



CONTRIBUCIÓ A L'ESTUDI MOLECULAR DEL CÀNCER DE MAMA
Joan Francesc García Fontgivell

Dipòsit Legal: T. 606-2012

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso al contenido de esta tesis doctoral y su utilización ha de respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para la consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otras utilizaciones se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos habrá que indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con finalidades de lucro ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDX. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDX (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto a los contenidos de la tesis como a sus resúmenes o índices.

Joan Francesc Garcia Fontgibell

**CONTRIBUCIÓ A L'ESTUDI MOLECULAR DEL CÀNCER
DE MAMA**

TESI DOCTORAL

Dirigida pel Dr. Juan José Sirvent Calvera

**Departament
De Ciències Mèdiques Bàsiques**



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

**Reus
2011**



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FAIG CONSTAR que aquest treball, titulat “**Contribució a l’estudi molecular del càncer de mama**”, que presenta **Joan Francesc Garcia Fontgibell** per a l’obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la meva direcció al **Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques** d’aquesta universitat.

Reus, 2 d’octubre de 2011

El director de la tesi doctoral

Dr. Joan Josep Sirvent Calvera

AGRAÏMENTS

Al Dr. Juan José Sirvent, per la paciència demostrada dirigint aquest treball.

A la Carmen Aguilar, per la seva inestimable ajuda tècnica i moral

A la Pilar Hernández per les llargues estones analitzant les dades estadístiques, i l'ajuda a desenvolupar-les.

Als companys del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari Joan XXIII, pel suport demostrat i pel treball realitzat en el diagnòstic dels casos utilitzats en aquest treball.

Als meus pares i amics/amigues per la insistència i ànims donats durant aquests anys.

A la Xarxa de Bancs de Tumors de Catalunya (XBTC).

Gràcies a tots!

ÍNDEX GENERAL

1. INTRODUCCIÓ.....	1
1.1 Epidemiologia del càncer de mama.....	3
1.2 Factors pronòstics i predictius.....	5
1.2.1 Edat.....	6
1.2.2 Afectació ganglionar.....	6
1.2.3 Mida tumoral.....	7
1.2.4 Grau histològic.....	8
1.2.5 Receptors d'estrògens i progesterona.....	9
1.2.6 Receptors dels factors de creixement tipus I. Sobreexpressió de l'oncogèn Her-2/neu.....	10
1.2.7 Factors genètics.....	11
1.2.8 Altres factors.....	12
1.2.8.1 Citoqueratina 5/6.....	12
1.2.8.2 Citoqueratina 14.....	13
1.2.8.3 Citoqueratina 34βE12.....	13
1.2.8.4 EGFR (HER1).....	13
1.2.8.5 C-kit (CD117).....	14
1.2.8.6 Receptors d'andrògens.....	14
1.2.8.7 p16.....	15
1.2.8.8 p53.....	15

1.2.8.9 Índex de proliferació cel·lular mitjançant Ki-67.....	15
1.3 Classificació histològica actual del càncer de mama.....	16
1.3.1 Carcinoma de mama in situ.....	16
1.3.1.1 Carcinoma ductal in situ.....	17
1.3.1.1.1 Carcinoma ductal in situ de baix grau.....	17
1.3.1.1.2 Carcinoma ductal in situ de grau intermedi.....	17
1.3.1.1.3 Carcinoma ductal in situ d'alt grau.....	18
1.3.1.2 Carcinoma lobel·lar in situ.....	18
1.3.1.3 Carcinoma intraductal.....	19
1.3.1.3 Carcinoma papil·lar intraductal.....	19
1.3.2 Carcinoma de mama infiltrant.....	19
1.3.2.1 Carcinoma ductal infiltrant.....	19
1.3.2.2 Carcinoma lobel·lar infiltrant.....	20
1.3.2.3 Carcinoma tubular infiltrant.....	20
1.3.2.4 Carcinoma medul·lar.....	21
1.3.2.5 Carcinoma papil·lar infiltrant.....	21
1.3.2.6 Carcinoma micropapil·lar infiltrant.....	22
1.3.2.7 Carcinoma inflamatori.....	22
1.3.2.8 Altres tipus.....	22
1.4 Classificació per biologia molecular.....	23
1.4.1 Grup luminal A.....	26

1.4.2 Grup luminal B.....	26
1.4.3 Grup c-erb-B2/ grup Her2.....	27
1.4.4 Grup triple negatiu.....	28
1.4.4.1 Subtipus basal.....	29
1.5 Estadiatge clàssic.....	30
1.6 Tractament del càncer de mama.....	33
1.7 El paper del patòleg.....	34
2.- HIPÒTESI.....	35
3- OBJECTIUS.....	39
4.- MATERIAL I MÈTODES.....	43
4.1 Tipus d'estudi i característiques generals.....	45
4.2 Criteris d'inclusió.....	46
4.3 Criteris d'exclusió.....	46
4.4 Variables a estudiar.....	47
4.4.1 Número d'història clínica.....	47
4.4.2 Número de biòpsia i bloc representatiu.....	47
4.4.3 Edat.....	47
4.4.4 Data de la primera cirurgia.....	47
4.4.5 Grau histològic de la tumoració.....	47
4.4.5.1 Formació de túbuls i glàndules.....	49

4.4.5.2 Pleomorfisme del nucli de la cèl·lula tumoral.....	50
4.4.5.3 Nombre de mitosis.....	50
4.4.6 Presència de necrosi tumoral.....	51
4.4.7 Mida de la tumoració.....	51
4.4.8 Nombre de ganglis extrets.....	51
4.4.9 Nombre de ganglis metastàsics.....	52
4.4.10 Tipus de metàstasi.....	52
4.4.11 Última data de control de la pacient.....	52
4.4.12 Estat actual de la pacient.....	53
4.4.13 Presència/característiques de la recidiva tumoral/metàstasi.....	53
4.4.14 Temps lliure de malaltia.....	53
4.4.15 Temps total de seguiment.....	53
4.4.16 Presència d'una segona neoplàsia d'origen no mamari.....	54
4.4.17 Variables immunohistoquímiques.....	54
4.4.17.1 Característiques generals de l'estudi immunohistoquímic.....	54
4.4.17.2 Variables immunohistoquímiques estudiades.....	55
4.4.17.2.1 Receptors d'estrògens.....	55
4.4.17.2.2 Receptors de progesterona.....	56
4.4.17.2.3 C-erb-B2 (Her2/neu).....	56
4.4.17.2.4 Citoqueratina 5/6.....	57
4.4.17.2.5 Citoqueratina 14.....	58

4.4.17.2.6 Citoqueratina 34 β E12.....	58
4.4.17.2.7 EGFR (HER1).....	58
4.4.17.2.8 c-kit (CD117).....	58
4.4.17.2.9 Receptors d'andrògens.....	59
4.4.17.10 p16.....	59
4.4.17.2.11 p53.....	59
4.4.17.2.12 ki-67 (índex de proliferació cel·lular).....	60
4.4.18 Classificació molecular.....	61
4.4.18.1 Grup luminal A.....	61
4.4.18.2 Grup luminal B.....	61
4.4.18.3 Grup c-erb-B2 (Her2).....	61
4.4.18.4 Grup triple negatiu.....	61
4.4.19 Noves propostes de classificació molecular.....	62
4.4.20 Estudi estadístic.....	62
5.- RESULTATS.....	65
5.1 Anàlisi estadística descriptiva.....	67
5.2 Anàlisi estadística univariant.....	73
5.2.1 Anàlisi estadística univariant respecte a la recidiva.....	73
5.2.2 Anàlisi estadística univariant respecte a la mortalitat.....	74
5.3 Anàlisi estadística multivariant.....	75
5.3.1 Anàlisi estadística multivariant respecte a la recidiva.....	75

5.3.2 Anàlisi estadística univariant respecte a la mortalitat.....	76
5.3.3 Anàlisi estadística de l'estat dels ganglis limfàtics.....	78
5.3.3.1 En relació a la recidiva.....	78
5.3.3.2 Ren relació a la mortalitat.....	78
5.3.4 Anàlisi estadística del grau histològic.....	79
5.3.4.1 En relació a la recidiva.....	79
5.3.4.2 En relació a la mortalitat.....	79
5.3.5 Anàlisi estadística de la classificació molecular.....	80
5.3.5.1 En relació a la recidiva.....	80
5.3.5.2 En relació a la mortalitat.....	82
6.- DISCUSSIÓ.....	85
7.- CONCLUSIONS.....	103
8.- BIBLIOGRAFIA.....	107

ÍNDEX DE TAULES

Taula 1.1.- Prevalença a 5 anys del càncer a Espanya.....	3
Taula 1.2.- Subtipus tumorals per classificació molecular.....	25
Taula 1.3.- Taula pT del càncer de mama.....	31
Taula 1.4.- Taula pN del càncer de mama.....	32
Taula 4.1.- Mètode de gradació histològica d'Elston i Ellis.....	48
Taula 5.1.- Taula estat de les pacients.....	67
Taula 5.2.- Taula pT, pN i grau histològic.....	69
Taula 5.3.- Taula localització de les segones neoplàsies.....	70
Taula 5.4.- Taula d'expressió de les variables immunohistoquímiques.....	71
Taula 5.5.- Taula de grups moleculars.....	72
Taula 5.6.- Taula de l'estudi univariant per la recidiva.....	73
Taula 5.7.- Taula de l'estudi univariant per la mortalitat.....	74
Taula 5.8.- Taula de l'estudi multivariant per la recidiva.....	75
Taula 5.9.- Taula de l'estudi multivariant per la mortalitat.....	76
Taula 5.10.- Taula d'afectació de ganglis limfàtics per la recidiva.....	78
Taula 5.11.- Taula d'afectació de ganglis limfàtics per la mortalitat.....	79
Taula 5.12.- Taula dels graus histològics per la recidiva.....	79

Taula 5.13- Taula dels graus histològics per la mortalitat.....	80
Taula 5.14- Taula dels grups moleculars per la recidiva.....	80
Taula 5.15- Taula dels nous grups moleculars plantejats per la recidiva.....	81
Taula 5.16- Taula dels grups moleculars per la mortalitat.....	82
Taula 5.17- Taula dels nous grups moleculars plantejats per la mortalitat...	83

ÍNDEX DE FIGURES

Figura 1.1- Alguns subtipus especials de carcinoma de mama.....	23
Figura 4.1- Tissue-arrays.....	46
Figura 4.2- Formació de túbuls i glàndules (Elston i Ellis).....	49
Figura 4.3- Pleomorfisme cel·lular (Elston i Ellis).....	50
Figura 4.4- Necrosi i mitosis.....	51
Figura 4.5- Expressió immunohistoquímica dels receptors d'estrògens.....	56
Figura 4.6- Valoració immunohistoquímica c-erb-B2.....	58
Figura 4.7- Estudi immunohistoquímic, exemples de marcadors de membrana i de marcadors nuclears.....	61
Figura 5.1- Gràfica de la recidiva acumulada.....	68
Figura 5.2- Gràfica de la supervivència acumulada.....	68
Figura 5.3- Patró de recidiva segons expressió de CK 34 β E12.....	76
Figura 5.4- Patró de mortalitat segons l'estat dels ganglis limfàtics.....	77
Figura 5.5- Patró de mortalitat segons l'estat dels receptors d'andrògens.....	77
Figura 5.6- Patró de recidiva pel model molecular 1.....	81
Figura 5.7- Patró de recidiva pel model molecular 2.....	82
Figura 5.8- Patró de mortalitat pel model molecular 1.....	83

Figura 5.9- Patró de mortalitat pel model molecular 2.....	84
---	----

ÍNDIX DE ABREVIATURES (ordre alfabètic)

ADN	Àcid DesoxiriboNucleic
AIB1	Amplified In Breast 1
ANOVA	ANalysis Of VAriance between groups
BRCA	BReast CAncer
BRCA1	BReast CAncer 1
BRCA2	BReast CAncer 2
°C	Graus Celsius
CD117	Cluster of differentiation 117
C-ERB-B2	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
CK	Citoqueratina
CK 5/6	Citoqueratina 5/6
CK 14	Citoqueratina 14
CK 34βE12	Citoqueratina 34βE12
C-KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
CM	Centímetres
CMF	Ciclofosfamida-Metotrexate-Fluoracil

CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
DAB	Diaminobencidina
DPX	Dibutylfeniltalat-Poliestirè-Xilè
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
Erb-B1	Epidermal growth factor receptor
Erb-B2	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
Erb-B3	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3
Erb-B4	v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4
FCMS	Facultat de Ciències Mèdiques i de la Salut
FISH	Flourescence In Situ Hybridation
GSTM1	Glutatio S-Transferasa Mu 1
HE	Hematoxilina-Eosina
HER1	Epidermal growth factor receptor
HER2	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
HER2/neu	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
HER3	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3

