

## EXPRESIÓN DE KI-67 COMO FACTOR PRONÓSTICO EN LAS CLASES MOLECULARES DE CARCINOMA DE MAMA

CHIEN YANG HUNG, LUIS LÓPEZ, ALFONSINA LIZARDO, GABRIEL HERNÁNDEZ, FELIPE SALDIVIA, ANYELIN FERNÁNDEZ, IVANA SILVA, DAVID HARDISSON, ALDO REIGOSA

CENTRO DE INVESTIGACIONES MÉDICAS Y BIOTECNOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD DE CARABOBO (CIMBUC). INSTITUTO DE ONCOLOGÍA "DR. MIGUEL PÉREZ CARREÑO". DEPARTAMENTO DE SALUD PÚBLICA Y DESARROLLO SOCIAL, UNIVERSIDAD DE CARABOBO, VALENCIA, VENEZUELA. DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA, HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ, FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID, ESPAÑA.

### RESUMEN

**OBJETIVO:** Determinar si el índice de proliferación basado en la expresión del antígeno Ki-67 es un factor pronóstico que permite sub-clasificar las clases moleculares de carcinoma de mama. **MÉTODO:** 312 tumores de pacientes del Instituto de Oncología "Dr. Miguel Pérez Carreño" con carcinoma ductal infiltrante diagnosticadas entre 2000 a 2008. Se determinó la clasificación molecular según el perfil de expresión inmunohistoquímico de receptores hormonales y HER2; el índice de Ki-67 se estratificó en bajo ( $\leq 14,50\%$ ), intermedio ( $14,51\% - 25,50\%$ ) alto ( $\geq 25,51\%$ ). Asimismo, se registró edad, grado histológico, estadio clínico y evolución de acuerdo a la supervivencia global e intervalo libre de enfermedad a través de curvas de Kaplan Meier. **RESULTADOS:** En la serie, se clasificaron 132 casos (42,31 %) como luminal A, 66 (21,15 %) como luminal B, 27 (8,65 %) como HER2 y 87 (27,88 %) como triple negativo. Se observó que existe variación de evolución en cada clase molecular según el índice Ki-67, y se demostró dentro de cada clase que las pacientes con índice alto presentaron menor supervivencia global e intervalo libre de enfermedad, mientras que aquéllas pacientes con índice bajo mostraron mejor pronóstico con mayor supervivencia global e intervalo libre de enfermedad  $P \leq 0,05$ ). **CONCLUSIÓN:** El índice de Ki-67 permite establecer dentro de cada clase molecular subgrupos de mejor o peor pronóstico, con valores de corte de 14,5 % para los luminal A y de 25,51 para los luminal B, HER2 y triple negativo.

**PALABRAS CLAVE:** Carcinoma, mama, Ki-67, pronóstico, clases moleculares.

Recibido: 07/09/2011 Revisado: 21/01/2012  
Aceptado para publicación: 12/03/2012

### SUMMARY

**OBJECTIVE:** To determine if the proliferation index based on the Ki-67 antigen's expression is a prognostic factor in the molecular classes of the breast carcinoma. **METHOD:** The study was carried on 312 tumors of patients view in the "Dr. Miguel Pérez Carreño" Oncology Institute with have infiltrating ductal carcinoma of the breast diagnosed between the years 2000 and 2008. The molecular classification was done according to hormonal receptor expression profile by the immunohistochemistry; the Ki-67 index was stratified into low ( $\leq 14.50\%$ ), intermediate ( $14.51\% - 25.50\%$ ) and high ( $\geq 25.51\%$ ). Likewise the age, the histological grade, the clinical stage, and the evolution by the overall survival and the relapse free-survival through the curve of Kaplan Meier were established. **RESULTS:** In this group, 132 cases (42.31%) were classified into luminal A, 66 (21.15%) as luminal B, 27 (8.65 %) as HER2 and 87 (27.88 %) as triple negative. Variation in the evolution was observed in each molecular class according to the Ki-67 index. Therefore it was demonstrated in each class, that patients with high index presented lower overall survival and relapse free survival, whereas those whom had low index exhibited better prognosis with higher overall survival and relapse free survival. **CONCLUSION:** The proliferation index of Ki-67 expression allows to establish in each molecular class subgroups with better or worse prognosis, with cut-off values of 14.5 % for luminal A cases and 25.51 for luminal B, HER2 and triple negative.

**KEY WORDS:** Carcinoma, breast, Ki-67, prognosis, molecular classes.

Correspondencia: Dr. Aldo Reigosa. Instituto de Oncología "Dr. Miguel Pérez Carreño" antiguo psiquiátrico de Bárbula, Naguanagua, Valencia. Tel: 02418591432. E-mail: aldo.reigosa@gmail.com

## INTRODUCCIÓN

**E**l carcinoma de mama es el tumor maligno más frecuente en la mujer a nivel mundial<sup>(1,2)</sup>. En Venezuela, el cáncer de mama se ubicó en el segundo lugar de mortalidad por cáncer en mujeres en 2005, año en que ocurrieron 1 441 defunciones por esta patología y se diagnosticaron 3 408 casos nuevos, mientras que en 2007 se diagnosticaron 3 549 casos nuevos y 1 465 defunciones<sup>(3,4)</sup>. Recientemente, estudios sobre perfiles de expresión genética permitieron el establecimiento de una clasificación molecular de carcinoma de mama, donde se distinguen cuatro clases: luminal A, luminal B, HER2 y triple negativo. Al analizar las diferentes clases y asociarlas con el intervalo libre de enfermedad (ILE) y la supervivencia global (SG), se demostró que las clases receptor de estrógeno negativo (HER2 y triple negativo) estaban asociados a los tiempos más cortos de supervivencia, siendo las clases receptor de estrógeno positivo aquéllas con mejores tiempos de supervivencia<sup>(5)</sup>. A pesar de la aproximación pronóstica que brinda la clasificación molecular sobre la evolución de las pacientes diagnosticadas, persisten pacientes con cursos clínicos alejados del pronóstico derivado de la clasificación molecular, por lo que es necesario desarrollar marcadores pronósticos más eficaces y certeros en carcinoma de mama<sup>(6)</sup>.

Durante los últimos años, la incidencia de carcinoma de mama en Venezuela ha mostrado un notable ascenso en cuanto al número de casos nuevos y fallecidos<sup>(2-4)</sup>. Las dificultades en la conducta terapéutica se presentan debido a que pacientes con el mismo diagnóstico y estadio clínico, poseen diferencias en el desarrollo clínico y en la respuesta terapéutica a la enfermedad. La clasificación molecular de carcinoma de mama ha permitido definir diversos fenotipos en la presentación y evolución del carcinoma de mama, sin embargo, existe un porcentaje

de pacientes que escapan de estos perfiles pronósticos, surgiendo la necesidad de investigar otros factores más específicos dentro de la clasificación molecular para refinar el pronóstico y las conductas terapéuticas<sup>(6-10)</sup>.

Los estudios iniciales desarrollados para clasificar los carcinomas mamarios fueron publicados por Perou, y col., quienes lograron distinguir cinco clases de tumores de acuerdo a sus perfiles de expresión génica, siendo estos: luminal A, luminal B, luminal C, HER2 y basal<sup>(6)</sup>. Diversos investigadores se encargaron de validar la significancia pronóstica de la clasificación, entre ellos Muñoz y col., quienes concluyeron que la clasificación molecular era un marcador pronóstico significativo, y que los tumores HER2 y triple negativo, en comparación con los tumores luminal, tenían peor pronóstico y peor evolución clínica<sup>(11)</sup>. Del mismo modo, Zhao y col., que realizaron un análisis del ILE y la SG en pacientes con carcinoma de mama, obtuvieron resultados que demostraron que las clases HER2 y triple negativo tenían un peor pronóstico, en comparación con las clases luminal A y luminal B<sup>(12)</sup>. Por su parte, De Azambuja y col., realizaron meta-análisis incluyendo 12 155 pacientes en donde se relacionaba el índice de proliferación por Ki-67 con tiempos de ILE y SG, donde confirmaron el valor pronóstico del índice de proliferación en la estimación de supervivencia de pacientes con carcinoma de mama<sup>(13)</sup>. Asimismo, Bhargava y col., clasificaron molecularmente y correlacionaron 205 tumores con índices de proliferación por Ki-67, resultando que los tumores luminal tenían los índices bajos, los tumores HER2 índices moderados y los triple negativo los índices más altos, por lo que concluyeron que el índice se relacionaba significativamente con las clases moleculares, y que altos índices se asociaban a peor pronóstico<sup>(14)</sup>. Del mismo modo, Cheang y col., en el año 2009 estudiaron los índices de proliferación por Ki-67 en una cohorte de 144 tumores luminal A y B, resultando que los tumores luminal A tenían índices menores

(<14 %) y los tumores luminal B los mayores (>14 %); de forma independiente, también clasificaron molecularmente 2 598 tumores, que luego asociaron con el grado histológico, tamaño del tumor e índices de Ki-67. Los investigadores obtuvieron como resultado que los tumores luminal B y HER2 tenían una asociación estadísticamente significativa con ILE y SG más cortos que los tumores luminal A<sup>(15)</sup>. Basado en los perfiles de expresión genética por la técnica de micro arreglos de ADN de tejido se estableció la clasificación molecular<sup>(6,16)</sup>.

