UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓXICA E CIENCIAS FORENSES

TESIS DOCTORAL

EVALUACIÓN DE HER2, TOPOISOMERASA 2 ALFA Y KI67 POR TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN *IN SITU* (DuoCISH vs. FISH) E INMUNOHISTOQUÍMICA EN CÁNCER DE MAMA

OLGA PRIETO GÓMEZ

Santiago de Compostela, 2014

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Los Dres. Tomás García-Caballero Parada, Catedrático de Histología de la Universidad de Santiago de Compostela, Máximo Fraga Rodríguez, Catedrático de Anatomía Patológica de la Universidad de Santiago de Compostela, y José Ramón Antúnez López, Jefe de Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela,

HACEN CONSTAR:

Que la Tesis Doctoral que lleva por título "EVALUACIÓN DE HER2, TOPOISOMERASA 2 ALFA Y KI67 POR TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN *IN SITU* (DuoCISH vs. FISH) E INMUNOHISTOQUÍMICA EN CÁNCER DE MAMA"**,** fue realizada bajo su dirección por la Licenciada en Medicina y Cirugía Olga Prieto Gómez y reúne todos los requisitos para ser presentada y defendida para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Santiago de Compostela.

Santiago de Compostela, 22 de mayo de 2014

Dr. T. García-Caballero *Dr. M. Fraga* *Dr. J.R. Antúnez.*

O. Prieto Gómez

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

"*El estudio y, en general, la búsqueda de la verdad y la belleza conforman un área donde podemos seguir siendo niños toda la vida*"
(Albert Einstein).

A mi madre.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi gratitud al Prof. Tomás García-Caballero, Catedrático de Histología de la Universidad de Santiago de Compostela, por su asesoramiento técnico, consejos prácticos, supervisión continuada y apoyo moral sin el que no se habría concluido el presente trabajo. Sobre todo por SU PACIENCIA INFINITA, ejerciendo de corrector del manuscrito final, que nunca es final por algún detalle. Muchas gracias Tomás por haber confiado en mí.

Al Prof. Máximo Fraga Rodríguez y al Dr. José Ramón Antúnez López, compañeros y amigos del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, que además de unos excelentes profesionales y modelos a seguir en investigación, con una enorme capacidad de trabajo, son unas buenas personas, y tienen "un gran sentido del humor", por ello para mí ha sido un gran privilegio haber podido trabajar con ellos.

Muy especialmente, quiero agradecer a Ángel Vázquez Boquete, Técnico de Anatomía Patológica y Diplomado en Enfermería, las muchas horas de ayuda que me ha dedicado, de su tiempo libre, en la elaboración de las tablas, formateo del manuscrito y toma y selección de las fotografías histológicas que ilustran esta Tesis.

A Patricia Viaño, Técnico de Anatomía Patológica, y próximamente Diplomada en Enfermería, por su ayuda (siempre con una sonrisa) y a María Otero por su ayuda y "confidencias".

Al Dr. Francisco Gude por sus explicaciones sobre la importancia del estudio estadístico.

A todos mis compañeros y compañeras del Servicio de Anatomía Patólogica del Complexo Hospitalario de Pontevedra (especialmente a la Dra. Rosa Pardavila Gómez y al Dr. Juan Alcázar Otero, que recientemente nos ha dejado), todos ellos han contribuido con sus conocimientos, paciencia y amistad, a través de casi 30 años, a mi formación en Anatomía Patológica.

A mi padre, Dr. Antonio Prieto Bouza, por enseñarme a transformar el trabajo en “algo divertido” aunque no siempre lo he conseguido.

A mi hermana Cristina por su ayuda constante, principalmente con mis problemas con el ordenador.

A toda mi familia, a Carlos y a todos mis amigos, que me han animado, insistentemente (por ejemplo, “tomando una cervecita” cuando llegaba de Santiago), para llevar a cabo el presente trabajo.

Y por supuesto a Iago.

Los agradecimientos serían una “Historia Interminable”. De todos he aprendido y de todos hay algo en esta Tesis.

Para terminar no puedo olvidarme de Pilar Victoria González Castro y de todas las mujeres valientes que han luchado hasta el final contra el cáncer de mama, ellas han sido el principal motivo de la realización de este trabajo.

ÍNDICE

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Índice:

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 15

I.1. INCIDENCIA DEL CÁNCER DE MAMA 17

I.2. ETIOLOGÍA 20

I.3. TIPOS HISTOLÓGICOS DE CARCINOMA DE MAMA 23

I.3.1. CARCINOMA INVASIVO DE TIPO NO ESPECÍFICO 24

I.3.2. CARCINOMA DE TIPO MIXTO 26

I.3.3 TIPOS ESPECIALES DE CARCINOMA DE MAMA 26

I.3.3.a. Carcinoma lobulillar infiltrante 26

I.3.3.b. Carcinoma tubular 31

I.3.3.c. Carcinoma cribiforme invasivo 33

I.3.3.d. Carcinoma con características medulares 35

I.3.3.e. Carcinomas productores de mucina 37

I.3.3.f. Carcinoma con diferenciación neuroendocrina 41

I.3.3.g. Carcinoma papilar invasivo 42

I.3.3.h. Carcinoma micropapilar invasivo 43

I.3.3.i. Carcinoma con diferenciación apocrina 45

I.3.3.j. Carcinoma metaplásico 47

I.3.4. VARIANTES MORFOLÓGICAS RARAS DE CARCINOMA INVASIVO 49

I.3.4.a. Carcinoma pleomórfico 56

I.3.4.b. Carcinoma con células gigantes tipo osteoclástico 50

I.3.4.c. Carcinoma con características de coriocarcinoma 51

I.3.4.d. Carcinoma con características melanóticas 51

I.3.4.e. Carcinomas tipo glándulas salivales/anexiales de la piel 52

I.3.4.f. Carcinoma adenoide quístico 53

I.3.4.g. Carcinoma mucoepidermoide 55

I.3.4.h. Carcinoma polimórfico. 56

I.3.5. FORMAS EXCEPCIONALMENTE RARAS Y VARIANTES DE CARCINOMA INVASIVO 56

I.3.5.a. Carcinoma secretor 56

I.3.5.b. Carcinoma oncocítico 57

I.3.5.c. Carcinoma sebáceo 58

I.3.5.d. Carcinoma rico en lípidos 59

I.3.5.e. Carcinoma de células ricas en glucógeno 59
I.3.5.f. Carcinoma de células acinares 61
I.4. CLASIFICACIÓN MOLECULAR 62
I.4.1. TIPO LUMINAL 63
I.4.1.a. Luminal A 63
I.4.1.b. Luminal B 63
I.4.2. TIPO HER2 POSITIVO 64
I.4.3. TIPO TRIPLE NEGATIVO 64
I.4.4. TIPO BAJO EN CLAUDINA 66
I.4.5. TIPO SIMILAR AL TEJIDO MAMARIO NORMAL 67
I.5. CARCINOMA HEREDITARIO 68
I.6. FACTORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS 70
I.6.1. FACTORES PRONÓSTICO TRADICIONALES 71
I.6.1.a. Estado ganglionar 71
I.6.1.b. Ganglio centinela 74
I.6.1.c. Tamaño tumoral 75
I.6.1.d. Tipo histológico 77
I.6.1.e. Grado histológico 77
I.6.1.f. Invasión vascular 78
I.6.2. RECEPTORES HORMONALES 79
I.6.3. Ki67 81
I.7. HER2 86
I.7.1. HER2 COMO FACTOR PRONÓSTICO 88
I.7.2. HER2 Y RECEPTORES HORMONALES 91
I.7.3. HER2 COMO FACTOR PREDICTIVO 92
I.7.4. HER2 Y NUEVOS FÁRMACOS 95
I.7.5. HER2 Y OTROS TUMORES 96
I.7.6. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE HER2 97
I.7.6.a. Inmunohistoquímica 97
I.7.6.b. Hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) 100
I.7.6.c. Hibridación *in situ* cromogénica (CISH) 104
I.7.6.d. Hibridación *in situ* con amplificación argéntica (SISH) 108
I.7.6.e. Otros métodos 108
I.8. TOPOISOMERASA 2 ALFA 110

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS 113

III. MATERIAL Y MÉTODOS 119

III.1. PACIENTES Y MUESTRAS 121

III.1.1. MUESTRAS PARA ANÁLISIS DE HER2 121

III.1.2. MUESTRAS PARA ANÁLISIS DE TOP2A MEDIANTE FISH Y DUOCISH 122

III.1.3. MUESTRAS PARA ANÁLISIS COMPARATIVO DE TOP2A Y KI67 MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA 124

III.1.4. MUESTRAS PARA ANÁLISIS COMPARATIVO DE TOP2A MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA Y DUOCISH 125

III.2. INMUNOHISTOQUÍMICA 126

III.2.1. KI67 Y TOP2A 126

III.2.2. ANÁLISIS DE IMAGEN 127

III.3. HIBRIDACIÓN IN SITU 128

III.3.1. HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE (FISH) PARA HER2 128

III.3.2. HIBRIDACIÓN IN SITU CROMOGÉNICA DE DOBLE COLOR (DUOCISH) PARA HER2 129

III.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO 132

IV. RESULTADOS 133

IV.1. CORRELACIÓN ENTRE HER2 DETERMINADO MEDIANTE HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE (FISH) E HIBRIDACIÓN *IN SITU* CROMOGÉNICA (DUOCISH) 135

IV.2. CORRELACIÓN ENTRE TOP2A DETERMINADO MEDIANTE HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH) E HIBRIDACIÓN *IN SITU* CROMOGÉNICA (DUOCISH) 144

IV.3. EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE TOP2A E ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN CELULAR KI67 154

IV.4. CORRELACIÓN ENTRE TOP2A DETERMINADA MEDIANTE INMUNO-HISTOQUÍMICA E HIBRIDACIÓN *IN SITU* CROMOGÉNICA (DUOCISH) 161

V. DISCUSIÓN 167

V.1. CORRELACIÓN ENTRE HER2 DETERMINADO MEDIANTE HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH) E HIBRIDACIÓN *IN SITU* CROMOGÉNICA (DUOCISH) 169

V.2. CORRELACIÓN ENTRE TOP2A DETERMINADO MEDIANTE HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE (FISH) E HIBRIDACIÓN *IN SITU* CROMOGÉNICA (DUOCISH) 173

V.3. EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE TOP2A E ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN CELULAR KI67 177
V.4. CORRELACIÓN ENTRE TOP2A DETERMINADA MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA E HIBRIDACIÓN *IN SITU* CROMOGÉNICA (DUOCISH) 181

VI. CONCLUSIONES 185

VII. BIBLIOGRAFÍA 189

VIII. ANEXO 249

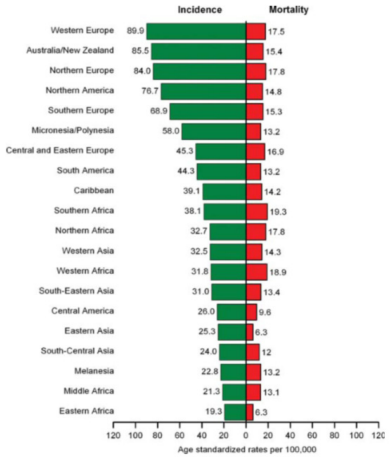
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

I.1. INCIDENCIA DEL CÁNCER DE MAMA

Según el IARC *(International Agency for Reseach on Cancer*) del año 2008, el cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente en las mujeres y su primera causa de muerte por cáncer en todo el mundo. Constituye el 23% del total de nuevos casos de cánceres en mujeres, y el 14% del total de muertes por cáncer en 2008 (Jemal y cols., 2011).



Ratios de incidencia y mortalidad en cáncer de mama ajustados por edad en el mundo (GLOBOCAN 2008). Tomado de Jemal y cols., 2011.

Como en la mayoría de los tumores epiteliales, la incidencia de cáncer de mama aumenta con la edad. Las áreas de mayor riesgo de padecer cáncer de mama son Europa, Australia, y Norteamérica donde el 6% de la población desarrollará cáncer de mama antes de los 75 años; la incidencia es baja en África Subsahariana y zonas del sudeste y este de Asia (incluido Japón), en donde la probabilidad de padecer cáncer de mama antes de los 75 años es un tercio de la incidencia en los países más desarrollados.

Estudios de variaciones geográficas y de emigración de poblaciones de países de bajo riesgo a alto riesgo demuestran que después de dos generaciones el riesgo se iguala al del país de alto riesgo, lo que sugiere la importancia de los factores ambientales en la etiología de esta enfermedad.

El riesgo de padecer cáncer de mama se incrementó en la década de los 80. Desde el año 2005, en Europa y Estados Unidos se ha observado un descenso de la incidencia de la enfermedad probablemente debido a la disminución del tratamiento hormonal sustitutivo.

El pronóstico de la enfermedad es bueno si se detecta en estadio precoz. Se han visto avances importantes en el tratamiento en la década de los 90 debido al cribado mamográfico, tratamiento hormonal y de quimioterapia (especialmente en la introducción de la segunda y tercera generación de quimioterapia) e inhibidores de la aromatasa. Como resultado, durante los pasados diez años la mortalidad por cáncer de mama ha disminuido en Australia, Canadá y Estados Unidos, aunque ha aumentado en Japón, República de Corea, y Rusia (Colditz y Chia, 2012).

En la Unión Europea en el año 2006 se diagnosticaron 319.900 casos nuevos de cáncer de mama, que representan el 30,9% de cáncer en las mujeres. Las tasas de incidencia más altas se dan en Bélgica, Irlanda, Holanda, Francia y Suecia (con tasas superiores a 125 por 100.000 mujeres) y las más bajas en países de Europa del Este (Letonia, Lituania y Eslovaquia), con tasas inferiores a 70 por 100.000. España tiene una tasa de incidencia media: 93,6 por 100.000. En el año 2006 se estima que hubo 85.300 muertes por esta causa, con una tasa de mortalidad estandarizada por edad de población de 25 por 100.000 mujeres, destacando países como Dinamarca, Bélgica y Hungría con tasas superiores a 30 por cada 100.000 mujeres, mientras que en España la tasa de mortalidad es más baja (19,2 por 100.000 mujeres). Durante el año 2005 se registraron en España 18,58 muertes por 100.000 mujeres (Bevers y cols., 2009). Según los datos de la Asociación Española Contra el Cáncer (*todocancer.org; AECC),* considerando los dos sexos, el cáncer de mama es el cáncer más frecuente en el mundo después del de pulmón, y su incidencia aumenta con el nivel socioeconómico.

Según los datos obtenidos del Registro de Mortalidad de Galicia, el cáncer de mama sigue siendo la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres en nuestra Comunidad. En el año 2005 se registraron 430 muertes por esta causa, correspondiendo el 21,48% a mujeres de entre 50 y 64 años y el 67,26% a mujeres

mayores de 65 años (Dirección Xeral de Saúde Pública), siendo la tasa de mortalidad de 19,38 (tasa estandarizada para la población europea) *(datos obtenidos de la Dirección Xeral de Saude Pública. Servicio de Información sobre Saúde Pública. Mortalidade en Galicia 2005. Santiago de Compostela, Conselllería de Sanidade. Documento interno).*

En Galicia, desde la Dirección Xeral de Saúde Pública, en colaboración con la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC), se puso en marcha en el año 1992 el "*Programa galego de detección precoz do cancro de mama*" que, desde el año 1998 cubre al 100% de la población y tiene como objetivo reducir la mortalidad por cáncer de mama en las mujeres de entre 50 y 64 años, ampliándose paulatinamente hasta los 69 años a partir de 2005. La prueba básica del cribado es la mamografía, que se realiza cada dos años. Los resultados del año 2007 mostraron 304 casos de cáncer de mama en las 109.580 mujeres exploradas, lo que significa 2,77 casos por cada 1.000 mujeres exploradas (*Data de cálculo: 30/08/2009. Servicio de programas poboacionais de cribado. DXSPP).*

Tanto el número de casos como las tasas de incidencia aumentan, probablemente debido al envejecimiento de la población y al diagnóstico precoz de la lesión. La supervivencia del cáncer de mama en España se sitúa en el 76%, y es similar a la de países muy desarrollados como Islandia o EEUU. La supervivencia ha mejorado notablemente en la última década pero, a pesar de una mejora significativa en el diagnóstico precoz y tratamiento del cáncer de mama, que ha supuesto una mejor tasa de supervivencia a los cinco años, muchas mujeres presentan recidivas y finalmente mueren de enfermedad metastásica. El fracaso del tratamiento se debe a que muchas veces el cáncer es resistente a los tratamientos convencionales.

En general, la mortalidad por cáncer de mama ha disminuido en todo el mundo desarrollado. En España, la mortalidad por cáncer de mama comienza a descender en el año 1992, a un ritmo del 2% anual. Este descenso se observa en todos los grupos de edad, siendo éste de mayor magnitud en el grupo de mujeres menores de 45 años ya que se detecta antes. Sin duda, un factor determinante en esta mejora han sido los nuevos tratamientos adyuvantes tras la cirugía en tumores primarios. Un

descenso similar aparece en mujeres entre 45 y 64 años, que además se habrían beneficiado de la detección temprana de tumores palpables (Cabanes y cols., 2009).

I.2. ETIOLOGÍA

La etiología del cáncer de mama es multifactorial: la alimentación, factores reproductivos, y factores hormonales que ya comienzan a afectar en la vida intrauterina y continúan a lo largo de la vida con la exposición a múltiples factores que modulan el riesgo de padecer la enfermedad (Lee y cols., 2008). Según los datos epidemiológicos, el cáncer de mama es una enfermedad "del modo occidental de vida":

1) La alimentación (dieta hipercalórica, rica en grasas y proteínas animales) y el sobrepeso.

2) Vida sedentaria: La actividad física es especialmente beneficiosa después de la menopausia y para controlar el sobrepeso (Colditz y Chia, 2012)

3) Sobrepeso: la disminución de la actividad física tiene como consecuencia metabólica el desarrollo de una resistencia a la insulina. Los niveles elevados de insulina dan lugar a un incremento de síntesis de hormonas esteroideas ováricas y/o adrenales, particularmente de andrógenos, y disminuye la síntesis hepática y los niveles circulantes de globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) (Kaaks, 1996). En mujeres posmenopáusicas, por aumento de la acción de la aromatasa periférica sobre los andrógenos en el plasma, se produce un incremento de la formación de estrógenos circulantes, especialmente el estradiol no ligado a proteínas. Así se plantea la hipótesis de que una hiperinsulinemia crónica puede explicar la observación de un mayor riesgo de padecer cáncer de mama en mujeres con niveles plasmáticos bajos de SHBG y niveles altos de estrógenos y andrógenos (Moore y cols., 1987; Kaaks, 1996).

3) Antecedentes familiares: como en otros cánceres se ha demostrado alteración genética. Se han identificado los genes de alta penetrancia BRCA1 y BRCA2. Las mujeres portadoras de estos genes tienen una probabilidad de hasta el 60-80% de desarrollar cáncer de mama a lo largo de su vida. Sin embargo, estos dos genes solo explican una pequeña proporción de los cánceres familiares (Cabanes y cols., 2009). Recientemente ei estudio de asociación del genoma completo GWAS identifica genes adicionales y polimorfismos que son de baja o media penetrancia e implican bajo riesgo. Algunos autores asocian el ejercicio físico con una disminución del riesgo de padecer cáncer de mama en mujeres con antecedentes familiares y portadoras de mutación BRCA1 y BRCA2 (Pijpe y cols., 2010).

4) Hormonas: Factores reproductivos que incrementan el riesgo de padecer cáncer de mama como la historia menstrual larga, nuliparidad, tratamiento hormonal en la posmenopausia, o el uso de contraceptivos (Jemal y cols., 2011). La infertilidad y la ausencia de lactancia son factores que aumentan el riesgo, por el contrario un embarazo antes de los treinta años y una lactancia prolongada parece que son factores que disminuyen el riesgo (Rosner y cols., 1994; Lööf-Johanson y cols., 2010). Estudios epidemiológicos demuestran relación entre las hormonas esteroideas (andrógenos, estrógenos y progesterona) y el cáncer de mama: la incidencia de cáncer de mama aumenta mas rápidamente antes de la menopausia que después de la misma, en la que cesa la producción de estrógenos y progesterona por los ovarios y disminuye gradualmente la producción de andrógenos (Colditz y Chia, 2012).

El efecto protector de una menopausia temprana para padecer carcinoma de mama demuestra que las hormonas ováricas incrementan el riesgo de padecer cáncer de mama. Se cree que el mecanismo consiste en la estimulación de la división celular ya que la cifra de mitosis de las células mamarias es mayor en la fase progesterónica (o luteínica) del ciclo menstrual que en la fase folicular, sugiriendo que los estrógenos y progesterona juntos inducen más mitosis que solo los estrógenos (Key y Pike, 1988). Otra teoría postula que solo son los estrógenos los responsables de inducir las mitosis, y que la progesterona no tiene efecto. Ambas hipótesis concuerdan con los

efectos conocidos de historia reproductiva, obesidad, contraceptivos orales y terapia sustitutiva, que aumentan el riesgo de padecer cáncer de mama, sugiriéndose que puede reducirse el riesgo retrasando el comienzo del ciclo menstrual y minimizando el uso de terapia hormonal sustitutiva en mujeres posmenopáusicas (Moore y cols., 1987, Key y Pike, 1988).

El trabajo de Beral en el Reino Unido, sobre un millón de mujeres, confirma la relación entre los estrógenos y el riesgo de padecer cáncer de mama en la menopausia (Beral, 2003; Beral y cols., 2011).

Datos recientes de la WHO (*World Health Organization*) demuestran una elevación de la mortalidad de cáncer de mama en mujeres a las que se han administrado combinaciones de estrógenos y progesterona (Chlebowski y cols., 2003). Así, la IARC (*International Agency for Research on Cancer*) concluye que la combinación de estrógenos y progesterona es carcinogénica en la especie humana (IARC Working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 2007).

6) Otros factores:

- Consumo de alcohol y tabaco (Cabanes y cols. 2009; Jemal y cols., 2011).
- Tomar té verde con regularidad: principalmente en mujeres jóvenes, parece que retrasa la aparición de cáncer de mama, como se refleja en un estudio sobre 74.942 mujeres de Shanghai, en el que se sugiere que los polifenoles del té verde inhiben la acción de la aromatasa, una enzima clave para convertir los andrógenos en estrona o estradiol (Dai y cols., 2010).
- Exposiciones ambientales:
  - Estudios sobre las explosiones nucleares en Hiroshima y Nagasaki indican una mayor incidencia de cáncer de mama principalmente en mujeres que fueron afectadas alrededor de la pubertad (Tokunaga y cols., 1987).
  - Exposición a radiaciones por fluoroscopia para diagnóstico de tuberculosis (Boice y cols., 1991).
  - Sustancias como herbicidas e hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) que afectan a la producción y metabolismo de los estrógenos y

funcionan como xenoestrógenos, lo que produce un mayor riesgo de padecer cáncer de mama (Davis y cols., 1993).

- El cáncer de mama también se relaciona con el estrés y es más frecuente en mujeres ejecutivas y administrativas (Calle y cols., 1998).
- Hay trabajos que relacionan el aumento del riesgo con los trastornos del ritmo circadiano en mujeres que trabajan de noche, se basa en la supresión de la producción normal de melatonina por la glándula pineal, e incremento de producción de estrógenos por los ovarios (Davis y cols., 2001).

En los países económicamente desarrollados la incidencia del cáncer aumenta por el estilo de vida (consumo de tabaco, inactividad física y dietas occidentalizadas). Puede disminuirse la incidencia de cáncer con campañas de salud públicas para el control del consumo de tabaco, campañas de vacunación (cáncer cuello de útero o hígado) y con la promoción de la actividad física y una dieta saludable. La mortalidad se disminuye con campañas de detección y tratamiento precoz del cáncer (Jemal y cols., 2011). Como estrategia para reducir el riesgo de padecer cáncer de mama se debe controlar el peso, incrementar la actividad física y minimizar el consumo de alcohol (Jemal y cols., 2011).

I.3. TIPOS HISTOLÓGICOS DE CARCINOMA DE MAMA

El carcinoma de mama constituye un grupo heterogéneo de lesiones. La mayoría de ellas son adenocarcinomas. Su clasificación histopatológica está basada en el patrón de crecimiento y características citológicas del tumor. Aunque la mayoría de los tumores se denominan “ductales” y “lobulillares” esta distinción no indica el lugar de origen en el sistema mamario ductal del tumor. Independientemente de su tipo histológico, la mayoría de los cánceres infiltrantes comienzan en la unidad ducto-lobulillar terminal.

La clasificación de la OMS define 21 tipos histológicos y variantes especiales de cáncer de mama, que constituyen un 25-35% de los casos. El resto se incluye dentro del carcinoma ductal infiltrante de tipo no específico (NST, "*no specific type"*).

I.3.1. CARCINOMA INVASIVO DE TIPO NO ESPECÍFICO

El carcinoma invasivo de tipo no específico (NST), conocido generalmente como carcinoma ductal infiltrante de tipo no específico, es el más frecuente de los tumores infiltrantes de mama, constituyendo entre el 40% y 75% de los casos. Se trata de un grupo heterogéneo de tumores, que no cumplen las características específicas para clasificarlos en un tipo histológico específico, como por ejemplo el carcinoma tubular o lobulillar (Ellis y cols., 2012).

Este tipo histológico se ha denominado de diferentes maneras: carcinoma invasivo de tipo no específico (ductal NST), carcinoma invasivo no específico (ductal NOS), o carcinoma ductal infiltrante. Históricamente se le ha denominado también como carcinoma escirroso, carcinoma simple y carcinoma esferoidal. El término "ductal" puede dar lugar a pensar en un origen en el epitelio ductal del tumor, diferente del origen del carcinoma lobulillar que, también debido a su nombre, puede llevar a pensar que se origina en el epitelio lobulillar. Pero se sabe que el origen de la mayoría de los carcinomas mamarios está en la unidad terminal ductolobulillar. Internacionalmente ha ido aceptándose el término de "Carcinoma de tipo no específico" (NST) (Ellis y cols., 2012).

Como todas las formas de carcinoma de mama, es rara su presentación antes de los 40 años, pero la proporción de tumores de este tipo diagnosticados en mujeres jóvenes es similar a los de ancianas. Entre los factores de riesgo generales (geográficos, culturales, estilos de vida y variables reproductivas) no hay diferencias reconocidas entre cáncer de mama en general y carcinomas invasivos NST. Se observa un incremento del riesgo de desarrollar carcinoma en patologías mamarias como hiperplasia atípica y neoplasia lobulillar, pero en estos casos el carcinoma invasivo NST es menos frecuente que en tumores de tipo específico como el carcinoma tubular o el carcinoma lobulillar de tipo clásico.

Clínicamente se presenta como un tumor palpable y/o anormalidad mamográfica. Mamográficamente lo más frecuente son las masas espiculadas con o sin microcalcificaciones.

Macroscópicamente no tienen características específicas. Su tamaño oscila entre <10 mm y >100 mm, son estrellados, irregulares o nodulares, con bordes mal definidos. Son firmes a la palpación y "rasposos" al corte, con una superficie de corte blanquecino-grisácea con frecuentes estrías amarillentas.

Microscópicamente varían ampliamente de caso a caso. Definir este tipo histológico de carcinoma de mama es esencial para excluir los tipos específicos. Las características morfológicas varían considerablemente según los casos. Los márgenes del tumor pueden ser expansivos o muy infiltrativos permeando el estroma lobular y alterando la arquitectura normal lobulillar. Las células epiteliales se disponen arquitecturalmente en cordones, grupos y trabéculas, con abundante estroma que puede ser muy celular de tipo fibroblástico o con marcada hialinización; otros tumores se disponen en patrón sincitial o sólido con poco estroma.

Existe una diferenciación tubular variable en los grupos celulares que se disponen alrededor de una luz central. Los túbulos están desprovistos de membrana basal y de la capa de células mioepiteliales que se dispone entre las células epiteliales y la membrana basal en los conductos mamarios normales. Las células también pueden disponerse infiltrando en "fila india" o "en diana", pero sin mostrar las características morfológicas del carcinoma lobulillar. Puede haber focos de necrosis que pueden ser extensos y que también pueden dar lugar a la formación de quistes. Las células neoplásicas presentan un aspecto también variable, desde poca desviación de la célula epitelial mamaria normal a células con marcado pleomorfismo y atipia nuclear. El citoplasma puede ser abundante y eosinófilo. La actividad mitótica es variable, de casi ausente a muy abundante. En algunos casos puede observarse infiltración linfoplasmocitaria en el estroma.

Se asocia a carcinoma intraductal en el 80% de los casos. El carcinoma intraductal asociado es generalmente del mismo grado nuclear que el carcinoma

invasivo. En algunos tumores no hay componente intraductal y en otros predomina el componente intraductal sobre el infiltrante. En este sentido, algunos histopatólogos incluyen como subtipo el "carcinoma ductal infiltrante con extenso componente intraductal". El componente estromal es extremadamente variable desde una proliferación muy celular fibroblástica, a estroma con poca celularidad o marcada hialinización. Pueden verse focos de elastosis de distribución periductal o perivenosa. También pueden observarse en el tumor émbolos vasculares pero solo los localizados por fuera del tumor tienen efecto pronóstico (Ellis y cols., 2012).

I.3.2. CARCINOMA DE TIPO MIXTO

Para que un tumor sea clasificado como de tipo NST debe tener más del 50% del tumor de tipo no específico. Si el tipo NST constituye entre el 10 y 49% de la masa tumoral, se le considera de tipo mixto y deben especificarse los tipos de tumor que lo constituyen.

I.3.3. TIPOS ESPECIALES DE CARCINOMA DE MAMA.

I.3.3.a. Carcinoma lobulillar infiltrante

Se define como un carcinoma invasivo constituido por células poco cohesivas, dispuestas individualmente o con patrón en "fila india", incluidas en estroma fibroso y que generalmente se asocian a carcinoma lobulillar *in situ*.

Representa el 5-15% de los tumores infiltrantes de la mama, y es el segundo más frecuente. Desde los años 80 su incidencia ha aumentado relativamente con respecto al carcinoma de tipo no específico, lo que puede ser debido al aumento del tratamiento hormonal sustitutivo o al incremento en el consumo de alcohol. La media de edad es de 57-65 años, ligeramente superior a la del carcinoma infiltrante no específico (Lakhani y cols., 2012).

Se caracteriza por su multifocalidad y es bilateral más frecuentemente en comparación con otros tipos de cáncer infiltrante (el porcentaje de bilateralidad oscila entre el 6% y el 47%). Sin embargo, algunos estudios muestran que la incidencia de

bilateralidad es similar a pacientes con carcinoma ductal infiltrante (Schnitt y Collins, 2009).

La mayoría de las pacientes presentan una masa palpable, mal definida, en cualquier lugar de la mama, aunque algunos trabajos refieren mayor frecuencia en las zonas centrales de la mama en comparación con el carcinoma ductal infiltrante. Radiológicamente se detecta como masas espiculadas o distorsión arquitectural, y las microcalcificaciones son menos frecuentes que en el carcinoma ductal infiltrante. Comparado con el carcinoma ductal invasivo la mamografía tiene menos sensibilidad diagnóstica con una cifra de falsos negativos cerca al 19%. En este caso la ecografía es más sensible (78-95%), aunque esta técnica puede infravalorar el tamaño del tumor. El método radiológico que más ayuda en el diagnóstico es la resonancia magnética, especialmente en lesiones multifocales, aunque esta técnica puede dar falsos positivos y sobrestimar el tamaño del tumor (Lakhani y cols., 2012).

Son tumores macroscópicamente irregulares y mal definidos debido al patrón de crecimiento difuso de las células tumorales. El diámetro medio es dificil de determinar y en algunas series se describe como algo mayor que el del carcinoma ductal infiltrante (Lakhani y cols., 2012).

Microscópicamente se describen diferentes subtipos:

I) Clásico. Se caracteriza por células de pequeño tamaño, poco cohesivas, que aparecen dispersas individualmente en un tejido conjuntivo fibroso o infiltrando en “fila india”, con frecuencia de manera concéntrica alrededor de un conducto. Tienen poca reacción tisular del huésped y no alteran mucho la arquitectura mamaria. Las células tienen un núcleo redondeado u ovoide, indentado, y escaso citoplasma con ocasionales luces intracitoplasmáticas, que a menudo tienen una inclusión central mucoide, a veces con morfología en anillo de sello. Las mitosis son infrecuentes. Con frecuencia es multifocal, observándose focos neoplásicos separados por tejido mamario normal. Esta forma clásica se asocia al 58-98% de los casos de carcinoma lobulillar *in situ*.

Variantes histológicas:

2) Sólido: Las células neoplásicas forman sábanas y pueden plantear diagnóstico diferencial con otras lesiones como por ejemplo el linfoma. Con frecuencia las células tienen núcleos de alto grado (Hanby y Hughes, 2008).

3) Alveolar: Las células se disponen en agregados globulares de al menos veinte células con la misma morfología del patrón clásico. Semejan la neoplasia lobulillar *in situ,* pero no tienen capa basal/mioepitelial ni membrana basal. Son receptores de estrógenos positivos (Shousha y cols., 1986; Hanby y Hughes, 2008).

4) Pleomórfico: Son tumores con frecuencia multifocales, de células poco cohesivas, de núcleos irregulares, y con más mitosis que en la forma clásica. El tamaño de los núcleos es mayor que en la forma clásica, al menos algún núcleo debe tener 4 veces el tamaño de un linfocito (Chen y cols., 2009). Con frecuencia se asocia a carcinoma lobullillar in situ con células similares a las del componente infiltrante. Puede ser de tipo apocrino o histiocitoide (Chen y cols., 2009), y hasta en el 29% de los casos pueden verse células con morfología en anillo de sello (Lakhani y cols., 2012). Tienen peor pronóstico. Tienden a aparecer en mujeres posmenopáusicas, y pueden presentarse como enfermedad localmente avanzada. En cuanto a los receptores hormonales pueden ser positivos o negativos, pero comparándolos con el tipo clásico son con más frecuencia receptores hormonales negativos. Tienen mayor índice de proliferación celular con el Ki67 y mayor índice de amplificación de HER2 (Chen y cols., 2009). Los tumores que son HER2 positivos pueden ser también receptores hormonales positivos (Middleton y cols., 2000). Con frecuencia son positivos para p53, citoqueratinas de alto peso, y a veces para cromogranina (Hanby y Hughes, 2008).

Existe controversia sobre si se origina en la misma vía genética del carcinoma lobulillar o se trata de un carcinoma ductal de alto grado que pierde la cadherina-E. En estudios de carcinoma lobulillar pleomórfico con inmunohistoquímica, hibridación *in situ* cromogénica, hibridación genómica

comparativa de alta resolución (CGH) y CGH basada en micromatrices tisulares (arrays) se observa que todas las lesiones pierden la cadherina-E y la catenina-beta y muestran ganancias de 1q y pérdida de 16q, que son características típicas de carcinoma lobulillar, y que no se ven en carcinomas ductales de alto grado. Estos estudios demuestran que por lo menos algunos carcinomas lobulillares pleomórficos tienen el mismo precursor o el mismo componente genético que el carcinoma lobulillar de tipo clásico. Además en alguno de estos casos se detecta amplificación de c-myc y HER2, que pueden ser responsables del mal pronóstico de estos tumores (Palacios y cols., 2003 b; Reis-Filho y cols., 2005 b).

5) Tubulolobulillar: Representa menos del 3% de los casos. Se caracteriza por presentar el patrón en fila india de la forma clásica, pero también pequeños túbulos. En un tercio de los casos se asocia a carcinoma lobulillar *in situ*. En algunos casos la cadherina E es positiva tanto en las zonas de patrón tubular como en las zonas de células sueltas de aspecto lobulillar, similar a algunos carcinomas de alto grado con células discohesivas, pero el carcinoma ductal raramente muestra mutaciones específicas en el gen de la cadherina-E, e incluso en estos casos no se altera la inmunorreactividad de membrana con la técnica de inmunohistoquímica de cadherina-E. Este patrón discohesivo puede ser debido a otras alteraciones que conducen a rotura de las uniones de células epiteliales, y quizás como resultado un incremento en la capacidad invasiva y metastásica. También se ha detectado en estos carcinomas una pérdida de la claudina 7, miembro de la familia de las claudinas, que son proteínas de unión celular. Esto puede demostrarse comparando lesiones ductales de alto grado con lesiones de bajo grado y con epitelio mamario no neoplásico. Además, la existencia en los carcinomas tubulolobulillares de otros factores relacionados con la invasión como las metaloproteinasas de matriz (enzimas así llamadas por necesitar átomos de cinc o de calcio y que descomponen proteínas de la matriz celular) puede ayudar a explicar el relativo incremento de las metástasis en casos de carcinoma tubulolobulillar (16% de pacientes tienen metástasis ganglionares) comparado con el carcinoma tubular (Esposito y cols., 2007).

Los casos de carcinomas tubulolobulillares cadherina-E positivos deberían denominarse “carcinoma ductal variante tubulolobulillar” o “carcinoma ductal con patrón tubulolobulillar” (Esposito y cols., 2007). Los casos cadherina-E negativos pueden considerarse variantes de carcinoma lobulillar. La mayoría de los carcinomas lobulillares son grado 1, según el método combinado de Scarff, Bloom y Richardson (Bloom y Richardson, 1957). Es importante no confundirlos con los carcinomas mixtos tubular y lobulillar (Wheeler y cols., 2004, Schnitt y Collins, 2009).

La mayoría de los carcinomas lobulillares son receptores hormonales positivos: 70-95% positivos para estrógenos y 60-70% para progesterona. La alteración genética más importante, que se encuentra entre el 63 y 87% de los casos, es una pérdida en el brazo largo del cromosoma 16q, y ganancia de material en 1q y 16p, pero se han identificado otras alteraciones mas heterogéneas: ganacias (8q), amplificaciones (1q32, 8p12-p11.2, 11q13) y pérdidas (8p23-p21, 11q14.1-q25, 13q). El gen cadherina-E (epitelial) que se localiza en 16q22 está implicado en mantener la cohesión celular de los tejidos epiteliales adultos y actúa como diferenciación celular y factor supresor de invasión. Se ha demostrado una correlación entre la deleción del 16q y la pérdida de cadherina-E. El carcinoma lobulillar de tipo pleomórfico tiene alteraciones cromosómicas similares, pero además contiene amplificaciones de locus 8q24, 17q12 y 20q13, que son características de carcinoma invasivo de alto grado. Conviene recordar que en algunos casos con morfología de carcinoma lobulillar la técnica de inmunohistoquímica de cadherina-E puede ser positiva y si los datos morfológicos son de carcinoma lobulillar no debe reclasificarse como carcinoma ductal (Rakha y cols., 2010).

La mayoría de los carcinomas lobulillares se clasifican por estudios de perfil genético como Luminales A, pero también pueden ser de tipo Luminal B, HER2, de tipo mama normal, o triple negativos.

En cuanto al pronóstico comparándolo con el carcinoma ductal infiltrante, hay controversia: algunos autores describen mejor pronóstico, otros no encuentran

diferencias significativas, y otros autores observan un peor pronóstico para el carcinoma lobulillar. En las grandes series son tumores de mayor tamaño que los carcinomas ductales (>5cms), debutan con mayor estadío tumoral (estadío III/V) y con más metástasis ganglionares. En los primeros 10 años después del diagnóstico el pronóstico del carcinoma lobulillar es similar o mejor que el carcinoma ductal de tipo no específico, pero a largo plazo el pronóstico es peor, con mayor frecuencia de metástasis a distancia, recurrencias y mortalidad. El carcinoma lobulillar de tipo clásico presenta un mejor pronóstico comparado con el tipo pleomórfico y sólido. Las variantes tubulolobulillar y alveolar se consideran tumores de bajo grado.

Las metástasis del carcinoma lobulillar en ganglios linfáticos constituidas por células aisladas pueden confundirse con histiocitosis sinusal y requieren estudios de inmunohistoquímica para su detección. En el carcinoma lobulillar hay migración a huesos, tracto gastrointestinal, útero, meninges, ovario y afectación difusa de las membranas serosas; mientras que la afectación pulmonar es más frecuente en el carcinoma ductal infiltrante. Los estudios de inmunohistoquímica de GCDFP-15, citoqueratina 7, receptores de estrógenos y progesterona, y cadherina-E pueden ayudar a establecer el diagnóstico de metástasis de carcinoma lobulillar en un tumor intraabdominal (Lakhani y cols., 2012)

I.3.3.b. Carcinoma tubular

Es un tumor compuesto por estructuras tubulares bien diferenciadas de luces abiertas limitadas por una sola capa de células epiteliales y que se asocia a buen pronóstico. Constituye aproximadamente el 2% de los tumores invasivos en la mayoría de las series (Rakha y cols., 2012).

No tiene características clínicas que lo diferencien del carcinoma invasivo NST. Cuando se compara con el carcinoma invasivo de bajo grado suele ser más pequeño, y tiene con menos frecuencia infiltración linfovascular y ganglionar, lo que conlleva un buen pronóstico. Aproximadamente el 10-20% son multifocales. Se puede detectar por mamografía debido a su naturaleza espiculada y porque puede presentar calcificaciones, pero el 22-57% de los casos no muestran masa en la mamografía; aunque por ecografía puede verse como una masa hipoecoica con

bordes mal definidos y sombra acústica posterior. Con frecuencia se asocian a lesiones proliferativas epiteliales incluyendo carcinomas intraductales bien diferenciados, neoplasia lobulillar y atipia plana; también se ha descrito una asociación con cicatriz radial.

Macroscópicamente no se diferencian del tipo ductal infiltrante o de los tipos mixtos, excepto por su menor tamaño (generalmente mide entre 0,2 y 2 cm y la mayoría son de 1 cm o menos).

Microscópicamente se caracteriza por túbulos abiertos, ovales, redondeados o típicamente angulados, adoptando una morfología en lágrima, limitados por una sola capa de células epiteliales pequeñas, regulares con poco pleomorfismo y escasas mitosis. En un tercio de los casos se ven secreciones apicales hacia la luz de la célula. No hay células mioepiteliales, pero algunos túbulos pueden estar rodeados de capa incompleta de membrana basal. El componente epitelial se asocia a un estroma celular desmoplásico. Se pueden ver calcificaciones en el componente invasivo o en el *in situ*. El componente *in situ* es de bajo grado de tipo cribiforme o micropapilar, y ocasionalmente es de tipo lobulillar. Cuando se asocia a la atipia epitelial plana el carcinoma *in situ* es de tipo micropapilar. No hay consenso sobre el porcentaje de túbulos requerido para el diagnóstico de carcinoma tubular (entre el 75 y el 100%), aunque de manera práctica se acepta un 90% de diferenciación tubular. Los tumores con el 50-90% de diferenciación tubular y otros tipos de carcinoma se incluyen en el carcinoma de tipo mixto (Rakha y cols., 2012).

En el diagnóstico diferencial deben distinguirse de lesiones benignas como la adenosis esclerosante y la cicatriz radial, de las que se diferencia por su arquitectura y por que en estas lesiones las glándulas están rodeadas por una capa de células mioepiteliales que se demuestran por técnicas de inmunohistoquímica (calponina, p63, y otros marcadores de mioepitelio). Otra lesión benigna que puede confundirse con el carcinoma tubular es la adenosis microglandular, en la que las glándulas no están rodeadas por células mioepiteliales, pero presentan morfología redondeada y contienen secreción similar a coloide en su luz, a diferencia de la morfología angulada o en lágrima de las glándulas del carcinoma tubular. También deben

diferenciarse de otras formas de carcinoma como el carcinoma infiltrante de bajo grado, del que se distingue por la morfología angulada de las glándulas y el poco pleomorfismo celular, así como por presentar muy pocas mitosis. En cuanto al carcinoma tubulolobulillar se diferencia por la ausencia del componente de tipo lobulillar infiltrante de tipo clásico.

Este tipo de tumores son casi siempre positivos para receptores de estrógenos y progesterona, mientras que HER2 y EGFR suelen ser negativos. Tienen menos alteraciones genéticas que los otros tipos de carcinomas. Usando técnicas para el estudio de pérdida de heterozigosidad (LOH) y de hibridación genómica comparada (CGH) se ven con frecuencia alteraciones como pérdidas en 16q (78-86%) seguido por ganacia en 1q (50-62%), y que ocurren con frecuencia de manera concomitante. Otras alteraciones incluyen ganancias en 16p y pérdidas de 8p, 3p (gen FHIT) y 11q (locus del gen ATM). Aunque estas alteraciones cromosómicas son comunes a otros carcinomas de bajo grado (carcinomas invasivos de bajo grado y carcinoma lobulillares) pero, a diferencia del carcinoma invasivo de tipo no específico, es infrecuente observar alteraciones como pérdida de 17p. Estudios de perfil genético los incluyen en el tipo Luminal A.

El pronóstico es excelente en el carcinoma tubular puro y en algunas series es igual a mujeres sin cáncer. Es el candidato ideal para la cirugía conservadora, ya que son muy raras las recidivas por lo que algunos grupos consideran innecesaria la radioterapia posoperatoria. La tasa de supervivencia sin enfermedad a los 10 años, y la tasa de supervivencia después de mastectomía o cirugía conservadora es del 93,1 al 99,1% y del 99 al 100%, respectivamente. La incidencia de metástasis axilares es también muy baja, con una media de un 10% (0-22%) y raramente afecta a más de un ganglio por lo que algunos autores sugieren incluso que no se utilice tratamiento neoadyuvante en tumores menores de 1 cm (Diab y cols., 1999; Edge y cols., 2010, Rakha y cols., 2012).

I.3.3.c. Carcinoma cribiforme invasivo

Se define como un carcinoma invasivo de patrón similar al carcinoma intraductal cribiforme y que se asocia a un pronóstico excelente. Se admite un componente

tubular asociado de hasta el 50%. Constituye el 0,3-0,8% de los carcinomas de mama (Rakha y cols., 2012).

Aparece con mayor frecuencia entre los 53 y 58 años. Se presenta clínicamente como una masa, pero con frecuencia está clínicamente oculto. Se detecta por mamografía como masa espiculada que con frecuencia tiene microcalcificaciones. Es multifocal en el 10-20% de los casos.

No hay características macroscópicas que lo diferencien del carcinoma invasivo de tipo no específico.

Microscópicamente la forma pura consiste casi exclusivamente en un patrón cribiforme invasivo mayor del 90%. Los casos que contengan entre el 10-40% de otros tipos de carcinoma que no sea el tipo tubular deberán incluirse en el tipo mixto. El tumor está constituido por islotes, a menudo angulados, en los que se ven espacios vacíos bien definidos a modo de cribas. Se pueden ver secreciones mucinosas apicales hacia la luz, que pueden contener microcalcificaciones. Las células tumorales son de pequeño tamaño, con bajo a moderado pleomorfismo nuclear. Las mitosis son poco frecuentes. En la mayoría de los tumores hay un estroma reactivo fibroblástico y pueden observarse en algunas ocasiones células gigantes de tipo osteoclástico de origen histiocitario. En casi el 80% de los casos se asocia a carcinoma intraductal de tipo cribiforme. En el 14,3% se asocia a metástasis axilares.

Son receptores de estrógenos positivos en el 100% de los casos, receptores de progesterona positivos en el 69%, y el HER2 es negativo. Son tumores de tipo Luminal A (Rakha y cols., 2012).

Se deben diferenciar de:

- Tumor carcinoide, que presenta marcadores neuroendrocrinos.
- Carcinoma adenoide quístico, en el que hay una segunda población además de la variedad secretora intraquística y material tipo membrana basal, con laminina alrededor de las estructuras cribiformes. En estos casos los

receptores hormonales y el HER2 son negativos, por lo que se considera dentro del grupo de los tumores triple negativos (Shin y Rosen; 2002).

- Carcinoma intraductal extenso cribiforme, que se diferencia por la existencia de capa mioepitelial alrededor de las estructuras cribiformes (Moinfar, 2007).

El pronóstico es muy favorable, con un 90% de supervivencia a los diez años. La forma mixta de carcinoma cribiforme tiene peor pronóstico, pero mejor que el carcinoma ductal infiltrante de tipo no específico. El pronóstico es muy similar al carcinoma tubular, pero muchos de estos tumores no tienen estructuras tubulares definitivas, lo que justifica su separación como una entidad distinta (Rakha y cols., 2012).

I.3.3 d. Carcinoma con características medulares

Son carcinomas con características medulares el carcinoma medular, el carcinoma medular atípico y un grupo de carcinomas ductales no específico que incluyen alguna de las siguientes características: borde expansivo o circunscrito, patrón de crecimiento sincitial, células de alto grado nuclear y abundante infiltración linfocitaria.

El carcinoma de mama de tipo medular es raro. Representa menos del 1% de todos los carcinomas de mama, aunque se describen series con una mayor frecuencia dependiendo de los criterios estrictos utilizados en su diagnóstico. Así muchos estudios incluyen casos de carcinoma medular atípico o carcinomas invasivos con características medulares.

La edad de máxima frecuencia está comprendida entre los 45 y los 52 años. Clínicamente está bien delimitado y es blando a la palpación. Mamográficamente está bien circunscrito y se puede confundir con una lesión benigna.

Macroscópicamente es redondeado, de bordes bien definidos, consistencia blanda, carnoso, de coloración parda a grisácea y con frecuencia tiene áreas de necrosis o hemorragia. El diámetro suele variar entre 2,0-2,9 cm.

Microscópicamente se caracteriza por:

- Arquitectura sincitial en más del 75% del tumor. Pueden verse focos de necrosis y diferenciación escamosa.
- No deben verse estructuras glandulares o tubulares, incluso como componente menor.
- Abundante y difusa infiltración linfoplasmocitaria estromal. La densidad del infiltrado varía según los casos desde escaso a casi obliterar las células neoplásicas epiteliales. Pueden verse folículos linfoides y granulomas de células epitelioides.
- Las células epiteliales son generalmente redondeadas con abundante citoplasma y núcleo vesicular con nucléolo único o múltiple. El pleomorfismo nuclear es moderado o marcado con grado nuclear 2 o 3 y abundantes mitosis y pueden observarse células gigantes atípicas.
- Está bien circunscrito histológicamente, con bordes expansivos que comprimen una zona periférica fibrosa.

Se necesita ser estricto en los criterios para el diagnóstico de carcinoma medular debido a su relativamente buen pronóstico. Tumores que muestran patrón sincitial con solo dos o tres criterios más se designan como carcinoma medular atípico o carcinoma ductal infiltrante con características medulares y se comportan como un carcinoma ductal infiltrante de tipo no específico.

En estos tumores suelen ser positivos los marcadores de células basales/mioepiteliales como citoqueratinas 5/6, citoqueratina 14, p63 y CD10, y se consideran dentro del grupo de los tumores de fenotipo basal (Moinfar, 2007). Los receptores hormonales y HER2 son negativos (triple negativos) y presentan una alta incidencia de mutaciones en p53. Por estudios de citometría de flujo la mayoría son tumores aneuploides y altamente proliferativos. Se describe una alta tasa de apoptosis.

El infiltrado linfoide está constituido principalmente por linfocitos T maduros. El infiltrado inflamatorio B es policlonal y las células plasmáticas expresan IgG o IgA. Aunque el carcinoma de tipo linfoepitelal asociado a EBV tiene características similares, hay muy pocos casos de carcinomas con características medulares

asociados a EBV, a diferencia del 31-51% de casos EBV positivos de carcinoma ductal infiltrante.

Genéticamente un gran porcentaje de estos tumores se consideran de "Tipo Basal" y la inestabilidad genómica es frecuente en estos tumores. La mayoría de las pacientes con mutaciones en BRCA1 tienen tumores con características medulares, pero solo el 13% de las pacientes con tumores de características medulares tienen alteraciones en BRCA1. En un estudio reciente se sugiere que los carcinomas medulares no son un indicador de cribado de mutaciones en BRCA1 en ausencia de factores de riesgo familiares (Iau y cols., 2004). El gen en el que se detectan con frecuencia más mutaciones es *P53*.

Tradicionalmente se consideró que el carcinoma medular tiene mejor pronóstico que el carcinoma invasivo de tipo no específico. En una serie de carcinomas invasivos grado 3, se demuestra mejor pronóstico cuando se asocian a un infiltrado linfoplasmocitario importante. El perfil genético de estos tumores es similar a los tumores triple negativos, por lo que el relativo mejor pronóstico puede ser debido al tratamiento agresivo en estos tumores y probablemente al prominente infiltrado linfoplasmocitario peritumoral (Jacquemier y cols., 2012).

I.3.3.e. Carcinomas productores de mucina

En esta categoría se incluyen los tumores cuyas células producen mucina tanto intracelular como extracelularmente: carcinoma mucinoso o coloide, carcinoma de células en anillo de sello y cistadenocarcinoma mucinoso.

El carcinoma mucinoso se caracteriza por grupos de células epiteliales generalmente pequeñas y uniformes flotando en material mucinoso extracelular. Los carcinomas mucinosos puros constituyen aproximadamente el 2% de los carcinomas de mama. Ocurren en pacientes de más de 55 años.

Macroscópicamente se caracteriza por ser bien circunscrito, de bordes expansivos con superficie de corte blanda gelatinosa, con un tamaño que varía entre 1 y 20 cms. Mamográficamente simula un proceso benigno. Ecográficamente son

hipoecoicos y con imagen dinámica de patrón de realce por RM. Microscópicamente está compuesto por pequeños grupos de células epiteliales uniformes, con atipia nuclear leve, flotando en “lagos” de moco. Los grupos de células que flotan en el moco pueden ser sólidos, micropapilares o formar luces glandulares, y con frecuencia se ven finas bandas de tejido fibrovascular dentro del material mucoide. Los grupos de células epiteliales no están rodeados por células mioepiteliales. La mucina es principalmente extracelular y raramente se ven células con mucina intraepitelial o células en anillo de sello. En el tipo hipercelular o carcinoma mucinoso tipo B descrito por Capella, las células neoplásicas pueden tener cromatina en “sal y pimienta” y citoplasma eosinófilo finamente granular, característicos de diferenciación neuroendocrina, que se demuestran con marcadores neuroendocrinos como enolasa neuronal específica, cromogranina y sinaptofisina (Capella y cols., 1980). El carcinoma mucinoso tipo A contiene poca celularidad y abundante material mucoide extracelular (Bussolati y Sapino, 2012).

Se describen dos subtipos: a) puro, cuando el carcinoma mucinoso es mayor del 90%, y b) mixto, generalmente asociado a carcinoma invasivo de tipo no específico. Debe diferenciarse de las lesiones tipo mucocele en donde las células epiteliales que flotan en el moco están rodeadas por células mioepiteliales (Tan y cols., 2008).

Estos tumores son positivos para receptores hormonales de estrógenos y progesterona y expresan receptores de andrógenos (niveles bajos). El HER2 no está amplificado. Las formas puras y mixtas expresan Wt1. Son de tipo Luminal A. Los de tipo hipercelular (carcinomas mucinosos de tipo B) presentan un patrón de expresión genética similar a carcinomas neuroendocrinos.

Los carcinomas mucinosos puros se asocian con bajas tasas de recurrencia local y a distancia, y excelentes tasas de supervivencia sin enfermedad a 5 años. La supervivencia a 10 años alcanza el 80-100%, aunque se han descrito metástasis a distancia en carcinoma puros mucinosos. Los carcinomas mixtos tienen un peor pronóstico con mayor incidencia de metástasis linfáticas (Bussolati y Sapino, 2012).

Se describen como variantes:

1) Carcinoma con diferenciación en células en anillo de sello.

Es un carcinoma constituido por células que crecen de forma aislada, en pequeños nidos o trabéculas y con abundante mucina intracitoplasmática que rechaza el núcleo hacia la periferia adoptando una morfología característica. Carcinomas de mama constituidos exclusivamente por este tipo de células son raros, sin embargo es más frecuente la diferenciación focal de células en anillo de sello. No hay características clínicas ni macroscópicas específicas de este tipo de tumores.

Puede verse diferenciación de células en anillo de sello en carcinomas lobulillares, en carcinomas invasivos de tipo no específico y en otros tipos específicos. Se describen dos tipos: un tipo se caracteriza por células con una gran vacuola citoplasmática con aspecto en “diana” que parece una luz intracitoplasmática que contiene material positivo con PAS, azul alcián y HMFG2; este tipo se observa en el carcinoma lobulillar de tipo clásico (in situ e infiltrante) y en la variedad pleomórfica. El segundo tipo es similar al carcinoma difuso gástrico, y se caracteriza por mucosustancias ácidas que llenan difusamente el citoplasma y desplazan el núcleo a un extremo de la célula; este tipo puede verse en carcinomas intraductales. Esta variante debe ser separada del carcinoma mucinoso ya que mientras el carcinoma mucinoso tiene buen pronóstico, el carcinoma de células en anillo de sello es muy agresivo.

Algunos autores refieren mal pronóstico sobre todo cuando se presenta en forma pura (Merino y Livolsi, 1981). La presencia de células en anillo de sello de origen ductal o lobulillar en un carcinoma indica un pronóstico más agresivo, independientemente de su número, y debe referenciarse el tanto por ciento de células en anillo de sello que hay en el tumor (Moinfar, 2007). Sin embargo en estudios más recientes el pronóstico se refiere como incierto (Bussolati y Sapino, 2012).

Es importante distinguirlos de metástasis en mama de carcinomas con células en anillo de sello de otras localilzaciones. Son tumores capaces de metastatizar a sitios inusuales como vejiga urinaria, estómago y otros lugares gastrointestinales y superficies serosas (ovario y útero), donde pueden parecer tumores primarios de esos órganos (Harris y cols., 1978). Los carcinomas mamarios de células en anillo de sello son generalmente positivos para GCDFP-15, receptores hormonales de estrógenos y progesterona y MUC1, mientras que los carcinomas de células en anillo de sello gastrointestinales son negativos. La citoqueratina 7 es normalmente positiva en los tumores de origen mamario y la citoqueratina 20 es positiva en los de origen gastrointestinal (O'Connel y cols., 2005).

2) Cistadenocarcinoma mucinoso

Es una variante muy rara, que actualmente no se incluye en la clasificación de tumores de mama de la OMS, y que parece un cistadenocarcinoma mucinoso ovárico o de páncreas. Macroscópicamente se ven zonas sólidas y quistes multiloculados. Microscópicamente el material mucinoso se localiza en el citoplasma de células columnares que forman glándulas con poca atipia nuclear o que limitan espacios con proliferación celular, múltiples capas, penachos y papilas hacia la luz. Algunas de las células neoplásicas muestran atipia nuclear y pérdida de mucina intracitoplasmática. Puede haber zonas de rotura de la pared de los quistes con infiltración del estroma y pueden observarse zonas de diferenciación (metaplasia) escamosa.

Puede asociarse a carcinoma intraductal con diferenciación mucinosa o de tipo convencional. Debe excluirse la posibilidad de metástasis de ovario o tracto gastrointestinal: para diferenciarlos son útiles las técnicas de inmunohistoquímica (son positivos para citoqueratina 7 y negativos para citoqueratina 20) (Koenig y Tavassoli, 1998; Honma y cols., 2003; Schnitt y Collins, 2009).

I.3.3.f. Carcinoma con diferenciación neuroendocrina

El término carcinoma con diferenciación neuroendocrina debe reservarse para tumores que muestren características similares a los tumores neuroendocrinos del tracto gastrointestinal o del pulmón. Todos estos tumores expresan marcadores neuroendocrinos en mayor o menor grado. Algunos carcinomas invasivos de tipo no específico (hasta el 30%) y de tipos específicos pueden mostrar diferenciación neuroendocrina, principalmente el carcinoma mucinoso.

Representa menos del 1% de los carcinomas de mama. La mayoría de las pacientes son de la sexta o séptima década. La incidencia real es difícil de asegurar ya que no se usan marcadores neuroendocrinos de rutina en tumores de crecimiento sólido, alveolar o en nidos.

Clínicamente no hay diferencias con otros tipos de carcinoma. Los síntomas relacionados con la producción de hormonas son extremadamente raros, pero los test serológicos pueden detectar marcadores neuroendocrinos como la cromogranina A. Macroscópicamente pueden ser infiltrativos o expansivos; la consistencia de los tumores mucinosos es blanda y gelatinosa.

Microscópicamente pueden ser:

1) Bien diferenciados.- La mayoría son de grado bajo o intermedio con nidos y trabéculas de células que varían de fusocelulares a plasmocitoides y grandes células claras, separados por estroma fibrovascular.

2) Pobremente diferenciado / Carcinoma de célula pequeña (*oat cell*).- Este último de morfología muy similar a los tumores de esta histología que se localizan en pulmón, por lo que su diagnóstico obliga a descartar una metástasis. Tienen abundantes mitosis y con frecuencia necrosis. Para el diagnóstico de tumor primario ayuda la presencia de carcinoma intraductal de características similares. Si no se observa carcinoma intraductal, se debe realizar una cuidadosa historia clínica de la paciente para descartar la posibilidad de metástasis.