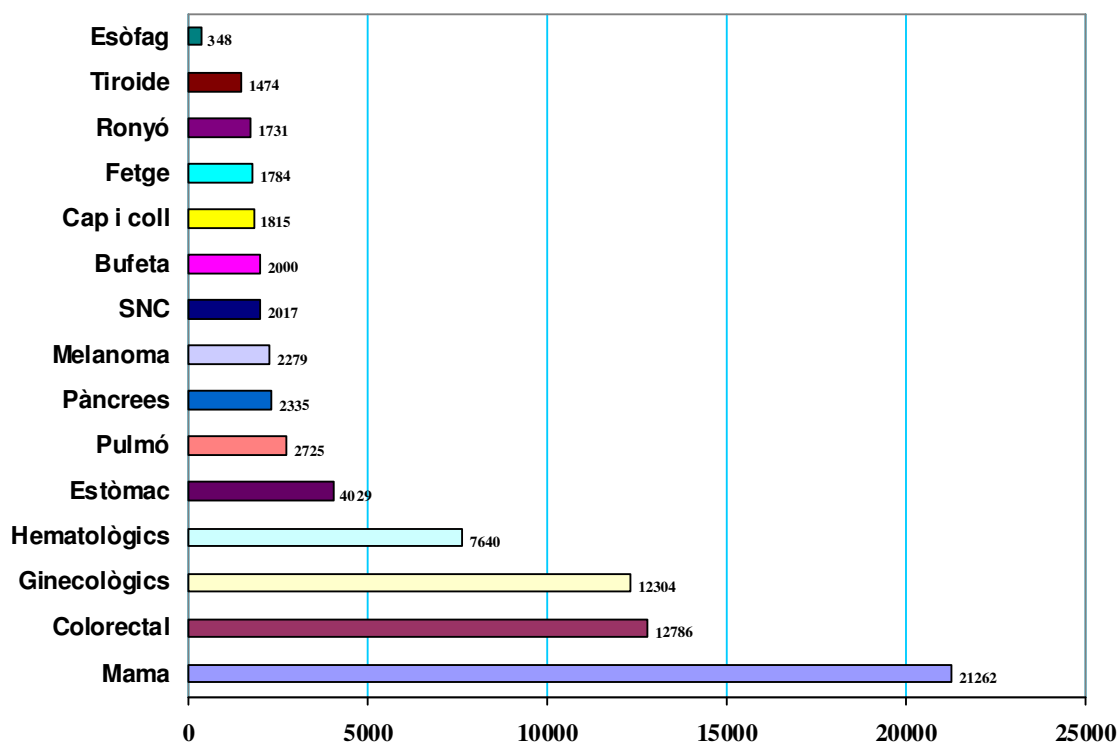
HER4	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4
HJ23	Hospital Universitari Joan XXIII
HJXXIII	Hospital Universitari Joan XXIII
IC	Interval de Confiança
IC95%	Interval de Confiança al 95%
KI-67	Antigen identificat per l'anticòs monoclonal Ki-67
MGF	Mother cells Growth Factor
MIB1	MIndBomb homolog 1
MSBR	Scarff-Bloom-Richardson modificada
NOS	Not Otherwise Specified (Sense d'Altre Component)
OMS	Organització Mundial de la Salut
OR	Odds Ratio
P16	proteïna 16 (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)
P53	proteïna 53 (CG33336 gene product from transcript CG33336-RB)
PTEN	Homòleg de fosfatasa i tensina
pM	Metàstasi (estudi anatomo-patològic)
pN	Nòduls limfàtics (estudi anatomo-patològic)
pT	Mida tumoral (estudi anatomo-patològic)

pTNM	Mida tumoral/nòduls/metàstasi (estudi anatomo- patològic)
RA	Receptors d'Andrògens
RE	Receptors d'Estrògens
RP	Receptors de Progesterona
RR	Risc Relatiu
SBR	Scarff-Bloom-Richardson
SNC	Sistema Nerviós Central
TNM	Mida tumoral/nòduls/metàstasi
URV	Universitat Rovira i Virgili

1. INTRODUCCIÓ

1.1 EPIDEMIOLOGIA DEL CÀNCER DE MAMA

El càncer de mama té un impacte enorme en la salut de les dones degut a l'alta incidència, la mortalitat i la prevalença que presenta. En els països occidentals és el càncer femení més freqüent (**Taula 1.1**).¹



Taula 1.1- Taula de prevalença als 5 anys del càncer a Espanya.²

El risc que té una dona per desenvolupar un càncer de mama durant la seva vida s'estima en un 12'6%, que equival a una de cada vuit dones. El risc de desenvolupar càncer de mama està relacionat amb l'edat, la majoria de casos es presenten en dones postmenopàusiques, sent l'edat mitjana en el moment del diagnòstic al voltant dels 60 anys, és poc freqüent en dones joves i molt poc freqüent en homes (1 home cada 102 dones).³

El Registre de Càncer de la província de Tarragona, durant el període 1993-97, descriu que el càncer de mama correspon al 28% del total de casos de càncers femenins amb una taxa ajustada de 64.5 per 100.000 dones/any, sent la primera causa de mort per càncer en les dones de

Catalunya (17'8%).³ Aquesta incidència és similar a la de nordamèrica, que és d'un 32%.⁴

La taxa d'incidència del càncer invasiu ha augmentat significativament, ha passat de 48'6 en el període 1982-86 a 63'5 en el període 1997-2001. A Tarragona, en el període 1998-2001 la taxa d'incidència ha estat influenciada per la posada en marxa del programa de detecció precoç del càncer de mama, produint un augment dels casos detectats en dones entre 50 i 64 anys. La proporció de càncers diagnosticats amb afectació axil·lar es troba en disminució com a conseqüència de la implementació de programes de diagnòstic precoç. No obstant això, en el període de 1996-1997 es varen diagnosticar, a la província de Tarragona, un 16'7% de pacients amb 4 o més ganglis axil·lars afectats.³

Els factors de risc implicats en el càncer de mama es poden dividir, bàsicament, en cinc grups: història familiar o personal, exposició hormonal endògena i exògena, factors dietètics i de l'estil de vida, història de lesions premalignes a la mama i exposició a carcinògens. Els factors hereditaris representen aproximadament entre un 5 i un 10% del total. L'impacte de cada factor de risc etiològic en la carcinogènesi està encara per demostrar, això dificulta les estratègies de prevenció primària.⁵

En els últims 50 anys s'han realitzat molts avenços en el diagnòstic i tractament d'aquest tipus de càncer, el desenvolupament de la mamografia contribuï al diagnòstic precoç, la cirurgia conservadora i la tècnica d'estudi del gangli sentinella ha substituït la mastectomia radical i limfadenectomia en moltes de les pacients tractades, i l'ús de teràpia antiestrogènica ha ajudat a inhibir el desenvolupament i progressió dels tumors sensibles a aquesta. Els tractaments sistèmics adjuvants a la cirurgia s'han convertit en eines primordials en relació a la disminució del risc de recidiva i mort. L'evidència d'aquest fet ha estat àmpliament confirmada en una metanàlisi del grup d'Òxford, on s'analitza el paper de la quimioteràpia i de l'hormonoteràpia adjuvant utilitzada en els estudis aleatoritzats dels darrers trenta anys.

S'observa una disminució del risc de recidiva d'un 25-30% i d'un 10-20% en la mortalitat, en un període de seguiment de 15 anys.⁶ A més a més, s'han creat grups o comitès de mama, és a dir, un grup d'especialistes en tots els camps (cirurgia, radiologia, patologia, oncologia i medicina nuclear) dedicats al tractament i seguiment de les pacients en cada centre.⁷ Amb tot això la taxa de mortalitat està disminuint significativament a nordamèrica i a Europa en els darrers anys.⁸ A Tarragona, també s'observa una millora de la supervivència als 5 anys, entre els períodes que engloben de 1985 a 1989 i de 1995 al 1999, la taxa ha disminuït d'un 67'6% a un 82'5%.³ La mitjana europea de la supervivència a 5 anys del període 1990-1994 va ser del 76'1%, molt semblant a la de Tarragona en aquest període (75'7%); mentre que la de nordamèrica era quelcom superior (85'3%). Aquesta millora en la mortalitat s'atribueix a la detecció precoç, fonamentalment mitjançant programes institucionals d'àmplia cobertura de la població, i a l'optimització dels tractaments multimodals utilitzats, la cirurgia i la radioteràpia a nivell local, i la quimioteràpia i hormonoteràpia a nivell sistèmic. La seva utilització es decideix en funció de l'estadi de presentació de la neoplàsia i d'altres factors pronòstics.⁹

1.2 FACTORS PRONÒSTICS I PREDICTIUS

Un factor pronòstic és qualsevol paràmetre, conegut amb el diagnòstic o després de la cirurgia, que s'associa amb una determinada supervivència, global o lliure de malaltia, en absència de tractament adjuvant.

Un factor predictiu és qualsevol valor associat al grau de resposta d'un tractament específic. Aquest són més útils en casos precoços de càncer pel seu paper a l'hora d'escollir un tractament adjuvant.

Després dels grans avenços en el diagnòstic i el tractament del càncer de mama, actualment els esforços es dirigeixen a la prevenció i l'estudi dels marcadors de risc i pronòstic. Sembla ser que els factors de risc principals són la predisposició genètica i la presència de canvis proliferatius en l'estudi

biòpsic. Els efectes d'aquests factors sobre el risc de patir càncer de mama poden interactuar entre ells.⁹

Tot i els avenços en el coneixement de la biologia molecular del càncer de mama i el gran nombre de biomarcadors descrits en els últims anys, actualment, els únics tres marcadors vàlids com a factors predictius a la resposta del tractament són els receptors d'estrògens, els receptors de progesterona i el c-erb-B2.¹⁰

1.2.1 Edat

La influència de l'edat en el moment del diagnòstic, quant al pronòstic del càncer de mama, és controvertida. Els tumors originats en pacients menors de 35 anys s'associen a característiques histològiques adverses com són l'alt grau histològic, la permeació vascular i/o limfàtica i la negativitat dels receptors hormonals. No obstant això, en els estudis que analitzen específicament el subgrup de pacients menors de 35 anys s'observa que el diagnòstic en una edat primerenca comporta un pronòstic advers, independent de tots els altres factors rellevants.¹¹

1.2.2 Afectació ganglionar

L'estat dels ganglis limfàtics axil·lars és el factor pronòstic més important del carcinoma infiltrant de mama, en absència de metàstasis a distància. A major nombre de nodes infiltrats, major és la taxa de recidiva i mortalitat, definint-se tres grups: d'1 a 3 ganglis afectes, de 4 a 9 i afectació de 10 o més ganglis. Les corbes de supervivència de cada grup presenten clares diferències en moltes de les sèries publicades.¹² La taxa de supervivència lliure de malaltia als 10 anys de les pacients sense ganglis afectats s'aproxima al 70-80%, mentre que si hi ha afectació adenopàtica aquesta disminueix al 35-40%, si s'afecta d'un a tres ganglis, o fins al 10-15% si s'afecten més de tres ganglis.¹³ Per aquest motiu les darreres edicions del sistema de classificació tumoral TNM sobre càncer de mama

incorporen l'estratificació per nombre de ganglis axil·lars afectats, per tal de millorar la seva capacitat pronòstica.