Los elementos discriminadores son la expresión del receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP) y del receptor de factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2). De acuerdo a la expresión del RE se divide el carcinoma de mama en dos grupos principales: tumores RE+, que incluyen las clases luminal A (RE+ y RP+, HER2-) y luminal B (RE +/- y/o PR+/-, HER2+/-); y tumores RE-, que comprenden las clases triple negativo (RE-, PR-, HER2-) y HER2 (RE-, PR-, HER2+) <sup>(6,17)</sup>. El pronóstico empeora en el siguiente orden: los tumores luminal A tienen el pronóstico más favorable; luminal B con pronóstico intermedio; y las clases HER2 y triple negativo con el pronóstico más sombrío <sup>(6,10,11,14,17)</sup>. En relación al pronóstico, uno de los factores de mayor relevancia lo constituye la determinación mediante inmunohistoquímica de índices de proliferación celular basados en la expresión del antígeno Ki-67 <sup>(18)</sup>. El cual es una proteína no histona del núcleo compuesta por una doble banda de 395 y 345 Kd que se expresa en las fases activas del ciclo celular: G2, S y M, de todas las células que se encuentran en proliferación, no siendo detectable en la fase G0 ni en la primera etapa de G1 <sup>(19,20)</sup>. La medición de la expresión del antígeno Ki-67 se hace mediante una técnica inmunohistoquímica basada en reacciones antígeno-anticuerpo <sup>(21)</sup>. Este método de marcación emplea un anticuerpo monoclonal de Ki-67, cuya estructura es una inmunoglobulina G<sub>1</sub>, la cual reacciona con el

antígeno nuclear Ki-67, reflejando un color característico posterior a la inmunotinción <sup>(20)</sup>. De esta manera, se obtiene el índice de proliferación basado en la expresión del antígeno Ki-67, el cual es un indicador que expresa el grado de proliferación tumoral mediante una evaluación cuantitativa de la positividad de Ki-67. Es así que mientras más elevado es el índice de Ki-67, mayor será la fracción de células tumorales en proliferación y la agresividad del tumor, lo cual es sugestivo de un pronóstico más sombrío <sup>(12,22,23)</sup>. Asimismo, la positividad del Ki-67 se correlaciona significativamente con el grado de diferenciación tumoral, invasión vascular, metástasis en ganglios linfáticos, ausencia de receptores hormonales, y tiempos de supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad menores, lo que da valor pronóstico importante a este factor <sup>(7,8,10-15,12,18,24-26)</sup>. Varios estudios señalan que altos índices de proliferación celular basados en la expresión del antígeno Ki-67 se asocian a mayor probabilidad de metástasis y menor supervivencia, lo que se traduce en peor pronóstico <sup>(7-10,15)</sup>; por lo tanto se planteó como objetivo determinar si el índice de proliferación basado en la expresión del antígeno Ki-67 permite discriminar mejor el pronóstico dentro de las clases moleculares de carcinoma de mama.

## MÉTODO

La población estuvo compuesta por 312 casos de mujeres diagnosticadas con carcinoma de mama en el Instituto de Oncología "Dr. Miguel Pérez Carreño" (IOMPC), durante el período 2000-2008. Se utilizó como material bloques de parafina procedentes del servicio de anatomía patológica de dicho instituto, correspondientes a los casos diagnosticados con carcinoma de mama, los cuales fueron sometidos a un estudio de inmunohistoquímica donde se evaluó la expresión del antígeno Ki-67. Los criterios de inclusión tomados en cuenta

fueron: mujeres diagnosticadas con carcinoma ductal infiltrante sin otra especificación, en el IOMPC en el período 2000-2008; bloque de parafina en buenas condiciones y biopsia recolectada antes de que la paciente haya sido expuesta a cualquier tratamiento. Las muestras tisulares se fijaron en formol al 10 % y se incluyeron en parafina siguiendo los métodos convencionales. De los bloques de parafina se obtuvieron secciones histológicas de 4  $\mu\text{m}$  de espesor que posteriormente se tiñeron con hematoxilina-eosina. Se revisaron las preparaciones histológicas y se seleccionaron cuidadosamente las zonas con tumor, marcando esas mismas áreas en el bloque de parafina. La edad, el estadio clínico y la evolución se obtuvieron de la historia clínica de cada paciente. Para el análisis de supervivencia se tomó como punto de corte un seguimiento de 60 meses (5 años), con un mínimo de 36 meses. El tiempo de seguimiento para pacientes no fallecidas varió de 36 a 112 meses.

Las matrices de tejidos (*microarrays*) así como las técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* fluorescente, fueron realizadas en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario La Paz, Madrid, España. Para realizar los *microarrays* de tejidos (TMA) se prepararon los bloques receptores o bloques únicamente de parafina, de un tamaño aproximado de 5 cm x 4 cm. Debía ser un bloque homogéneo y bien adherido al casete para evitar su desprendimiento al realizar la inserción de los cilindros. Se seleccionaron la serie de bloques donantes y separaron en grupos de 41 bloques. En cada tumor se seleccionaron dos zonas diferentes en el bloque de tejido (bloque donante). Se estableció el orden de estos bloques en una planilla que sirvió después para su lectura en el microscopio. El bloque receptor se colocó en la base del equipo *tissue arrayer* (estación de trabajo *Beecher Instruments, Silver Spring, MD, EE.UU*) ajustándose bien a esta para evitar su movimiento. Se comienza situando las agujas en el primer cilindro que se

va a realizar, ajustando las coordenadas de inicio en los tornillos micrométricos. El *tissue arrayer* consta de dos agujas de distintos calibre con las que se realiza el troquelado de los bloques. Con la aguja de mayor calibre se extrae un cilindro de parafina del bloque receptor dejando el espacio donde se introducen los cilindros obtenidos de los bloques donantes. Con la aguja de menor calibre se obtiene el cilindro con el material de la zona marcada del bloque donante que se introduce en el bloque receptor. Los cilindros deben introducirse intentando dejarlos al mismo nivel que el bloque de parafina para facilitar el corte de todos ellos. Para asegurar la zona elegida a estudio se realiza un duplicado de la plantilla en el mismo bloque, se obtuvieron así dos cilindros de 1 mm de diámetro de cada caso. Una vez terminado el proceso de troquelado de todos los bloques, se introdujo el nuevo bloque en la estufa a una temperatura de 45 °C durante 5 min, para que la parafina de los cilindros y del bloque receptor se amolden y la superficie se alise (Figura 1).

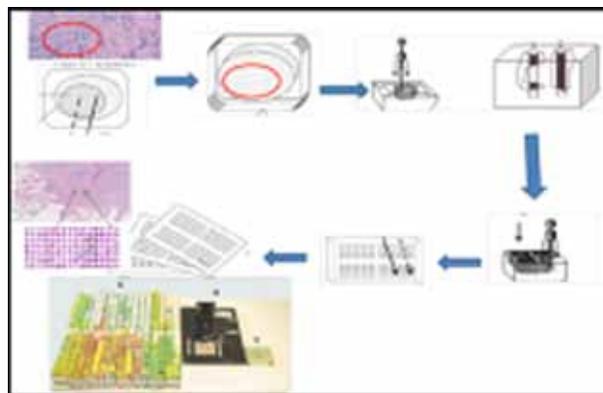


Figura 1. Representación esquemática de la construcción de matrices de tejidos.

## MÉTODO INMUNOHISTOQUÍMICO PARA DETECTAR LA EXPRESIÓN PROTEICA

Los cortes de los bloques se realizaron de 4 $\mu$ m en un micrótopo de rotación (*Microm HM350S*<sup>®</sup>) en cristales tratados para evitar el desprendimiento de los cortes y reintrodujeron durante 30 minutos a 65 °C en estufa para secarlos. Inicialmente se construyeron ocho bloques (siete con 41 casos y uno con 25 casos) y luego se construyó uno adicional, llamado TMA de rescate, con casos dudosos, caídos o sin células neoplásicas representativas en ambas muestras de un caso. La desparafinización y la recuperación antigénica se realizaron en un equipo (*PTL Link* casa comercial *DAKO*<sup>®</sup>) con un *buffer* Tris-EDTA pH9 (*DAKO*<sup>®</sup>) a 95 °C durante 20 min. Una vez terminada la recuperación antigénica, la inmunohistoquímica se efectuó en un equipo de inmunotinción automática en horizontal (*Autostainer plus*, *DAKO*<sup>®</sup>). Cada cilindro de los TMA fue visto en dos ocasiones y sus observaciones anotadas en cuadros diseñadas para tal fin. Se consideró como valor definitivo el promedio de las observaciones.