3) Carcinoma invasivo con diferenciación neuroendocrina.- Ocurre en hasta el 30% de los carcinomas invasivos no específicos y en otros tipos específicos, especialmente el carcinoma mucinoso (que constituye aproximadamente la cuarta parte de los carcinomas mamarios con diferenciación neuroendocrina), y el carcinoma papilar sólido que con frecuencia muestra diferenciación neuroendocrina. Puede observarse también un aspecto histológico divergente con zonas de carcinoma de células pequeñas y zonas de carcinoma ductal o lobulillar infiltrante (Shin y cols., 2000).

Expresan marcadores neuroendocrinos cromogranina y sinaptofisina, alrededor del 50% de los carcinomas de grado bajo o intermedio expresan cromogranina, y el 16% sinaptofisina. El anticuerpo monoclonal para enolasa neuronal específica se expresa en el 100% de los tumores pobremente diferenciados, mientras que solo en el 50% de estos casos se observa positividad con la cromogranina y sinaptofisina (Bussolati y Badve, 2012).

Por estudios genéticos el carcinoma papilar sólido y el carcinoma mucinoso con diferenciación neuroendocrina son tumores de tipo Luminal A (Bussolati y Badve, 2012).

Algunos autores no encuentran diferencias de pronóstico entre tumores con o sin diferenciación neuroendocrina (Miremadi y cols., 2002). El grado histológico y el estadío son importantes parámetros pronósticos, pero no existen guías específicas para graduar los carcinomas con diferenciación neuroendocrina aunque no se conoce el significado clínico (Bussolati y Badve, 2012).

I.3.3.g. Carcinoma papilar invasivo

Se define como un adenocarcinoma invasivo en el que predomina el componente papilar en más del 90%. No deben incluirse en este subtipo el carcinoma papilar sólido y el asociado a carcinoma papilar intraquístico; por ello, un tumor infiltrante de patrón papilar verdadero es extremadamente raro. No tiene características clínicas ni macroscópicas específicas.

El carcinoma infiltrante está constituido por papilas con ejes de tejido fibrovascular recubiertas por células epiteliales malignas (Schnitt y Collins, 2009).

De 1.603 carcinomas de mama revisados en el proyecto NSABP-B04, 38 casos tenían características papilares, pero solo 3 eran "puros", sin mezcla de otros componentes invasivos (Fisher y cols., 1980a).

Deben diferenciarse de las metástasis de otros órganos especialmente ovario o pulmón, y de carcinomas asociados a carcinoma papilar sólido y papilar intraquístico.

El pronóstico está asociado al grado y estadio del tumor. Hay pocos datos sobre la supervivencia de estos tumores (Tse y cols., 2012).

I.3.3.h. Carcinoma micropapilar invasivo

Es una variante rara de carcinoma invasivo que se caracteriza por un patrón infiltrante compuesto por pequeños grupos o mórulas, de células epiteliales, rodeados por espacios claros estromales. En esos grupos las células presentan una polaridad invertida conocida como "patrón de dentro afuera", con la superficie apical hacia el estroma y no hacia la superficie luminal.

La forma pura es rara y constituye aproximadamente 0,9 al 2% de todos los carcinomas invasivos.

Clínicamente la mayoría se presentan como masa palpable. La mamografía generalmente revela una masa densa, irregular, con márgenes mal definidos y microcalcificaciones. Ecográficamente son principalmente hipoecoicos, pero ocasionalmente isoecoicos o masas microlobuladas, con o sin sombra acústica posterior.

Macroscópicamente no tiene características específicas. Microscópicamente son grupos celulares que no contienen eje fibrovascular, de células cúbicas o columnares, rodeadas por un espacio estromal vacío que simula invasión linfovascular. Este espacio claro no esta limitado por células endoteliales y puede ser

un artefacto de la fijación. Las células tienen citoplasma eosinófilo y a veces características apocrinas. El pleomorfismo nuclear es variable pero raramente pronunciado. La actividad mitótica varía de baja a moderada. La necrosis y la infiltración inflamatoria son raras.

El patrón de las células neoplásicas de polaridad invertida se demuestra mediante estudio inmunohistoquímico para EMA (Schnitt y Collins, 2009) y para MUC1 (Reis-Filho y Ellis, 2012). Se observa un artefacto de retracción del estroma alrededor de los nidos de células tumorales que simula invasión vascular, pero también es frecuente la presencia de infiltración "real" vascular. Puede presentase en forma pura o combinado con carcinoma ductal infiltrante, o en algunos casos con carcinoma mucinoso; cuando se combina con carcinoma mucinoso puede clasificarse como carcinoma mixto mucinoso y micropapilar o como variante de carcinoma mucinoso (Schnitt y Collins, 2009). Las células neoplásicas muestran atipia nuclear moderada o alta, y la mayoría de los tumores son de grado histológico combinado 2 o 3.

Comparando los resultados de las técnicas de inmunohistoquímica de los carcinomas micropapilares infiltrantes con los de tipo no micropapilar los resultados son variables. Para algunos autores son con mayor frecuencia positivos para receptores de estrógenos (61-100%) y positivos para receptores de progesterona (46-83%). Sin embargo en otras series hay porcentajes de positividad mucho menores que varían entre un 25% a un 32% en receptores de estrógenos, y entre un 13% a un 20% en los receptores de progesterona. En cuanto a HER2 hay controversia sobre los resultados: para algunos autores los resultados no son muy diferentes de los de carcinomas de tipo no micropapilar (Kim y cols., 2005). En otros estudios más recientes demuestran una positividad entre menos del 10% hasta un 35% (Marchió y cols., 2008; 2009).

Se clasifican genéticamente como tipo Luminal A o luminal B; la expresión de marcadores de tipo basal es rara. Estudios genómicos demuestran ganancias en los cromosomas 8q, 17q y 20q, y deleciones en 6q y 13q, a diferencia del carcinoma invasivo. Es también importante que en los carcinomas de tipo mixto con

componente de tipo micropapilar, el componente de tipo no micropapilar tiene las características genéticas similares al componente micropapilar (Reis-Filho y Ellis, 2012a).

Comparado con el carcinoma invasivo NST, es más frecuente la presencia de infiltración tumoral linfovascular y metástasis a ganglios linfáticos axilares. Queda por determinar si el fenotipo micropapilar constituye un factor pronóstico independiente (Reis-Filho y Ellis, 2012a).

I.3.3.i. Carcinoma con diferenciación apocrina

Se define como un carcinoma invasivo en el que las células muestran características de células apocrinas. Se codifican según el tipo primario invasivo.

Diferenciación focal apocrina puede verse en carcinomas invasivos de tipo no específico y en algunos tipos especiales (tubular, lobulillar, micropapilar y medular) (O´Malley y Bane, 2008), así como en carcinoma lobulillar y ductal in situ. Solo aproximadamente el 4% de los carcinomas invasivos tienen diferenciación apocrina, pero no representan una entidad definida.

No tienen características clínicas ni radiológicas específicas. Pueden presentarse como masa de cualquier tamaño y en cualquier localización de la mama.

Las células tienen abundante citoplasma eosinófilo, granular PAS positivo diastasa resistente (células tipo A) o citoplasma abundante espumoso (células tipo B) o una combinación de ambas. En estos tumores se han demostrado en algunas ocasiones lípidos intracitoplasmáticos.

Con técnicas de inmunohistoquímica son Bcl-2 negativos y GCDFP-15 positivos. Los receptores de estrógenos y progesterona son generalmente negativos aunque se ha demostrado positividad con una nueva isoforma de receptores de estrógenos (receptor estrógenos alfa 36). Los tumores positivos para receptores de andrógenos, unido a la negatividad de los receptores hormonales y positividad para

HER2, frecuentemente presentan características histológicas apocrinas, por lo que se ha sugerido la denominación de “firma molecular apocrina”.

Los tumores con células tipo A deben diferenciarse de los tumores de células granulares, y los constituidos principalmente por células tipo B de reacciones histiocitarias e inflamatorias, siendo necesario en algunos casos estudios de inmunohistoquímica de citoqueratinas. Se deben diferenciar de los carcinomas de tipo oncocítico, que son muy raros e indistinguibles histológica e inmunohistoquímicamente; ultrastructuralmente, las mitocondrias en las células apocrinas son de localización perinuclear y no están difusamente distribuidas como en los oncocitos (Damiani y cols., 1998).

Estudios de hibridación genómica comparada (CGH) han revelado ganancias en 1p, 1q y 2q, y pérdidas en 1p, 12q, 16q, 17q y 22q. Pero hay que recordar que el perfil genético no equivale a diferenciación apocrina. Aproximadamente la mitad de los carcinomas con diferenciación apocrina muestran esta firma molecular, incluyendo la mayoría de los carcinomas lobulillares pleomórficos con diferenciación apocrina. Por esto los carcinomas con diferenciación apocrina están compuestos por los subtipos moleculares “luminal” y “apocrino”. Por ello se sugiere que la diferenciación apocrina es frecuente en muchos subtipos de cáncer de mama y que el “carcinoma apocrino” no constituye una entidad distinta (O’Malley y cols., 2012).

En cuanto al pronóstico hay controversia: algunos estudios no encontraban diferencias comparándolo con el carcinoma invasivo de tipo no específico en tumores del mismo grado y estadío (Abati y cols., 1990). Otros autores lo consideraban una entidad clinicopatológica con pronóstico menos agresivo que el carcinoma ductal infiltrante (Wells y El-Ayat, 2007). Actualmente los estudios genómicos pronósticos con microarrays muestran un alto índice de recurrencia con el estudio de 21 genes, y firma de mal pronóstico con el estudio de 70 genes, lo que sugiere un peor pronóstico (Weigelt y cols., 2008, 2009b, 2010a). La positividad para receptores de andrógenos abre la posibilidad de nuevas modalidades terapéutica en el futuro (O’Malley y cols., 2012).

I.3.3.j. Carcinoma metaplásico

Es un grupo heterogéneo de neoplasias malignas que se caracteriza por la diferenciación del epitelio neoplásico en células escamosas y/o mesenquimales, como por ejemplo células fusocelulares, condroides, rabdoides u óseas, en las que en función de sus componentes se clasifica en:

1) Carcinoma adenoescamoso de bajo grado.- Presenta formaciones glandulares y tubulares y nidos de células escamosas incluidas en un estroma fusocelular.

2) Carcinoma metaplásico de tipo fibromatosis, con células fusiformes y variable colagenización con atipia nuclear ligera o ausente; el aspecto histológico es similar a la fibromatosis. Con técnicas de inmunohistoquímica son p63 y citoqueratinas positivos. Puede observarse diferenciación focal escamosa.

3) Carcinoma escamoso: Generalmente se presenta como una lesión quística limitada por epitelio escamoso con variable grado de atipia citológica y pleomorfismo, las células neoplásicas infiltran el estroma adyacente. Puede ser carcinoma escamoso de tipo acantolítico, que delimita espacios seudoglandulares, por lo que puede confurdirse con angiosarcomas. Puede ser puro o estar mezclado con carcinoma ductal.

4) Carcinoma fusocelular: patrones variables de células fusocelulares con atipia nuclear moderada o marcada; puede observarse infiltrado inflamatorio de linfocitos y células dendríticas. Para su diagnóstico se requiere diferenciación epitelial morfológica o por técnicas de inmunohistoquímica (citoqueratinas). También puede observarse carcinoma intraductal en la periferia o dentro de la lesión.

5) Carcinoma con diferenciación mesenquimal:
   - con diferenciación condroide.
   - con diferenciación ósea.
   - con otros tipos de diferenciación mesenquimal (rabdoide o incluso neuroglial).

Históricamente se denomina “carcinoma productores de matriz” al subgrupo de carcinomas metaplásicos con elementos epiteliales con transición brusca al componente mesenquimal sin transición de tejido fusocelular.

Como tiene muchos aspectos histológicos ha sido denominado de muchas maneras: carcinoma metaplásico mixto epitelial y mesenquimal o carcinosarcoma en el que se identifican elementos heterólogos como cartílago o hueso. Algunos autores relacionan estos casos con mal pronóstico (Rosen, 2009). Como sinónimos se emplean carcinoma productor de matriz, carcinosarcoma y carcinoma fusocelular.

Constituyen aproximadamente el 0,2-5% de todos los carcinomas invasivos, depende de las definiciones adoptadas por los diferentes autores, aunque su frecuencia depende de si solo consideramos los carcinomas con metaplasia mesenquimal, suponen aproximadamente el 1% de los carcinomas invasivos.

Clínicamente son similares a los carcinomas de tipo no específico con receptores hormonales negativos.

Macrosocópicamente no tienen unas características específicas. La degeneración quística es frecuente particularmente en el componente escamoso. En general son grandes, con un tamaño medio de 3,9 cm (rango entre 1,2 y >10 cm).

La mayoría (más del 90%) son negativos para receptores hormonales y HER2, y son positivos para queratinas de tipo basal como las citoqueratinas 5/6, la 14 o la 34βE12 y entre el 70-80% sobreexpresan EGFR, con amplificación génica de *EGFR* en un tercio de esos tumores, que probablemente se beneficiarán de terapias dirigidas contra EGFR (Reis-Filho y cols., 2005a). La p63 se expresa en más del 90% de estos tumores. En una lesión fusocelular, la expresión inequívoca de queratinas de alto peso molecular y/o p63 en cualquier proporción de células significa un diagnóstico de carcinoma metaplásico (Reis-Filho y cols., 2012b).

Se consideran dentro del grupo de carcinomas de mama de fenotipo basal pero se ha sugerido que un subgrupo, particularmente los que presentan metaplasia

fusocelular, genéticamente muestran transición epiteliomesenquimal con menos genes que los encontrados en células epiteliales y sobreexpresión de genes que generalmente se encuentran en fibroblastos. En este caso pueden ser clasificados en el grupo "Tumores bajos en claudina" que son tumores con células llamadas *stem like* (células con características epiteliales y mesenquimales) (Prat y cols., 2010). Genéticamente son tumores complejos con ganacias y pérdidas similares a las observadas en otros tumores triple negativos y de tipo basal. En un 10-25% de casos hay amplificación y alta polisomía de *EGFR*, más prevalente en tumores con difrenciación escamosa y/o fusocelular.

El carcinoma metaplásico ocasiona menos metástasis ganglionares que el carcinoma invasivo no específico, pero similar a otros tumores triple negativos. Pueden observarse metástasis a distancia en ausencia de metástasis ganglionares especialmente cerebro y pulmones. En la actualidad no hay marcadores pronósticos para el carcinoma metaplásico, pero hay un grupo de estos tumores que responden muy mal a la quimioterapia convencional con peor pronóstico que otros tumores triple negativos (Weigelt y cols., 2009b). Los tumores adenoescamosos de bajo grado y los de tipo fibromatosis tienen mejor pronóstico que otros tumores triple negativos. Se desconoce el valor pronóstico del grado histológico de los carcinomas metaplásicos (Reis- Filho y cols., 2012b). Algunos autores describen variantes bifásicos con componentes epitelial y estromal generalmente de alto grado, de comportamiento agresivo y que pueden metastatizar como tumores bifásicos, como carcinomas o como sarcoma (Moinfar, 2007).

I.3.4. VARIANTES MORFOLÓGICAS RARAS DE CARCINOMA INVASIVO

Hay variantes morfológicas de carcinoma invasivo que no se consideran tipos específicos en la clasificación de la OMS.

I.3.4.a. Carcinoma pleomórfico

Es una variante rara que se caracteriza por la proliferación de células gigantes pleomórficas y atípicas que constituyen más del 50% de las células tumorales sobre un fondo de adenocarcinoma o adenocarcinoma con metaplasia escamosa o

fusocelular. La edad de presentación varía entre 28-96 años con una media de 51 años. La mayoría se presentan como masa palpable y en el 12% de los casos la primera manifestación es metastásica. El tamaño medio es de 5,4 cm y en tumores grandes puede haber necrosis y cavitación. Las mitosis son muy frecuentes y casi todos los tumores son grado 3, con frecuente invasión vascular. El componente intraductal es de alto grado con necrosis (Ellis y cols., 2012).

Generalmente los receptores hormonales son negativos, pero el HER2 es positivo en aproximadamente el 19% (Silver y Tavassoli, 2000).

En más del 50% de las pacientes hay metástasis axilares y en la mayoría de tres o más ganglios metastásicos. Muchas de las pacientes se presentan con enfermedad avanzada. Un estudio reciente demostró que los tumores con componente de metaplasia fusocelular se asocian a mal pronóstico (Nguyen y cols., 2010).

I.3.4.b. Carcinoma con células gigantes tipo osteoclástico

La característica de estos tumores es la presencia de células gigantes en el estroma, de tipo osteclástico. Las células gigantes se asocian generalmente con fondo inflamatorio, fibroblástico, muy vascularizado, con hematíes extravasados, linfocitos, y monocitos mono y binucleados que a veces contienen hemosiderina. Las células gigantes son de tamaño variable y a veces incluyen células epiteliales neoplásicas o se encuentran en el interior de las luces que forman las células neoplásicas. Las células gigantes contienen un número variable de núcleos que no son atípicos. En las metástasis y recurrencias del tumor puede observarse un estroma reactivo y muy vascularizado.

El componente carcinomatoso del tumor es carcinoma ductal infiltrante de bien a moderadamente diferenciado, pero se puede ver acompañando a otros tipos histológicos, particularmente al carcinoma invasivo cribiforme, y también al tubular, mucinoso, papilar, lobulillar, escamoso y otros patrones metaplásicos, y a carcinomas pleomórficos (Ellis y cols., 2012).

Las células gigantes son positivas para CD68, y son negativas para citoqueratinas, proteína S100, actina, y receptores de estrógenos y progesterona. Las células gigantes son fuertemente positivas para fosfatasa ácida, esterasa no específica y lisozima, lo que indica que su fenotipo es similar a histiocitos y osteoclastos; esta hipótesis está confirmada por estudios ultraestructurales (Ellis y cols., 2012). En estudios *in vitro* se demostró que los osteoclastos se pueden formar directamente a partir de precursores de monocitos y macrófagos. Los macrófagos asociados al tumor son capaces de diferenciarse en células multinucleadas que pueden afectar a la reabsorción ósea en las metástasis. Angiogénesis y agentes quimiotácticos producidos por las células neoplásicas pueden ser los responsables de la migración de los histiocitos a la zona afectada por el carcinoma y que se transformen en células gigantes osteoclásticas (Sheikh y cols., 1995; Quinn y cols., 1998).

Aproximadamente un tercio de los casos publicados tienen metástasis ganglionares. La supervivencia a los cinco años es del 70%, similar o quizás mejor que el carcinoma ductal infiltrante. El pronóstico se debe a las características del carcinoma asociado y no parece que esté influenciado por la presencia de células gigantes estromales (Ellis y cols., 2012).

I.3.4.c. Carcinoma con características de coriocarcinoma

Es extremadamente raro. Hay pacientes con carcinomas ductales infiltrantes y niveles elevados en suero de HCG-beta, sin evidencia histológica de diferenciación coriocarcinomatosa. Hasta el 60% de los carcinomas ductales infiltrantes contienen células HCG-beta positivas, pero la histología con diferenciación coriocarcinomatosa es muy rara. En estos casos es necesario descartar la posibilidad de metástasis de coriocarcinoma (Ellis y cols., 2012; Schnitt y Collins, 2009).

I.3.4.d. Carcinoma con características melanóticas

La mayoría de los tumores de células melanocíticas que aparecen en la mama representan metástasis de melanomas malignos de origen extramamario. Los melanomas malignos pueden originarse en cualquier lugar de la piel de la mama, aunque son muy raros aquellos que se originan en el complejo areola-pezón. En

estos casos el diagnóstico diferencial debe hacerse con la enfermedad de Paget que, en algunas raras ocasiones, las células pueden contener melanina en su citoplasma.

Se han publicado pocos casos de tumores en los que parece que presentan una combinación de carcinoma ductal infiltrante y melanoma maligno, con transición morfológica y diferente perfil inmunohistoquímico. Estos tumores podrían comenzar en el mismo clon y mostrar diferenciación divergente por múltiples alteraciones genéticas en el desarrollo del carcinoma in situ (Nobukawa y cols., 1999). Estudios genéticos demuestran una pérdida de heterocigosidad en el mismo lugar cromosómico en todos los componentes del tumor, lo que sugiere un origen a partir del mismo clon neoplásico.

En un estudio se encontró positividad para melan-A en un 18% de carcinomas de mama. La positividad y extensión de melan-A se asocia con una reducción de la diferenciación del tumor, pero no con el tipo tumoral, tamaño, metástasis ganglionares, ni estado de los receptores hormonales y HER2 (Ellis y cols., 2012).

No debe considerarse diferenciación melanocítica solo por la presencia de melanina, ya que la pigmentación melánica de las células tumorales puede ocurrir cuando las células invaden la unión dermoepidérmica. Es importante también diferenciar estos tumores de carcinomas de mama con depósito de lipofuscina en el citoplasma.

I.3.4.e. Carcinomas tipo glándulas salivales/anexiales de la piel

El cilindroma y el hidradenoma de células claras muestran características similares a los tumores cutáneos. Tanto el cilindroma como el hidradenoma de células claras son tumores extremadamente raros y ocurren en mujeres adultas y de edad avanzada. Los cilindromas pueden asociarse con carcinoma lobulillar y carcinoma invasivo de tipo no específico. Son tumores circunscritos, generalmente menores de 2 cms., que con frecuencia se encuentran en la región areolar sin conexión con la piel.

Macroscópicamente son lobulados y protruyen en espacios quísticos rellenos de una sustancia clara mucoide sin hemorragia.

Microscópicamente están constituidos por grupos epiteliales de diferentes formas y tamaños con imagen de "puzzle" a bajos aumentos, simulando un aspecto seudoinfiltrativo. Puede verse ocasionalmente diferenciación sebácea. Los lóbulos están rodeados por una matriz extracelular eosinófila hialina PAS positiva, similar a la sustancia que está dentro de los lóbulos. Los lóbulos neoplásicos están compuestos por dos tipos de células: a) células pequeñas, de aspecto basal, con escaso citoplasma y núcleo hipercromático, generalmente en la periferia de la célula, y b) células grandes, de citoplasma pálido y núcleo vesicular que se sitúan generalmente hacia el centro. Se pueden ver ocasionales luces ductales. No se ven mitosis, necrosis ni hemorragia. Los lóbulos están limitados por células mioepiteliales que se visualizan con las técnicas de p63 o actina de músculo liso alfa. Las células luminales se tiñen con EMA. Pueden verse abundantes células reactivas de Langerhans que son positivas para S100 y CD1a.

Son tumores negativos para estrógenos, progesterona y GCDFP-15. Las células tumorales son negativas para S100 y no hay evidencia de diferenciación mioepitelial.

En cuanto al pronóstico no se han descrito recurrencias ni metástasis del cilindroma, y el hidradenoma de células claras es un tumor benigno (Sapino y cols., 2012a).

I.3.4.f. Carcinoma adenoide quístico

Es un carcinoma de bajo grado de malignidad histológicamente similar a los tumores de glándula salival.

Es un tumor raro. Representa menos del 0,1% de los tumores de mama. La edad media al diagnóstico es 64 años. La incidencia en mujeres de raza negra es un 39% más baja que en mujeres blancas. Sobre el 50% de los casos se encuentran en

la región subareolar. Puede ser doloroso. El aspecto radiológico (mamografía y ecografía) es inespecífica.

Macroscópicamente son generalmente bien circunscritos, entre 0,5 y 12 cm y ocasionalmente son rosados, parduzcos, grisáceos y con microquístes.

Microscópicamente son muy similares a los de la glándula salival, pulmón y piel, formados por células epiteliales y mioepiteliales en la clásica arquitectura tubular o cribiforme. Puede verse una variante sólida de tipo basaloide. Pueden verse lesiones *in situ,* pero es muy difícil diferenciarlas del componente invasivo. Las células neoplásicas se polarizan alrededor de dos tipos de estructuras: verdaderos espacios glandulares, que son difíciles de ver y contienen un material PAS positivo, y seudoluces, que resultan de invaginaciones del estroma (espacios estromales). Dichas seudoluces están rodeadas por células basales/mioepiteliales y contienen sustancias que se tiñen con azul alcián; se pueden delimitar con laminina y colágeno IV y a veces están repletas por un material en forma de esférulas o cilindros hialinos que, a nivel ultraestructural e inmunohistoquímico, corresponde a material de membrana basal.

A nivel ultraestructural las células basaloides tienen características mioepiteliales y son positivas para actina de músculo liso, p63, calponina, y citoqueratinas de alto peso molecular (14 y 5/6), y son negativas para CD10. Las células luminales son positivas para citoqueratinas 7 y 8/18. El CD117 es positivo como en el tumor de glándula salival. Puede asociarse a adenomioepitelioma y a carcinoma siringomatoso de bajo grado (carcinoma adenoescamoso), lo que sugiere una relación estrecha entre tumores epiteliales y mioepiteliales.

Son tumores generalmente negativos para receptores hormonales y HER2; recientemente se detectó una isoforma de receptores de estrógenos alfa-36. En el 65% de los casos es EGFR positivo.

Son tumores de bajo grado que generalmente se curan con mastectomía simple. Se gradúan como los tumores de glándula salival y en algunos estudios los

tumores grado 3 se asocian a mayor tasa de recurrencias o metástasis, aunque esto no se corroboró en otros estudios (Sapino y cols., 2012b). Como los tumores de glándula salival raramente infiltran por via linfática y la mayoría de los casos se asocian con excelente supervivencia. La variante sólida con características basaliodes tiene peor pronóstico (Shin y Rosen, 2002). Las recurrencias normalmente ocurren por una resección incompleta. Las tasas de supervivencia a 5 y 10 años son superiores al 95 y al 90 % respectivamente (Sapino y cols., 2012b).

I.3.4.g. Carcinoma mucoepidermoide

Es un tumor de mama similar al tumor de glándula salival. Son muy raros y constituyen aproximadamente el 0,3% de los carcinomas de mama.

Clínicamente es similar al carcinoma invasivo tipo no específico. La secreción de pezón puede ser el primer síntoma de tumor localizado en la región retroareolar. El tamaño varía entre 0,5 y 15 cm. Son tumores bien circunscritos y a veces contienen quistes con material mucoide.

Microscópicamente son similares a los de la glándula salival con nidos de células epidermoides o mucosecretoras positivas para citoqueratina 7 y 18, limitadas por células "basaloides" positivas para citoqueratina 14, y células intermedias positivas para citoqueratinas 5 y 6, y p63. Las células intermedias pueden expresar EGFR. La mayoría de estos tumores en la mama son de bajo grado con predominio de células mucosecretoras. Los tumores de alto grado son raros, sólidos y de predominio de células intermedias y escamosas, y puede observarse componente intraductal. Los receptores hormonales son negativos, pero hay muy pocos casos estudiados (Sapino y cols., 2012c).

Debe diferenciarse de un carcinoma ductal infiltrante con diferenciación escamosa que contiene verdadera queratinización con formación de perlas córneas lo que excluye el carcinoma mucoepidermoide.

Los tumores de bajo grado tienen buen pronóstico, mientras los tumores de alto grado muestran comportamiento agresivo con metástasis a ganglios axilares y metástasis a distancia.

I.3.4.h. Carcinoma polimórfico

Histológicamente es similar al carcinoma polimórfico de bajo grado de glándula salival. Es muy raro y hay muy pocos casos descritos (Sapino y cols., 2012d). Macroscópicamente son nódulos con tamaño que varía entre 1,5 y 4 cm.

Microscópicamente son nidos sólidos rodeados en la periferia por patrón trabecular, alveolar, cribiforme y también en filas de una célula (que simula carcinoma lobulillar). Está constituido por un solo tipo de células, con núcleo redondeado u ovoide con numerosas mitosis. Las células neoplásicas son positivas para Bcl-2 y débilmente positivas para citoqueratina 7 y cadherina-E. Son negativos EMA, receptores hormonales de estrógenos y progesterona, HER2, citoqueratina 14, actina, y CD117.

Solo uno de los casos descritos en la literatura mostró un pronóstico agresivo con muerte de la paciente por enfermedad generalizada a los 3 años del diagnóstico. Todos los casos son grado 2 y de tamaño grande en el momento del diagnóstico. Parece que el comportamiento es de un carcinoma de alto grado por lo que se recomienda el término “carcinoma polimorfo de tipo glándula salival” (Sapino y cols., 2012d).

I.3.5. FORMAS EXCEPCIONALMENTE RARAS Y VARIANTES DE CARCINOMA INVASIVO

I.3.5.a. Carcinoma secretor

Se trata de un tumor raro, de bajo grado, en el que las células producen secreción, similar a la secreción láctea, intra o extracelular. La incidencia es menor del 0,15%, puede ocurrir en niños y adultos (37% en pacientes menores de 20 años, con un rango que varía entre 3 y 87 años). Se manifiesta como un nódulo cerca de la areola especialmente en hombres y niños.

Histológicamente es bien circunscrito, pero con frecuencia se identifica franca infiltración. Las células se disponen en patrón microquístico, sólido o tubular. La secreción es PAS positiva y resistente a la digestión con diastasa y azul alcián positivo. Cuando se asocia a carcinoma in situ tiene las mismas características secretoras, ocasionalmente con necrosis o de tipo bajo grado.

Con técnicas de inmunohistoquímica es positivo para EMA y proteína S100, y es negativo para receptores de estrógenos, HER2 y p63. Puede expresar cadherina-E, citoqueratina 8 y 18, CD117 y actina de músculo liso alfa.

Tiene un curso clínico de bajo grado con pronóstico favorable en niños y adolescentes menores de 20 años, pero es más agresivo en pacientes mayores en los que pueden verse recurrencias hasta 20 años después. Se encuentran metástasis axilares que afectan raramente a más de tres ganglios (Eusebi y cols., 2012).

I.3.5.b. Carcinoma oncocítico

Es un carcinoma de mama constituido por más del 70% de células con características oncocíticas. Los oncocitos son células de citoplasma eosinófilo debido a la gran cantidad de mitocondrias.

Clínicamente la media de edad de presentación es de 66 años. Raramente se observa en hombres. No se diferencian clínicamente del resto de los carcinomas invasivos. Debutan con metástasis axilares en un 44%.

Macróscopicamente el tamaño medio es de 3 cm.

Microscópicamente muestra un patrón de crecimiento sólido con márgenes expansivos. Las células poseen un citoplasma abundante, granular, eosinófilo, con bordes bien definidos, y los núcleos varían de monótonos a pleomórficos con nucléolo prominente.

Con técnicas de inmunohistoquímica sus células son positivas para marcadores de mitocondrias, EMA, citoqueratina 7 (un 84%), GCDFP-15 (un 34%), receptores de estrógenos (un 78%), receptores de progesterona (un 62,5%) y HER2 (un 25%). Estos tumores deben diferenciarse de los carcinomas apocrinos y neuroendocrinos.

Genéticamente presentan ganancias en 11q13.1-q13.2 y 19p13, similares a tumores oncocíticos del riñón y tiroides.

La supervivencia es similar al carcinoma invasivo NST del mismo grado y estadío (Eusebi y cols., 2012).

.

I.3.5.c. Carcinoma sebáceo

Se define como un carcinoma con diferenciación sebácea en no menos del 50% de las células. No existe evidencia de un origen en las glándulas sebáceas de la piel. Es un tumor del que hay muy pocos casos descritos.

Macroscópicamente su tamaño varía entre 2 y 20 cm.

Microscópicamente se caracteriza por una proliferación nodular o lobular de células de aspecto sebáceo con abundante citoplasma finamente vacuolado y que son positivas con rojo oleoso o Sudán III, mezcladas con células de pequeño tamaño, ovoideas o fusocelulares sin vacuolización. Las mitosis pueden ser numerosas. Puede verse diferenciación focal escamosa en forma de mórulas escamosas.

Las células son positivas para citoqueratinas, receptores de estrógenos, progesterona y de andrógenos, mientras que el HER2 puede ser positivo. Se debe diferenciar del carcinoma rico en lípidos y del liposarcoma. No hay referenciados estudios genéticos de estos tumores.

Como hay tan pocos casos descritos se sabe poco del pronóstico de estos tumores. Se ha descrito algún caso con metástasis a ganglios axilares y algún caso

aislado de metástasis a distancia después de 10 años de la cirugía (Eusebi y cols., 2012).

I.3.5.d. Carcinoma rico en lípidos

Es un carcinoma en el que no menos del 90% de las células contienen lípidos neutros en su citoplasma. La incidencia es menor del 1-1,6%.

Hasta entre dos tercios a tres cuartos de los carcinomas de mama contienen lípidos en el citoplasma, pero solo los tumores con al menos el 90% de las células que contengan lípidos pueden ser clasificados como esta variante. La mayoría es de grado 3.

Hay que diferenciarlo de otros tumores mamarios de células claras, de metástasis de carcinoma renal y de carcinomas con características modificadas por tratamiento hormonal y de quimioterapia. Necrosis grasa y mastitis xantogranulomatosa también pueden confundirse con estos tumores.

Suelen ser tumores de alto grado, con negatividad para receptores hormonales, HER2 y citoqueratinas de tipo basal.

La mayoría se presentan con metástasis axilares y desarrollan metástasis a distancia (Eusebi y cols., 2012).

I.3.5.e. Carcinoma de células ricas en glucógeno

Es un carcinoma en el que más del 90% de las células neoplásicas tienen citoplasma claro que contiene glucógeno.

La incidencia varía entre el 1 y el 3% de los carcinomas de mama, con una media de edad de 41-78 años.

Macroscópicamente el tamaño varía entre 1 y 8 cm.

Es importante una definición estricta por dos razones: primero, los carcinomas de células claras en la mama son infrecuentes y pueden ser un artefacto de extracción de sustancias intracitoplasmáticas producido durante el procesado del tejido. En segundo lugar, en aproximadamente el 60% de cánceres de mama puede observarse glucógeno intracitoplasmático sin observarse cambio claro en el citoplasma de estas células.

Estas lesiones tienen características estructurales de carcinoma intraductal e invasivo de tipo no específico, y raramente de tipo lobulillar, medular o tubular. Los márgenes son circunscritos o infiltrativos. El componente in situ, que puede ser puro o asociado a componente infiltrante, tiene un patrón de crecimiento compacto, sólido, comedo o papilar.

Las células claras o con citoplasma finamente granular contienen glucógeno PAS positivo diastasa lábil. El núcleo es hipercromático, con cromatina condensada y nucléolo prominente.

Mediante técnicas de inmunohistoquímica, son positivos los receptores de estrógenos en el 50%, mientras que los receptores de progesterona son negativos. Se pueden ver tumores positivos para HER2 y negativos para receptores hormonales de estrógenos y progesterona. Son negativos para actina de músculo liso, GCDFP-15, y CD10.

Se debe diferenciar de otros tumores de células claras de la mama como el carcinoma rico en lípidos, carcinoma histiocitoide apocrino, adenomioepitelioma, hidradenoma de células claras, y metástasis de un carcinoma de células renales y tumores de células epitelioides perivasculares (PEComa) (Eusebi y cols., 2012).

Aunque la mayoría de los trabajos publicados sugieren peor pronóstico que el carcinoma invasivo de tipo no específico, algunos autores no encuentran diferencias de pronóstico con los carcinomas invasivos de tipo no específico y el pronóstico estaría asociado al tamaño, grado histológico y estado ganglionar del tumor (Hayes y cols., 1995).

I.3.5.f. Carcinoma de células acinares

Es un carcinoma de mama similar al carcinoma acinar de la glándula parótida que muestra diferenciación serosa con gránulos de zimógeno en el citoplasma.

Es un tumor raro en la mama, aunque su incidencia real no se conoce porque no hay grandes series publicadas. Fue descrito por Roncaroli y cols. en 1996 como un tumor similar a los de glándula salival, y desde entonces se han publicado pocos casos (sobre 20 casos más). Afecta a mujeres entre 35 y 80 años. Clínicamente se presenta como un nódulo palpable entre 1 y 5 cm.

Microscópicamente varía de bien diferenciado y fácilmente reconocible a sólido (desdiferenciado). Algunos muestran microquistes y espacios microglandulares, o nidos sólidos con comedonecrosis y un ribete de estructuras microglandulares en la periferia. Las células tienen un núcleo irregular u ovoideo, con nucléolo evidente y citoplasma abundante eosinófilo o anfofílico, con gránulos rojizos similares a los observados en las células de Paneth. Pueden predominar las células con citoplasma claro de aspecto hipernefroide. Las mitosis pueden ser numerosas. Casi todos los tumores expresan alfa-1-antiquimiotripsina, amilasa de glándula salival, lisozima, EMA y S100. La mucoproteína GCDFP-15 puede ser focalmente positiva, son negativos para receptores hormonales de estrógenos, progesterona, andrógenos y HER2. Algunos autores describen casos asociados a adenosis microglandular, sugiriéndose una asociación entre las dos lesiones. Una de las características de este tumor es la presencia en la periferia de pequeños túbulos neoplásicos que se han interpretado como transformación neoplásica de la adenosis microglandular (Kahn y cols 2003) y en algunos casos se ha denominado “carcinoma microglandular”. Sin embargo, algunas características morfológicas, ultraestructurales y de inmunohistoquímica son diferentes, por lo que hasta el momento la histogénesis es desconocida (Eusebi y cols., 2012).

Debe diferenciarse del carcinoma secretor, que no tiene características hipernefroides. Además, desde el punto de vista genético, este carcinoma no muestra el reordenamiento t(12;15) ETV6-NTRK3 del carcinoma secretor.

Pueden verse metástasis axilares, pero no se ha descrito el fallecimiento de ningún paciente a causa de la enfermedad, aunque el seguimiento está limitado a un máximo de 10 años (media 3,3 años).

I.4. CLASIFICACIÓN MOLECULAR

Avances recientes en la investigación del genoma humano y en biología molecular hacen posible abordar la complejidad molecular del cáncer de mama y su relación con el tratamiento de la enfermedad (Aranda, 2010).

Para seleccionar el tratamiento más correcto de cada paciente, en la actualidad se intenta estudiar el perfil genético de cada tumor con tecnología de microarrays con la finalidad de determinar tumores de bajo riesgo que no necesiten tratamientos con quimioterapia y tumores que necesiten el tratamiento sistémico (Chang y cols., 2005; Wirapati y cols., 2008; Weigelt y cols., 2010b; Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), 2012). La heterogeneidad del cáncer de mama constituye múltples entidades asociadas a diferentes características biológicas, histológicas, de presentación clínica y pronóstico, y de respuesta al tratamiento, por ello se estudia la asociación entre la patología molecular y los diferentes tipos histológicos de cáncer de mama para intentar buscar nuevas dianas terapeúticas en el tratamiento de la enfermedad (Weigelt y Reis-Filho, 2009b).

Los estudios pioneros en Europa son del grupo holandés de Laura van´t Veer, y en EEUU del grupo de Stanford de Charles M. Perou.

El grupo de Stanford (Perou y cols., 2000; Sorlie, 2004) analizó la expresión de un grupo de genes en muestras de tejido mamario normal y muestras de diferentes tumores de mama, observando que los tumores se agrupaban en dos grupos principales dependiendo de la positividad o negatividad de los receptores de estrógenos y progesterona (RE y RP) y HER2. Según esta diferenciación se pueden clasificar los tumores en:

I.4.1. TIPO LUMINAL

Son receptores hormonales positivos y a su vez se clasifican en:

I.4.1.a. Luminal A

Son tumores con receptores hormonales de estrógenos y genes relacionados con los receptores de estrógenos positivos, receptores de progesterona positivos, y HER2 negativos. Son los tumores de mejor pronóstico (Rakha y cols., 2008). Generalmente presentan una actividad proliferativa menor del 14% (Schnitt y Collins, 2009, Cheang y cols., 2009). Se caracterizan por presentar un panel de genes que expresan típicamente las células epiteliales luminales de la mama (*RP*, *GATA*, *BCL2*) y expresan citoqueratinas 8 y 18. En relación con los tipos histológicos se incluirían dentro de este grupo los ductales infiltrantes de tipo no específico, especialmente los grados 1 y 2. De los tipos histológicos especiales se incluirían el tubular, el cribiforme infiltrante y el lobulillar de tipo clásico.

Actualmente hay estudios que relacionan el estudio genético de los tumores, cuando son receptores de estrógenos positivos y sin metastásis ganglionares, con el pronóstico de estos tumores (Sparano y Paik, 2008).

I.4.1.b. Luminal B

Son tumores receptores de estrógenos positivos, tienen perfil genético de tumores luminales pero, comparados con el tipo Luminal A, tienen un mayor índice de proliferación celular y expresan genes que tienen relación con los subtipos *basal-like* y HER2. Pueden presentar positividad para HER2 o actividad proliferativa mayor del 14%. Tienen peor pronóstico que los tipo luminal A (Rakha y cols., 2008). Tienen un incremento de expresión de genes asociados a HER2 (*ERBB2* y *GRB7*), que se han asociado a resistencia al tratamiento con tamoxifeno, y podrían beneficiarse de tratamiento sistémico. Solo el 30% de estos tumores son HER2 positivos. El Ki67 es un marcador de proliferación celular y un excelente marcador para los casos Luminal B. El punto de corte del Ki67 para valorar si es alto o bajo ha variado según los diferentes estudios desde el 10 al 25% (de Azambuja y cols., 2007). Hay autores como Viale, en un metaanálisis de 1521 pacientes, en donde considera el punto de corte en el 19% (Viale y cols., 2008b) y otros autores en el 20% (Joensuu y cols.,

2003). Hasta ahora el umbral más empleado era el 14% (Cheang y cols., 2009; Goldhirsch y cols., 2011), pero en St. Gallen 2013 la mayoría de los panelistas estaban a favor de subirlo al 20% (Goldhirsch y cols., 2013).

Prat y cols. (2013) comprobaron que un porcentaje alto de tumores luminales B identificados por técnicas de biología molecular eran clasificados como luminales A por inmunohistoquímica. Muchos de estos tumores presentaban baja o nula expresión de receptores de progesterona. Establecieron empíricamente un umbral de expresión para estos receptores en el 20% y comprobaron que el pronóstico de los mismos era claramente peor. Propusieron por tanto que se definiesen los luminales B/HER2- como tumores con receptores de estrógenos positivos, Ki67≥14% y/o receptores de progesterona ≤20%.

I.4.2. TIPO HER2 POSITIVO

Son tumores con receptores hormonales de estrógenos y progesterona negativos y positividad para HER2. Incluirían principalmente casos de ductal de tipo no específico (en torno al 15%, principalmente grado 2 y 3), un subgrupo de carcinomas apocrinos, un pequeño porcentaje de lobulillares pleomórficos (en torno al 20%), y un porcentaje variable de carcinomas micropapilares. Hay que recordar que no existe total equivalencia entre positividad por inmunohistoquímica y la amplificación del gen *HER2*, ya que ocasionalmente pueden verse casos positivos con inmunohistoquímica y que no están amplificados con la hibridación (Ellis y cols., 2005; Lal y cols., 2003; Tubbs y cols., 2001; Varshney y cols., 2004). La importancia de este grupo está determinada, además de por sus implicaciones pronósticas, por la posibilidad de tratamiento con bloqueantes del receptor o de la actividad tirosinquinasa del dominio intracelular del mismo.

I.4.3. TIPO TRIPLE NEGATIVO

Son tumores negativos para receptores de estrógenos, progesterona y para HER2, y presentan un mal pronóstico. Cuando a los tres marcadores mencionados se le añade positividad para las citoqueratinas basales 5 y 17, EGFR, p63, integrina 4,

laminina, c-Kit, integrina a6, cadherina-P, u otros marcadores, se habla de fenotipo basaloide, pero ambos términos no son sinónimos (Nielsen y cols., 2004, Rakha y cols., 2008). Un 15-54% de los tumores basaloides expresan RE, RP o HER2, y los tumores triple negativo que expresan un fenotipo basal presentan una supervivencia libre de enfermedad más corta que los que no lo expresan (Reis-Filho y Tutt, 2008). En este sentido, hay trabajos sobre el papel diagnóstico de la inmunohistoquímica en el carcinoma intraductal de tipo basaloide (Paredes y cols., 2007).

Los tumores triple negativos pueden ser: carcinomas ductales de tipo no específico (15% aproximadamente y principalmente grado 2 y 3), carcinoma medular (de mejor pronóstico) y *medular-like*, carcinoma metaplásico (de pronóstico variable según subtipo), algunos carcinomas apocrinos, la mayor parte de casos de carcinoma secretor (un 80% y de buen pronóstico), el carcinoma de células acinares y el adenoide quístico (de buen pronóstico, aunque constituye el 0,1-0,2% de los cánceres de mama) (Weigelt y cols., 2008).

Algunos de estos tipos presentan alteraciones moleculares adicionales, como el carcinoma medular y el *medular-like*, que presentan una subregulación de genes implicados en la respuesta inmune TH1 que incluye interleukinas, factores reguladores de IFN y genes relacionados con la apoptosis, incluyendo miembros del receptor TNF (Weigelt y cols., 2010a). También presentan subregulación de genes relacionados con el citoesqueleto y la capacidad de invasión, lo que podría explicar el mejor pronóstico de los carcinomas medulares (Weigelt y cols., 2010a).

Los carcinomas metaplásicos presentan subregulación de genes relacionados con las vías de reparación de ADN como *BRCA*, o *PTEN* y *TOP2A* implicados en la resistencia al tratamiento con antraciclinas (Weigelt y cols., 2009a).

El carcinoma adenoide quístico, aunque se incluye dentro del grupo triple negativo/basaloide, presenta características morfológicas bien definidas y un mejor pronóstico. Este grupo tumoral presenta una baja regulación de genes relacionados con la migración celular, proliferación y respuesta inmune que podría explicar en

parte su excelente comportamiento. Recientemente ha sido descrita la traslocación t(6;9)(q22-23;p23-24) que determina la fusión *MYB-NFIB* (Weigelt y cols., 2010a).

Otra traslocación característica es la observada en el carcinoma secretor, que presenta mejor pronóstico dentro de los carcinomas triple negativos: es la fusión de los genes *ETV6-NTRK3* secundaria a t(12;15)(p13; q25) (Weigelt y cols., 2010a). Esta fusión también ha sido descrita en el fibrosarcoma infantil, en el nefroma mesoblástico y en la leucemia mieloide aguda.

Recientemente se ha descrito la expresión de antígenos de tumores testiculares como MAGE-A1, MAGE-A10 y MAGE-A, así como TOP2A en tumores triple negativo. Considerando las limitadas opciones terapéuticas de estos tumores, estos hallazgos podrían abrir nuevas vías de tratamiento (Mrklić y cols., 2014).

I.4.4. TIPO BAJO EN CLAUDINA

En 2007 el grupo de Herschkowitz describió un subtipo molecular caracterizado por la baja expresión de genes de las proteínas de adhesión celular claudina 3, 4 y 7, así como de cadherina-E, son glicoproteínas de adhesión celular dependiente de calcio (Prat y cols., 2010). Estos tumores se caracterizan por presentar características entre células epiteliales y mesenquimales. Una prueba de ello, con técnicas de inmunohistoquímica, es la positividad para vimentina, que no se observa en tejido mamario normal o en carcinomas ductales infiltrantes de tipo NST (Herschkowitz y cols., 2007). Se han relacionado con las células de iniciación tumoral (TIC) y las células madre (*stem cells*), ya que son CD44+/CD24-. Muestran baja expresión de genes luminales (son receptores de estrógenos y progesterona negativos), son HER2 negativos (triple negativos), y tienen baja expresión de cadherina-E. Estas características moleculares están relacionadas con transición epiteliomesénquima (EMT) y *stem cells*. Existe la hipótesis de que las características celulares de estos tumores se parecen más a miofibroblastos que a células epiteliales, y revelan una diferenciación del cáncer de mama que recuerda la cascada de desarrollo del epitelio mamario normal.

Son tumores de mal pronóstico. Son necesarios estudios retrospectivos y prospectivos para valorar sus implicaciones terapeúticas (Prat y cols., 2010; Herschkowitz y cols., 2007, 2012).

I.4.5. TIPO SIMILAR AL TEJIDO MAMARIO NORMAL

El subtipo con perfil génico similar al tejido normal de la mama representa aproximadamente el 10%de los carcinomas de mama). Se caracteriza por una baja expresión de genes de tipo luminal y alta expresión de genes de células de tipo basal, y de células adiposas/mesenquimales o estromales (Rahka 2008). Su pronóstico parece que es mejor que el tipo basal y responde mal a la quimioterapia (Rody y cols., 2007). Debido a que sobrexpresa genes propios de las células mioepiteliales de la mama normal y de las células adiposas, sin peculiaridades inmunohistoquímicas definidas, se pensó en un principio que era una contaminación de tejido mamario normal, pero un trabajo reciente describe un modelo transgénico en ratones en el que la expresión de citoqueratina 6a genera tumores del tipo normal-like (Bu y cols.; 2011).

El epitelio mamario está constituido por células en varios estadíos de diferenciación: un pequeño grupo de células *stem cells* y células progenitoras bipotenciales, que dan lugar a la población de células más diferenciadas epiteliales ductales (o luminales) y células mioepiteliales (basales). Se ha sugerido que las células *stem* y progenitoras son el origen de leucemia y cánceres sólidos incluyendo los que comienzan en el colon, próstata y cerebro. Sin embargo hay controversia si el cáncer de mama comienza en las células *stem*, células progenitoras, o en células más diferenciadas, o si se originan de diferentes células. Esta última posibilidad podría ser responsable de la heterogeneidad fenotípica del cáncer de mama. De la familia de la citoqueratina 6 (citoqueratina 6a, citoqueratina 6b y citoqueratina 6hf) solo la citoqueratina 6a se expresa en el epitelio mamario y marca células bipotenciales progenitoras que pueden inducir tumores que recuerdan el subtipo mamario *normal-like*. En condiciones normales se observan más células queratina 6 positivas cuando el árbol mamario se expande, como en el comienzo de la pubertad o en el embarazo (Bu y cols., 2011).

Las distintas características de los grupos moleculares pueden ser la base para la utilización de tratamientos más o menos específicos para cada uno de ellos. Así el subtipo luminal A se beneficiaría fundamentalmente del tratamiento hormonal, mientras que el subtipo luminal B podría ser candidato a tratamiento mixto con hormonoterapia y quimioterapia. En cuanto a la respuesta al tratamiento quimioterápico, en diversos estudios se ha demostrado una mayor sensibilidad a la quimioterapia neoadyuvante de los carcinomas basales y HER2 positivos en comparación con los luminales. Pese a la mayor sensibilidad a la quimioterapia estándar de los carcinomas basales, su pronóstico es desfavorable. Por ello en la actualidad se están ensayando nuevos regímenes de quimioterapia (incluyendo derivados del platino) y el uso de tratamientos dirigidos a dianas específicas como EGFR (Kalykaki y cols., 2014).

Sin embargo, hay que tener en cuenta que cerca del 20% de los carcinomas de mama no se pueden incluir en ninguno de los subtipos anteriores.

Estudios recientes con micromatrices tisulares (TMA) han analizado la amplificación de otros oncogenes además del *HER2* (*EGFR*, *MYC*, *CCND1* y *FGFR1*) y la deleción de genes de supresión tumoral (p.ej., *BRCA1* y *BRCA2*) (Palacios y cols., 2003a; Lambros y cols., 2007). Entre los genes que sobreexpresan en los tumores HER2 positivos, se encuentran algunos localizados en la misma región cromosómica (17q12) de *HER2*, como *GRB7* y *MLN64* (Vinatzer y cols., 2005), y otros de distintas regiones como *GATA*, o Galectina 1 y 3. Los cambios de expresión de estos genes representan potenciales dianas terapéuticas en el futuro (Mehra y cols., 2005; Nangia-Makker y cols., 2007; Jung y cols., 2007).

I.5 CARCINOMA HEREDITARIO

Aproximadamente entre el 5% y 10% de los cánceres de mama son hereditarios y atribuibles a mutaciones germinales en genes de alta penetrancia. Dos de los genes más relevantes que se han identificado son el *BRCA1* (OMIM 113705) y el *BRCA2* (OMIM 600185).

La mayoría de los cánceres que se desarrollan en mujeres portadoras de mutaciones en *BRCA1* son carcinomas ductales infiltrantes de alto grado histológico, con muchas mitosis, poca formación de túbulos, nidos sólidos con bordes expansivos, zonas de necrosis geográfica e infiltración linfoplasmocitaria peritumoral. Comparados con los casos esporádicos, son más frecuentes los casos de carcinoma medular, de tipo *medular-like*, y de tipo basalioide (Lakhani y cols., 2001; Iau y cols., 2004; Rakha y cols., 2008), y son con más frecuencia receptores hormonales negativos. En ausencia de historia familiar de riesgo no se recomienda realizar estudio de mutación de *BRCA1* en las pacientes con carcinoma medular (Iau y cols., 2004). Comparando los resultados de los receptores hormonales de los carcinomas con mutaciones en BRCA1 con los casos de carcinoma esporádicos, los receptores de estrógenos son negativos en un 73-90% de los casos (35% de los tumores esporádicos). En cuanto a los receptores de progesterona, en el 80% de los casos son negativos (41% en los casos esporádicos).

Hay menos correlación genotipo-fenotipo en los casos asociados a mutaciones en *BRCA2*. En algunos estudios se asocian a carcinomas ductales invasivos de grado II o III. Los tumores no difieren de los casos esporádicos en la proporción de receptores de estrógenos y progesterona. Sin embargo, algunos autores encuentran que comparados con los grupos controles son con más frecuencia receptores de estrógenos positivos (Schnitt y Collins, 2009).

En cuanto a la amplificación y sobreexpresión de HER2, que ocurre entre el 15-30% de los casos esporádicos, es muy infrecuente en los casos BRCA1/2 mutados (0-3,7%) por lo que estas pacientes no son subsidiarias de tratamiento con trastuzumab. En los tumores *BRCA1* es frecuente la monosomía en el cromosoma 17, que ocurre en el 35-61% de los casos. Los tumores *BRCA2* muestran infrecuentemente monosomía del cromosoma 17, pero sin embargo el 20% de los casos son polisómicos (Palacios y cols., 2003a).

Distintos estudios demuestran una mayor incidencia de sobreexpresión de P53 y mutaciones de *P53* en carcinomas *BRCA1* en relación con carcinomas

esporádicos (Palacios y cols., 2003a). Los estudios con tumores *BRCA2* son menos concluyentes, debido a la gran variabilidad de resultados entre las diferentes series.

Casi todos los carcinomas *BRCA1* y *BRCA2* pierden la heterocigosidad (LOH). Se podrían detectar anomalías celulares como BRCA1/2 LOH, en células no atípicas obtenidas por punción aspiración, lavados ductales o aspirados de fluido del pezón, que ayudarían a detectar mujeres portadoras y que tendrían mayor riesgo de padecer cáncer de mama (Honrado y cols., 2005).

Los carcinomas de mama hereditarios no asociados a mutaciones BRCA1/2 ni a otros genes de alta penetrancia, representan el 67% de los cánceres familiares. Se cree que son mayoritariamente carcinomas ductales infiltrantes (67-78%). Son de grado histológico más bajo que los tumores *BRCA1* (un 25-50% corresponden a grado I), con mayor formación de túbulos, menos pleomorfismo nuclear y menos mitosis. En algunos estudios se observa una mayor frecuencia de carcinomas lobulillares (Palacios y cols., 2003a). Son con frecuencia receptores de estrógenos positivos (73-75%), receptores de progesterona positivos (54-67%), y Bcl-2 positivos (55%), pero P53 negativos (78-96%). Estas características son diferentes a los tumores BRCA1, pero similares fenotípicamente a los tumores BRCA2 (Honrado y cols., 2005).

I.6. FACTORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS

El tratamiento del cáncer de mama está estandarizado y es principalmente quirúrgico, con pocos intentos para abordar una terapia apropiada de manera invidualizada. Se ha demostrado que aproximadamente un tercio de carcinomas sin metástasis ganglionares que se habían clasificado en el grupo de “buen pronóstico” desarrollan recurrencias y, sin embargo, una proporción similar de pacientes con ganglios positivos permanecen sin desarrollar metástasis a distancia ni recurrencias.

En las dos últimas décadas el tratamiento del cáncer de mama ha experimentado drásticos cambios y actualmente hay más opciones de tratamiento.

El diagnóstico precoz, debido a los programas de cribado, detecta tumores que tienen un pronóstico más favorable, y así se ha incrementado la importancia de valorar el pronóstico para cada paciente antes de decidir un plan terapéutico.

Pueden dividirse los factores pronósticos en dos grandes grupos: tradicionales y moleculares.

I.6.1. FACTORES PRONÓSTICOS TRADICIONALES

Son los factores pronósticos que se valoran durante el examen histológico convencional del tumor. Para obtener una correcta valoración histológica es importante una cuidadosa preparación de la pieza.

Se recomienda que la pieza se reciba en fresco, se realicen lonchas de aproximadamente 0,5 cm de espesor, para conseguir una fijación homogénea del tejido. Se empleará una proporción de volumen de fijador de aproximadamente 4:1 (formol de alta calidad y tamponado, a una concentración final del 10%), y un tiempo de fijación de entre 6-48 horas, a temperatura ambiente. Si se sospecha que el tiempo de fijación va a ser superior (días festivos, fines de semana, vacaciones), deben tomarse medidas para minimizar el exceso de fijación y realizar una inclusión rápida, y notificarlo en la hoja de incidencias del laboratorio, pero sin olvidar que la fijación nunca debe ser menor de 6 horas. No deben usarse otros tipos de fijadores ya que pueden ser perjudiciales para la realización de técnicas especiales (FISH o PCR). Es recomendable tomar un corte del tejido tumoral al recibir la muestra, de aproximadamente 1,5 x 1,5 x 0,2 cm. para la realización de técnicas especiales. Posteriormente se realizan cortes histológicos de aproximadamente 4-5 micras de grosor y tinción con hematoxilina-eosina. Los cortes son examinados y se valoran los siguientes parámetros:

I.6.1.a. Estado ganglionar

Debe efectuarse por estudio histológico de los ganglios axilares, ya que se considera el principal factor pronóstico. Las pacientes con afectación ganglionar tienen mucho peor pronóstico que las que no tienen invasión ganglionar. En las pacientes con ganglios negativos la supervivencia a 10 años es del 75%, y baja al 25-30% en pacientes con ganglios afectados por el tumor. Cobra importancia:

- Número de ganglios y el nivel locorregional de afectación. Para fines terapéuticos se consideran pacientes con 1-3 ganglios, con 4 a 9, y más de 10 ganglios linfáticos afectados.
- Ganglios de nivel alto axilar, cadena mamaria interna o en otras localizaciones conllevan mal pronóstico.

El vaciamiento ganglionar axilar bajo consigue normalmente entre 4-15 ganglios linfáticos con mínima morbilidad. Se recomienda que la linfadenectomía axilar incluya por lo menos 10 ganglios axilares.

En el estudio de los ganglios linfáticos axilares en cáncer de mama no solo se requiere establecer la presencia o ausencia de carcinoma metastásico, sino también el tamaño mayor del foco metastásico, ya que determina el estadio ganglionar. La clasificación del estadiaje ganglionar según el manual de la comisión americana para el estadiaje del cáncer (TNM, 7ª edición) es la siguiente (Edge y cols., 2010):

- pNx: Los ganglios linfáticos regionales no pueden ser valorados (ya previamente extirpados o no enviados para estudio patológico).

- pN0: No se observan metástasis histológicamente sin estudios adicionales para detectar células tumorales aisladas.
    - pN0 (i-): No se detectan metástasis histológicamente, ni por técnicas de inmunohistoquímica.
    - pN0 (i+): Células tumorales aisladas identificadas histológicamente o por técnicas de inmunohistoquímica, los grupos de células metastásicas son <0,2 mm.
    - pN0 (mol-): No se detectan histológicamente metástasis ni por técnicas de biología molecular (RT-PCR).
    - pN0 (mol+): No se detectan metástasis histológicamente pero sí por técnicas de biología molecular (RT-PCR). Equivalencia en número de copias de ARNm-CK19: ≤ 250, > 100 copias (Bernet y cols., 2014).

- pN1: Metástasis en 1-3 ganglios axilares y/o ganglios de la cadena mamaria interna con enfermedad microscópica detectada por disección de ganglio centinela, pero no clínicamente detectable.
    - pN1mi: Micrometástasis (>0,2 mm y/o más de 200 células en un corte de tejido, no >2.0 mm). Equivalencia en número de copias de ARNm-CK19: ≥250, < 5.000 copias (Bernet y cols., 2014).
    - PN1a: Metástasis en 1-3 ganglios axilares >2.0mm. Equivalencia en número de copias de ARNm-CK19: ≥ 5.000 copias (Bernet y cols., 2014).
    - PN1b: Metástasis en los ganglios de la cadena mamaria interna con enfermedad microscópica detectada por biopsia de ganglio centinela, pero no clínicamente aparente.
    - PN1c: Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos axilares y en ganglios de la cadena mamaria interna con micrometástasis o macrometástasis detectada por disección de ganglio centinela, pero no clínicamente aparente.

- pN2: Metástasis en 4 a 9 ganglios linfáticos axilares o en ganglios de la cadena mamaria interna detectables clínicamente en ausencia de metástasis en ganglios axilares.
    - pN2a: Metástasis en 4 a 9 ganglios axilares (al menos un grupo metastásico >2.0 mm.).
    - pN2b: Metástasis clínicamente detectables en ganglios del mismo lado de la cadena mamaria interna en ausencia de metástasis axilares.

