

CARCINOMA DE LA MAMA TRIPLE NEGATIVO ASPECTOS MORFOLÓGICOS Y EXPRESIÓN DE CK 5/6

ANA KARINA RAMÍREZ CASADIEGO, GINO ITALO BIANCHI

CENTRO CLÍNICO DE ESTEREOTAXIA- CECLINES, INSTITUTO ANATOMOPATOLÓGICO "DR. JOSÉ A O'DALY UCV. CARACAS, VENEZUELA

RESUMEN

El carcinoma mamario es una enfermedad heterogénea, parámetros de clasificación, factores pronósticos, no siempre predicen su curso clínico. La genética molecular, los ha estratificado en grupos diferentes a la clasificación morfológica. Trabajos respaldan que un grupo específico: carcinoma de "tipo basal" tiene peor pronóstico, es frecuentemente triple negativo, es decir: RE (-), RP (-), C-erbB-2(-) expresa citoqueratinas de epitelios basales, como la citoqueratina 5/6 (CK5/6, planteamos determinar los aspectos morfológicos de estos carcinomas, identificar la frecuencia en la que expresan CK5/6 por inmunohistoquímica, relacionarlos con parámetros clínicos disponibles. Se seleccionaron 91 carcinomas entre 2003 - 2008 se les realizó CK5/6. 34 (37,4 %) fueron TN-CK5/6(+) y 57 (62,6 %) fueron TN-CK5/6(-). Las características morfológicas descritas se observaron en ambos grupos, más frecuentemente en los carcinomas TN-CK5/6(+). La detección de estos tumores por inmunohistoquímica es una forma práctica, rentable de identificar a este grupo de peor pronóstico en la práctica diaria.

PALABRAS CLAVE: Cáncer, triple negativos, basal, morfológicos, inmunohistoquímica, CK5/6.

SUMMARY

Breast cancer is heterogeneous disease classification parameters prognostic factors are not always predictors its clinical course. Molecular genetics are categorizing in different ways, as the well-known morphologic classification. Studies endorse specific group within this classifying system: Basal-like carcinomas, has worst prognosis; tends to be triple-negative: ER (-), RP (-), Erb-B2(-); expresses basal cytokeratins, such as cytokeratin 5/6 (CK5/6). Considered determining morphological aspects, frequency in which they express CK5/6 through immunohistochemistry, and contrasting them to existing clinical parameters. 91 carcinomas were selected between the years 2003 - 2008 and checked for CK5/6. Or the aforementioned cases, 34 (37.4 %) resulted TN-CK5/6(+) and 57 (62.6 %) resulted TN-CK5/6(-). Morphological aspects described for and carcinomas were observed in both groups, though they were more frequent in breast carcinomas TN-CK5/6(+). For this reason, detecting these tumors using immunohistochemistry is a practical, worthwhile, and convenient way to identify this group with the worst prognosis on our daily routines.

KEYWORDS: Cancer, triplenegative, basal, morphological, immunohistochemistry, CK5/6.

INTRODUCCIÓN

E

l carcinoma mamario es una enfermedad heterogénea, en la que los parámetros tradicionales para clasificarlo y los factores pronósticos, no siempre predicen su curso clínico ⁽¹⁾. Es por esta

Recibido: 08/07/2010 Revisado: 24/10/2010

Aceptado para publicación: 07 /12/2010

Correspondencia: Dra. Ana K Ramírez. Centro Clínico de Estereotaxia - Ceclines. Av. Libertador. Edif. Siclar, PB. Municipio Libertador. Caracas, Venezuela. 1050. Tel: 58 212 7074411 E-mail: akramirez@gmail.com

razón que el estudio de los carcinomas de la mama por medio de métodos de genética molecular cobra cada vez mayor importancia, intentando establecer marcadores moleculares que permitan clasificarlo de forma más refinada, para lograr definir especialmente aquellos grupos de pacientes en los cuales sus resultados no pueden predecirse certeramente mediante los parámetros convencionales ^(2,3).

En estos últimos años, con el uso de técnicas de genética molecular, se ha postulado, que ciertos perfiles de expresión genética predicen el curso clínico de estos tumores, así como la sensibilidad de ellos al tratamiento ⁽⁴⁻⁷⁾. Se ha logrado proponer una clasificación con bases moleculares para el cáncer de mama, en la cual el “subtipo basal” (FB) interesa cada vez más a los investigadores por presentar un curso clínico desfavorable y una mayor susceptibilidad a algunos agentes quimioterapéuticos, comparado con los otros grupos moleculares, además de estar asociados en un porcentaje importante con mutaciones del gen BRCA1 (80 % a 90 %) ^(3,8,9-11).

Desde el punto de vista de técnicas convencionales como la inmunohistoquímica, para categorizar al carcinoma mamario desde la óptica morfológica, se sabe que los tumores mamarios que son receptores de estrógenos negativos, receptores de progesterona negativos y C-erbB-2 negativos (RE - / RP - / C-erbB-2 -), es decir, los llamados “triple negativos” (TN), tienden a ser biológicamente más agresivos y de difícil tratamiento dada la falta de efectividad de los blancos terapéuticos, además del hecho de ser en un porcentaje elevado tumores que expresan FB (>90 %). De esta manera los carcinomas mamarios relacionados a mutaciones del gen BRCA1, carcinomas mamarios TN y los de FB son grupos muy cercanamente relacionados, sin ser necesariamente lo mismo ⁽¹¹⁾.