Los anticuerpos utilizados, la dilución, clon y fuente se muestran en el Cuadro 1.

Se consideró positivo cualquier tipo de inmunexpresión. Además de registrar la positividad o negatividad de la inmunorreactividad para cada

**Cuadro 1.** Dilución, clon y fuente de anticuerpos utilizados

Marcador	Dilución	Clon	Marca
RE	1/50	GF 11	Novocastra <sup>®</sup>
RP	1/100	clon 636	Dako <sup>®</sup>
HER-2/neu	Kit Herceptest		Dako <sup>®</sup>
Ki-67	1/100	clon MIB-1	Dako <sup>®</sup>

anticuerpo, se calculó el % de células positivas. Para RE y RP se utilizaron los parámetros del sistema de Allred <sup>(27)</sup>. El estado de HER2 se evaluó de acuerdo a los estándares habituales (patrones del *Herceptest*), así, se consideraron positivos los casos con inmunotinción valorada como 3+ y los casos con tinción equívoca (2+) en los que se comprobó la amplificación de HER2 mediante hibridización *in situ* fluorescente (FISH). Tres casos fueron considerados 2+ y tras la prueba de FISH, solo uno de ellos resultó con amplificación del HER2. Para el conteo de Ki-67 se tomaron cuatro microfotografías de cada caso, dos de cada cilindro, en un microscopio *Zeiss Axiostar plus*<sup>®</sup> con cámara *Canon PowerShot G9 12 MP*<sup>®</sup>, incorporada y conectada a ordenador con el programa *Axiovision*<sup>®</sup>. Luego se contaron las células positivas y negativas en cada imagen utilizando el programa “Bronce”, elaborado por el Ing. Víctor Barrios de la Universidad de Carabobo (Figura 2). Finalmente se obtuvo el promedio de los cuatro conteos.

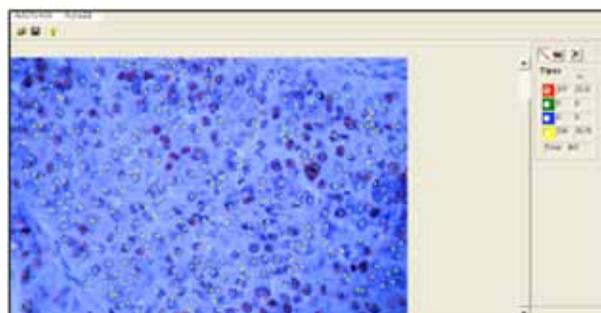


Figura 2. Programa “Bronce” utilizado para el cálculo del índice de Ki-67.

En base a los resultados de RE, RP y HER2, y de acuerdo a los criterios aceptados <sup>(28-30)</sup>; se clasificaron los casos como sigue:

- Luminal A: RE+ RP+;
- Luminal B: Positivo a RE o RP, independientemente del marcaje de HER2;

- HER2+: RE- RP- HER2+;
- Triple negativo: RE- RP- HER2-.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis estadísticos fueron realizados en SPSS versión 19 (SPSS, Inc., Chicago, IL<sup>®</sup>) para Windows<sup>®</sup>. El análisis estadístico se realizó a través de la estadística no para métrica con métodos de estadística bivariada. Se utilizó el coeficiente de correlación por rango de Spearman que permite la relación de una variable cualitativa con una cuantitativa, para realizar las asociaciones entre el índice de proliferación basado en la expresión del antígeno Ki-67 y las clases moleculares del carcinoma de mama, el grado histológico y el estadio clínico. De igual forma se utilizó la distribución de Chi cuadrado al 95 % de confianza para relacionar las clases moleculares de carcinoma de mama con la edad, estadio clínico, grado histológico y el índice de proliferación basado en la expresión de Ki-67. Para el análisis univariado y bivariado de la supervivencia se utilizó el método de Kaplan-Meier, a partir del cual fueron estimados el ILE y la SG de todas las variables en estudio, y la comparación entre las tasas de supervivencia de los diferentes subgrupos de pacientes se realizó mediante el test de *log rank*. El tiempo de SG fue calculado desde el momento del diagnóstico histológico hasta la muerte por la enfermedad o si la paciente aún se encontraba con vida hasta la fecha de corte del presente estudio (15 de junio 2011), mientras que el ILE corresponde al tiempo desde la mastectomía oncológica hasta los puntos de corte descritos anteriormente, aparición de recaída locorregional o metástasis.

## RESULTADOS

El estudio comprendió 312 casos de pacientes con carcinoma de mama en los cuales se calculó el Ki-67. El promedio de edad fue 50,84 años  $\pm$  1,16364, con un rango de 62 años (23-85);

de ellas el 47,8 % (n=149) tenían entre 41 y 50 años. En relación al grado histológico, la mayoría de los tumores fueron clasificados como grado II, 169 casos (54,17 %). En cuanto al estadio clínico, 250 casos (80,13 %) de las pacientes se ubicaron en los estadios II-III, con relativamente pocos casos en los estadios I y IV. Del mismo modo, se clasificaron molecularmente los 312 casos en estudio, de los cuales 132 (42,31 %) fueron clasificados como luminal A (LUM A), 66 (21,15 %) como luminal B (LUM B), 27 (8,65 %) como HER2 y 87 (27,88 %) como triple negativo (TN) Cuadro 2.

Con respecto al índice de Ki-67, el menor fue de 2,9 % y el mayor de 94,36 %. El promedio de células contadas fue 801,64  $\pm$  61,58, al 95 % de confianza; con una mediana para el número de células contadas de 692 y siendo el número menor de células contadas 48 y 3 923 el número mayor. En la Figura 3 y 4 se presentan ejemplos de las imágenes utilizadas para calcular el índice de proliferación, antes y después del conteo mediante el programa digital de marcaje manual "Bronce".

Se obtuvo una relación significativa ( $P < 0,001$ ) entre los índices de Ki-67 y las clases moleculares de carcinoma de mama, asociándose los índices más altos de Ki-67 a las clases moleculares HER2 y triple negativo (Cuadro 3).

Del mismo modo, al relacionar los índices de proliferación de Ki-67 con el grado histológico y el estadio clínico, se obtuvo que la correlación entre esas variables fue de +0,22 ( $P < 0,001$ ) y +0,27 ( $P < 0,001$ ), respectivamente, es decir, a mayor índice de proliferación, mayor es el grado histológico y el estadio clínico (Cuadro 3).

Al asociar las clases moleculares de carcinoma de mama con la edad agrupada por estratos, se encontró que casi la mitad de las pacientes en estudio (n=149, 47,8 %) se ubicaron en el estrato entre 41 y 50 años, sin embargo, su distribución no tuvo preferencia entre las diferentes clases moleculares. De igual forma ocurrió con los estratos extremos ( $\leq 40$  años y  $\geq 65$  años), con el

**Cuadro 2.** Características clínico patológicas y clases moleculares

Características	Indicador	F	%
Edad	≤40 años	45	14,40
	41-50 años	149	47,80
	51-65 años	84	26,90
	≥65 años	34	10,90
	Total	312	100
Grado histológico	I	44	14,10
	II	169	54,17
	III	99	31,73
	Total	312	100
Estadio clínico	I	29	9,29
	II	120	38,46
	III	130	41,67
	IV	33	10,58
	Total	312	100
Clase molecular	Luminal A	132	42,31
	Luminal B	66	21,25
	HER2	27	8,65
	Triple negativo	87	27,88
	Total	312	100

menor número de pacientes del estudio, donde también hubo una distribución equitativa entre las clases moleculares. Por lo tanto, en esta serie, las clases moleculares de carcinoma de mama no tuvieron una asociación estadísticamente significativa con la edad agrupada en estratos ( $P>0,05$ ) (Cuadro 4).