Un estudi mostra com el grau d'afectació axil·lar tindria implicacions pronòstiques fins i tot després de la recidiva, suggerint que el nombre de nodes infiltrats traduiria no només un fet cronològic sinó també un perfil biològic.¹⁴ Fins i tot després de la identificació d'un grup de gens amb capacitat pronòstica independent, l'afectació ganglionar axil·lar segueix aportant informació pronòstica addicional.^{15,16}

La macrometàstasi ganglionar, diàmetre superior a 2 mm, té una importància pronòstica demostrada. Amb l'estudi del gangli sentinella, podem trobar metàstasis de menor diàmetre que encara no sabem del cert quin significat biològic tenen. Actualment, s'està estudiant en diferents assaigs clínics.^{17,18}

1.2.3 Mida tumoral

La mida tumoral és el segon factor pronòstic més important i afegeix un valor pronòstic independent a l'afectació ganglionar axil·lar, sobretot en casos amb ganglis negatius, tot i ser dos variables relacionades.¹² La consideració conjunta de l'estat ganglionar i de la mida tumoral milloren la precisió pronòstica, ja que s'ha demostrat que el risc de metàstasis ganglionars axil·lars augmenta amb la mida tumoral.¹⁹ Fins i tot en les pacients amb ganglis afectes i tractades amb quimioteràpia adjuvant, la mida tumoral segueix aportant informació pronòstica independent.²⁰

Com exemple, les dones amb carcinomes menors a 1 cm de diàmetre i sense afectació ganglionar mostren un pronòstic excel·lent, pròxim al d'una dona sense càncer, amb una taxa de supervivència als 10 anys del 90%. Per altra banda, moltes de les dones que presenten tumoracions de més de 2 cm s'acompanyen d'afectació ganglionar i de major mortalitat.¹³

1.2.4 Grau histològic

El grau histològic és una mesura de la diferenciació cel·lular del tumor. L'agrupació en tres categories segons el sistema Scarff-Bloom-Richardson (SBR) és el més utilitzat, té en compte el nivell de diferenciació de la tumoració, el grau de pleomorfisme cel·lular i el nombre de mitosis existents.²¹ Actualment, s'usa la modificació proposada per Elston i Ellis (MSBR) o la modificació de Nottingham, que millora la capacitat pronòstica, sobretot del grup intermedi de l'escala de SBR. Això permet una millor concordança entre els patòlegs a l'hora de la determinació del grau histològic.²²

La gradació histològica, sistema d'Elston-Ellis, es basa en tres característiques de la tumoració: la formació de túbuls o glàndules, l'atípia nuclear i la quantitat de mitosis. Es realitza un suma dels scores dels tres factors i s'agrupa en tres grups: grau I o ben diferenciat (score 3-5), grau II o moderadament diferenciat (score 6-7) i grau III o pobrament diferenciat (score 8-9).

Una altra tipus de gradació és la nuclear, és poc usada ja que el sistema d'Elston-Ellis ja l'inclou en un dels seus scores. La gradació nuclear, tal com diu el nom, es basa només en la morfologia que presenta el nucli i la cromatina a gran augment. Es defineixen dos grups, el carcinoma de baix grau present cèl·lules uniformes de nuclis arrodonits monomorfes amb cromatina de distribució regular. El carcinoma d'alt grau mostra cèl·lules tumorals pleomòrfiques amb nuclis molt irregulars i pleomòrfics, nuclèols prominents i cromatina grollera.²²

La majoria d'estudis certifiquen el valor del grau histològic com a factor pronòstic independent i algun d'ells també com factor predictiu de resposta als tractaments sistèmics preoperatoris.²³

1.2.5 Receptors d'estrògens i progesterona

Els receptors hormonals, d'estrògens i progesterona, tenen una utilitat consolidada en el tractament del càncer de mama. El seu valor predictiu de resposta als diferents tractaments hormonals està totalment reconegut i avalat pels nombrosos estudis prospectius en malaltia avançada, adjuvant i neoadjuvant. De fet l'estat dels receptors en el tumor primari és l'únic marcador de resposta al tractament que té inequívoca utilitat clínica.^{24,25} El receptor estrogènic representa el paradigma del marcador predictiu de resposta. La seva absència prediu la no resposta al tractament hormonal en el càncer de mama, tant avançat com neoadjuvant. La resposta al tractament està influenciada pel nivell de positivitat dels receptors d'estrògens, així a major positivitat major resposta.²⁶ No obstant això, en una part important dels tumors amb receptors d'estrògens positius no s'observa una resposta d'inici o la perd posteriorment, probablement per l'adquisició de resistències a l'hormonoteràpia. Existeixen evidències creixents de que aquesta resposta estaria en gran part mediatitzada per la via dels factors de creixement EGFR-HER.²⁵ El seu valor pronòstic en pacients que no reben tractament hormonal és limitat, amb un diferencial d'aproximadament un 5-10% en el risc de recidiva entre receptors positius i negatius. Aquest diferencial sembla que disminueix fins a desaparèixer amb el temps de seguiment.²⁷

Actualment, la determinació d'aquests receptors hormonals es realitza mitjançant immunohistoquímica. Del 50 al 80% dels carcinomes els expressen, sent més freqüents en dones postmenopàusiques. La positivitat dels receptors hormonals està inversament relacionada amb l'índex de proliferació cel·lular i a la vegada amb el grau histològic.^{28,29}

Quan s'analitzen per separat els dos tipus de receptors, la positivitat dels receptors de progesterona es mostra com a factor independent de la supervivència en diversos estudis. Probablement reflecteixen una superior probabilitat de resposta a l'hormonoteràpia en el moment de la recidiva.³⁰

1.2.6 Receptors dels factors de creixement tipus I. Sobreexpressió de l'oncogèn HER-2/neu

Els receptors dels factors de creixement tipus I inclouen la família Erb-B (HER), els quals estan constituïts per 4 receptors transmembrana tirosin-quinasa: Erb-B1/EGFR (HER-1), Erb-B2/neu (HER-2), Erb-B3 (HER-3) i Erb-B4 (HER-4). El domini extracel·lular del tipus 1, 3 i 4 interaccionen amb lligams coneguts i específics. No es coneixen els de l'HER-2, encara que pot ser activat per qualsevol dels lligams de la família HER.³¹

El EGFR (HER-1) està sobreexpressat en un 35-60% dels carcinomes de mama. El seu paper ha estat analitzat en múltiples estudis, avaluats conjuntament per Fox et al. (1994) en una metanàlisi de més de 3000 pacients on el seu valor pronòstic predictiu no s'estableix com a independent.³¹

El gen HER-2/neu està localitzat al cromosoma 17q21. La seva transcripció produeix una proteïna de membrana de 185 kd, la qual actua com un factor de creixement epidèrmic amb activitat tirosin-quinasa. Les mutacions d'aquest gen comporten la seva amplificació, la qual provoca un augment de l'expressió de la proteïna que codifica. S'ha demostrat una bona correlació entre l'amplificació del gen i la sobreexpressió de la proteïna, això permet l'estudi avaluant la sobreexpressió de la proteïna mitjançant tècniques immunohistoquímiques. Aquest fet s'observa entre un 10-34% dels càncers de mama segons estudis, en més del 90% dels casos, la sobreexpressió de la proteïna es deguda a l'amplificació del gen, i es pot determinar per Hibridació In Situ amb Fluorescència (FISH).¹⁰

Molts estudis han demostrat un impacte negatiu de la sobreexpressió del gen en el pronòstic de les pacients amb ganglis positius, per contra en el grup de ganglis negatius es manté controvertit.¹⁰ Altres estudis apunten que la sobreexpressió d'HER-2 provocaria una ineficàcia de la quimioteràpia amb Ciclofosfamida-Metotrexate-Fluoracil (CMF) i que el benefici dels tractaments amb antraciclins en front CMF es trobarien limitats al subgrup de pacients

amb aquesta sobreexpressió.³² S'ha suggerit, també, que l'estatus de l'HER-2 pot predir la resposta a l'hormonoteràpia, alguns estudis mostren com la supervivència lliure de recidiva del subgrup de pacients amb tumors tractats amb tamoxifè, és menor en els que expressen receptors hormonals i HER-2 que en els tumors que només expressen receptors hormonals.³³ Es necessari, doncs, en qualsevol anàlisi de l'eficàcia d'una teràpia adjuvant la inclusió de l'estatus de l'HER-2 en l'anàlisi dels factors pronòstics i predictius implicats.³⁴

La sobreexpressió d'HER-2 s'associa també amb altres factors adversos com el grau histològic 3 i la negativitat als receptors hormonals.³⁵

1.2.7 Factors genètics

La susceptibilitat genètica clínicament es manifesta per la presència de càncer de mama en una o més dones de la família. Aquest risc augmenta quan la dona afectada és familiar de primer grau, si la familiar afectada es premenopàusica amb carcinoma bilateral o si moltes familiars estan afectades. Altres indicadors de possible herència són l'inici primerenc del càncer, la multiplicitat de les neoplàsies (com per exemple mama i ovari) i la presència de càncers poc freqüents o de càncers associats a síndromes.³⁶

Hi ha un altre grup de gens que sembla tenir influència en l'aparició del càncer de mama, s'anomenen gens de baixa penetrància. Aquests gens poden ser els responsables d'alguns casos de carcinoma esporàdic o no familiar. La seva influència es deu a la interacció amb altres factors com els carcinògens ambientals o el metabolisme hormonal. Els més destacats en aquest grup són el GSTM1, una glutation-S-transferasa, que està relacionada amb el metabolisme carcinogen, i el AIB1 (Amplified In Breast 1) que està implicat en la transducció dels senyals estrogènics en les cèl·lules mamàries.^{37,38}

Per altra banda hi ha els gens BRCA que poden jugar un paper en la carcinogènesis ja sigui per la presència de mutacions o per altres

mecanismes que no siguin les mutacions, aquestes vies alternatives són la conseqüència d'altres alteracions genètiques que tenen un efecte negatiu sobre la funció de supressió tumoral dels gens BRCA.³⁹ El gen BRCA1 situat al braç llarg del cromosoma 17, apareixen mutacions en quelcom més del 45% dels càncers familiars, o del gen BRCA2 localitzat al cromosoma 13. S'han identificat diverses mutacions en diferents punts d'aquests gens.^{40,41} El risc de desenvolupar un càncer de mama per una mutació en el gen BCRA1 va del 56 al 90%; mentre que una mutació del BRCA2 es mou entre el 37 i el 84%. El risc associat a mutacions de BRCA1 i BRCA2 esta modificat per altres alteracions genètiques i múltiples factors com la paritat, l'edat del primer part, els anticonceptius orals, el tabac, etc.^{42,43,44}

1.2.8 Altres factors

Aprofitant la revisió dels factors clàssics, s'estudiaran també l'expressió d'altres proteïnes relacionades d'alguna manera amb el carcinoma de mama o que s'ha demostrat utilitat en l'elecció de tractament en altres tipus de tumors.

1.2.8.1 Citoqueratina 5/6

La citoqueratina 5/6 és una citoqueratina basal de 58 i 56 KDa, al teixit normal la trobem present, principalment, a epiteli escamós queratinitzant (epidermis) i no-queratinitzant (mucosa), també s'expressa en la capa de cèl·lules mioepitelials del teixit prostàtic i de les glàndules salivals. També s'expressa en tumors benignes i malignes epidèrmics, en mesoteliomes, en tumors de mucoses d'epiteli escamós i en tumors originats en cèl·lules mioepitelials.⁴⁵ En el teixit mamari la citoqueratina 5/6 s'expressa a les cèl·lules de la capa basal (mioepitelials) junt a la citoqueratina 14 i la 17. Mentre que a les cèl·lules luminals s'expressa les citoqueratines 8/18, la 7 i la 19.

L'expressió d'aquesta citoqueratina en el càncer de mama indica un fenotip basal de la tumoració, que s'associa a un pitjor pronòstic.⁴⁶ Alguns

estudis posen de manifest la correlació entre la mida tumoral, la recidiva local i/o regional, les metàstasis a distància i el mal pronòstic, amb la expressió de citoqueratina 5/6 i la correlació inversa amb l'edat de la pacient.⁴⁷

1.2.8.2 Citoqueratina 14

La citoqueratina 14 és una altra citoqueratina basal que s'expressa en les cèl·lules mioepiteliales. I s'expressa de forma similar a la citoqueratina 5/6. L'expressió d'aquesta citoqueratina, al igual que la 5/6, indica un fenotip basal de la lesió i un pitjor pronòstic.⁴⁸

1.2.8.3 Citoqueratina 34βE12

La 34βE12 és un altra citoqueratina basal, d'expressió similar a les dues anteriors. En la majoria de publicacions s'estudia l'expressió de les tres citoqueratines basals (5/6, 14 i 34βE12) combinades considerant un fenotip basal quan s'expressa immunohistoquímicament com a mínim una de les tres.⁴⁹

1.2.8.4 EGFR (HER1)

L'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) és una glicoproteïna de transmembrana de la família protein-quinasa. Aquesta proteïna es troba a la superfície cel·lular i s'encarrega d'enllaçar el factor de creixement epidèrmic. Aquesta unió causa una dimerització del receptor i una autofosforilització de la tirosina que inicia la proliferació cel·lular. La mutació en el gen que codifica aquesta proteïna s'ha vist relacionada amb el càncer de pulmó.⁵⁰

En els càncers de mama la sobreexpressió de l'EGFR s'observa en un 20'6% dels casos. Tant la sobreexpressió d'EGFR (HER1) com la de c-erbB2 (HER2) estan associades a un pronòstic pitjor per la pacient, amb una disminució de les pacients lliures de malaltia als 5 anys. Les pacients que coexpressen HER1 i HER2 tenen pitjor pronòstic respecte als que expressen només HER1, encara que la diferència no és estadísticament significativa.⁵¹