En la necesidad de hacer los hallazgos genéticos cada vez más accesibles, estudios correlacionales entre las técnicas de genética molecular y estudios de inmunohistoquímica han

tenido lugar demostrando la relación que existe específicamente entre aquellos tumores de FB con la expresión de citoqueratinas basales por inmunohistoquímica y la correlación de estos hallazgos con el pronóstico de las pacientes, pudiendo utilizarse esta información como un indicador pronóstico ^(5,12).

Aunque aún no existe un consenso internacional para elegir un panel de anticuerpos que permita establecer el diagnóstico definitivo de carcinomas mamarios con FB, en numerosas publicaciones se ha propuesto varios paneles para hacer una clasificación más exacta por inmunohistoquímica ⁽¹³⁻¹⁶⁾. En general, se ha demostrado que para aquellos tumores ya confirmados por “*microarrays*” de ADN como de FB, su detección por inmunohistoquímica tiene una sensibilidad hasta del 76 % y una especificidad de hasta 100 % cuando se utilizan los anticuerpos sugeridos en forma combinada ⁽¹⁴⁾.

Se ha establecido que la CK5/6 es el marcador más sensible con un porcentaje de hasta el 90,1 % para algunos autores, seguida por el factor de crecimiento epidérmico 1 (HER1) con una sensibilidad del 73,33 % y la CK17 con 61 % o menos ^(14,16,17). Aunque el HER1 no es un marcador específico de las células de origen epitelial basal, como lo es la CK5/6, hay trabajos que apoyan que su expresión en los carcinomas de FB es lo suficientemente frecuente como para ser combinado con los otros marcadores y asistir en la identificación inmunohistoquímica de estos tumores ^(9,14).

Según diversos trabajos publicados, un promedio entre el 10 % al 20 % del total de carcinomas mamarios son de FB positivos para marcadores basales, y estos representan a su vez, más del 25 % de los tumores mamarios de alto grado ^(9,10,13,15).

Estos tumores, comparados con aquellos de “fenotipo luminal” tienden a ser de mayor grado histológico y tienen un peor pronóstico con mayor tendencia a cursar con metástasis pulmonares, cerebrales y con una sobrevida

más corta que aquellos tumores que no expresan marcadores basales ^(13,14,18). También se ha descrito que en aquellos grupos de pacientes con axila positiva, la positividad para marcadores basales no tiene ningún valor predictivo. Sin embargo, para aquellos pacientes con axila negativa, la positividad para estos marcadores basales se ha asociado con una sobrevida significativamente más corta independientemente del tamaño tumoral, del grado histológico o su inmunorreactividad para RE y C-erbB-2 ⁽¹³⁾.

Por todas estas razones, no es de extrañar que este tipo de tumores no solo tengan una sobreposición genética y fenotípica, sino que también compartan características morfológicas descritas, tales como: borde de avance tumoral romo (No infiltrativo), necrosis tumoral geográfica, esclerosis y/o necrosis central que recuerda cambios colagenosos regenerativos o necróticos, componente linfocitario abundante asociado, presencia de células tumorales fusiformes o células tumorales sarcomatoides, metaplasia escamosa y/o diferenciación escamosa, alto grado nuclear, alta tasa mitótica, elevada relación núcleo-citoplasma y arreglo sincicial de las células tumorales ^(11,15,18).

De tal manera, nos propusimos como objetivos de este trabajo caracterizar los aspectos morfológicos y expresión de la CK5/6 de los carcinomas mamarios TN, determinar sus aspectos morfológicos y su frecuencia en un grupo de casos, así como identificar qué porcentaje de ellos expresan CK5/6 por inmunohistoquímica.

MÉTODOS

Para este estudio la población estuvo constituida por 1 444 muestras de carcinomas mamarios que tuvieran inmunohistoquímica para RE, RP y C-erbB-2, diagnosticados en el Instituto Anatomopatológico de la Universidad Central de Venezuela (IAP-UCV), durante los años 2003 a 2008.

La muestra final estuvo conformada por 91 bloques de parafina de carcinomas mamarios infiltrantes TN, provenientes de piezas quirúrgicas.

Los criterios de inclusión fueron: casos diagnosticados como carcinomas mamarios infiltrantes con inmunohistoquímica para RE, RP y C-erbB-2 en los que los tres marcadores hayan resultado negativos (TN).

Se tomó como negativo el marcaje para receptores de estrógenos y de progesterona cuando no se observó inmunorreactividad nuclear en las células tumorales. Asimismo, se consideró negativo el marcaje para C-erbB-2 cuando no se observó inmunorreactividad de membrana en las células tumorales (0) o cuando la intensidad de la inmunorreacción mostró un marcaje débil (1+).

Los criterios de exclusión fueron: casos correspondientes a punción por aguja gruesa; material con cambios por autólisis o artificios marcados por procesamiento inadecuado; casos cuyas láminas y/o bloques no estaban disponibles en la sección de archivo del IAP; en los que el material incluido en parafina fue escaso o la cantidad de tumor con componente infiltrante en la(s) lámina(s) fue insuficiente y/o material en el que el tumor exhibió cambios posterior a tratamiento (radioterapia/quimioterapia).