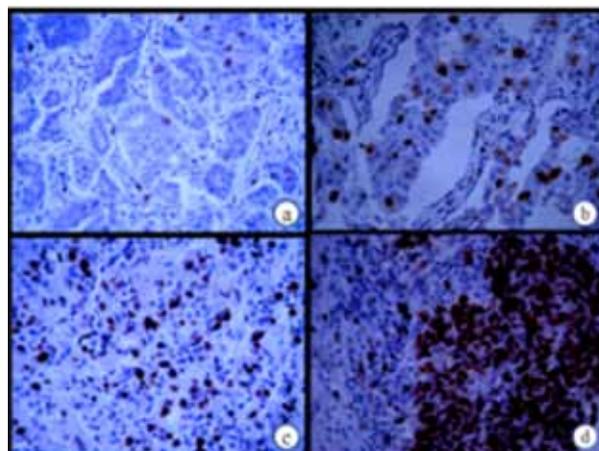


Figura 3. Tumores positivos para Ki-67. a) Luminal A, b) Luminal B, c) HER2 y d) Triple negativo (400x).

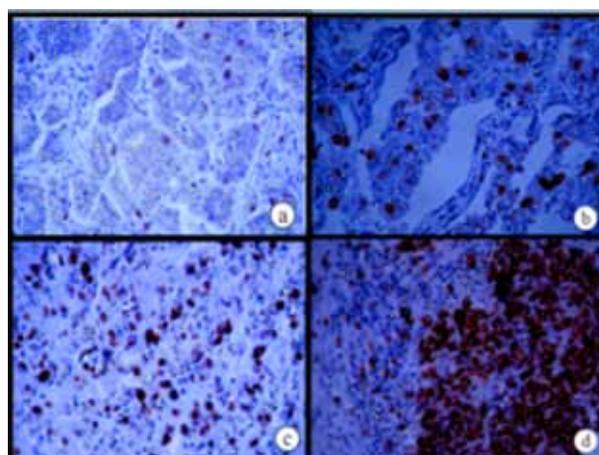


Figura 4. Índices de proliferación basados en la expresión del antígeno Ki-67: a) Índice bajo: 5,25 %; b) Índice intermedio: 20,10 %; c) Índice alto: 34,16 %; y d) Índice alto: 80,26 %. Células negativas para Ki-67: marca amarilla; células positivas para Ki-67: marca roja.

**Cuadro 3.** Cuadro resumen de correlaciones de Spearman de las variables en estudio

Variables	Rs	P
Índice de proliferación de Ki-67 con las clases moleculares	+0,27	< 0,001
Índice de proliferación de Ki-67 con el grado histológico	+0,27	< 0,001
Índice de proliferación de Ki-67 con los estadios clínicos	+0,22	< 0,001

**Cuadro 4.** Cuadro de contingencia de las clases moleculares de carcinoma de mama con la edad, estadio clínico, grado histológico e índice de proliferación.

	Clases Moleculares				Total (%1)	n	X <sup>2</sup>	P
	Luminal A (%1)	Luminal B (%1)	HER2 (%1)	Triple negativo (%1)				
<b>Edad</b>								
≤40 años	17 (12,9)	8 (12,1)	3 (11,1)	17 (19,5)	45 (14,4)	8,77	0,458	
41-50 años	65 (49,2)	35 (53,0)	13 (48,1)	36 (41,4)	149 (47,8)			
51-64 años	35 (26,5)	17 (25,8)	5 (18,5)	27 (31,0)	84 (26,9)			
≥ 65 años	15 (11,4)	6 (9,1)	6 (22,2)	7 (8,0)	34 (10,9)			
Total	132 (42,302)	67 (21,22)	27 (8,72)	87 (27,92)	312 (100)			
<b>Grado Histológico</b>								
I	36 (27,3)	5 (7,6)	1 (3,7)	2 (2,3)	44 (14,1)	68,29	<0,001	
II	76 (57,6)	45 (68,2)	9 (33,3)	39 (44,8)	169 (54,2)			
III	20 (15,2)	16 (24,2)	17 (63,0)	46 (52,9)	99 (31,7)			
Total	132 (42,302)	67 (21,22)	27 (8,72)	87 (27,92)	312 (100)			
<b>Estadio clínico</b>								
I	25 (18,9)	1 (1,5)	1 (3,7)	2 (2,3)	29 (9,3)	58,92	<0,001	
II	62 (47,0)	29 (43,9)	4 (14,8)	25 (28,7)	120 (38,5)			
III	37 (28,0)	34 (51,5)	16 (59,3)	43 (49,4)	130 (41,7)			
IV	8 (6,1)	2 (3,0)	6 (22,2)	17 (19,5)	33 (10,6)			
Total	132 (42,302)	67 (21,22)	27 (8,72)	87 (27,92)	312 (100)			
<b>KI-67 %</b>								
≤14,50 %	54 (40,9)	20 (30,3)	6 (22,2)	7 (8,0)	87 (27,9)	42,94	<0,001	
14,51-25,50 %	38 (28,8)	17 (25,8)	6 (22,2)	17 (19,5)	78 (25,0)			
≥25,51 %	40 (30,3)	29 (43,9)	15 (55,6)	63 (72,4)	147 (47,1)			
Total	132 (42,302)	67 (21,22)	27 (8,72)	87 (27,92)	312 (100)			

Igualmente, al asociar las clases moleculares de carcinoma de mama con el grado histológico se observó que más de la mitad de los casos con grado histológico III correspondían a las clases HER2 y triple negativo; mientras que los casos con grado histológico I correspondían casi en la totalidad de los casos a las clases luminal A y B, esto significa que las clases moleculares de carcinoma de mama tienen una asociación estadísticamente significativa con el grado histológico ( $P < 0,001$ ) (Cuadro 4).

Al relacionar las clases moleculares de carcinoma de mama con el estadio clínico, se obtuvo que del total de pacientes en estadio I,

el 86,2 % ( $n=25$ ) eran de la clase luminal A; mientras que del total de pacientes en estadio IV, más del 50 % correspondían a pacientes de la clase triple negativo. En los estadios clínicos II-III se ubicaron más del 95 % de las pacientes del tipo luminal B y más del 70 % del tipo HER2. Por lo tanto, se evidenció una asociación estadísticamente significativa con el estadio clínico ( $P < 0,001$ ) (Cuadro 4). La asociación de las clases moleculares de carcinoma de mama con los índices de Ki-67 clasificados por estrato, mostró que más del 50 % de los tumores clasificados como luminal A y B se asociaron a índices de proliferación bajos o intermedios

y, para el caso de los tumores HER2 y triple negativo, más del 50 % de estos tuvieron índices de proliferación altos. En el caso de luminal A y luminal B, el 69,7 % (n=92) y 56,1 % (n=37) respectivamente, correspondieron a tumores con índices de proliferación bajos o intermedios; mientras que en las clases HER2 y triple negativo, el 55,5 % (n=15) y el 72,4 % (n=63) respectivamente, fueron tumores con índices de proliferación altos (Cuadro 4). Ello demuestra una asociación entre las clases moleculares luminal A y B con índices de proliferación bajo/intermedios, y que las clases moleculares HER2 y triple negativo se asocian con índices de proliferación altos ( $P < 0,001$ ).

Al asociar la edad, el grado histológico y el estadio clínico con la evolución de los casos en estudio, los gráficos de Kaplan-Meier (Figura 5 y 6) mostraron asociación significativa estadísticamente entre el ILE con el grado histológico ( $\log\text{-rank} = 17,295 / P < 0,001$ ) y el estadio clínico ( $\log\text{-rank} = 60,637 / P < 0,001$ ). Sin embargo, no hubo relación estadísticamente significativa entre la edad por estratos y el ILE ( $\log\text{-rank} = 2,791 / P = 0,425$ ). Igualmente, los gráficos de Kaplan-Meier (Figura 5 y 6) mostraron asociación significativa estadísticamente entre la SG con el grado histológico ( $\log\text{-rank} = 24,374 / P < 0,001$ ) y el estadio clínico ( $\log\text{-rank} = 47,451 / P < 0,001$ ), pero no se encontró relación estadísticamente significativa entre la edad por estratos y la SG ( $\log\text{-rank} = 2,791 / P = 0,441$ ) (Cuadro 5).