1.2.8.5 C-kit (CD117)

Aquesta proteïna és un receptor transmembrana tipus 3 per al MGF (factor de creixement de les cèl·lules mare). Les mutacions del gen que codifica aquesta proteïna s'han vist en tumors de l'estroma gastrointestinal, malalties de cèl·lules mastocitàries i leucèmia mieloide aguda.^{52,53} També el trobem expressat en parènquima mamari normal i en lesions mamàries no neoplàsiques, sembla ser que té un paper en el manteniment de l'epiteli glandular de la mama.⁵⁴

L'expressió de c-kit en els tumors de mama té una prevalença molt baixa que oscil·la entre el 1 i el 14,7% segons els estudis, encara que en un estudi es descriu més del 25%, aquesta variació es deu, probablement, a la falta d'estandardització dels estudis immunohistoquímics realitzats. Aquesta expressió és més freqüent en carcinomes mamaris amb fenotip basal (31%), de tipus medul·lar (19%), en carcinomes de grau histològic 3 (24%) i en carcinomes metaplàstics (57%).⁵⁵

L'expressió de c-kit és un factor de mal pronòstic independent de l'estat dels receptors hormonals i de l'HER2, sobretot en pacients amb carcinoma no estès a ganglis limfàtics. L'eficàcia del tractament amb imatinib (fàrmac per diana terapèutica utilitzat en els GIST) està poc estudiat en assajos clínics, encara que sembla que pot tenir un paper important associat al tractament amb aromatases.⁵⁶

1.2.8.6 Receptors d'andrògens

Els tumors de mama són molt hormono-depenents (estrògens i progestàgens), davant aquest fet estudiarem la relació amb un altra tipus hormonal, els andrògens. Alguns estudis han demostrat que l'expressió dels receptors d'andrògens es correlaciona amb l'expressió dels receptors d'estrògens i progesterona, però no amb altres factors pronòstics típics. També s'ha observat que la falta d'expressió de receptors d'andrògens es tradueix amb un pitjor pronòstic per la pacient.⁵⁷

1.2.8.7 p16

La p16 és una proteïna supressora de tumors codificada en el gen CDKN2A (Inhibidor 2A de quinasa dependent de ciclina). Aquesta proteïna té un paper important en la regulació del cicle cel·lular, suprimeix l'angiogènesi i la producció de metàstasis del càncer de mama, inhibint la proliferació i migració de les cèl·lules tumorals i afavorint-ne l'apoptosi. Mutacions en aquesta proteïna augmenten el risc de desenvolupar un càncer, ja s'ha descrit en càncers de pàncrees, esòfag i estómac.⁵⁸

Alguns estudi demostren que l'estat de metilació del gen p16(INK4a) està relacionada amb els nivells d'expressió de la proteïna p16 i la falta d'expressió de receptors d'estrògens en el càncer de mama, però no es relaciona amb la mida tumoral, grau de diferenciació, presència de metàstasis ganglionars ni amb l'edat de la pacient. Arribant a la conclusió que la metilació del gen p16 no juga un paper important en les fases precoces del càncer de mama, però pot jugar un paper en la progressió d'aquest.⁵⁹

1.2.8.8 p53

El gen que codifica p53 es troba al braç curt del cromosoma 17 (17p13), codifica una proteïna amb el mateix nom. És un gen supressor tumoral que té un paper important en l'apoptosi i el control del cicle cel·lular, aturant el cicle quan detecta una mutació o alteració de l'ADN. Una mutació d'aquest gen podria acabar desenvolupant un càncer, s'ha vist que el 50% de tots els tumors contenen mutacions de p53 i en un 25% dels càncers de mama.^{60,61} Les alteracions en el gen supressor p53 tampoc han estat acceptades com a factors amb suficient informació pronòstica o predictiva.⁶²

1.2.8.9 Índex de proliferació cel·lular mitjançant Ki-67

El ki-67 és una proteïna usada per avaluar la proliferació cel·lular, està present en totes les fases d'activitat del cicle cel·lular (G1, S, G2 i mitosi), i

no es present en la fase de repòs (G0). És a dir, a major nombre de cèl·lules amb expressió de Ki-67, major és l'activitat proliferativa cel·lular i més agressiva és la tumoració.

El Ki-67 és un factor pronòstic per les recidives a distància i per la supervivència en pacients amb càncer de mama sense afectació de ganglis limfàtics, cal destacar que només afegeix informació pronòstica en el grup de tumors amb receptors d'estrògens positius o en els tumors amb grau histològic 2.⁶³ L'índex de proliferació cel·lular no s'ha mostrat com un factor independent en la majoria d'estudis, les dificultats en la reproductibilitat del seu estudi han contribuït a aquest fet.^{35,62}

1.3 CLASSIFICACIÓ HISTOLÒGICA DEL CÀNCER DE MAMA^{36,64,65}

Ja fa anys que el càncer de mama es subdivideix en diversos tipus segons la seva histologia, a vegades ajudant-se d'algunes tècniques immunohistoquímiques com pot ser l'expressió d'E-cadherina que permet diferenciar els carcinomes ductals que l'expressen dels carcinomes lobel·lars que no l'expressen. L'última actualització d'aquesta classificació es féu el 2003 per l'OMS, dividint els tumors en dos grups bàsics, carcinomes in situ i carcinomes infiltrants, dins de cada grup trobem múltiples subgrups.

1.3.1 Carcinoma de mama in situ

El carcinoma in situ és el que es troba localitzat a l'interior del ducte o lobel, aquest no rebassa la membrana basal i per tan no s'estén cap a l'estroma mamari, sent així una tumoració limitada al sistema ductal/lobel·lar. El carcinoma in situ pot classificar-se en ductal, lobel·lar o papil·lar.

El tractament conservador, consistent en la resecció tumoral, és generalment, curatiu. No és necessària la limfadenectomia axil·lar, encara que un 5% de les pacients presenten ganglis afectats per la neoplàsia, probablement per la no detecció de petits focus infiltrants de la tumoració mamària catalogant-la de carcinoma in situ, tot i no ser-ho.⁶⁶

1.3.1.1 Carcinoma ductal in situ

Es caracteritza per una proliferació de cèl·lules epitelials, amb atípia cel·lular amb una inherent, però no obligada, tendència a la progressió a carcinoma invasiu (risc relatiu de 8-11). La presentació, habitualment, no és multicèntrica sinó segmental, és a dir, que mamogràficament sembla haver-hi dos focus de malignitat però en realitat estan connectats per carcinoma ductal in situ. Es classifica en tres subgrups: carcinoma ductal de baix grau, de grau intermedi o d'alt grau; no és infreqüent trobar-ne una barreja en la mateixa lesió.

La quantitat de carcinomes ductals in situ diagnosticats ha augmentat junt amb l'evolució de les tècniques d'imatge i diagnòstiques passant d'un 2'8% dels càncers de mama diagnosticats en 1973 al 14'4% durant el 1995, als Estats Units. La majoria de casos, al voltant del 85%, es detecten només per les alteracions a les proves d'imatge (mamografia bàsicament), un altre 10% associa unes manifestacions clíniques, i el 5% restant són troballes incidentals. El pronòstic està lligat a l'exèresi completa de tota la lesió

1.3.1.1.1 Carcinoma ductal in situ de baix grau

Està format per cèl·lules petites i monomorfes amb un lleu augment de la relació nucli-citoplasma. Creix a l'interior del ducte mamari fent arcades, micropapil·les, patró cribiforme o patró sòlid. El nucli és de mida uniforme i presenta un patró regular de cromatina amb nuclèol no evident, és estrany veure figures de mitosis. La presència de necrosi o comedonecrosi és inacceptable per classificar la tumoració en aquest grup.

1.3.1.1.2 Carcinoma ductal in situ de grau intermedi

Les cèl·lules que constitueixen aquesta lesió són semblants a les del carcinoma ductal in situ de baix grau. El patró de creixement pot ser sòlid, cribiforme o micropapil·lar; però alguns dels ductes presenten necrosi. En

d'altres casos el nucli és més gran amb ocasionals nuclèols i cromatina grollera, amb o sense necrosi.

1.3.1.1.3 Carcinoma ductal in situ d'alt grau

Està format per cèl·lules marcadament atípiques proliferant en una capa, formant micropapil·les, patró cribiforme o sòlid. El nucli és marcadament pleomòrfic, amb vores irregulars i distribució grollera de la cromatina amb nuclèol prominent, els nuclis perden la polaritat (l'organització). És típica la presència de comedonecrosi i freqüentment presenten abundants mitosis, però cap d'aquestes dues característiques són necessàries per fer-ne el diagnòstic.

Generalment és més gran de 5 mm, però una lesió de menys d'1 mm amb la morfologia típica ja és diagnòstica, una sola capa de cèl·lules aplanada marcadament anaplàsiques recobrint un ducte són suficients per fer el diagnòstic de carcinoma in situ d'alt grau.

1.3.1.2 Carcinoma lobel·lar in situ

Representa entre menys de l'1% i el 3'8% de tots els càncers de mama. La lesió és multicèntrica en el 85% dels casos i bilateral entre el 30 i el 67%. El risc relatiu de desenvolupar una neoplàsia infiltrant és de 6'9 a 12, respecte una dona sense aquest tipus de patologia. La mamografia només mostra anomalies en poques ocasions, quan presenta necrosi central i calcificació.

Histològicament, es caracteritza per una proliferació de cèl·lules petites i poc cohesives, que es localitza al lobel afectant de vegades el ducte terminal de forma pagetoide, és a dir en forma de cèl·lules soltes dins de l'epiteli ductal. Les cèl·lules mostren nuclis arrodonits, nuclèol inexistent o poc evident, cromatina uniforme i escàs citoplasma; la presència de necrosi o calcificacions és poc freqüent, i les mitosis són molt escasses. Aquestes troballes són típiques del subtipus A, en el subtipus B (pleomòrfic) les

cèl·lules són més grans i presenten major atípia, amb cromatina menys uniforme i nuclèol més evident. En una mateixa lesió podem trobar els dos tipus.

Immunohistoquímicament, entre un 60 i un 90% dels casos presenten positivitat per receptors d'estrògens, i quelcom menys pels receptors de progesterona. No s'observa positivitat per la immunotinció amb E-cadherina.

1.3.1.3 Carcinoma papil·lar intraductal

Aquest tipus de lesió és localitza dins d'un ducte dilatat i es pot estendre per les seves rames, es caracteritza perquè el patró de creixement és papil·lar, centrat per eixos fibro-connectius vascularitzats. Pel seu diagnòstic cal que com a mínim un 90% de la lesió papil·lar hagi perdut l'acompanyament de cèl·lules mioepitelials característic de la mama normal, i que no presenti un patró de carcinoma ductal in situ de baix grau en més del 90% de la lesió. El tractament curatiu és l'exèresi completa de la lesió, sent el pronòstic molt favorable sempre que no trobem carcinoma ductal in situ o carcinoma infiltrant acompanyant la lesió.

1.3.2 Carcinoma de mama infiltrant

El carcinoma infiltrant és quan la proliferació neoplàsica surt de l'interior del ducte o lobel, aquest trenca la membrana basal i s'estén cap a l'estroma mamari acompanyat, generalment, d'una reacció estromal anomenada desmoplàsia. Pot presentar diferents morfologies des del punt de vista de l'estudi microscòpic òptic, algunes de les quals aporten un pitjor pronòstic de la tumoració, com podria ser el tipus micropapil·lar.

1.3.2.1 Carcinoma ductal infiltrant

El carcinoma ductal infiltrant és el tipus més freqüent de carcinoma de mama infiltrant, representant-ne entre un 60 i un 75% del total de casos. El diagnòstic es fa per exclusió, quan no es pot classificar com algun tipus especial de càncer de mama.

Macroscòpicament, la mida oscil·la entre més d'1 mm fins a més de 10 cm. es presenta com una lesió estrellada o, a vegades, amb bores arrodonides, coloració blanquinosa i consistència ferma al tall.

Microscòpicament, creix formant nius epitelials sòlids arrodonits o irregulars barrejat amb cèl·lules soltes i cordons amb infiltració de l'estroma, que no presenten morfologia de cap tipus especial de carcinoma de mama, es perd la membrana basal i la capa de cèl·lules mioepitelials dels túbuls o grups. Moltes vegades s'acompanya d'àrees de carcinoma ductal in situ, ocasionalment es pot associar a carcinoma lobel·lar in situ.