- pN3: Metástasis en 10 o más ganglios linfáticos axilares o en ganglios linfáticos infraclaviculares, en ganglios del nivel III axilar, o en ganglios de la cadena mamaria interna detectables clínicamente en presencia de uno o más ganglios linfáticos axilares del nivel I o II; o en más de tres ganglios axilares con metástasis microscópicas en ganglios de la cadena mamaria interna del mismo lado detectados por biopsia selectiva de ganglio centinela pero no detectables clínicamente, o en ganglios supraclaviculares.

- pN3a: Metástasis en 10 o más ganglios linfáticos axilares (al menos un grupo de células metastásicas >2.0 mm), o metástasis en ganglios infraclaviculares (nivel III axilar).
- pN3b: Metástasis en ganglios de la cadena mamaria interna clínicamente detectables en presencia de uno o más ganglios linfáticos positivos axilares, o en más de tres ganglios axilares y en la cadena mamaria interna con enfermedad microscópica detectada por biopsia selectiva de ganglio centinela, pero no detectable clínicamente.
- pN3c: Metástasis en ganglios supraclaviculares del mismo lado.

Si solo se estudia el ganglio centinela se añadirá el sufijo "sn" (por ejemplo: pN0sn). Si la pieza ganglionar es postratamiento antineoplásico se añadirá el prefijo "y" (por ejemplo, ypN0). Es también importante referenciar si hay infiltración tumoral perigangliónar. No se considera factor pronóstico independiente, pero se correlaciona con el número de ganglios afectados.

I.6.1.b. Ganglio centinela

Es la extirpación del primer ganglio linfático al que drena el tumor. Cada ganglio centinela debe ser informado por separado y especificar el nivel axilar. Si el estadío patológico ganglionar está basado solo en el estudio del ganglio centinela debe añadirse el sufijo "sn" (por ejemplo, pN0sn en una paciente con ganglio centinela negativo) Las técnicas de inmunohistoquímica (cóctel de citoqueratinas AE1-AE3, citoqueratina 19, citoqueratina 7, o CAM5.2 han contribuido a mejorar la detección de las micrometástasis y células tumorales aisladas.

En la actualidad se están imponiendo las técnicas moleculares en estudio intraoperatorio, que determinan cuantitativamente el ARNm de la citoqueratina 19 con resultados disponibles en aproximadamente 30 minutos. El método diagnóstico OSNA ***(One-Step Nucleic Acid Amplification)*** representa un procedimiento objetivo, reproducible y estandarizado. Se basa en la amplificación del ARNm de la CK19, de alto valor discriminatorio entre tejido linfoide no metastásico y con metástasis por carcinoma de mama. La amplificación se realiza por medio de una reacción RT-LAMP, que se realiza en un corto espacio de tiempo (16 min) y a temperatura

isotérmica (65º C) (Tsujimoto y cols., 2007).

Las principales ventajas de este método son las siguientes:

1. Estudiar la totalidad del ganglio sin pérdida de tejido.
2. La rapidez de la reacción de amplificación (16 min), lo que permite realizar el diagnóstico intraoperatorio.
3. Temperatura de reacción isotérmica (65ºC).
4. Elevada velocidad y especificidad de la reacción al trabajar con 6 primers frente a los 2 primers habituales en las reacciones de PCR convencionales.
5. Estandarizar el diagnóstico del ganglio centinela al ofrecer una lectura cuantitativa y cualitativa reproducible.

El método OSNA, al ser el único procedimiento que permite el estudio del ganglio centinela en su totalidad y sin pérdida de tejido, puede conllevar la detección de un mayor porcentaje de metástasis de pequeño volumen (micrometástasis y células tumorales aisladas), permitiendo por primera vez el seguimiento de grupos estandarizados de pacientes. No constituyen indicación de linfadenectomía axilar los casos con baja carga tumoral o perfil bajo de riesgo. Constituye indicación de linfadenectomía axilar: a) Carga tumoral mayor de 10.000-15.000 copias; b) Diagnóstico de macrometástasis (TNM, 7ª edición), salvo en el contexto de pacientes con criterios de «bajo riesgo» del tumor primario, pacientes que cumplan los criterios del ensayo Z0011 (Giuliano y cols., 2010) o en el contexto de ensayos clínicos (Bernet y cols., 2014).

Puede tambien efectuarse estudio intraoperatorio de citología por raspado o impronta del ganglio y posteriormente se realizará el estudio histológico de la totalidad del ganglio en diferido (Bernet y cols., 2014).

I.6.1.c. Tamaño tumoral

La relación entre el tamaño del tumor y el pronóstico es prácticamente lineal: a mayor tamaño peor pronóstico. El riesgo de recidiva en tumores inferiores a 1 cm en enfermas no tratadas, es del 10-12% a los 20 años. Para fines pronósticos el tamaño del tumor debe ser determinado por el patólogo, ya que la medida clínica puede no

ser lo suficientemente precisa. Se debe medir el tumor en tres planos y se recomienda realizar la medida en fresco. El tamaño se vuelve a valorar después de la fijación y posteriormente se valora el mayor diámetro, en los cortes histológicos, que es el que se utiliza como parámetro pronóstico. Cuando se detecte más de un foco tumoral en la misma mama, se clasifica según el foco de mayor tamaño.

La estimación del tamaño del tumor es particularmente importante en el contexto de los programas de cribado. Los tumores de 10 mm o menos de diámetro se denominan carcinomas mínimamente invasivos, y con más frecuencia tienen estadíos más bajos (ganglios linfáticos negativos) que los tumores mayores de 15 mm. Para análisis de supervivencia a largo plazo el punto de corte de tamaño es de 15 mm. En el programa nacional de cribado de mama del Reino Unido (NHSBSP) el objetivo es que el 50% de los carcinomas invasivos detectados midan menos de 15 mm.

Estadío según tamaño tumoral siguiendo el manual de la comisión americana para estadiaje del cáncer de mama (Edge y cols., 2010).

- Tx: No puede asegurarse el tamaño del tumor primario.
- T0: No existe evidencia de tumor primario.
- Tis: Carcinoma in situ.
    - Tis (DCIS): carcinoma ductal in situ.
    - Tis (LCIS): carcinoma lobulillar in situ.
    - Tis (Paget): Enfermedad de Paget del pezón no asociada a tumor *in situ* o infiltrante en el tejido mamario. Si existe carcinoma en el parénquima mamario se clasificará basándose en el tamaño del tumor del parénquima mamario añadiendo la presencia de enfermedad de Paget.
- T1: Tumor menor o igual a 20 mm en su dimensión mayor.
    - T1mi: Microinvasión menor o igual a 1 mm en su dimensión mayor.
    - T1a: >1 mm pero no >5 mm en su dimensión mayor.
    - T1b: >5 mm pero no >10 mm en su dimensión mayor.
    - T1c: >10 mm pero no >20 mm en su dimensión mayor.
- T2: Tumor >20 mm pero no >50 mm en su dimensión mayor.

- T3: Tumor >50 mm en su dimensión mayor.
- T4 Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a la pared torácica o a la piel.
    - T4a: Extensión a la pared torácica, no incluyendo solo adherencia/ infiltración del músculo pectoral.
    - T4b: Edema (incluyendo piel de naranja) o ulceración de la piel de la mama, o nódulos satélites en la misma mama.
    - T4c: T4a y T4b.
    - T4d: Carcinoma inflamatorio.

En casos de múltiples focos de tumor infiltrante se pondrá el sufijo “m” y se clasificará según el tamaño del mayor foco de tumor infiltrante. Cuando se trate de piezas extirpadas después de tratamiento antineoplásico (radioterapia, quimioterapia u hormonoterapia) se pondrá el prefijo “y” (por ejemplo, ypT2).

I.6.1.d. Tipo histológico

El 80% de los cánceres de mama son del tipo ductal infiltrante; el tipo lobulillar es el segundo más frecuente, siendo el pronóstico similar en los dos tipos con una tendencia favorable en el tipo lobulillar.

I.6.1.e. Grado histológico

Aunque la determinación del grado histológico es subjetiva, se ha constatado su utilidad en las escalas de Scarff-Bloom-Richardson, el grado nuclear de Fisher (Fisher y cols., 1980b) y el índice pronóstico de Nottingham (NPI) (D´Eredita y cols., 2001). Está ampliamente demostrada la asociación entre el grado histológico y la supervivencia de los carcinomas invasivos y se reconoce como un factor pronóstico muy importante que debe ser incluido en todos los diagnósticos de cáncer de mama.

El método de Scarff, Bloom y Richardson (Bloom y Richardson, 1957) y modificado posteriormente por Elston y Ellis (Elston y Ellis, 1991). Se valoran tres características según la diferenciación tubular, pleomorfismo nuclear y número de mitosis, y se le da un índice numérico del 1 al 3:

1. Formación de túbulos, como expresión de la diferenciación glandular:

- Más del 75% del tumor ..... Índice 1
- Del 10 al 75%..... Índice 2
- Menos del 10% ..... Índice 3

2. Pleomorfismo nuclear:
    - Núcleo pequeño, regular y uniforme ..... Índice 1
    - Variabilidad moderada..... Índice 2
    - Variabilidad marcada..... Índice 3
3. Número de mitosis: Se cuenta el número de mitosis por cada 10 campos de gran aumento. Solo se contarán las mitosis claras y si hay heterogeneidad en el tumor se elegirán las zonas de mitosis más frecuentes. También hay que tener en cuenta que el diámetro del campo varía según el microscopio utilizado y por tanto también el índice.

    Se suman las tres cifras y el resultado es el grado histológico:
    - Grado 1 - Bien diferenciado: ..... 3-5 puntos
    - Grado 2 - Moderadamente diferenciado: ..... 6-7 puntos
    - Grado 3 - Pobremente diferenciado: ..... 8-9 puntos

I.6.1.f. Invasión vascular

Hay diferentes opiniones en la literatura sobre su influencia en el pronóstico. La infiltración vascular hay que valorarla por fuera del tumor y no confundirla con el artefacto por retracción del tejido conjuntivo debido a una fijación incorrecta. Los émbolos tumorales deben estar en el interior de cavidades limitadas por endotelio. Se correlaciona con la presencia de infiltración tumoral ganglionar. Es uno de los factores más importantes para predecir la recidiva en pacientes con ganglios linfáticos negativos, recidivas después de cirugía conservadora y recurrencias después de mastectomía. Este factor pronóstico ha sido incluido en los factores de riesgo del consenso de expertos en St. Gallen (Goldhirsch y cols., 2009)

La infiltración tumoral vascular extensa puede ser difícil de diagnosticar si las células tumorales llenan completamente los espacios vasculares y pueden confunirse con un carcinoma *in situ* (Lester y cols., 2012).

La infiltración tumoral vascular se observa en aproximadamente el 15% de los pacientes sin metástasis en ganglios linfáticos axilares y debe interpretarse como factor pronóstico independiente (Lee y cols., 2006).

Algunos subtipos de cáncer se asocian con baja incidencia de metástasis en ganglios linfáticos y metastatizan por vía sanguínea dando metástasis a distancia, como es frecuente en los carcinoma triple negativo (Lester y cols., 2012).

I.6.2. RECEPTORES HORMONALES

El estado de los receptores hormonales es un marcador molecular incluido en los factores pronósticos de cáncer de mama y representa también un factor predictivo, de forma que solo debe administrarse tratamiento hormonal a pacientes cuyos tumores expresen dichos receptores hormonales.

Hay dos tipos de receptores de estrógenos: alfa y beta. El primero es el que se usa en la práctica clínica. Está codificado por un gen localizado en el cromosoma 14q22-q24, se sintetiza en el citoplasma y se traslada al núcleo donde se forma el complejo receptor-esteroide, con dimerización del receptor. Algunos genes regulados por los receptores de esteroides se involucran en el control del crecimiento celular y esos efectos son los más relevantes en la influencia de los receptores hormonales en el pronóstico y tratamiento del cáncer de mama.

El método más empleado para la evaluación de los receptores de estrógenos fue propuesto por el grupo de Allred (Allred y cols., 1998; Harvey y cols., 1999). Este método tiene en cuenta tanto el porcentaje de células positivas (que se valora de 1 a 5) como la intensidad de tinción (de 1 a 3). La puntuación final se calcula sumando ambos resultados. Los casos con una puntuación mayor o igual a 3 se consideran positivos.

La Sociedad Americana de Oncología y el Colegio Americano de Patólogos (ASCO/CAP) recomienda en su guía el estudio inmunohistoquímico con anticuerpos monoclonales para valorar el estado de los receptores de estrógenos y progesterona

en todos los carcinomas invasivos de mama y en las recurrencias. Se recomienda que el resultado se considere positivo si hay al menos se observa un 1% de positividad en los núcleos de las células neoplásicas, ya que hay pacientes que se benefician del tratamiento adyuvante endocrino con tumores que contienen solo un 1% de células con positividad para receptores de estrógenos (Hammond y cols., 2010). La ausencia de beneficio del tratamiento hormonal en mujeres con tumores con receptores de estrógenos negativos se ha confirmado en ensayos clínicos (Hammond y cols., 2010). Pero la desventaja de la inmunohistoquímica es que no da información sobre el estado funcional del receptor. Además, la valoración es subjetiva y la reproducibilidad interobservador es moderada. La reproducibilidad es mayor cuando el nivel de estrógenos es alto. En estos casos la reproducibilidad interlaboratorios es de un 80%, pero este porcentaje cae a solo el 37% en tumores de baja expresión de receptores de estrógenos.

Se realizan esfuerzos para obtener resultados objetivos con: 1) controles de calidad externos, 2) fijación inmediata del tejido en formol neutro tamponado 24-72 horas para optimizar la tinción, 3) incremento de la recuperación antigénica, 4) una selección correcta del anticuerpo, 5) la inclusión de un control positivo (mejor en el mismo portaobjetos), y 6) técnica automatizada mejor que manual. Para el control de tejido mamario normal debe recordarse que se tiñen entre el 10-15% de las células lobulillares y ductales, la tinción es heterogénea y las células mioepiteliales son negativas. El epitelio apocrino no expresa receptores de estrógenos ni de progesterona, pero sí receptores de andrógenos.

El carcinoma intraductal bien diferenciado o grado 1 y la neoplasia lobulillar *in situ* de tipo clásico son receptores hormonales positivos. Los carcinomas infiltrantes bien diferenciados (carcinoma tubular, mucinoso, lobulillar infiltrante de tipo clásico y carcinoma ductal infiltrante grado I) son todos positivos para receptores de estrógenos. Por el contrario, carcinomas de alto grado con reacción linfocitaria estromal (como el carcinoma medular, carcinomas apocrinos y carcinomas metaplásicos) son receptores de estrógenos y progesterona negativos. Los carcinomas con receptores de estrógenos negativos y receptores de progesterona positivos son raros o no existen (Nadji y cols., 2005). Aproximadamente el 80% de

los carcinomas invasivos son receptores de estrógenos positivos en una proporción que varía entre el 1 y el 100% de las células neoplásicas, y se ha demostrado que la positividad de receptores de estrógenos es un factor predictivo para la respuesta al tratamiento hormonal como el tamoxifeno (Dowsett, 2003), o los inhibidores de la aromatasa (que suprimen la producción de estrógenos) (Allred y cols., 2012).

La positividad en las metástasis ganglionares es paralela a la del tumor primario (Santiago y cols., 2009).

Los receptores de progesterona se expresan en el núcleo de 60-70% de los carcinomas de mama. Hay una correlación directa entre los niveles de expresión y la respuesta al tratamiento hormonal (Allred y cols., 2012).

Los resultados de los receptores hormonales combinados con otros factores pronósticos como tamaño del tumor y ganglios axilares, son datos necesarios para decidir el tratamiento adecuado en cada paciente. Así, por ejemplo, quimioterapia y/o tamoxifeno deben considerarse como tratamiento en mujeres con tumores de 1 cm o menos con receptores de estrógenos positivos o negativos y sin metástasis en ganglios axilares (Fisher y cols., 2001).

I.6.3. Ki67

La regulación del crecimiento celular se basa en el balance entre proliferación y muerte celular. El ciclo celular en las células somáticas se puede definir como el conjunto de sucesos que tienen lugar entre dos divisiones mitóticas, y se divide en las siguientes fases: G1, S, G2 y M, y la fase G0 o fase de quiescencia, en la que se encuentran las células que no están proliferando. Tras la mitosis, las células hijas entran en la fase G1 de duración variable según el tipo de célula, en la que se realizan las funciones citológicas específicas. Al final de la fase G1 la célula se prepara para el ciclo y organiza los elementos necesarios para la fase siguiente. En la fase S, fase de síntesis de ADN o fase de replicación de ADN, el material genético de la célula se duplica. En la fase G2 la célula comprueba que la replicación del ADN se ha producido adecuadamente y se realizan los preparativos para la fase siguiente,

es decir, la síntesis de proteínas necesarias para la mitosis. La mitosis (fase M) implica dos procesos, la cariocinesis o división del núcleo, y la citocinesis o división del citoplasma.

Desde el punto de vista morfológico, con las técnicas de rutina no podemos saber qué células están en ciclo de división, a no ser que estén en fase M. Las células en las restantes fases del ciclo no difieren morfológicamente de la célula en reposo.

Cuando se altera el control de la proliferación celular se produce un desequilibrio entre el número de células en división y el número de células programadas para su diferenciación y/o muerte celular (apoptosis). Este control está basado en un balance entre señales estimulantes e inhibitorias y cuando se altera debido a modificaciones genéticas surge la transformación neoplásica (Gago, 1997).

Determinados genes supresores codifican proteínas que transmiten señales estimuladoras del crecimiento normal (Bishop, 1987), y algunas de estas proteínas están comprometidas en el control del ciclo celular (Studzinski, 1989). Por ejemplo, la estimulación mitógena de células quiescentes induce un aumento de la expresión de c-fos y c-myc (Greenberg y Ziff, 1984; Kelly y Siebenlist, 1986). Por otro lado, la inhibición del crecimiento por parte de los genes supresores *Rb* y *P53* se consigue por medio de proteínas nucleares que actúan en G1, evitando la progresión del ciclo celular (Marshall, 1991).

A través de estos datos se explica el porqué encuadramos la proliferación como un proceso molecularmente regulado, participando oncogenes y antioncogenes. Hay alteraciones moleculares en las que oncogenes como el c-myc, comprometidos en la proliferación celular normal, estarían sobrexpresados e implicados en diversos procesos de tumorogénesis (Kelly y Siebenlist, 1986; Almendral y cols., 1988; Jiwa y cols., 1993).

Los genes codifican proteínas nucleares que se unen con gran afinidad al ADN, pero sin que al parecer tengan ninguna afinidad a una determinada secuencia

de bases (Donner y cols., 1982; Watt y cols., 1985). El mecanismo de la proliferación es extremadamente complejo y en el pueden incidir, además, factores del tipo de proteínas virales como las del HTLV1, que estimulan la proliferación celular (Sawyers y cols., 1991).

La proliferación celular en los tumores constituye una varible biológica importante a tener en cuenta, valorada en conjunto con el resto de los marcadores pronósticos (tamaño tumoral, grado histológico, estado ganglionar, invasión vascular, estado de los receptores hormonales y de HER2, y edad de la paciente) (Colozza y cols., 2005; Goldhirsch y cols., 2009, 2011, 2013).

La cuantificación de la proliferación celular puede realizarse por diversos métodos tales como el contaje de mitosis (Baak, 1990); índice de incorporación de timidina tritiada (Johnson y Bond, 1961; Meyer y cols., 1986) o su análogo bromodeoxiuridina (Gratzner, 1982; Dean y cols., 1984), demostración de regiones organizadoras nucleolares por métodos argénticos-contaje de AgNORs (Goodpasture y Bloom, 1975; Ploton y cols., 1986) y de citometria de flujo (Quirke y Dyson, 1986; Koss y cols., 1989) o estática (Taylor y cols., 1989). Todos estos métodos tienen ventajas e inconvenientes desde el punto de vista de reproducibilidad y de la facilidad o dificultad de realización en condiciones rutinarias (Quinn y Wright, 1990).

Las técnicas de inmunohistoquímica han proporcionado diversos marcadores para poner de manifiesto la proliferación celular como Ki67 (Gerdes y cols., 1984), PCNA (Bravo y cols., 1987; García y cols., 1989) y MIB1 (McCormick y cols., 1993). Otros marcadores inmunohistoquímicos de proliferación son la alfa DNA-polimerasa (Tanaka y cols., 1982), el receptor de transferrina CD71 (Habeshaw y cols., 1983), la p125/6.5 (Philipova y cols., 1987), y el Ki-S1 (Sampson y cols., 1992).

La existencia de antígenos nucleares humanos asociados a la proliferación celular se sugirió al identificar autoanticuerpos en el suero de algunos pacientes con lupus eritematoso (Miyachi y cols., 1978). En 1983 Gerdes y su grupo de investigación de la Universidad de Kiel, buscando un marcador para linfoma de

Hodgkin en la línea celular L428, obtienen un anticuerpo monoclonal que denominan Ki67 (por Kiel). Este anticuerpo reconoce un antígeno nuclear humano que se halla en células proliferantes, pero está asusente en células en reposo (Gerdes y cols., 1983).

El antígeno Ki67 es una proteína no histónica con una doble banda de 345 y 395 kDa (Gerdes y cols., 1991). El gen que lo codifica está situado en el cromosoma 10 (Schonk y cols., 1989). Se detecta en todas las fases del ciclo celular excepto en G0 y por tanto se expresa en G1, S, G2 y M (Gerdes y cols., 1984). A diferencia de la PCNA, no hay acuerdo en la bibliografía sobre la distribución del Ki67 en G1. Algunos autores afirman que aparece al final de la misma (Gerdes y cols., 1984), acumulándose durante el ciclo celular, desde G1 a la mitosis, fase en la que alcanza su punto máximo e inmediatamente después de la mitosis la cantidad de Ki67 disminuye llegando al nivel mínimo (Duchrow y cols., 1994). Otros autores postulan que los niveles de Ki67 disminuyen a lo largo de G1 y desaparecen al final de esta fase (Lopez y cols., 1991). También a diferencia de la PCNA, el Ki67 no está relacionado con la reparación del DNA (Hall y cols., 1993), y muestra una gran correlación con datos de fracción de crecimiento obtenidos mediante otros métodos (Scott y cols., 1991; McCormick y cols., 1993).

El Ki67 puede usarse rutinariamente en tumores como marcador de proliferación celular, y puede detectarse el antígeno Ki67 en tejidos incluidos en parafina mediante varios anticuerpos comercializados, como por ejemplo KiS5 o KiS11 (Rudolph y cols., 1999), pero el anticuerpo MIB1 es el que se usa con mayor frecuencia (Cattoretti y cols., 1992; McCormick y cols., 1993). La fijación recomendada es en formol neutro tamponado con el mismo tiempo de fijación que para los receptores hormonales (Hammond y cols., 2010; Dowsett y cols., 2011). El índice Ki67 se define como el porcentaje de células teñidas sobre el número total de células neoplásicas cuantificadas.

La valoración del Ki67 en los tumores es importante como:

- Factor pronóstico.

- Predicción de respuesta o resistencia a tratamiento de quimioterapia o tratamiento hormonal.
- Estimación del riesgo en pacientes sometidos a tratamiento estandarizado.
- Biomarcador dinámico para valorar la eficacia del tratamiento neoadyuvante, particularmente en tratamiento hormonal (Dowsett y cols., 2011).

En el año 2000 el grupo de Charles Perou introdujo la clasificación molecular del cáncer de mama usando técnicas de microarrays de DNA, y se comprobó que estos subtipos se correlacionan con el pronóstico (Sorlie y cols., 2004). El Ki67 es uno de los cuatro marcadores empleados en el panel IHC4 (receptores de estrógenos, receptores de progesterona, HER2 y Ki67) para la aproximación inmunohistoquímica a los subtipos biológicos del cáncer de mama (Cuzick y cols., 2011; Harbeck y cols., 2014).

Un Ki67 alto se asocia con tumores de alto grado, tamaño grande, afectación ganglionar, fenotipo basal, receptores hormonales negativos y HER2 positivo. También se observan diferencias raciales y así hay estudios que demuestran un mayor índice de proliferación celular en mujeres afroamericanas comparadas con mujeres caucasianas, especialmente en mujeres jóvenes (Agboola y cols., 2013). Lo más importante es que un Ki67 alto se asocia con mayor probabilidad de recidiva del tumor y disminución de la supervivencia global (de Azambuja y cols., 2007).

La clasificación inmunohistoquímica, que se emplea rutinariamente por su disponibilidad, rapidez y precio, es la siguiente (Goldhirsch y cols., 2013):

- Luminal A: receptores de estrógenos positivos, receptores de progesterona >20%, HER2 negativo y Ki67 bajo (<14%).
- Luminal B/HER2-: receptores de estrógenos positivos, receptores de progesterona ≤20%, HER2 negativo y Ki67 alto (≥14%).
- Luminal B/HER2+: receptores de estrógenos y/o progesterona positivos y HER2 positivo.
- HER2: Receptores hormonales negativos y HER2 positivo.
- Triple negativo: Receptores hormonales negativos y HER2 negativo.

Tipo IHQ	R.Estrógenos	R.Progesterona	HER2	Ki67
Luminal A	+	>20%	-	<14% (Bajo)
Luminal B/HER2-	+	≤20%	-	≥14% (Alto)
Luminal B/HER2+	+ / - (RP+)	+ / - (RE+)	+	----------
HER2	-	-	+	----------
Triple Negativo	-	-	-	----------

I.7. HER2

El cáncer de mama se ha relacionado con amplificación y/o sobreexpresión de algunos oncogenes (Vadgama y cols., 2006). Los oncogenes son formas activadas de los genes normales celulares, protooncogenes, requeridos durante la embriogénesis y la mitosis, para reponer las células que se pierden durante la muerte celular programada (apoptosis). Los oncogenes requieren la activación de solo un alelo para ejercer influencia oncogénica. Esta activación puede ocurrir por mutaciones, duplicación/amplificación, reordenamiento, promotores virales, hipometilación de los genes, o secuencias reguladoras. Los oncogenes se clasifican por su función y/o localización celular (Bishop, 1987).

El oncogén *HER2* se identificó por primera vez en 1984 (Schechter y cols., 1984). Localizado en el brazo largo del cromosoma 17 (17q11.2-q12) codifica una glucoproteína que actúa como receptor de membrana de 185 kDa (p185) con actividad tirosina-quinasa. Esta molécula pertenece a la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico humano (HER1-4). Aunque se denomina comúnmente *HER2*, es también conocido como *neu* (gen de la rata) o *c-erb-B2* (se denomina con el sufijo B ya que el *c-erb-A* es otro gen con algunas similitudes, y que codifica el receptor de la tirosina, fue identificado en neuroblastomas de ratas inducidos por carcinógenos químicos (etilnitrosurea) (Shih y cols., 1981), y presenta importantes homologías con el oncogén viral asociado a la eritroblastosis aviar *(v-erb)* (Downward y cols., 1984).

En 1987 Slamon y cols. describieron la amplificación del gen *HER2* en un grupo de 103 cánceres de mama demostrando además su asociación con menor intervalo libre de enfermedad y menor supervivencia. En publicaciones posteriores

de los mismos autores con series más grandes de pacientes se consolida el valor pronóstico de la amplificación y sobreexpresión del gen *HER2* (Slamon y cols., 1987, 1989 y 2001). La sobreexpresión del receptor está producida por la amplificación del oncogén que lo codifica.

Los receptores del factor de crecimiento epidérmico humano de la familia HER son un grupo de cuatro receptores de superficie celular: HER1 (EGFR), HER2, HER3 y HER4, involucrados en la comunicación célula-célula y célula-estroma. La proteína HER2 se localiza en la membrana celular y transmite señales desde la membrana celular hacia el núcleo. Las señales transmitidas hacen que la célula prolifere adecuadamente. Cada célula contiene normalmente dos copias del gen *HER2* y éstas deben de producir una cantidad apropiada de la proteína HER2 en la superficie celular. Cuando el gen *HER2* está amplificado aumenta la transcripción de ARNm y se produce una cantidad excesiva de proteína que transmite señales a las células para que se dividan, crezcan y se multipliquen a mayor velocidad que las células normales. Además se disminuye también la apoptosis, la diferenciación y la adhesión celular; contribuyendo de este modo a la progresión del cáncer (Holbro y cols., 2003).

La activación de los receptores requiere tres variables: un ligando, un receptor, y una pareja de dimerización. El lugar de unión al ligando es el dominio extracelular, la membrana plasmática es el dominio de transmembrana y el citoplasma es el dominio intracelular con actividad tirosina-quinasa. El ligando se une a un receptor, y el receptor debe interaccionar con otro receptor de estructura idéntica o relacionada en un proceso conocido como dimerización, para activar señales en cascada dentro de la célula. Si se une con un miembro idéntico de la familia se produce una homodimerización, y si lo hace con miembros diferentes de la familia se trata de una heterodimerización (Rubin y Yarden, 2001).

No se ha identificado un ligando endógeno específico para el receptor HER2. (Slamon y cols., 1987) Se cree que puede no existir ligando y que HER2 se une a otros miembros de la familia formando heterodímeros. Actúa como correceptor y es la pareja de dimerización preferida para otros miembros de la familia de los

receptores del factor de crecimiento. Los heterodímeros de HER2 son más estables y sus señales más potentes que otras combinaciones que no contengan HER2, especialmente el dímero HER2-HER3, combinación con más potencia mitógena y la que predomina en las células de los carcinomas (Rubin y Yarden, 2001).

I.7.1. HER2 COMO FACTOR PRONÓSTICO

La amplificación/sobreexpresión de HER2 se ha observado entre el 15-30% de todos los cánceres de mama (Slamon y cols., 1987, 1989, 2001; Andrulis y cols., 1998; Dandachi y cols., 2004; Garcia-Caballero y cols., 2006; Sauter y cols., 2009; Francis y cols., 2009), aunque los datos más recientes sitúan la positividad entre el 15 y el 20% (Wolff y cols., 2013).

La sobreexpresión de la proteína HER2 y/o la amplificación del gen *HER2*, es un factor de mal pronóstico con enfermedad más agresiva, y un acortamiento de tiempo sin recidivas comparando con tumores HER2 negativos (Slamon y cols., 1989; Andrulis y cols., 1998). Se considera un factor pronóstico independiente en relación con el riesgo de recurrencias, particularmente importante en tumores con ganglios linfáticos negativos (Andrulis y cols., 1998). Los tumores HER2 positivos se asocian con estadios clínicos avanzados, metástasis y mal pronóstico (Vadgama y cols., 2006; Dandachi y cols., 2004).

El Colegio Americano de Patólogos en el simposio sobre factores pronósticos de cáncer de mama en 1999 ya incluye la determinación de HER2 como factor pronóstico de categoría II (Fitzgibbons y cols., 2000), y en el simposio de mayo de 2002 y también está incluida su determinación en las recomendaciones para el uso de marcadores tumorales en cáncer de mama por la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) (Harris y cols., 2007). Existen numerosos trabajos sobre su importancia como factor pronóstico y en la repercusión en el tipo de tratamiento (Zarbo y Hammond., 2003; Dandachi y cols., 2004; Joensuu y cols., 2003). La amplificación de *HER2* se correlaciona con el grado histológico de Scarff-Bloom-Richardson del tumor infiltrante: se observa sobreexpresión en los carcinomas grado

2 o 3, y es muy rara la positividad en los grado 1 (Lewis y cols., 2004; Hoff y cols., 2002; Ridolfi y cols., 2000).

La sobreexpresión de HER2 en carcinomas ductales *in situ* (CDIS) fue descrita por van de Vijver en 1988, y se asocia a carcinomas de alto grado nuclear con necrosis de tipo comedocarcinoma. Aproximadamente el 60% de los CDIS de grado nuclear 3 presentan amplificación génica, que también se correlaciona con la presencia de necrosis y un patrón de crecimiento tipo comedocarcinoma. Solo un 15-20% de los CDIS de bajo grado (grado nuclear 1 ó 2) presentan amplificación (De Potter y cols., 1995; Mack y cols., 1997; Lewis y cols., 2004). En la tercera parte de los CDIS de alto grado, existe una amplificación simultánea de *c-myc* y es frecuente la asociación de HER2/neu con la sobreexpresión de p53 (Mack y cols., 1997; Ménard y cols., 2001 a y b).

Como ya dijimos, la sobreexpresión de HER2 incrementa la proliferación y migración celular. En este sentido es de interés la observación de que el 80-100% de los casos de la enfermedad de Paget de la mama, y algunos casos de enfermedad de Paget extramamarios, sobreexpresan HER2, tanto en el componente de carcinoma *in situ* como en las células que infiltran la epidermis (Wolber y cols., 1991). Estudios recientes han demostrado que la herregulina-alfa es un factor de movilidad producido y secretado por las células de la epidermis que, al unirse a receptores (HER2, HER3 y HER4), promovería la quimiotaxis de las células neoplásicas, que finalmente podrían migrar hasta la epidermis del pezón. Este mismo mecanismo también puede influir en las metástasis (Schelfhout y cols., 2000; Bianco y Vasef, 2006). Hay estudios que demuestran que la mayoría de los casos de enfermedad de Paget de la mama presentan amplificación de *HER2*, a diferencia de los casos de enfermedad de Paget de la vulva (Bianco y Vasef., 2006).

La sobreexpresión/amplificación de HER2 también se correlaciona con el tipo histológico. Así, los carcinomas tubulares y mucinosos suelen ser HER2 negativos (Bilous y cols., 2003a). En los carcinomas lobulillares la sobreexpresión de HER2 varía según los diferentes estudios consultados. Se ha descrito sobreexpresión en aproximadamente un 13% de casos de carcinomas lobulillares (Ross y Fletcher,

1999), siendo más frecuente en los casos de carcinoma lobulillar pleomórfico (Middleton y cols., 2000; Li-Ning y cols., 2005; Bassarova y cols., 2005; Reis-Filho y cols., 2005b), describiéndose en algunos trabajos una positividad de hasta un 53% (Frolik y cols., 2001), aunque también hay otros estudios donde no han encontrado ningún caso con amplificación del gen (Gancberg y cols., 2000).

El epitelio mamario normal no tiene amplificación ni sobreexpresión de HER2 y por esto no debe de teñirse, o teñirse solo ligeramente (Palacios y cols., 2009). Se ha propuesto sustraer al nivel de tinción del carcinoma el nivel de tinción del epitelio normal para evitar falsos negativos (método de normalización o sustracción) (Gown y cols., 2008). De todas formas, si la tinción de la membrana celular en epitelio mamario normal es intensa y extensa el resultado de la técnica queda invalidado (Ross y cols., 2007; Sauter y cols., 2009; Palacios y cols., 2009). Diferentes trabajos trataron de correlacionar la tinción por inmunohistoquímica en el epitelio mamario normal o en lesiones benignas con el riesgo de desarrollo posterior de carcinoma, pero todavía no hay estudios concluyentes (Ross y Fletcher, 1998). Hay trabajos donde no se demuestra amplificación de *HER2* en enfermedad proliferativa benigna o hiperplasia ductal atípica (Lakhani, 2001).

En la actualidad hay estudios de evaluación de HER2 en biopsias por aguja con buena correlación con los resultados obtenidos en la pieza quirúrgica (Mueller-Holzner y cols., 2001; Taucher y cols., 2004), pero los resultados en casos 3+ heterogéneos pueden variar en la biopsia escisional (Usami y cols., 2007) En algunos estudios se recomendó realizar la determinación de HER2 en biopsia escisional (Shousha y cols., 2009), pero en la guía de HER2 recientemente publicada se recomienda la determinación en la biopsia de aguja, sin necesidad de repetir la determinación siempre que el resultado sea claramente positivo o negativo y no haya discordancia histopatológica (Wolff y cols., 2013). Se consideran discordantes los casos positivos que sean ductal o lobulillar infiltrante grado 1 con receptores hormonales positivos, tubulares, mucinosos, cribiformes o adenoide quísticos y los casos negativos que sean grado 3 (Wolff y cols., 2013). En citología, tanto en punción aspiración como en improntas citológicas, existe una buena correlación con los resultados de la histología de los tumores (McManus y cols.,

1999; Sartelet y cols., 2005; Sumiyoshi y cols., 2006; Vocaturo y cols., 2006; Shin y cols., 2007), aunque por el momento la determinación no está validada para citología (Palacios y cols., 2009).

Se ha comprobado que el estado de HER2 puede variar a lo largo de la progresión del cáncer, por esto la guía de 2013 aconseja la repetición de la determinación en casos de metástasis siempre que se disponga de material (Wolff y cols., 2013). Se han publicado diversos trabajos sobre la determinación de los niveles de HER2 en suero (Volas y cols., 1996; Souder y cols., 2006). Unos niveles elevados de HER2 en suero, pueden indicar el desarrollo de positividad de HER2 en células tumorales metastásicas, incluso en pacientes con tumores primarios negativos (Fehm y cols., 2007; Colomer y cols., 2007).

I.7.2. HER2 Y RECEPTORES HORMONALES

En relación con los receptores hormonales, se ha demostrado que los tumores HER2 positivos son con frecuencia resistentes al tratamiento hormonal. Existe en general una relación inversa entre sobreexpresión/amplificación de HER2 y expresión de receptores de estrógenos y progesterona; pacientes con niveles altos de sobreexpresión o amplificación de HER2 tienen estadísticamente niveles más bajos de receptores hormonales que las pacientes con niveles bajos de sobreexpresión o amplificación de HER2 (Andrulis y cols., 1998; Ross y cols., 2003; Ariga y cols., 2005; García-Caballero y cols., 2006). Como la respuesta al tratamiento hormonal está directamente relacionada con los niveles de receptores hormonales, los bajos niveles de estos receptores pueden ser la explicación de la relativa resistencia de los tumores HER2 positivos al tratamiento hormonal en estas pacientes (Konecny y cols., 2003).

Aunque en los tumores HER2 positivos predominan los carcinomas ductales infiltrantes con receptores negativos, hay que tener en cuenta que hasta un 40% de los casos expresan receptores hormonales en variable cuantía. Aunque estos tumores son, en principio, candidatos a ser tratados con tamoxifeno, distintos estudios han demostrado que los carcinomas ductales infiltrantes HER2+/RE+ son

con frecuencia resistentes al tratamiento hormonal (Konecny y cols., 2003). Otros trabajos, sin embargo, demuestran que el tratamiento hormonal es beneficioso para estas pacientes (Bast y cols., 2001; Martoni y cols., 2006), recomendándose tratamiento hormonal e inhibidores de la aromatasa (Lacroix-Triki y cols., 2006).

Probablemente uno de los factores que influyen en la respuesta al tamoxifeno es la expresión del gen *AIB1*. Este gen, que codifica una proteína que funciona como un coactivador del receptor de estrógenos, se encuentra amplificado en el 10% de los carcinomas ductales infiltrantes de mama. En tumores que sobreexpresan simultáneamente *HER2* y *AIB1*, el tamoxifeno recluta *AIB1* (coactivador) en lugar de correpresores y se comporta como un agonista en lugar de como un antagonista del estradiol. Por tanto en estos tumores el tamoxifeno favorecería el crecimiento tumoral y estaría contraindicado, debiendo emplearse en estos casos inhibidores de la aromatasa (Ellis y cols., 2001; Ropero y cols., 2004; Lahusen y cols., 2007).

No existe evidencia clínica suficiente para recomendar la determinación del estado de HER2 a fin de seleccionar pacientes candidatas a hormonoterapia. Dado el probable beneficio del tratamiento hormonal en estas pacientes, la selección debe hacerse solo por el estado de los receptores hormonales (Bast y cols., 2001; Hayes y Thor., 2002; Goldhirsch y cols., 2003).

I.7.3. HER2 COMO FACTOR PREDICTIVO

La importancia del HER2 se basa en que la tecnología genética desarrolló un anticuerpo dirigido contra el dominio extracelular del HER2, el anticuerpo monoclonal murino humanizado clase IgG1, trastuzumab (Herceptin®), desarrollado por Genetech (San Francisco, CA, USA) y comercializado en Europa por Roche (Basilea, Suiza), que ha supuesto el primer éxito en la historia terapéutica basada en el estudio de los oncogenes (Vogel y cols., 2002).

El trastuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante (rhuMAb), con gran afinidad por el dominio extracelular del receptor HER2. Está dirigido contra la proteína que se expresa en la membrana citoplasmática, interfiere

con la señal de transducción en cascada iniciada por la sobreexpresión de HER2 y posiblemente estimula una respuesta inmune a la sobreexpresión celular del receptor (Sauter y cols., 2009). Trastuzumab reduce la disponibilidad de los heterodímeros y la oncogenicidad e induce a la muerte celular (Rubin y Yarden, 2001). El que sea humanizado (95% humano, 5% murino) supone un menor potencial inmunogénico y mayor capacidad inmunorreguladora. Además, algunas sustancias citotóxicas interaccionan de una manera sinérgica con el trastuzumab.

La prueba imprescindible para el tratamiento con trastuzumab es la determinación de HER2 (Pauletti y cols., 2000), ya que está ampliamente demostrado que el tratamiento es efectivo en los casos HER2 positivos (Cobleigh y cols., 1999; Vogel y cols., 2002; Piccart-Gebhart y cols., 2005). Diferentes estudios sugieren que hasta el 66% de las pacientes susceptibles de tratamiento con trastuzumab no tienen documentada la realización del test de HER2 y lo mismo ocurre en un 20% de las pacientes seleccionadas para dicho tratamiento (Phillips y cols., 2009), aunque esto no ocurre en nuestro país. Se ha argumentado que las pruebas actuales para determinar la expresión o amplificación no reflejan necesariamente la actividad funcional del receptor. De hecho el receptor debe estar activado/fosforilado para poder realizar sus funciones.

Debido a la importancia de la determinación del estado del gen *HER2,* sobreexpresión/amplificación, ésta debe realizarse siempre bajo rigurosas condiciones de seguridad diagnóstica debido a su importancia en las decisiones terapéuticas y el consiguiente impacto sanitario (Phillips y cols., 2009). Los peores escenarios serían tratar con trastuzumab un falso positivo u omitir el tratamiento en un caso falso negativo (Piccart-Gebhart, 2005).

El trastuzumab combinado con la quimioterapia ha demostrado un aumento en la supervivencia de las pacientes, independientemente del estado de afectación ganglionar. Inicialmente se administró a pacientes con cáncer de mama en estadío avanzado, cuyos tumores sobreexpresaban HER2, con respuestas clínicas significativas (Vogel y cols., 2002; Cobleigh y cols., 1999; Slamon y cols., 2001). El trastuzumab fue aprobado por la FDA en 1998 y por la agencia europea del medicamento (EMEA) en 2000 para el uso en casos de carcinoma metastásico.

Actualmente, después del 2006 (aprobación EMEA) también se administra a pacientes con tumores en estadíos precoces en monoterapia, a pacientes en que fracasa la quimioterapia y como primera línea asociado con quimioterapia. Todos los estudios clínicos con trastuzumab en monoterapia o combinado con quimioterapia, demuestran que el estado de HER2 es un predictor de respuesta al tratamiento (Hofmann y cols., 2008a). Por tanto, siguiendo las recomendaciones actuales, debe valorarse el estado de HER2 en todos los nuevos casos diagnosticados de carcinoma de mama invasivo (Zarbo y Hammond, 2003; Phillips y cols., 2009; Wolff y cols., 2013). Hay algunos ensayos clínicos (NSABP B31 y NCCTG N9831) que sugieren que algunas pacientes pueden beneficiarse del tratamiento con trastuzumab aunque tengan tumores HER2 negativos, postulándose que estas pacientes pueden tener células tumorales circulantes HER2 positivas (Allison, 2010).

La respuesta al trastuzumab va a depender de la sobreexpresión del receptor, y en último término de la amplificación del gen *HER2.* Por tanto, la valoración adecuada del estado de HER2, es crucial para la selección de las pacientes con carcinoma infiltrante de mama que sean susceptibles de tratamiento con trastuzumab. La sobreexpresión de HER2 también puede predecir una probable resistencia a tratamientos de quimioterapia convencionales (Andrulis y cols., 1998) y una mayor sensibilidad a tratamiento con antraciclinas (doxorrubicina) o taxanos (paclitaxel o docetaxel) (Burstein y cols., 2003).

Las antraciclinas son inhibidores de topoisomerasa 2 alfa (TOP2A). Algunos casos HER2 positivos muestran coamplificación de *TOP2A*, con una incidencia que varía según los trabajos consultados entre un 33 y un 60% (Hicks y cols., 2005; Press y cols., 2011). Aunque la amplificación de *HER2* se consideró predictiva de respuesta a las antraciclinas, el tamaño de la amplificación es variable y contiene otros genes ocasionales (más de 30 genes pueden tener número de copias alterados) incluyendo la *TOP2A*, que es realmente el gen diana para las antraciclinas. Por tanto, es posible que este gen, y no el *HER2*, sea el enlace entre la respuesta a las antraciclinas en las pacientes HER2 positivas (véase más adelante).

Los taxanos inducen la apoptosis del tumor a través de la detención del ciclo celular en la fase G2/M, que es independiente de la función de p53. Con ello se

consigue una respuesta en el 30-40% de las pacientes. Esto ha propiciado nuevos estudios. Por ejemplo, en casos resistentes al paclitaxel, el empleo de nanopartículas de paclitaxel en una cápsula de polímeros induce la detención del ciclo celular en la fase G2/M, después de 24 a 48 horas de incubación en líneas celulares de cáncer de mama (Zahr y Pishko, 2007). Hay también publicaciones señalando que algunas plantas como la *Physalis angulata* (empleada en herboristerías para tratar la diabetes, hepatitis, asma y malaria en Taiwán) inhiben la proliferación celular y produce apoptosis por detención del ciclo celular en la fase G2/M en líneas celulares de cáncer de mama (Hsieh y cols., 2006).

Diversos estudios demostraron que cuando el trastuzumab se asocia a quimioterapia, doxorrubicina y ciclofosfamida (AC) o paclitaxel se consigue una mayor tasa de respuesta, más tiempo sin recidivas y una mayor supervivencia (Burstein y cols., 2003). También hay trabajos de tratamiento en enfermedad metastásica durante el embarazo con resolución casi completa de la enfermedad y parto de niño sano (Fanale y cols., 2005).

Los efectos tóxicos relacionados con el trastuzumab son reacciones leves-moderadas (escalofríos, astenia, fiebre, dolor y náuseas) durante las primeras infusiones, pero el efecto adverso más importante es la disfunción cardíaca cuando se asocia a antraciclinas, que es reversible con el cese del tratamiento (Cobleigh y cols., 1999; Hayes y Thor., 2002). Aproximadamente el 5-15% de las pacientes desarrollan disfunción cardíaca, y entre el 1-4% incluso síntomas de fallo congestivo cardíaco (Wolff y cols., 2007). Esta elevada toxicidad se debe a que el HER2 se manifiesta en el tejido cardíaco y la doxorrubicina es conocida como agente cardiotóxico, por ello se recomiendan seguimientos a largo plazo de la función cardíaca en supervivientes de cáncer de mama, particularmente las que hayan sido tratadas con radioterapia y antraciclinas (Bird y Swain, 2008).

I.7.4. HER2 Y NUEVOS FÁRMACOS

El Lapatinib (Tykerb®) (GlaxoSmithKline, London, United Kingdom) es una pequeña molécula inhibidora de la actividad tirosina-quinasa de HER1 (EGFR) y HER2 (Xia y cols., 2002; Sauter y cols., 2009). Su uso fue aprobado por la FDA en 2007. Al

contrario que el trastuzumab, el pequeño tamaño de esta molécula permite que atraviese la barrera hematoencefálica, siendo por tanto efectiva en el tratamiento de metástasis cerebrales. Otra ventaja importante es que el Lapatinib se administra por vía oral (aunque actualmente el trastuzumab puede administrarse también por vía subcutánea).

Pertuzumab (2C4, Omnitarg) es un inhibidor de la dimerización de *HER2* con otros miembros de la familia, tales como *HER1* o *HER3* (Adams y cols., 2006). Se ha ensayado la combinación de trastuzumab con pertuzumab en pacientes que habían progresado tras tratamiento con el primero, observándose una reducción de más del 50% de la masa tumoral (Allison, 2010).

También se está ensayando una droga que conjuga trastuzumab con el antimitótico DM1 (agente despolimerizante de microtúbulos) que deriva de *maytansine,* daunorrubicina (Phillips y cols., 2008). Se ha obtenido una disminución del tamaño tumoral incluso en pacientes con cáncer avanzado que ya habían sido tratadas con una media de siete drogas diferentes (Allison, 2010).

I.7.5. HER2 Y OTROS TUMORES

Se ha detectado sobreexpresión/amplificación de HER2 en tumores de otros órganos:

- Carcinomas gástricos, fundamentalmente los de tipo intestinal (Park y cols., 2006; Inui y cols., 2006; Hofmann y cols., 2008b)
- Colon (Bast y cols., 2001)
- Ovario (Serrano-Olvera y cols., 2006; Slamon y cols., 1989)
- Páncreas (Tsiambas y cols., 2006)
- Vejiga urinaria, que comparado con el cáncer de mama, presenta una mayor incidencia de aneusomía, por lo que es muy importante la determinación del cromosoma 17 (Hauser-Kronberger y cols., 2006)
- Endometrio (Peiró y cols., 2004)
- Pulmón: carcinoma de tipo no microcítico (Heinmöller y cols., 2003)

I.7.6. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE HER2

Se ha discutido mucho en la bibliografía respecto al método más apropiado para la detección del HER2 (Lacroix-Triki y cols., 2006; Dietel y cols., 2007; Wolff y cols., 2007). La FDA ha aprobado tres tipos de técnicas para determinar el estado del HER2: inmunohistoquímica, hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y más recientemente la hibridación *in situ* cromogénica (CISH) (Phillips y cols., 2009).

En informes de consenso y guías se concluye que cualquier método para la valoración de HER2 es válido, siempre que la tecnología esté completamente estandarizada, validada y apoyada por un programa de control de calidad externo (Palacios y cols., 2009).

I.7.6.a. Inmunohistoquímica

Entre los métodos para la valoración del HER2, la inmunohistoquímica (IHQ) constituye la técnica más empleada, determinando la sobreexpresión de la proteína receptora en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina. Para ello se han empleado:

- Distintos anticuerpos monoclonales o policlonales, a diluciones optimizadas por cada laboratorio.
- Diferentes métodos de recuperación antigénica (microondas, olla a presión, baño termostático, PT-Link, etc.), con distintos tiempos y temperaturas.
- Diversos sistemas de detección (ABC, LSAB, polímeros de dextrano, etc.).

Todas estas variables hacen difícil que los resultados de los laboratorios sean equiparables, y esto suele ser una fuente potencial de confusión entre los clínicos. Para evitar el problema de las variables mencionadas, se ha estandarizado la técnica de inmunohistoquímica mediante la introducción de los kits: HercepTest (Dako-Agilent, Glostrup, Dinamarca), Pathway anti-HER2/neu (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona), In Site HER-2/neu (Biogenex, San Ramon, California) y Bond Oracle (Leica Biosystems, Wetzbr, Alemania), sistemas aprobados por la FDA para la selección de pacientes para tratamiento con trastuzumab. La concordancia entre estos métodos y el empleo de otros anticuerpos comercializados es aceptable, pero se recomienda encarecidamente el uso de sistemas aprobados por la FDA sin

modificación alguna del protocolo aprobado por el laboratorio fabricante (Wolff y cols., 2007, 2013).

En la Guía de Recomendaciones del Colegio Americano de Patólogos y la Sociedad de Oncología Clínica (Wolf y cols., 2007) la sobreexpresión proteica del HER2 se definía como:

- 3+ (POSITIVO), cuando se tiñe de manera intensa la totalidad de la membrana celular en más del 30% de las células neoplásicas.
- 2+ (*BORDERLINE, EQUÍVOCO O INDETERMINADO)* con tinción de toda la membrana celular de forma débil o moderada en más del 10% de las células.
- 1+ (NEGATIVO) se tiñe de forma débil e incompleta la membrana, en más del 10%, de las células neoplásicas.
- 0 (NEGATIVO) es cuando no se observa tinción de membrana o se tiñen menos del 10% de las células neoplásicas.

En la nueva Guía de HER2 recientemente publicada (Wolff y cols., 2013) la puntuación queda como sigue:

- 3+ (POSITIVO): Se tiñe de manera intensa la totalidad de la membrana celular en >10% de las células neoplásicas.
- 2+ (EQUÍVOCO): Tinción de membrana completa o incompleta y de intensidad débil o moderada en >10% de las células. También se clasifican como 2+ aquellos casos en que se observa positividad intensa y completa en ≤10% de las células. En estos casos se recomienda realización de técnicas de hibridación *in situ* (HIS) en la misma muestra o determinación mediante IHQ o HIS en una nueva muestra si se dispone de la misma.
- 1+ (NEGATIVO): Se tiñen las membranas de forma incompleta y apenas perceptible en >10% de las células neoplásicas.
- 0 (NEGATIVO): Cuando no se observa tinción de membrana o se tiñen las membranas de forma incompleta y apenas perceptible en ≤10% de las células neoplásicas.
- INDETERMINADO: Aquel caso que por razones técnicas no puede ser diagnosticado como positivo, negativo o equívoco.

Como ya dijimos, se ha afirmado que aproximadamente el 20% de las pruebas realizadas en los laboratorios tienen resultados incorrectos cuando son repetidas en el laboratorio central de referencia (Phillips y cols., 2009). Para una correcta evaluación de la IHQ, es muy importante valorar los controles celulares externos (positivos y negativo) incluidos en los kits estandarizados, así como buscar controles en la propia preparación. Técnicas IHQ o diluciones del anticuerpo inadecuadas, pueden inducir tinción de membrana en epitelio normal, lo que conlleva a clasificar un tumor de positivo cuando no tiene sobreexpresión ni amplificación (Ross y cols., 2007). También resultados inesperados para determinados tipos de tumor (p.ej., ductal de grado 1, tubular o lobulillar clásico, que normalmente son negativos) pueden alertar sobre la fiabilidad de la determinación.

Empleando técnicas de inmunohistoquímica estandarizadas, la reproducibilidad interobservadores es muy buena en los casos 0 y 3+, pero no en los casos 1+ y 2+, siendo la clase 1+ la menos reproducible (Italian Network for Quality Assurance of Tumor Biomarkers -INQAT Group, 2005), con discordancias notables también en la clase 2+. Por ello, aparte de la realización de HIS en todos los casos 2+, se aconseja también dicha realización ante cualquier duda diagnóstica entre 1+ y 2+ o entre 2+ y 3+ (Palacios y cols., 2009).

Ventajas de la IHQ

1. Técnica universal disponible en todos los laboratorios de anatomía patológica.
2. Sencilla y rápida.
3. Bajo coste.
4. Posibilidad de estandarización mediante el empleo de kits.
5. No necesita instrumental especial, ya que se emplea un microscopio convencional.
6. La observación en microscopio de campo claro permite distinguir bien el componente infiltrante del componente *in situ* del tumor, e identificar áreas locales de sobreexpresión (heterogeneidad).
7. Test permanente que permite su archivo.
8. Requiere poco tejido tumoral.

Inconvenientes de la IHQ

1. Potencialmente afectada por la fijación de la muestra. Se ha propuesto que el tiempo de fijación óptimo para la determinación IHQ de HER2, está comprendido entre 6 y 12 horas (Zarbo y Hammond, 2003) y no más de 48 horas. El tiempo de fijación altera la expresión de la proteína antigénica; en la guía de 2007 se decía que una fijación prolongada de más de 48 horas podría producir falsos negativos (Wolff y cols., 2007), pero en la guía actual se admite una fijación comprendida entre 6 y 72 horas (Wolff y cols., 2013).
2. Susceptible de múltiples variantes metodológicas. Hay muchos trabajos comparando la eficacia de diferentes anticuerpos monoclonales o policlonales (Arnould y cols., 2003; Sapino y cols., 2003; Artufel y cols., 2005).
3. La estandarización mediante kits aprobados incrementa el coste, aunque aun así sigue siendo menor que el de la hibridación *in situ*.
4. Interpretación subjetiva, aun a pesar del empleo de criterios de evaluación consensuados. El análisis de imagen evita este problema y en la guía actual se recomienda su empleo para mejorar la correlación entre patólogos.
5. Carencia de control interno positivo: posibilidad de falsos negativos. Hasta el 6% de casos negativos, 0 o 1+, amplifican con FISH (Ellis y cols., 2005).
6. Puede aparecer inmunorreactividad inespecífica: posibilidad de falsos positivos. Hasta el 10% de casos 3+ no muestran amplificación por FISH (Ellis y cols., 2005).

I.7.6.b. Hibridación *in situ* de fluorescencia

El método de hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) trata de determinar la amplificación del gen *HER2* mediante el empleo de sondas marcadas con fluorocromos. Se considera el mejor método para determinar la amplificación del gen (Gupta y cols., 2003). Puede emplearse una única sonda que marca el gen *HER2*, como en el caso INFORM HER2 Gene Detection System (Ventana Medical Systems) (aprobado por la FDA, pero solo para uso como factor pronóstico), o bien dos sondas, como en el caso de PathVysionHER2 DNA Probe kit (Vysis, Downers Grove, Illinois) o HER2 FISH pharmDx kit (Dako-Agilent) (ambos aprobados por la FDA para la selección de pacientes para tratamiento con trastuzumab).

Una sonda localiza el gen *HER2*, marcada en naranja (Vysis) o rojo (Dako-Agilent) mediante SpectrumOrange o Texas red, y la otra el centrómero 17, marcado en verde mediante SpectrumGreen (Vysis) o fluoresceína (Dako-Agilent). El empleo de dos sondas simultáneamente permite analizar la relación entre el *HER2* y el centrómero 17 y, por tanto, detectar tanto la amplificación del gen *HER2* como las aneusomías del cromosoma 17. Para marcar los núcleos se emplea DAPI (4'6-diamidina-2-fenilindol) que proporciona una fluorescencia azul.

Se recomienda examinar entre 20 y 60 células, a ser posible, en dos campos tumorales distintos. En la mayoría de los casos cuando hay amplificación clara basta con estudiar 20 células. Según la aprobación de la FDA se considera genotipo amplificado cuando la relación HER2/centrómero del cromosoma 17 es >2 (Pauletti y cols., 2000).

En las guías ASCO/CAP y de la SEAP (Wolff y cols., 2007; Palacios y cols., 2009) se establecen tres categorías:

1. NO AMPLIFICADO: Relación HER2/CEN17: <1,8
2. AMPLIFICADO: Relación HER2/CEN17: >2,2
3. EQUÍVOCO o BORDERLINE: Relación HER2/CEN17: 1,8-2,2. En este caso se cuantificarán 20-60 núcleos más. Si la relación resultante es <1,8 se informará como: No amplificado; si es 1,8 o 1,9: Borderline no amplificado; si está comprendida entre 2 y 2,2: Borderline amplificado (Palacios y cols., 2009).

En la guía de HER2 recientemente publicada (Wolff y cols., 2013) se simplifica el umbral de la ratio *HER2*/CEN17 fijándolo en 2,0, pero se tiene en cuenta además el número de señales de *HER2*/célula. La clasificación queda como sigue:

1. NEGATIVO: Ratio <2 y *HER2*/célula <4,0
2. EQUÍVOCO: Ratio <2 y *HER2*/célula ≥4,0 y <6. En este caso es necesario repetir la determinación en la misma muestra, bien sea por IHQ (si se hizo FISH de entrada) o empleando una sonda alternativa para cromosoma 17, o bien empleando una nueva muestra si se dispone de la misma (p.ej., pieza

quirúrgica). Si tras estas repeticiones el resultado siguiese siendo equívoco, el oncólogo/a podría considerar la prescripción de tratamiento anti-HER2.

3. POSITIVO:
    a) Ratio <2 y *HER2*/célula ≥6
    b) Ratio ≥2 y *HER2*/célula ≥4 (en casos excepcionales: ratio ≥2 y *HER2*/célula <4 siempre que CEN17/célula <2).

Excepcionalmente se publicaron casos (1-2%) que mostraron amplificación génica en ausencia de sobreexpresión proteica (Jacobs y cols., 1999; Hoang y cols., 2000). En estos casos, los distintos efectos de fijación sobre las técnicas de IHQ y FISH podrían explicar las discrepancias. Por otra parte, aunque se ha obtenido un 100% de amplificación por FISH en los casos 3+ (Lebeau y cols., 2001), también se han publicado casos 3+ (2,7%-10%) que no muestran amplificación (Ellis y cols., 2005; Lal y cols., 2004; Tubbs y cols., 2001; Varshney y cols., 2004), siendo frecuente en los mismos la polisomía 17, que podría explicar la sobreexpresión (Lal y cols., 2003; Varshney y cols., 2004; Yaziji y Gown, 2004; Ma y cols., 2005, Gong y cols., 2009b). Ante estas discrepancias, en los centros en que se utilicen técnicas de hibridación solo para gen *HER2*, y en los casos con 2-7 copias del gen, se recomienda realizar también prueba para cromosoma 17 (Bartlett y cols., 2008a).