Adicionalmente se seleccionó un caso de carcinoma basocelular y un caso de mesotelioma como controles para las pruebas de inmunohistoquímica.

Se hicieron cortes histológicos con espesor de 3 μ m que fueron recogidos en láminas silanizadas (Dako®) previamente identificadas con el número de la biopsia y nombre del anticuerpo primario utilizado. Las secciones histológicas se secaron y fueron incubadas en estufa a 60 °C por toda una noche. Posteriormente, se desparafinaron sumergiéndolas en 5 baños de xilol (5 min cada uno). Para su rehidratación, fueron pasadas por una batería de 4 alcoholes isopropílicos absolutos (5 min cada uno). Finalmente, las láminas se hidrataron en agua corriente durante 5 min.

Los antígenos a revelar mediante la prueba

inmunohistoquímica, se rescataron precalentando una solución *buffer* recuperadora (*Dako*® pH 6,0) y posteriormente incluyendo las láminas en la solución haciendo uso de una vaporera (*Oster*)® por 30 min.

Los cortes histológicos recuperados se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3 % en metanol durante 20 a 30 minutos. Seguidamente fueron lavados con agua y TBST 3 veces durante 15 minutos. El anticuerpo primario (CK5/6) se incubó sobre las secciones histológicas por una hora a la dilución de 1:200 determinada por titulación. Posteriormente, se lavaron las láminas con TBST 3 veces durante 15 minutos. Para la detección y amplificación de la señal se utilizó el Sistema *EnVision* (*Dako*)®. El anticuerpo secundario se incubó sobre los cortes histológicos por 20 minutos, seguido por lavados con TSBT 3 veces durante 15 minutos. Las reacciones antígeno-anticuerpo se revelaron utilizando diaminobencidina-peróxido de hidrógeno (DAB-H₂O₂) incubándolo sobre las secciones histológicas durante 5 a 10 minutos. Posteriormente, las reacciones fueron detenidas con agua corriente y el contraste nuclear se realizó con hematoxilina de Mayer. El montaje permanente de las láminas se hizo según la técnica histológica convencional.

Finalmente, se tomó como positivo el marcaje para CK5/6 cuando se observó: algún tipo de marcaje (débil o fuerte) citoplasmático o de membrana en las células tumorales.

Los datos obtenidos se registraron en un instrumento de recolección de datos. El resumen de las variables cualitativas se expresó en forma de porcentajes y el de las cuantitativas en forma de medidas aritméticas y desviaciones estándar. La significancia estadística de las diferencias entre las variables cualitativas se determinó con la prueba de Chi (χ^2) cuadrado así como con la prueba exacta de *Fisher*, con un nivel de confianza de 95 % (P significativa < 0,05). Los análisis estadísticos se realizaron con los programas SPSS 17.0®.

RESULTADOS

De un total de 1 444 biopsias a las cuales se les realizaron estudios de inmunohistoquímica para RE, RPy C-erbB-2, 277 (19,2 %) correspondieron a carcinomas mamarios TN.

De los 277 TN se excluyeron 186 casos por cumplir con los criterios de exclusión ya señalados. Solo 91 casos en total fueron seleccionados.

De la muestra de carcinomas mamarios TN 44/91 (48,3 %) fueron carcinomas ductales infiltrantes grado 3, 25/91 (27,5 %) fueron carcinomas ductales infiltrantes grado 2, 5/91 (5,5 %) fueron carcinomas apocrinos infiltrantes, 4/91 (4,4 %) fueron carcinomas papilares sólidos infiltrantes, 3/91 (3,3 %) fueron carcinomas ducto-lobulillares infiltrantes, 3/91 (3,3 %) fueron carcinomas metaplásicos infiltrantes, 2/91 (2,2 %) fueron carcinomas lobulillares infiltrantes, 2/91 (2,2 %) fueron carcinomas ductales infiltrantes grado 1, 1/91 (1,1 %) fue un carcinoma microinvasor, 1/91 (1,1 %) fue un carcinoma lobulillar pleomórfico infiltrante y 1/91 (1,1 %) fue un carcinoma mucinoso infiltrante (Cuadro 1). Ninguno de los carcinomas medulares que formaban parte de la población de este trabajo, pudieron contemplarse dentro de la muestra a estudiar por cumplir con los criterios de exclusión. 34/91 casos (37,4 %) resultaron CK5/6 positivos (CK5/6+). 57 casos (62,6 %) de los 91 casos fueron negativos para la CK5/6 (CK5/6-). Se conocía la edad de 17/34 carcinomas TN-CK5/6(+), situándose la media de edad en 54,8 años y de 25/57 carcinomas TN-CK5/6(-) con una media de edad de 56,5 años ($P=0,663$).

Del grupo de TN-CK5/6(+) 22/34 (64,7 %) fueron carcinomas ductales infiltrantes grado 3, 10/34 (29,4 %) fueron carcinomas ductales infiltrantes grado 2, 1/34 (2,9 %) fue un carcinoma metaplásico infiltrante y 1/34 (2,9 %) fue un carcinoma lobulillar pleomórfico infiltrante.