1.3.2.2 Carcinoma lobel·lar infiltrant

Representen del 5 al 15% dels tumors infiltrants de mama.

Macroscòpicament, la lesió pot no presentar una massa i tenir un creixement difús imperceptible que pot arribar a afectar tota la mama, però generalment es presenta com un nòdul dur de bores irregulars, a vegades multicèntric.

Microscòpicament, presenta cèl·lules epitelials petites-mitjanes de nuclis hiper cromàtics i citoplasma escàs a vegades amb contingut mucoide, i absència de cèl·lules mioepitelials. El patró de creixement infiltrant és típicament en cèl·lules soltes o fileres de poques cèl·lules, pot presentar un patró discontinu d'infiltració de bores mal definides. Com a característica especial, a part de la morfologia, és que gairebé el 100% de les tumoracions d'aquest tipus presenta una falta d'expressió d'E-cadherina, a diferència del carcinoma ductal, demostrable en estudis immunohistoquímics. A vegades pot presentar cèl·lules més grans i de nuclis més bigarrats, aquesta és la variant pleomòrfica del carcinoma lobel·lar infiltrant.

1.3.2.3 Carcinoma tubular infiltrant

És un tipus de carcinoma molt ben diferenciat, de difícil diagnòstic ja que pot recordar lesions benignes, i que té un molt bon pronòstic.

Macroscòpicament, es presenta com una lesió mal definida quelcom més ferma al tall que la mama normal, de menys de 2 cm, moltes vegades recorda una cicatriu radial (lesió benigna).

Microscòpicament, es caracteritza per una proliferació de túbuls ben formats però sense cèl·lules mioepitelials i amb una organització atzarosa. Les cèl·lules presenten poca atípia i s'acompanya d'una reacció estromal de tipus desmoplàstic. A vegades el trobem combinat amb altres tipus tumorals, el carcinoma túbulo-lobel·lar és una variant bastant freqüent.

1.3.2.4 Carcinoma medul·lar

És una tumoració poc freqüent, alguns autors l'associen a un millor pronòstic tot i la morfologia anaplàstic que presenta, però no està clar que sigui així

Macroscòpicament, és una tumoració ben delimitada, en ocasions capsulada, l'aspecte recorda a un fibroadenoma (lesió benigna).

Microscòpicament, presenta un creixement expansiu, està format per un creixement sincitial de cèl·lules epitelials, formant cordons i llençols anastomosats entre ells, les cèl·lules són molt atípiques amb abundants figures de mitosis. L'estroma del voltant presenta un infiltrat limfoplasmocitari difús, com a mínim en un 75% de la perifèria tumoral, i no s'observa reacció estromal desmoplàstica.

1.3.2.5 Carcinoma papil·lar infiltrant

És un carcinoma infiltrant, molt poc freqüent, que es caracteritza pel creixement invasiu formant papil·les, amb cèl·lules amb atípia moderada o lleu. És més freqüent el carcinoma papil·lar intraductal, fins i tot quan infiltra moltes vegades o fa en forma de carcinoma ductal sense característiques papil·lars.

1.3.2.6 Carcinoma micropapil·lar infiltrant

És una variant poc freqüent de carcinoma infiltrant, molt agressiva i de mal pronòstic, presenta un tipus d'infiltració característic formant petits nius cel·lulars que recorden petites pseudopapil·les, ja que no tenen eix fibroconnectiu central i les cèl·lules presenten atípia moderada o severa.

1.3.2.7 Carcinoma inflamatori

El carcinoma inflamatori es pot definir des del punt de vista clínic o des del punt de vista patològic.

Els criteris pel diagnòstics clínics inclouent l'eritema difús, l'edema que afecti a més de dues tercers parts de la mama, la pell de taronja, la induració i la calor a la palpació. No cal que es presentin tots els signes clínics per fer el diagnòstic.

Des del punt de vista histològic, tot i el nom no s'acompanya d'abundant inflamació, es defineix com la presència de cèl·lules tumorals en l'interior dels vasos limfàtics dèrmics. A vegades només es presenten les troballes histològiques sense clínica acompanyant, llavors s'anomena carcinoma inflamatori ocult.

1.3.2.8 Altres tipus

En menor freqüència es presenten altres tipus histològics amb característiques especials (**Figura 1.1**), com poden ser el carcinoma productor de moc, els tumors neuroendocrins, el carcinoma cribiforme infiltrant, el carcinoma apocrí, el carcinoma metaplàstic, el carcinoma ric en lípids, el carcinoma secretor, el carcinoma oncocític, el carcinoma adenoidequístic, el carcinoma de cèl·lules acinars, el carcinoma de cèl·lules riques en glicògen, el carcinoma sebaci, el carcinoma escamós, i les metàstasis de diferents orígens.

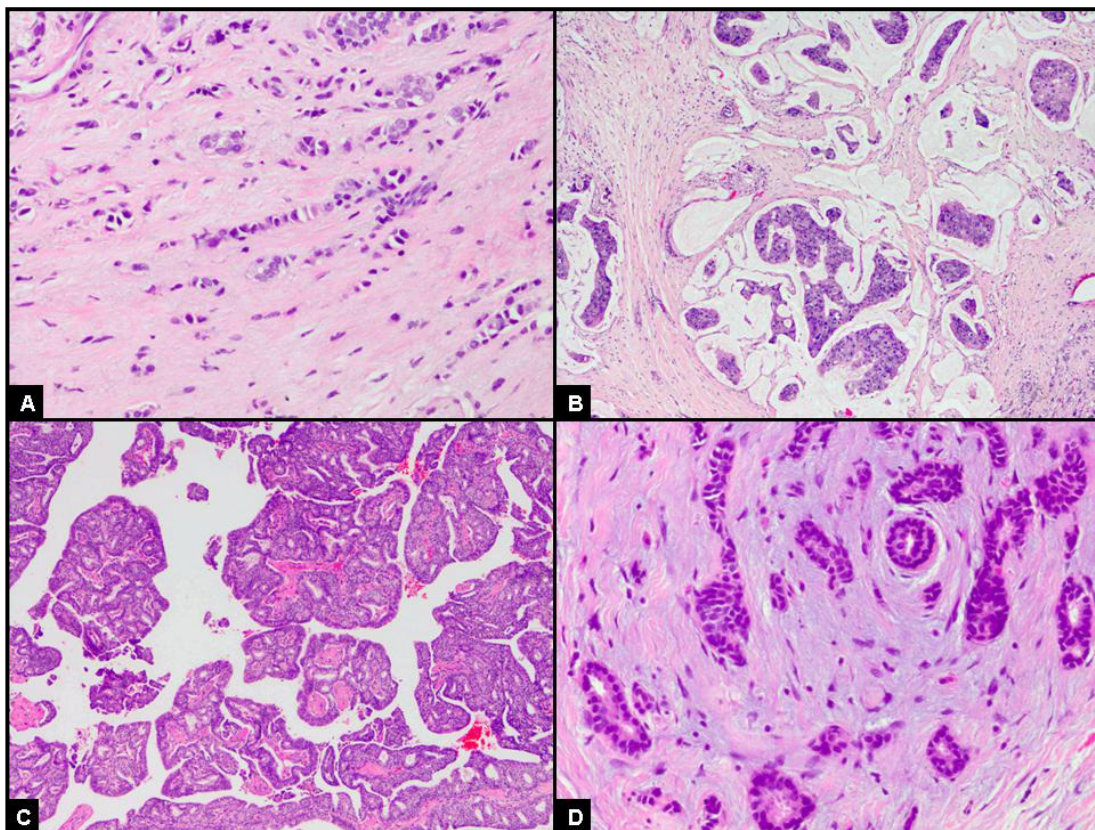


Figura 1.1- Alguns subtipus especials de càncer de mama. A) Carcinoma lobel·lar: les cèl·lules tumorals són petites i monomorfes, es disposen en fileres HE 100X. B) Carcinoma mucinós o col·loide: els nius de cèl·lules tumorals es troben englobats en el moc (color blanc) HE 100X. C) Carcinoma papil·lar: els nius tumorals es troben centrats per eixos fibro-vasculars. HE 100X D) Carcinoma tubular: formació de túbuls petits rodejats per estroma lax (gris-blau) HE 200X.

1.4 CLASSIFICACIÓ PER BIOLOGIA MOLECULAR

Està acceptat que l'alteració genètica cel·lular és fonamental en l'evolució de les neoplàsies, l'alteració en els gens donen uns canvis en el fenotip de la cèl·lula i dels teixits que el patòleg pot utilitzar per fer el diagnòstic i l'estimació d'un pronòstic. Les tècniques de microarrays de teixit o d'estudi d'expressió de gens han estat un gran pas en la investigació ja que permet l'estudi simultani de moltes mostres de diferents exemplars tumorals. Els microarrays de teixits són preparacions histològiques amb múltiples seccions de diferents tumors que permeten l'avaluació de la funció

genètica mitjançant l'estudi d'expressió de proteïnes en les seccions de teixit amb un estudi immunohistoquímic; mentre que en els microarrays d'expressió genètica s'utilitza el DNA extret de les mostres, permeten l'estudi directe dels gens tumorals mitjançant la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) o de la transcripció inversa de la PCR (RT-PCR).³⁶

Des de fa uns anys, s'aposta per realitzar una classificació molecular del càncer de mama basant-se amb l'expressió de múltiples gens amb l'objectiu d'obtenir una millor classificació, clarificar l'origen de la malaltia, augmentar la capacitat pronòstica i ajudar a prendre decisions terapèutiques. S'ha demostrat, en algun estudi, que la classificació molecular és un factor pronòstic independent per si mateix.⁶⁷ L'estudi molecular del càncer de mama requereix de mètodes d'alta tecnologia i de costos econòmics elevats, per això molts estudis intenten trobar una manera més econòmica i que precisi de menys tecnologia per realitzar aquesta classificació. Amb aquesta idea s'utilitza la immunohistoquímica, Carey et al. (2006) amb l'estudi de cinc marcadors immunohistoquímics (receptors d'estrògens, receptors de progesterona, c-erb-B2, EGFR i citoqueratina 5/6) han aconseguit realitzar una classificació molt aproximada a la realitzada amb l'estudi genètic.^{68,69}

En general, es proposa dividir el carcinoma de mama en quatre grups: **luminal A** (receptors d'estrògens i progesterona positius), **luminal B** (receptors d'estrògens positius i receptors de progesterona negatius), **grup Her2/neu** (receptors negatius amb c-erb-B2 positiu) i **grup triple negatiu** (receptors i c-erb-B2 negatius), dins d'aquest últim grup hi ha la subdivisió entre *basals* (expressen CK14 o CK 5/6 o EGFR) i *no basals* (**Taula 1.2**). En alguns estudis es parla d'un grup luminal C o d'un grup mixt, amb expressió de receptors i c-erb-B2, però no està clara la identitat d'aquests com a grup per ells mateixos.^{70,71,72,73} Aquests subtipus es distribueixen diferent segons la raça, això pot explicar les diferències de presentació i de resposta al tractament; per exemple, el subtipus basal es més prevalent en dones africanes o afroamericanes amb el corresponent pitjor pronòstic que presenta aquest grup.^{74,75}

Subtipus	R estrògens	R progesterona	c-erb-B2	CK basals
Luminal A	+	+	+/-	+/-
Luminal B	+	-	+/-	+/-
Grup Her2	-	-	+	+/-
Triple negatiu				
No basals	-	-	-	-
Basals	-	-	-	+

Taula 1.2- Subtipus tumorals per classificació molecular.