Algunos autores recomiendan considerar el empleo sistemático de FISH en todos los casos con sobreexpresión proteica, antes de empezar el tratamiento con trastuzumab, ya que el coste adicional de hacer el FISH es muy inferior al coste de un solo tratamiento innecesario (Artufel y cols., 2005). Por otra parte, otros autores consideran que no está justificado efectuar FISH en todos los casos, solo en los indeterminados, ya que únicamente raros casos (1-2%) sin sobreexpresión proteica muestran amplificación del gen (Hoang y cols., 2000).

Existen estudios que utilizan de manera simultánea la inmunofluorescencia y la hibridación *in situ* fluorescente. Con este método se puede valorar la amplificación génica, polisomía, aneuploidia y la proteína en la misma célula (Lottner y cols., 2005).

En algunos casos hay heterogeneidad en la amplificación de *HER2* por diversidad subclonal dentro del tumor. La incidencia en la literatura varía entre el 5 y el 30%. Existe heterogeneidad cuando más del 5% pero menos del 50% de las células infiltrantes muestran >6 señales de *HER2* o una relación *HER2*/CEN17 >2,0. La existencia de heterogeneidad debe consignarse en el informe haciendo mención del porcentaje de células que muestran amplificación y si esas células están aisladas o agrupadas (Vance y cols., 2009; Wolff y cols., 2013).

La técnica de FISH se considera actualmente el mejor método, el patrón de oro para la determinación del estado de *HER2,* pero esta técnica también tiene una zona gris, que está representada por los casos de baja amplificación, en los que se observa una variabilidad significativa de los resultados entre laboratorios (Persons y cols., 2006).

Ventajas del FISH

1. Técnica poco afectada por diferencias de fijación de las muestras, Se ha recomendado una fijación 4-12 horas (Hicks y Tubbs, 2005) o de 8-32 horas (Selvajaran y cols., 2002), aunque solo un periodo de fijación superior a una semana parece comprometer los resultados de FISH (Selvajaran y cols., 2002). Los requerimientos de la digestión enzimática se ven afectados por el tiempo de fijación (Wolf y cols., 2007) y por tanto han de ajustarse en caso de ausencia de señales (incrementar la digestión) o de degradación de los núcleos (disminuir la digestión).
2. Relativamente sencilla y de fácil estandarización.
3. Interpretación de los resultados objetiva (cuantificación de señales).
4. Control interno en las células normales y tumorales (evita la posibilidad de falsos negativos).

Inconvenientes del FISH

1. No se emplea como técnica de rutina en los laboratorios de anatomía patológica.
2. Hasta ahora era una técnica más larga que la inmunohistoquímica (necesidad de hibridación durante la noche), pero en la actualidad existe un método

(IQFISH) que permite realizar todo el proceso en 3 horas y media (Franchet y cols., 2014).

3. Coste más alto que la inmunohistoquímica.
4. Requiere instrumental especial: microscopio de fluorescencia con lámpara de mercurio de 100 W, filtro doble (para SpectrumOrange/SpectrumGreen o Texas red/fluoresceína) y filtro especial para DAPI.
5. Observación en campo oscuro, que puede dificultar la distinción entre el componente infiltrante y el componente *in situ* del tumor.
6. Requiere trabajar en cuarto oscuro y con aumento de inmersión de 100x, lo cual, unido a la necesidad de cuantificación, resulta fatigoso.
7. Las preparaciones no pueden archivarse por periodos largos, ya que la fluorescencia se pierde paulatinamente, aunque se mantiene durante varios años si se almacenan en congelador a -20ºC.
8. Posibles pequeñas diferencias interobservadores, que sin embargo pueden tener importancia en casos *bordeline,* recomendándose en estos casos la valoración por dos personas (Palacios y cols., 2009).

I.7.6.c. Hibridación *in situ* cromogénica (CISH)

La técnica de hibridación *in situ* cromogénica (CISH), es descrita por primera vez por Dhingra en 1992, aunque la mayoría de la bibliografía hace referencia a Tanner en el año 2000. En un principio se emplearon sondas marcadas con digoxigenina, que se detectaban mediante un anticuerpo monoclonal anti-digoxigenina, seguido por un anticuerpo anti-ratón marcado con peroxidasa y revelado con DAB (SPoT-Light HER2 CISH, Zymed, San Francisco, California). En el CISH se utilizaba una sonda única, que permite detectar el gen *HER2* en microscopio de campo claro. Para diferenciar baja amplificación de polisomía, se empleaba otra sonda para detectar el centrómero del cromosoma 17 en un corte seriado.

Las preparaciones se visualizan en un microscopio óptico a 40, 60 o 100 aumentos. Se valoran las señales nucleares en 20 núcleos individualizadas que se localizan en cada una de las copias del gen *HER2*, o los agregados de señales intranucleares. En casos *borderline* se contarán 20 núcleos más. Deben identificarse como mínimo 1 señal en las células tumorales y 1-2 señales en las células no

tumorales con una morfología celular preservada por la digestión adecuada con pepsina. Se valorará el número de señales por núcleo en las células de carcinoma invasivo, evitando valorar los núcleos superpuestos o fragmentados. La presencia de áreas heterogéneas en un tumor (diferente morfología y grado histológico) aconsejaría la determinación de amplificación génica en las diferentes áreas.

Los criterios de evaluación establecidos por Tanner y colaboradores (2000) son los siguientes:

1. NO AMPLIFICADO: 1-5 señales *HER2*/núcleo en 50% de las células tumorales.
2. BAJA AMPLIFICACION: 6-10 señales/núcleo o pequeños agregados de señales en 50% de células tumorales.
3. AMPLIFICADO: >10 señales/núcleo o agregados de señales en > 50% células tumorales.

Los criterios de evaluación establecidos por la SEAP (Palacios y cols., 2009) son los siguientes:

1. NO AMPLIFICADO: 1-5 señales/ núcleo.
2. BAJA AMPLIFICACION/POLISOMÍA: 6-10 señales *HER2*/núcleo, o agregados discretos de señales en >50% de las células tumorales. Se practicará determinación con sonda CEN17 y se considerará amplificado si el promedio de señales CEN17/núcleo es <3 (disomía) y no amplificado-polisomía si es ≥3.
3. AMPLIFICADO: >10 señales o agregados gruesos de señales > del 50% de las células tumorales.

La mayoría de los tumores pueden clasificarse como amplificados o no amplificados con una única prueba (CISH sonda *HER2*). Existe una pequeña proporción de tumores (aproximadamente 13% de casos clasificados 2+) que presentan entre 6-10 señales por núcleo. La aneuploidía del cromosoma 17 es frecuente en cáncer de mama, por lo que para considerar amplificación génica mediante CISH se ha establecido la cifra de más de 6 copias por célula, ya que la mayoría de casos con polisomía del cromosoma 17, presentan entre 3-5 señales por núcleo (Gupta y cols., 2003; Isola y cols., 2004). La aneusomía del cromosoma 17

no es un factor que condicione un incremento en la expresión del receptor de membrana (Wang y cols., 2002b) y tampoco se han observado diferencias en la supervivencia de pacientes con incrementos bajos de señales (3-5 señales/núcleo), y las que tienen un número normal de copias génicas por CISH.

Estas técnicas representan una alternativa al FISH práctica, efectiva y fiable (Wixom y cols., 2004; Ross y cols., 2007), que ha sido aprobada por la EMEA y la FDA (Phillips y cols., 2009). Los kits aprobados son: Spot-Light (Life Technologies, Carlsbad, CA), Inform HER2 dual ISH (Ventana Medical Systems) y HER2CISH pharmDx (Dako-Agilent). Los criterios de evaluación a seguir son los definidos por la guía ASCO/CAP para HIS (FISH e HIS cromogénica) (Wolff y cols., 2013).

La concordancia entre CISH e IHQ es muy buena (Madrid y Lo, 2004; Hauser-Kronberger y Dandachi, 2004; Kounelis y cols., 2005). Las pocas discrepancias se dieron en casos 1+ con baja amplificación (Wixom y cols., 2004).

Actualmente se suelen emplear técnicas duales que permiten detectar el gen y el centrómero en la misma preparación (Laasko y cols.,2006).

Ventajas del CISH

1. Empleo de microscopio convencional.
2. La mayoría de los patólogos están familiarizados con la tinción de inmunohistoquímica basada en peroxidasa (Park y cols., 2003a).
3. Observación rápida y cómoda al emplearse microscopio de campo claro, y objetivo de 40 aumentos (Zhao y cols., 2002)
4. La observación en campo claro permite la valoración simultánea de la morfología del tejido, de la misma forma que la inmunohistoquímica. Así, se puede diferenciar con facilidad el componente tumoral del no tumoral, y el componente *in situ* del invasivo, ya que en este último es donde debe ser valorada la alteración del gen *HER2* (Zhao y cols., 2002; Pedersen y cols., 2009).
5. Valoración sencilla de la posible heterogeneidad en la amplificación (Dhingra y cols., 1992).

6. Cuantificación simple y más rápida que el FISH con una reducción de hasta el 28% del tiempo comparando con el protocolo de FISH (García-Caballero y cols., 2010).
7. En la técnica de doble color, visualizar el gen *HER2* y el cromosoma 17 en el núcleo de la misma célula como en el FISH, de particular importancia en casos de polisomía del cromosoma 17 (Pedersen y cols., 2009; García-Caballero y cols., 2010; Bai y cols., 2010).
8. Utilizar como control interno linfocitos y fibroblastos (Nitta y cols., 2008).
9. Test permanente que permite su archivo y reevaluación posterior (Pedersen y cols., 2009; García-Caballero y cols., 2010).
10. La técnica de CISH es más económica que la de FISH, siendo el coste en tiempo de personal técnico solo ligeramente superior en el CISH (Sáez y cols., 2006), pues la segunda parte de la técnica está automatizada.
11. Concordancia con el FISH entre el 98.6% y el 100% (Pedersen y cols., 2009; García-Caballero y cols., 2010; Kato y cols., 2010) Se requiere una concordancia entre las dos técnicas de al menos 95% (Palacios y cols., 2009; Penault- Llorca y cols., 2009; Kato y cols., 2010).
12. Alta concordancia interobservadores (Gong y cols., 2005).
13. Método aprobado por la FDA (Phillips y cols., 2009).

Inconvenientes del CISH

1. Las diferencias de fijación de las muestras pueden originar sobredigestión, con núcleos “fantasma” y ausencia de señales; en este caso debe reducirse el tiempo de digestión enzimática. Es menos frecuente que los núcleos se contratiñan intensamente, no llegando a observarse las señales; en este caso debe incrementarse el tiempo de digestión.
2. En casos de alta amplificación de *HER2* la superposición de las señales en el núcleo puede infravalorar el número de señales comparando con el FISH, pero aunque esta diferencia es estadísticamente relevante no se altera la relación *HER2*/CEN17 (García-Caballero y cols., 2010). En casos amplificados las copias del gen *HER2* forman unos grupos de formas irregulares, que son fácilmente distinguibles como amplificados (Kato y cols., 2010).

3. Empleo de sondas FISH en vez de sondas específicas para CISH, lo que alarga y encarece la técnica al precisar el empleo de dos kits diferentes.
4. La falta de automatización completa del proceso.
5. Casos de discordancia CISH/FISH en casos de baja amplificación génica (van de Vijver y cols., 2007), en casos de deleción génica (Lambros y cols., 2007), o por polisomía o heterogeneidad tumoral (Mayr y cols., 2009).

I.7.6.d. Hibridación *in situ* con amplificación argéntica

Técnica de hibridación *in situ* de metalografía enzimática con amplificación argéntica *(Silver In Situ Hybridization* o SISH), que se puede combinar con inmunohistoquímica para la observación simultánea de la expresión proteica del receptor del estado del gen (Downs-Kelly y cols., 2005; Dietel y cols., 2007). La técnica está automatizada y cumple los criterios de concordancia con el FISH, requeridos por la UK y ASCO/CAP (Papouchado y cols., 2010, Bartlett y cols., 2009). El criterio de amplificación se definió como 6 o más señales o grupos grandes de señales en al menos el 30% de las células tumorales (Downs-Kelly y cols., 2005). En la actualidad se suele emplear doble sonda y por tanto los criterios de evaluación a seguir son los ya definidos en CISH siguiendo la guía ASCO/CAP (Wolff y cols., 2013).

I.7.6.e. Otros métodos

Se han empleado también otras técnicas para el estudio de HER2 como Southern o Spot blot, Northern blot, Western blot o ELISA (Inmunoensayo ligado a enzimas). En este último método se determina oncoproteína HER2 en sangre de pacientes con cáncer de mama, en aspirados de médula ósea, secreción de pezón u otros fluidos corporales y es la técnica que se utiliza para la detección precoz de células aisladas circulantes (detección precoz de micro metástasis). La técnica de ELISA se utiliza para medir la proteína HER2 en plasma/suero, aspirados de médula ósea para asegurar la progresión de la enfermedad y predecir respuesta a la quimioterapia. En la actualidad hay varios kits de ELISA para determinar HER2 en suero o plasma. Los diferentes kits de ELISA proporcionan varios rangos de niveles de HER2; también pueden usarse los kits en citosoles tisulares de tejidos frescos. Es un método fácil y permite la reevaluación del estado del HER2 en diferentes estadíos de progresión de

la enfermedad o también para valorar la eficacia del tratamiento (Lipton y cols., 2005; Quaranta y cols., 2006; Vadgama y cols., 2006; Colomer y cols., 2007).

El estado del gen *HER2* puede evaluarse también mediante:

a) *GOLDFISH:* Técnica de hibridación *in situ* autometalográfica, con amplificación mediante oro (Tubbs y cols., 2002;). Otros métodos metalográficos visualizan la amplificación del gen y la expresión proteica al mismo tiempo (Downs-Kelly y cols., 2005; Powell y cols., 2007).
b) *PCR a tiempo real*: Emplea la tecnología *LightCycler* y permite una precisa cuantificación de la amplificación génica con un pequeño volumen de ADN (Königshoff y cols., 2003), pero requiere microdisección con láser para una mayor exactitud (Merkelbach-Bruse y cols., 2003). Se considera una alternativa al FISH, ya que hay una gran concordancia con otros métodos: 91% con IHQ y 92% con FISH. Puede utilizarse en biopsias por aguja, aspirados de médula ósea, sangre periférica o incluso secreción por pezón. La ventaja de este método es que se necesitan pocas células neoplásicas para la detección de *HER2*, permitiendo precisar la cuantificación del número de copias génicas en lesiones de pequeño tamaño y lesiones premalignas (Vadgama y cols., 2006).

Las nuevas técnicas cromogénicas se han comparado también con el FISH, obteniéndose una buena correlación tanto con GOLDFISH (Tubbs y cols., 2002) como con SISH (Downs-Kelly y cols., 2005). Por último, se ha publicado también una buena concordancia entre PCR e IHQ (Erdogan y cols., 2003; Schlemmer y cols., 2004) o PCR y FISH (Schlemmer y cols., 2004; Benöhr y cols., 2005), llegándose en algunos trabajos a cifras de correlación del 100% (Erdogan y cols., 2003)

Respecto a los métodos de estudio de ARNm (p. ej., empleando rtPCR) la guía ASCO/CAP de 2013 concluye que no hay suficiente evidencia para su empleo en la determinación del estado de HER2 (Wolff y cols., 2013). En este sentido, el empleo de sondas dirigidas contra el ARNm del *HER2* mediante la técnica de hibridación *in situ* (HistoSonda) es una metodología que, aunque informativa, estandarizable y reproducible, necesita de ensayos clínicos prospectivos para su validación clínica en la determinación del estado de HER2 (Bernet y cols., 2012).

I.8. TOPOISOMERASA 2 ALFA

La topoisomerasa 2 (TOP2) es una enzima nuclear, dependiente de ATP, que controla y altera la topología del ADN y es esencial para la viabilidad de todos los organismos celulares desde las bacterias unicelulares a la especie humana. Su función es controlar el grado de superenrollamientos del ADN modificando los estados topológicos de las cadenas de ADN durante la transcripción genética, replicación, recombinación y mitosis, combinando actividades nucleasa, helicasa y ligasa (Watt y Hickson, 1994; Wang, 2002a).

Hay dos isoformas de TOP2 en las células de los mamíferos: TOP2alfa (TOP2A) de 170 kDa y TOP2beta (TOP2B) de 180 kDa, cuyos genes están localizados en 17q21-22 y 3p24, respectivamente. Aunque ambas enzimas muestran estructura similar, difieren en sus propiedades biológicas y farmacológicas, estabilidad térmica, localización celular, regulación del ciclo celular, y transformación oncogénica de las células (Watt y Hickson, 1994; Wang y cols., 1997).

La expresión de TOP2A es baja en G1, se incrementa en fase S y es máxima en fase G2/M, por ello la asociación de esta isoforma con la replicación de ADN, mitosis y proliferación celular (Wang y cols., 1997). TOP2A cataliza la rotura transitoria de las dos hebras del ADN girándolas y sellándolas después, lo que permite que las hebras pasen una a través de la otra, alterando así la topología del ADN. La enzima está implicada en procesos celulares como la segregación y condensación de los nuevos pares de cromosomas en las células en división, y la liberación de tensión de la torsión durante la transcripción y replicación de ADN.

Los niveles de la TOP2B son relativamente constantes a través del ciclo celular y su función es menos conocida. Se sabe que la deleción del gen TOP2B en ratones produce defectos en la formación de uniones neuromusculares, pero el mecanismo exacto de cómo afecta esta enzima a las uniones neuromusculares es aún objeto de estudio (Wang, 2002a).

El conocimiento de la función de TOP2A en la oncogénesis, así como su implicación en la respuesta al tratamiento con antraciclinas, después de muchos

años de estudio, es aún controvertido. Las antraciclinas se encuentran entre las drogas antineoplásicas más potentes para el tratamiento del cáncer de mama. En un reciente metaanálisis del grupo colaborador de ensayos clínicos de carcinoma de mama precoz (EBCTCG) sobre tratamiento adyuvante basado en antraciclinas, se observa una reducción de la muerte anual por cáncer de mama en 12% en mujeres <45 años, 9% en mujeres de 45-54 años y 11% en mujeres de 55-69 años (Peto y cols., 2012). En el año 2011 el consenso de St. Gallen recomienda el uso de quimioterapia basada en antraciclinas en pacientes con carcinomas luminales B o triple negativos (Goldhirsch y cols., 2011). Sin embargo, el tratamiento con antraciclinas presenta una serie de efectos tóxicos, especialmente cardiotoxicidad (que puede llevar a insuficiencia cardíaca congestiva), pero también leucemia aguda y mielodisplasia. Para minimizar tales efectos es necesario identificar nuevas dianas terapéuticas que puedan ser usadas en tratamientos más personalizados (Glynn y cols., 2010; Press y cols., 2011) y limitar la administración de drogas con conocida toxicidad solo a las pacientes que se van a beneficiar más de las mismas.

TOP2A es la diana molecular de las antraciclinas, que al unirse a la misma estabiliza las roturas de la doble cadena del ADN, impidiendo la restauración del ADN e induciendo apoptosis (Knoop y cols., 2005). Como dijimos, el gen *TOP2A* se localiza en 17q21-22, próximo al gen *HER2*. Desde hace años el valor predictivo de la determinación de *TOP2A* o *HER2* en relación al tratamiento con antraciclinas del cáncer de mama es objeto de controversia (Pritchard y cols., 2008).

Se postuló que la amplificación de *TOP2A* podría deberse a una alteración genética compleja y secundaria a la amplificación del gen *HER2* (Coon y cols., 2002; Di Leo y cols., 2002; Bhargava y cols., 2005b; Lambros y cols., 2007; Press y cols., 2011). Ya trabajos previos habían demostrado que la amplificación del gen *HER2* es seguida por alteraciones genéticas complejas que pueden dar lugar a amplificación o deleción del gen *TOP2A* (Järvinen y cols., 1999).

Sin embargo, otros autores afirman que ambas amplificaciones son fenómenos independientes y que es la coamplificación de *HER2/TOP2A* el marcador predictivo de respuesta a antraciclinas (Coon y cols., 2002; Tanner y cols., 2006;

Arriola y cols., 2007; Desmedt y cols., 2011; Press y cols., 2011; Slamon y cols., 2011; Fountzilas y cols., 2012a, Wang y cols., 2012).

Aproximadamente un 35% de los cánceres de mama con *HER2* amplificado muestran coamplificación del gen *TOP2A* (Press y cols., 2011). El interés por el análisis del estado de *TOP2A* se incrementó recientemente tras la demostración de que la amplificación del gen *TOP2A* representa un factor pronóstico favorable en pacientes con cáncer de mama metastásico tratados con trastuzumab (Fountzilas y cols., 2012a), y que la coamplificación de *HER2* y *TOP2A* es un factor pronóstico favorable para el aumento de tiempo libre de enfermedad en relación a tratamientos con antraciclinas, pero esta hipótesis tiene que ser corroborada en estudios posteriores (Fountzilas y cols., 2012b).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

La medicina personalizada es definida por el *Nacional Cancer Institute* como la forma de medicina que usa información acerca de genes y proteínas para prevenir, diagnosticar y tratar enfermedades. Los biomarcadores son características evaluables de los tumores que sirven como indicadores de procesos patológicos y de repuesta al tratamiento. La integración de los biomarcadores en la medicina personalizada permite identificar pacientes que con mayor probabilidad obtendrán beneficio de un tratamiento específico y evitar tratamientos innecesarios en pacientes que no se beneficiarán.

El desarrollo de las terapias personalizadas dirigidas contra dianas específicas ha revolucionado el tratamiento oncológico en los últimos quince años. Las terapias antiHER2, que incluyen trastuzumab (vía parenteral y próximamente subcutánea), lapatinib y pertuzumab, modificaron sustancialmente el pronóstico de las pacientes con cáncer de mama de subtipo biológico HER2, de muy mal pronóstico con anterioridad al desarrollo de dichas terapias.

Para el tratamiento antiHER2 resulta imprescindible una determinación fiable del estado de HER2 mediante IHQ, que en caso de resultado *borderline* debe confirmarse mediante hibridación *in situ.* Clásicamente la hibridación *in situ* se realiza mediante la técnica FISH (hibridación *in situ* fluorescente), pero esta técnica tiene inconvenientes como la necesidad de un microscopio especial de fluorescencia con lámpara de 100W (con el coste que ello implica), el empleo del campo oscuro, que dificulta la interpretación morfológica (principalmente si existe mezcla de componente intraductal e infiltrante y en casos de microinvasión) y la valoración mediante el objetivo de inmersión (con la incomodidad consiguiente). La hibridación *in situ* cromogénica de doble color elimina estos problemas al evaluarse empleando un microscopio óptico convencional que permite por tanto una evaluación morfológica adecuada. El poder evaluar las muestras en campo claro y con objetivos en seco y poder archivarlas en el archivo general y revisarlas pasado el tiempo sin pérdida de la señal constituyen ventajas importantes de esta técnica. La implantación de nuevas técnicas requiere la realización de estudios de correlación con las técnicas previamente empleadas para asegurarnos de la fiabilidad de las mismas.

El 1er OBJETIVO planteado fue correlacionar los resultados de la determinación del estado del gen *HER2* mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) e hibridación *in situ* cromogénica (DuoCISH).

Las antraciclinas son inhibidores de la topoisomerasa 2 alfa (TOP2A). Aunque la amplificación del gen *HER2* se consideró predictiva de respuesta a las antraciclinas, hoy sabemos que algunos casos *HER2* positivos muestran coamplificación de *TOP2A* (con incidencia muy variable según los trabajos consultados) y parece probable que sea el gen *TOP2A*, no el *HER2*, el marcador predictivo de respuesta a las antraciclinas. El interés por el estudio del gen *TOP2A* se ha incrementado recientemente tras demostrarse que su amplificación representa un factor de pronóstico favorable en pacientes con cáncer de mama metastásico HER2 positivo tratadas con trastuzumab.

El 2º OBJETIVO que nos propusimos, como continuación del primero, fue estudiar la concordancia entre el estado del gen *TOP2A* determinado mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) e hibridación *in situ* cromogénica (DuoCISH) y analizar la relación entre amplificación de *HER2* y de *TOP2A*.

Diversos autores consideran, sin embargo, que la proteína TOP2A (diana de las antraciclinas) es el factor predictivo principal de respuesta al tratamiento y que por tanto es necesario perfeccionar las herramientas de detección de dicha proteína. En base a esta idea, pusimos a punto la técnica IHQ para estudio de TOP2A. Pensamos que como factor relacionado con la proliferación celular podría haber una correlación entre los resultados obtenidos con TOP2A y Ki67, pero también podría ocurrir que ambos marcadores fuesen independientes. Si se confirmase esta segunda hipótesis, en futuras investigaciones se podría analizar si TOP2A aporta información adicional al Ki67 para mejorar la clasificación de los subtipos biológicos de cáncer de mama mediante el método IHQ4, ya que se sabe que un porcentaje alto de tumores luminales B definidos por medio de microarrays de expresión génica son erróneamente clasificados como luminales A empleando el método IHQ4.

El 3er OBJETIVO que nos planteamos fue optimizar la técnica de detección IHQ de TOP2A y correlacionar la expresión de la proteína TOP2A con el índice de proliferación estudiado mediante Ki67 (clon MIB1).

Al contrario de lo que ocurre con HER2, para TOP2A no parece existir una correlación entre los niveles de proteína y el estado del gen. Esto puede explicarse por la existencia de señales reguladoras de la transcripción que pueden incrementar los niveles de proteína independientemente del gen. Sin embargo, algunos autores demostraron asociación entre sobreexpresión de la proteína y amplificación del gen. Un vez realizada la cuantificación de la proteína TOP2A nos intrigó confirmar si realmente existía o no una correlación con el estado del gen (amplificado o no amplificado).

El 4º OBJETIVO propuesto fue estudiar la correlación entre la expresión de la proteína TOP2A determinada mediante inmunohistoquímica y la amplificación del gen *TOP2A* analizada mediante hibridación *in situ* cromogénica, por la posibilidad futura de realizar screenig de TOP2A con inmunohistoquímica como sucede con HER2.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

III. MATERIAL Y MÉTODOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

III.1. PACIENTES Y MUESTRAS

Para este estudio se seleccionaron 246 tumores correspondientes a 241 pacientes (todas mujeres), diagnosticadas de carcinoma infiltrante de mama en el Complexo Universitario de Santiago de Compostela (CHUS) y en el Complexo Hospitalario de Pontevedra (CHOP). La edad media de las pacientes fue de 60,2 años (rango comprendido entre 29 y 94 años). Tres casos presentaron multifocalidad y en dos casos había bilateralidad. La distribución en cuanto a tipo histológico y grado se recoge en la tabla siguiente:

Tipo histológico	Nº Casos	Grado		
		1	2	3
Carcinoma ductal infiltante (NOS)	220	33	106	81
Carcinoma lobulillar infiltrante	17	2	13	2
Carcinoma mucinoso	3	0	3	0
Carcinoma ductolobulillar	1	1	0	0
Carcinoma infiltrante con células en anillo de sello	1	0	1	0
Carcinoma de tipo medular	1	0	0	1
Carcinoma micropapilar infiltrante	1	0	1	0
Carcinoma papilar infiltrante	1	0	1	0
Carcinoma tubular infiltrante	1	1	0	0

Las muestras de casos recientes, tanto correspondientes a piezas quirúrgicas como a biopsias con aguja gruesa, se habían fijado en formol tamponado (6-72 horas) e incluido en parafina de forma rutinaria.

III.1.1. MUESTRAS PARA ANÁLISIS DE HER2

El estudio se realizó sobre 106 tumores consecutivos correspondientes a 105 pacientes con carcinomas infiltrantes de mama de los archivos de los Servicios de Anatomía Patológica del CHUS (50 casos correspondientes a los años 1998 y 1999)

y del CHOP (56 casos correspondientes a los años 2003 a 2005) (**Tabla 1, apartado IV.1**). De una misma paciente se seleccionaron dos muestras representativas al ser diagnosticada de carcinoma bilateral. La edad media de las pacientes fue de 57,9 años, con un rango comprendido entre 30 y 85 años. La distribución en cuanto a tipo histológico y grado se recoge en la tabla siguiente:

Tipo histológico	**Nº Casos**	**Grado**		
		1	2	3
Carcinoma ductal infiltante (NOS)	101	23	50	28
Carcinoma lobulillar infiltrante	5	1	4	0

Por cada paciente se seleccionó una muestra representativa correspondiente a un bloque de parafina. A partir de los bloques histológicos de tumor infiltrante se confeccionaron 6 micromatrices tisulares (TMA) empleando un *Tissue Microarrayer* (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA). De cada bloque histológico seleccionado se extrajeron 2 cilindros correspondientes a 2 áreas representativas de tumor, utilizándose una aguja de 1,5 mm de diámetro e incluyéndolos en la misma micromatriz.

De cada micromatriz se realizaron cortes histológicos seriados de 4 µm de grosor, tiñéndose la primera sección con hematoxilina-eosina para comprobar la idoneidad de las muestras. El resto de secciones se utilizaron para las técnicas de determinación del estado del gen *HER2* por hibridación in situ fluorescente (FISH) y cromogénica de doble color (DuoCISH).

III.1.2. MUESTRAS PARA ANÁLISIS DE TOP2A MEDIANTE FISH Y DUOCISH

Para el estudio de comparación del estado del gen *TOP2A* mediante FISH y DuoCISH se emplearon 70 casos de la muestra de HER2 (**Tabla 5a, apartado IV.2**)

(el análisis del resto de casos no fue posible debido a falta de material en las muestras de los TMA). Los 70 casos correspondían a 69 pacientes (uno de los casos presentaba bilateralidad). Al archivo del CHUS correspondía 44 casos, y al del CHOP, 26 casos. La edad media de las pacientes fue de 55,1 años (rango comprendido entre 30 y 85 años). La distribución en cuanto a tipo histológico y grado se recoge en la tabla siguiente:

Tipo histológico	**Nº Casos**	**Grado**		
		1	2	3
Carcinoma ductal infiltante (NOS)	68	15	36	17
Carcinoma lobulillar infiltrante	2	0	2	0

Dado que en el estudio de correlación de las dos técnicas comprobamos que todos los casos que mostraban amplificación para *TOP2A* también la presentaban para *HER2* (no había ningún caso con amplificación para *TOP2A* con *HER2* no amplificado), nos pareció de interés estudiar una muestra mayor de casos *HER2* amplificados para analizar el porcentaje de coamplificación de *TOP2A*. Para ello seleccionamos del archivo del CHUS (años 2009-2011) 30 tumores consecutivos con resultado HER2 positivo, es decir Herceptest 3+ o 2+ amplificado (en los casos 3+ se comprobó mediante FISH que en todos ellos había amplificación) y se confeccionó un TMA con las mismas características que las descritas previamente (**Tabla 5b, apartado IV.2**). La edad media de las 30 pacientes fue de 63,4 años, con un rango comprendido entre 29 y 94 años. La distribución en cuanto a tipo histológico y grado se recoge en la tabla siguiente:

Tipo histológico	**Nº casos**	**Grado**		
		1	2	3
Carcinoma ductal infiltante (NOS)	28	0	11	17
Carcinoma lobulillar infiltrante	2	0	2	0

III.1.3. MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS COMPARATIVO TOP2A Y Ki67 MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA

La estandarización de la técnica de IHQ para determinación de TOP2A nos permitió intuir que podría existir una correlación entre los valores de TOP2A y de Ki67, que podría ser interesante para mejorar la discriminación entre los subtipos inmunohistoquímicos luminal A y B. Dado que, siguiendo las recomendaciones de ASCO-CAP para la cuantificación de Ki67, debe hacerse un muestreo de las diferentes áreas del tumor (Dowsett y cols., 2011) no nos pareció oportuno emplear TMA con este objetivo.

Para este análisis comparativo se emplearon por tanto secciones completas de biopsias de aguja gruesa de 14G. Se estudiaron 110 tumores consecutivos del archivo del Servicio de Anatomía Patológica del CHUS (año 2012) (**Tabla 9, apartado IV.3**). Los tumores correspondían a 106 pacientes con edad media de 61,5 años, con un rango comprendido entre 33 y 89 años. Tres casos presentaron multifocalidad (dos tumores en cada caso) (**Tabla 9**; casos 42 y 43, casos 70 y 71, casos 83 y 84) y en un caso había bilateralidad (**Tabla 9**; casos 95 y 96). Los casos de carcinoma lobulillar infiltrante grado 3 eran de tipo pleomórfico (**Tabla 9**; casos 23 y 68).

La distribución en cuanto a tipo histológico y grado se recoge en la tabla siguiente:

Tipo histológico	Nº casos	Grado		
		1	2	3
Carcinoma ductal infiltante (NOS)	91	10	45	36
Carcinoma lobulillar infiltrante	10	1	7	2
Carcinoma mucinoso	3	0	3	0
Carcinoma ductolobulillar	1	1	0	0
Carcinoma infiltrante con células en anillo de sello	1	0	1	0
Carcinoma de tipo medular	1	0	0	1
Carcinoma micropapilar infiltrante	1	0	1	0
Carcinoma papilar infiltrante	1	0	1	0
Carcinoma tubular infiltrante	1	1	0	0

III.1.4. MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS COMPARATIVO DE TOP2A MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA Y DUOCISH

Una vez cuantificada la expresión de TOP2A por IHQ en secciones completas (en los TMA no nos fue posible porque el anticuerpo anti-TOP2A requiere muy frecuentemente adaptar los parámetros técnicos a las características específicas de fijación de la muestra), nos quedaba analizar la correlación entre expresión proteica y génica de TOP2A. Por razones de economía de medios y tiempo, y una vez validada la determinación de *TOP2A* mediante DuoCISH, construimos 4 TMA con los 110 casos referidos en el apartado **III.1.3**. Al realizar el análisis comprobamos que en 7 de los 110 casos no quedaba material suficiente en el TMA para la valoración de *TOP2A* mediante DuoCISH, por lo que para analizar estos 7 casos recurrimos a secciones completas de las BAGs (**Tabla 10, apartado IV.4**).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

III.2. INMUNOHISTOQUÍMICA

III.2.1. Ki67 y TOP2A

Se realizaron secciones de 4 μm que se montaron en portas pretratados FLEX IHC (Dako-Agilent, Glostrup, Denmark) y se secaron en una estufa a 60°C durante 4 h. Las secciones se desparafinaron, hidrataron e incubaron en solución de recuperación antigénica EnVision FLEX (pH bajo) en un PT-Link (Dako-Agilent) durante 20 min a 95°C. Posteriormente se atemperaron en el PT-Link a 65°C y se pasaron a tampón de lavado (Dako-Agilent) durante 5 min a temperatura ambiente.

La técnica inmunohistoquímica se realizó de forma automática en un inmunoteñidor AutostainerLink 48 (Dako-Agilent). El protocolo de inmunotinción incluyó las siguientes etapas de incubación:

1. Reactivo de bloqueo de peroxidasa (Dako-Agilent) durante 5 min.
2. Anticuerpos monoclonales de ratón anti-Ki67 (clon MIB1, Dako-Agilent), prediluido e incubado durante 30 minutos, y anti-TOP2A (clon Ki-S1, Dako-Agilent) al 1/50 e incubado durante 20 minutos.
3. Envision FLEX + Mouse Linker (Dako-Agilent) para amplificar la señal del Ki67 (15 minutos) (solo para Ki67).
4. Polímero de dextrano conjugado con peroxidasa de rábano e inmunoglobulinas de cabra anti-ratón y anti-conejo durante 20 min.
5. Solución de trabajo de tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina con peróxido de hidrógeno (Dako-Agilent) durante 10 min.
6. Contratinción con hematoxilina EnVision FLEX (Dako-Agilent) durante 15 min.

Entre las distintas etapas se realizaron lavados con tampón (Dako-Agilent) y tras la última, las secciones se lavaron de nuevo en tampón durante 5 min, para posteriormente proceder a su deshidratación, aclaramiento y montaje.

Los controles negativos de la técnica se llevaron a cabo sustituyendo el anticuerpo primario por tampón de dilución (Dako-Agilent). En todos los controles negativos no se obtuvo inmunotinción. Los cortes se observaron y fotografiaron en un microscopio Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Japón) equipado con una cámara digital DP70 (Olympus).

III.2.2. ANÁLISIS DE IMAGEN

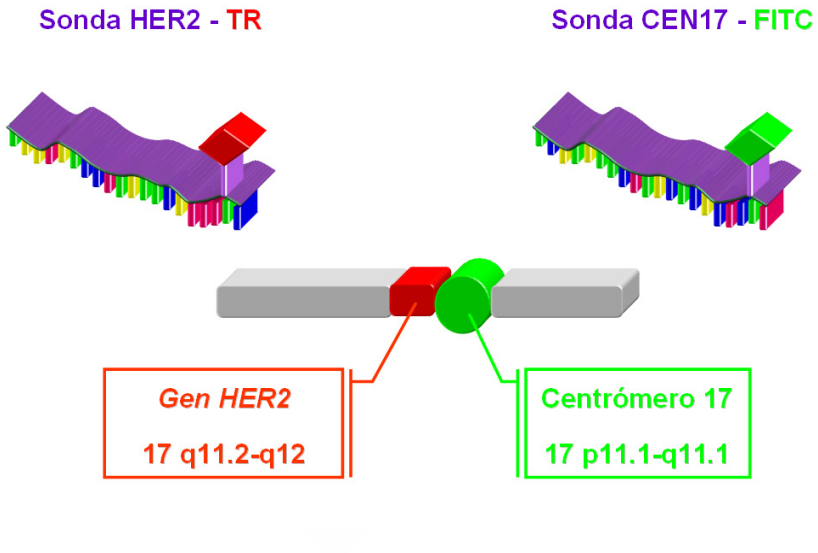
El cálculo de la proporción de núcleos positivos en las preparaciones inmunohistoquímicas de Ki67 y TOP2A se realizó mediante un analizador de imagen ChromaVision Systems - ACIS III (Dako-Agilent). Antes de realizar las cuantificaciones se revisó el umbral de positividad seleccionando la opción “plantilla” y, en caso necesario, se ajustó dicho umbral a las características de tinción de la muestra. La cuantificación se llevó a cabo seleccionando “a mano alzada” un mínimo de 5 campos da cada preparación elegidos al azar en la primera sección (Ki67) y procurando que los campos seleccionados en la segunda sección seriada (TOP2A) de cada caso fueran los mismos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

III.3. HIBRIDACIÓN *IN SITU*

III.3.1. HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH) PARA HER2

La técnica FISH fue realizada usando el kit HER2 FISH pharmDX™ (Dako-Agilent), que permite la determinación y visualización simultánea del gen *HER2/neu* y del centrómero del cromosoma 17. Dicha detección se realizó mediante el empleo de una mezcla de dos sondas: (1) una sonda *HER2* (ADN) marcada con Texas Red (TR), y (2) una sonda CEN-17 (PNA, Peptide Nucleic Acid) marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC), específica para la región centromérica del cromosoma 17.



La técnica fue realizada según las recomendaciones del fabricante, que se resumen a continuación:

1. Desparafinado y deshidratación de las secciones histológicas.
2. Pretratamientos, para permeabilizar el tejido y facilitar el acceso de la sonda a la secuencia diana:
    a) Solución de pretratamiento MES (2-[*N*-morpholino]ethanesulphonic acid), 10 minutos a 95-99ºC.
    b) Digestión enzimática con pepsina, 10 minutos a temperatura ambiente. Ocasionalmente fue necesario repetir la técnica en aquellos casos que

se observaba ausencia de señales o sobredigestión, ajustando el tiempo de incubación con pepsina (aumentándolo o disminuyéndolo en 5 minutos, respectivamente).

3. Deshidratación en alcoholes de gradación creciente (70%, 85% y 96%).
4. Codesnaturalización de la mezcla de sondas y del ADN diana (5 minutos a 82ºC).
5. Hibridación de la mezcla de sondas con las secuencias diana (toda la noche a 45ºC).
6. Lavado de rigor en tampón citrato salino estándar (SSC) (10 minutos a 65ºC).
7. Deshidratación y montaje con DAPI (4´,6-diamidina-2-fenilindol) para contraste de los núcleos.

La valoración de las preparaciones hibridadas se realizó en un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51, Tokio, Japón) equipado con un filtro para DAPI (núcleos) y un filtro doble para TR *(HER2)* / FITC (CEN-17), y una cámara digital DP70 (Olympus, Tokio, Japón). La cuantificación se llevó a cabo con objetivo de inmersión de 100x.

Siguiendo el sistema de valoración del kit *HER2* FISH pharmDx™ (aprobado por la FDA en 1998), se cuantificaron 20 núcleos y se consideró que existe amplificación del gen *HER2*, cuando el cociente entre el número de señales del gen *HER2* y el número de señales del centrómero 17 (*HER2*/CEN-17) es ≥2. En caso de que la ratio estuviese comprendida entre 1.8 y 2.2, se cuantificaron 20 núcleos más, resultando no amplificados aquellos casos con ratio <2 y amplificados aquellos con ratio ≥2.

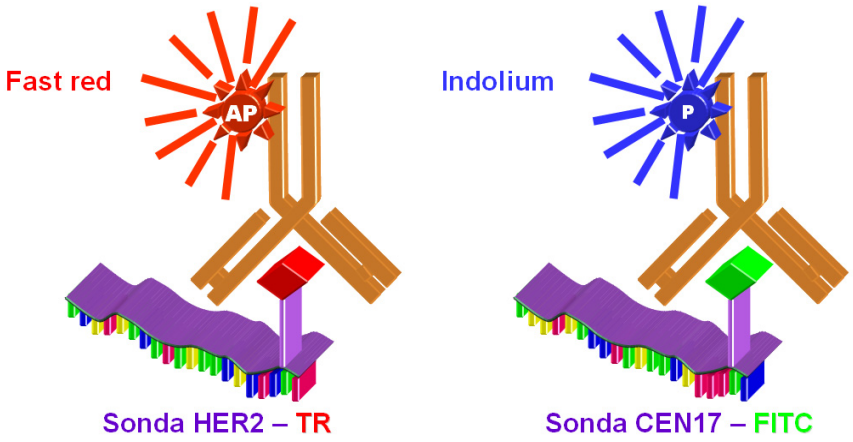
III.3.2. HIBRIDACIÓN *IN SITU* CROMOGÉNICA DE DOBLE COLOR (DUOCISH) PARA HER2

La técnica DuoCISH fue realizada mediante el empleo de los kits HER2 FISH pharmDX™ y DuoCISH ™ (Dako-Agilent). Tras la hibridación de las secuencias diana con la mezcla de sondas para detección del gen *HER2* y de la región

centromérica del cromosoma 17 (CEN-17) descrita en el apartado **III.3.1** y los lavados de rigor, se procedió con la técnica inmunohistoquímica para la detección de ambos fluorocromos, FITC y TR, con una mezcla de anticuerpos específicos: 1) la detección de FITC se realizó mediante un anticuerpo anti-FITC marcado covalentemente con peroxidasa (anti-FITC-P), y 2) la detección de TR se realizó mediante un anticuerpo anti-TR marcado con fosfatasa alcalina (anti-TR-AP).

La tinción específica en el lugar de hibridación se realizó mediante el empleo de 2 cromógenos de forma consecutiva:

1. Tinción del complejo *HER2*/anti-FITC-P con Fast Red (Fast Red KL SALT), obteniéndose tinción roja en el lugar de hibridación,
2. Tinción del complejo CEN-17/anti-TR-AP con Indolium (5-amino-2-[3-[5-amino-1,3-dihydro-3,3-dimethyl-1-(4-sulfobutyl)-2H-indol-2-ylidene]-1-propenyl]-3,3-dimethyl-1-(4-sulfobutyl)-3H-Indolium, ter trifluoroacetate), obteniéndose tinción azul.



Como dijimos, la primera etapa de la técnica consiste en realizar una hibridación *in situ* con fluorescencia del mismo modo que se ha descrito previamente en el apartado **III.3.1** (hasta el paso 5). A continuación, el procedimiento es el siguiente:

1. Incubación de la preparación con una mezcla de anticuerpos anti-TR y anti-FITC marcados con fosfatasa alcalina y peroxidasa, respectivamente, 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
2. Tampón de lavado, 2x3 minutos.
3. Incubación en *Fast red TR Salt* (solución cromógena para fosfatasa alcalina, que proporciona una señal roja), 10 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
4. Tampón de lavado, 3 minutos.
5. Incubación en 5-amino-2[3-[5-amino-1,3-dihidro-3,3-dimetil-1-(4sulfobutil)-2H-indol-2-ylidene]-1-propenil]-3,3dimetil-1-(4sulfobutil)-3H-Indolium (solución cromógena para peroxidasa, que proporciona una señal azul), 10 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
6. Tampón de lavado, 3 minutos.
7. Contratinción con hematoxilina, 5 minutos a temperatura ambiente.
8. Secado, 30 minutos a 37ºC (*Hybridizer*).
9. Montaje en medio permanente (*Tissue-Mount*) que no contiene etanol ni xilol (en los que serían solubles los cromógenos empleados).

La cuantificación se llevó a cabo en un microscopio óptico de campo claro (Olympus BX51, equipado con una cámara digital DP70), empleando un objetivo de 60x en seco, excepto en los casos con alta amplificación, en los que se usó un objetivo de 100x en inmersión. Los criterios para determinar la existencia o no de amplificación fueron los mismos que los detallados en la técnica FISH.

III.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La correlación entre el estado de *HER2* y *TOP2A* mediante las técnicas de FISH y DuoCISH fue evaluada usando el índice kappa (Landis y Koch., 1977). La correlación se considera muy débil cuando el índice kappa está comprendido entre 0 y 0.20; débil, entre 0.21 y 0.40; moderada, entre 0.41 y 0.60; buena, entre 0.61 y 0.80; y excelente, entre 0.81 y 1.

Para determinar la asociación entre el estado de *HER2*, *TOP2A* y Ki67 con la edad y grado histológico, usamos el test de Student y el test Chi-cuadrado, respectivamente. Se calcularon los coeficientes de correlación de FISH y DuoCISH entre sí y con respecto a las ratios *HER2*/CEN17, *TOP2A*/CEN17 y número de copias por núcleo de *HER2*, *TOP2A* y CEN17. En los casos con coamplificación *HER2*/*TOP2A* se emplearon tests de datos pareados para comparar las ratios de *HER2* y *TOP2A*. El test de Wilcoxon se usó para comparar las ratios de *HER2*/CEN17 y *TOP2A*/CEN17, y el número de copias por núcleo de *HER2*, *TOP2A* y CEN17.

La relación existente entre la proteína TOP2A y el índice Ki67, así como entre los resultados del estudio del gen *TOP2A* y su expresión proteica, se analizaron calculando el coeficiente de correlación lineal de Pearson.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados usando el paquete estadístico SPSS 15 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), y los resultados se expresaron como media ± desviación estándar. Las diferencias se consideraron significativas si $p<0.05$.

IV. RESULTADOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

IV.1. CORRELACIÓN ENTRE *HER2* DETERMINADO MEDIANTE HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH) E HIBRIDACIÓN *IN SITU* CROMOGÉNICA (DUOCISH)

La determinación del estado de *HER2* mediante FISH y DuoCISH se realizó en 106 casos consecutivos de carcinoma infiltrante de mama incluidos en 6 TMAs (**Tabla 1**).

La tinción mediante DuoCISH para *HER2* mostró señales claras para el gen *HER2* (color rojo) y CEN17 (color azul) lo que permite una cuantificación sencilla de las señales a 40x o 60x (con objetivo seco), evitando el uso de aumentos superiores y aceite de inmersión. En la **Fig. 1** se muestran ejemplos representativos de muestras no amplificadas y amplificadas mediante DuoCISH. En casos no amplificados (**Fig. 1A**) la mayoría de las células presentaron dos señales rojas (*HER2*) y dos señales azules (CEN17). Los tumores amplificados normalmente mostraban dos señales azules y un número moderado (baja amplificación) (**Fig. 1B**) o un alto (alta amplificación) (**Fig. 1C**) de señales rojas.

La determinación del estado de *HER2* mediante DuoCISH y FISH fue concordante en 103 de 106 casos (concordancia: 97.2%; kappa=0.91), con una correlación excelente entre ambos métodos (Landis and Koch, 1977). Se demostró amplificación de *HER2* en 21 de los 106 casos (19.8%) analizados mediante DuoCISH, mientras que mediante FISH se demostró amplificación en 22 de los 106 casos (20.8%), hallándose por tanto 3 casos discordantes. De estos 3 casos, 2 no mostraron amplificación para DuoCISH y sí para FISH, y un caso mostró amplificación para DuoCISH, pero no para FISH. Los casos discordantes mostraron ratios próximas al umbral (2,0/1,6, 1,9/3,2, y 1,6/2,1; para DuoCISH/FISH, respectivamente) (véanse casos 25, 94 y 104 de la **Tabla 1**).

Tabla 1. Distribución de casos del estudio comparativo DuoCISH y FISH para *HER2* (**CDI**: Carcinoma ductal infiltrante; **CLI**: Carcinoma lobulillar infiltrante)

Caso	Edad	Tipo Histológ.	Grado	DuoCISH							FISH					
				HER2		CEN17		Ratio	*HER2* / Núcleo	CEN17/ Núcleo	*HER2*		CEN17		Ratio	*HER2* / Núcleo	CEN17/ Núcleo
				1-20	21-40	1-20	21-40				1-20	21-40	1-20	21-40			
1	80	CDI	2	31		39		0,8	1,6	2,0	37		33		1,1	1,9	1,7
2	49	CDI	3	485		31		15,6	24,3	1,6	353		31		11,4	17,7	1,6
3	60	CDI	1	30		65		0,5	1,5	3,3	37		26		1,4	1,9	1,3
4	51	CDI	1	35		43		0,8	1,8	2,2	34		33		1,0	1,7	1,7
5	63	CDI	2	33		33		1,0	1,7	1,7	39		37		1,1	2,0	1,9
6	64	CDI	2	35		36		1,0	1,8	1,8	39		41		1,0	2,0	2,1
7	33	CDI	2	40		38		1,1	2,0	1,9	40		30		1,3	2,0	1,5
8	49	CDI	3	29		28		1,0	1,5	1,4	38		23		1,7	1,9	1,2
9	73	CDI	2	35		37		0,9	1,8	1,9	35		31		1,1	1,8	1,6
10	85	CDI	3	178		47		3,8	8,9	2,4	349		74		4,7	17,5	3,7
11	52	CDI	3	36		42		0,9	1,8	2,1	31		40		0,8	1,6	2,0
12	60	CDI	1	31		36		0,9	1,6	1,8	41		37		1,1	2,1	1,9
13	57	CDI	1	41		48		0,9	2,1	2,4	38		37		1,0	1,9	1,9
14	43	CLI	2	27		37		0,7	1,4	1,9	38		35		1,1	1,9	1,8
15	43	CDI	1	37		41		0,9	1,9	2,1	44		39		1,1	2,2	2,0
16	58	CDI	1	104		20		5,2	5,2	1,0	85		24		3,5	4,3	1,2
17	49	CDI	3	40		43		0,9	2,0	2,2	53		40		1,3	2,7	2,0
18	75	CDI	2	37		37		1,0	1,9	1,9	64		45		1,4	3,2	2,3
19	79	CDI	2	35		68		0,5	1,8	3,4	37		32		1,2	1,9	1,6
20	58	CDI	2	34		41		0,8	1,7	2,1	56		51		1,1	2,8	2,6
21	43	CDI	3	391		74		5,3	19,6	3,7	454		59		7,7	22,7	3,0
22	50	CDI	2	49		59		0,8	2,5	3,0	81		81		1,0	4,1	4,1
23	85	CDI	3	264		74		3,6	13,2	3,7	311		70		4,4	15,6	3,5
24	47	CDI	3	48		47		1,0	2,4	2,4	41		36		1,1	2,1	1,8
25	36	CDI	1	63	60	29	34	2,0	3,1	1,6	94		57		1,6	4,7	2,9
26	61	CDI	2	26		35		0,7	1,3	1,8	40		38		1,1	2,0	1,9
27	42	CDI	1	36		47		0,8	1,8	2,4	32		32		1,0	1,6	1,6

Caso	Edad	Tipo Histológ.	Grado	DuoCISH							FISH						
				HER2		CEN17		Ratio	*HER2* / Núcleo	CEN17 / Núcleo	*HER2*		CEN17		Ratio	*HER2* / Núcleo	CEN17 / Núcleo
				1-20	21-40	1-20	21-40				1-20	21-40	1-20	21-40			
28	78	CDI	2	44		50		0,9	2,2	2,5	64		51		1,3	3,2	2,6
29	67	CDI	3	37		46		0,8	1,9	2,3	49		40		1,2	2,5	2,0
30	59	CLI	1	45		50		0,9	2,3	2,5	33		31		1,1	1,7	1,6
31	73	CDI	2	34		42		0,8	1,7	2,1	35		43		0,8	1,8	2,2
32	54	CDI	1	48		41		1,2	2,4	2,1	57		53		1,1	2,9	2,7
33	51	CDI	3	47		43		1,1	2,4	2,2	53		44		1,2	2,7	2,2
34	85	CDI	2	37		56		0,7	1,9	2,8	37		49		0,8	1,9	2,5
35	65	CDI	2	24		32		0,8	1,2	1,6	39		40		1,0	2,0	2,0
36	41	CDI	1	46		52		0,9	2,3	2,6	34		47		0,7	1,7	2,4
37	70	CDI	3	40		46		0,9	2,0	2,3	45		34		1,3	2,3	1,7
38	67	CDI	2	150		52		2,9	7,5	2,6	266		36		7,4	13,3	1,8
39	49	CDI	3	32		35		0,9	1,6	1,8	31		32		1,0	1,6	1,6
40	68	CDI	3	44		80		0,6	2,2	4,0	54		54		1,0	2,7	2,7
41	80	CDI	1	35		45		0,8	1,8	2,3	37		36		1,0	1,9	1,8
42	84	CDI	1	53		69		0,8	2,7	3,5	66		53		1,2	3,3	2,7
43	57	CDI	2	43		44		1,0	2,2	2,2	37		37		1,0	1,9	1,9
44	43	CDI	3	40		48		0,8	2,0	2,4	56		62		0,9	2,8	3,1
45	53	CDI	2	44		63		0,7	2,2	3,2	54		42		1,3	2,7	2,1
46	62	CDI	2	216		48		4,5	10,8	2,4	287		45		6,4	14,4	2,3
47	82	CDI	1	35		34		1,0	1,8	1,7	39		38		1,0	2,0	1,9
48	45	CDI	2	216		46		4,7	10,8	2,3	264		44		6,0	13,2	2,2
49	48	CDI	2	261		49		5,3	13,1	2,5	308		27		11,4	15,4	1,4
50	82	CDI	2	42		51		0,8	2,1	2,6	52		48		1,1	2,6	2,4
51	67	CDI	2	34		35		1,0	1,7	1,8	37		28		1,3	1,9	1,4
52	75	CDI	3	47		54		0,9	2,4	2,7	64		49		1,3	3,2	2,5
53	59	CDI	2	294		45		6,5	14,7	2,3	359		40		9,0	18,0	2,0
54	54	CDI	3	42		43		1,0	2,1	2,2	65		42		1,5	3,3	2,1

Caso	Edad	Tipo Histológ.	Grado	DuoCISH							FISH						
				HER2		CEN17		Ratio	*HER2* / Núcleo	CEN17 / Núcleo	*HER2*		CEN17		Ratio	*HER2* / Núcleo	CEN17 / Núcleo
				1-20	21-40	1-20	21-40				1-20	21-40	1-20	21-40			
55	47	CDI	2	36		37		1,0	1,8	1,9	45		44		1,0	2,3	2,2
56	84	CDI	1	53		49		1,1	2,7	2,5	52		44		1,2	2,6	2,2
57	60	CLI	2	23		47		0,5	1,2	2,4	45		36		1,3	2,3	1,8
58	66	CDI	1	42		70		0,6	2,1	3,5	64		41		1,6	3,2	2,1
59	64	CDI	1	37		111		0,3	1,9	5,6	35		46		0,8	1,8	2,3
60	32	CDI	2	172		76		2,3	8,6	3,8	151		53		2,8	7,6	2,7
61	49	CDI	1	26		40		0,7	1,3	2,0	41		37		1,1	2,1	1,9
62	62	CDI	2	30		54		0,6	1,5	2,7	41		70		0,6	2,1	3,5
63	73	CDI	2	21		46		0,5	1,1	2,3	23		32		0,7	1,2	1,6
64	60	CDI	2	33		58		0,6	1,7	2,9	51		40		1,3	2,6	2,0
65	62	CDI	2	46		54		0,9	2,3	2,7	54		41		1,3	2,7	2,1
66	30	CDI	2	200		43		4,7	10,0	2,2	258		34		7,6	12,9	1,7
67	31	CDI	3	33		40		0,8	1,7	2,0	42		51		0,8	2,1	2,6
68	35	CDI	3	32		69		0,5	1,6	3,5	50		50		1,0	2,5	2,5
69	62	CDI	2	43		56		0,8	2,2	2,8	66		70		0,9	3,3	3,5
70	61	CDI	2	39		45		0,9	2,0	2,3	36		31		1,2	1,8	1,6
71	39	CDI	2	26		35		0,7	1,3	1,8	53	69	50	69	1,0	3,1	3,0
72	77	CDI	1	51		65		0,8	2,6	3,3	67		52		1,3	3,4	2,6
73	67	CDI	3	40		46		0,9	2,0	2,3	67		50		1,3	3,4	2,5
74	46	CDI	2	57		89		0,6	2,9	4,5	87		55		1,6	4,4	2,8
75	39	CDI	2	235		61		3,9	11,8	3,1	334		37		9,0	16,7	1,9
76	43	CDI	3	50		43		1,2	2,5	2,2	50		53		0,9	2,5	2,7
77	63	CDI	2	34		35		1,0	1,7	1,8	41		35		1,2	2,1	1,8
78	60	CDI	1	32		51		0,6	1,6	2,6	36		34		1,1	1,8	1,7
79	76	CDI	1	36		30		1,2	1,8	1,5	36		32		1,1	1,8	1,6
80	37	CDI	3	246		46		5,3	12,3	2,3	261		35		7,5	13,1	1,8
81	83	CDI	2	43		37		1,2	2,2	1,9	53		40		1,3	2,7	2,0

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Caso	Edad	Tipo Histológ.	Grado	DuoCISH							FISH						
				HER2		CEN17		Ratio	*HER2* / Núcleo	CEN17 / Núcleo	*HER2*		CEN17		Ratio	*HER2* / Núcleo	CEN17 / Núcleo
				1-20	21-40	1-20	21-40				1-20	21-40	1-20	21-40			
82	58	CDI	2	29		28		1,0	1,5	1,4	23		22		1,0	1,2	1,1
83	39	CDI	2	47		40		1,2	2,4	2,0	66		52		1,3	3,3	2,6
84	65	CDI	2	23		26		0,9	1,2	1,3	34		29		1,2	1,7	1,5
85	55	CDI	3	30		31		1,0	1,5	1,6	23		23		1,0	1,2	1,2
86	49	CDI	2	31		37		0,8	1,6	1,9	49		43		1,1	2,5	2,2
87	59	CDI	3	43		34		1,3	2,2	1,7	56		40		1,4	2,8	2,0
88	76	CDI	2	32		30		1,1	1,6	1,5	34		31		1,1	1,7	1,6
89	65	CDI	3	49		62		0,8	2,5	3,1	73		59		1,2	3,7	3,0
90	80	CDI	2	430		60		7,2	21,5	3,0	572		49		11,7	28,6	2,5
91	68	CDI	2	160		44		3,6	8,0	2,2	171		36		4,8	8,6	1,8
92	51	CDI	2	20		35		0,6	1,0	1,8	22		39		0,6	1,1	2,0
93	48	CDI	3	26		41		0,6	1,3	2,1	25		28		0,9	1,3	1,4
94	51	CDI	2	276	295	150	146	1,9	14,3	7,4	377		117		3,2	18,9	5,9
95	48	CDI	2	33		45		0,7	1,7	2,3	38		36		1,1	1,9	1,8
96	37	CDI	1	40		36		1,1	2,0	1,8	40		36		1,1	2,0	1,8
97	50	CDI	1	52		92		0,6	2,6	4,6	59		84		0,7	3,0	4,2
98	54	CDI	2	352		34		10,4	17,6	1,7	568		48		11,8	28,4	2,4
99	60	CDI	1	36		37		1,0	1,8	1,9	41		35		1,2	2,1	1,8
100	46	CLI	2	33		36		0,9	1,7	1,8	33		34		1,0	1,7	1,7
101	61	CDI	3	351		73		4,8	17,6	3,7	407		64		6,4	20,4	3,2
102	38	CDI	2	53		62		0,9	2,7	3,1	68		58		1,2	3,4	2,9
103	60	CDI	2	31		36		0,9	1,6	1,8	37		72		0,5	1,9	3,6
104	43	CDI	3	128	149	73	100	1,6	6,9	4,3	167	136	77	70	2,1	7,6	3,7
105	38	CLI	2	214		38		5,6	10,7	1,9	389		34		11,4	19,5	1,7
106	53	CDI	3	349		72		4,8	17,5	3,6	659		92		7,2	33,0	4,6

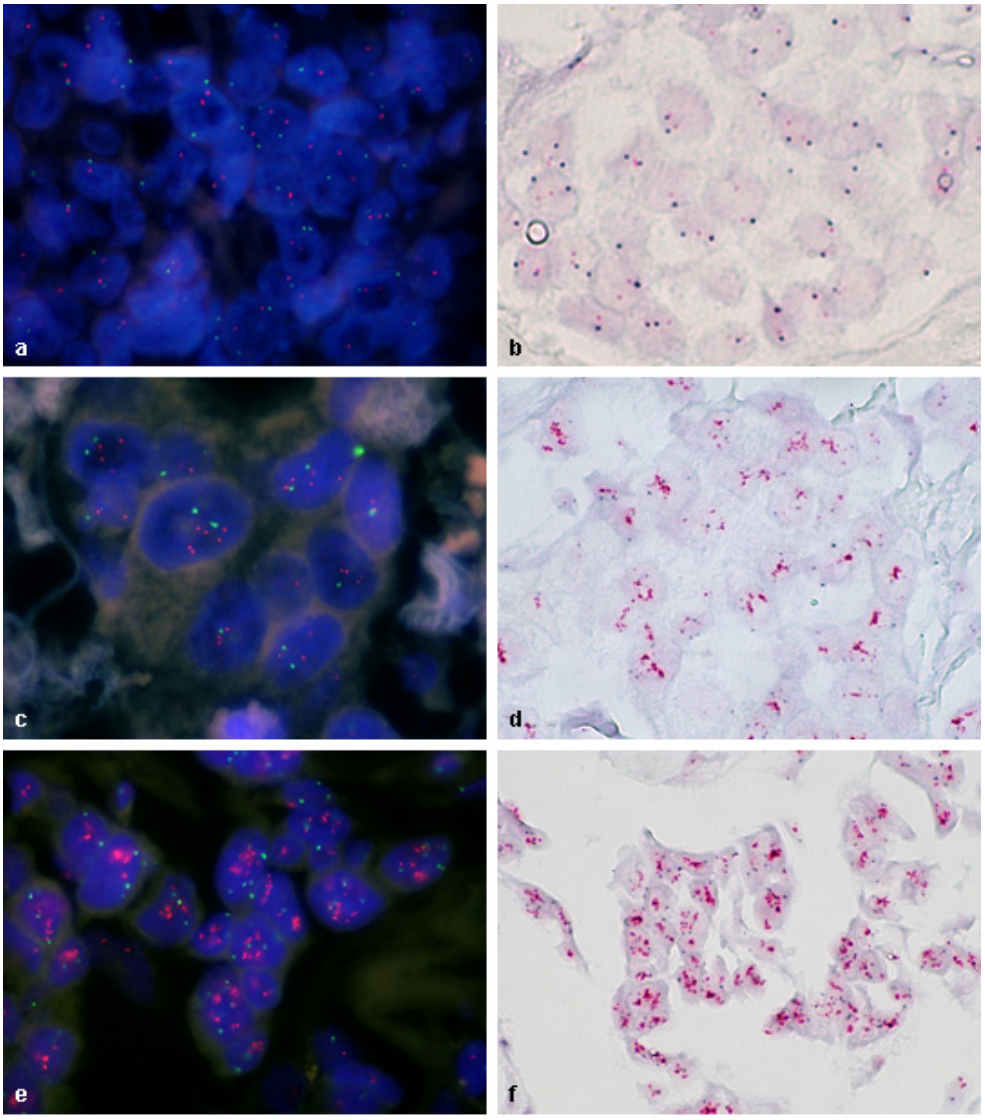


Figura 1. Comparación del estado del gen HER2 mediante FISH (izquierda) y DuoCISH (derecha). Caso no amplificado tanto en FISH (ratio: 0,5) (**a**) como en DuoCISH (ratio: 0,9) (**b**). Caso con baja amplificación en FISH (ratio: 4,7) (**c**) y en DuoCISH (ratio: 3,8) (**d**). Caso con alta amplificación en FISH (ratio: 7,2) (**e**) y en DuoCISH (ratio: 4,8) (**f**).