Del grupo de TN-CK5/6(+), se conocía el

Cuadro 1. Distribución de los carcinomas mamarios triple negativos y carcinomas mamarios triple negativos positivos a la CK 5/6 según diagnóstico histológico n=91

Tipo histológico	TN		TN-CK 5/6 (+)	
	n	%	n	%
Ductal infiltrante grado 3	44	48,3	22	64,7
Ductal infiltrante grado 2	25	27,5	10	29,4
Apocrino infiltrante	5	5,5	0	0,0
Papilar sólido infiltrante	4	4,4	0	0,0
Ducto-lobulillar infiltrante	3	3,3	0	0,0
Metaplásico infiltrante	3	3,3	1	2,9
Lobulillar infiltrante	2	2,2	0	0,0
Ductal infiltrante grado 1	2	2,2	0	0,0
Microinvasor	1	1,1	0	0,0
Lobulillar pleomórfico infiltrante	1	1,1	1	2,9
Mucinoso infiltrante	1	1,1	0	0,0
	91	100	34	100

Abreviaturas: TN, Triple Negativos; TN-CK5/6(+), Triple Negativos positivos a la CK5/6.

Fuente: Archivo del Instituto Anatomopatológico "Dr José Antonio O'Daly"-Universidad Central de Venezuela.

estado de los ganglios axilares de 8 pacientes. 4 de estos 8, tenían ganglios metastásicos. De los TN-CK5/6(-) solo 6 casos de los 14 casos con estado de los ganglios axilares conocido, tenían axila positiva ($P=0,746$).

El tamaño tumoral se conocía en 9 de los TN-CK5/6(+) y en 17 de los TN-CK5/6(-). El tamaño promedio para el primer grupo fue de 6,5 cm y para el segundo grupo fue de 3,9 cm ($P=0,048$).

CARACTERÍSTICAS ARQUITECTURALES

En términos generales, el componente linfocitario se asoció en 67/91 casos (73,6 %) y de este el de leve intensidad (+) fue el más frecuente (40,6 %). El componente linfocitario se vio más asociado a los TN-CK5/6(+) que a los TN-CK5/6(-). De la misma forma, el componente de mayor intensidad (+++) se asoció más con los

TN-CK5/6(+) (17,6 %) que a los TN-CK5/6(-) (5,3 %) ($P=0,009$). 14 casos (41,2 %) estuvieron asociados a leve (+) componente inflamatorio y 11 casos (32,4 %) a moderado (++), solo 3 casos (8,8 %) no se asociaron al componente inflamatorio en el grupo de TN-CK5/6(+), a diferencia del grupo de TN-CK5/6(-) en el que la mayoría de los casos (23 casos, 40,4 %) se asoció a un leve (+) componente inflamatorio, seguido por los casos que no estaban asociados a ningún grado de inflamación (21 casos, 36,8 %). 10 casos (17,5 %) de este grupo tenían asociado un componente inflamatorio moderado (++) (Cuadro 2) (Figura 1).

La necrosis tumoral geográfica se observó en 47/91 casos (51,6 %); en 26/34 casos (76,5 %) del grupo de TN-CK5/6(+) y en 21/57 casos (36,8 %) del grupo de TN-CK5/6(-) ($P=0,000$) (Figura 2b). El borde de avance tumoral como se observó en 50/91 casos (54,9 %); asimismo, se vió en 24/34 casos (70,6 %) del grupo de TN-CK5/6(+) y en 26/57 casos (45,6 %) del grupo de TN-

Cuadro 2. Relación de los aspectos morfológicos de los carcinomas mamarios triples negativos con la respuesta a la CK5/6

	TN-CK5/6(+)		TN-CK5/6(-)		
VARIABLES					
ARQUITECTURALES	n=34	%	n=57	%	Valor de P
Componente linfocitario					0,009
(+)	14/34	41,2	23/57	40,4	
(++)	11/34	32,4	10/57	17,5	
(+++)	6/34	17,6	3/57	3,3	
Necrosis geográfica	26/34	76,5	21/57	36,8	0,001
Borde avance romo	24/34	70,6	26/57	45,6	0,031
Esclerosis/necrosis central	18/34	52,9	18/57	31,6	0,044
Escaso estroma intratumoral	19/34	55,9	22/57	38,6	0,109
VARIABLES CITOLÓGICAS					
Grado nuclear					0,003
I	0/34	0,0	4/57	7,1	
II	7/34	20,6	28/57	48,2	
III	27/34	79,4	25/57	44,6	
Células fusiformes	15/34	44,1	13/57	22,8	0,033
Células claras	7/34	20,6	8/57	14,0	0,415
Aspecto en sincicio	7/34	20,6	20/57	35,1	0,143
Metaplasia escamosa	5/34	14,7	0/57	0,0	0,003
Características metaplasia*	1/34	2,9	2/57	3,5	0,883
Alta relación N:C	32/34	94,1	47/57	82,5	0,112

Abreviaturas: TN-CK5/6(+), Triple Negativos positivos a la CK5/6; TN-CK5/6(-), Triple Negativos negativos a la CK5/6; N:C, Núcleo/Citoplasma.

*Correspondió a metaplasia condroide, observada en carcinoma metaplásico.

Fuente: Archivo del Instituto Anatomopatológico "Dr José Antonio O'Daly"-Universidad Central de Venezuela.