Els dos grups que mostren pitjor pronòstic són el grup Her2 i el grup de basals, ja que s'associen a un grau histològic més elevat. Mentre que el grup luminal A és el de millor pronòstic i es correlaciona amb un grau histològic més baix.^{69,76} La recidiva acumulada als 5 anys del diagnòstic és significativament diferent ($p=0'047$) entre els diferents subtipus moleculars, oscil·la del 0'8% (luminal A) fins al 12'7% (triple negatiu de subtipus basal), passant pel 1'4% dels luminals B i el 3'6% del subtipus Her2.⁷⁵ També s'observa una diferència significativa ($p=0'007$) en el temps lliure de malaltia als 5 anys, que és d'un 3'6% dels luminals A, 7'3% els luminal B, 13'7% els HER-2 i d'un 15% en els subtipus basals.⁷⁶

En diversos estudis aplicant la combinació de l'expressió genètic i immunohistoquímica s'ha vist que tant els carcinomes ductals com els lobel·lars tenen representants de tots els subgrups moleculars, mentre que alguns tipus histològics especials sempre presenten el mateix subtipus, com ara els carcinomes tubulars, mucinosos o micropapil·lars sempre són luminals, i els carcinomes medul·lars, adenoide quístic i metaplàstic sempre són basals.⁷⁷

1.4.1 Grup luminal A

Aquest grup és el més freqüent, representa entre el 44% i el 67% dels tumors de mama segons diferents estudis. L'edat de presentació majoritària es troba entre els 40 i els 55 anys (58'8%), un 16% es presenta per sota dels 40 anys i un 24'9% per sobre dels 55.^{76,78,79,80}

Immunohistoquímicament aquest grup es caracteritza per l'expressió de receptors d'estrògens i progesterona, amb o sense expressió d'Her2Neu. Aquest patró d'expressió concorda amb el component epitelial luminal de la glàndula mamària, a més a més expressen també citoqueratines luminals 8/18 i gens associats a la seva activació, com LIV1 i CCND1. També presenta alta expressió de gens RE α , menys del 20% tenen mutació de p53 i freqüentment són de grau histològic 1.⁸⁰

Aquests tumors tenen bon pronòstic, ja que la majoria de tumors són de baix grau histològic (39'3% grau 1 i 41'5% grau 2) i de menor mida (31% inferiors a 1 cm, 47'1% entre 1'1 i 2 cm);⁷³ la supervivència als 5 anys ronda el 86%. S'ha observat que tenen bona resposta a l'hormonoteràpia i menys resposta a la quimioteràpia que els tumors que no expressen receptors hormonals.⁸¹

És l'únic subgrup on s'ha demostrat una diferència estadísticament significativa en quan la mortalitat en relació a la raça, s'ha vist que les dones afroamericanes tenen major mortalitat que les dones blanques.⁸²

1.4.2 Grup luminal B

Aquest grup representa un 18-24% dels tumors de mama.^{78,79}

Immunohistoquímicament aquest grup es caracteritza per l'expressió de receptors d'estrògens i la no expressió de receptors de progesterona, amb o sense expressió d'Her2/Neu. Tenen una menor expressió de gens relacionats amb els receptors d'estrògens i major expressió de gens relacionats amb la proliferació cel·lular que el tipus luminal A.⁸⁰ Alguns

autors inclouen en aquest subgrup els casos amb positivitat tan per receptors d'estrògens com de progesterona amb Her2 negatiu, i un ki-67 superior al 20%.⁸³

El percentatge de tumors de baix grau en aquest grup és sensiblement menor als que trobem en el grup de luminals A.^{80,82} El grup luminal B respon pitjor a l'hormonoteràpia amb tamoxifè que el grup luminal A, conferint-los-hi un pitjor pronòstic.⁸⁰ Tot i així el pronòstic segueix sent bo, la supervivència als 5 anys ronda el 75%. Si els tumors són inferiors a 1 cm no tenen més risc de recidiva loco-regional que els luminals A de mida similar.⁸⁴

1.4.3 Grup c-erb-B2

Representen un 5-8% dels tumors mamaris. Acostumen a presentar-se en dones més joves, i encara que no es estadísticament significatiu presenten una mida més gran en el moment del diagnòstic. No s'ha demostrat associació d'aquest grup amb l'edat o la raça de la pacient, ni amb d'altres factors de risc.^{74,78,79,82,85}

Immunohistoquímicament aquest grup es caracteritza per la mínima o no expressió de receptors d'estrògens i progesterona, i l'expressió intensa d'Her2/neu, entre un 40 i un 80% tenen mutacions de p53.⁸⁰

En aquest grup s'inclouen tumors més indiferenciats que els tumors luminals (la majoria grau histològic 3), i amb major freqüència presenten afectació ganglionar axil·lar (67%).⁸²

La sobreexpressió d'HER2 a les cèl·lules tumorals s'associa a un augment del risc de recidiva loco-regional, d'aparició de metàstasis a distància i una disminució de la supervivència, però a una millor resposta a la quimioteràpia, amb antraciclins i taxans, que els tumors de tipus luminals, trobant més casos de resposta patològica completa.^{84,86} Si s'associa a quimioteràpia s'obté una millora fins al 12% en termes de supervivència lliure

de malaltia, fins un 52% menys de recaigudes i una disminució del 33% en la mortalitat.⁸⁷

Aquest grup té una diana terapèutica amb l'anticòs monoclonal antiHER2 (trastuzumab), s'ha observat que el tractament neoadjuvant amb trastuzumab aconsegueix una reducció de fins el 40% de la mida tumoral,⁸⁸ però no tots els casos responen per igual, ja que s'ha demostrat resistència al tractament en els que expressen els gens PTEN i CXCR4.⁸⁰

1.4.4 Grup triple negatiu

Representen un 14-19% dels tumors mamaris.^{78,79}

Immunohistoquímicament aquest grup es caracteritza per la no expressió de receptors d'estrògens i progesterona, ni l'expressió d'Her2Neu.

Aquest grup es divideix en dos subgrups, els carcinomes de fenotip basal que representen aproximadament un 10% del tots els càncers de mama, i la resta de tumors triple negatius anomenats no-basals (9% del total). La diferència es basa en l'expressió, per part del grup de fenotip basal, de citoqueratines basals CK5/6, CK17 i/o CK14 o expressió d'EGFR⁷⁹ i de gens relacionats amb la proliferació cel·lular, associat a la falta d'expressió de receptors d'estrògens i gens relacionats, i una baixa expressió de HER2.⁸⁰

Aquest grup és el que presenta pitjor pronòstic amb una supervivència als 5 anys del 60%.⁸² Encara que molts estudis associen el subtipus basal a un pitjor pronòstic, hi ha estudis que demostren que no hi ha diferències significatives entre els subtipus basal i no-basal.⁸⁹

Pel que fa al tractament, el fet de ser triple negatiu fan inútils els tractaments habituals, però sembla ser que tenen millor resposta a la quimioteràpia.⁸⁶

1.4.4.1 Subtipus basal

En aquest grup s'inclouen la majoria de tumors d'alt grau citològic, amb gran expressió de p53. Molts dels tumors basals són carcinomes ductals invasius d'alt grau histològic, amb arquitectura sòlida de bores arrodonides amb necrosi central i absència de formació de túbuls, presència de moltes mitosis, amb escassa o nul·la presència de carcinoma in situ. Aproximadament el 80% dels casos de càncer de mama associats a BRCA1 són de fenotip basal.^{69,74} Tots els tumors triple negatius amb expressió de CK5/6 i EGFR presenten una expressió de tipus basal en l'estudi genètic, amb una sensibilitat del 76% i una especificitat del 100%.⁷² Altres estudis defineixen que amb l'expressió d'una de les dues CK5/6 o CK14 ja és suficient per determinar el fenotip basal.⁹⁰

El primer en parlar del subtipus basal va ser Perou et al. al 2000 després de realitzar un estudi d'expressió gènica, en el que observava l'expressió de gens i proteïnes associades a les cèl·lules mioepiteliales normal del teixit mamari, demostrant que aquests tipus de tumors presentaven un pitjor pronòstic.⁹¹ Ribeiro et al. (2008) van demostrar que existeixen cèl·lules luminals normals que expressen citoqueratina 5/6, aquestes actuen com a cèl·lules mares i sota transformació maligna originen el fenotip basal del càncer de mama. I que en circumstàncies normals, BRCA1 pot estimular l'expressió de p63, afavorint un creixement anormal d'aquestes cèl·lules citoqueratina 5/6 positives.⁹²

Carey et al. (2004) va demostrar que el subtipus basal és el més freqüent en dones afroamericanes i en les perimenopàusiques, això associat a la baixa proporció de tipus luminal explica el mal pronòstic d'aquest grup de dones.⁸⁵

El subtipus basal tenen menor afectació de ganglis limfàtics, comparant amb tumors de mateixa mida d'altres tipus de càncer de mama, i encara que mostren major freqüència de resposta patològica completa a la quimioteràpia presenten un pitjor pronòstic,⁸⁰ encara que no queda clar si aquest mal

pronòstic es degut al fenotip basal o a d'altres factors com la falta d'expressió estrògens o l'alt grau histològic que presenten aquests tipus de tumors.⁹² Presenten un risc augmentat de recidiva loco-regional (RR 3'58 amb IC 95% entre 1'40-9'13) i de problemes relacionats amb la tumoració (RR 2'18, IC al 95% 1'04-4'57).⁸⁴

Da Silva et al. (2007) afirmen que totes les recidives de carcinoma basal es donen en els primers 5 anys, per això sembla tenir pitjor pronòstic i si no recidiva en aquest temps el pronòstic és relativament bo, també descriuen una major freqüència de metàstasis cerebrals comparant-los amb altres carcinomes de grau 3.⁹³

1.5 ESTADIATGE CLÀSSIC

L'estadiatge d'un tumor implica l'agrupació de pacients d'acord amb l'extensió de la malaltia, la seva utilitat radica en ajudar a l'elecció d'un tractament per a cada pacient, estimar el pronòstic i poder establir comparacions entre pacients i estudis. Pot basar-se en aspectes clínics o patològics, s'utilitza el sistema TNM, on la T indica la mida tumoral, la N l'estat dels ganglis limfàtics regionals i la M avalua la presència (pM1) o no de metàstasis (pM0).

pTis	Carcinoma in situ
pT1	≤ 2 cm
pT1mi	≤ a 0'1 cm
pT1a	> a 0'1 fins a 0'5 cm
pT1b	> a 0'5 fins a 1 cm
pT1c	> a 1 fins a 2 cm
pT2	> a 2 cm fins a 5 cm
pT3	> a 5cm
pT4	Qualsevol mida amb:
pT4a	Afectació de la paret toràcica
pT4b	Úlcera/edema cutani ó nòduls cutanis
pT4c	Ambdós T4a i T4b
pT4d	Carcinoma inflamatori

Taula 1.3 – Taula pT del càncer de mama.⁹⁴

pN0	Ganglis limfàtics sense afectació tumoral
pN1	
pN1mi	Micrometàstasi de >0'02 a 0'2 cm
pN1a	Afectació d' 1 a 3 ganglis
pN1b	Ganglis de regió mamària interna positius a la biòpsia però no clínicament
pN1c	pN1a + pN1b
pN2	
pN2a	Afectació de 4 a 9 ganglis
pN2b	Ganglis de regió mamària interna positius clínicament, sense afectació de ganglis axil·lars
pN3	
pN3a	≥ 10 ganglis o afectació ganglis infraclaviculars
pN3b	Afectació de ganglis a mamària interna i aixella
pN3c	Ganglis supraclaviculars

Taula 1.4 – Taula pN del càncer de mama.⁹⁴

1.6 TRACTAMENT DEL CÀNCER DE MAMA

El tractament del càncer de mama ha anat variant en les últimes dècades a mesura que s'han millorat en els coneixements sobre la biologia del càncer, els mètodes diagnòstics i les tècniques de tractament. S'ha passat de la cirurgia radical de tipus Halstead, amb una resecció molt extensa i amb alta morbiditat, a una cirurgia conservadora en la majoria de casos, gràcies al diagnòstic precoç i a l'eficàcia de la radioteràpia.⁹⁵ El tractament radioteràpic complementari a la cirurgia conservadora de la mama esdevé un tractament obligat a partir d'una sèrie d'estudis recopilats en un metanàlisi l'any 2004.⁹⁶ El tractament radioteràpic adjuvant en el grup de pacients amb extensa afectació ganglionar axil·lar redueix l'alt risc, entre un 10 i un 30 %, de recidiva loco-regional i augmenta la supervivència específica per càncer.⁹⁷

Diversos estudis aleatoritzats i metanàlisis han demostrat, de forma concloent, el benefici del tractament sistèmic amb quimioteràpia pel que fa a la supervivència de les pacients amb càncer de mama, aquest benefici és proporcional al risc de recidiva i per tant superior en les pacients amb ganglis positius.⁷ En general l'administració de forma seqüencial, primer la quimioteràpia i després la radioteràpia, sembla la forma d'administració millor tolerada i la que pot oferir més beneficis.⁹⁸

El tractament hormonal complementari amb tamoxifè s'esdevingué un tractament efectiu al reduir la taxa de recidiva i mortalitat. Es va observar primer en les pacients postmenopàusiques⁹⁷ i, posteriorment, es va demostrar la seva eficàcia en les pacients premenopàusiques i es va confirmar que el seu benefici era en els grups de pacients amb receptors hormonals positius. Els beneficis del tractament amb tamoxifè s'incrementen quan el tractament es prolonga durant cinc anys, resultant-ne una reducció anual del 50% en la taxa de recidives i del 28% en la taxa de mortalitat.⁹⁹

L'estudi dels ganglis limfàtics és de vital importància, actualment han disminuït el nombre de limfadenectomies axil·lars completes, gràcies a la tècnica del gangli sentinella. Aquesta tècnica es basa en la teoria que la majoria de carcinomes de mama, en un primer moment, drenen a un o dos ganglis, anomenats ganglis sentinelles, aquests són altament predictius de l'estat de la resta de ganglis limfàtics, per això amb la biòpsia selectiva d'aquests ganglis es pot estalviar la morbiditat associada a la dissecció axil·lar completa, de forma que quan els ganglis sentinelles no presenten infiltració tumoral no es realitza la limfadenectomia axil·lar.