Tabla 2. Tabla de contingencia de resultados de *HER2* obtenidos mediante DuoCISH y FISH

		FISH *HER2*		Total
		No Amplificados	**Amplificados**	
DuoCISH HER2	**No amplificados**	83	2	85
	Amplificados	1	20	21
Total		84	22	106

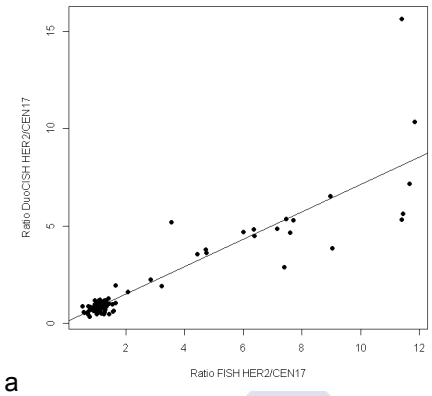
Concordancia: 97.2%
Kappa = 0.91 (concordancia excelente)

La edad media global de las pacientes fue de 57,8±14,3 años; la edad media en los casos no amplificados mediante FISH fue de 58,8 y en los casos amplificados fue de 54,0 años. No se demostró asociación entre el estado del gen *HER2* y la edad de las pacientes (p=0,144). Sin embargo, sí se obtuvo correlación con el grado histológico (p=0,036), siendo éste más alto en los casos amplificados (**Tabla 3**).

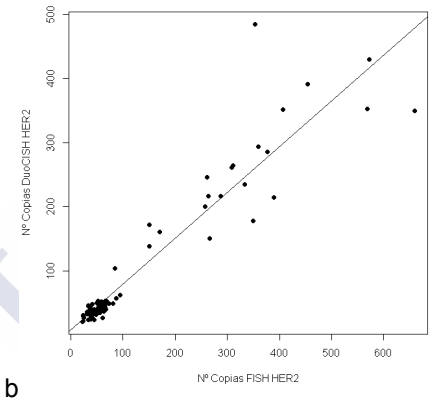
Tabla 3. Correlación entre el estado del gen HER2 y el grado histológico

		FISH HER2		Total
		No amplificados	**Amplificados**	
Grado histológico	**1**	23	1	24
	2	41	13	54
	3	20	8	28
Total		84	22	106

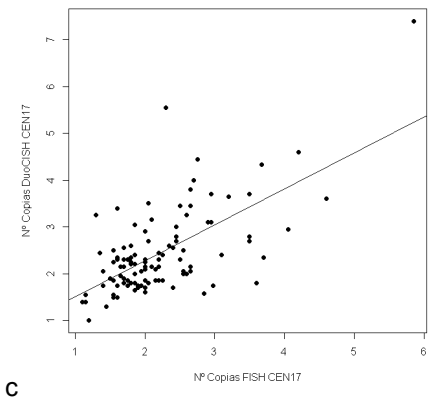
El análisis de correlación entre los métodos de DuoCISH y FISH se realizó mediante gráficos de dispersión de las ratios de *HER2*/CEN17, del número de copias de *HER2* y del número de copias de CEN17 mostrados por ambos métodos, seguidos de un análisis de regresión lineal. Los resultados mostraron una alta correlación entre ambos métodos (**Fig. 2**). El coeficiente de correlación (r) para la ratio *HER2*/CEN17 fue de 0,90 (p<0,001) (**Fig. 2a**); para el número de copias de *HER2* fue de 0,95 (p<0,001) (**Fig. 2b**); y para el número de copias de CEN17 fue de 0,65 (p<0,001) (**Fig. 2c**).



a



b



c

Figura 2. Correlación entre ratios de *HER2*/CEN17 (**a**), número de copias de *HER2* (**b**) y número de copias de CEN17 (**c**) obtenidos mediante DuoCISH y FISH.

El test de Wilcoxon por pares reveló diferencias significativas entre las medias de las ratios de *HER2/*CEN17 (p<0,001), del número de copias del gen *HER2/*núcleo (p<0,001) y del número de copias de CEN17 por núcleo (p=0,001) (**Tabla 4**).

Tabla 4. Medias de ratios de *HER2*/CEN17 (negro), número de copias de *HER2*/núcleo (rojo) y número de copias de CEN17/núcleo (azul), obtenidas mediante DuoCISH y FISH.

Ratios	**FISH**	**DuoCISH**	**Valor p**
	Media±DE	Media±DE	
HER2*/CEN17	2,36±2,83	1,76±2,21	<0,001
Número de copias *HER2*/núcleo*	5,30±6,68	4,18±5,04	<0,001
Número de copias CEN17/núcleo	2,21±0,77	2,44±0,92	0,001

*Existen diferencias significativas entre las media del número de copias del gen *HER2*/CEN17 y el número de copias HER2/núcleo, obtenidas mediante FISH y DuoCISH (p<0,001).

IV.2. CORRELACIÓN ENTRE *TOP2A* DETERMINADA MEDIANTE HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH) E HIBRIDACIÓN *IN SITU* CROMOGÉNICA (DUOCISH)

La determinación del estado de *HER2* mediante FISH en 70 casos consecutivos de carcinomas infiltrantes de mama mostró amplificación en 13 casos (18,6%) (**Tabla 5a**).

Al igual que para *HER2*, la tinción mediante DuoCISH para *TOP2A* mostró señales claramente discernibles para el gen *TOP2A* (color rojo) y el CEN17 (color azul). En la **Fig. 3** se muestran ejemplos representativos de muestras no amplificadas y amplificadas mediante DuoCISH y FISH. En casos no amplificados (**Fig. 3a**) la mayoría de las células presentaron dos señales rojas (*TOP2A*) y dos señales azules (CEN17). Los tumores amplificados normalmente mostraban dos señales azules y un número moderado (baja amplificación) (**Fig. 3b**) o alto de señales rojas (alta amplificación) (**Fig. 3c**).

La determinación del estado de *TOP2A* mediante DuoCISH y FISH fue concordante en los 70 casos consecutivos estudiados (concordancia: 100%; kappa=1,0) (**Tabla 5a**), con una correlación perfecta entre ambos métodos (Landis y Koch, 1977). Se demostró amplificación de *TOP2A* en 6 de 70 casos (8,6%). Todos los casos amplificados para *TOP2A* también mostraron amplificación para *HER2* (no se observó amplificación de *TOP2A* en ningún caso con estado del gen *HER2* normal) y 8 de los casos amplificados para *HER2* no mostraron coamplificación de *TOP2A*.

En el TMA construido solo con casos *HER2* amplificados, el estado de *TOP2A* determinado por DuoCISH y FISH fue concordante en 29 de 30 casos (concordancia: 99%; kappa=0,93), es decir, se obtuvo una correlación excelente entre ambos métodos (**Tabla 5b**). El caso discordante (caso 24) mostró amplificación mediante la técnica FISH (ratio=3,3), mientras que resultó no amplificado próximo al umbral (ratio=1,9) mediante DuoCISH. Considerando el caso discordante como amplificado (la técnica FISH está considerada como el patrón de oro en la determinación de *HER2*), 14 de los 30 casos estudiados (46,7%) mostraron coamplificación de *TOP2A*.

Tabla 5a. Distribución de 70 casos consecutivos en el estudio comparativo DuoCISH y FISH para *TOP2A* (**CDI**: Carcinoma ductal infiltrante; **CLI**: Carcinoma lobulillar infiltrante)

Casos	Edad	Tipo Histológico	Grado	Ratio FISH *HER2*	DuoCISH					FISH				
					Señales		Ratio	*TOP2A* / Núcleo	CEN17 / Núcleo	Señales		Ratio	*TOP2A* / Núcleo	CEN17 / Núcleo
					TOP2A	CEN17				*TOP2A*	CEN17			
1	80	CDI	2	1,1	33	37	0,9	1,7	1,9	31	32	1,0	1,6	1,6
2	49	CDI	3	11,4	212	38	5,6	10,6	1,9	237	32	7,4	11,9	1,6
3	60	CDI	1	1,4	31	32	1,0	1,6	1,6	38	28	1,4	1,9	1,4
4	51	CDI	1	1	32	37	0,9	1,6	1,9	37	35	1,1	1,9	1,8
5	63	CDI	2	1,1	34	34	1,0	1,7	1,7	39	40	1,0	2,0	2,0
6	64	CDI	2	1	45	31	1,5	2,3	1,6	56	46	1,2	2,8	2,3
7	33	CDI	2	1,3	32	23	1,4	1,6	1,2	38	22	1,7	1,9	1,1
8	49	CDI	3	1,7	31	29	1,1	1,6	1,5	35	24	1,5	1,8	1,2
9	73	CDI	2	1,1	29	25	1,2	1,5	1,3	39	38	1,0	2,0	1,9
10	85	CDI	3	4,7	36	55	0,7	1,8	2,8	94	61	1,5	4,7	3,1
11	52	CDI	3	0,8	32	35	0,9	1,6	1,8	34	39	0,9	1,7	2,0
12	60	CDI	1	1,1	35	40	0,9	1,8	2,0	37	32	1,2	1,9	1,6
13	43	CLI	2	1,1	31	35	0,9	1,6	1,8	38	39	1,0	1,9	2,0
14	43	CDI	1	1,1	31	33	0,9	1,6	1,7	39	27	1,4	2,0	1,4
15	58	CDI	1	3,5	55	23	2,4	2,8	1,2	100	27	3,7	5,0	1,4
16	49	CDI	3	1,3	33	29	1,1	1,7	1,5	47	39	1,2	2,4	2,0
17	75	CDI	2	1,4	31	26	1,2	1,6	1,3	40	26	1,5	2,0	1,3
18	79	CDI	2	1,2	36	35	1,0	1,8	1,8	35	30	1,2	1,8	1,5
19	58	CDI	2	1,1	27	30	0,9	1,4	1,5	47	34	1,4	2,4	1,7
20	43	CDI	3	7,7	36	37	1,0	1,8	1,9	29	31	0,9	1,5	1,6
21	50	CDI	2	1	40	43	0,9	2,0	2,2	42	41	1,0	2,1	2,1
22	47	CDI	3	1,1	52	35	1,5	2,6	1,8	49	35	1,4	2,5	1,8
23	61	CDI	2	1,1	40	32	1,3	2,0	1,6	33	30	1,1	1,7	1,5
24	42	CDI	1	1	31	27	1,1	1,6	1,4	32	27	1,2	1,6	1,4
25	78	CDI	2	1,3	37	31	1,2	1,9	1,6	52	44	1,2	2,6	2,2
26	66	CDI	1	1,5	49	38	1,3	2,5	1,9	70	50	1,4	3,5	2,5
27	64	CDI	1	0,7	48	60	0,8	2,4	3,0	40	50	0,8	2,0	2,5

Casos	Edad	Tipo Histológico	Grado	Ratio FISH *HER2*	DuoCISH					FISH				
					Señales		Ratio	*TOP2A* / Núcleo	CEN17 / Núcleo	Señales		Ratio	*TOP2A* / Núcleo	CEN17 / Núcleo
					TOP2A	CEN17				*TOP2A*	CEN17			
28	32	CDI	2	2,9	122	38	3,2	6,1	1,9	177	68	2,6	8,9	3,4
29	49	CDI	1	1,1	34	34	1,0	1,7	1,7	24	40	0,6	1,2	2,0
30	62	CDI	2	0,6	43	48	0,9	2,2	2,4	42	38	1,1	2,1	1,9
31	73	CDI	2	0,7	30	30	1,0	1,5	1,5	27	30	0,9	1,4	1,5
32	60	CDI	2	1,3	44	44	1,0	2,2	2,2	66	44	1,5	3,3	2,2
33	62	CDI	2	1,3	55	42	1,3	2,8	2,1	70	50	1,4	3,5	2,5
34	30	CDI	2	7,6	32	40	0,8	1,6	2,0	32	32	1,0	1,6	1,6
35	31	CDI	3	0,8	47	36	1,3	2,4	1,8	44	34	1,3	2,2	1,7
36	35	CDI	3	1	40	40	1,0	2,0	2,0	48	44	1,1	2,4	2,2
37	62	CDI	2	0,9	51	46	1,1	2,6	2,3	69	46	1,5	3,5	2,3
38	61	CDI	2	1,2	33	30	1,1	1,7	1,5	39	32	1,2	2,0	1,6
39	39	CDI	2	1	31	34	0,9	1,6	1,7	42	38	1,1	2,1	1,9
40	77	CDI	1	1,3	65	46	1,4	3,3	2,3	65	50	1,3	3,3	2,5
41	46	CDI	2	1,6	42	42	1,0	2,1	2,1	53	44	1,2	2,7	2,2
42	39	CDI	2	9	34	38	0,9	1,7	1,9	40	40	1,0	2,0	2,0
43	43	CDI	3	0,9	47	52	0,9	2,4	2,6	46	46	1,0	2,3	2,3
44	63	CDI	2	1,2	40	40	1,0	2,0	2,0	44	34	1,3	2,2	1,7
45	60	CDI	1	1,1	32	32	1,0	1,6	1,6	39	32	1,2	2,0	1,6
46	76	CDI	1	1,1	40	40	1,0	2,0	2,0	38	34	1,1	1,9	1,7
47	37	CDI	3	7,5	34	34	1,0	1,7	1,7	47	36	1,3	2,4	1,8
48	83	CDI	2	1,3	49	38	1,3	2,5	1,9	39	32	1,2	2,0	1,6
49	58	CDI	2	1	38	32	1,2	1,9	1,6	28	28	1,0	1,4	1,4
50	39	CDI	2	1,3	44	48	0,9	2,2	2,4	53	44	1,2	2,7	2,2
51	65	CDI	2	1,2	44	34	1,3	2,2	1,7	36	28	1,3	1,8	1,4
52	55	CDI	3	1	39	30	1,3	2,0	1,5	35	32	1,1	1,8	1,6
53	49	CDI	2	1,1	38	38	1,0	1,9	1,9	36	36	1,0	1,8	1,8
54	59	CDI	3	1,4	30	34	0,9	1,5	1,7	42	30	1,4	2,1	1,5

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Casos	Edad	Tipo Histológico	Grado	Ratio FISH *HER2*	DuoCISH					FISH				
					Señales		Ratio	*TOP2A* / Núcleo	CEN17 / Núcleo	Señales		Ratio	*TOP2A* / Núcleo	CEN17 / Núcleo
					TOP2A	CEN17				*TOP2A*	CEN17			
55	76	CDI	2	1,1	34	34	1,0	1,7	1,7	40	36	1,1	2,0	1,8
56	65	CDI	3	1,2	73	66	1,1	3,7	3,3	68	62	1,1	3,4	3,1
57	68	CDI	2	4,8	37	46	0,8	1,9	2,3	29	36	0,8	1,5	1,8
58	51	CDI	2	0,6	32	46	0,7	1,6	2,3	30	30	1,0	1,5	1,5
59	51	CDI	2	3,2	70	140	0,5	3,5	7,0	42	70	0,6	2,1	3,5
60	48	CDI	2	1,1	46	46	1,0	2,3	2,3	36	40	0,9	1,8	2,0
61	37	CDI	1	1,1	40	36	1,1	2,0	1,8	37	34	1,1	1,9	1,7
62	50	CDI	1	0,7	55	46	1,2	2,8	2,3	32	36	0,9	1,6	1,8
63	54	CDI	2	11,8	156	40	3,9	7,8	2,0	129	38	3,4	6,5	1,9
64	60	CDI	1	1,2	46	42	1,1	2,3	2,1	41	34	1,2	2,1	1,7
65	46	CLI	2	1	40	40	1,0	2,0	2,0	34	34	1,0	1,7	1,7
66	61	CDI	3	6,4	33	86	0,4	1,7	4,3	38	71	0,5	1,9	3,6
67	38	CDI	2	1,2	43	48	0,9	2,2	2,4	55	42	1,3	2,8	2,1
68	60	CDI	2	0,5	40	40	1,0	2,0	2,0	37	34	1,1	1,9	1,7
69	43	CDI	3	2,1	146	56	2,6	7,3	2,8	151	54	2,8	7,6	2,7
70	53	CDI	3	7,2	170	68	2,5	8,5	3,4	273	44	6,2	13,7	2,2

Tabla 5b. Distribución de 30 casos *HER2* amplificados consecutivos en el estudio comparativo DuoCISH y FISH para *TOP2A* (**CDI**: Carcinoma ductal infiltrante; **CLI**: Carcinoma lobulillar infiltrante)

Casos	Edad	Tipo Histológico	Grado	Ratio FISH *HER2*	DuoCISH					FISH				
					Señales		Ratio	*TOP2A* / Núcleo	CEN17 / Núcleo	Señales		Ratio	*TOP2A* / Núcleo	CEN17 / Núcleo
					TOP2A	CEN17				*TOP2A*	CEN17			
1	71	CLI	2	4,7	121	43	2,8	6,1	2,2	120	44	2,7	6,0	2,2
2	57	CDI	3	8,6	115	47	2,4	5,8	2,4	142	34	4,2	7,1	1,7
3	39	CDI	2	8,1	46	45	1,0	2,3	2,3	63	57	1,1	3,2	2,9
4	63	CDI	3	11,1	300	45	6,7	15,0	2,3	179	36	5,0	9,0	1,8
5	94	CDI	3	6,1	36	49	0,7	1,8	2,5	37	32	1,2	1,9	1,6
6	67	CDI	3	8,5	35	46	0,8	1,8	2,3	52	29	1,8	2,6	1,5
7	63	CDI	3	8,9	229	41	5,6	11,5	2,1	141	25	5,6	7,1	1,3
8	94	CDI	2	3,5	36	53	0,7	1,8	2,7	36	37	1,0	1,8	1,9
9	50	CDI	2	7,5	36	39	0,9	1,8	2,0	46	32	1,4	2,3	1,6
10	57	CDI	3	8,2	36	44	0,8	1,8	2,2	38	27	1,4	1,9	1,4
11	61	CDI	2	6,5	236	25	9,4	11,8	1,3	138	21	6,6	6,9	1,1
12	59	CDI	2	5,1	43	37	1,2	2,2	1,9	39	24	1,6	2,0	1,2
13	64	CLI	2	4,3	135	41	3,3	6,8	2,1	81	28	2,9	4,1	1,4
14	81	CDI	3	5,5	48	32	1,5	2,4	1,6	38	20	1,9	1,9	1,0
15	29	CDI	2	5,4	120	33	3,6	6,0	1,7	42	20	2,1	2,1	1,0
16	64	CDI	2	4,6	38	49	0,8	1,9	2,5	35	29	1,2	1,8	1,5
17	83	CDI	3	5,6	46	41	1,1	2,3	2,1	38	32	1,2	1,9	1,6
18	49	CDI	2	7,5	266	42	6,3	13,3	2,1	154	27	5,7	7,7	1,4
19	83	CDI	3	7,5	205	42	4,9	10,3	2,1	138	28	4,9	6,9	1,4
20	63	CDI	3	4,7	27	49	0,6	1,4	2,5	23	27	0,9	1,2	1,4
21	82	CDI	3	7,0	415	45	9,2	20,8	2,3	265	31	8,5	13,3	1,6
22	50	CDI	3	5,2	39	43	0,9	2,0	2,2	29	26	1,1	1,5	1,3
23	49	CDI	2	6,8	30	33	0,9	1,5	1,7	35	21	1,7	1,8	1,1
24	71	CDI	3	3,2	68	35	1,9	3,4	1,8	89	27	3,3	4,5	1,4
25	66	CDI	3	4,8	232	47	4,9	11,6	2,4	145	27	5,4	7,3	1,4
26	35	CDI	3	8,8	49	41	1,2	2,5	2,1	42	28	1,5	2,1	1,4
27	55	CDI	3	11,1	40	37	1,1	2,0	1,9	28	23	1,2	1,4	1,2
28	62	CDI	2	5,1	217	33	6,6	10,9	1,7	119	28	4,3	6,0	1,4
29	77	CDI	2	2,5	154	65	2,4	7,7	3,3	155	81	1,9	7,8	4,1
30	63	CDI	3	12	223	39	5,7	11,2	2,0	216	81	2,7	10,8	4,1

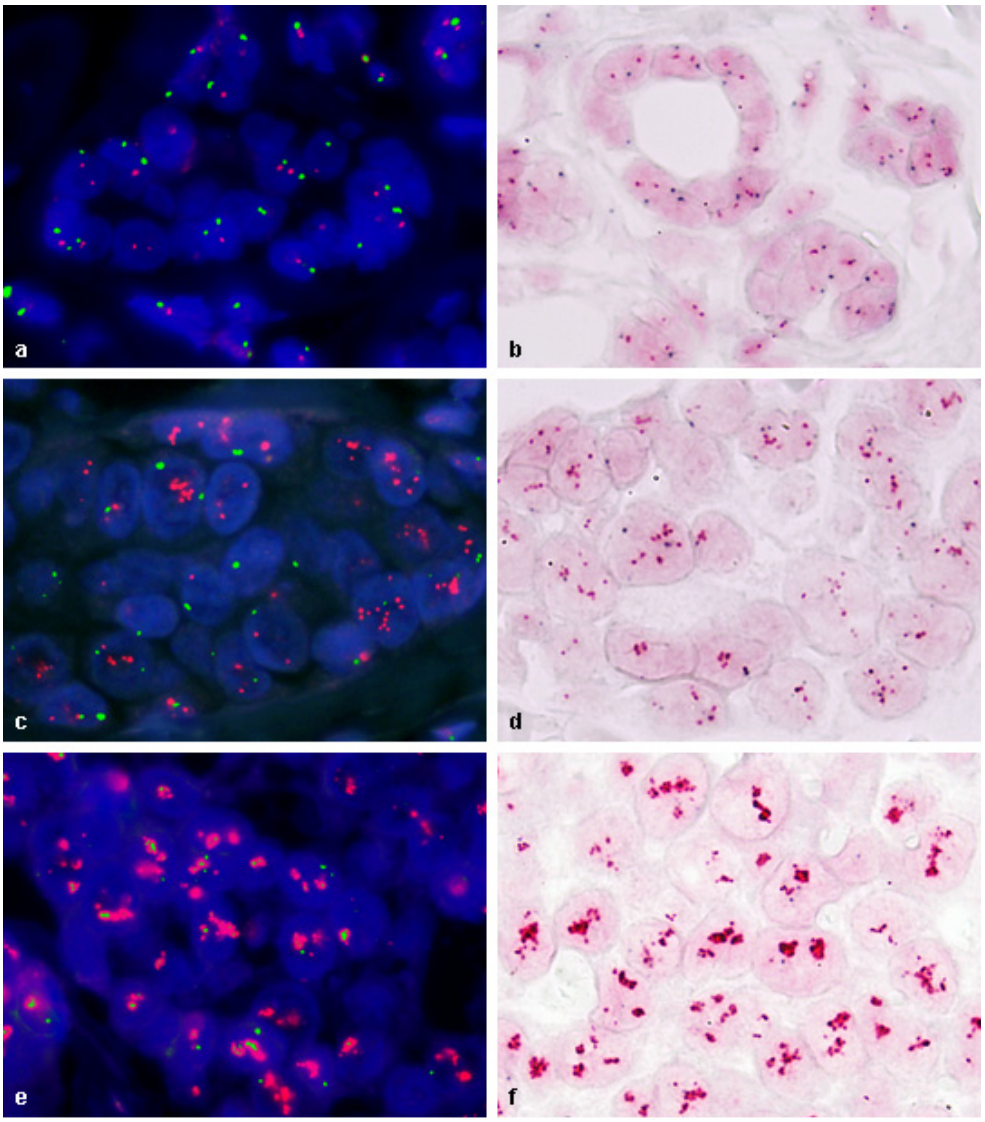


Figura 3. Caso de carcinoma de mama no amplificado para *TOP2A* (**a** y **b**) estudiado mediante FISH (**a**; ratio: 1,4) y DuoCISH (**b**; ratio: 0,9); en ambas imágenes el número de señales rojas (*TOP2A*) y verdes (**a**) o azules (**b**) (CEN17) es normal. Caso con baja amplificación tanto por FISH (**c**; ratio: 4,9) como por DuoCISH (**d**; ratio: 4,9) en el que el número de señales rojas es claramente superior al de señales verdes/azules. Caso con alta amplificación por FISH (**e**; ratio: 8,5) y por DuoCISH (**f**; ratio: 9,2) donde se observan grupos compactos de señales rojas con ambas técnicas (100x).

Analizando conjuntamente ambas series (casos consecutivos y casos *HER2* amplificados), el estado del gen *TOP2A* determinado mediante DuoCISH y FISH fue concordante en 99 de 100 casos (concordancia: 99%; kappa=0,97), lo que implica una correlación excelente entre ambos métodos (**Tabla 6**).

Tabla 6. Tabla de contingencia de resultados de *TOP2A* obtenidos mediante DuoCISH y FISH

		FISH *TOP2A*		Total
		No Amplificados	Amplificados	
DuoCISH *TOP2A*	No amplificados	80	1	81
	Amplificados	0	19	19
Total		80	20	100

Concordancia: 99%
Kappa: 0,97 (concordancia excelente)

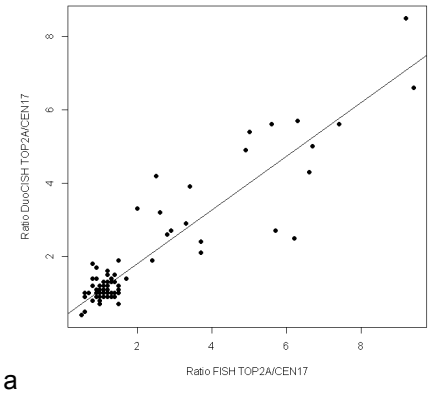
La amplificación del gen *TOP2A* en presencia de amplificación de *HER2* se demostró en 20 de 43 casos (46,5%). En muestras coamplificadas la media de la ratio *HER2*/CEN17 fue de 6,74±3,13, significativamente mayor que la media de la ratio *TOP2A*/CEN17 que fue de 5,00±2,18 (p=0,016).

La edad media de las pacientes fue de 57,8±14,5 años, siendo de 57,5±14,8 en los casos no amplificados y de 58,9±14,3 en los amplificados. No se demostró asociación entre el estado del gen *TOP2A* y la edad de las pacientes (p=0,702). Respecto al grado histológico, los casos amplificados mostraron tendencia a presentar un grado histológico más alto, pero la asociación, aunque próxima al umbral, no fue significativa (p=0,055) (**Tabla 7**).

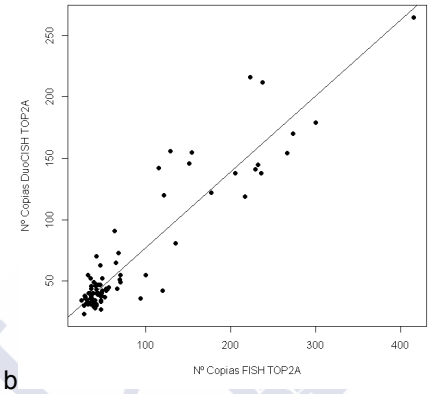
Tabla 7. Correlación entre el estado del gen *TOP2A* y el grado histológico

		FISH *TOP2A*		Total
		No amplificados	Amplificados	
Grado histológico	1	14	1	15
	2	42	9	51
	3	24	10	34
Total		80	20	100

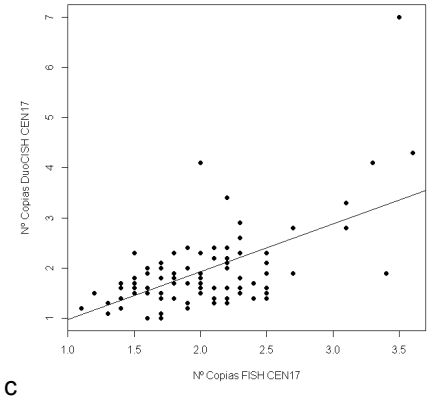
El análisis de correlación entre los métodos de DuoCISH y FISH se realizó mediante gráficos de dispersión de las ratios de *TOP2A*/CEN17, del número de copias de *TOP2A* y del número de copias de CEN17 mostrados por ambos métodos, seguido de un análisis de regresión lineal. Los resultados mostraron una correlación altamente significativa entre ambos métodos (**Fig. 4**). El coeficiente de correlación (r) para la ratios *TOP2A*/CEN17 fue de 0,92 ($p<0,001$) (**Fig. 4a**); para el número de copias de *TOP2A* fue de 0,93 ($p<0,001$) (**Fig. 4b**); y para el número de copias de CEN17 fue de 0,60 ($p<0,001$) (**Fig. 4c**).



a



b



c

Figura 4. Correlación entre ratios de *TOP2A*/CEN17 (**a**), número de copias de *TOP2A* (**b**) y número de copias de CEN17 (**c**) obtenidos mediante DuoCISH y FISH.

El test de Wilcoxon por pares no demostró diferencias significativas entre las ratios de *TOP2A/*CEN17 obtenidas mediante DuoCISH y FISH (p=0,051), reveló diferencias significativas entre el número de copias del gen *TOP2A* por núcleo (p<0,001) y no mostró diferencias entre el número de copias de CEN17 por núcleo (p=0,124) (**Tabla 8**).

Tabla 8. Medias de ratios de *TOP2A*/CEN17, número de copias de *TOP2A*/núcleo, y número de copias de CEN17/núcleo, obtenidas mediante FISH y DuoCISH.

Ratios	**FISH**	**DuoCISH**	**Valor p**
	Media±DE	Media±DE	
TOP2A/CEN17	1,88±1,85	1,70±1,46	0,051
Número de copias *TOP2A*/núcleo*	3,71±3,67	3,05±2,44	<0,001
Número de copias CEN17/núcleo	1,99±0,49	1,93±0,81	0,124

*Existen diferencias significativas entre las media del número de copias del gen *TOP2A*/núcleo obtenidas mediante FISH y DuoCISH (p<0,001).

Estos resultados fueron publicados recientemente (García-Caballero y cols., 2014) (véase **Anexo**).

IV.3. EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE TOP2A E ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN CELULAR (KI67)

El estudio de expresión de la proteína TOP2A y de Ki67 se realizó en 110 casos consecutivos de carcinomas infiltrantes de mama, empleándose secciones completas y seriadas de BAG y análisis de imagen (ACIS III), seleccionándose para la cuantificación las mismas áreas en ambas preparaciones (**Tabla 9**).

Los valores de TOP2A se hallaron comprendidos entre 2% y 99% y los de Ki67, entre 3% y 99%. La media de TOP2A y Ki67 en los casos de grado histológico 1 fue de 7,0±5.8 y 12,4±12,6, respectivamente; en los casos grado 2 de 11,3±8,5 y 18,9±14,6; y en los casos grado 3 de 43,8±26,1 y 55,2±26,9. Se observó asociación entre el grado histológico y la expresión de TOP2A y Ki67 (p<0,001) (**Figs. 5a y 5b**).

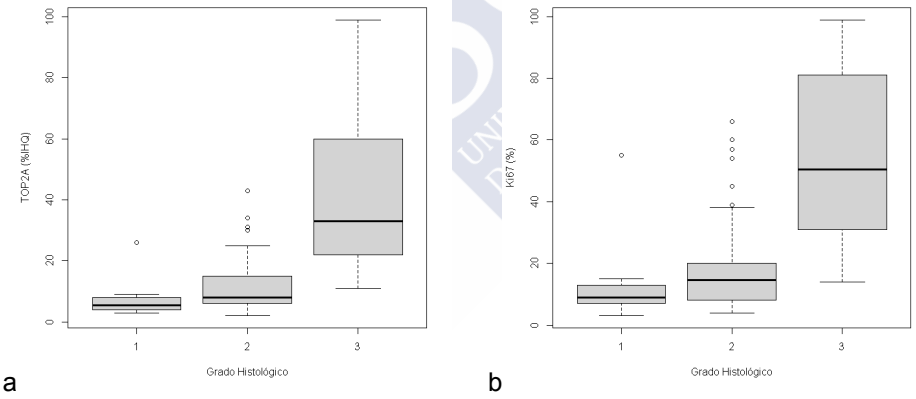


Fig. 5. Diagramas de cajas para la expresión de TOP2A (**a**) y Ki67 (**b**) con respecto al grado. Se representa la mediana, el percentil 25, el percentil 75 y los valores máximo y mínimo.

La edad media global de las pacientes fue de 61,5±15,5 años. Parece encontrarse una relación inversa entre la edad y la expresión de TOP2A (R=-0,198; p=0,038) y de Ki67 (R=-0,186), pero la significación es ligeramente superior al límite (p=0,051) (**Fig. 6a y 6b**).

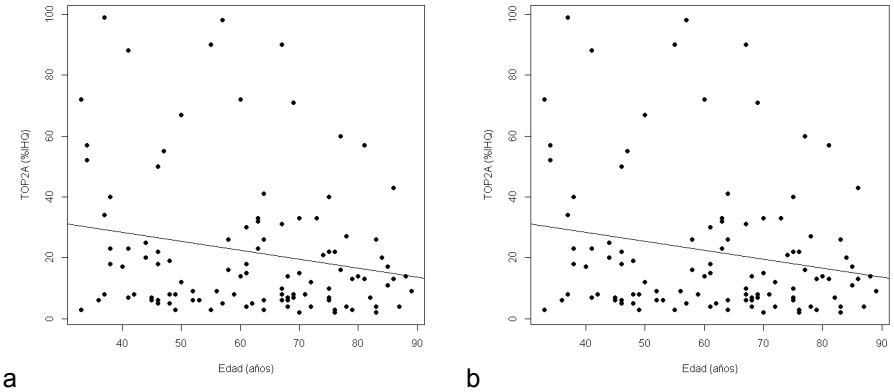


Fig. 6. Gráficos de dispersión entre TOP2A y edad (**a**), y Ki67 y edad (**b**)

En la gráfica que aparece a continuación (**Fig. 7**), se muestra mediante un diagrama de dispersión la relación existente entre la proteína TOP2A y el índice Ki67, con una correlación excelente entre ambos marcadores (coeficiente de correlación lineal de Pearson r=0,90; p<0,001).

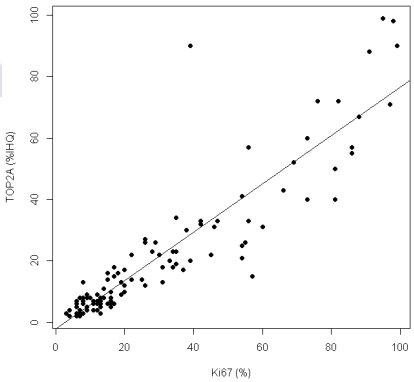


Figura 7. Correlación entre el porcentaje de expresión de TOP2A y Ki67.

Tabla 9. Distribución de casos comparando la expresión de Ki67 y TOP2A mediante inmunohistoquímica.

Caso	Edad	Tipo Histológico	Grado	Ki67 (%)	TOP2A (%)
1	70	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	56	33
2	42	Carcinoma Tubular Infiltrante	1	7	8
3	37	Carcinoma Ductal Infiltrante	1	8	8
4	46	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	22	22
5	46	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	81	50
6	46	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	8	6
7	40	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	37	17
8	61	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	38	30
9	52	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	8	6
10	80	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	15	14
11	34	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	69	52
12	67	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	39	90
13	84	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	39	20
14	64	Carcinoma Ductal Infiltrante	1	7	3
15	76	Carcinoma Lobulillar Infiltrante	2	6	2
16	37	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	35	34
17	75	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	45	22
18	88	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	22	14
19	60	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	25	14
20	61	Carcinoma Ductal Infiltrante	1	7	4
21	56	Carcinoma Lobulillar Infiltrante	2	12	9
22	64	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	54	41
23	76	Carcinoma Lobulillar Infiltrante	3	30	22
24	68	Carcinoma Lobulillar Infiltrante	1	15	6
25	68	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	25	14
26	67	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	9	8
27	69	Carcinoma mucinoso	2	8	7
28	59	Carcinoma Lobulillar Infiltrante	2	14	8
29	74	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	54	21
30	75	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	73	40
31	50	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	20	12
32	67	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	16	6
33	79	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	8	13
34	55	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	99	90
35	38	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	81	40
36	58	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	15	16
37	53	Carcinoma mucinoso	2	12	6
38	48	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	6	5
39	49	Carcinoma Ductal Infiltrante	1	3	3
40	79	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	8	3

Caso	Edad	Tipo Histológico	Grado	Ki67 (%)	TOP2A (%)
41	56	Carcinoma Lobulillar Infiltrante	2	12	9
42	45	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	6	7
43	45	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	8	7
44	77	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	73	60
45	83	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	26	26
46	52	Carcinoma Ductal Infiltrante	1	9	9
47	48	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	8	8
48	82	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	13	7
49	60	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	82	72
50	49	Carcinoma Lobulillar Infiltrante	2	16	8
51	63	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	47	33
52	44	Carcinoma Lobulillar Infiltrante	2	54	25
53	81	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	31	13
54	50	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	88	67
55	45	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	11	6
56	71	Carcinoma Infiltrante con Células en Anillo de Sello	2	13	8
57	62	Carcinoma Micropapilar Infiltrante	2	16	5
58	72	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	4	4
59	36	Carcinoma Ductal Infiltrante	1	13	6
60	41	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	16	7
61	57	Carcinoma Ductal Infiltrante	1	13	5
62	86	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	66	43
63	68	Carcinoma Ductolobulillar Infiltrante	1	9	4
64	57	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	98	98
65	75	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	12	7
66	70	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	57	15
67	67	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	16	10
68	64	Carcinoma Lobulillar Infiltrante	3	55	26
69	63	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	42	32
70	75	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	17	6
71	75	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	20	10
72	37	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	95	99
73	83	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	4	2
74	47	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	86	55
75	72	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	26	12
76	44	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	33	20
77	48	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	35	19
78	73	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	42	33
79	67	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	60	31
80	41	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	34	23

Caso	Edad	Tipo Histológico	Grado	Ki67 (%)	TOP2A (%)
81	76	Carcinoma Lobulillar Infiltrante	2	13	3
82	69	Carcinoma Ductal Infiltrante	1	10	8
83	38	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	34	18
84	38	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	28	23
85	34	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	86	57
86	86	Carcinoma Mucinoso	2	19	13
87	46	Carcinoma Ductal Infiltrante	1	9	5
88	46	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	31	18
89	33	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	6	3
90	61	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	17	15
91	68	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	11	7
92	85	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	14	11
93	77	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	18	16
94	64	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	6	6
95	78	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	26	27
96	78	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	12	4
97	61	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	17	18
98	41	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	91	88
99	58	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	29	26
100	85	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	20	17
101	55	Carcinoma Ductal Infiltrante	1	8	3
102	67	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	46	31
103	87	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	9	4
104	81	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	56	57
105	69	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	97	71
106	63	Carcinoma Ductal Infiltrante	3	35	23
107	33	Carcinoma Medular	3	76	72
108	70	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	7	2
109	83	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	11	4
110	89	Carcinoma Ductal Infiltrante	2	19	9

Dada la excelente correlación lineal obtenida entre ambos marcadores, podemos establecer una recta de regresión que nos permite predecir con bastante aproximación los valores de TOP2A en relación a los valores de Ki67. La recta de regresión puede expresarse de la siguiente forma:

$$TOP2A = - 2{,}05724 + 0{,}78540 \times Ki67$$

Por ejemplo, si tomamos el umbral más frecuentemente empleado en la actualidad para Ki67 (14%) y aplicamos la fórmula anterior, el umbral resultante para TOP2A sería: $TOP2A = - 2{,}05724 + 0{,}78540 \times 14 = 8{,}9$. Si tomásemos para Ki67 el umbral del 20% (frecuentemente propuesto en la actualidad y el más votado en el último Consenso de St. Gallen), el correspondiente a TOP2A sería 13,7%.

En la **Fig. 8** se muestran ejemplos representativos de baja, intermedia y alta expresión para Ki67 y TOP2A, donde puede comprobarse la buena correlación entre los resultados de ambos marcadores.

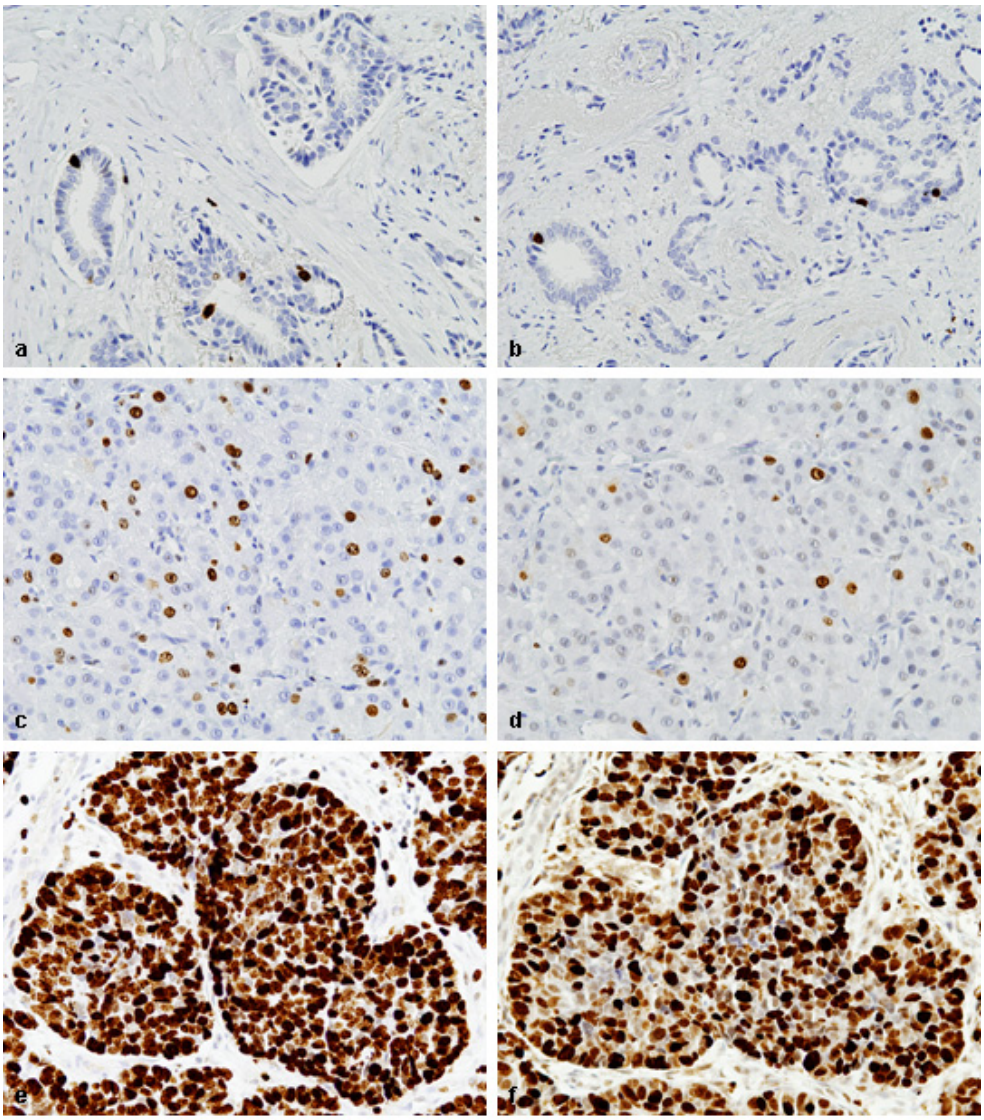


Figura 8. Comparación entre la expresión de Ki67 (izquierda) y TOP2A (derecha). Caso con baja expresión de Ki67 (**a**) y de TOP2A (**b**), ambos del 3%. Caso con expresión intermedia con un 14% de Ki67 (**c**) y un 11% de TOP2A (**d**). Caso con alta expresión, con un 97% de Ki67 (**e**) y un 71% de TOP2A (**f**). Como se observa, la expresión de TOP2A es generalmente inferior a la de Ki67.

IV.4. CORRELACIÓN ENTRE TOP2A DETERMINADA MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA E HIBRIDACIÓN *IN SITU* CROMOGÉNICA (DUOCISH)

Tras el estudio de la expresión proteica de TOP2A nos pareció de interés analizar la correlación con el estado del gen *TOP2A*. La determinación del estado de *TOP2A*, realizado mediante DuoCISH en TMAs sobre los 110 casos consecutivos en los que se analizó la proteína (véase apartado **IV.3**), mostró amplificación en 6 casos (5,5%) (**Tabla 10**).

El análisis estadístico de correlación entre la expresión de la proteína TOP2A y el estado del gen mostró una correlación débil, tanto con respecto a la ratio (R=0,230) (**Fig.9a**), como con respecto al número de copias del gen por célula (R=0,313), pero en ambos casos dicha correlación fue significativa (p=0,015 y p=0,001, respectivamente) (Fig.9B).

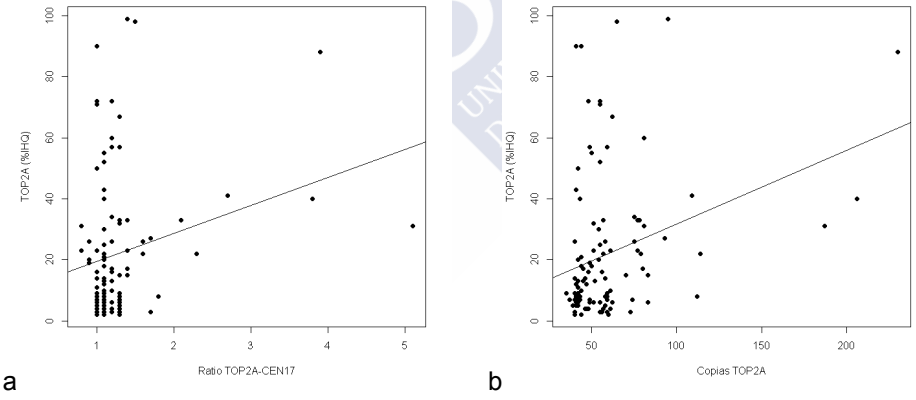


Fig. 9. Gráficos de dispersión entre TOP2A y la ratio *TOP2A*/CEN17 (**a**), y TOP2A y número de copias de *TOP2A* (**b**).

En la **Fig. 10** se muestran casos representativos de la expresión de TOP2A y el estado del gen *TOP2A* mediante DuoCISH, donde se comprueba la correlación entre ambos.

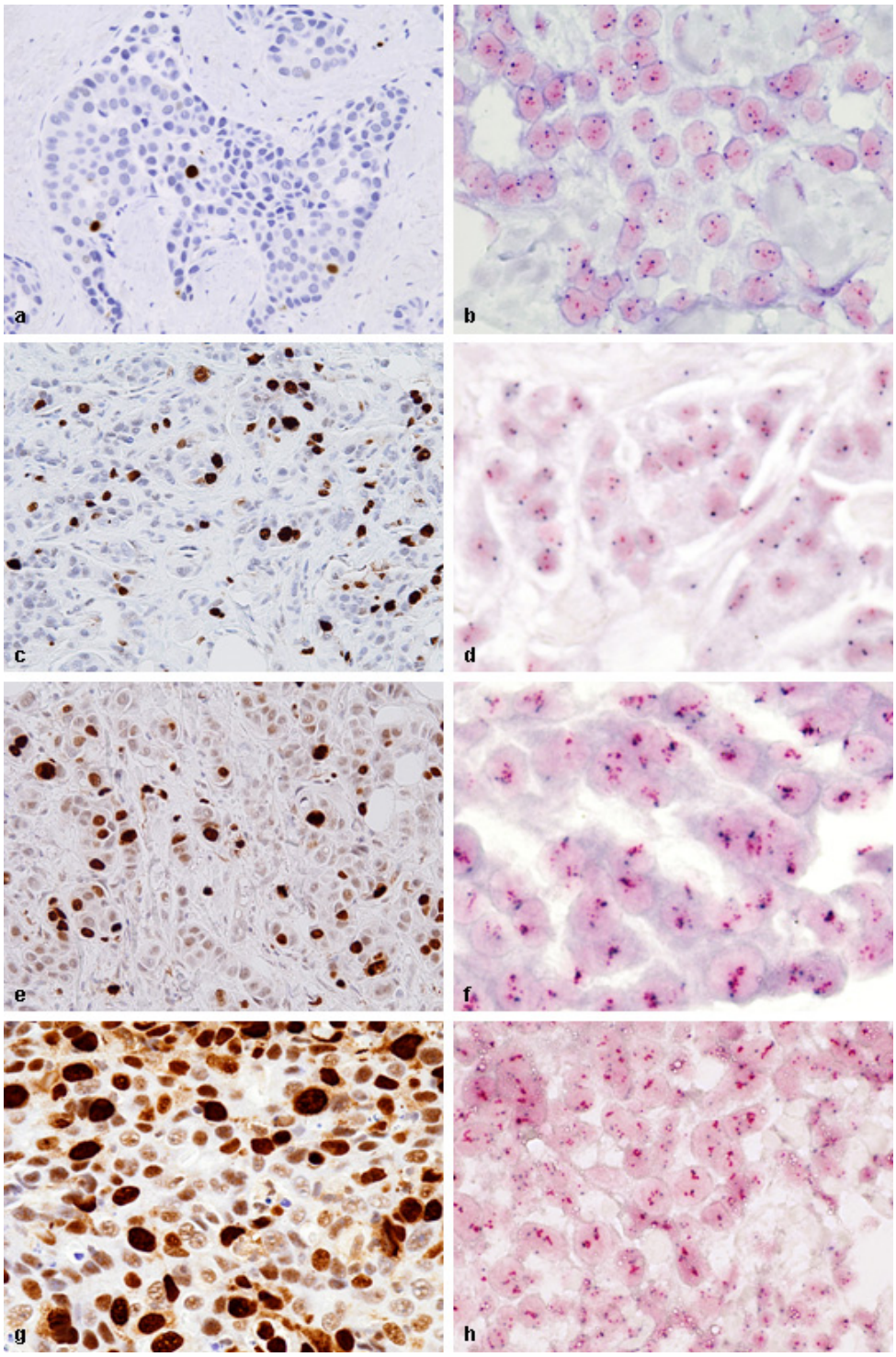
Tabla 10. Distribución de casos comparando la expresión de Ki67 y TOP2A mediante inmunohistoquímica, con el estudio de amplificación de *TOP2A* mediante DuoCISH (**CDI**: Carcinoma ductal infiltrante; **CTI**: Carcinoma tubular infiltrante; **CLI**: Carcinoma lobulillar infiltrante; **CMC**: Carcinoma mucinoso; **CICAS**: Carcinoma infiltrante con células en anillo de sello; **CMPI**: Carcinoma micropapilar infiltrante; **CDLI**: Carcinoma ductolobulillar infiltrante; **CMD**: Carcinoma medular).

Caso	Edad	Tipo Histológico	Grado	Ki67 (%)	TOP2A (%)	DuoCISH				
						Señales		Ratio	*TOP2A* / Núcleo	CEN17 / Núcleo
						TOP2A	CEN17			
1	70	CDI	3	56	33	77	56	1,4	3,9	2,8
2	42	CTI	1	7	8	58	54	1,1	2,9	2,7
3	37	CDI	1	8	8	112	64	1,8	5,6	3,2
4	46	CDI	3	22	22	57	51	1,1	2,9	2,6
5	46	CDI	3	81	50	42	41	1	2,1	2,1
6	46	CDI	2	8	6	49	44	1,1	2,5	2,2
7	40	CDI	2	37	17	45	38	1,2	2,3	1,9
8	61	CDI	2	38	30	54	50	1,1	2,7	2,5
9	52	CDI	2	8	6	41	40	1	2,1	2
10	80	CDI	2	15	14	58	51	1,1	2,9	2,6
11	34	CDI	3	69	52	55	50	1,1	2,8	2,5
12	67	CDI	3	39	90	41	41	1	2,1	2,1
13	84	CDI	2	39	20	42	46	0,9	2,1	2,3
14	64	CDI	1	7	3	73	42	1,7	3,7	2,1
15	76	CLI	2	6	2	40	38	1,1	2	1,9
16	37	CDI	2	35	34	75	61	1,2	3,8	3,1
17	75	CDI	2	45	22	79	49	1,6	4	2,5
18	88	CDI	2	22	14	46	45	1	2,3	2,3
19	60	CDI	3	25	14	40	38	1,1	2	1,9
20	61	CDI	1	7	4	61	49	1,2	3,1	2,5
21	56	CLI	2	12	9	42	41	1	2,1	2,1
22	64	CDI	3	54	41	109	41	2,7	5,5	2,1
23	76	CLI	3	30	22	114	49	2,3	5,7	2,5
24	68	CLI	1	15	6	42	40	1,1	2,1	2
25	68	CDI	2	25	14	40	40	1	2	2
26	67	CDI	2	9	8	59	46	1,3	3	2,3
27	69	CMC	2	8	7	41	40	1	2,1	2
28	59	CLI	2	14	8	42	38	1,1	2,1	1,9
29	74	CDI	3	54	21	44	40	1,1	2,2	2
30	75	CDI	3	73	40	206	54	3,8	10,3	2,7
31	50	CDI	2	20	12	41	38	1,1	2,1	1,9
32	67	CDI	2	16	6	55	51	1,1	2,8	2,6
33	79	CDI	2	8	13	45	38	1,2	2,3	1,9
34	55	CDI	3	99	90	44	43	1	2,2	2,2
35	38	CDI	3	81	40	43	40	1,1	2,2	2

Caso	Edad	Tipo Histológico	Grado	Ki67 (%)	TOP2A (%)	DuoCISH				
						Señales		Ratio	*TOP2A* / Núcleo	CEN17 / Núcleo
						TOP2A	CEN17			
36	58	CDI	2	15	16	48	47	1	2,4	2,4
37	53	CMC	2	12	6	62	51	1,2	3,1	2,6
38	48	CDI	2	6	5	39	38	1	2	1,9
39	49	CDI	1	3	3	40	38	1,1	2	1,9
40	79	CDI	2	8	3	40	40	1	2	2
41	56	CLI	2	12	9	40	38	1,1	2	1,9
42	45	CDI	2	6	7	43	41	1	2,2	2,1
43	45	CDI	2	8	7	49	44	1,1	2,5	2,2
44	77	CDI	3	73	60	81	67	1,2	4,1	3,4
45	83	CDI	3	26	26	75	46	1,6	3,8	2,3
46	52	CDI	1	9	9	59	46	1,3	3	2,3
47	48	CDI	2	8	8	42	41	1	2,1	2,1
48	82	CDI	2	13	7	59	55	1,1	3	2,8
49	60	CDI	3	82	72	48	46	1	2,4	2,3
50	49	CLI	2	16	8	41	37	1,1	2,1	1,9
51	63	CDI	3	47	33	57	43	1,3	2,9	2,2
52	44	CLI	2	54	25	55	50	1,1	2,8	2,5
53	81	CDI	3	31	13	42	40	1,1	2,1	2
54	50	CDI	3	88	67	62	49	1,3	3,1	2,5
55	45	CDI	2	11	6	83	65	1,3	4,2	3,3
56	71	CICAS	2	13	8	41	39	1,1	2,1	2
57	62	CMPI	2	16	5	58	44	1,3	2,9	2,2
58	72	CDI	2	4	4	57	43	1,3	2,9	2,2
59	36	CDI	1	13	6	51	43	1,2	2,6	2,2
60	41	CDI	2	16	7	37	36	1	1,9	1,8
61	57	CDI	1	13	5	41	40	1	2,1	2
62	86	CDI	2	66	43	41	39	1,1	2,1	2
63	68	CDLI	1	9	4	46	47	1	2,3	2,4
64	57	CDI	3	98	98	65	44	1,5	3,3	2,2
65	75	CDI	2	12	7	40	38	1,1	2	1,9
66	70	CDI	2	57	15	70	56	1,3	3,5	2,8
67	67	CDI	2	16	10	61	53	1,2	3,1	2,7
68	64	CLI	3	55	26	58	50	1,2	2,9	2,5
69	63	CDI	3	42	32	51	40	1,3	2,6	2
70	75	CDI	2	17	6	42	39	1,1	2,1	2
71	75	CDI	2	20	10	44	41	1,1	2,2	2,1
72	37	CDI	3	95	99	95	70	1,4	4,8	3,5
73	83	CDI	2	4	2	44	43	1	2,2	2,2
74	47	CDI	3	86	55	50	45	1,1	2,5	2,3
75	72	CDI	2	26	12	47	43	1,1	2,4	2,2
76	44	CDI	3	33	20	54	48	1,1	2,7	2,4

Caso	Edad	Tipo Histológico	Grado	Ki67 (%)	TOP2A (%)	DuoCISH				
						Señales		Ratio	*TOP2A* / Núcleo	CEN17 / Núcleo
						TOP2A	CEN17			
77	48	CDI	3	35	19	49	52	0,9	2,5	2,6
78	73	CDI	3	42	33	78	38	2,1	3,9	1,9
79	67	CDI	2	60	31	81	100	0,8	4,1	5
80	41	CDI	2	34	23	51	67	0,8	2,6	3,4
81	76	CLI	2	13	3	59	59	1	3	3
82	69	CDI	1	10	8	43	39	1,1	2,2	2
83	38	CDI	3	34	18	50	47	1,1	2,5	2,4
84	38	CDI	3	28	23	61	59	1	3,1	3
85	34	CDI	3	86	57	59	45	1,3	3	2,3
86	86	CMC	2	19	13	52	42	1,2	2,6	2,1
87	46	CDI	1	9	5	42	40	1,1	2,1	2
88	46	CDI	2	31	18	44	40	1,1	2,2	2
89	33	CDI	2	6	3	55	44	1,3	2,8	2,2
90	61	CDI	2	17	15	83	58	1,4	4,2	2,9
91	68	CDI	2	11	7	74	57	1,3	3,7	2,9
92	85	CDI	3	14	11	42	41	1	2,1	2,1
93	77	CDI	2	18	16	56	46	1,2	2,8	2,3
94	64	CDI	2	6	6	62	50	1,2	3,1	2,5
95	78	CDI	3	26	27	93	54	1,7	4,7	2,7
96	78	CDI	2	12	4	47	43	1,1	2,4	2,2
97	61	CDI	3	17	18	50	45	1,1	2,5	2,3
98	41	CDI	3	91	88	230	59	3,9	11,5	3
99	58	CDI	3	29	26	40	43	0,9	2	2,2
100	85	CDI	2	20	17	80	59	1,4	4	3
101	55	CDI	1	8	3	56	46	1,2	2,8	2,3
102	67	CDI	3	46	31	187	37	5,1	9,4	1,9
103	87	CDI	2	9	4	48	42	1,1	2,4	2,1
104	81	CDI	3	56	57	49	42	1,2	2,5	2,1
105	69	CDI	3	97	71	55	54	1	2,8	2,7
106	63	CDI	3	35	23	77	55	1,4	3,9	2,8
107	33	CMD	3	76	72	55	46	1,2	2,8	2,3
108	70	CDI	2	7	2	60	48	1,3	3	2,4
109	83	CDI	2	11	4	46	43	1,1	2,3	2,2
110	89	CDI	2	19	9	35	28	1,3	1,8	1,4

Figura 10 (Página siguiente) Correlación entre expresión de TOP2A (izquierda) y estado del gen *TOP2A* mediante DuoCISH (derecha). Caso con baja expresión de TOP2A (3%) (**a**) y que no presenta amplificación en el gen (ratio: 1,7) (**b**). Caso con expresión intermedia de TOP2A (33%) (**c**), que tampoco presenta amplificación en el gen (ratio: 1,3) (**d**). Caso con expresión intermedia de TOP2A (40%) (**e**), pero con amplificación del gen (ratio: 3,8) (**f**). Caso con alta expresión de TOP2A (90%) (**g**) y con amplificación del gen (ratio: 3,9) (**h**).


a
b
c
d
e
f
g
h

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

V. DISCUSIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

V.1. CORRELACIÓN ENTRE *HER2* DETERMINADO MEDIANTE HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH) E HIBRIDACIÓN *IN SITU* CROMOGÉNICA (DUOCISH)

La determinación precisa del estado de HER2 es crucial para la identificación de pacientes con cáncer de mama que puedan beneficiarse del tratamiento anti-HER2 con trastuzumab, lapatinib o pertuzumab (Slamon y cols., 2001; Cameron y cols., 2008; Baselga y cols., 2012; Kümler y cols., 2014) y también porque la respuesta a terapia endocrina parece dependiente del estado de HER2 (De Laurentis y cols., 2005; Rastelli y Crispino, 2008). Para la determinación de la amplificación del gen HER2 la práctica clínica demanda emplear un método cuantitativo, rápido y fiable. Generalmente se considera que el FISH representa el patrón de oro en el estudio del gen HER2 (Bilous y cols., 2003b). Sin embargo, como se expuso en la revisión bibliográfica, esta técnica presenta limitaciones y desventajas, muchas de las cuales pueden solventarse con el uso del CISH.