CK5/6(-) (P=0,031). La esclerosis y/o necrosis central del tumor estuvo presente en 36/91 casos (39,6 %); en el grupo de los TN-CK5/6(+) se observó en 18/34 casos (52,9 %) y en el de los TN-CK5/6(-) en 18/57 casos (31,6 %) (P=0,044) (Figura 2d). El escaso estroma intratumoral se vio en 41/91 (45,1 %); en 19/34 (55,9 %) de los TN-CK5/6(+) y en 22/57 (38,5 %) de los TN-CK5/6(-) (P=0,109) (Cuadro 2).

CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS

Los TN-CK5/6(+) tuvieron un número mayor de mitosis con una media de 17,03 mitosis en

10 campos de mayor aumento, que aquellos TN-CK5/6(-), en los cuales se observó una media de 11,5 mitosis en 10 campos de mayor aumento (P=0,001). El alto grado nuclear (III) en general predominó en la muestra, observándose más frecuentemente en los TN-CK5/6(+) (79,4 %) que en los TN-CK5/6(-) (44,6 %) (P=0,003). La presencia de células fusiformes tumorales se vio en 28/91 casos (30,8 %); en 15/34 casos (44,1 %) de los TN-CK5/6(+) y en 13/57 (22,8 %) de los casos de TN-CK5/6(-) (P=0,033). Mostraron focos de células claras 15/91 casos (16,5 %); 7/34 (20,6 %) fueron TN-CK5/6(+) y 8/57 (14,0 %) TN-CK5/6(-) (P=0,415). 27/91

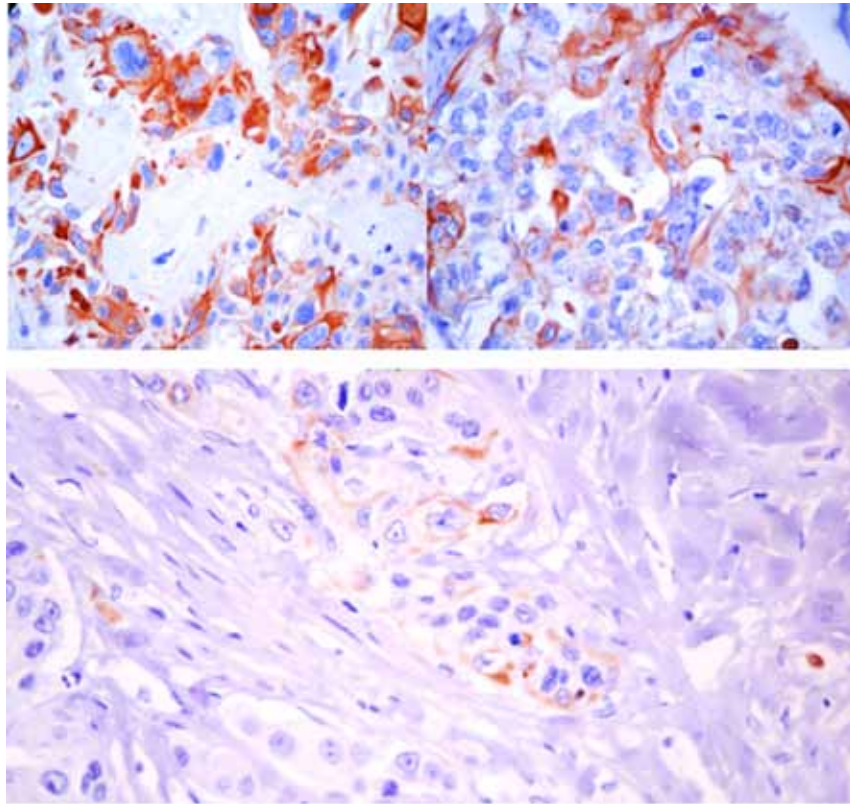


Figura 1. A. (40x) CK5/6 positiva de fuerte intensidad en el citoplasma de las células tumorales de un carcinoma metaplásico. B. (40x) CK5/6 positiva de fuerte intensidad en el citoplasma de las células tumorales de un carcinoma ductal infiltrante grado 3 con áreas de células claras. C. (40x) CK5/6 positiva de leve intensidad y con marcaje focal en el citoplasma de las células tumorales de un carcinoma ductal infiltrante grado 3.

casos (29,7 %) exhibieron aspecto en sincicio; de estos, 7/34 (20,6 %) fueron TN-CK5/6(+) y 20/57 casos (35,1 %) fueron TN-CK5/6(-) ($P=0,143$). La metaplasia escamosa intratumoral solo fue observada en el grupo TN-CK5/6(+); observándose en 5/34 casos de este grupo (14,7 %) ($P=0,003$) (Cuadro 2).

Solo en 3/91 tumores se vieron características de metaplasia distintas a la metaplasia escamosa y esta fue la metaplasia condroide observada en los carcinomas metaplásicos. 1 solo de ellos (2,9 %) fue CK5/6(+) ($P=0,112$). La mayoría de los carcinomas mamarios TN indistintamente de su respuesta a la CK5/6 tenían una alta relación núcleo/citoplasma ($P=0,112$) (Cuadro 2).