Por otro lado, al asociar los subtipos moleculares de carcinoma de mama con la evolución de los casos en estudio, los gráficos de Kaplan-Meier para el ILE y la SG permitieron identificar, con evidencias estadísticamente significativas, que los subtipos moleculares HER2 y triple negativo son factores de mal pronóstico en el cáncer de mama (Figura 7 y 8). Después de 5 años de seguimiento la media para el ILE en el luminal A, luminal B, HER2 y triple negativo fue de 44,5 meses; 38,9 meses; 29,8

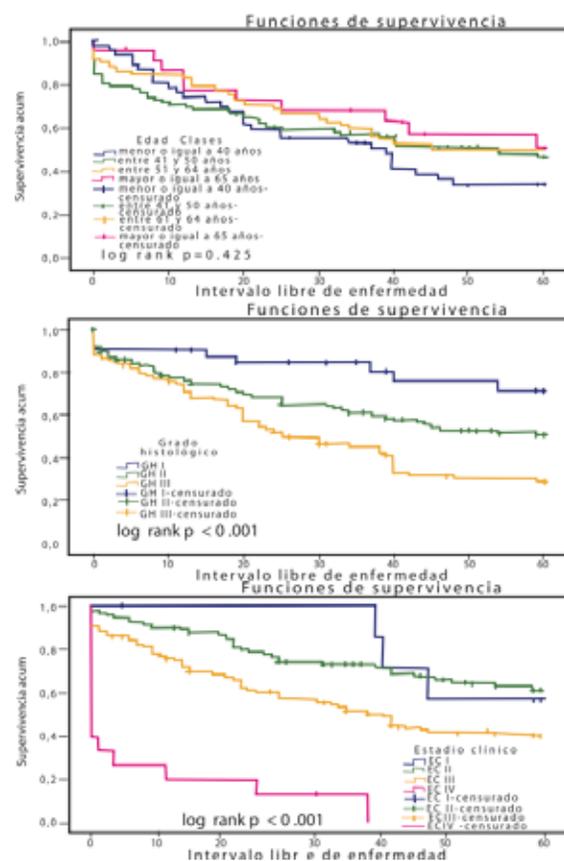


Figura 5. Gráficos de Kaplan-Meier para el intervalo libre de enfermedad en las variables edad, grado histológico y estadio clínico.

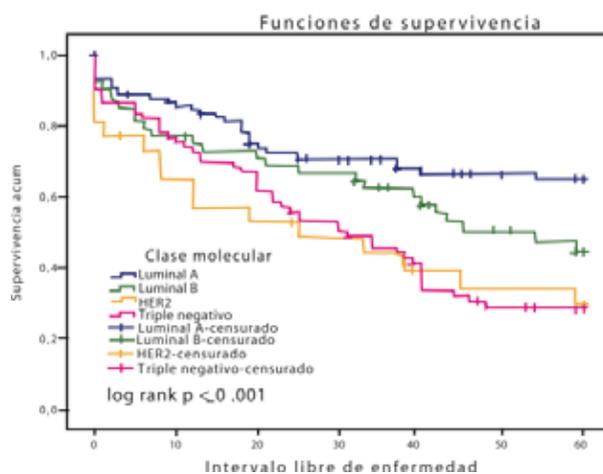


Figura 6. Gráficos de Kaplan-Meier para la supervivencia global en las variables edad, grado histológico y estadio clínico.

meses y 31,7 meses, respectivamente (log rank= 20,135/ P<0,001). Mientras que la media para la SG a los 5 años para el luminal A, luminal B,

HER2 y triple negativo fue de 52,0; 49,7; 41,4 y 43,4 meses, respectivamente (log rank= 26,785/ P<0,001) (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Supervivencia en relación con las variables clínico-patológicas en estudio

Factor	Intervalo Libre de Enfermedad (ILE)			Supervivencia Global (SG)		
	Media (IC95 %) - meses -	Test de Log Rank	P.	Media (IC95 %) - meses -	Test de Log Rank	P.
Edad						
≤40 años	34,6 (28,3-40,9)	2,791	0,425	44,8 (40,0-49,7)	2,695	0,441
41-50 años	36,8 (31,6-42,0)			47,2 (43,7-,50,8)		
51-64 años	39,6 (34,5-44,6)			49,3 (46,2-52,4)		
≥ 65 años	42,7 (33,5-52,0)			50,4 (44,0-56,7)		
Grado histológico						
I	49,6 (42,8-56,5)	17,295	<0,001	55,8 (52,1-59,6)	24,374	<0,001
II	39,4 (35,3-43,5)			49,8 (47,2-52,3)		
III	30,8 (25,8-35,8)			41,4 (37,5-45,3)		
Estado clínico						
I	51,7 (44,5-59,0)	60,637	<0,001	52,7 (45,9-59,6)	47,451	<0,001
II	46,0 (41,8-50,3)			53,0 (50,4-55,7)		
III	34,9 (30,8-39,0)			46,2 (43,3-49,1)		
IV	7,3 (0,5-14,1)			27,8 (20,0-35,7)		
Clase molecular						
Luminal A	44,5 (40,0-49,1)	20,135	<0,001	52,0 (49,0-55,0)	26,785	<0,001
Luminal B	38,9 (32,3-45,5)			49,7 (45,5-53,9)		
HER2	29,8 (20,0-39,6)			41,4 (33,6-49,3)		
Triple negativo	31,7 (26,6-36,9)			43,4 (39,8-47,0)		
KI-67 %						
≤14,50	51,2 (46,4-56,0)	49,171	<0,001	55,0 (51,9-58,1)	60,523	<0,001
14,51-25,50	43,0 (37,5-48,3)			53,2 (50,0-56,3)		
≥25,51	27,9 (23,7-32,0)			40,8 (37,7-43,8)		

Del mismo modo, al asociar los índices de proliferación basados en la expresión del antígeno Ki-67 con la evolución de los casos en estudio, los gráficos de Kaplan-Meier para el ILE y la SG mostraron que el índice de proliferación alto es un factor de mal pronóstico en el carcinoma de mama (Figura 7 y 8). Después de 5 años de seguimiento, la media para el ILE en el índice

bajo, intermedio e índice alto fue de 51,2; 43,0 y 27,9 meses, respectivamente (log rank=49,171/P.<0,001). Mientras que la media para la SG a los 5 años de seguimiento para el índice bajo, intermedio y alto fue de 55,0; 53,2 y 40,8 meses respectivamente (log rank=60,523/P<0,001).

Con respecto al objetivo orientado a determinar el valor pronóstico del índice

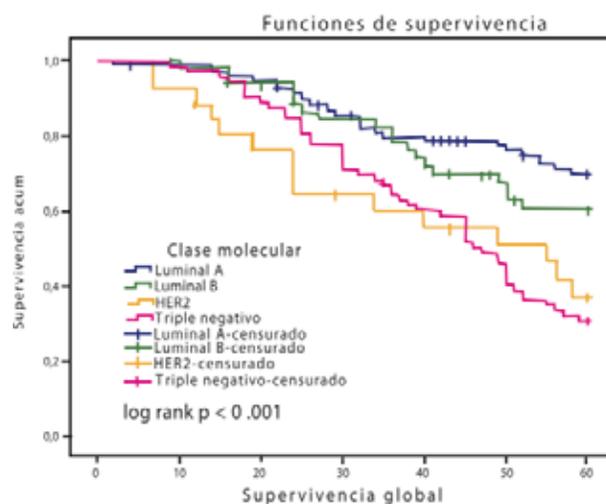
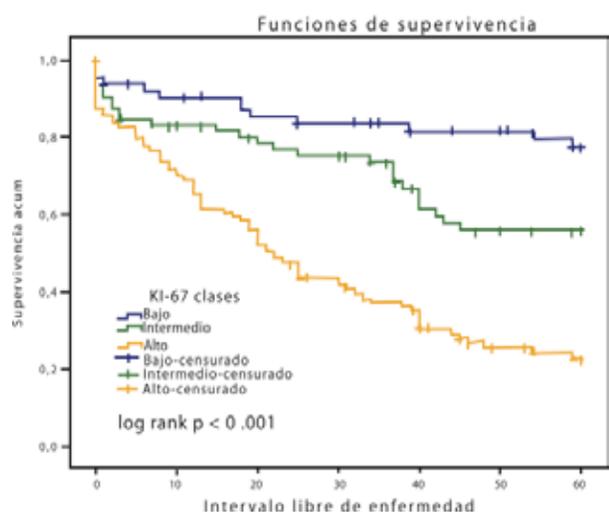


Figura 7. Gráficos de Kaplan-Meier para el intervalo libre de enfermedad en las variables clasificación molecular e índices de Ki-67 por clases.

de proliferación basado en la expresión del antígeno Ki-67 dentro de cada clase molecular de carcinoma de mama, los gráficos de Kaplan-Meier demostraron en cada clase molecular que el índice de proliferación de Ki-67 tiene una asociación inversa estadísticamente significativa con el ILE y la SG, es decir, los índices bajos de proliferación por Ki-67 se asocian a tiempos más largos de supervivencia, y los índices altos se asocian a tiempos de supervivencia más cortos (Figura 9 y 10)