La principal ventaja del CISH de doble color sobre el FISH está en el empleo de la microscopía de campo claro, eliminando la necesidad de un microscopio de fluorescencia especial (lámpara de 100W) y permitiendo una valoración más sencilla de la morfología tumoral. Esta última característica es de importancia crucial en el diagnóstico de tumores con importante componente intraductal entremezclado con el infiltrante, además de permitir la consulta y discusión de casos así como facilitar la docencia. Entre otras ventajas está la posibilidad de valorar los resultados usando objetivos de 40x y 60x, eliminando el uso de aceite de inmersión que resulta indispensable en la valoración del FISH, y la posibilidad del archivo de preparaciones a largo plazo permitiendo la revisión de resultados y estudios retrospectivos. Asimismo hemos encontrado una reducción significativa en el tiempo necesario para la valoración de los resultados del CISH de doble color en comparación con el FISH (García-Caballero y cols., 2010). Además, la resolución de DuoCISH, aunque no del SISH, permite la cuantificación de señales individuales incluso en casos con alta amplificación, una ventaja importante sobre todo en investigación.

En todas las muestras analizadas (n=106) para la determinación del estado del gen *HER2* mediante FISH y DuoCISH obtuvimos resultados valorables, aunque en ocasiones fue necesario repetir la técnica incrementando o disminuyendo los tiempos de digestión con pepsina en aquellos casos en los que se observaba poca digestión o sobredigestión enzimática respectivamente.

Se demostró amplificación de HER2 mediante DuoCISH en el 19,8% de los casos analizados y mediante FISH en el 20,8%. Estos resultados, que se encuentran en el extremo superior del rango de positividad aceptable (Wolff y cols., 2013), son muy similares a los publicadas previamente por Pauletti y cols. (2000) mediante FISH en una muestra de 900 casos y por García-Caballero y cols. (2006) tras análisis de las determinaciones rutinarias realizadas a más de 500 pacientes empleando IHQ y FISH.

La edad media de las pacientes cuyos tumores mostraron amplificación mediante FISH (58 años) fue ligeramente superior a la de las pacientes con tumores no amplificados (54 años). Sin embargo, el análisis estadístico no mostró asociación entre el estado del gen *HER2* y la edad de las pacientes.

Como era de esperar, sí se obtuvo en cambio correlación con el grado histológico, siendo éste más alto en los casos amplificados, como ya fue previamente descrito en un amplio estudio tras el análisis de 1.536 cánceres de mama en el que observaron que el 97% de los casos 3+ eran de grado 2 o 3 (Bilous y cols., 2003a).

La concordancia entre los resultados obtenidos con FISH y DuoCISH para la valoración del gen *HER2* fue excelente (97%) y muy similar a las concordancias previamente publicadas (Brügmann y cols., 2011; García-Caballero y cols., 2010; Kato y cols., 2010; Mollerup y cols., 2012). Solo obtuvimos discrepancias en 3 de los 106 casos y todos ellos mostraron ratios muy próximas al umbral de positividad.

La concordancia entre CISH de un solo color y FISH fue del 91-100% en diferentes series publicadas (Tanner y cols., 2000; Dandachi y cols., 2002; Arnould y

cols., 2003; Gupta y cols., 2003; Hauser-Kronberger y Dandachi, 2004; Wixom y cols., 2004; Bhargava y cols., 2005a; Hanna y Kwok, 2006; Vocaturo y cols., 2006) y es también muy alta entre CISH, FISH e IHQ (Li-Ning y cols., 2005). Sin embargo, el uso de un solo color en el CISH es limitado y en los casos que el gen *HER2* no está claramente amplificado obliga a realizar una segunda prueba para valorar el cromosoma 17 por la posibilidad de una polisomía, lo que conlleva un mayor coste económico y tiempo en la valoración (García-Caballero y cols., 2010).

La técnica de doble color permite la visualización del gen *HER2* y del cromosoma 17 en la misma preparación (Pedersen y cols., 2009) y es más fácil, más rápida y más adecuada para distinguir la verdadera amplificación génica de la aneuploidía cromosómica (García-Caballero y cols., 2010). En uno de los primeros trabajos sobre este método se estudiaron 40 muestras de cáncer de mama, obteniéndose una concordancia entre DuoCISH y FISH del 91% (Laasko y cols.,2006).

El análisis de correlación mediante gráficos de dispersión de las ratios de *HER2*/CEN17 y del número de copias de *HER2* y de CEN17 obtenidos con DuoCISH y FISH, seguidos de un análisis de regresión lineal, mostraron una alta correlación entre ambos métodos.

El test de Wilcoxon por pares, sin embargo, mostró diferencias significativas para ambas técnicas tanto en las medias de las ratios de *HER2*/CEN17, como de las correspondientes al número de copias de *HER2* y CEN17 por núcleo, resultados similares a los publicados en un trabajo previo (García-Caballero y cols., 2010). Estas diferencias podrían explicarse por una estimación a la baja en DuoCISH del número de copias de *HER2* en los casos amplificados. De hecho, otros autores afirman que el número de copias del gen *HER2* se subestima en áreas de alta amplificación debido al solapamiento de las señales con la formación de grupos (*clusters*) (Hanna y Kwok, 2006). En efecto, posteriormente se demostró que las diferencias entre el número de señales de *HER2* obtenido por FISH y DuoCISH solo se observan en casos con número de señales por núcleo mayor de 2,5 (García-Caballero y cols., 2010).

En la actualidad la IHQ y la HIS son los métodos habitualmente empleados para determinar el estado de HER2 en cáncer de mama. Según las recomendaciones del Comité ASCO/CAP, para HIS puede emplearse tanto el FISH como el CISH, ya que este último método mostró altos niveles de concordancia con el FISH (Wolff y cols., 2013).

Dado que existen métodos de análisis del estado de HER2 (IHQ e HIS) estandarizados y aprobados por la FDA/EMEA, éstos deberían ser aprobados por las administraciones hospitalarias ya que, aunque son más costosos, se compensa el gasto al evitar tratar falsos positivos, y lo que es más importante, se elimina un riesgo cardiotóxico innecesario.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

V.2. CORRELACIÓN ENTRE *TOP2A* DETERMINADA MEDIANTE HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH) E HIBRIDACIÓN *IN SITU* CROMOGÉNICA (DUOCISH)

Se han obtenido resultados cuantificables en todas las muestras estudiadas mediante FISH y DuoCISH (n=100). Hemos observado una concordancia excelente (99%) entre los resultados de FISH y los de DuoCISH en la determinación del estado del gen *TOP2A*, muy similar a las concordancias de estudios previos del estado del gen *HER2* (Brügmann y cols., 2011; García-Caballero y cols., 2010; Kato y cols., 2010; Mollerup y cols., 2012). Con respecto al análisis del estado del gen *TOP2A*, Hoff y cols. (2010) ha mostrado, en un estudio previo de 20 casos, una concordancia del 100% entre FISH y DuoCISH.

También hemos hallado un alto grado de correlación entre FISH y DuoCISH en lo referente a la ratio *TOP2A*/CEN17 y al número de copias por núcleo tanto con respecto a *TOP2A* como al centrómero CEN17. El test de Wilcoxon por pares no mostró diferencias significativas para ambas técnicas entre las ratios de *TOP2A*/CEN17 ni para el número de copias de CEN17 por núcleo. En cambio sí se observaron diferencias significativas en cuanto al número de copias de *TOP2A* por núcleo. Este resultado puede ser explicado por una probable estimación a la baja en el número de señales rojas de *TOP2A* en casos amplificados debido al solapamiento de señales en la formación de grupos densos o *clusters* (Hanna y Kwok, 2006).

En el presente estudio se evidenció amplificación del gen *TOP2A* en el 8,6% de la serie inicial de casos consecutivos. Ésta es exactamente la misma frecuencia hallada por Arriola y cols. (2007), mientras que porcentajes similares (7-10%) han sido publicados por diversos autores (Desmedt y cols., 2011; Fountzilas y cols., 2012b; Moelans y cols., 2010b; Nikolényi y cols., 2011; Press y cols., 2011). En las series del presente estudio, en ningún caso se observó amplificación para *TOP2A* en ausencia de amplificación de *HER2*, lo que concuerda con estudios previos (Hicks y cols., 2005; Arriola y cols., 2007; Desmedt y cols., 2011; Press y cols., 2011; Fountzilas y cols., 2012a). No obstante, algunos autores han encontrado amplificación del gen *TOP2A* en un 2-8,8% de casos con *HER2* no amplificado

(Nielsen y cols., 2008; Bouchalova y cols., 2009; Schindlbeck y cols., 2010; Fountzilas y cols., 2012b). Además, dos estudios han hallado niveles altos de expresión génica de *TOP2A*, usando PCR cuantitativa, en una proporción estadísticamente significativa de casos *HER2* negativo (Glynn y cols., 2011; Zaczek y cols., 2012). Tales discrepancias son difíciles de explicar sin un análisis detallado de la metodología empleada. Sin embargo, los datos del presente estudio, obtenidos de una amplia serie de muestras y analizados utilizando una misma metodología estandarizada, le otorgan mayor peso a la hipótesis de que la amplificación de *TOP2A* está restringida a los tumores con *HER2* amplificado. Cabe destacar que se ha evidenciado heterogeneidad intratumoral con amplificación para *TOP2A* en un 15% de tumores con amplificación de *HER2* (Järvinen y cols., 1999). Debido al uso de TMAs en nuestra metodología, no hemos podido evaluar dicha heterogeneidad en nuestras series.

En cuanto a la coamplificación, hemos evidenciado que el 46,5% de los casos con *HER2* amplificado mostraron amplificación para *TOP2A*, resultado similar al obtenido por Konecny y cols., 2010 (46%). Nuestro resultado concuerda con la mayoría de las series publicadas, en las cuales se encontró coamplificación en un 40-50% de los casos (Järvinen y cols., 1999; Hicks y cols., 2005; Arriola y cols., 2006; Moelans y cols., 2010b; Schindlbeck y cols., 2010; Fountzilas y cols., 2013). Otros autores publicaron porcentajes menores de coamplificación que oscilan entre el 21% y el 37% (Tanner y cols., 2006; Press y cols., 2011; Slamon y cols., 2011; Fountzilas y cols., 2012b).

En nuestra serie de casos coamplificados la media de ratios *HER2*/CEN17 (6,74) fue significativamente superior a la media de ratios *TOP2A*/CEN17 (5,00). Este hallazgo también corrobora resultados previos de otros autores (Hicks y cols., 2005; Nielsen y cols., 2010; Fountzilas y cols., 2013), y podría ser explicado si la amplificación de ambos genes estuviese mediada por mecanismos diferentes, conduciendo a niveles altos de amplificación de *HER2* en comparación con *TOP2A* (Nielsen y cols., 2010).

El valor predictivo de la determinación del estado del gen *TOP2A* para el empleo de terapias basadas en antraciclinas en cáncer de mama es muy controvertido. Inicialmente se realizaron estudios donde la sobreexpresión/amplificación de HER2 era un valor predictivo de susceptibilidad para el tratamiento con terapias basadas en antraciclinas (Muss y cols., 1994; Paik y cols., 1998). Se propuso que la respuesta a antraciclinas necesitaría de la coamplificación de *TOP2A*, gen situado cerca del gen *HER2* en el cromosoma 17. No obstante, es sabido que los genes *HER2* y *TOP2A* no están situados en el mismo amplicón y que cuando *HER2* está amplificado, *TOP2A* puede estar amplificado o delecionado (Järvinen y cols., 1999). Estudios posteriores han demostrado que el mejor factor de predicción de respuesta a regímenes basados en antraciclinas es la coamplificación de *HER2* y *TOP2A* (Coon y cols., 2002; Tanner y cols., 2006; Arriola y cols., 2007; Desmedt y cols., 2011; Press y cols., 2011; Slamon y cols., 2011; Fountzilas y cols., 2012b; Wang y cols., 2012), aunque algunos autores consideran que estos hallazgos no justifican la restricción de los tratamientos con antraciclinas solo a pacientes con coamplificación (Di Leo y cols., 2011). También se ha propuesto la amplificación de *TOP2A* como factor pronóstico favorable en pacientes con cáncer de mama metastásico HER2-positivo tratado con trastuzumab, y que este efecto está asociado a la combinación o a la previa exposición a antraciclinas (Fountzilas y cols., 2012a).

Otros autores proponen la hipótesis de que las alteraciones en el gen *TOP2A* (tanto la amplificación como la deleción) son predictivas de respuesta a antraciclinas (Knoop y cols., 2005; Nielsen y cols., 2008; O'Malley y cols., 2009; Pritchard y cols., 2008). Por el contrario, como hemos dicho anteriormente, se ha asociado la existencia de deleciones en *TOP2A* con resistencia a antraciclinas (Järvinen y cols., 2000; Withoff y cols., 1996), de forma que la asociación entre deleciones y respuesta a antraciclinas sigue siendo controvertida. El uso de diferentes umbrales (0,67-1,0) en la determinación de deleciones en *TOP2A* (Press y cols., 2011) dificulta la comparación entre las diferentes series de datos, y algunos autores consideran inapropiado incluir en un mismo grupo de alteraciones en *TOP2A* tanto las amplificaciones como las deleciones, en las cuales basar predicciones de respuesta biológica a antraciclinas (Oakman y cols., 2009b). De hecho, un estudio reciente con

un amplio número de pacientes no demostró asociación entre las deleciones de *TOP2A* con la remisión de la enfermedad ni con la supervivencia (Press y cols., 2011).

Se ha propuesto que la polisomía del cromosoma 17 era un predictor de respuesta completa tras tratamiento neoadyuvante con quimioterapia basada en antraciclinas (Orlando y cols., 2008), pero un trabajo reciente no confirmó esta relación (Nielsen y cols., 2012a).

Por último, otro estudio reciente mostró que pacientes con tumores con coamplificación de *HER2* y *TOP2A* (aproximadamente el 8% de carcinomas infiltrantes de mama) experimentaron resultados de supervivencia equivalentes, sin tener en cuenta si fueron tratadas con regímenes basados en trastuzumab o antraciclinas (ambos regímenes no pueden ser combinados debido a la considerable toxicidad a largo plazo) (Press y cols., 2011).

V.3. EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE TOP2A E ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN CELULAR (KI67)

Aunque es bien conocida la importancia de la proliferación celular como factor pronóstico en el carcinoma de mama, su empleo en el panel IHC4 para diferenciar los subtipos luminal A y B hizo que el interés por la estandarización de la determinación del índice de proliferación se viese incrementado. Así, se creó un grupo internacional de trabajo que propuso unas recomendaciones para la determinación de Ki67. Destacamos entre las recomendaciones, la propuesta de emplear MIB1 como anticuerpo de elección y, para la selección de áreas a cuantificar, la de realizar un muestreo por toda la preparación tratando de buscar la media entre áreas de menor y mayor *(hot spots)* proliferación. No hubo consenso respecto al punto de corte (Dowsett y cols., 2011).

En un estudio reciente sobre 1.086 cánceres de mama se comprobó que la expresión de Ki67 se puede distribuir de dos maneras: en la mayoría de los casos la positividad de Ki67 se dispone de forma homogénea en el tumor (tipo difuso), mientras que en otros casos la positividad se expresa en el frente invasivo de la tumoración, en la zona de transición entre el tumor y el estroma (tipo *borderline*). Estos casos de positividad borderline se asocian a mayor frecuencia de metástasis a distancia (hueso e hígado) y a menor supervivencia (Gong y cols., 2013).

No existen estudios comparativos sistemáticos acerca de la determinación de Ki67 en TMAs *vs s*ecciones completas, pero parece que los resultados son más bajos empleando TMAs. Hasta que se publiquen los resultados comparativos, no deben utilizarse TMAs para determinaciones de Ki67 con fines de aplicación clínica (Dowsett y cols., 2011). Los autores que valoran el Ki67 en microarrays usan dos muestras de cada tumor y valoran 2-3 zonas incluyendo *hot spots*, pero hacen hincapié en el problema de la fiabilidad debido a la heterogeneidad tumoral (Ono y cols., 2013). En base a esto, y a la recomendación de realizar un muestreo entre las diferentes áreas del tumor, decidimos llevar a cabo el estudio comparativo de la expresión IHQ de TOP2A y Ki67 empleando secciones completas de BAGs, como realizamos en la práctica diaria para todos los marcadores de mama.

La reproducibilidad intra e interlaboratorios en la interpretación del Ki67 se analizó en un estudio cooperativo internacional. Se comprobó que, aunque existía concordancia en los análisis intralaboratorios, había una gran variabilidad interlaboratorios y que los métodos formales de contaje eran más fiables que los de estimación visual. Un programa de entrenamiento mediante imágenes-web permitió mejorar la concordancia interlaboratorios (Nielsen y cols., 2012b). Para la cuantificación de Ki67 y TOP2A empleamos el sistema de análisis de imagen ACIS III, pues consideramos que resulta muy objetivo y práctico, permitiendo muestreos mucho más amplios que la técnica manual. Este sistema ha sido validado para distintos marcadores de cáncer de mama (Slodkowska y cols., 2010; Hanley y cols., 2009). Recientemente se propuso un nuevo método de análisis de imagen denominado AQUA *(automated quantitative analysis)* que utiliza inmunohistoquímica fluorescente con anticuerpo SP6 (FIHC). Se comprobó que con este método se obtiene una alta reproducibilidad, una buena correlación con los resultados de la inmunohistoquímica con contaje manual, y que se mejora significativamente la precisión de la determinación de Ki67 (Murphy y cols., 2012).

Como ya dijimos en la introducción, un nivel elevado de TOP2A se asocia con alta proliferación celular (Wang y cols., 1997; Nitiss, 2009a). Se demostró que los niveles de proteína TOP2A aumentaban exponencialmente en cultivos de células proliferantes durante las fases G0 y G1 (Hsiang y cols., 1988), así como con la inducción de diferenciación celular (Zwelling y cols., 1990). TOP2A puede considerarse como un marcador de proliferación celular (Colozza y cols., 2005; Milde-Langosch y cols., 2013).

En concordancia con el papel jugado por TOP2A en la proliferación celular, en nuestro trabajo observamos correlación entre la expresión proteica de TOP2A y los resultados de Ki67, por lo que TOP2A no parece útil para mejorar la discriminación entre los subtipos inmunohistoquímicos luminal A y B. En 61 pacientes con carcinoma localmente avanzado pertenecientes al ensayo clínico de neoadyuvancia NCT00123929 del Hospital Clínico de San Carlos, se observó no solo una asociación significativa entre la expresión génica de *TOP2A* y el Ki67, sino también entre la positividad IHQ de TOP2A y el Ki67 (Romero y cols., 2011). Recientemente

se confirmó que la expresión IHQ de TOP2A se asociaba a alta expresión de Ki67 (Fountzilas y cols., 2012a). En el ensayo clínico citado se observó también que la amplificación génica de *TOP2A* se asociaba a subtipos moleculares de cáncer de mama con alto nivel de proliferación como luminal B, HER2 y basal, comparados con los subtipos luminal A, mama normal y bajo en claudina (Romero y cols., 2011).

La sobreexpresión de TOP2A se correlaciona con un peor pronóstico (Fritz y cols., 2005) siendo más frecuente en tumores de alto grado, y se correlaciona con otros marcadores de proliferación celular como el Ki67 (Fountzilas y cols., 2012b).

Como era de esperar, también se observó correlación tanto para TOP2A como para Ki67 con el grado histológico. La asociación entre expresión IHQ de TOP2A y los tumores de alto grado es bien conocida (Fountzilas y cols 2012b), al igual que la correlación de Ki67 con grado histológico y grado nuclear del tumor, aunque se observan discordancias en algunos tumores de bajo grado cuando se utiliza el punto de corte de 10%, como por ejemplo el carcinoma papilotubular, el carcinoma ductal infiltrante de predominio intraductal o el carcinoma mucinoso (Ono y cols., 2013).

Respecto a la edad, parece existir una tendencia a una relación inversa entre la expresión de TOP2A y la edad de las pacientes, pero el grado de significación fue ligeramente superior al límite establecido (p=0,051).

Para Ki67 en cáncer de mama se emplearon umbrales muy variables para distinguir entre baja y alta proliferación, con una gama comprendida entre 1% y 28,6% (Urriticoechea y cols., 2005). Sin embargo, los umbrales más comúnmente empleados para dicotomizar los resultados fueron 10% y 20% (Viale y cols., 2008 a y b; Stuart-Harris y cols., 2008; Dowsett y cols., 2011; Ono y cols., 2013). En la actualidad el umbral más utilizado es el 14% (Fountzilas y cols., 2012a y b; Geng y cols., 2013; Chen y cols., 2013), umbral propuesto por Cheang y cols. 2009 para diferenciar los subtipos luminal A y B y aceptado por el Consenso de St. Gallen en 2011 (Goldhirsch y cols., 2011), aunque en el Consenso de 2013 el umbral más votado fue el 20% (Goldhirsch y cols., 2013).

También para la evaluación inmunohistoquímica de TOP2A se han empleado umbrales muy variables, comprendidos entre el 5% (Bhargava y cols., 2005b; Fountzilas y cols., 2012a) y el 45% (Zaczek y cols., 2012). Sin embargo, la mayor parte de los autores proponen como umbral el 10% (Di Leo y cols., 2001; Durbecq y cols., 2004; Chen y cols., 2013), aunque también se ha barajado el 20% (Romero y cols., 2011).

Como ya dijimos, si tomamos el umbral del 14% para Ki67 y aplicamos la fórmula resultante de la recta de regresión lineal (véase IV.3), el umbral para dicotomizar TOP2A sería 8,9, muy próximo al umbral del 10% antes mencionado. Si tomásemos para Ki67 el umbral del 20% propuesto en el último Consenso de St. Gallen, el correspondiente a TOP2A sería 13,7%, que podría redondearse al 15%.

En cuanto al valor pronóstico de TOP2A y Ki67, dos estudios retrospectivos demostraron que la coexistencia de sobreexpresión de TOP2A y de Ki67 alto tiene valor pronóstico negativo, con presencia de metástasis ganglionares, estadío avanzado y disminución de la supervivencia global (Rudolph y cols., 1999; Depowski y cols., 2000).

No hay acuerdo en la bibliografía consultada respecto a la asociación de Ki67 y TOP2A, y la respuesta al tratamiento con antraciclinas. En varios estudios se considera que Ki67, TOP2A, HER1, HER2 y HER3 son marcadores potenciales para el beneficio del tratamiento con antraciclinas (Bartlett y cols., 2008b; Di Leo y cols., 2008), pero en un estudio prospectivo posterior sobre beneficio del tratamiento adyuvante con antraciclinas (NEAT/BR9601) no se observó que estos marcadores tengan valor predictivo (Bartlett y cols., 2010).

V.4. CORRELACIÓN ENTRE TOP2A DETERMINADA MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA E HIBRIDACIÓN *IN SITU* CROMOGÉNICA (DUOCISH)

Los resultados comparativos entre la expresión de la proteína TOP2A y el estado del gen mostraron una correlación débil, tanto con respecto a la ratio como con respecto al número de copias del gen por célula, pero en ambos casos dicha correlación fue significativa.

Aunque en algunos trabajos también se demostró asociación entre sobreexpresión de TOP2A y la amplificación del gen (Moelans y cols., 2010b), la mayor parte de la bibliografía consultada coincide en que, a diferencia del gen *HER2*, el número de copias del gen *TOP2A* no se correlaciona con los niveles de expresión de sus productos (ARNm y proteína) (Coon y cols., 2002; Mueller y cols., 2004; Bhargava y cols., 2005b; Brase y cols., 2010; O'Malley y cols., 2011; Varga y cols., 2012a; Romero y cols., 2011). Esto puede ser debido a la complejidad multifactorial en la vía de traducción de *TOP2A* y en el papel regulador de la transcripción por parte de las señales de proliferación (Oakman y cols., 2009b), pero no debe olvidarse que la dificultad en la determinación de TOP2A (falta de estandarización y anticuerpos muy sensibles a las variaciones de fijación) pueden llevar a resultados dispares.

Se sabe que existe una mayor demanda de proteína TOP2A durante la replicación del ADN y para ello el gen transcribe independientemente de la existencia de copias extra del mismo. Por otro lado, la transcripción de *TOP2A* puede estar subregulada por p53 nativo (Wang y cols., 1997) o sobrerregulada por HMGB1 y HMGB2 (Stros y cols., 2009). Se ha sugerido que la amplificación génica y la sobrexpresión de TOP2A son indicadores de dos procesos biológicos diferentes, y que la expresión del gen/proteína varía significativamente dependiendo del subtipo tumoral y del nivel de proliferación celular. Así se comprobó que los tumores de tipo basal sobrexpresan proteína y/o ARNm, pero no tienen amplificación génica (Romero y cols., 2011).

En un trabajo reciente se demostró que la amplificación de *TOP2A* no estaba asociada al estado de la proteína, ya que la mayoría de los casos positivos para TOP2A (umbral: 5%) no mostraban amplificación y además las puntuaciones de IHQ no diferían entre casos *TOP2A* amplificados y no amplificados. La expresión del ARNm de *TOP2A* tampoco se correlacionaba con la amplificación del gen, pero sí con el estado de la proteína, lo que indica una traducción efectiva del ARNm (Fountzilas y cols., 2012b).

Algunos autores consideran que la determinación de los niveles de proteína TOP2A puede ser más relevante que el estado del gen *TOP2A* para predecir los beneficios del tratamiento con antraciclinas (Oakman y cols., 2009a; Schindlbeck y cols., 2010), debido a que la diana del tratamiento es la proteína TOP2A, no el gen ni el ARNm. Así, se observó correlación entre beneficio del tratamiento con antraciclinas y la expresión proteica de TOP2A, pero no con la amplificación o deleción del gen (Romero y cols., 2011).

Se ha propuesto que la expresión de la proteína TOP2A puede ser de ayuda en la estimación del grado de riesgo en los carcinomas de mama RE positivos (Rody y cols., 2009). Un estudio reciente ha mostrado que niveles bajos de expresión de TOP2A junto a receptores de estrógenos negativos predicen respuesta a doxorubicina, y que niveles altos de proteína TOP2A constituyen un factor predictivo de resistencia a esta droga (Martín y cols., 2011). Este mismo grupo demostró que tanto la expresión de la proteína como la amplificación del gen *TOP2A* se asocia con índice de proliferación alto, tumores de alto grado y subtipos luminal B, HER2 y tipo basal, y no con los tipos luminal A, bajo en claudina y tipo similar a mama normal (Romero y cols., 2011).

Los resultados conflictivos de la cuantificación IHQ de TOP2A encontrados en la bibliografía pueden deberse al uso de diferentes métodos de cuantificación (consideramos que el uso de análisis de imagen es garantía de objetividad en la cuantifiación) y sobre todo al empleo de umbrales de positividad muy variables, como ya hemos comentado, ya que no hay un valor que defina subgrupos asociados a eficacia con el tratamiento (Romero y cols., 2012). La mayoría de los autores

coincide en que se requiere mejorar la determinación IHQ de la proteína TOP2A con el fin de verificar los resultados obtenidos hasta la fecha (Oakman y cols., 2009b; Rody y cols., 2009; Romero y cols., 2012).

La correlación (aunque débil) que obtuvimos entre expresión génica e inmunohistoquímica de TOP2A abre la vía a nuevas investigaciones para confirmar el resultado obtenido empleando mejores anticuerpos y un umbral estandarizado que podría ser del 10 o 15%.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

VI. CONCLUSIONES

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1) Se demostró amplificación de *HER2* mediante DuoCISH en el 19.8% de los carcinomas de mama analizados. La concordancia entre los resultados obtenidos con DuoCISH y FISH fue excelente (97,2%). Por tanto, el CISH de doble color representa una alternativa fiable al FISH, que además permite una valoración más sencilla de la morfología tumoral y una cuantificación más cómoda y rápida.

2) Al igual que para *HER2,* la concordancia entre los resultados de DuoCISH y FISH para *TOP2A* fue excelente (99%). Se obtuvo amplificación del gen *TOP2A* en el 8,6% de los casos estudiados. El 46,5% de los casos con *HER2* amplificado mostraron también amplificación para *TOP2A* y no se observó amplificación para *TOP2A* en ausencia de amplificación de *HER2*. Por ello, se propone limitar los estudios de amplificación de *TOP2A* a los casos *HER2* amplificados.

3) En concordancia con el papel jugado por la TOP2A en la proliferación celular, en nuestro trabajo observamos correlación entre la expresión proteica de TOP2A y los resultados de Ki67, siendo los valores en general ligeramente más bajos para TOP2A. Como era de esperar, también se observó correlación tanto para TOP2A como para Ki67 con el grado histológico.

4) Se obtuvo una correlación débil, pero significativa, entre la expresión de la proteína TOP2A y el estado del gen, tanto con respecto a la ratio como al número de copias del gen por célula. Este resultado abre la vía a nuevas investigaciones empleando mejores anticuerpos y un umbral estandarizado que podría ser del 15%. Se trataría de comprobar si los niveles de proteína TOP2A (diana del tratamiento con antraciclinas) pueden representar un factor predictivo de respuesta al tratamiento.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

VII. BIBLIOGRAFÍA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. Abati AD, Kimmel M, Rosen PP. Apocrine mammary carcinoma. A clinicopathologic study of 72 cases. Am J Clin Pathol 1990; 94:371-7.

2. Adams CW, Allison DE, Flagella K, Presta L, Clarke J, Dybdal N, McKeever K, Sliwkowski MX. Humanization of a recombinant monoclonal antibody to produce a therapeutic HER2 dimerization inhibitor, pertuzumab. Cancer Immunol Immunother 2006; 55:717-27.

3. Agboola AO, Banjo AA, Anunobi CC, Salami B, Agboola MD, Musa AA, Nolan CC, Rakha EA, Ellis IO, Green AR. Cell proliferation (Ki-67) expression Is associated with poorer prognosis in Nigerian compared to British breast cancer women. SRN Oncol 2013; 2013:675051, doi: 10.1155/2013/675051

4. Akhdar A, Bronsard M, Lemieux R, Geha S. HER-2 oncogene amplification assessment in invasive breast cancer by dual-color in situ hybridization (dc-CISH): a comparative study with fluorescent in situ hybridization (FISH). Ann Pathol 2011; 31:472-9.

5. Allison M. The HER2 testing conundrum. Nature Biotech 2010; 28:117-9.

6. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. Mod Pathol 1998; 11:155-68.

7. Allred DC, Miller K, Viale G, Brogi E, Isola J. Invasive breast carcinoma: Introduction and general features: Molecular testing for estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 In: Lakhani SR, Ellis IO, Scnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. eds. WHO Classification of Tumours of the Breast. 4th ed. IARC: Lyon 2012; pp. 67-8.

8. Almendral JM, Sommer D, Macdonald-Bravo H, Burckhardt J, Perera J, Bravo R. Complexity of the early genetic response to growth factors in mouse fibroblasts. Mol Cell Biol 1988; 8:2140-8.

9. Andrulis IL, Bull SB, Blackstein ME, Sutherland D, Mak C, Sidlofsky S, Pritzker KP, Hartwick RW, Hanna W, Lickley L, Wilkinson R, Qizilbash A., Ambus U, Lipa M, Weizel H, Katz A, Baida M, Mariz S, Stoik G, Dacamara P, Strongitharm D, Geddie W, and McCready D. Neu/erbB-2 amplification identifies a poor prognosis group of women with node-negative breast cancer. J Clin Oncol 1998; 16:1340-9.

10. Aranda I. Tipos histológicos del cáncer de mama: problemas diagnósticos. Comunicación oral en: Tercer curso de actualización en patología mamaria. Sevilla 2010; 28-30 junio.

11. Ariga R, Zarif A, Korasick J, Reddy V, Siziopikou K, Gattuso P. Correlation of Her-2/neu gene amplification with other prognostic and predictive factors in female breast carcinoma. Breast J 2005; 11:278-80.

12. Arnould L, Denoux Y, MacGrogan G, Penault-LLorca F, Fiche M, Treilleux I, Mathieu MC, Vincent-Salomon A, Vilain MO. Couturier J. Agreement between chromogenic in situ hybridisation (CISH) and FISH in the determination of HER2 status in breast cancer. Br J Cancer 2003; 88:1587-91.

13. Arriola E, Moreno A, Varela M, Serra JM, Falo C, Benito E, Escobedo AP. Predictive value of HER-2 and Topoisomerase IIalpha in response to primary doxorubicin in breast cancer. Eur J Cancer 2006; 42:2954-60.

14. Arriola E, Rodriguez-Pinilla SM, Lambros MB, Jones RL, James M, Savage K, Smith IE, Dowsett M, Reis-Filho JS. Topoisomerase II alpha amplification may predict benefit from adjuvant anthracyclines in HER2 positive early breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2007; 106:181-9.

15. Artufel MV, Colomer Valero A, Román Lledó R, Erill Sagalés N, Calvo Llorca M, Moreno Carazo A, Cordón Cardó C, Puig Torrus X. Protocolo de estudio molecular del oncogén HER2/neu en el carcinoma de mama. Clin Transl Oncol 2005; 7:504-11.

16. Baak JP. Mitosis counting in tumors. Hum Pathol 1990; 21:683-5.

17. Bai YF, Ren GP, Wang B, Teng LS, Liu X. Comparison between analysis of HER2 gene and chromosome 17 in breast cancer by dual-probe chromogenic in situ hybridization and fluorescence in situ hybridization. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi 2010; 39:161-5.

18. Bartlett JM, Campbell FM, Mallon EA. Determination of HER2 amplification by in situ hybridization. Am J Clin Pathol 2008a; 130:920-6.

19. Bartlett JM, Munro A, Cameron DA, Thomas J, Prescott R, Twelves CJ. Type 1 receptor tyrosine kinase profiles identify patients with enhanced benefit from anthracyclines in the BR9601 adjuvant breast cancer chemotherapy trial. Clin Oncol 2008b; 26:5027-35.

20. Bartlett JM, Path FRC, Campbell FM, Ibrahim M, Wencyk P, Ellis I, Kay E, Connolly Y, O´Grady A, Di Palma S, Starczynski J, Morgan JM, Jasani B, Miller K. A multicenter study comparing silver in situ hybridization with FISH. Am J Clin Pathol 2009; 132:514-20.

21. Bartlett JM, Munro AF, Dunn JA, McConkey C, Jordan S, Twelves CJ, Cameron DA, Thomas J, Campbell FM, Rea DW, Provenzano E, Caldas C, Pharoah P, Hiller L, Earl H, Poole CJ. Predictive markers of anthracycline benefit: a prospectively planned analysis of the UK National Epirubicin Adjuvant Trial (NEAT/BR9601). Lancet Oncol 2010; 113:266-74.

22. Baselga J, Cortés J, Kim SB, Im SA, Hegg R, Im YH, Roman L, Pedrini JL, Pienkowski T, Knott A, Clark E, Benyunes MC, Ross G, Swain SM. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. N Engl J Med 2012; 366:109-19.

23. Bassarova AV, Nesland JM, Sedloev T, Lilleby W, Hristova SL, Trifonov DY, Torlakovic E. Simultaneous bilateral breast carcinomas: a category with frequent coexpression of HER-2 and ER-alpha, high Ki-67 and Bcl-2, and low p53. Int J Surg Pathol 2005; 13:239-46.

24. Bast RC Jr, Ravdi P, Haye DF, Bates S, Fritsche H, Jessup JM, Kemeny N, Locker GY, Mennel RG, Somerfield MR, American Society of Clinical Oncology Tumor Markers Expert Panel. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. J Clin Oncol 2001; 19:1865-78.

25. Benöhr P, Henkel V, Speer R, Vogel U, Sotlar K, Aydeniz B, Reiser A, Neubauer H, Tabiti K, Wallwiener D, Clare SE, Kurek R. Her-2/neu expression in breast cancer-A comparison of different diagnostic methods. Anticancer Res 2005; 25:1895-900.

26. Beral V, Million Women Study Collaborators. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. Lancet 2003; 362:419-27.

27. Beral V, Reeves G, Bull D, Green J, Million Women Study Collaborators. Breast cancer risk in relation to the interval between menopause and starting hormone therapy. J Natl Cancer Inst. 2011; 103:296-305.

28. Bernet L, Martinez Benaclocha M, Castera C, Cano Muñoz R, Sevilla F, Alba J, de Dios Barranco J, Cordoba A, Garcia-Caballero T, Hardisson D, de Francisco Hernández JM, Miguel Lazaro J, Polo L, Riu F, Rezola R, Rojo F, Ruiz I, Hernándiz A, de la Cámara de las Heras JM, Coupe VM. mRNA In Situ Hybridization (HistoSonda): A New Diagnostic Tool for HER2-Status in Breast Cancer. A Multicentric Spanish Study. Diagn Mol Pathol 2012; 21:84-92.

29. Bernet L, Piñero A, Vidal-Sicart S, Peg V, Giménez J, Algara M, Dueñas B, Tresserra F, Cano R, Cordero JM, Navarro B, Torró J, Pardo R, Martinez Ramos D, Moreno Elola A, Vallejos V, Vázquez C, Alvarez Benito M, Raya Povedano JL, Carreira Gómez C, Galobardes Monge J, Iglesias E, Fuster C, Lluch A, Martinez Agulló A. Consenso sobre la biopsia selectiva del ganglio centinela en el cáncer de mama. Revisión 2013 de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria. Rev Esp Patol 2014; 47: 22-32.

30. Bevers TB, Anderson BO, Bonaccio E, Buys S, Daly MB, Dempsey PJ, Farrar WB, Fleming I, Garber JE, Harris RE, Heerdt AS, Helvie M, Huff JG, Khakpour N, Khan SA, Krontiras H, Lyman G, Rafferty E, Shaw S, Smith ML, Tsangaris TN, Williams C, Yankeelov T; National Comprehensive Cancer NCCN clinical practice guidelines in oncology: breast cancer screening and diagnosis. J Natl Compr Canc Netw 2009; 7:1060-96.

31. Bhargava R, Lal P, Chen B. Chromogenic in situ hybridization for the detection of HER2/neu gene amplification in breast cancer with an emphasis on tumors with borderline and low-level amplification. Does it measure up to fluorescence in situ hybridization? Am J Clin Pathol 2005a; 123:237-43.

32. Bhargava R, Lal P, Chen B. HER-2/neu and topoisomerase II alfa gene amplification and protein expression in invasive breast carcinomas. Chromogenic in situ hybridization and immunohistochemical analyses. Am J Clin Pathol 2005b; 123:889-95.

33. Bianco MK, Vasef MA. HER-2 gene amplification in Paget disease of the nipple and extramammary site: A chromogenic in situ hybridization study. Diagn Mol Pathol 2006; 15:131-5.

34. Bilous M, Ades C, Armes J, Bishop J, Brown R, Cooke B, Cummings M, Farshid G, Field A, Morey A, McKenzie P, Raymond W, Robbins P, Tan L. Predicting the HER2 status of breast cancer from basic histopathology data: an analysis of 1500 breast cancer as part of the HER2000 International Study. Breast 2003a; 12:92-8.

35. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, Moreno A, Penault-Llorca F, Rüschoff J, Tomasic G, van de Vijver M. Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines. Mod Pathol 2003b; 16:173-82.

36. Bird BR, Swain SM. Cardiac toxicity in breast cancer survivors: review of potential cardiac problems. Clin Cancer Res 2008; 14:14-24.

37. Bishop JM The molecular genetics of cancer. Science 1987; 235:305-11.

38. Bloom HJG, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer. Br J Cancer 1957; 11:359-73.

39. Boice JD Preston D, Davis FG, Monson RR. Frecuent chest X-ray fluoroscopy and breast cancer incidence among tuberculosis patients in Massachusetts. Radiat Res 1991; 125:214-22.

40. Bouchalova K, Cizkova M, Cwiertka K, Trojanec R, Hajduch M. Triple negative breast cancer--current status and prospective targeted treatment based on HER1 (EGFR), TOP2A and C-MYC gene assessment. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2009; 153:13-7.

41. Brase JC, Schmidt M, Fischbach T, Sültmann H, Bojar H, Koelbl H, Hellwig B, Rahnenführer J, Hengstler JG, Gehrmann MC. ERBB2 and TOP2A in breast cancer: a comprehensive analysis of gene amplification, RNA levels, and protein expression and their influence on prognosis and prediction. Clin Cancer Res 2010; 16:2391-401.

42. Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo Hl. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase delta. Nature 1987; 326:515-7.

43. Brügmann A, Lelkaitis G, Nielsen S, Jensen KG, Jensen V. Testing HER2 in breast cancer: a comparative study on BRISH, FISH, and IHC. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2011; 19:203-11.

44. Bu W, Chen J, Morrison GD, Huang S, Creighton CJ, Huang J, Chamness GC, Hilsenbeck SG, Roop DR, Leavitt AD, Li Y. Keratin 6a marks mammary bipotential progenitor cells that can give rise to a unique tumor model resembling human normal-like breast cancer. Oncogene 2011; 30:4399-409.

45. Burstein HJ, Harris LN, Gelman R, Lester SC, Nunes RA, Kaelin CM, Parker LM, Ellisen LW, Kuter I, Gadd MA, Christian RL, Kennedy PR, Borges VF, Bunnell CA, Younger J, Smith B L, Winer EP. Preoperative therapy with trastuzumab and paclitaxel followed by sequential adjuvant doxorubicin/cyclophosphamide for HER2 overexpressing stage II or III breast cancer: a pilot study. J Clin Oncol 2003; 21:46-53.

46. Bussolati G, Sapino A. Special subtypes: Mucinous carcinoma and carcinoma with signet-ring-cell differentiation. In: Lakhani SR, Ellis IO, Scnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. eds. WHO Classification of Tumours of the Breast. 4th ed. IARC: Lyon 2012; pp. 60-1.

47. Bussolati G, Badve S. Special subtypes: Carcinomas with neuroendocrine features. In: Lakhani SR, Ellis IO, Scnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. eds. WHO Classification of Tumours of the Breast. 4th ed. Lyon: IARC; 2012; pp. 62-3.

48. Cabanes A, Pérez-Gómez B, Aragonés N, Pollán M, Lopez- Abente G, en Capítulo 4. Mortalidad. Vigilancia epidemiológica del cáncer. Monitorización de la situación del cáncer en España. Area de epidemiologia ambiental y cáncer. Centro Nacional de Epidemiologia ISCIII. La situación del cáncer en España 1975-2006, Madrid, 2009.

49. Calle EE, Murphy TK, Rodriguez C, Thun MJ, Heath CW. Occupation and breast cancer mortality in a prospective cohort of US women. Am J Epidemiol 1998; 148:191-7.

50. Cameron D, Casey M, Press M, Lindquist D, Pienkowski T, Romieu CG, Chan S, Jagiello-Gruszfeld A, Kaufman B, Crown J, Chan A, Campone M, Viens P, Davidson N, Gorbounova V, Raats JI, Skarlos D, Newstat B, Roychowdhury D, Paoletti P, Oliva C, Rubin S, Stein S, Geyer CE. A phase III randomized comparison of lapatinib plus capecitabine versus capecitabine alone in women with advanced breast cancer that has progressed on trastuzumab: updated efficacy and biomarker analyses. Breast Cancer Res Treat 2008; 112:533-43.

51. Capella C, Eusebi V, Mann B, Azzopardi JG. Endocrine differentiation in mucoid carcinoma of the breast. Histopathology 1980; 4:613-30.

52. Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, Gerdes J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. J Pathol 1992; 168: 357-63.

53. Chang JC, Hilsenbeck SG, Fuqua SA. The promise of microarrays in the management and treatment of breast cancer. Breast Cancer Res 2005; 7:100-4

54. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO. Ki 67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. J Natl Cancer Inst 2009; 101:736-50.

55. Chen Y-Y, Hwang ES, Roy R, DeVries S, Anderson J, Wa C, Fitzgibbons PL, Jacobs TW, MacGrogan G, Peterse H, Vicent-Salomon A, Tokuyasu T, Schinitt S, Waldman FM. Genetic and phenotypic characteristics of pleomorphic lobular carcinoma in situ of the breast. Am J Surg Pathol 2009; 33:1683-94.

56. Chen S, Huang L, Liu Y, Chen CM, Wu J, Shao ZM. The predictive and prognostic significance of pre- and post-treatment topoisomerase IIα in anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy for local advanced breast cancer. Eur J Surg Oncol 2013; 39:619-26.

57. Chlebowski RT, Hendrix SL, Langer RD, Stefanick ML, Gass M, Lane D, Rodabough RJ, Gilligan MA, Cyr MG, Thomson CA, Khandekar J, Petrovitch H, McTiernan A; WHI Investigators. Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial. JAMA 2003; 289:3243-53.

58. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, Wolter JM, Paton V, Shak S, Lieberman G, Slamon DJ. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. J Clin Oncol 1999; 17:2639-48.

59. Colditz G, Chia KS. Invasive breast carcinoma: introduction and general features. In: Lakhani SR, Ellis IO, Scnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. 4th ed. WHO Classification of Tumours of the Breast. IARC: Lyon 2012, pp. 14-31.

60. Colomer R, Llombart-Cussac A, Lloveras B, Ramos M, Mayordomo JI, Fernández R, Tusquets I, Gil M, Barnadas A, Constenla M, Gilabert M, Alba E. High circulating HER2 extracellular domain levels correlate with reduced efficacy of aromatase inhibitor in hormone receptor-positive metastatic breast cancer: a confirmatory prospective study. Cancer 2007; 110:2178-85.

61. Colozza M, Azambuja E, Cardoso F, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart MJ. Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now? Ann Oncol 2005; 16:1723-39.

62. Coon JS, Marcus E, Gupta-Burt S, Seelig S, Jacobson K, Chen S, Renta V, Fronda G, Preisler HD. Amplification and overexpression of topoisomerase II alpha predict response to anthracycline-based therapy in locally advanced breast cancer. Clin Cancer Res 2002; 8:1061-7.

63. Cuzick J, Dowsett M, Pineda S, Wale C, Salter J, Quinn E, Zabaglo L, Mallon E, Green AR, Ellis IO, Howell A, Buzdar AU, Forbes JF. Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67, and human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the Genomic Health recurrence score in early breast cancer. J Clin Oncol 2011; 29:4273-8.

64. Dai Q, Shu XO, Li H, Yang G, Shrubsole MJ, Cai H, Ji B, Wen W, Franke A, Gao YT, Zheng W. Is green tea drinking associated with a later onset of breast cancer? Ann Epidemiol 2010; 1:74-81.

65. Damiani S, Eusebi V, Losi L, D'Adda T, Rosai J. Oncocytic carcinoma (malignant oncocytoma) of the breast. Am J Surg Pathol 1998; 22:221-30.

66. Dandachi N, Dietze O, Hauser-Kronberger C. Chromogenic in situ hybridization: a novel approach to a practical and sensitive method for the detection of HER2 oncogen in archival human breast carcinoma. Lab Invest 2002; 82:1007-14.

67. Dandachi N, Dietze O, Hauser-Kronberger C. Evaluation of the clinical significance of HER2 amplification by chromogenic in situ hybridisation in patients with primary breast cancer. Anticancer Res 2004; 24:2401-6.

68. Davis DL, Bradlow HL, Wolff M, Woodruff T, Hoel DG, Anton-Culver H. Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. Environ Health Perspect 1993; 101:372-7.

69. Davis S, Mirick DK, Stevens RG. Night shift work, light at night, and risk of breast cancer. J Natl Cancer Inst 2001; 93:1557-62.

70. De Azambuja E, Cardoso F, de Castro G Jr, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart-Gebhart MJ, Paesmans M. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. Br J Cancer 2007; 96:1504-13.

71. De Laurentis M, Arpino G, Masarelli E. A meta-analysis on the interaction between HER2 expression and response to endocrine treatment in advanced breast cancer. Clin Cancer Res 2005; 11:4741-8.

72. De Potter CR, Schelfhout AM, Verbeeck P, Lakhani SR, Brünken R, Schroeter CA, Van den Tweel JG, Schauer AJ, Sloane JP. neu overexpression correlates with extent of disease in large cell ductal carcinoma in situ of the breast. Hum Pathol 1995; 26:601-6.

73. Dean PN, Dolbeare F, Gratzner H, Rice GC, Gray JW. Cell cycle analysis using a monoclonal antibody to BrdUrd. Cell Tissue Kinet 1984; 17:427-36.

74. Depowski PL, Rosenthal SI, Brien TP, Stylos S, Johnson RL, Ross JS. Topoisomerase II alpha expression in breast cancer: correlation with outcome variables. Mod Pathol 2000; 13:542-7.

75. D´Eredita G, Giardina C, Martellota M. Prognostic factors in breast cancer the predictive value of the Nottingham Prognostic Index in patients with a long term follow-up that were treated in a single institution. Eur J Cancer 2001; 37:591-6.

76. Desmedt C, Di Leo A, de Azambuja E, Larsimont D, Haibe-Kains B, Selleslags J, Delaloge S, Duhem C, Kains JP, Carly B, Maerevoet M, Vindevoghel A, Rouas G, Lallemand F, Durbecq V, Cardoso F, Salgado R, Rovere R, Bontempi G, Michiels S, Buyse M, Nogaret JM, Qi Y, Symmans F, Pusztai L, D'Hondt V, Piccart-Gebhart M, Sotiriou C. Multifactorial approach to predicting resistance to anthracyclines. J Clin Oncol 2011; 29:1578-86.

77. Dhingra K, Sahin A, Supak J, Kim SY, Hortobagyi G, Hittelman W. Chromosome in situ hybridization on formalin-fixed mammary tissue using non-isotopic, non-fluorescent probes: technical considerations and biological implications. Breast Cancer Res Treat 1992; 23:201-10.

78. Diab SG, Clark GM, Osborne CK, Libby A, Allred DC, Elledge RM. Tumor characteristics and clinical outcome of tubular and mucinous breast carcinomas. J Clin Oncol 1999; 17:1442-48.

79. Dietel M, Ellis IO, Höfler H, Kreipe H, Moch H, Dankof A, Kölble K, Kristiansen G. Comparison of automated silver enhanced in situ hybridisation (SISH) and fluorescence ISH (FISH) for the validation of HER2 gene status in breast carcinoma according to the guidelines of the American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists. Virchows Arch 2007; 451:19-25.

80. Di Leo A, Larsimont D, Gancberg D, Jarvinen T, Beauduin M, Vindevoghel A, Michel J, Focan CH, Ries F, Gobert PH, Closon-Dejardin MT, Dolci S, Rouas G, Paesmans M, Lobelle JP, Isola J, Piccart MJ. HER-2 and topo-isomerase IIalpha as predictive markers in a population of node-positive breast cancer patients randomly treated with adjuvant CMF or epirubicin plus cyclophosphamide. Ann Oncol 2001; 12:1081-9.

81. Di Leo A, Gancberg D, Larsimont D, Tanner M, Jarvinen T, Rouas G, Dolci S, Leroy JY, Paesmans M, Isola J, Piccart MJ. HER-2 amplification and topoisomerase IIalpha gene aberrations as predictive markers in node-positive breast cancer patients randomly treated either with an anthracycline-based therapy or with cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil. Clin Cancer Res 2002; 8:1107-16.

82. Di Leo A, Biganzoli L, Claudino W, Licitra S, Pestrin M, Larsimont D. Topoisomerase II alpha as a marker predicting anthracyclines' activity in early breast cancer patients: ready for the primetime? Eur J Cancer 2008; 44:2791-8.

83. Di Leo A, Desmedt C, Bartlett JM, Piette F, Ejlertsen B, Pritchard KI, Larsimont D, Poole C, Isola J, Earl H, Mouridsen H, O'Malley FP, Cardoso F, Tanner M, Munro A, Twelves CJ, Sotiriou C, Shepherd L, Cameron D, Piccart MJ, Buyse M, HER2/TOP2A Meta-analysis Study Group. HER2 and TOP2A as predictive markers for anthracycline-containing chemotherapy regimens as adjuvant treatment of breast cancer: a meta-analysis of individual patient data. Lancet Oncol 2011; 12:1134-42.

84. Dirección Xeral de Saúde Pública. Servicio de información sobre saúde pública. Mortalidade en Galicia. Santiago de Compostela: Consellería de Sanidade. Documento interno. Santiago de Compostela, 2005

85. Dirección Xeral de Saude Pública. Programa galego de detección precoz do cancro de mama. Santiago de Compostela: Consellería de Sanidade e Servicios Sociais; Resultados 1992-2006. Santiago de Compostela, 2006.

86. Donner P, Greiser-Wilke I, Moelling K. Nuclear localization and DNA binding of the transforming gene product of avian myelocytomatosis virus. Nature 1982; 296: 262-9.

87. Downs-Kelly E, Pettay J, Hicks D, Skacel M, Yoder B, Rybicki L, Myles J, Sreenan J, Roche P, Powell R, Hainfeld J, Grogan T, Tubbs R. Analytical validation and interobserver reproductibility of EnzMet GenePro: a second-generation bright-field metallography assay for concomitant detection of HER2 gene status and protein expression in invasive carcinoma of the breast. Am J Surg Pathol 2005; 29:1505-11.

88. Downward J, Yarden Y, Mayes E, Scrace G, Totty N, Stockwell P, Ullrich A, Schlessinger J, Waterfield MD. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. Nature 1984; 307:521-7.

89. Dowsett M. Efforts to link biological and clinical breast cancer research. Breast 2003; 12:442-6.

90. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, Ellis M, Henry NL, Hugh JC, Lively T, McShane L, Paik S, Penault-Llorca F, Prudkin L, Regan M, Salter J, Sotiriou C, Smith IE, Viale G, Zujewski JA, Hayes DF; International Ki-67 in Breast Cancer Working Group Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. J Natl Cancer Inst 2011; 103:1656-64.

91. Duchrow M, Gerdes J, Schlüter C. The proliferation associated ki-67 protein: definition in molecular terms. Cell Prolif 1994; 27:235-42.

92. Durbecq V, Desmed C, Paesmans M, Cardoso F, Di Leo A, Mano M, Rouas G, Leroy JY, Sotiriou C, Piccart M, Larsimont D. Correlation between topoisomerase-IIalpha gene amplification and protein expression in HER-2 amplified breast cancer. Int J Oncol 2004; 25:1473-9.

93. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Peto R, Davies C, Godwin J, Gray R, Pan HC, Clarke M, Cutter D, Darby S, McGale P, Taylor C, Wang YC, Bergh J, Di Leo A, Albain K, Swain S, Piccart M, Pritchard K. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. Lancet 2012; 379:432-44.

94. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti III A. Breast. In: AJCC Cancer Staging Manual, 7th ed, Chicago, IL, 2010; pp.345-76.

95. Ellis PS, Whitehead R. Mitosis counting: a need for reappraisal. Hum Pathol 1981; 12: 3-4.

96. Ellis IO, Dowsett M, Bartlett J, Walker R, Cooke T, Gullick W, Gusterson B, Mallon E, Barret Lee P. Recommendations for HER2 testing in the UK. J Clin Pathol 2000; 53:890-92.

97. Ellis JM, Coop A, Singh B, Mauriac L, Llombert-Cussac A, Jänicke F, Miller WR, Evans DB, Dugan M, Brady C, Quebe-Fehling E, Borgs M. Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for erbB-1/and/or erbB-2-positive, estrogen receptor-positive primary breast cancer: evidence from a phase III randomized trial. J Clin Oncol 2001; 18:3808-16.

98. Ellis CM, Dyson MJ, Stephenson TJ, Maltby EL. HER2 amplification status in breast cancer: a comparison between immunohistochemical staining and fluorescence in situ hybridisation using manual and automated quantitative image analysis scoring techniques. J Clin Pathol 2005;58:710-4.

99. Ellis IO, Collins L, Ichihara S, MacGrogan G. Invasive carcinoma of no special type. In: Lakhani SR, Ellis IO, Scnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. eds. WHO Classification of Tumours of the Breast. 4th ed. IARC: Lyon 2012, pp. 34-8.

100. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. Histopathology 1991; 19:403-10.

101. Erdogan S, Ergin M, Tuncer I Comparison of differential PCR and immunohistochemistry for the evaluation of c-erbB-2 in breast carcinoma and relationship to other prognostic factors. Neoplasma 2003; 50:326-30.

102. Esposito NN, Chivukula M, Dabbs DJ. The ductal phenotypic expression of the E-cadherin/catenin complex in tubulolobular carcinoma of the breast: an immunohistochemical and clinicopathologic study. Mod Pathol 2007; 20:130-8.

103. Eusebi V, Ichihara S, Vicent-Salomon A, Sneige N, Sapino A. Special subtypes: Exceptionally rare types and variants. In: Lakhani SR, Ellis IO, Scnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. eds. WHO Classification of Tumours of the Breast. 4th ed. IARC: Lyon 2012; pp. 71-6.

104. Fanale MA, Uvei AR, Theriault RL, Adam K, Thompson RA. Treatment of metastatic breast cancer with trastuzumab and vinorelbine during pregnancy. Clin Breast Cancer 2005; 6:354-6.

105. Fehm T, Solomayer E, Duerr-Stoerzer S, Sotlar K, Mueller V, Wallwiener D, Lane N, Becker S, Uhr J. Determination of HER2 status using both serum HER2 levels and circulating tumor cells in patients with recurrent breast cancer whose primary tumor was HER2 negative or of unknown HER2 status. Breast Cancer Res 2007; 9:R74.

106. Fisher B, Dignam J, Tan-Chiu E, Andersen S, Fisher ER, Wittliff JL, Wolmark N. Prognosis and treatment of patients with breast tumors of one centimeter or less and negative axillary lymph nodes. J Natl Cancer Inst 2001; 93:112-20.