DISCUSIÓN

Los tumores de FB a diferencia de los de fenotipo luminal, son tumores que frecuentemente exhiben un mayor grado histológico y tienen peor pronóstico, con mayor tendencia a cursar con metástasis pulmonares, cerebrales y con una sobrevida más corta que aquellos tumores que no expresan marcadores basales. Además, un número importante de ellos son TN (90 %) y con frecuencia están asociados a mutaciones del gen BRCA1^(13,14,18). Desde el ámbito clínico, los carcinomas mamarios TN, son aquellos que no expresan RE, RP ni C-erbB-2 por métodos inmunohistoquímicos⁽¹¹⁾.

A pesar de aún no existir un consenso internacional para elegir un panel de anticuerpos que permita distinguir los carcinomas mamarios con FB, parece ser suficiente el uso de: RE, RP, C-erbB-2, CK5/6 y HER1 para identificar robustamente estos tumores a través de técnicas de inmunohistoquímica estándar. Estos mismos anticuerpos servirían además, según diversas publicaciones, para identificar y clasificar a estos pacientes en el ámbito clínico y para su evaluación retrospectiva ^(9,14,16,17).

Dada la sobreposición genética y fenotípica que estos tumores tienen, es fácil imaginar que además compartan características morfológicas, descritas como lo son: el borde de avance tumoral romo, necrosis tumoral geográfica, esclerosis y/o necrosis central, componente linfocitario abundante asociado, presencia de células tumorales fusiformes, metaplasia escamosa y/o diferenciación escamosa, alto grado nuclear, alta tasa mitótica, elevada relación núcleo-citoplasma, arreglo sincicial de las células tumorales ^(11,15,18).

De tal manera, que al plantearnos como objetivos para este trabajo determinar los aspectos morfológicos de los carcinomas de la mama TN y su frecuencia en un grupo de casos, identificar qué porcentaje de estos carcinomas expresan solo CK5/6 por inmunohistoquímica y relacionar los hallazgos morfológicos e inmunohistoquímicos con otros parámetros de importancia clínica y pronóstica disponibles encontramos que: en este estudio, el porcentaje de casos TN (19,18 %)

respecto a la población en estudio (1 444 biopsias), correspondió al porcentaje encontrado por los distintos trabajos para este grupo de tumores ^(9,10,13,15). Sin embargo, del total de los 91 carcinomas mamarios TN que constituyeron nuestra muestra, solo 34/91 (37,4 %) resultaron ser positivos a la CK5/6, siendo considerados por nosotros como tumores muy probablemente de FB. Estos resultados difieren de los porcentajes obtenidos por otros autores, para quienes el porcentaje de los carcinomas mamarios de FB, fue en todos los casos mayor al 50 % ⁽¹¹⁾ (Cuadro 3). Posiblemente esto tenga su explicación en lo propuesto por Livasy y col., y Nielsen y col., donde explican que al tratar de determinar carcinomas mamarios TN de FB solo con la utilización de CK5/6 por inmunohistoquímica, es probable que se esté dejando de detectar un grupo importante de estos tumores (hasta el 39 %) que definidos genéticamente, han demostrado ser negativos para este marcador ^(14,15).

Por otra parte, la edad promedio de las pacientes con carcinoma mamario TN-CK5/6(+) fue 54,76 años; similar a los parámetros observados por Buys y col., en los que ellos observaron una edad media para este grupo de 49,73 años ⁽¹⁶⁾.

La mayoría (22/34 casos, 64,7 %) de los TN-CK5/6(+) fueron tumores de alto grado histológico, correspondientes a carcinoma ductal infiltrante grado 3 y esto concuerda con los resultados de Livasy y col. ⁽¹⁵⁾.

Cuadro 3. Comparación de los carcinomas mamarios triple negativos y de tipo basal con la respuesta a la CK5/6 según distintos autores

Van de Rijn 2002	Nielsen* 2004	Livasy* 2006	Rakha† 2007	Buys 2008	Bhargava 2009	Ramírez 2009
57,1 %	57,0 %	61,0 %	69,0 %	94,0 %	71,0 %	37,4 %

*Expresión de CK5/6 en casos de tipo basal comprobados por microarrays

†Expresión de citoqueratinas (CK5/6 y CK14) en carcinomas mamarios triple negativos

Aunque no pudimos correlacionar la evolución clínica de las pacientes en las que conocíamos el estado de los ganglios axilares, podemos decir que en nuestro estudio el compromiso de la axila fue independiente de la positividad para la CK5/6. Sin embargo, a pesar de que estos hallazgos concuerdan con los resultados obtenidos por otros autores ⁽¹³⁾, fueron muy pocos los pacientes de los cuales poseíamos tal información.

En orden de frecuencia y en términos generales para ambos grupos, las características arquitecturales y citológicas más frecuentes en la muestra fueron: la elevada relación núcleo/citoplasma (79/91 casos, 86,8 %), el componente linfocitario asociado (67/91 casos, 73,6 %) y de este el de leve intensidad (+) (40,6 %), el alto grado nuclear (grado nuclear III) (52/91 casos, 57,1 %), el borde de avance tumoral romo (50/91 casos, 54,9 %), la necrosis tumoral geográfica (47/91 casos, 51,6 %), el escaso estroma intratumoral (41/91 casos, 45,1 %), la necrosis y/o esclerosis central (36/91 casos, 39,6 %), la presencia de células tumorales fusiformes (29/91 casos; 30,8 %), el aspecto en sincicio (27/91 casos; 29,7 %), la presencia de focos de células tumorales claras (15/91 casos, 16,5 %), la metaplasia escamosa (5/91 casos, 5,5 %) y la metaplasia condroide (3,3 %). De todas estas variables, nosotros consideramos que la elevada relación núcleo/citoplasma constituye un dato poco objetivo, el cual, a menos que estén establecidos muy claramente parámetros citomorfológicos específicos, siempre va a estar presente y en un número elevado en la muestra como sabemos, la mayoría de los tumores indistintamente de su origen comparten esta característica.