Después de 5 años de seguimiento de esta cohorte de 250 pacientes, los índices bajos y altos de proliferación por Ki-67 demostraron tener diferencias significativas estadísticamente en el pronóstico, siendo el índice bajo el índice de mejor pronóstico y el índice alto el de peor pronóstico. En cuanto al ILE, los índices de proliferación bajos y altos mostraron respectivamente una media para el luminal A de 52,3 meses y 36,5 meses ( $P = 0,009 \leq 0,05$ ); para el luminal B 56,8 y 26,1 meses ( $P = 0,004 \leq 0,05$ ); para HER2 49,2 y 21,7 meses ( $P = 0,046 \leq 0,05$ ); y para el triple

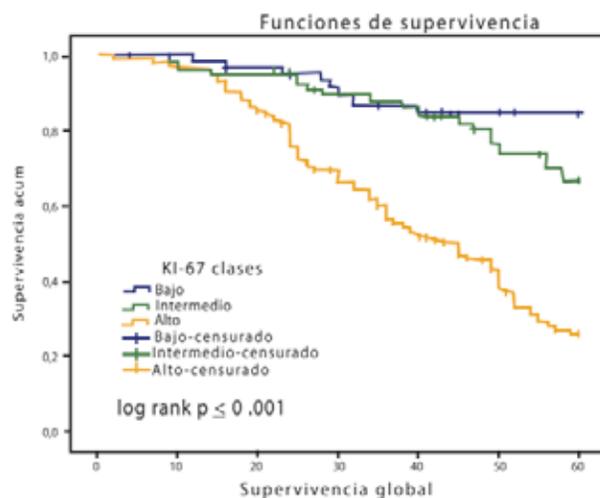


Figura 8. Gráficos de Kaplan-Meier para la supervivencia global en las variables clasificación molecular e índices de Ki-67 por clases.

negativo fue 37,8 y 26,4 meses ( $P = 0,004 \leq 0,05$ ). En el caso de la SG, los índices de proliferación bajos y altos mostraron una media para el luminal A fue 55,5 y 47,2 meses ( $P = 0,023 \leq 0,05$ ); para el luminal B 58,5 y 40,8 meses ( $P < 0,001$ ); para HER2 50,4 y 35,4 meses ( $P < 0,001$ ); y para el triple negativo fue 46,6 y 39,2 meses ( $P < 0,001$ ) (Cuadro 6).

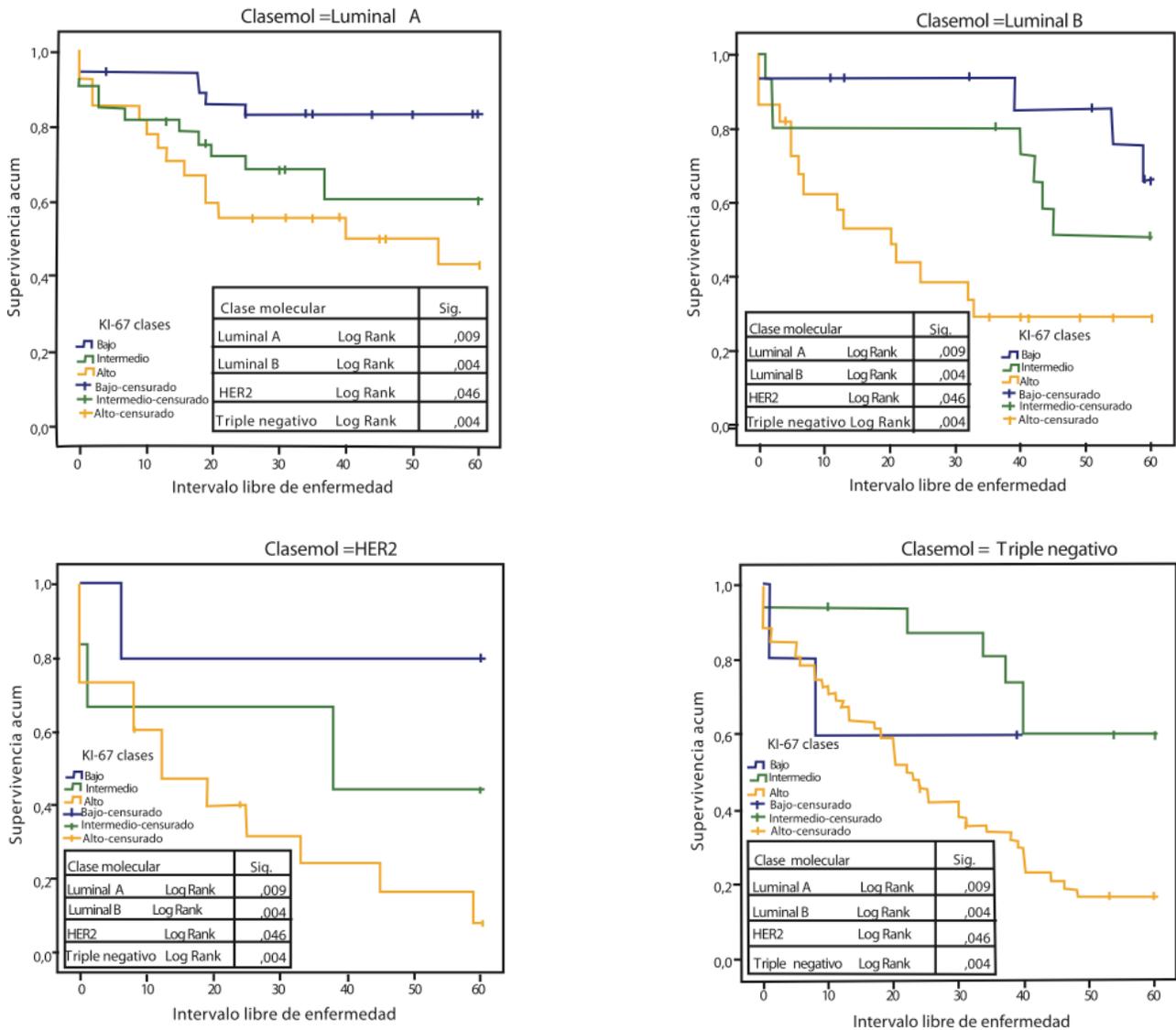


Figura 9. Gráficos de Kaplan-Meier mostrando el intervalo libre de enfermedad para los índices Ki-67 en cada clase molecular de carcinoma de mama.

### DISCUSIÓN

El carcinoma de mama es una enfermedad con alto grado de morbilidad que se ha estudiado profundamente para tratar de predecir su pronóstico. No obstante, debido a la heterogeneidad en la evolución de pacientes

con características clínico-patológicas similares, ha surgido la necesidad de investigar nuevos métodos para intentar pronosticar su desarrollo con mayor precisión. En este sentido, la clasificación molecular basada en el perfil de la expresión genética de las células neoplásicas (luminal A, luminal B, HER2 y triple negativo) ha

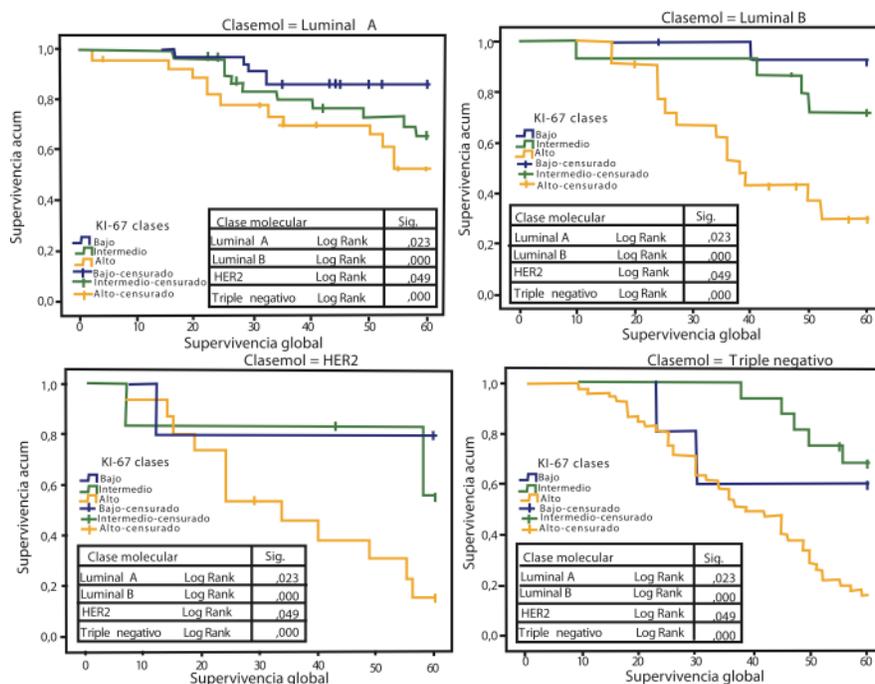


Figura 10. Gráficos de Kaplan-Meier mostrando la supervivencia global para los índices de Ki-67 en cada clase molecular de carcinoma de mama.

demostrado su utilidad y se ha validado en varios estudios <sup>(6,31-33)</sup>. Diversos factores adicionales están en estudio para tratar de definir aún más el pronóstico del paciente, entre ellos la expresión de Ki-67 <sup>(35,36)</sup>.