1.7 EL PAPER DEL PATÒLEG³⁶

El paper del patòleg en el diagnòstic i tractament de la patologia tumoral mamària és cada dia més important i imprescindible per:

- a) l'ús generalitzat de la mamografia per detectar lesions no palpables, i l'ús de la biòpsia per punció amb agulla grossa (core-biòpsia) d'aquestes lesions.
- b) l'ús de la cirurgia conservadora necessita d'un estudi detallat de la peça quirúrgica en el moment de la cirurgia, amb una bona comunicació patòleg-cirurgià per valorar la histologia tumoral i els marges de resecció quirúrgica.
- c) la possibilitat de realitzar estudis de factors pronòstics sobre la peça de resecció quirúrgica com els receptors d'estrògens i progesterona, la detecció de l'expressió de c-erb-B2 o la mutació del Her2/Neu, etc.
- d) l'estudi del gangli sentinella en el moment quirúrgic permet no realitzar la limfadenectomia en totes les pacients, en cas que el gangli sentinella sigui negatiu.

Resumint, el patòleg aporta una gran part d'informació a partir de la qual es prendran les decisions terapèutiques més apropiades.

2. HIPÒTESI

En base a:

- 1) Que el carcinoma de mama és la primera neoplàsia en les dones i el carcinoma ductal infiltrant en representa prop del 85% dels casos, i que els factors pronòstics clàssics tenen una rellevància important en el tractament i pronòstic de les pacients.
- 2) Que actualment es proposa la creació d'una classificació molecular del càncer de mama (independentment del tipus histològic), per determinar el tractament i pronòstic de la pacient de forma més específica.
- 3) Que l'expressió gènica es pot valorar amb l'estudi directe dels gens amb tècniques de biologia molecular o amb l'estudi de l'expressió de les proteïnes en les cèl·lules tumorals mitjançant immunohistoquímica.

Pensem que:

- 1) Els factors clàssics morfològics i immunohistoquímics (receptors hormonals i c-erb-B2) tenen una gran influència en les recidives i la supervivència de les pacients.
- 2) La classificació molecular és útil per personalitzar el tractament de càncer de mama, i establir-ne un pronòstic més acurat.
- 3) L'estudi immunohistoquímic (més econòmic i fàcil de realitzar) pot ser suficient per establir la classificació molecular.
- 4) Alguns nous marcadors immunohistoquímics poden ser útils per a predir el pronòstic del càncer de mama.

3. OBJECTIUS

Tenint en compte les hipòtesis, els objectius d'aquesta Tesi Doctoral són els següents:

- 1.** Reafirmar la correlació entre els factors pronòstics clàssics (mida tumoral, afectació de ganglis limfàtics, grau histològic del tumor, expressió de receptors hormonals i sobreexpressió del c-erb-B2), amb l'evolució i pronòstic de la pacient.
- 2.** Estudiar la relació entre la presència de necrosi tumoral en el component infiltrant de la neoplàsia i la mala evolució de la mateixa.
- 3.** Estudiar el comportament dels carcinomes segons el seu patró d'expressió gènica, determinat per l'estudi de l'expressió immunohistoquímica de les proteïnes codificades per aquests gens. Agrupant-los en quatre grups: luminal A, luminal B, c-erb-B2 i triple negatiu (tenint en compte el subtipus basal).
- 4.** Avaluar possibles noves propostes de classificació molecular.
- 5.** Estudiar la relació entre l'expressió immunohistoquímica de diverses proteïnes (p53, ki67, CK34βE12, c-kit, receptors d'andrògens i p16) i la mala evolució o no de la pacient.

4. MATERIAL I MÈTODES

4.1 TIPUS D'ESTUDI I CARACTERÍSTIQUES GENERALS

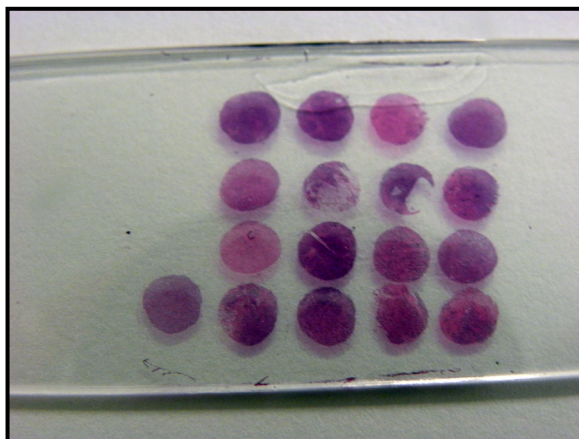
Es realitza un estudi retrospectiu analític i observacional de les pacients diagnosticades de carcinoma ductal infiltrant pur, incloent els que s'acompanyen de carcinoma ductal in situ, a l'Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona entre l'1 de gener de 1994 i el 31 de desembre de 2006, ambdós dies inclosos.

Es seleccionen tots els casos diagnosticats de càncer de mama a l'Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona entre els anys 1994 i l'any 2006, mitjançant el programa informàtic propi del Servei d'Anatomia Patològica del centre. Posteriorment, es revisen les preparacions histològiques de tots aquests casos, fent nous talls histològics o noves tècniques immunohistoquímiques quan es cregui convenient per confirmar el diagnòstic. Es seleccionen tots els casos que corresponguin a carcinoma ductal infiltrant, NOS, incloent els que s'acompanyen de carcinoma ductal in situ. De les mostres escollides es realitza la gradació d'Elston i Ellis, i es selecciona un bloc de parafina per realitzar un tissue-array (**Figura 4.1**) per practicar l'estudi immunohistoquímic que posteriorment es comentarà (punt 4.4.20). La classificació tumoral es realitza segons el TNM de la 6a edició

Les mostres es van recollir en el moment de l'estudi histològic, sigui intraoperatori o diferit, després de ser fixades 18-24 hores en formol tamponat al 4%. Foren incloses en parafina seguint el processament estàndard dels laboratoris d'Anatomia Patològica, amb posterior tinció d'hematoxilina-eosina (tinció de rutina al laboratori d'Anatomia Patològica).

Un cop recollides les dades s'anonimitzen les mostres, eliminant els camps de número d'història i de número de biòpsia.

Figura 4.1 – Foto d'una preparació de tissue-arrays tenyida amb la tinció d'hematoxilina-eosina. Cada cercle correspon a un cas (17 casos).



4.2 CRITERIS D'INCLUSIÓ

- Dones operades d'un tumor de mama de qualsevol lateralitat a l'Hospital Universitari Joan XXIII entre l'1 de gener de 1994 i el 31 de desembre de 2006, ambdós inclosos, el diagnòstic final de les quals fou carcinoma ductal infiltrant (NOS) de mama.

- S'inclouen tan pacients operades amb cirurgia conservadora (tumorectomia i gangli sentinella) com intervingudes amb mastectomia i limfadenectomia; o combinacions d'aquestes tècniques.

4.3 CRITERIS D'EXCLUSIÓ

- Dones que la primera intervenció en aquest període fos una recidiva d'un tumor primari anterior.

- Dones diagnosticades de tipus especials de carcinoma ductal, entre elles variant mucinosa, variant micropapil·lar, etc.

- Dones diagnosticades de tumors de col·lisió en que una de les parts fos carcinoma ductal.

- Dones diagnosticades o tractades en el nostre centre, intervingudes en un centre extern.

- Dones amb carcinoma ductal microinfiltrant (infiltració menor d'1 mm), per l'escassa representació del component infiltrant sobre el que es realitzen els estudis immunohistoquímics d'aquest treball.

4.4 VARIABLES A ESTUDIAR

Un cop seleccionats els casos s'han revisat totes les històries de les pacients incloses a l'estudi prenent nota de les diferents variables a estudiar que seguidament enumeraré:

4.4.1 Número d'història clínica

S'encripten les pacients per número d'història clínica hospitalària, un cop recollides les dades s'anonimitzen eliminant aquest cap i el 4.4.2.

4.4.2 Número de biòpsia i bloc representatiu

S'assigna a cada número d'història el número corresponent de biòpsia per facilitar les tasques de preparació de material al laboratori, també es seleccionarà el bloc que inclogui una zona representativa del tumor per fer els arrays de teixit.

4.4.3 Edat

És l'edat de la pacient en anys naturals en el moment del diagnòstic, recollida com a variable contínua.

4.4.4 Data de la primera cirurgia

És el dia en que es realitza la intervenció quirúrgica del carcinoma de mama per primera vegada.

4.4.5 Grau histològic de la tumoració

Es graduarà histològicament la tumoració seguint el sistema d'Elston i Ellis²² (**Taula 4.1**) que és el més utilitzat en l'actualitat. Té en compte la

suma de tres paràmetres, a cadascun se li assigna un valor numèric entre 1 i 3, i del resultat de la suma s'obté una categoria. Si la suma final està entre 3 (mínim) i 5 punts es classifica en grau histològic 1; si el valor obtingut és 6 o 7 es cataloga de grau histològic 2; i, si és 8 o 9 (màxim) es classifica dins el grau histològic 3. L'agressivitat biològica va de menor, grau 1, a la major en el grau 3.

La valoració dels paràmetres es realitza mitjançant microscopia òptica convencional i tinció d'hematoxilina-eosina (estàndard dels laboratoris d'Anatomia patològica), de la següent manera:

Troballes	Score
Formació de túbuls o glàndules	1.- La majoria del tumor (>75%)
	2.- Moderada formació (10-75%)
	3.- Escassa formació o nul·la (<10%)
Pleomorfisme nuclear	1.- Cèl·lules regulars, uniformes i petites
	2.- Moderat augment de la mida i variabilitat
	3.- Variació marcada
Mitosis per 10 camps de grau augment	1.- Entre 0 i 5
	2.- Entre 6 i 10
	3.- Més de 10

Taula 4.1- Mètode de gradació histològica d'Elston i Ellis.²²

4.4.5.1 Formació de túbuls i glàndules

Es valora el tipus de creixement que presenta la tumoració avaluant la formació de túbuls i/o glàndules per graduar-ho de la següent manera: si la majoria del tumor (més del 75%) forma estructures glandulars o tubulars se li assignarà 1 punt; si només en formen entre el 10 i el 75% de la tumoració se li assignaran 2 punts; i, si no se'n formen o quasi no se'n formen (inferior al 10% de la superfície tumoral) es puntuarà amb 3 punts (**Figura 4.2**).