107. Fisher ER, Palekar AS, Redmond C, Barton B, Fisher B. Pathological findings from the national surgical adjuvant breast projet (protocol no. 4). VI. Invasive papillary cancer. Am J Clin Pathol 1980a; 73:313-22.

108. Fisher ER, Redmond C, Fisher B. Histologic grading of breast cancer. Pathol Ann 1980b; 15:239-51.

109. Fitzgibbons P, Page D, Weaver D, Thor A, Allred D, Clark G, Ruby S, O´Malley F, Simpson J, Connolly J, Hayes D, Edge S, Lichter A, Schnitt S. Prognostic factors in breast cancer. College of American pathologist consensus statement 1999. Arch Pathol Lab Med 2000; 124: 966-78

110. Fountzilas G, Christodoulou C, Bobos M, Koutoula V, Eleftheraki AG, Xanthakis I, Batistatou A, Pentheroudakis G, Xiros N, Papaspirou I, Koumarianou A, Papakostas P, Bafaloukos D, Skarlos DV, Kalogeras KT. Topoisomerase II alpha gene amplification is a favorable prognostic factor in patients with HER2 positive metastatic breast cancer treated with Trastuzumab. J Transl Med 2012a; 10:212. doi: 10.1186/1479-5876-10-212.

111. Fountzilas G, Valavanis C, Kotoula V, Eleftheraki AG, Wirtz K, Bobos M, Timotheadou E, Soupos N, Pentheroudakis G, Aravantinos H, Koutras A, Christodoulou C, Pectasides D. HER2 and TOP2A in high-risk early breast cáncer patients treated with sequential chemotherapy. J Transl Med 2012b; 10:10. doi: 10.1186/1479-5876-10-10.

112. Fountzilas G, Dafni U, Bobos M, Kotoula V, Batistatou A, Xanthakis I, Papadimitriou C, Kostopoulos I, Koletsa T, Tsolaki E, Televantou D, Timotheadou E, Koutras A, Klouvas G, Samantas E, Pisanidis N, Karanikiotis C, Sfakianaki I, Pavlidis N, Gogas H, Linardou H, Kalogeras KT, Pectasides D, Dimopoulos MA. Evaluation of the prognostic role of centromere 17 gain and HER2/topoisomerase II alpha gene status and protein expression in patients with breast cancer treated with anthracycline-containing adjuvant chemotherapy: pooled analysis of two Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG) phase III trials. BMC Cancer 2013; 13:163. doi: 10.1186/1471-2407-13-163.

113. Franchet C, Filleron T, Cayre A, Mounié E, Penault-Llorca F, Jacquemier J, Macgrogan G, Arnould L, Lacroix-Triki M. Instant-quality fluorescence in-situ hybridization as a new tool for HER2 testing in breast cancer: a comparative study. Histopathology 2014; 64:274-83.

114. Francis GD, Jones MA, Beadle GF, Stein SR. Bright-field in situ hybridization for HER2 gene amplification in breast cancer using tissue microarrays: correlation between chromogenic (CISH) and automated silver-enhanced (SISH) methods with patient outcome. Diagn Mol Pathol 2009; 18:88-95.

115. Fritz P, Cabrera CM, Dippon J, Gerteis A, Simon W, Aulitzky WE, van der Kuip H. c-ErbB2 and topoisomerase II alpha protein expression independently predict poor survival in primary human breast cancer: a retrospective study. Breast Cancer Res 2005; 7:R374-84.

116. Frolik D, Caduff R, Varga Z. Pleomorphic lobular carcinoma of the breast: its cell kinetics, expression of oncogenes and tumour suppressor genes compared with invasive ductal carcinomas and classical infiltrating lobular carcinomas. Histopathology 2001; 39:503-13.

117. Gago Hermida MD. Proliferación celular en la Enfermedad de Hodgkin: Cuantificación y evaluación pronóstica. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago. Facultad de Medicina. 1997; pp.24-29.

118. Gancberg D, Lespagnard L, Rouas G, Paesmans M, Piccart M, Di Leo A, Nogaret J M, Hertens D, Verhest A, Larsimont D. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples of invasive breast cancer. Am J Clin Pathol 2000; 113:675-82.

119. García RL, Coltrera MD, Gown AM. Analysis of proliferative grade using anti. PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues: comparison with flow cytometric analysis. Am J Pathol 1989: 134:733-9.

120. García-Caballero T, Menéndez MD, Vázquez-Boquete A, Gallego R, Forteza J, Fraga M. HER-2 status determination in breast carcinomas. A practical approach. Histol Histopathology 2006; 21:227-36.

121. García-Caballero T, Grabau D, Green AR, Gregory J, Schad A, Kohlwes E, Ellis IO, Watts S, Mollerup J. Determination of HER2 amplification in primary breast cancer using dual-colour chromogenic in situ hybridization: a European multicentre study involving 168 specimens. Histopathology 2010; 56:472-80.

122. García-Caballero T, Prieto O, Vázquez-Boquete A, Gude F, Viaño P, Otero M, Curiel T, Fernández-Rodríguez B, Parrado C, Fraga M, Antúnez JR. Dual-colour CISH is a reliable alternative to FISH for assessment of topoisomerase 2-alpha amplification in breast carcinomas. Breast Cancer Res Treat 2014; 143:81-9.

123. Geng WW, Zhang B, Li DH, Liang XR, Cao XC. [Analysis of correlation between breast cancer molecular subtypes and prognosis of patients receiving breast-conserving therapy]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi 2013; 93:1571-3.

124. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated wih cell proliferation. Int J Cancer 1983; 31:13-20.

125. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. J Immunol 1984; 133:1710-5.

126. Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki 67. Am J Pathol 1991; 138:867-73.

127. Giuliano AE, McCall L, Beitsch P, Whitworth PW, Blumencranz P, Leitch M, Saha S, Hunt KK, Morrow M, Ballman K. Locoregional recurrence after sentinel lymph node dissection with or without axillary dissection in patients with sentinel lymph node metastases. The American College of Surgeons Oncology Group Z0011 Randomized Trial. Ann Surg 2010; 252:426-33.

128. Glynn RW, Miller N, Whelan MC, Kerin MJ. Topoisomerase 2 alpha and the case for individualized breast cancer therapy. Ann Surg Oncol 2010; 17:1392-7.

129. Glynn RW, Mahon S, Curran C, Callagy G, Miller N, Kerin MJ. TOP2A amplification in the absence of that of HER-2/neu: toward individualization of chemotherapeutic practice in breast cancer. Oncologist 2011; 16:949-55.

130. Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ. Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. J Clin Oncol 2003; 21:3357-65.

131. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. Ann Oncol 2011; 22:1736-47.

132. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B & Senn HJ Panel members. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. Ann Oncolo 2013; 24:2206–23.

133. Gong Y, Gilcrease M, Sneige N. Reliability of chromogenic in situ hybridization for detecting HER2 gene status in breast cancer: comparison with fluorescence in situ hybridization and assessment of interobserver reproducibility. Mod Pathol 2005; 18:1015-21.

134. Gong Y, Sweet W, Duh Y, Greenfield L, Fang Y, Zhao J, Tarco E, Symmans F, Isola J, Sneige N. Chromogenic in situ hybridization is a reliable method for detecting HER2 gene status in breast cancer. Am J Clin Pathol 2009a; 131:490-7.

135. Gong Y, Sweet W, Duh Y, Greenfield L, Tarco E, Trivedi S, Symmans F, Isola J, Sneige N. Performance of chromogenic in situ hybridization on testing HER2 status in breast carcinomas with chromosome 17 polysomy and equivocal (2+) Herceptest results. Am J Clin Pathol 2009b; 132:228-36.

136. Gong P, Wang Y, Liu G, Zhang J, Wang Z. New insight into Ki67 expression at the invasive front in breast cancer. PLOS One 2013; 8:54912. doi: 10.1371/journal.pone.0054912.

137. Goodpasture C, Bloom SE. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. Chromosoma 1975; 53:37-50.

138. Gown AM, Goldstein LC, Barry TS, Kussick SJ, Kandalaft PL, Kim PM, Tse CC. High concordance between immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization testing for HER2 status in breast cancer requires a normalized IHC scoring system. Mod Pathol 2008; 21:1271-7.

139. Gratzner HG. Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. Science 1982; 218:474-5.

140. Greenberg ME, Ziff EB. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. Nature 1984; 311:433-8.

141. Gupta D, Middleton LP, Whitaker MJ, Abrams J. Comparison of fluorescence and chromogenic in situ hybridization for detection of HER-2/neu oncogene in breast cancer. Am J Clin Pathol 2003; 119:381-7.

142. Habeshaw JA, Lister TA, Stansfeld AG, Greaves MF. Correlation of transferrin receptor expression with histological class and outcome in non-Hodgkin lymphoma. Lancet 1983; 1:498-501.

143. Hall PA, McKee PH, Menage HD, Dover R, Lane DP. High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin. Oncogene 1993; 8:203-7.

144. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Mangu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FCG, Taube S, Torlakovic EE, Paul Valenstein, Viale G, Visscher GD, Wheeler T, Williams RC, Wittliff JL, Wolff AC. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. Arch Pathol Lab Med 2010; 134:48-72.

145. Hanby AM, Hughes TA. In situ and invasive lobular neoplasia of the breast. Histopathology 2008; 52:58-66.

146. Hanley KZ, Siddiqui MT, Lawson D, Cohen C, Nassar A Evaluation of new monoclonal antibodies in detection of estrogen receptor, progesterone receptor, and Her2 protein expression in breast carcinoma cell block sections using conventional microscopy and quantitative image analysis. Diagn Cytopathol 2009; 37:251-7.

147. Hanna WM, Kwok K. Chromogenic in-situ hybridization: a viable alternative to fluorescence in-situ hybridization in the HER2 testing algorithm. Mod Pathol 2006; 19:481-7.

148. Harbeck N, Sotlar K, Wuerstlein R, Doisneau-Sixou S Molecular and protein markers for clinical decision making in breast cancer: Today and tomorrow. Cancer Treat Rev 2014; 40:434-44.

149. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. J Clin Oncol 1999; 17:1474-81.

150. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC Jr; American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. J Clin Oncol 2007; 25:5287-312.

151. Harris M, Wells S, Vasudev KS. Primary signet ring cell carcinoma of the breast. Histopathology 1978; 2:171-6.

152. Hauser-Kronberger C, Dandachi N. Comparison of chromogenic in situ hybridization with other methodologies for HER2 status assessment in breast cancer. J Mol Histol 2004; 35:647-53.

153. Hauser-Kronberger C, Peham K, Grall J, Rausch G, Hutarew G, Diezte O. Novel approach of human epidermal growth factor receptor 2 detection in non-invasive and invasive transitional cell carcinoma of the bladder. J Urol 2006; 175:875-80.

154. Hayes MM, Seidman JD, Ashton MA. Glycogen-rich clear cell carcinoma of the breast. A clinicopathologic study of 21 cases. Am J Surg Pathol 1995; 19:904-11.

155. Hayes DF and Thor AD. c-erb-B-2 in breast cancer: development of a clinically useful marker. Semin Oncol 2002; 29:231-45.

156. Heinmöller P, Gross C, Beyser K, Schmidtgen C, Maass G, Pedrochi M, Rüschoff J. HER2 status in non-small cell lung cancer: results from patient screening for enrollment to a phase II study of Herceptin. Clin Cancer Res 2003; 9:5238-43.

157. Helzlsouer KJ, Alberg AJ, Bush TL, Longcope C, Gordon GB, Comstock GW. A prospective study of endogenous hormones and breast cancer. Cancer Detect Prev 1994; 18:79-85.

158. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, Rasmussen KE, Jones LP, Assefnia S, Chandrasekharan S, Backlund MG, Yin Y, Khramtsov AI, Bastein R, Quackenbush J, Glazer RI, Brown PH, Green JE, Kopelovich L, Furth PA, Palazzo JP, Olopade OI, Bernard PS, Churchill GA, Van Dyke T, Perou CM. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. Genome Biol 2007; 8:R76. doi: 10.1186/gb-2007-8-5-r76.

159. Herschkowitz JI, Zhao W, Zhang M, Usary J, Murrow G, Edwards D, Knezevic J, Greene SB, Darr D, Troester MA, Hilsenbeck SG, Medina D, Perou CM, Rosen JM. Comparative oncogenomics identifies breast tumors enriched in functional tumor-initiating cells. Proc Natl Acad Sci USA 2012; 109:2778-83.

160. Hicks DG, Yoder BJ, Pettay J, Swain E, Tarr S, Hartke M, Skacel M, Crowe JP, Budd GT, Tubbs RR. The incidence of topoisomerase II-alpha genomic alterations in adenocarcinoma of the breast and their relationship to human epidermal growth factor receptor-2 gene amplification: a fluorescence in situ hybridization study. Hum Pathol 2005; 36:348-56.

161. Hicks DG, Tubbs RR. Assessment of the HER2 status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization: a technical review with interpretative guidelines. Hum Pathol 2005; 36:250-61.

162. Hsiang YH, Wu HY, Liu LF. Proliferation-dependent regulation of DNA topoisomerase II in cultured human cells. Cancer Res 1988; 48:3230-5.

163. Hoang MP, Sahin AA, Ordoñez NG, Sneige N. HER-2 gene amplification compared with HER-2 protein overexpression and interobserver reproducibility in invasive breast carcinoma. Am J Clin Pathol 2000; 113:852-9.

164. Hoff ER, Tubbs RR, Myles JL, Procop GW. HER2/neu amplification in breast cancer. Stratification by tumor type and grade. Am J Clin Pathol 2002; 117:916-21.

165. Hoff K, Jorgensen JT, Müller S, Rongaard E, Rasmussen O, Schonau A. Visualization of FISH probes by dual-color chromogenic in situ hybridization. Am J Clin Pathol 2010; 133:205-11.

166. Hofmann M, Stoss O, Gaiser T, Kneitz H, Heinmöller P, Gutjahr T, Kaufmann M, Henkel T, Rüschoff J. Central HER2 IHC and FISH analysis in a trastuzumab (Herceptin) phase II monotherapy study: assessment of test sensitivity and impact of chromosome 17 polysomy. J Clin Pathol 2008a; 61:89-94.

167. Hofmann M, Stoss O, Shi D, Büttner R, van de Vijver M, Kim W, Ochiai A, Rüschoff J, Henkel T. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. Histopathology 2008b; 52:797-805.

168. Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. Exp Cell Res 2003; 284:99-110.

169. Honma N, Sakamoto G, Ikenaga M, Kuroiwa K, Younes M, Takubo K. Mucinous cystadenocarcinoma of the breast: a case report and review of the literature. Arch Pathol Lab Med 2003; 127:1031-3.

170. Honrado E, Benítez J, Palacios J. The molecular pathology of hereditary breast cancer: genetic testing and therapeutic implications. Mod Pathol 2005; 18:1305-20.

171. Hsieh WT, Huang KY, Lin HY, Chung JG. Physalis angulata induced G2/M phase arrest in human breast cancer cells. Food Chem Toxicol 2006; 44:974-83.

172. Hwang CC, Pintye M, Chang LC, Chen HY, Yeh KY, Chein HP, Lee N, Chen JR Dual-colour chromogenic in-situ hybridization is a potential alternative to fluorescence in-situ hybridization in HER2 testing. Histopathology. 2011; 59:984-92.

173. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Combined estrogen-progestogen contraceptives and combined estrogen-progestogen menopausal therapy. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 2007; 91:1-528.

174. Iau PT, Marafie M, Ali A, Sng JH, Macmillan RD, Pinder S, Denley HE, Ellis IO, Wenzyck P, Scott N, Cross G, Blamey RW. Are medullary breast cancers an indication for BRCA 1 mutation screening? A mutation analysis of 42 cases of medullary breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2004; 85: 81-8.

175. Inui T, Asakawa A, Morita Y, Mizuno S, Natori T, Kawaguchi A, Murakami M, Hishikawa Y, Inui A. HER-2 overexpression and targeted treatment by trastuzumab in a very old patient with gastric cancer. J Intern Med 2006; 260:484-7.

176. Ishitobi M, Okumura Y, Arima N, Yoshida A, Nakatsukasa K, Iwase T, Shien T, Masuda N, Tanaka S, Tanabe M, Tanaka T, Komoike Y, Taguchi T, Nishimura R, Inaji H. Breast cancer subtype and distant recurrence after ipsilateral breast tumor recurrence. Ann Surg Oncol 2013; 20:1886-92.

177. Isola J, Tanner M, Forsyth A, Cooke TG, Watters AD, Bartlett JM. Interlaboratory comparison of HER-2 oncogene amplification as detected by chromogenic and fluorescence in situ hybridization. Clin Cancer Res 2004; 10:4793-98.

178. Italian Network for Quality Assurance of Tumor Biomarkers (INQAT) Group; SIAPEC-IAP. Interobserver reproducibility of immunohistochemical HER-2/neu assessment in human breast cancer: an update from INQAT round III. Int J Biol Markers. 2005; 20:189-94.

179. Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. Comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer. J Clin Oncol 1999; 17:1974-82.

180. Jacquemier J, Reis-Filho JS, Lakhani SR, Rakha E. Special subypes: Carcinoma with medullary features. In: Lakhani SR, Ellis IO, Scnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. eds. WHO Classification of Tumours of the Breast. 4th ed. Lyon: IARC: Lyon 2012; pp. 46-7.

181. Järvinen TA, Tanner M, Bärlund M, Borg A, Isola J. Characterization of topoisomerase II alpha gene amplification and deletion in breast cancer. Genes Chromosomes Cancer 1999; 26:142-50.

182. Järvinen TA, Tanner M, Rantanen V, Bärlund M, Borg A, Grénman S, Isola J. Amplification and deletion of topoisomerase IIalpha associate with ErbB-2 amplification and affect sensitivity to topoisomerase II inhibitor doxorubicin in breast cancer. Am J Pathol 2000; 156: 839-47.

183. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 2011; 61:69-90.

184. Jiwa NM, Kanavaros P, van der Valk P, Walboomers JM, Horstman A, Vos W, Mullink H, Meijer CJ. Expression of c-myc and bcl-2 oncogene products in Reed- Sternberg cells independent of presence of Epstein-Barr virus. J Clin Pathol 1993; 46:211-7.

185. Joensuu H, Isola J, Lundin M, Salminen T, Holli K, Kataja V, Pylkkänen L, Turpeenniemi-Hujanen T, von Smitten K, Lundin J. Amplification of erbB2 and erbB2 expression are superior to estrogen receptor status as risk factors for distant recurrence in pT1N0M0 breast cancer: a nationwide population-based study. Clin Cancer Res 2003; 9:923-30.

186. Johnson SE, Bond VP. A method of labelling tissues with tritiated thimidine in vitro and its use in comparing rates of cellular proliferation in duct epithelium, fibroadenoma and carcinoma of the human breast. Cancer 1961; 14:639-50.

187. Jung EJ, Moon HG, Cho BI, Jeong CY, Joo YT, Lee YJ, Hong SC, Choi SK, Ha WS, Kim JW, Lee CW, Lee JS, Park ST. Galectin-1 expression in cancer-associated stromal cells correlates tumor invasiveness and tumor progression in breast cancer. Int J Cancer 2007; 120:2331-8.

188. Kaaks R. Nutrition, hormones, and breast cancer: is insulin the missing link? Cancer Causes Control 1996; 7:605-25.

189. Kahn R, Holtveg H, Nissen F, Holck S. Are acinic cell carcinoma and microglandular carcinoma of the breast related lesions? Histopathology 2003; 42:195-6.

190. Kalykaki A, Agelaki S, Kallergi G, Xyrafas A, Mavroudis D, Georgoulias V. Elimination of EGFR-expressing circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer treated with gefitinib. Cancer Chemother Pharmacol 2014; 73:685-93.

191. Kato N, Itoh H, Serizawa A, Hatanaka Y, Umemura S, Osamura RY. Evaluation of HER2 gene amplification in invasive breast cancer using a dual-color chromogenic in situ hybridization (dual CISH). Pathol Int 2010; 60:510-5.

192. Kelly K, Siebenlist U. The regulation and expression of c-myc in normal and malignant cells. Annu Rev Immunol 1986; 4:317-38.

193. Key TJ, Pike MC. The role of oestrogens and progestagens in the epidemiology and prevention of breast cancer. Eur J Cancer Clin Oncol 1988; 24:29-43.

194. Kim MJ, Gong G, Joo HJ, Ahn SH, Ro JY. Immunohistochemical and clinicopathologic characteristics of invasive ductal carcinoma of breast with micropapillary carcinoma component. Arch Pathol Lab Med 2005; 129:1277-82.

195. Knoop AS, Knudsen H, Balslev E, Rasmussen BB, Overgaard J, Nielsen KV, Schonau A, Gunnarsdóttir K, Olsen KE, Mouridsen H, Ejlertsen B; Danish Breast Cancer Cooperative Group. Retrospective analysis of topoisomerase IIa amplifications and deletions as predictive markers in primary breast cancer patients randomly assigned to cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil or cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil: Danish Breast Cancer Cooperative Group. J Clin Oncol 2005; 23:7483-90.

196. Koenig C, Tavassoli FA. Mucinous cystadenocarcinoma of the breast. Am J Surg Pathol 1998; 22:698-703.

197. Konecny G., Pauletti G., Pegram M, Untch M, Dandekar S, Aguilar Z, Wilson C, Rong H.M, Bauerfeind I, Felber M, Wang H.J, Beryt M, Seshadri R, Hepp H. and Slamon DJ. Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. J Natl Cancer Inst 2003; 95:142-53.

198. Konecny GE, Pauletti G, Untch M, Wang HJ, Möbus V, Kuhn W, Thomssen C, Harbeck N, Wang L, Apple S, Jänicke F, Slamon DJ. Association between HER2, TOP2A, and response to anthracycline-based preoperative chemotherapy in high-risk primary breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2010; 120:481-9.

199. Königshoff M, Wilhelm J, Bohle R.M, Pingoud A, Hahn M. HER-2/neu gene copy number quantified by real-time PCR: comparison of gene amplification, heterozygosity, and immunohistochemical status in breast cancer tissue. Clin Chem 2003; 49:219-29.

200. Koss LG1, Czerniak B, Herz F, Wersto RP. Flow cytometric measurements of DNA and other cell components in human tumors: a critical appraisal. Hum Pathol 1989; 20:528-48.

201. Kounelis S, Kapranos N, Malamos N, Kouri-Bairaktari E. Evaluation of HER2 gene status in breast cancer by chromogenic in situ hybridization comparison with immunohistochemistry. Anticancer Res 2005; 25:939-46.

202. Kümler I, Tuxen MK, Nielsen DL. A systematic review of dual targeting in HER2-positive breast cancer. Cancer Treat Rev 2014; 40:259-70.

203. Laasko M, Tanner M, Isola J. Dual-colour chromogenic in situ hybridization for testing of Her-2 oncogene amplification in archival breast tumors. J Pathol 2006; 210:3-9.

204. Lacroix-Triki M, Mathoulin-Pelissier S, Ghanassia JP, Macgrogan G, Vicent-Salomon A, Brouste V, Mathieu MC, Roger P, Bibeau F, Jacquemier J, Penault-Llorca F, Arnoud L. High inter-observer agreement in immunohistochemical evaluation of HER-2/neu expression in breast cancer: A multicentre GEFPICS study. Eur J Cancer 2006; 42:2946-53.

205. Lahusen T, Fereshteh M, Oh A, Wellstein A, Riegel AT. Epidermal grow factor receptor tyrosine phosphorylation and signaling controlled by a nuclear receptor coactivator, amplified in breast cancer. Cancer Res 2007; 67:7256-65.

206. Lakhani SR. Molecular genetics of solid tumours: translating research into clinical practice. What we could do now: breast cancer. Mol Pathol 2001; 54:281-4.

207. Lakhani SR, Rakha E, Simpson PT. Special subtipes: Invasive lobular carcinoma. In: Lakhani SR, Ellis IO, Scnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. 4th ed. WHO Classification of Tumours of the Breast. IARC: Lyon 2012, pp. 40-2.

208. Lal P, Salazar PA, Ladanyi M, Chen B. Impact of polysomy 17 on HER-2/neu immunohistochemistry in breast carcinomas without HER-2/neu gene amplification. J Mol Diagn 2003; 5:155-9.

209. Lal P, Salazar PA, Hudis CA, Ladanyi M. HER-2 Testing in breast cancer using immunohistochemical analysis and fluorescence in situ hybridization. A single-institution experience of 2,279 cases and comparison of dual-color and single-color scoring. Am J Clin Pathol 2004; 121:631-6.

210. Lambros MB, Natrajan R, Reis-Filho JS. Chromogenic and fluorescent in situ hybridization in breast cancer. Hum Pathol 2007; 38:1105-22.

211. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics 1977; 33:159-74.

212. Lebeau A, Deimling D, Kaltz C, Sendlehofert A, Iff A, Luthardt B, Untch M, Löhrs U. HER-2 analysis in archival tissue samples of human breast cancer: comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. J Clin Oncol 2001; 19:354-63.

213. Lee AH, Pinder SE, Macmillan RD, Mitchell M, Ellis IO, Elston CW, Blamey RW. Prognostic value of lymphovascular invasion in women with lymph node negative invasive breast carcinoma. Eur J Cancer. 2006; 42:357-62.

214. Lee E, Ma H, McKean-Cowdin R, Van Den Berg D, Bernstein L, Henderson BE, Ursin G. Effect of reproductive factors and oral contraceptives on breast cancer risk in BRCA1/2 mutation carriers and noncarriers: results from a population-based study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2008; 17:3170-8.

215. Lee MY, Alejandro R, Toomey NL. Immunochemical studies of DNA polymerase delta: relationships with DNA polymerase alfa. Arch Biochem Biophys 1989; 272:1-9.

216. Lester S, Weaver B, Morrow M. Invasive breast carcinoma: Introduction and general features. Staging In: Lakhani SR, Ellis IO, Scnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. 4th ed. WHO Classification of Tumours of the Breast. IARC Lyon 2012. pp. 20-21.

217. Lewis F, Jackson P, Lane S, Coast G, Hanby AM. Testing for HER2 in breast cancer. Histopathology 2004; 45:207-17.

218. Li-Ning E, Ronchetti R, Torres-Cabala C, Merino MJ. Role of chromogenic in situ hybridization (CISH) in the evaluation of HER2 status in breast carcinoma: comparison with immunohistochemistry and FISH. Int J Surg Pathol 2005; 13:343-51.

219. Lipton A, Leitzel K, Ali SM, Demers L, Harvey HA, Chaudri-Ross H, Evans D, Lang R, Hackl W, Hamer P, Carney W. Serum HER-2/neu conversion to positive at the time of disease progression in patients with breast carcinoma on hormone therapy. Cancer 2005; 104:257-63.

220. Lööf-Johanson M, Brudin L, Sundquist M, Thorstenson S, Rudebeck CE. Breastfeeding and prognostic markers in breast cáncer. Breast 2010; 20:170-5.

221. Lopez F, Belloc F, Lacombe F, Dumain P, Reiffers J, Bernard P, Boisseau MR. Modalitis of synthesis of Ki-67 antigen during the stimulation of lymphocytes. Cytometry 1991; 12:42-9.

222. Lottner C, Schwarz S, Diermeier S, Hartmann A, Knuechel R, Hofstaedter F, Brockhoff G. Simultaneous detection of HER2/neu gene amplification and protein overexpression in parafin-embedded breast cancer. J Pathol 2005; 205:577-84.

223. Ma Y, Lespagnard L, Durbecq V, Paesmans M, Desmedt C, Gómez-Galdon M, Veys I, Cardoso F, Sotiriou C, Di Leo A, Piccart M J, Larsimont D. Polisomy 17 in HER-2/neu status elaboration in breast cancer: effect on daily practice. Clin Cancer Res 2005; 11:4393-9.

224. Mack LL, Kerkvliet N, Doig G, O´Malley FP. Relationship of a new histological categorization of ductal carcinoma in situ of the breast with size and the immunohistochemical expression of p53, c-erbB2, bcl-2, and Ki-67. Hum Pathol 1997; 28:974-9.

225. Madrid MA, Lo RW. Chromogenic in situ hybridization (CISH): a novel alternative in screening archival breast cancer tissue samples for HER-2/neu status. Breast Cancer Res 2004; 6:R593-600.

226. Marchiò C, Iravani M, Natrajan R, Lambros MB, Savage K, Tamber N, Fenwick K, Mackay A, Senetta R, Di Palma S, Schmitt FC, Bussolati G, Ellis LO, Ashworth A, Sapino A, Reis-Filho JS. Genomic and immunophenotypical characterization of pure micropapillary carcinomas of the breast. J Pathol. 2008; 215:398-410.

227. Marchiò C, Iravani M, Natrajan R, Lambros MB, Geyer FC, Savage K, Parry S, Tamber N, Fenwick K, Mackay A, Schmitt FC, Bussolati G, Ellis I, Ashworth A, Sapino A, Reis-Filho JS. Mixed micropapillary-ductal carcinomas of the breast: a genomic and immunohistochemical analysis of morphologically distinct components. J Pathol. 2009; 218:301-15.

228. Marshall CJ. Tumor suppressor genes. Cell 1991; 64:313-26.

229. Martín M, Romero A, Cheang MC, López García-Asenjo JA, García-Saenz JA, Oliva B, Román JM, He X, Casado A, de la Torre J, Furio V, Puente J, Caldés T, Vidart JA, Lopez-Tarruella S, Diaz-Rubio E, Perou CM. Genomic predictors of response to doxorubicin versus docetaxel in primary breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2011; 128:127-36.

230. Martoni AA, Bernardi A, Quercia S. Trastuzumab plus estrogen supression as salvage treatment in a case of liver failure due to metastasic breast cancer. Anticancer Res 2006; 26:3739-44.

231. Mayr D, Heim S, Weyrauch K, Zeindl-Eberhart E, Kunz A, Engel J, Kirchner T Chromogenic in situ hybridization for Her-2/neu-oncogene in breast cancer: comparison of a new dual-colour chromogenic in situ hybridization with immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. Histopathology. 2009; 55:716-23.

232. McCormick D, Chong H, Hobbs C, Datta C, Hall PA. Detection of the Ki 67 antigen in fixed and wax-embedded sections with the monoclonal antibody MIB1. Histopathology 1993; 22:355-60.

233. McManus DT, Patterson AH, Maxwell P, Humphreys MW, Anderson NH. Fluorescence in situ hybridisation detection of erbB2 amplification in breast cancer fine needle aspirates. J Clin Pathol 1999; 52:75-7.

234. Mehra R, Varambally S, Ding L, Shen R, Sabel MS, Ghosh D, Chinnanaiyan AM, Kleer CG. Identification of GATA 3 as breast cancer prognostic marker by global gene expression meta-analysis. Cancer Res 2005; 65:11259-64.

235. Ménard S, Casalini P, Campiglio M, Pupa S, Agresti R, Tagliabue E. HER2 overexpression in various tumor types, focussing on its relationship to the development of invasive breast cancer. Ann Oncol 2001a; 12:S15-9.

236. Ménard S, Fortis S, Castiglioni F, Agresti R, Balsari A. HER2 as a prognostic factor in breast cancer. Oncology 2001b; 61:S67-72.

237. Merkelbach-Bruse S, Wardelmann E, Behrens P, Losen I, Buettner R, Friedrichs N. Current diagnostic methods of HER-2/neu detection in breast cancer with special regard to real-time PCR. Am J Surg Pathol 2003; 27:1565-70.

238. Merino MJ, Livolsi VA. Signet ring carcinoma of the female breast: a clinicopathologic analysis of 24 cases. Cancer 1981; 48:1830-7.

239. Meyer JS, Prey MU, Babcock DS, McDivitt RW. Breast carcinoma cell kinetics, morphology, stage, and host characteristics. A thymidine labeling study. Lab Invest 1986; 54:41-51.

240. Middleton LP, Palacios DM, Bryant BR, Krebs P, Otis CN, Merino MJ. Pleomorphic lobular carcinoma: morphology, inmunohistochemistry, and molecular analysis. Am J Surg Pathol 2000; 24:1650-6.

241. Milde-Langosch K, Karn T, Müller V, Witzel I, Rody A, Schmidt M, Wirtz RM. Validity of the proliferation markers Ki67, TOP2A, and RacGAP1 in molecular subgroups of breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2013; 137:57-67.

242. Miremadi A, Pinder SE, Lee AH, Bell JA, Paish EC, Wencyk P, Elston CW, Nicholson RI, Blamey RW, Robertson JF, Ellis IO. Neuroendocrine differentiation and prognosis in breast adenocarcinoma. Histopathology 2002; 40:215-22.

243. Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. J Immunol 1978; 121:2228-34.

244. Moelans CB, de Weger RA, Monsuur HN, Vijzelaar R, van Diest PJ. Molecular profiling of invasive breast cancer by multiplex ligation-dependent probe amplification-based copy number analysis of tumor suppressor and oncogenes. Mod Pathol 2010a; 23:1029-39.

245. Moelans CB, de Weger RA, van Blokland MT, van der Wall E, van Diest PJ. Simultaneous detection of TOP2A and HER2 gene amplification by multiplex ligation-dependent probe amplification in breast cancer. Mod Pathol 2010b; 23:62-70.

246. Moinfar F. Special Types of Breast Carcinoma. In: Essentials of Diagnostic Breast Pathology. 1st ed Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2007, pp. 223-39.

247. Mollerup J, Henriksen U, Müller S, Schønau A. Dual color chromogenic in situ hybridization for determination of HER2 status in breast cancer: a large comparative study to current state of the art fluorescence in situ hybridization. BMC Clin Pathol 2012; 12:3.

248. Moore JW, Key TJ, Bulbrook RD, Clark GM, Allen DS, Wang DY, Pike MC. Sex hormone binding globulin and risk factors for breast cancer in a population of normal womwn who had never used exogenous sex hormones. Br J Cancer 1987; 56:661-6.

249. Mrklić I, Spagnoli GC, Juretić A, Pogorelić Z, Tomić S. Co-expression of cancer testis antigens and topoisomerase 2-alpha in triple negative breast carcinomas. Acta Histochem 2014; 22:182-7.

250. Mueller-Holzner E, Fink V, Frede T, Marth C. Immunohistochemical determination of HER2 expression in breast cancer from core biopsy specimens: a reliable predictor of HER2 status of the whole tumor. Breast Cancer Res Treat 2001; 69:13-9.

251. Mueller RE, Parkes RK, Andrulis I, O'Malley FP. Amplification of the TOP2A gene does not predict high levels of topoisomerase II alpha protein in human breast tumor samples. Genes Chromosomes Cancer 2004; 39:288-97.

252. Murphy DA, Pacia E, Beruti S, Lamoreux J, Dabbas B, Diver J, Christiansen J. Development of a highly reproducible clinical test for Ki 67 using AQUA technology. 35th San Antonio Breast Cancer Symposium, 2012 (Abstract).

253. Muss HB, Thor AD, Berry DA, Kute T, Liu ET, Koerner F, Cirrincione CT, Budman DR, Wood WC, Barcos M, c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. N Engl J Med 1994; 330:1260-6.

254. Nadji M, Gómez-Fernandez C, Ganjei-Azar P, Morales AR. Inmunohistochemistry of estrógen and progesterone receptors reconsidered: experience with 5,993 breast cancers. Am J Clin Pathol 2005; 123:21-7.

255. Nangia-Makker P, Raz T, Tait L, Hogan V, Fridman R, Raz A. Galectin-3 cleavage: a novel surrogate marker for matrix metalloproteinase activity in growing breast cancers. Cancer Res 2007; 67:11760-8.

256. Nguyen CV, Falcón-Escobedo R, Hunt KK, Nayeemuddin KM, Lester TR, Harrell RK, Bassett RL Jr, Gilcrease MZ. Pleomorphic ductal carcinoma of the breast: predictors of decreased overall survival. Am J Surg Pathol 2010; 34:486-93.

257. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, Hernandez-Boussard T, Livasy C, Cowan D, Dressler L, Akslen LA, Ragaz J, Gown AM, Gilks CB, van de Rijn M, Perou CM. Inmunohistochemical and clinical characterization of the basal like subtype of invasive breast cancer. Clin Cancer Res 2004; 15:5367-74.

258. Nielsen KV, Ejlertsen B, Møller S, Jørgensen JT, Knoop A, Knudsen H, Mouridsen HT. The value of TOP2A gene copy number variation as a biomarker in breast cancer: Update of DBCG trial 89D. Acta Oncol 2008; 47:725-34.

259. Nielsen KV, Müller S, Møller S, Schønau A, Balslev E, Knoop AS, Ejlertsen B. Aberrations of ERBB2 and TOP2A genes in breast cancer. Mol Oncol 2010; 4:161-8.

260. Nielsen KV, Ejlertsen B, Møller S, Jensen MB, Balslev E, Müller S, Knoop A, Mouridsen HT. Lack of independent prognostic and predictive value of centromere 17 copy number changes in breast cancer patients with known HER2 and TOP2A status. Mol Oncol 2012a; 6:88-97.

261. Nielsen TO, Polley M-YC, Leung SCY, Mastropasqua MG, Zabaglo LA, Bartlett JMS, Viale G, McShane LM, Hayes DF, Dowsett M. On behalf of the international Ki67 breast cancer working group of the BIG-NABCG collaboration. University of Brithis Columbia, Vancouver, Bc, Canada, Natonal Cancer Institute, Bethesda MD; European Institute of oncology, Milan, Italy; The Institute of cancer research, London, United Kingdom; Ontario Institute for cancer reseach, Toronto, On, Canada; University of Michigan comprehnsive cancer center, Ann Arbor, MI; Royal Marsden Hospital, London, United Kingdom; Breast International Group-North American breast cancer group collaboration. An International Ki 67 reproducibility study. 35th San Antonio Breast Cancer Symposium, 2012b (Abstract).

262. Nikolényi A, Sükösd F, Kaizer L, Csörgo E, Vörös A, Uhercsák G, Ormándi K, Lázár G, Thurzó L, Brodowicz T, Kahán Z. Tumor topoisomerase II alpha status and response to anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. Oncology 2011; 80:269-77.

263. Nitiss JL. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. Nat Rev Cancer 2009a; 9:327-37.

264. Nitiss JL. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. Nat Rev Cancer 2009b; 9:338-50.

265. Nitta H, Hauss-Wegrzyniak B, Lehrkamp M, Murillo AE, Gaire F, Farell M, Walk E, Penault-Llorca F, Kurosomi M, Dietel M, Wang L, Loftus M, Pettay J, Tubbs RR, Grogan TM. Development of automated brightfield double in situ hybridization (BDISH) application for HER2 gene and chromosome 17 centromere (CEN17) for breast carcinoma and an assay performance comparison to manual dual color HER2 fluorescence in situ hybridization (FISH). Diagn Pathol 2008; 3:41.

266. Nobukawa B, Fujii H, Iria S, Kumasaka T, Shimizu H, Matsumoto T, Suda K, Futagawa S. Breast carcinoma diverging to aberrant melanocytic differenciatiation: a case report with histopathologic and loss of heterozygosity analyses. Am J Surg Pathol 1999; 23:1280-7.

267. Oakman C, Bessi S, Zafarana E, Galardi F, Biganzoli L, Di Leo A. Recent advances in systemic therapy: new diagnostics and biological predictors of outcome in early breast cancer. Breast Cancer Res 2009a; 11:205.

268. Oakman C, Moretti E, Sotiriou C, Viale G, Di Leo. Re: Topoisomerase II alpha and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. J Natl Cancer Inst 2009b; 101:1735-6.

269. O'Connell FP, Wang HH, Odze RD. Utility of immunohistochemistry in distinguishing primary adenocarcinomas from metastatic breast carcinomas in the gastrointestinal tract. Arch Pathol Lab Med. 2005; 129:338-47.

270. O´Malley FP, Bane A. An update on apocrine lesions of the breast. Histopathology 2008; 52:3-10.

271. O'Malley FP, Chia S, Tu D, Shepherd LE, Levine MN, Bramwell VH, Andrulis IL, Pritchard KI. Topoisomerase II alpha and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. J Natl Cancer Inst 2009; 101:644-50.

272. O'Malley FP, Chia S, Tu D, Shepherd LE, Levine MN, Huntsman D, Bramwell VH, Andrulis IL, Pritchard KI. Topoisomerase II alpha protein and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy with CEF compared to CMF in the NCIC CTG randomized MA.5 adjuvant trial. Breast Cancer Res Treat 2011; 128:401-9.

273. O´Malley F, Eusebi V, Lakhani SR. Special subtypes: Carcinomas with apocrine differentiation. In: Lakhani SR, Ellis IO, Scnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. eds. WHO Classification of Tumours of the Breast. 4th ed. IARC: Lyon 2012; pp. 53-4.

274. Ono M, Tsuda H, Yunokawa M, Yonemori K, Shimizu C, Tamura K, Kinoshita T, Fujiwara Y. Prognostic impact of Ki-67 labeling indices with 3 different cutoff values, histological grade, and nuclear grade in hormone-receptor-positive, HER2-negative, node-negative invasive breast cancers. Breast Cancer 2013 April 13. doi:10.1007/s12282-013-0464-4.

275. Orlando L, Del Curto B, Gandini S, Ghisini R, Pietri E, Torrisi R, Balduzzi A, Cardillo A, Dellapasqua S, Veronesi P, Viale G, Goldhirsch A, Colleoni M. Topoisomerase II alpha gene status and prediction of pathological complete remission after anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in endocrine non-responsive Her2/neu-positive breast cancer. Breast 2008; 17:506-11.

276. Paik S, Bryant J, Park C, Fisher B, Tan-Chiu E, Hyams D, Fisher ER, Lippman ME, Wickerham DL, Wolmark N. erbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. J Natl Cancer Inst 1998; 90:1361-70.

277. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller W, Fisher ER, Wickerham DL, Bryant J, Wolmark N. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. N Engl J Med 2004; 351:2817-26.

278. Palacios J, Honrado E, Osorio A, Cazorla A, Sarrió D, Barroso A, Rodríguez S, Cigudosa JC, Díez O, Alonso C, Lerma E, Sánchez L, Rivas C, Benítez J. Immunohistochemical characteristics defined by tissue microarray of hereditary breast cancer not attributable to BRCA1 or BRCA2 mutations; differences from breast carcinomas arising in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. Clin Cancer Res 2003a; 9:3606-14.

279. Palacios J, Sarrió D, García-Macias MC, Bryant B, Sobel ME, Merino MJ. Frecuent E-cadherin gene inactivation by loss of heterozygosity in pleomorphic lobular carcinoma of the breast. Mod Pathol 2003b; 16:674-8.

280. Palacios J, Andreu X, Calasanz MJ, Concha A, Corominas JM, García-Caballero T, López JA, López-Ríos F, Ramón y Cajal S, Vera-Sempere FJ, Colomer R, Martín M, Alba E, González-Martín A, Llombart A, Lluch A, Albanell J. Recomendación para la determinación de HER2 en cáncer de mama. Consenso nacional de la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP) y de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). Rev Esp Patol 2009; 42:3-16.

281. Papouchado BG, Myles J, Lloyd RV, Stoler M, Oliveira AM, Downs- Kelly E, Morey A, Bilous M, Nagle R, Prescott N, Wang L, Dragovich L, McElhinny A, Garcia CF, Ranger-Moore J, Free H, Powell W, Loftus M, Pettay J, Gaire F, Roberts C, Dietel M, Roche P, Grogan T, Tubbs R. Silver in situ hybridization (SISH) for determination of HER2 gene status in breast carcinoma: comparison with FISH and assesment of interobserver reproductibility. Am J Surg Pathol 2010; 34:767-76.

282. Paredes J, Lopes N, Milanezi F, Schmitt FC. P-cadherin and cytokeratin 5: useful adjunct markers to distinguish basal-like ductal carcinomas in situ. Virchows Arch 2007; 450:73-80.

283. Park DI, Yun JW, Park JH, Oh SJ, Kim HJ, Cho YK, Shon CI, Jeon WK, Kim BI, Yoo CH, Son BH, Cho EY, Chae SW, Kim EJ, Sohn JH, Ryu SH, Sepúlveda AR. HER-2/neu amplification is a independent prognostic factor in gastric cancer. Dig Dis Sci 2006; 51:1371-9.

284. Park K, Kim J, Lim S. Comparing fluorescence in situ hybridization and chromogenic in situ hybridization methods to determine the HER 2/neu status in primary breast carcinoma using tissue microarray. Mod Pathol 2003a; 16:937-43.

285. Park K, Kim J, Lim S, Han S. Topoisomerase II-alpha (topoII) and HER2 amplification in breast cancers and response to preoperative doxorubicin chemotherapy. Eur J Cancer 2003b; 39:631-4.

286. Park K, Han S, Gwak GH, Kim HJ, Kim J, Kim KM. Topoisomerase II-alpha gene deletion is not frequent as its amplification in breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2006; 98:337-42.

287. Pauletti G, Dandekar S, Rong HM, Ramos L, Peng HJ, Seshadri R, Slamon DJ. Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2 alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. J Clin Oncol 2000; 18:3651-64.

288. Piccart-Gebhart MJ. Adjuvant trastuzumab therapy for HER2-overexpressing breast cancer: what we know and what we still need to learn. Eur J Cancer 2006; 42:1715-9.

289. Pedersen M, Rasmussen BB. The correlation between dual-color chromogenic in situ hybridization and fluorescence in situ hybridization in assessing HER2 gene amplification in breast cancer. Diagn Mol Pathol 2009; 18:96-102.

290. 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; 17:277-87.

291. Peiró G, Aranda FI, Adrover E, Niveiro M, Alenda C, Payá A, Seguí J. Analysis of HER2 by chromogenic in situ hybridization and immunohistochemistry in lymph node-negative breast carcinoma: prognostic relevance. Human Pathol 2007; 38:26-34.

292. Penault-Llorca F, Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Osamura RY, Rüschoff J, van de Vijver M. Emerging technologies for assessing HER2 amplification. Am J Clin Pathol 2009; 132:539-48.

293. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB. Molecular portraits of human breast tumours. Nature 2000; 406:747-52.

294. Persons DL, Tubbs RR, Cooley LD, Dewald GW, Dowling PK, Du E, Mascarello JT, Rao KW, Wilson KS, Wolff DJ, Habeqqer-Vance G. HER-2 fluorescence in situ hybridizatión: results from the survey program of College of American Pathologists. Arch Pathol Lab Med 2006; 130:325-31.

295. Peto R, Davies C, Godwin J, Gray R, Pan HC, Clarke M, Cutter D, Darby S, McGale P, Taylor C, Wang YC, Bergh J, Di Leo A, Albain K, Swain S, Piccart M, Pritchard K. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. Lancet 2012; 379:432-44.

296. Philipova RN, Zhelev NZ, Todorov IT, Hadjiolov AA. Monoclonal antibodys against a nuclear matrix antigen in proliferating human cells. Biol Cell 1987; 60: 1-8.

297. Phillips GDL, Li G, Dugger DL, Crocker LM, Parsons KL, Mai E, Blättler WA, Lambert JM, Chari RV, Lutz RJ, Wong WL, Jacobson FS, Koeppen H, Schwall RH, Kenkare-Mitra SR, Spencer SD, Sliwkowski MX. Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. Cancer Res 2008; 68:9280-90.

298. Phillips KA, Marshall DA, Haas JS, Elkin EB, Liang SY, Hassett MJ, Ferrusi I, Brock JE, Van Bebber SL. Clinical practice patterns and cost-effectiveness of HER2 testing strategies in breast cancer patients. Cancer 2009; 115:5166-74.

299. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, Steger G, Huang CS, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Lang I, Nitz U, Iwata H, Thomssen C, Lohrisch C, Suter TM, Rüschoff J, Süto T, Greatorex V, Straehle C, McFadden E, Dolci MS, Gelber RD. Trastuzumab after adjuvant chemoterapy in HER2 positive breast cancer. N Engl J Med 2005; 353:1659-72.

300. Pijpe A, Manders P, Brohet RM, Collée JM, Verhoef S, Vasen HF, Hoogerbrugge N, van Asperen CJ, Dommering C, Ausems MG, Aalfs CM, Gomez-Garcia EB; HEBON, Van't Veer LJ, van Leeuwen FE, Rookus MA. Physical activity and the risk of breast cancer in BRCA1/2 mutation carriers. Breast Cancer Res Treat 2010; 120: 235-44.

301. Ploton D, Menager M, Jeannesson P,Himber G, Pigeon F, Adnet JJ. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. Histochem J 1986; 18:5-14.

302. Powell RD, Pettay JD, Powell WC, Roche PC, Grogan TM, Hainfeld JF, Tubbs RR. Metallographic in situ hybridization. Hum Pathol 2007; 38:1145-59.

303. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He X, Perou CM. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. Breast Cancer Research 2010; 12:R68. doi: 10.1186/bcr2635.

304. Prat A, Cheang MC, Martín M, Parker JS, Carrasco E, Caballero R, Tyldesley S, Gelmon K, Bernard PS, Nielsen TO, Perou CM. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. J Clin Oncol 2013; 31:203-9.

305. Press MF, Sauter G, Buyse M, Bernstein L, Guzman R, Santiago A, Villalobos IE, Eiermann W, Pienkowski T, Martin M, Robert N, Crown J, Bee V, Taupin H, Flom KJ, Tabah-Fisch I, Pauletti G, Lindsay MA, Riva A, Slamon DJ. Alteration of topoisomerase II-alpha gene in human breast cancer: association with responsiveness to anthracycline-based chemotherapy. J Clin Oncol 2011; 29:859-67.

306. Pritchard KI, Messersmith H, Elavathil L, Trudeau M, O'Malley F, Dhesy-Thind B. HER-2 and topoisomerase II as predictors of response to chemotherapy. J Clin Oncol 2008; 26:736-44.

307. Quaranta M, Daniele A, Coviello M, Savonarola A, Abbate I, Venneri MT, Paradiso A, Stea B, Zito A, Labriola A, Schittulli F. c-erb-2 protein level in tissue and sera of breast cancer patients: a possible useful clinical correlation. Tumori 2006; 92:311-7.

308. Quinn CM, Wright NA. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and applications as prognostic variables. J Pathol 1990; 160:93-102.

309. Quinn JM, McGee JO, Athanasou NA. Human tumour-associated macrophages differentiate into osteoclastic bone-resorbing cells. J Pathol 1998; 184:31-6.

310. Quirke P, Dyson JE. Flow cytometry: methodology and applications in pathology. J Pathol 1986; 149: 79-87.

311. Rakha EA, El-Sayed ME, Reis-Filho JS, Ellis IO. Expression profiling technology: its contribution to our understanding of breast cancer. Histopathology 2008; 52:67-81.

312. Rakha EA, Patel A, Powe DG, Benhasouna A, Green AR, Lambros MB, Reis-Filho JS, Ellis IO. Clinical and biological significance of E- cadherin protein expression in invasive lobular carcinoma of the breast. Am J Surg Pathol 2010; 34:1472-9.

313. Rakha EA, Pinder SE, Shin SJ, Tsuda H. Special subtypes: Tubular carcinoma and cribiform carcinoma. In: Lakhani SR, Ellis IO, Scnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. eds. WHO Classification of Tumours of the Breast. 4th ed. IARC: Lyon 2012, pp. 43-5.

314. Rastelli F, Crispino S. Factors predictive of response to hormone therapy in breast cancer. Tumori 2008; 94:370-83.

315. Recomendación del Consejo de 2 de diciembre de 2003 sobre el cribado del cáncer. (2003/878/CE). (Diario Oficial de la Unión Europea, L 327/34, de 16-12-2003).

316. Reis-Filho JS, Milannezi F, Carvalho S. Metaplastic breast carcinoma exhibit EGFR, but not HER2, gene amplification and overexpression: immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization analysis. Breast Cancer Res 2005a; 7:R1028-35.

317. Reis-Filho JS, Simpson PT, Jones C, Steele D, Mackay A, Iravani M, Fenwick K, Valgeirsson H, Lambros M, Ashworth A, Palacios J, Schmitt F, Lakhani SR. Pleomorphic lobular carcinoma of the breast: role of comprensive molecular pathology in characterization of an entity. J Pathol 2005b; 207:1-13.

318. Reis-Filho JS, Tutt ANJ. Triple negative tumours: a critical review. Histopathology 2008; 52:108-18.

319. Reis-Filho JS, Ellis IO. Special subtypes: Invasive micropapillary carcinoma. In: Lakhani SR, Ellis IO, Scnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. eds. WHO Classification of Tumours of the Breast. 4th ed. Lyon: IARC: 2012a, pp. 65-6.

320. Reis-Filho JS, Lakhani SR, Gobbi H, Sneige N. Special subtypes: Metaplastic carcinoma. In: Lakhani SR, Ellis IO, Scnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. eds. WHO Classification of Tumours of the Breast. 4th ed. IARC: Lyon 2012b; pp. 48-52.

321. Ridolfi RL, Jamehdor MR, Arber JM. HER-2/neu testing in breast carcinoma: a combined immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization approach. Mod Pathol 2000; 13:866-73.

322. Rody A, Karn T, Solbach C et al. The erbB2+ cluster of the intrinsic gene set predicts tumor response of breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy with docetaxel, doxorubicin and cyclophosphamide within the GEPARTRIO trial. Breast 2007; 16: 235–240.

323. Rody A, Karn T, Ruckhäberle E, Müller V, Gehrmann M, Solbach C, Ahr A, Gätje R, Holtrich U, Kaufmann M. Gene expression of topoisomerase II alpha (TOP2A) by microarray analysis is highly prognostic in estrogen receptor (ER) positive breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2009; 113:457-66.

324. Romero A, Martin M, Cheang MC, López García-Asenjo JA, Oliva B, He X, de la Hoya M, García Sáez JA, Arroyo F M, Díaz Rubio E, Perou CM, Caldés Llopis T. Assessment of topoisomerase II a status in breast cancer by quantitative PCR, gene expresion microarrays, inmunohistochemistry, and fluorescence in situ hybridization. Am J Pathol 2011; 178:1453-60.

325. Romero A, Caldés T, Díaz-Rubio E, Martín M. Topoisomerase 2 alpha: a real predictor of anthracycline efficacy? Clin Transl Oncol 2012;14:163-8.

326. Roncaroli F, Lamovec J, Zidar A, Eusebi V. Acinic cell-like carcinoma of the breast. Virchows Arch 1996; 429:69-74.

327. Ropero S, Menéndez JA, Vázquez-Martín A, Montero S, Cortés Funes H, Colomer R. Trastuzumab plus tamoxifen: anti-proliferative and molecular interactions in breast carcinoma. Breast Cancer Res Treat 2004; 86:125-37.

328. Rosen PP. Carcinoma with metaplasia. In: Rosen's Breast Pathology, 3th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2009; pp. 470-505.

329. Rosner B, Colditz GA, Willet WC. Reproductive risk factors in a prospective study of breast cáncer: the Nurses' Health Study. Am J Epidemiol 1994; 139: 819-35.

330. Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. Oncologist 1998; 3:237-52.

331. Ross JS, Fletcher JA. HER-2/neu (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer. Am J Clin Pathol 1999; 112:S53-67.

332. Ross JS, Fletcher. JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Symmans WF, Pusztai L, Bloom KJ. The HER-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. Oncologist 2003; 8:307-25.

333. Ross JS, Symmans WF, Pusztai L, Hortobagyi GN. Standardizing slide-based assays in breast cancer: hormone receptors, HER2, and sentinel lymph nodes. Clin Cancer Res 2007; 15:2831-35.

334. Rubin I, Yarden Y. The basic biology of HER2. Ann Oncol 2001; 12:S3-8.

335. Rudolph P, MacGrogan G, Bonichon F, Frahm SO, de Mascarel I, Trojani M, Durand M, Avril A, Coindre JM, Parwaresch R. Prognostic significance of Ki-67 and topoisomerase IIalpha expression in infiltrating ductal carcinoma of the breast. A multivariate analysis of 863 cases. Breast Cancer Res Treat. 1999; 55:61-71.

336. Sáez A, Andreu FJ, Seguí MA, Baré ML, Fernández S, Dinarés C, Rey M. HER-2 gene amplification by chromogenic in situ hybridisation (CISH) compared with fluorescence in situ hybridisation (FISH) in breast cancer - A study of two hundred cases. Breast 2006; 15:519-27.

337. Sampson SA, Kreipe H, Gillett CE, Smith P, Chaudary MA, Khan A, Wicks K, Parwaresch R, Barnes DM. Ki S1: a novel monoclonal antibody with recognizes proliferating cells: evaluation of its relationship to prognosis in mammary carcinoma. J Pathol 1992; 168:179-85.

338. Santiago MP, Vázquez-Boquete A, Fernández B, Masa C, Antúnez JR, Fraga M, Forteza J, García-Caballero T. Whether to determine HER2 status for breast cancer in the primary tumour or in the metastasis. Histol Histopathol. 2009; 24: 675-82.

339. Sapino A, Coccorullo Z, Cassoni P, Ghisolfi G, Gugliotta P, Bongiovanni M, Arisio R, Crafa P, Bussolati G. Which breast carcinomas need HER-2/neu gene study after immunohistohemical analysis? Results of combined use of antibodies against different c-erbB2 protein domains. Histopathology 2003; 43:354-62.

340. Sapino A, Sneige N, Eusebi V, Michal M. Special subtypes: Salivary gland/skin adnexal type tumours. In: Lakhani SR, Ellis IO, Scnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. eds. WHO Classification of Tumours of the Breast. 4th ed. IARC: Lyon 2012a, p. 55.

341. Sapino A, Sneige N, Eusebi V. Special subtypes: Adenoid cystic carcinoma. In: Lakhani SR, Ellis IO, Scnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. eds. WHO Classification of Tumours of the Breast. 4th ed. IARC: Lyon 2012b; pp. 56-7.

342. Sapino A, Sneige N, Eusebi V. Special subtypes: Mucoepidermoid carcinoma. In: Lakhani SR, Ellis IO, Scnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. eds. WHO Classification of Tumours of the Breast. 4th ed. IARC: Lyon 2012c; p. 58.

343. Sapino A, Sneige N, Eusebi V. Special subtypes: Polymorphous carcinoma. In: Lakhani SR, Ellis IO, Scnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. eds. WHO Classification of Tumours of the Breast. 4th ed. IARC: Lyon 2012d, p. 59.

344. Sartelet H, Lagonotte E, Lorenzato M, Duval I, Lechki C, Rigaud C, Cucherousset J, Durlach A, Graesslin O, Abboud P, Doco-Fenzy M, Quereux C, Costa B, Polette M, Munck JN, Birembaut P. Comparison of liquid based cytology and histology for the evaluation of HER-2 status using immunostaining and CISH in breast carcinoma. J Clin Pathol 2005; 58: 864-71.

345. Sauter G, Lee J, Bartlett J M. S, Slamon DJ, Press MF. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. J Clin Oncol 2009; 27:1323-32.

346. Sawyers CL, Denny CT, Witte ON. Leukemia and the disruption of normal hematopoiesis. Cell 1991; 64: 337-50.

347. Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene MI, Weinberg RA. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. Nature 1984; 312:513-6.

348. Schelfhout VR, Coene ED, Delaey B, Thys S, Page DL, De Potter CR. Pathogenesis of Paget´s disease: epidermal heregulin-alpha, motility factor, and the HER receptor family. J Natl Cancer Inst 2000; 92: 622-8.

349. Schindlbeck C, Mayr D, Olivier C, Rack B, Engelstaedter V, Jueckstock J, Jenderek C, Andergassen U, Jeschke U, Friese K. Topoisomerase II alpha expression rather than gene amplification predicts responsiveness of adjuvant anthracycline-based chemotherapy in women with primary breast cancer. J Cancer Res Clin Oncol 2010; 136:1029-37.

350. Schlemmer BO, Sorensen BS, Overgaard J, Olsen KE, Gjerdrum LM, Nexo E. Quantitative PCR--new diagnostic tool for quantifying specific mRNA and DNA molecules: HER2/neu DNA quantification with LightCycler real-time PCR in comparison with immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. Scand J Clin Lab Invest 2004; 64:511-22.

351. Schnitt SJ, Collins LC. Invasive Breast Cancer. In: Biopsy Interpretation of the Breast. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2009, pp. 249-314.

352. Schonk DM, Kuijpers HJ, van Drunen E , van Dalen CH, Geurts van Kessel AH, Verheijen R, Ramaekers FCl. Assignment of the gene(s) involved in the expression of the proliferation-related Ki 67 antigen to human chromosome 10. Hum Genet 1989 83:297-9.

353. Scott RJ, Hall PA, Haldane JS, van Noorden S, Price Y, Lane DP, Wright NA. A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. J Pathol 1991; 165:173-8.

354. Selvajaran S, Bay BH, Choo A, Chuah KL, Sivaswaren CR, Tien SL, Wong CY, Tan PH. Effect of fixation period on HER2/neu gene amplification deteced by fluorescence in situ hybridization in invasive breast carcinoma. J Histochem Cytochem 2002; 50:1693-6.