Desde la publicación de Perou y col., en el año 2000 <sup>(6)</sup>, proponiendo la clasificación molecular del cáncer de mama, ocurrió una verdadera revolución en el campo de la patología mamaria, hasta el punto que actualmente prácticamente todas las publicaciones se refieren a ella. Sin embargo, después de cierto tiempo, quedó claro que esas clases moleculares no eran homogéneas y existían grupos híbridos o subtipos <sup>(6,14,15,33,35,36)</sup>.

La heterogeneidad del carcinoma de mama es un hecho bien reconocido y aceptado. Esta se explica por el origen en las células madre cancerosas con potenciales evolutivos diferentes

y un significativo número de diferentes alteraciones genéticas posibles <sup>(37,38)</sup>.

En el análisis de los resultados de este estudio en cuanto a grupos etarios, se encuentra en la literatura trabajos como el de Muñoz y col., que las clases HER2 y triple negativo son las más frecuentes en mujeres jóvenes <sup>(26)</sup>. Asimismo, Zhao y col., dieron como resultado que el tipo triple negativo tenía alta prevalencia en grupos de mujeres premenopáusicas <sup>(11)</sup>. Webster y col., también consiguieron como resultado que la mayor proporción de pacientes pertenecientes a las clases HER2 y triple negativo se presentaban en mujeres jóvenes <sup>(39)</sup>. Sin embargo, en este estudio no se observó asociación del grupo etario con las clases moleculares; se plantea como explicación de no haber encontrado tal asociación el hecho de existir un número elevado de pacientes jóvenes en todas las clases moleculares

**Cuadro 6.** Supervivencia de las clases moleculares según la expresión de Ki-67

Factores Clase Molecular KI-67 %	Intervalo libre de enfermedad (ILE)			Supervivencia global (SG)		
	Media (IC95 %) - meses -	Test de Log Rank	P.	Media (IC95 %) - meses -	Test de Log Rank	P.
<b>Luminal A</b>						
Bajo	52,3 (46,6-58,1)	9,323	0,009	55,5 (51,7-59,2)	7 505	0,023
Intermedio	42,2 (34,0-50,5)			52,0 (47,1-56,9)		
Alto	36,5 (27,2-45,7)			47,2 (40,5-53,9)		
<b>Luminal B</b>						
Bajo	53,8 (46,2-61,4)	10,980	0,004	58,5 (55,6-61,4)	15 900	<0,001
Intermedio	43,2 (32,0-54,5)			53,9 (47,3-60,5)		
Alto	26,1 (16,0-36,1)			40,8 (34,1-47,5)		
<b>HER2</b>						
Bajo	49,2 (30,3-68,1)	6,138	0,046	50,4 (33,6-67,2)	6 049	0,049
Intermedio	35,3 (14,1-56,5)			50,6 (35,0-66,2)		
Alto	21,7 (10,8-32,6)			35,4 (26,2-44,7)		
<b>Triple negativo</b>						
Bajo	37,8 (13,9-31,7)	10,851	0,004	46,6 (32,1-61,1)	15 561	<0,001
Intermedio	47,7 (39,0-56,5)			56,0 (52,6-59,3)		
Alto	26,4 (20,8-31,9)			39,2 (35,0-43,4)		

y por consiguiente no hubo diferencias entre ellas, siendo esta posiblemente una característica diferente del carcinoma de mama en Venezuela, por el hecho de presentarse en mujeres más jóvenes con respecto a la población mundial, al menos en esta serie.

Por otro lado, se encontró una asociación

entre el grado histológico y el estadio clínico con los tipos moleculares, evidenciándose que el mayor grado histológico (III) y los estadios clínicos de evolución desfavorable (estadio III-IV) corresponden a clases moleculares de peor pronóstico (HER2 y triple negativo); este resultado está en concordancia con la mayoría de trabajos publicados <sup>(14,40-42)</sup>.

Del mismo modo, se asociaron estas características clínico-patológicas con el índice de Ki-67; dando como resultado que elevadas cifras de dicho índice correspondían a mayores grado histológico y estadio clínico, debido a que cuanto menor es la diferenciación celular del carcinoma de mama, consecuentemente hay un aumento de la proliferación celular llevando a una alta expresión del Ki-67 y a tener características clínico patológicas de peor índole.

Anteriormente, se ha investigado la asociación del índice de Ki-67 con las clases moleculares, como Bhargava y col., quienes en 205 casos de carcinoma de mama, observaron los índices de Ki-67 en cada clase molecular, resultando que las clases luminal A y B tenían un promedio de 15,85 %, el tipo HER2 de 27,8 % y la clase triple negativo de 61,7 %<sup>(14)</sup>. Asimismo, Al Tamimi y col., dieron como resultado que la clase triple negativo tenía la mayor expresión de Ki-67 (78,3 %) con respecto a las otras tres clases moleculares<sup>(43)</sup>. Coincidiendo estos estudios con similares resultados en esta investigación, donde se evidenció una asociación entre las clases moleculares de mejor pronóstico (luminal A y B) con índices de Ki-67 bajo ( $\leq 14,50$  %) o intermedio (14,51 %- 25,50 %), y clases moleculares de peor pronóstico (HER2 y triple negativo) con altos índices de proliferación ( $\geq 25,51$  %). Por lo cual se deduce que, cuando hay positividad de receptores hormonales (RE+, RP+) existe la tendencia a una menor proliferación celular, conllevando a índices bajos de antígeno Ki-67.

Se comprobó además que existe una relación entre índices altos de Ki67 ( $\geq 25,51$  %) con menores tiempos de intervalo libre de enfermedad (ILE) y supervivencia global (SG), afirmando así los resultados encontrados por De Azambuja y col., quienes establecieron que altas expresiones de Ki-67 confieren menor supervivencia para la paciente en etapas tempranas del carcinoma de mama<sup>(13)</sup>. Estos resultados pueden explicarse por el hecho de que este antígeno se expresa cuando las células se encuentran en procesos

activos de la mitosis celular; por ende, indica una notable proliferación celular conllevando a un menor ILE y SG.

Por otra parte, esta investigación dio como resultado que existe una asociación entre el grado histológico y el estadio clínico con la evolución de la enfermedad, por lo cual, a mayor grado histológico (III) y estadio clínico (III-IV) existe una tendencia a un menor ILE y SG. Similares resultados encontró, entre muchos otros, Webster y col., quienes demostraron que el mayor grado histológico (III) estaba representado por aquellas pacientes que tenían peor pronóstico, encontrando también una asociación entre el tamaño tumoral con la evolución clínica; mientras mayor sea el tamaño tumoral, menor será el tiempo de supervivencia para la paciente<sup>(39)</sup>. Todos estos resultados confirman que las características clínico-patológicas son factores pronósticos principales y primordiales para determinar la progresión del carcinoma de mama<sup>(44)</sup>.

En numerosos trabajos previos se ha investigado acerca de la evolución clínica de las pacientes con carcinoma de mama según la clasificación molecular. Las clases moleculares mostraron curvas de supervivencia parecidas a las descritas en los estudios pioneros de Perou y col.<sup>(6,45,46)</sup>; y corroborado por la gran mayoría de las publicaciones posteriores. La clase molecular luminal A presentó el mejor pronóstico con respecto a las otras clases moleculares. La clase luminal B mostró una supervivencia intermedia y las clases HER2 y triple negativo, peor pronóstico, con diferencia significativa ( $P < 0,001$ ). En este estudio se evidencia que las clases moleculares con receptores hormonales positivos tienen mejor pronóstico, con mayores ILE y SG, pudiendo ellos beneficiarse de la terapéutica hormonal<sup>(42,43)</sup>.

Por último, tomando en consideración los índices de proliferación altos ( $\geq 25,51$  %) y bajos ( $\leq 14,50$  %) y relacionándolos con la evolución clínica de las pacientes en cada clase molecular, se obtuvo en el luminal A una media de 52,3

meses y 36,5 meses; luminal B de 56,8 meses y 26,1 meses; HER2 de 49,2 meses y 21,7 meses; y triple negativo de 37,8 meses y 26,4 meses. Se puede decir que aún en la misma clasificación molecular; la expresión del antígeno Ki-67 tiene alto valor pronóstico. Las altas expresiones de Ki-67 señalan un peor pronóstico en la evolución clínica del carcinoma de mama y, si se presentan bajos índices de proliferación celulares indicativo que habrá un mayor ILE y SG; En la literatura consultada el Ki-67 ha mostrado relevancia

pronostica y para la clasificación de los casos<sup>(13-15,39,47)</sup>; pero no se encontraron referencias en relación específicamente con puntos de corte para las clases luminal B, HER2 y triple negativo.