Por otra parte, al analizar los TN-CK5/6(+) por separado, observamos que este grupo estuvo asociado más frecuentemente a: un mayor tamaño tumoral; con componente linfocitario de mayor intensidad (++++) asociado; con porcentaje estadísticamente mayor de necrosis tumoral geográfica (76,5 %); bordes tumorales

expansivos (70,6 %) más que infiltrativos; a la presencia de necrosis y/o esclerosis central (52,9 %). Asimismo, estos tumores tuvieron un mayor número de mitosis, grado nuclear III (79,4 %), presencia de células fusiformes (44,1 %) y solo en este grupo se observó metaplasia escamosa. Todos estos hallazgos fueron estadísticamente significativos ($P < 0,04$).

Estos resultados, específicamente los correspondientes a las características morfológicas arquitecturales para los TN-CK5/6(+), son similares a los obtenidos por otros autores ^(11,13,16,18-21) tales como Livasy y col., para los cuales, por ejemplo, al igual que a nosotros la metaplasia escamosa solo fue observada en los tumores de FB. Sin embargo, ellos reportan no haber observado esclerosis y/o necrosis central a diferencia de nuestros resultados y de los obtenidos por Fulford y col., para quienes este hallazgo se observó en más del 40 % de los casos ^(15,18) (Cuadro 4).

Es importante tener en cuenta que las variaciones en los resultados de cada trabajo publicado en este ámbito, han sido ampliamente expuestas por diversos autores. Diferencias en los protocolos de fijación, manejo del material quirúrgico y finalmente los métodos en general de procesamiento, afectan en forma importante los patrones de expresión de genes que van a ser detectados por técnicas como la inmunohistoquímica ^(20,22). En Venezuela no encontramos ningún trabajo publicado sobre este tema con el cual comparar nuestros resultados. Podemos concluir que alrededor del 20 % de los carcinomas mamarios son TN y un porcentaje importante de este grupo (> 37 %) son de FB. Dada la sobreposición genética y fenotípica de los carcinomas mamarios TN y de FB, estos comparten características histopatológicas.

Las características morfológicas que fueron estadísticamente significativas según nuestros resultados para los TN-CK5/6(+) fueron en orden de significancia: la necrosis tumoral geográfica, la presencia de diferenciación escamosa del tumor

Cuadro 4. Comparación de los parámetros morfológicos con los resultados obtenidos por otros autores

VARIABLES	Ramírez 2009		Buys † 2009		Fulford* 2006		Livasy * 2006	
	CMTN-CK 5/6(+)		CMTN-CK 5/6(+)		FB		FB (CK5/6(+)	
	n=34	%	n=48	%	n=88	%	n=23	%
ARQUITECTURALES								
Componente linfocitario	31/34	91,2	46/48	96,8	31/88	35,0	13/23	56,0
Necrosis geográfica	26/34	76,6	32/48	66,6	67/88	76,0	17/23	100
Borde avance romo	24/34	70,6	23/48	47,9	24/88	27,2	14/23	61,0
Esclerosis/necrosis central	18/34	52,9	--	--	37/88	42,0	0/23	0,0
Escaso estroma intratumoral	19/34	55,9	--	--	--	--	--	--
VARIABLES CITOLÓGICAS								
Alta relación N:C	32/34	94,1	--	--	77/88	87,0	--	--
Grado nuclear III	27/34	79,4	42/48	87,5	85/88	96,0	15/23	65,0
Células fusiformes	15/34	44,1	--	--	13/88	15,0	--	--
Células claras	7/34	20,6	--	--	--	--	--	--
Aspecto en sincicio	7/34	20,6	--	--	26/88	30,0	--	--
Metaplasia escamosa	5/34	14,7	--	--	5/88	6,0	2/23	91
Características metaplasia§	1/34	2,9	--	--	--	--	--	--

Abreviaturas: CMTN-CK5/6(+): carcinoma mamario triple negativo positivo a la CK5/6; FB, fenotipo basal; CK5/6 (+), CK5/6 positivo; N:C: Relación núcleo/citoplasma.

†Expresión de CK5/6, factor de crecimiento epidérmico (ECFR), P63, CD117, Ki67 y P53 en carcinomas mamarios triple negativos.

*Expresión de CK5/6 en casos de tipo basal comprobados por microarrays.

§Correspondió a metaplasia condroide, observada en un carcinoma metaplásico.

o metaplasia escamosa, elevado grado nuclear (III), elevado componente linfocitario asociado, borde de avance tumoral romo, presencia de células fusiformes tumorales y necrosis / esclerosis central.

Los hallazgos morfológicos descritos en la literatura para estos tumores fueron observados tanto en los carcinomas mamarios TN-CK5/6(-) como en los TN-CK5/6(+), siendo más frecuentemente observados en los TN-CK5/6(+).