355. Serrano-Olvera A, Dueñas- González A, Gallardo-Rincón D, Candelaria M, de la Garza-Salazar J. Prognostic, predictive and therapeutic implications of HER2 in invasive epithelial ovarian cancer. Cancer Treat Rev 2006; 32:180-90.

356. Sheikh MS, Rochefort H, García M. Overexpression of p21WAF1/CIP1 induces growth arrest, giant cell formation and apoptosis in human breast carcinoma lines. Oncogene 1995; 11:1899-905.

357. Shih C, Padhy LC, Murray M, Weinberg RA. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. Nature. 1981; 290:261-4.

358. Shin SJ, DeLellis RA, Ying L, Rosen PP. Small cell carcinoma of the breast: a clinicopathologic and immunohistochemical study of nine patients. Am J Surg Pathol 2000; 24:1231-38.

359. Shin SJ, Rosen PP. Solid variant of mammary adenoid cystic carcinoma with basaloid features: a study of nine cases. Am J Surg Pathol. 2002; 26:413-20.

360. Shin SJ, Chen B, Hyjek E, Vazquez M. Immunocytochemistry and fluorescence in situ hybridization in HER2/neu status in cell block preparations. Acta Cytol 2007; 51:552-7.

361. Shipley J. Putting the colours into chromogenic in situ hybridization (CISH). J Pathol 2006; 210:1-2.

362. Shousha S, Backhous CM, Alaghband-Zadeh J, Burn I. Alveolar variant of invasive lobular carcinoma of the breast. A tumor rich in estrogen receptors. Am J Clin Pathol 1986; 85:1-5.

363. Shousha S, Peston D, Amo-Takyi B, Morgan M, Jasani B. Evaluation of automated silver-enhance in situ hybridization (SISH) for detection of HER2 gene amplification in breast carcinoma excision and biopsy specimens. Histopathology 2009; 54:248-53.

364. Silver SA, Tavassoli FA. Pleomorphic carcinoma of the breast: clinicopathological analysis of 26 cases of an unusual high-grade phenotype of ductal carcinoma. Histopathology 2000; 36:505-14.

365. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science 1987; 235:177-82.

366. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, Press MF. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science 1989; 244:707-12.

367. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shack S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. N Engl J Med 2001; 344:783-92.

368. Slamon DJ, Press MF. Alterations in the TOP2A and HER2 genes: association with adjuvant anthracycline sensitivity in human breast cancers. J Natl Cancer Inst 2009; 101:615-8.

369. Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Press M, Mackey J, Glaspy J, Chan A, Pawlicki M, Pinter T, Valero V, Liu MC, Sauter G, von Minckwitz G, Visco F, Bee V, Buyse M, Bendahmane B, Tabah-Fisch I, Lindsay MA, Riva A, Crown J; Breast Cancer International Research Group. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. N Engl J Med 2011; 365:1273-83.

370. Słodkowska J, Filas V, Buszkiewicz E, Trzeciak P, Wojciechowski M, Koktysz R, Staniszewski W, Breborowicz J, Rojo MG. Study on breast carcinoma Her2/neu and hormonal receptors status assessed by automated images analysis systems: ACIS III (Dako) and ScanScope (Aperio). Folia Histochem Cytobiol 2010; 48:19-25.

371. Sorlie T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. Eur J Cancer 2004; 40: 2667–75.

372. Souder C, Leitzel K, Ali SM, Demers L, Evans DB, Chaudri-Ross HA, Hackl W, Hamer P, Carney W, Lipton A. Serum epidermal growth factor receptor/HER-2 predicts poor survival in patients with metastatic breast cancer. Cancer 2006; 107:2337-45.

373. Sparano JA, Paik S. Development of the 21-gene assay and its application in clinical practice and clinical trials. J Clin Oncol 2008; 26:721-8.

374. Starczynski J, Atkey N, Connelly Y, O'Grady T, Campbell FM, di Palma S, Wencyk P, Jasani B, Gandy M, Bartlett JM; UKNEQAS. HER2 gene amplification in breast cancer: a rogues' gallery of challenging diagnostic cases: UKNEQAS interpretation guidelines and research recommendations. Am J Clin Pathol 2012 ;137:595-605.

375. Stros M, Polanská E, Struncová S, Pospísilová S. HMGB1 and HMGB2 proteins up-regulate cellular expression of human topoisomerase IIalpha. Nucleic Acids Res 2009; 37:2070-86.

376. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. Breast 2008; 17:323-34.

377. Studzinsky GP. Oncogenes, growth, and the cell cycle: an overview. Cell Tissue Kinet 1989; 22:405-24.

378. Sumiyoshi K, Shibayama Y, Akashi S, Nohara T, Iwamoto M, Kobayashi T, Nishimura H, Yoshinaka R, Harada T, Tanigawa N. Detection of human epidermal growth factor receptor 2 protein and gene in fine needle aspiration cytology specimens and tissue sections from invasive breast cancer: can cytology specimens take the place of tissue sections? Oncol Rep 2006; 15:803-8.

379. Tan PH, Tse GM, Bay BH. Mucinous breast lesions: diagnostic challenges. J Clin Pathol. 2008; 61:11-9.

380. Tanaka S, Hu SZ, Wang TS, Korn D. Preparation and preliminary characterization of monoclonal antibodies against human DNA polymerase alpha. J Biol Chem 1982; 257: 8386-90.

381. Tanner M, Gancberg D, Di Leo A, Larsimont D, Rouas G, Piccart MJ, Isola J. Chromogenic in situ hybridization: a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. Am J Pathol 2000; 157:1467-72.

382. Tanner M, Isola J, Wiklund T, Erikstein B, Kellokumpu-Lehtinen P, Malmström P, Wilking N, Nilsson J, Bergh J. Scandinavian Breast Group Trial 9401, Topoisomerase IIalpha gene amplification predicts favorable treatment response to tailored and dose-escalated anthracycline-based adjuvant chemotherapy in HER-2/neu-amplified breast cancer: Scandinavian Breast Group Trial 9401. J Clin Oncol 2006; 24:2428-36.

383. Taucher S, Rudas M, Mader R M, Gnant M, Dubsky P, Roka S, Bachleitner T, Kandioler D, Steger G, Mittlböck M. Prognostic markers in breast cancer: the reliability of HER2/neu status in core needle biopsy of 325 patients with primary breast cancer. Wien Klin Wochenschr 2004; 116:26-31.

384. Taylor SR, Titus- Ernstoff L, Stitely S. Central values and variation of measured nuclear DNA contents in imprints of normal tissues determined by image analysis. Cytometry 1989; 10:382-7.

385. Tokunaga M, Land CE, Yamamoto T, Asano M, Tokuoka S, Ezaki H, Nishimori I. Incidence of female breast cancer among atomic bomb survivors, Hiroshima and Nagasaki, 1950-1980. Radiat Res 1987; 112:243-72.

386. Tse G, Moriya T, Niu Y. Special subtypes: Invasive papillary carcinoma. In: Lakhani SR, Ellis IO, Scnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. eds. WHO Classification of Tumours of the Breast. 4th ed. IARC: Lyon 2012; p. 64.

387. Tsiambas E, Karameris A, Dervenis C, Lazaris AC, Giannakou N, Gerontopoulos K, Patsouris E. HER2/neu expression and gene alterations in pancreatic ductal adenocarcinoma: a comparative immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization study based on tissue microarrays and computerized image analysis. JOP 2006; 7:283-94.

388. Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, Kaneko T, Iwase T, Akiyama F, Kato Y, Tsuda H, Ueda S, Sato K, Tamaki Y, Noguchi S, Kataoka TR, Nakajima H, Komoike Y, Inaji H, Tsugawa K, Suzuki K, Nakamura S, Daitoh M, Otomo Y, Matsuura N. One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. Clin Cancer Res 2007; 13: 4807-16.

389. Tubbs RR, Pettay JD, Roche PC, Stoler MH, Jenkins RB, Grogan TM. Discrepancies in clinical laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy: apparent immunohistochemical false-positives do not get the message. J Clin Oncol 2001; 19:2714-21.

390. Tubbs R, Skacel M, Pettay J, Powell R, Myles J, Hicks D, Sreenan J, Roche P, Stoler MH, Hainfeld J. Interobserver interpretative reproducibility of GOLDFISH, a first generation gold-facilitated autometallographic bright field in situ hybridization assay for HER-2/neu amplification in invasive mammary carcinoma. Am J Surg Pathol 2002; 26:908-13.

391. Usami S, Moriya T, Amari M, Suzuki A, Ishida T, Sasano H, Ohuchi N. Reliability of prognostic factors in breast carcinoma determined by core needle biopsy. Jpn J Clin Oncol 2007; 37:250-5.

392. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. J Clin Oncol 2005; 23:7212-20.

393. Vadgama J, Wu Y, Mehta M. HER2/neu overexpression in breast cancer: methods of detection and therapeutic implications. The molecular and cellular pathology of cancer progression and prognosis. Ed. GV Shebert, Reseach Signpost, Kerala 2006; pp. 327-58.

394. Vance GH, Barry TS, Bloom KJ, Fitzgibbons PL, Hicks DG, Jenkins RB, Persons DL, Tubbs RR, Hammond ME; College of American Pathologists. Genetic heterogeneity in HER2 testing in breast cancer. Panel summary and Guidelines. Arch Pathol Lab Med 2009; 133:611-2.

395. van de Vijver M, Peterse JL, Mooi WJ, Wisman P, Lomans J, Dalesio O, Nusse R. Neu-protein overexpression in breast cancer. Association with comedo-type ductal carcinoma in situ and limited prognostic value in stage II breast cancer. N Engl J Med 1988; 319:1239-45.

396. van de Vijver M, Bilous M, Hanna W, Hofmann M, Kristel P, Penault-Llorca F, Rüschoff J. Chromogenic in situ hybridisation for the assessment of HER2 status in breast cancer: an international validation ring study. Breast Cancer Res 2007; 9:R68. doi:10.1186/bcr1776.

397. Varga Z, Moelans CB, Zuerrer-Hardi U, Ramach C, Behnke S, Kristiansen G, Moch H. Topoisomerase 2A gene amplification in breast cancer. Critical evaluation of different FISH probes. Breast Cancer Res Treat 2012a; 133:929-35.

398. Varga Z, Tubbs RR, Wang Z, Sun Y, Noske A, Kradolfer D, Bosshard G, Jochum W, Moch H, Öhlschlegel C. Co-amplification of the HER2 gene and chromosome 17 centromere: a potential diagnostic pitfall in HER2 testing in breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2012b; 132:925-35.

399. Varshney D, Zhou YY, Geller SA, Alsabeh R. Determination of HER-2 status and chromosome 17 polysomy in breast carcinomas comparing HercepTest and PathVysion FISH assay. Am J Clin Pathol 2004; 121:70-7.

400. Viale G, Giobbie-Hurder A, Regan MM, Coates AS, Mastropasqua MG, Dell'Orto P, Maiorano E, MacGrogan G, Braye SG, Ohlschlegel C, Neven P, Orosz Z, Olszewski WP, Knox F, Thürlimann B, Price KN, Castiglione-Gertsch M, Gelber RD, Gusterson BA, Goldhirsch A; Breast International Group Trial 1-98. Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki-67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from Breast International Group Trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole. J Clin Oncol 2008a; 26:5569-75.

401. Viale G, Regan MM, Mastropasqua MG., Maffini F, Maiorano E, Colleoni M, Price KN, Golouh R, Perin T, Brown RW, Kovács A, Pillay K, Öhlschlegel C, Gusterson BA, Castiglione-Gersch M, Gelber RD, Goldhirsch A, Coates AS; International Breast Cancer Study Group. Predictive value of tumor Ki 67 expression in two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node-negative breast cancer. J Nat Cancer Inst 2008b; 100:207-12.

402. Vinatzer U, Dampier B, Streubel B, Pacher M, Seewald MJ, Stratowa C, Kaserer K, Schreiber M. Expression of HER2 and the coamplified genes GRB7 and MLN64 in human breast cancer: quantitative real-time reverse transcription-PCR as a diagnostic alternative to immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. Clin Cancer Res 2005; 11:8348-57.

403. Vocaturo A, Novelli F, Benevolo M, Piperno G, MarandinoF, Cianciulli AM, Merola R, Donnorso RP, Sperduti I, Buglioni S, Mottolese M. Chromogenic in situ hybridization to detect HER-2/neu gene amplification in histological and thinprep-processed breast cancer fine-needle aspirates: A sensitive and practical method in trastuzumab era. Oncologist 2006; 11:878-86.

404. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil J.C, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart S.J, Press M. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. J Clin Oncol 2002; 20:719-726.

405. Volas GH, Leitzel K, Teramoto Y, Grossberg H, Demers L, Lipton A. Serial serum c-erbB-2 levels in patients with breast carcinoma. Cancer 1996; 78:267-72.

406. Wang Q, Zambetty GP, Suttle DP. Inhibition of DNA topoisomerase IIa gene expression by the p53 tumor suppressor. Mol Cell Biol 1997; 17:389-97.

407. Wang JC. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. Nat Rev Mol Cell Biol 2002a; 3:430-40.

408. Wang S, Hossein Saboorian M, Frenkel EP, Haley BB, Siddiqui MT, Gokaslan S, Hynan L, Ashfaq R. Aneusomy 17 in breast cancer: its role in HER-2/neu protein expression and implication for clinical assessment of HER-2/neu status. Mod Pathol 2002b; 15:137-45.

409. Wang J, Xu B, Yuan P, Zhang P, Li Q, Ma F, Fan Y. TOP2A amplification in breast cancer is a predictive marker of anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy efficacy. Breast Cancer Res Treat 2012; 135:531-7.

410. Watt PM, Hickson ID. Structure and function of type II DNA topoisomerases. Biochem J 1994; 303:681-95.

411. Watt RA, Shatzman AR, Rosenberg M. Expression and characterization of the human c-myc DNA binding protein. Mol Cell Biol 1985; 5:448-56.

412. Weigelt B, Horlings HM, Kreike B, Hayes MM, Hauptmann M, Wessels LF, de Jong D, Van de Vijver MJ, Van´t Veer LJ, Peterse JL. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. J Pathol 2008; 216:141-50.

413. Weigelt B, Kreike B, Reis-Filho JS. Metaplastic breast carcinomas are basal-like breast cancers: a genomic profiling analysis. Breast Cancer Res Treat 2009a; 117:273-80.

414. Weigelt B, Reis-Filho JS. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? Nat Rev Clin Oncol 2009b; 6:718-30.

415. Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer: how special are they? Mol Oncol 2010a; 4:192-208.

416. Weigelt B, Mackay A, A'hern R, Natrajan R, Tan DS, Dowsett M, Ashworth A, Reis-Filho JS. Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis. Lancet Oncol 2010b; 11:339-49.

417. Wells CA, El-Ayat GA. Non operative breast pathology: apocrine lesions. J Clin Pathol 2007; 60:1313-20.

418. Wheeler DT, Tai LH, Bratthauer GL, Waldner DL, Tavassoli FA. Tubulolobular carcinoma of the breast: an analysis of 27 cases of a tumor with a hybrid morphology and immunoprofile. Am J Surg Pathol 2004; 28:1587-93.

419. Wirapati P, Sotiriou C, Kunkel S, Farmer P, Pradervand S, Haibe-Kains B, Desmedt C, Ignatiadis M, Sengstag T, Schütz F, Goldstein DR, Piccart M, Delorenzi M. Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. Breast Cancer Res. 2008; 10:R65.

420. Withoff S, Keith WN, Knol AJ, Coutts JC, Hoare SF, Mulder NH, de Vries EG. Selection of a subpopulation with fewer DNA topoisomerase II alpha gene copies in a doxorubicin-resistant cell line panel. Br J Cancer 1996; 74:502-7.

421. Wixom CR, Albers EA, Weidner N. HER2 amplification: correlation of chromogenic in situ hybridization with immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2004; 12:248-51.

422. Wolber RA, Dupuis BA, Wick MR. Expression of c-erbB-2 oncoprotein in mammary and extramammary Paget´s disease. Am J Clin Pathol 1991; 96:243-7.

423. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowset M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijer M, Wheeler TM, Hayes DF. American Society of Clinical Oncology/ College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. J Clin Oncol 2007; 25:118-45.

424. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American society of clinical oncology/college of american pathologists clinical practice guideline update. J Clin Oncol 2013; 31:3997-4013.

425. Xia W, Mullin RJ, Keith BR, Liu LH, Ma H, Rusnak DW, Owens G, Alligood KJ, Spector NL. Anti-tumor activity of GW572016: a dual tyrosine kinase inhibitor blocks EGF activation of EGFR/erbB2 and downstream Erk1/2 and AKT. Oncogene 2002; 21:6255-63.

426. Yaziji H, Gown AM. Accuracy and precision in HER2/neu testing in breast cancer: are we there yet? Hum Pathol 2004; 35:143-6.

427. Zaczek AJ, Markiewicz A, Seroczynska B, Skokowski J, Jaskiewicz J, Pienkowski T, Olszewski WP, Szade J, Rhone P, Welnicka-Jaskiewicz M, Jassem J. Prognostic significance of TOP 2A gene dosage in HER2 negative breast cancer. Oncologist 2012; 17:1246-55.

428. Zahr AS, Pishko MV. Encapsulation of paclitaxel in macromolecular nanoshells. Biomacromolecules 2007; 8:2004-10.

429. Zarbo RJ, Hammond EH. Conference summary, strategic science symposium. HER-2 testing of breast cancer patients in clinical practice. Arch Pathol Lab Med 2003; 127:5149-53.

430. Zhao J, Wu R, Au A, Marquez A, Yu Y, Shi Z. Determination of HER2 gene amplification by chromogenic in situ hybridization (CISH) in archival breast carcinoma. Mod Pathol 2002; 15:657-65.

431. Zwelling LA, Hinds M, Chan D, Altschuler E, Mayes J, Zipf TF. Phorbol ester effects on topoisomerase II activity and gene expression in HL-60 human leukemia cells with different proclivities toward monocytoid differentiation. Cancer Res 1990; 50:7116-22.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

VIII. ANEXO

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Breast Cancer Res Treat (2014) 143:81–89
DOI 10.1007/s10549-013-2791-8

PRECLINICAL STUDY

Dual-colour CISH is a reliable alternative to FISH for assessment of topoisomerase 2-alpha amplification in breast carcinomas

Tomás García-Caballero · Olga Prieto · Ángel Vázquez-Boquete · Francisco Gude · Patricia Viaño · María Otero · Teresa Curiel · Beatriz Fernández-Rodríguez · Concepción Parrado · Máximo Fraga · José R. Antúnez

Received: 7 September 2013 / Accepted: 23 November 2013 / Published online: 30 November 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract Anthracyclines are among the most powerful antineoplastic drugs available for breast cancer treatment. Although *HER2* amplification has been postulated to predict anthracycline benefit, numerous reports have demonstrated that *HER2/TOP2A* co-amplification is the clinically useful predictive marker of response to anthracyclines. The standard technique to evaluate gene status for target therapy selection is fluorescence in situ hybridization (FISH), but this technique has some disadvantages. Dual-colour chromogenic in situ hybridization (CISH) is an extension of the FISH protocol that allows bright-field microscopy and thus represents a user-friendly alternative to FISH. In order to evaluate whether dual-colour CISH is a reliable alternative to FISH in determining *TOP2A* gene amplification and to determine the frequency with which *TOP2A* and *HER2* were co-amplified, we analysed 100 invasive breast cancer specimens (70 consecutive and 30 *HER2*-amplified samples) using tissue microarrays. Thus, a 99 % agreement was found between *TOP2A* status determined by dual-colour CISH and FISH, as well as a high degree of correlation in *TOP2A* ratios using both techniques. *TOP2A* gene amplification was present in 8.6 % of the 70 consecutive samples studied, all of which were *HER2*-amplified. Co-amplification of *TOP2A* was observed in 46.5 % of the additional 30 *HER2*-amplified samples (no *TOP2A* amplification was seen in non-amplified *HER2* samples). We conclude that dual-colour CISH represents an excellent alternative to FISH for determination of *TOP2A* gene status in invasive breast cancer. Our results showing *TOP2A* amplification only in *HER2*-amplified cases also add to the evidence that *TOP2A* determination should be restricted to those cases.

Keywords Topoisomerase 2 alpha · HER2 · Breast cancer · Dual-colour CISH · FISH

T. García-Caballero (✉)
Department of Morphological Sciences, Faculty of Medicine-University Clinical Hospital, University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain
e-mail: tomas.garcia-caballero@usc.es

O. Prieto
Department of Pathology, Hospital Complex of Pontevedra, Pontevedra, Spain

Á. Vázquez-Boquete · P. Viaño · M. Otero · B. Fernández-Rodríguez · M. Fraga · J. R. Antúnez
Department of Pathology, University Clinical Hospital, Santiago de Compostela, Spain

F. Gude
Clinical Epidemiology Unit, University Clinical Hospital, Santiago de Compostela, Spain

T. Curiel
Department of Oncology, University Clinical Hospital, Santiago de Compostela, Spain

C. Parrado
Department of Histology, Faculty of Medicine, University of Málaga, Málaga, Spain

Introduction

Breast cancer is the most frequently diagnosed cancer and the leading cause of cancer death in females worldwide, accounting for 23 % (1.38 million) of total new cancer cases and 14 % (458,400) of total cancer deaths in 2008 [18].

Anthracyclines are among the most powerful antineoplastic drugs available for breast cancer treatment. However, anthracyclines exhibit a range of toxic effects, especially cardiotoxicity (which can lead to congestive

heart failure), but also acute leukaemia and myelodysplasia. To minimise such effects it is necessary to identify novel therapeutic targets that might be used in more individually tailored treatments [11] and to limit administration of drugs with known toxicity to patients who are likely to benefit the most.

Topoisomerase 2 is a homodimeric enzyme that exists in two isoforms in human cells: 170-kD topoisomerase 2 alpha (TOP2A) and 180-kD TOP2 beta [45]. TOP2A is a key enzyme in DNA metabolism. It catalyses transient double-strand breaks that resolve DNA topological problems during transcription, recombination, replication and chromosome partitioning [46, 47]. TOP2A is the target of anthracyclines, with their binding stabilizing the DNA double-strand breaks that can lead to apoptosis [20]. The *TOP2A* gene is located at 17q21-22, ~700 kb telomeric to *HER2*. Although *HER2* amplification has been postulated to predict anthracycline benefit, numerous reports have demonstrated that *HER2/TOP2A* co-amplification is in fact the clinically useful predictive marker of response to anthracyclines [5, 7, 37, 43, 44]. Interest in the analysis of *TOP2A* status has recently also increased following the demonstration that *TOP2A* gene amplification represents a favourable prognostic factor in patients with HER2-positive metastatic breast cancer treated with trastuzumab [8].

The gold standard technique for evaluation of gene status for selection for target therapy is fluorescence in situ hybridization (FISH), but this technique has some disadvantages (e.g. evaluation of tissue morphology is difficult in dark field and the fluorescence signal fades relatively quickly). Dual-colour chromogenic in situ hybridization (CISH), on the other hand, is an extension of the FISH technique that allows bright-field microscopy—with all the concomitant benefits of morphological visualisation—and long-term storage of slides. In a recent study we showed that dual-colour chromogenic detection is a reliable and robust technique for *HER2* testing in breast cancer [10]. Comparison between FISH and dual-colour CISH assays for *TOP2A* determination in breast carcinoma has also been reported, with a perfect correlation between the two techniques [15]. However, only a small number of cases were included in that study. The first aim of the current study, therefore, was to validate dual-colour CISH in *TOP2A* testing in a larger cohort of 100 patients. The second aim was to determine the frequency with which *TOP2A* and *HER2* were co-amplified.

Materials and methods

Patients and tumour samples

Routine formalin-fixed paraffin-embedded invasive breast carcinomas from 70 consecutive samples, corresponding to 69 women (one case was bilateral), were included in the study. Tissue samples were obtained from the archives of the Departments of Pathology in University Clinical Hospital of Santiago de Compostela (44 samples) and Pontevedra Hospital Complex (26 samples). The mean age of patients was 55.1 years (range 30–85 years). Sixty-eight samples were of ductal invasive carcinoma of no special type (NST) (15 corresponded to grade 1, 36 to grade 2 and 17 to grade 3) and two samples were of lobular invasive carcinoma (both grade 2). A representative block was selected for each sample. On a haematoxylin-and-eosin (HE)-stained slide, two representative tumour areas of interest were selected for tissue microarray (TMA) construction. Two tissue cores, each 1.5 mm in diameter, from the selected areas were placed into a recipient paraffin block using a microarrayer (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA). Four TMAs were constructed.

Since all samples in the consecutive series which showed *TOP2A* amplification also had *HER2* amplification (see Results), a second series, of *HER2*-amplified samples, was also studied in order to ascertain the rate of *HER2-TOP2A* co-amplification in a larger number of samples. For this purpose we selected 30 invasive breast carcinomas with HER2 positivity, e.g. HercepTest 3+ or 2+ amplified (FISH amplification was confirmed in all 3+ cases), from the archives of the Department of Pathology of University Clinical Hospital of Santiago de Compostela, and constructed a new TMA. Median age of these 30 patients was 63.4 years (range 29–94 years). Twenty-eight samples were of ductal invasive carcinoma NST (11 were grade 2 and 17 were grade 3) and two samples were of lobular invasive carcinoma (both grade 2).

Sections (4 μm) were cut from the TMA and stained with HE, to verify the presence of the invasive tumour. Then FISH and dual-colour CISH were carried out.

FISH protocol

FISH was conducted using *HER2/CEP17* FISH pharmDx and *TOP2A/CEP17* FISH pharmDx (both from Dako, Glostrup, Denmark). The *TOP2A* probe covers a total of 228 kb of the *TOP2A* amplicon on 17q21-22 and is labelled with Texas red. The *CEP17* probe covers the region 17p11.1-q11.1 and is labelled with fluorescein isothiocyanate (FITC) (Fig. 1a). Assays were performed according to the manufacturer's recommendations and subsequently evaluated at ×100 magnification using an Olympus BX51 fluorescence microscope (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a filter for 4′-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and a dual filter for Texas Red and FITC, and photographed using a DP70 digital camera (Olympus).

Breast Cancer Res Treat (2014) 143:81–89

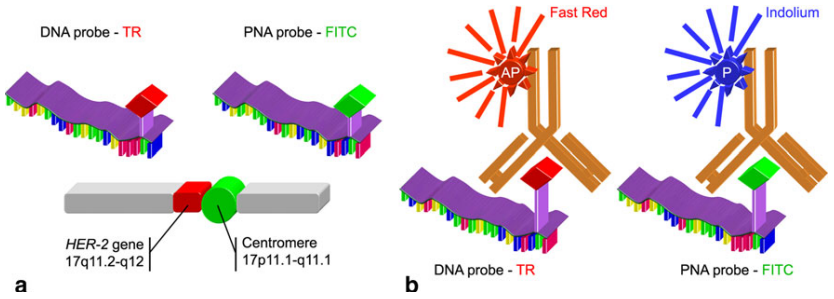


Fig. 1 **a** Schematic diagram of the FISH technique. *TOP2A* gene and CEN17 are hybridized by probes labelled with Texas red (TR) and isothiocyanate of fluorescein (FITC), respectively. **b** Diagram of dual-colour CISH technique. Antibodies to TR and FITC recognise these fluorochromes and are labelled with alkaline phosphatase (AP) and peroxidase (P), respectively. The fast red chromogen is used to visualise alkaline phosphatase and indolium for peroxidase, giving a red signal for *TOP2A* and blue signal for CEN17

Dual-colour CISH protocol

The DuoCISH (Dako) protocol for *TOP2A* consisted of the same initial steps as for the FISH procedure, with the exception that the final dehydration, air-drying and mounting steps were omitted. DuoCISH staining was performed automatically in a Dako Autostainer according to the manufacturer's instructions. Briefly, after washing and blocking peroxidase activity, sections were incubated with the CISH antibody mixture of an HRP-conjugated antibody to FITC and an AP-conjugated antibody to Texas Red for 30 min. To visualize the AP-conjugated antibodies, sections were incubated in red chromogen solution (Fast Red KL Salt) for 10 min. To visualize the HRP-conjugated antibodies, sections were incubated in blue chromogen solution (5-amino-2-[3-[5-amino-1,3-dihydro-3,3-dimethyl-1-(4-sulfobutyl)-2H-indol-2-ylidene]-1-propenyl]-3,3-dimethyl-1-(4-sulfobutyl)-3H-Indolium, tertrifluoroacetate) for 10 min (Fig. 1b). Sections were counterstained with haematoxylin for 5 min, rinsed with wash buffer and distilled water, and dried for 30 min at 37 °C. They were then mounted with permanent (non-alcohol, non-xylene based) mounting media, and evaluated and photographed using a BX51 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a DP70 digital camera (Olympus).

Scoring of FISH and dual-colour CISH slides

HER2 FISH results were analysed by one author (AVB), according to the guidelines for the Dako *HER2* FISH pharmDx kit. Following the ratio cut-off point approved by the US FDA, samples with ratios of *HER2*/CEN17 < 2 were considered non-amplified while ratios ≥ 2 were defined as amplified. The same ratio cut-off point was used for *TOP2A*/CEN17 to define *TOP2A* amplification, as established by several authors [3, 9, 20, 32, 37]. Evaluation of *TOP2A* FISH and DuoCISH were performed blinded and independently by three different authors (AVB for FISH, and MO and PV for CISH), according to the guidelines for the Dako *TOP2A* FISH pharmDx and Dako DuoCISH kits. For each sample, *TOP2A* and CEN17 signals from 20 nuclei were counted and the *TOP2A*/CEN17 ratio was calculated.

Statistical analyses

Agreement between *TOP2A* status in FISH and dual-colour CISH assays was evaluated using κ statistics [22]. To determine association of *TOP2A* status with age and histological grade, we used Student's *t* test and the Chi squared test, respectively. Correlation coefficients for FISH and dual-colour CISH, with each other and data with respect to *TOP2A*/CEN17 ratios and copy number per nucleus of *TOP2A* and CEN17 were calculated. For co-amplified samples, paired t-tests were used to compare *HER2* and *TOP2A* ratios. Wilcoxon's matched pairs test was used for comparisons between *TOP2A*/CEN17 ratios, and copy number per nucleus for *TOP2A* and CEN17. All statistical analyses were performed using SPSS 15 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), and results were expressed as mean ± SD.

Results

HER2 gene status, determined by FISH in the initial series of 70 consecutive samples of invasive breast cancer, was amplified in 13 samples (18.6 %).

Dual-colour CISH staining for *TOP2A* resulted in clearly discernible signals for *TOP2A* gene (red) and

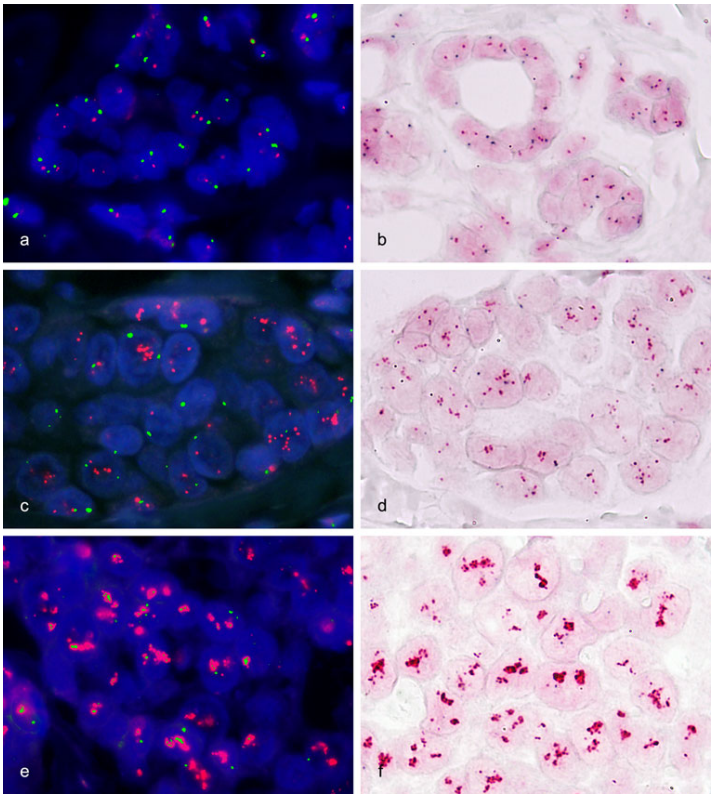


Fig. 2 **a** and **b** Non-amplified breast cancer sample studied by FISH (**a**) and dual-colour CISH (**b**). In both images the number of *red* (*TOP2A*) and *green* (**a**) or *blue* (**b**) signals (CEN17) correspond to a normal diploid state. **c** and **d** Low amplification. In this sample the number of *red* signals is clearly higher than the number of *green*/*blue* signals (1–2/cell). **e** and **f** High amplification. This tumour presented a huge number of *red* signals that frequently formed clusters. (Objective magnification ×100.)

CEN17 (blue) that allowed these signals to be easily counted at x40 or x60 using a dry objective lens. Representative examples of non-amplified and amplified samples obtained by DuoCISH are shown in Fig. 2. In non-amplified samples (Fig. 2a) the majority of cells had two red (*TOP2A*) and two blue (CEN17) signals. *TOP2A*-amplified tumours usually showed two blue signals but either a moderate (low amplification) (Fig. 2b) or large (high amplification) number of red signals (Fig. 2c).

TOP2A status determined by FISH and dual-colour CISH was concordant in 70/70 consecutive samples (kappa value = 1.0), indicating a perfect agreement between these two techniques. *TOP2A* gene amplification was found in 6/70 samples (8.6 %).

All *TOP2A*-amplified samples also showed *HER2* amplification (no *TOP2A* amplification was found in tumours with normal *HER2* status), but 7 *HER2*-amplified tumours did not show *TOP2A* co-amplification. In the TMA constructed with *HER2*-amplified cases, *TOP2A* status as determined by FISH and dual-colour CISH was concordant in 29/30 cases (kappa value = 0.93), indicating an almost perfect agreement. The one discrepant case was defined as amplified by FISH (ratio 2.4) but fell just below the cut-off point with DuoCISH (ratio 1.9). If the discrepant case was considered to be amplified (given that FISH is still regarded as the gold standard), 14/30 *HER2*-amplified cases (46.7 %) also showed *TOP2A* co-amplification.

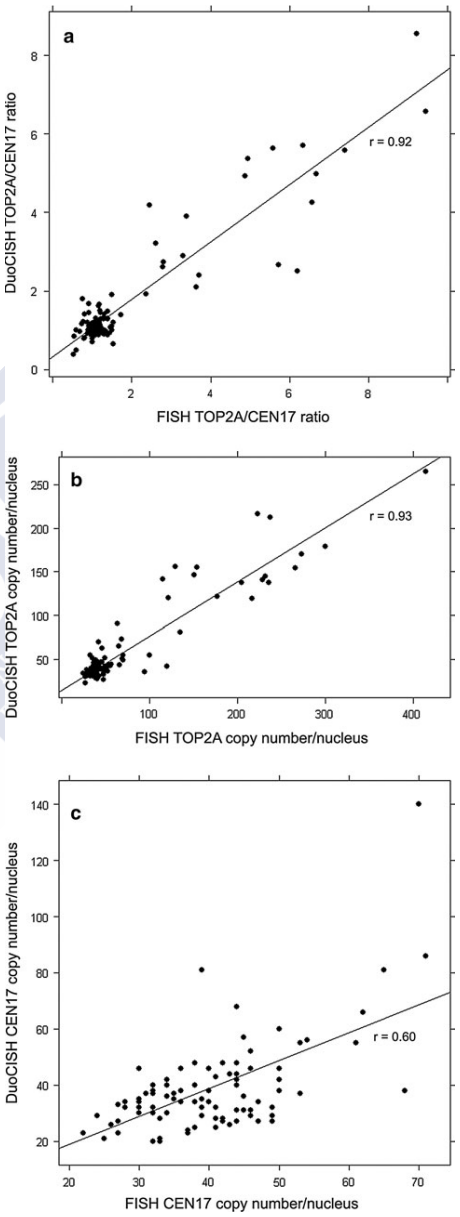


Fig. 3 Correlation between *TOP2A*/CEN17 ratios **(a)**, *TOP2A* copy number/nucleus **(b)** and CEN17 copy number/nucleus **(c)**, obtained by FISH and dual-colour CISH ▶

Combining the two series (consecutive and *HER2*-amplified samples), *TOP2A* status as determined by FISH and dual-colour CISH was concordant in 99/100 samples (kappa value = 0.97), indicating an almost perfect agreement between the two techniques (Table 1). Amplification of *TOP2A* in the presence of *HER2* amplification was found in a total of 20/43 samples (46.5 %). In co-amplified samples the mean *HER2*/CEN17 ratio was 6.74 ± 3.13, significantly higher than the mean *TOP2A*/CEN17 ratio which was 5.00 ± 2.18 ($p = 0.016$).

Median age in the combined cohort of 99 patients was 57.8 ± 14.5 years: in *TOP2A* non-amplified samples 57.5 ± 14.8 years and in amplified samples 58.9 ± 14.3 years. There was no association between *TOP2A* status and age ($p = 0.702$). With respect to tumour histological grade, *TOP2A*-amplified cases showed a trend towards a higher grade, although the association was not quite significant ($p = 0.055$) (Table 2).

Scatter plots of *TOP2A*/CEN17 ratios, *TOP2A* copy number/nucleus and CEN17 copy number/nucleus, followed by linear regression analysis, showed highly significant correlations between results obtained with FISH and dual-colour CISH (Fig. 3). The correlation coefficient (r) for *TOP2A*/CEN17 ratios was 0.92 ($p < 0.001$)

Table 1 Crosstabulation of *TOP2A* results for dual-colour CISH and FISH

Dual-colour CISH *TOP2A* status	FISH *TOP2A* status		Total
	Non-amplified	Amplified	
Non-amplified	80	1	81
Amplified	0	19	19
Total	80	20	100

Agreement 99 %

Kappa value 0.97

Table 2 Association between *TOP2A* status and histological grade

Histological grade	FISH *TOP2A* status		Total
	Non-amplified	Amplified	
1	14	1	15
2	42	9	51
3	24	10	34
Total	80	20	100

p value 0.005

(Fig. 3a); for *TOP2A* copy number/nucleus was 0.93 ($p < 0.001$) (Fig. 3b); and for CEN17 copy number/nucleus was 0.60 ($p < 0.001$) (Fig. 3c). Comparing FISH and DuoCISH by Wilcoxon's test for paired data revealed: (a) slight but insignificant differences in *TOP2A*/CEN17 ratios ($p = 0.051$); (b) significant differences in *TOP2A* gene copy number/nucleus ($p < 0.001$); and (c) no significant differences between CEN17 copy number/nucleus ($p = 0.124$) (Table 3).

Table 3 Means of *TOP2A*/CEN17 ratios, *TOP2A* copy number/nucleus and CEN17 copy number/nucleus obtained by FISH and dual-colour CISH

Ratios	FISH Mean ± SD	Dual-colour CISH Mean ± SD	*p* value
TOP2A/CEN17	1.88 ± 1.85	1.70 ± 1.46	0.051
TOP2A copy number/nucleus	3.71 ± 3.67	3.05 ± 2.44	<0.001
CEN17 copy number/nucleus	1.99 ± 0.49	1.93 ± 0.81	0.124

Discussion

FISH and the more recent dual-colour CISH and silver-grain ISH (SISH) are techniques routinely employed to analyse *HER2* status in breast cancer. The main advantage of dual-colour CISH over FISH is the use of light microscopy, avoiding the requirement of an expensive fluorescence microscope while allowing straightforward assessment of tumour morphology. The latter is specifically important in diagnosis of microinvasive cases, and more generally for collaborative discussion and training purposes. Other advantages are the ability to use ×40 or ×60 dry objective lenses, thus avoiding the use of immersion oil necessitated by FISH, and long-term storage of slides, allowing revision of results and retrospective studies. We have also found a significant reduction in the time needed to score the results of dual-colour CISH as compared with FISH [10]. The resolution of dual-colour CISH, but not SISH, moreover, allows counting of individual signals even in cases with high amplification, an important criterion for research.

Quantifiable results were obtained in all samples studied with FISH and dual-colour CISH ($n = 100$). We found an almost perfect agreement between FISH and dual-colour CISH in the determination of *TOP2A* status (99 % agreement), which is similar to that reported for *HER2* status [4, 10, 19, 25]. A smaller study of 20 cases has previously shown a 100 % agreement between FISH and dual-colour CISH in the assessment of *TOP2A* gene status [15].

We also found a high degree of correlation between FISH and dual-colour CISH with respect to *TOP2A*/CEN17 ratios, and copy number per nucleus ratios in both *TOP2A* and CEN17. Wilcoxon's test for paired data also showed no significant differences between *TOP2A*/CEN17 ratios and CEN17 copy number per nucleus for the two techniques. However, significant differences were seen in terms of *TOP2A* gene copy number per nucleus. This apparently unexpected result can probably be explained by an underestimation of the number of *TOP2A* red signals in amplified cases due to an overlapping of signals to form clusters [13]. Indeed, a similar result was previously obtained for *HER2* determination [10].

In the current study *TOP2A* gene amplification was found in 8.6 % of the initial series of consecutive samples. This is exactly the same frequency as that obtained by Arriola et al. [2], while similar data (7–10 %) have also been reported by several authors [5, 7, 24, 30, 37]. In the present series, *TOP2A* amplification was never observed in the absence of *HER2* amplification, which also agrees with several previous reports [2, 5, 8, 14, 37]. Other authors, however, have found *TOP2A* to be amplified in 2–4 % of *HER2* non-amplified cases [7, 29, 42]. Two studies, moreover, have found high levels of *TOP2A* gene expression, using quantitative PCR, in a statistically significant proportion of *HER2*-negative cases [12, 49]. Such discrepancies are difficult to explain without detailed analyses of methodology. However, our present data, obtained from a relatively large number of samples all analysed in the same standardized way, add further weight to the main body of evidence suggesting that TOP2A amplification is confined to *HER2*-amplified tumours. It is noteworthy that intratumoural heterogeneity of *TOP2A* amplification has been shown in almost 15 % of the *HER2*-amplified tumours [16]. We could not evaluate such heterogeneity due to the use of TMAs rather than whole sections.

TOP2A co-amplification occurred in 46.5 % of all the *HER2*-amplified samples studied, the same figure obtained by Konecny et al. [21]. The current result also agrees with the majority of published series, which have found 40–50 % co-amplification [1, 7, 9, 14, 16, 24, 42]. Lower co-amplification rates (21–37 %) have also been reported [7, 37, 43, 44]. In the co-amplified samples in the current study the mean *HER2*/CEN17 ratio (6.74) was significantly higher than the mean *TOP2A*/CEN17 ratio (5.00). This finding also corroborates previous results [9, 14, 29] and might be explained if amplification of the two genes is by different mechanisms, leading to higher level of amplification for *HER2* compared to *TOP2A* [29].

The predictive value of *TOP2A* gene status for benefit from anthracycline-based therapy in breast cancer remains controversial. Initially, overexpression/amplification of *c-erbB-2/HER2* was reported to predict sensitivity to anthracycline-based therapy [27, 36]. It was then proposed

that responsiveness to anthracyclines might in fact require the simultaneous amplification of *TOP2A* which is situated close to *HER2* on chromosome 17. It is, however, also known that *HER2* and *TOP2A* are not on the same amplicon and that when *HER2* is amplified, *TOP2A* can either be amplified or deleted [16]. Further studies have demonstrated that the best predictor of responsiveness to anthracycline-containing regimens is *HER2/TOP2A* co-amplification [5, 7, 37, 43, 44], although some authors consider that that finding does not justify restricting the use of anthracyclines only to patients showing co-amplification [6]. It has also been proposed that *TOP2A* amplification represents a favourable prognostic factor in patients with *HER2*-positive metastatic breast cancer treated with trastuzumab, and that this effect is associated with concurrent or previous exposure to anthracyclines [8].

It has also been suggested that *TOP2A* gene alterations (either amplification or deletion) are predictive of response to anthracyclines [20, 28, 33, 38]. However, *TOP2A* deletions have also been associated with anthracycline resistance [17, 48] and the association between *TOP2A* deletions and response to anthracyclines remains controversial. The use of different FISH ratio cut-off points (0.67–1.0) to define *TOP2A* deletions [37] has made comparisons been data sets difficult, and some authors consider it inappropriate to pool *TOP2A* amplification and deletion into a single group of *TOP2A* alterations on which to base predictions of a biological response to anthracyclines [31]. Indeed, a recent study of a large number of patients showed that *TOP2A* deletions were not associated with either disease-free or overall survival [37]. The role of chromosome 17 polysomy as a predictor of a pathologic complete response after neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy has also been suggested [35].

Some authors consider that TOP2A assessment at the protein level may be more relevant than *TOP2A* gene status for predicting benefit from anthracycline treatment [31, 42], because the drug target is TOP2A protein, not its gene or RNA. Moreover, in contrast to *HER2*, *TOP2A* gene levels do not correlate with protein levels [26, 34, 40], due to multifactorial complexity in the TOP2A translation pathway and the transcriptional regulatory role of proliferation signals [31]. It has also been proposed that TOP2A protein expression might be helpful in risk assessment in ER-positive breast cancer [39]. However, a recent study has shown low levels of TOP2A expression and ER-negative status to be predictors of a response to doxorubicin, but high levels of TOP2A protein to be a strong predictor of resistance to this drug [23]. Most authors agree that better detection and standardization of TOP2A protein expression will be required in order to verify the results obtained to date [31, 39, 41].

Finally, a recent report has shown that patients with tumours that have co-amplification of *HER2* and *TOP2A* (approximately 8 % of invasive breast cancers) experience equivalent survival outcomes, regardless of whether they are treated with a trastuzumab- or anthracycline-based regimen (the two cannot be combined due to significant long-term toxicity) [37].

In conclusion, dual-colour CISH represents a robust and user-friendly technique to determine *TOP2A* amplification in invasive breast carcinoma and our current data add weight to the evidence for limiting tests for *TOP2A* amplification to *HER2*-amplified cases.

Acknowledgments The authors thank Dako Spain for providing the *TOP2A/CEP17* FISH pharmDx kit.

Conflict of interest The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Arriola E, Moreno A, Varela M, Serra JM, Falo C, Benito E, Escobedo AP (2006) Predictive value of HER-2 and Topoisomerase II alpha in response to primary doxorubicin in breast cancer. Eur J Cancer 42:2954–2960
2. Arriola E, Rodriguez-Pinilla SM, Lambros MB, Jones RL, James M, Savage K, Smith IE, Dowsett M, Reis-Filho JS (2007) Topoisomerase II alpha amplification may predict benefit from adjuvant anthracyclines in HER2 positive early breast cancer. Breast Cancer Res Treat 106:181–189
3. Bofin AM, Ytterhus B, Hagmar BM (2003) TOP2A and HER-2 gene amplification in fine needle aspirates from breast carcinomas. Cytopathology 14:314–319
4. Brügmann A, Lelkaitis G, Nielsen S, Jensen KG, Jensen V (2011) Testing HER2 in breast cancer: a comparative study on BRISH, FISH, and IHC. Appl Immunohistochem Mol Morphol 19:203–211
5. Desmedt C, Di Leo A, de Azambuja E, Larsimont D, Haibe-Kains B, Selleslags J, Delaloge S, Duhem C, Kains JP, Carly B, Maerevoet M, Vindevoghel A, Rouas G, Lallemand F, Durbecq V, Cardoso F, Salgado R, Rovere R, Bontempi G, Michiels S, Buyse M, Nogaret JM, Qi Y, Symmans F, Pusztai L, D'Hondt V, Piccart-Gebhart M, Sotiriou C (2011) Multifactorial approach to predicting resistance to anthracyclines. J Clin Oncol 29:1578–1586
6. Di Leo A, Desmedt C, Bartlett JM, Piette F, Ejlertsen B, Pritchard KI, Larsimont D, Poole C, Isola J, Earl H, Earl H, Earl H, Mouridsen H, O'Malley FP, Cardoso F, Tanner M, Munro A, Twelves CJ, Sotiriou C, Shepherd L, Cameron D, Piccart MJ, Buyse M, HER2/TOP2A Meta-analysis Study Group (2011) HER2 and TOP2A as predictive markers for anthracycline-containing chemotherapy regimens as adjuvant treatment of breast cancer: a meta-analysis of individual patient data. Lancet Oncol 12:1134–1142
7. Fountzilas G, Valavanis C, Kotoula V, Eleftheraki AG, Kalogeras KT, Tzaida O, Batistatou A, Kronenwett R, Wirtz RM, Bobos M, Timotheadou E, Soupos N, Pentheroudakis G, Gogas H, Vlachodimitropoulos D, Polychronidou G, Aravantinos G, Koutras A, Christodoulou C, Pectasides D, Arapantoni P (2012) HER2 and TOP2A in high-risk early breast cancer patients treated with adjuvant epirubicin-based dose-dense sequential chemotherapy. J Transl Med 10:10. doi:10.1186/1479-5876-10-10
8. Fountzilas G, Christodoulou C, Bobos M, Kotoula V, Eleftheraki AG, Xanthakis I, Batistatou A, Pentheroudakis G, Xiros N,

Papaspirou I, Koumarianou A, Papakostas P, Bafaloukos D, Skarlos DV, Kalogeras KT (2012) Topoisomerase II alpha gene amplification is a favorable prognostic factor in patients with HER2-positive metastatic breast cancer treated with trastuzumab. J Transl Med 10:212. doi:10.1186/1479-5876-10-212

9. Fountzilas G, Dafni U, Bobos M, Kotoula V, Batistatou A, Xanthakis I, Papadimitriou C, Kostopoulos I, Koletsa T, Tsolaki E, Televantou D, Timotheadou E, Koutras A, Klouvas G, Samantas E, Pisanidis N, Karanikiotis C, Sfakianaki I, Pavlidis N, Gogas H, Linardou H, Kalogeras KT, Pectasides D, Dimopoulos MA (2013) Evaluation of the prognostic role of centromere 17 gain and HER2/topoisomerase II alpha gene status and protein expression in patients with breast cancer treated with anthracycline-containing adjuvant chemotherapy: pooled analysis of two Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG) phase III trials. BMC Cancer 13:163. doi:10.1186/1471-2407-13-163
10. García-Caballero T, Grabau D, Green AR, Gregory J, Schad A, Kohlwes E, Ellis IO, Watts S, Mollerup J (2010) Determination of HER2 amplification in primary breast cancer using dual-colour chromogenic in situ hybridization is comparable to fluorescence in situ hybridization: a European multicentre study involving 168 specimens. Histopathology 56:472–480
11. Glynn RW, Miller N, Whelan MC, Kerin MJ (2010) Topoisomerase 2 alpha and the case for individualized breast cancer therapy. Ann Surg Oncol 17:1392–1397
12. Glynn RW, Mahon S, Curran C, Callagy G, Miller N, Kerin MJ (2011) TOP2A amplification in the absence of that of HER-2/neu: toward individualization of chemotherapeutic practice in breast cancer. Oncologist 16:949–955
13. Hanna WM, Kwok K (2006) Chromogenic in situ hybridization: a viable alternative to fluorescence in situ hybridization in the HER2 testing algorithm. Mod Pathol 19:481–487
14. Hicks DG, Yoder BJ, Pettay J, Swain E, Tarr S, Hartke M, Skacel M, Crowe JP, Budd GT, Tubbs RR (2005) The incidence of topoisomerase II-alpha genomic alterations in adenocarcinoma of the breast and their relationship to human epidermal growth factor receptor-2 gene amplification: a fluorescence in situ hybridization study. Hum Pathol 36:348–356
15. Hoff K, Jørgensen JT, Müller S, Røngaard E, Rasmussen O, Schønau A (2010) Visualization of FISH Probes by dual-color chromogenic in situ hybridization. Am J Clin Pathol 133:205–211
16. Järvinen TA, Tanner M, Bärlund M, Borg A, Isola J (1999) Characterization of topoisomerase II alpha gene amplification and deletion in breast cancer. Genes Chromosom Cancer 26:142–150
17. Järvinen TA, Tanner M, Rantanen V, Bärlund M, Borg A, Grénman S, Isola J (2000) Amplification and deletion of topoisomerase IIalpha associate with ErbB-2 amplification and affect sensitivity to topoisomerase II inhibitor doxorubicin in breast cancer. Am J Pathol 156:839–847
18. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011) Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 61:69–90
19. Kato N, Itoh H, Serizawa A, Hatanaka Y, Umemura S, Osamura RY (2010) Evaluation of HER2 gene amplification in invasive breast cancer using a dual-color chromogenic in situ hybridization (dual CISH). Pathol Int 60:510–515
20. Knoop AS, Knudsen H, Balslev E, Rasmussen BB, Overgaard J, Nielsen KV, Schonau A, Gunnarsdóttir K, Olsen KE, Mouridsen H, Ejlertsen B, Danish Breast Cancer Cooperative Group (2005) Retrospective analysis of topoisomerase IIa amplifications and deletions as predictive markers in primary breast cancer patients randomly assigned to cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil or cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil: Danish Breast Cancer Cooperative Group. J Clin Oncol 23:7483–7490
21. Konecny GE, Pauletti G, Untch M, Wang HJ, Möbus V, Kuhn W, Thomssen C, Harbeck N, Wang L, Apple S, Jänicke F, Slamon DJ (2010) Association between HER2, TOP2A, and response to anthracycline-based preoperative chemotherapy in high-risk primary breast cancer. Breast Cancer Res Treat 120:481–489
22. Landis JR, Koch GG (1977) The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics 33:159–174
23. Martín M, Romero A, Cheang MC, López García-Asenjo JA, García-Saenz JA, Oliva B, Román JM, He X, Casado A, de la Torre J, Furio V, Puente J, Caldés T, Vidart JA, López-Tarruella S, Díaz-Rubio E, Perou CM (2011) Genomic predictors of response to doxorubicin versus docetaxel in primary breast cancer. Breast Cancer Res Treat 128:127–136
24. Moelans CB, de Weger RA, van Blokland MT, van der Wall E, van Diest PJ (2010) Simultaneous detection of TOP2A and HER2 gene amplification by multiplex ligation-dependent probe amplification in breast cancer. Mod Pathol 23:62–70
25. Mollerup J, Henriksen U, Müller S, Schønau A (2012) Dual color chromogenic in situ hybridization for determination of HER2 status in breast cancer: a large comparative study to current state of the art fluorescence in situ hybridization. BMC Clin Pathol 12:3. doi:10.1186/1472-6890-12-3
26. Mueller RE, Parkes RK, Andrulis I, O'Malley FP (2004) Amplification of the TOP2A gene does not predict high levels of topoisomerase II alpha protein in human breast tumor samples. Genes Chromosom Cancer 39:288–297
27. Muss HB, Thor AD, Berry DA, Kute T, Liu ET, Koerner F, Cirrincione CT, Budman DR, Wood WC, Barcos M, Henderson IC (1994) c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. N Engl J Med 330:1260–1266
28. Nielsen KV, Ejlertsen B, Møller S, Jørgensen JT, Knoop A, Knudsen H, Mouridsen HT (2008) The value of TOP2A gene copy number variation as a biomarker in breast cancer: update of DBCG trial 89D. Acta Oncol 47:725–734
29. Nielsen KV, Müller S, Møller S, Schønau A, Balslev E, Knoop AS, Ejlertsen B (2010) Aberrations of ERBB2 and TOP2A genes in breast cancer. Mol Oncol 4:161–168
30. Nikolényi A, Sükösd F, Kaizer L, Csörgo E, Vörös A, Uhercsák G, Ormándi K, Lázár G, Thurzó L, Brodowicz T, Kahán Z (2011) Tumor topoisomerase II alpha status and response to anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. Oncology 80:269–277
31. Oakman C, Moretti E, Sotiriou C, Viale G, Di Leo A (2009) Re: Topoisomerase II alpha and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. J Natl Cancer Inst 101:1735–1736
32. Olsen KE, Knudsen H, Rasmussen BB, Balslev E, Knoop A, Ejlertsen B, Nielsen KV, Schönau A, Overgaard J, Danish Breast Cancer Co-operative Group (2004) Amplification of HER2 and TOP2A and deletion of TOP2A genes in breast cancer investigated by new FISH probes. Acta Oncol 43:35–42
33. O'Malley FP, Chia S, Tu D, Shepherd LE, Levine MN, Bramwell VH, Andrulis IL, Pritchard KI (2009) Topoisomerase II alpha and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. J Natl Cancer Inst 101:644–650
34. O'Malley FP, Chia S, Tu D, Shepherd LE, Levine MN, Huntsman D, Bramwell VH, Andrulis IL, Pritchard KI (2011) Topoisomerase II alpha protein and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy with CEF compared to CMF in the NCIC CTG randomized MA.5 adjuvant trial. Breast Cancer Res Treat 128:401–409
35. Orlando L, Del Curto B, Gandini S, Ghisini R, Pietri E, Torrisi R, Balduzzi A, Cardillo A, Dellapasqua S, Veronesi P, Viale G, Goldhirsch A, Colleoni M (2008) Topoisomerase IIalpha gene status and prediction of pathological complete remission after anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in endocrine non-responsive Her2/neu-positive breast cancer. Breast 17:506–511
36. Paik S, Bryant J, Park C, Fisher B, Tan-Chiu E, Hyams D, Fisher ER, Lippman ME, Wickerham DL, Wolmark N (1998) erbB-2

and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. J Natl Cancer Inst 90:1361–1370
37. Press MF, Sauter G, Buyse M, Bernstein L, Guzman R, Santiago A, Villalobos IE, Eiermann W, Pienkowski T, Martin M, Robert N, Crown J, Bee V, Taupin H, Flom KJ, Tabah-Fisch I, Pauletti G, Lindsay MA, Riva A, Slamon DJ (2011) Alteration of topoisomerase II-alpha gene in human breast cancer: association with responsiveness to anthracycline-based chemotherapy. J Clin Oncol 29:859–867
38. Pritchard KI, Messersmith H, Elavathil L, Trudeau M, O'Malley F, Dhesy-Thind B (2008) HER-2 and topoisomerase II as predictors of response to chemotherapy. J Clin Oncol 26:736–744
39. Rody A, Karn T, Ruckhäberle E, Müller V, Gehrmann M, Solbach C, Ahr A, Gätje R, Holtrich U, Kaufmann M (2009) Gene expression of topoisomerase II alpha (TOP2A) by microarray analysis is highly prognostic in estrogen receptor (ER) positive breast cancer. Breast Cancer Res Treat 113:457–466
40. Romero A, Martín M, Cheang MC, López García-Asenjo JA, Oliva B, He X, de la Hoya M, García Sáenz JA, Arroyo Fernández M, Díaz Rubio E, Perou CM, Caldés Llopis T (2011) Assessment of Topoisomerase II α status in breast cancer by quantitative PCR, gene expression microarrays, immunohistochemistry, and fluorescence in situ hybridization. Am J Pathol 178:1453–1460
41. Romero A, Caldés T, Díaz-Rubio E, Martín M (2012) Topoisomerase 2 alpha: a real predictor of anthracycline efficacy? Clin Transl Oncol 14:163–168
42. Schindlbeck C, Mayr D, Olivier C, Rack B, Engelstaedter V, Jueckstock J, Jenderek C, Andergassen U, Jeschke U, Friese K (2010) Topoisomerase IIalpha expression rather than gene amplification predicts responsiveness of adjuvant anthracycline-based chemotherapy in women with primary breast cancer. J Cancer Res Clin Oncol 136:1029–1037
43. Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Press M, Mackey J, Glaspy J, Chan A, Pawlicki M, Pinter T, Valero V, Liu MC, Sauter G, von Minckwitz G, Visco F, Bee V, Buyse M, Bendahmane B, Tabah-Fisch I, Lindsay MA, Riva A, Crown J, Breast Cancer International Research Group (2011) Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. N Engl J Med 365:1273–1283
44. Tanner M, Isola J, Wiklund T, Erikstein B, Kellokumpu-Lehtinen P, Malmström P, Wilking N, Nilsson J, Bergh J (2006) Topoisomerase IIalpha gene amplification predicts favorable treatment response to tailored and dose-escalated anthracycline-based adjuvant chemotherapy in HER-2/neu-amplified breast cancer: Scandinavian Breast Group Trial 9401. J Clin Oncol 24: 2428–2436
45. Wang JC (1996) DNA topoisomerases. Annu Rev Biochem 65:635–692
46. Wang JC (2002) Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. Nat Rev Mol Cell Biol 3:430–440
47. Watt PM, Hickson ID (1994) Structure and function of type II DNA topoisomerases. Biochem J 303:681–695
48. Withoff S, Keith WN, Knol AJ, Coutts JC, Hoare SF, Mulder NH, de Vries EG (1996) Selection of a subpopulation with fewer DNA topoisomerase II alpha gene copies in a doxorubicin-resistant cell line panel. Br J Cancer 74:502–507
49. Zaczek AJ, Markiewicz A, Seroczynska B, Skokowski J, Jaskiewicz J, Pienkowski T, Olszewski WP, Szade J, Rhone P, Welnicka-Jaskiewicz M, Jassem J (2012) Prognostic significance of TOP2A gene dosage in HER-2-negative breast cancer. Oncologist 17:1246–1255