En definitiva, de acuerdo a los resultados de este estudio, se puede concluir que el índice de Ki-67 permite establecer dentro de cada clase molecular subgrupos de mejor o peor pronóstico, con valores de corte de 14,5 % para los luminal A y de 25,51 % para los luminal B, HER2 y triple negativo.

## REFERENCIAS

- Borrás JM, Peiré MA, Mellado B. Oncología médica: epidemiología y prevención. En: Farreras V, Rozman C, editores. Medicina interna. 16a edición. Barcelona: Elsevier; 2009. p.1155-1157.
- Lippman ME. Cáncer de mama. En: Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, editores. Harrison. Principios de Medicina Interna. 16a edición. Ciudad de México: McGraw-Hill; 2008.p.563-570.
- Molina ML, Reigosa A, Nobrega D, Molina Y. Receptores de estrógeno y progesterona en cáncer de mama: asociación con variables clínico-patológicas. *Salus*. 2001;5:34-42.
- Reunión de Especialistas del MERCOSUR en el Ámbito del Congreso Internacional del Control del Cáncer. Río de Janeiro: 2007:16.
- Capote N. Fundación BADAN. Frecuencia del cáncer en Venezuela. 2008;2:12-26.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB van de Rijn M, Jeffrey SS, Renshaw CA, et al. Molecular portraits of human breast tumor. *Nature*. 2000;406:747-752.
- Zepeda EJ, Recinos E, Cuéllar M, Robles CD, Maafs E. Clasificación molecular del cáncer de mama. *Cir Ciruj*. 2008;76:87-93.
- Roa JC. Marcadores moleculares: proliferación celular e inestabilidad micro satelital. *Gastr Latinoam*. 2003;14:195-199.
- Viale G, Giobbie-Hurder A, Reagan M, Coates A, Mastropasqua M, Dell'Orto P, et al. 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*. 2008;26:5569-5575.
- Viale G, Reagan M, Mastropasqua M, Maffini F, Maiorano E, Colleoni M, et al. Predictive value of tumor Ki-67 expression in two randomized trials of adjuvant chemo endocrine therapy for node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100:207-212.
- Muñoz M, Fernandez-Acenero M, Martin S, Schneider J. Prognostic significance of molecular classification of breast invasive ductal carcinoma. *Arch Gynecol Obstet*. 2009;280:43-48.
- Zhao J, Liu H, Wang M, Gu L, Guo X, Gu F, et al. Characteristics and prognosis for molecular breast cancer subtypes in Chinese women. *J Surg Oncol*. 2009;100:89-94.
- De Azambuja E, Cardoso F, De Castro G, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: A meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. *Br J Cancer*. 2007;96:1504-1513.
- Bhargava R, Striebel J, Beriwal S, Flickinger JC, Onisko A, Ahrendt G, et al. Prevalence, morphologic features and proliferation indices of breast carcinoma molecular

- classes using immunohistochemical surrogate markers. *Int J Clin Exp Pathol.* 2009;2:444-455.
15. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki-67 index, HER2 status and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101:736-750.
  16. García Sáenz JA, Martín Jiménez M. *Oncología. Cáncer de mama. 2ª edición.* Madrid: Arán; 2006.
  17. Cleator S, Ashworth A. Molecular profiling of breast cancer: Clinical implications. *Br J Cancer.* 2004;90:1120-1124.
  18. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA.* 2006;295(21):2492-2502.
  19. Tavassoli FA. *Pathology of the breast. 2a edición.* Hong Kong: McGraw-Hill; 1992.
  20. 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;133:1710-1715.
  21. Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C. Immuno-biochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol.* 1991;138:867-873.
  22. Jones R, Salter J, A'Hern R, Nerurkar A, Parton M, Reis-Filho J, et al. The prognostic significance of Ki-67 before and after neo-adjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;116:53-68.
  23. Domagala W, Markiewski M, Harezga B, Dukowicz A, Osborn M. Prognostic significance of tumor cell proliferation rate as determined by the MIB-1 antibody in breast carcinoma: Its relationship with vimentin and p53 protein. *Clin Cancer Res.* 1996;2:147-154.
  24. Gerdes J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immune-histological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *Semin Cancer Biol.* 1990;1:199-206.
  25. Trihia H, Murray S, Price K, Gelber RD, Goldhirsch A, Coates AS, et al. Ki-67 expression in breast carcinoma: Its association with grading systems, clinical parameters, and other prognostic factors a surrogate marker? *Cancer.* 2003;97:1321-1331.
  26. Charpin C, Andrac L, Vacheret H, Habib MC, Devictor B, Lavaut MN, et al. Multi-parametric evaluation (SAMBA) of growth fraction (monoclonal ki67) in breast carcinoma tissue sections. *Cancer Res.* 1988;48:4368-4374.
  27. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol.* 1998;11:155-168.
  28. 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.
  29. 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.
  30. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, et al. The triple negative paradox: Primary tumour chemo sensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res.* 2007;13:2329-2334.
  31. Pusztai L, Mazouni C, Anderson K, Wu Y, Symmans WF. Molecular classification of breast cancer: Limitations and potential. *Oncologist.* 2006;11:868-877.
  32. Loi S, Sotiriou C, Haibe-Kains B, Lallemant F, Conus NM, Piccart MJ, et al. Gene expression profiling identifies activated growth factor signaling in poor prognosis (Luminal-B) estrogen receptor positive breast cancer. *BMC Med Genomics.* 2009;2:37.
  33. Choi YL, Oh E, Park S, Kim Y, Park YH, Song K, et al. Triple-negative, basal-like, and quintuple-negative breast cancers: Better prediction model for survival. *BMC Cancer.* 2010;10:507.
  34. Rosen JM, Jordan CT. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science.* 2009;324:1670-1673.
  35. Sircoulomb F, Bekhouche I, Finetti P, Adélaïde J, Ben Hamida A, Bonansea J, et al. Genome profiling of ERBB2-amplified breast cancers. *BMC Cancer.* 2010;10:539.
  36. Anders CK, Carey LA. Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. *Clin Breast Cancer.* 2009;9 (Suppl 2):73-81.
  37. Melchor L, Saucedo-Cuevas LP, Muñoz-Repeto I, Rodríguez-Pinilla SM, Honrado E, Campoverde A, et al. Comprehensive characterization of the DNA amplification at 13q34 in human breast cancer reveals TFDP1 and CUL4A as likely candidate target genes. *Breast Cancer Res.* 2009;11:R86.
  38. Park SY, Lee HE, Li H, Shipitsin M, Gelman R, Polyak K. Heterogeneity for stem cell-related markers

- according to tumor subtype and histological stage in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16:876-877.
39. Webster LR, Lee S, Ringland C, Morey AL, Hanby AM, Morgan G, et al. Poor-prognosis estrogen receptor-positive breast cancer identified by histopathology sub classification. *Clin Cancer Res.* 2008;14:6625-6633.
  40. D'Eredita' G, Giardina C, Martellotta M, Natale T, Ferrarese F. 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;37:591-596.
  41. Makretsov NA, Hayes M, Carter BA, Dabiri S, Gilks CB, Huntsman DG. Stromal CD10 expression in invasive breast carcinoma correlates with poor prognosis, estrogen receptor negativity, and high grade. *Mod Pathol.* 2007;20:84-89.
  42. Rakha EA, Elsheikh SE, Aleskandarany MA, Habashi HO, Green AR, Powe DG, et al. Triple-negative breast cancer: Distinguishing between basal and non basal subtypes. *Clin Cancer Res.* 2009;15:2302-2310.
  43. Al Tamimi DM, Shawarby MA, Ahmed A, Hassan AK, AlOdaini AA. Protein expression profile and prevalence pattern of the molecular classes of breast cancer: A Saudi population based study. *BMC Cancer.* 2010;10:223-236.
  44. Kumar V, Abas AK, Fausto N. *Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional. 7a edición.* Barcelona: Elsevier; 2008.
  45. Sørli 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.
  46. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumour subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:8418-8423.
  47. Bánkfalvi A, Ludwig A, De-Hesselle B, Buerger H, Buchwalow IB, Boecker W. Different proliferative activity of the glandular and myoepithelial lineages in benign proliferative and early malignant breast diseases. *Mod Pathol.* 2004;17:1051-1061.