Debido a que los carcinomas mamarios TN y de FB comparten características morfológicas, estos parámetros por sí solos, no pueden ser usados para distinguir a los carcinomas mamarios de FB. Sin embargo, pueden ser de ayuda para establecer la necesidad de estudios moleculares y/o de inmunohistoquímica en estas pacientes.

Actualmente, la detección de la sobreexpresión de marcadores específicos basales (como la CK5/6) en conjunto con otras inmunorreacciones (probablemente el HER1) en tumores conocidos como TN, es una forma práctica, potencialmente objetiva, rentable y conveniente de identificar al menos la mayoría de los carcinomas mamarios de FB en la práctica diaria.

Consideramos que la afinación de criterios morfológicos a través de más estudios sobre este tema, pueden ayudar a los clínicos y patólogos a alertarlos en la necesidad de hacer estudios de inmunohistoquímica y/o moleculares dirigidos a definir este subtipo de carcinoma mamario, del cual ya se conoce su asociación con una peor sobrevida del paciente.

Es necesaria la estandarización de todos los aspectos referentes al manejo del material

quirúrgico, fijación, rendimiento de los protocolos de investigación e interpretación, para mejorar de forma más consistente la confiabilidad y la reproductibilidad de los resultados de la inmunohistoquímica en este campo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al IAP-UCV centro invaluable de la formación para patólogos en Venezuela, especialmente a la histotecnóloga Joyce Santiago de la sección de inmunohistoquímica, al Sr. Victor Escalona de la sección de archivo, y al Lic. Douglas Angulo estadista de la Comisión de Posgrado de la Facultad de Medicina de la UCV, gracias a quienes sin su ayuda y colaboración este trabajo no hubiese podido ser posible.

REFERENCIAS

1. Riley RD, Abrams KR, Sutton AJ, Lambert PC, Jones DR, Heney D, et al. Reporting of prognostic markers: Current problems and development of guidelines for evidence-based practice in future. *Br J Cancer*. 2003;88:1191-1198.
2. Alizadeh AA, Ross DT, Perou CM, Van de Rijn M. Towards a novel classification of human malignancies based on gene expression patterns. *J Pathol*. 2001;195:41-52.
3. Rakha EA, El-Rehim DA, Parish C, Green AR, Lee AHS, Robertson JF, et al. Basal phenotype identifies a poor prognostic subgroup of breast cancer of clinical importance. *Eur J Cancer*. 2006;42:3149-3156.
4. Pusztai L, Mazouni C, Anderson K, Wu Y, Symmans WF. Molecular classification of breast cancer: Limitations and potential. *Oncologist*. 2006;11:868-877.
5. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:10869-10874.
6. Morris SR, Carey LA. Molecular profiling in breast cancer. *Rev Endocr Metab Disord*. 2007;8(3):185-198.
7. Symmans WF. A pathologist's perspective on emerging genomic tests for breast cancer. *Semin Oncol*. 2007;34(3 Suppl):4-9.
8. Marchiò C, Reis-Filho JS. Molecular diagnosis in breast cancer. *Diag Histopathol*. 2008;14(5):202-213.
9. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature*. 2000;406:747-752.
10. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtype in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:8418-8423.
11. Diaz Lk, Cryns VL, Symmans WF, Sneige N. Triple negative carcinoma and the basal phenotype: From expression profiling to clinical practice. *Adv Anat Pathol*. 2007;14(6):419-430.
12. Perou CM, Jeffrey SS, Van de Rijn M, Rees CA, Eisen MB, Ross DT, et al. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:9212-9217.
13. Van de Rijn M, Perou CM, Tibshirani R, Haas P, Kallioniemi O, Kononen J, et al. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am J Pathol*. 2002;161:1991-1996.
14. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10:5367-5374.
15. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*. 2006;19:264-271.
16. Buys DLJ, Zarate A. Carcinoma mamario con inmunofenotipo similar al de las células basales. Estudio morfológico y perfil de expresión inmunohistoquímico en 54 casos triple negativos. *Patología*. 2008;46(4):303-308.
17. Bhargava R, Striebel J, Sushil B, Flickinger JC, Onisko A, Ahrendt G, et al. Prevalence, morphologic features and proliferation indices of breast carcinoma molecular classes using immunohistochemical surrogate markers. *Int Clin Exp Pathol*. 2009;2:444-455.
18. Fulford LG, Easton DF, Reis-Filho JS, Sofronis A, Gillett CE, Lakhani SR, et al. Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *Histopathology*.

-
- 2006;49:22-34.
19. Rakha EA, Putti TC, Abd El-Rehim DM, Paish C, Green AR, Powe DG, et al. Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. *J Pathol.* 2006;208(4):495-506.
 20. Fadare O, Tavassoli FA. The phenotypic spectrum of basal-like cancers: A critical appraisal. *Adv Anat Pathol.* 2007;14:358-373.
 21. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Paish EC, Lee AHS, Ellis IO. Breast carcinoma with basal differentiation: A proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression. *Histopathology.* 2007;50:434-438.
 22. Tang P, Skinner KA, Hicks DG. Molecular classification of the breast carcinomas by immunohistochemical Analysis, are we ready? *Diagn Mol Pathol.* 2009;18(3):125-132.