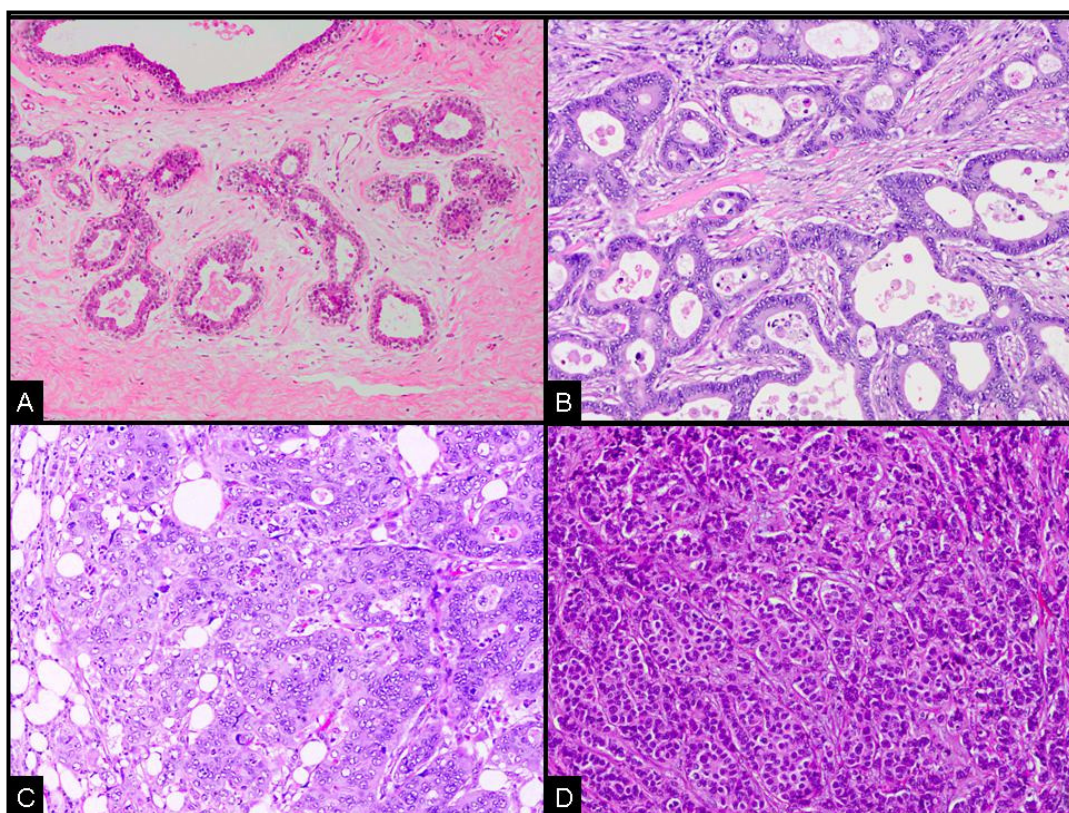


Figura 4.2- Formació de túbuls i glàndules. A) Parènquima mamari normal, s'observa una doble capa de cèl·lules epitelials i mioepitelials recobrint els ductes, HE 100X. B) Patró de creixement 100% glandular (score 1), HE 200X. C) Patró de creixement sòlid amb ocasionals llums glandulars (score 2), HE 200X. D) Patró de creixement totalment sòlid (score 3), HE 200X.

4.4.5.2 Pleomorfisme del nucli de la cèl·lula tumoral

Per avaluar aquest punt es té en compte la forma i mida dels nuclis de les cèl·lules tumorals, si la majoria de nuclis són petits i rodons, amb una uniformitat generalitzada, se li assignarà 1 punt; si els nuclis estan lleugerament augmentats de mida o s'observa una variabilitat entre la mida dels nuclis se li donaran 2 punts; i, finalment, si els nuclis són molt grans pleomòrfics amb una variabilitat marcada entre cèl·lules se li assignaran 3 punts (**Figura 4.3**).

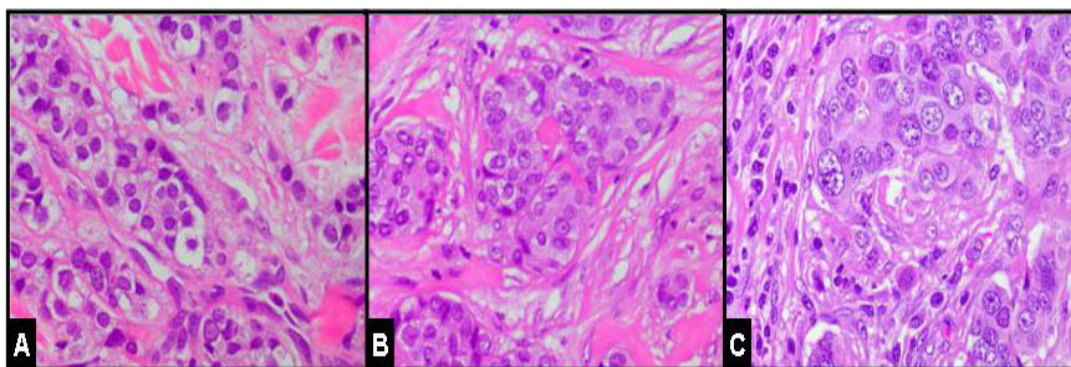


Figura 4.3- Pleomorfisme cel·lular, HE 400X. A) Score 1, nuclis rodons petits isomorfes. B) Score2, lleugera anisonucleosi amb ocasionals nuclèols. C) Marcat pleomorfisme nuclear amb nuclèols evidents.

4.4.5.3 Nombre de mitosis

La mitosi és l'última fase del cicle cel·lular, és quan es duplica el material genètic per donar lloc a la divisió cel·lular, per tant a major nombre de mitosis major és el ritme de creixement de la tumoració.

Es compten el número de mitosis existents en deu camps de gran augment (x400) elegits aleatòriament per la zona tumoral. Si el recompte final és de 0 a 5 mitosis se li donarà 1 punt; si és entre 5 i 10, 2 punts; i si és superior a 10 mitosis se li assignaran 3 punts.

4.4.6 Presència de necrosis tumoral

La necrosis tumoral és la mort de les cèl·lules tumorals, apareix quan el creixement cel·lular és tan gran i ràpid que no dona temps a la formació de vasos sanguinis nous per irrigar la tumoració; la imatge habitual és la necrosi en la zona central de la tumoració ja que en la perifèria aquesta aprofita els vasos del teixit sà per alimentar-se (**Fig 4.4**).

Amb tinció d'hematoxilina-eosina s'avalua la presència o no de necrosi en almenys el 10% del tumor, considerant-se una variable dicotòmica (sí o no).

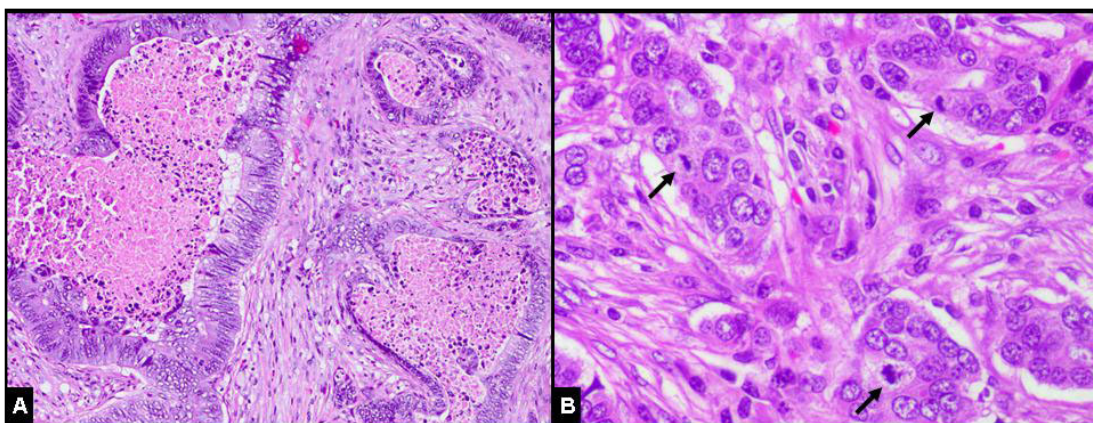


Fig. 4.4- A) Presència de necrosis en el component infiltrant (material rosat), HE 200X. B) Presència de mitosis abundants (fletxes), HE 400X.

4.4.7 Mida de la tumoració

Es té en compte el diàmetre màxim de la tumoració, mesurat en centímetres.

És una variable contínua.

4.4.8 Nombre de ganglis extrets

És el nombre de ganglis limfàtics aïllats, ja sigui en la limfadenectomia com en la peça de mastectomia, el resultat final és la suma de tots els ganglis trobats en les mostres remeses al servei d'anatomia patològica en el

moment de la primera intervenció quirúrgica o en l'ampliació de la primera cirurgia.

La variable és un nombre enter continu.

4.4.9 Nombre de ganglis metastàtics

És el nombre de ganglis que presenten infiltració pel carcinoma ductal de mama.

La variable és un nombre enter i continu.

4.4.10 Tipus de metastasi

Segons la mida de la infiltració del gangli limfàtic és divideix en tres grups: cèl·lules tumorals soltes, quan la mida és inferior a 0'2 mm; micrometàstasi quan la mida es troba entre 0'2 mm i 2 mm, i macrometàstasi (o metastasis) quan és major a 2 mm. En aquest punt també es té en compte si la tumoració trenca o no la càpsula ganglionar.

El nombre de ganglis limfàtics afectats s'avalua com una variable contínua amb nombres enters.

El tipus de metastasi s'avalua com una variable qualitativa (cèl·lules soltes, micrometàstasi o macrometàstasi).

La ruptura capsular s'avalua com una variable dicotòmica (si o no).

Són unes variables qualitatives.

4.4.11 Última data de control de la pacient

És l'últim dia que la pacient ha estat visitada per l'oncòleg/a o el ginecòleg/a.

4.4.12 Estat actual de la pacient

S'avalua l'estat que presenta la pacient en el moment de l'últim control, es dividirà en: viva i sense signes de malaltia; viva amb malaltia tumoral activa; morta per patologia no relacionada amb la neoplàsia (pacients sense neoplàsia en el moment de la mort); morta degut al creixement neoplàsic; i, en pocs casos, història no recuperada per trasllat de la pacient o per la pèrdua del seguiment.

És una variable qualitativa.

4.4.13 Presència/característiques de la recidiva tumoral/metàstasi

S'avalua si reapareix la neoplàsia un cop acabat el primer tractament eradicador. En cas de recidiva s'avalua si és local (recidiva), regional (recidiva regional), mama contralateral (recidiva contralateral), o a distància (metàstasi).

És una variable qualitativa.

4.4.14 Temps lliure de malaltia

És el temps transcorregut entre el dia de la primera intervenció quirúrgica i el dia que es confirma histològicament la recidiva o metàstasi, si no apareix recidiva o metàstasi el temps lliure de malaltia és el mateix que el temps total del seguiment.

És una variable numeral contínua que avaluem en dies.

4.4.15 Temps total de seguiment

És el temps transcorregut des de la primera cirurgia fins al dia de l'últim control realitzat per la pacient.

Variable numeral contínua, s'avalua en dies.

4.4.16 Presència d'una segona neoplàsia d'origen no mamari

Es revisen els antecedents quirúrgics i mèdics de les pacients en cerca d'una segona neoplàsia que no estigui relacionada amb la tumoració mamària a estudi. En cas de trobar-ne s'avalua la data, localització i tipus de tractament.

Variable qualitativa.

4.4.17 Variables immunohistoquímiques

4.4.17.1 Característiques generals de l'estudi immunohistoquímic

Al mateix temps que es revisen les històries es busquen els blocs de teixit en parafina de cadascun d'elles, i es procedirà a fer blocs de parafina amb tissue-arrays, que utilitzarem pels estudis immunohistoquímics posteriors. Els blocs de tissue-arrays es realitzaran amb cilindres de 4 mm de diàmetre de la mostra tumoral de cada cas, agrupats de 17 en 17 casos a cada bloc de tissue-arrays. D'aquests blocs de tissue-arrays es realitzarà primer de tot un tall histològic de 3 micres per tenyir-lo amb la tinció convencional d'eosina-hematoxilina per valorar la correcta representació tumoral de cada cas, amb els casos poc o no representats es realitzarà una nova pressa de mostra i formació de nous tissue-arrays. Seguidament es practica l'estudi immunohistoquímic sobre talls de 3 micres dels blocs de tissue-arrays que es muntaran sobre portaobjectes tractats amb adhesius tissulars, seguint el procés del sistema BondMax, sistema de rutina en el nostre laboratori d'Anatomia Patològica:

1r) Es desparafinen les seccions, a 72°C, i es rehidrataran amb alcohols en concentracions decreixents.

2n) Es realitza recuperació antigènica a pH6 o 9, a 100°C, amb temps variable entre 10 i 30 minuts, segons l'anticòs usat.

3r) Es realitza el bloqueig de la peroxidasa amb “peroxid block” a temperatura ambient durant 5 minuts.

4t) Es renten amb aigua destil·lada.

5è) S'incuben amb l'anticòs primari corresponent a l'antigen a identificar.

6è) Es realitza el bloqueig de les unions inespecífiques, durant 15 minuts a temperatura ambient.

7è) S'incuben amb el sistema de visualització (anticòs secundari) durant 8 minuts.

8è) Es revelen amb diaminobencidina (DAB) durant 7 minuts.

9è) Es realitza contratinció amb hematoxilina de Harris durant 7 minuts.

10è) Posteriorment es deshidraten i es munten amb mitjà de muntatge ràpid (DPX).

4.4.17.2 Variables immunohistoquímiques estudiades

4.4.17.2.1 Receptors d'estrògens

És un marcador nuclear que detecta si les cèl·lules expressen la proteïna receptora dels estrògens, es valora com a positiu si s'expressa com a mínim en el 10% de les cèl·lules (**Fig 4.5**).

S'utilitza el producte de la casa Novocastra clona 6F11 prediluït per la casa comercial distribuïdora, amb recuperació antigènica a pH9 i un temps d'incubació de 30 minuts.

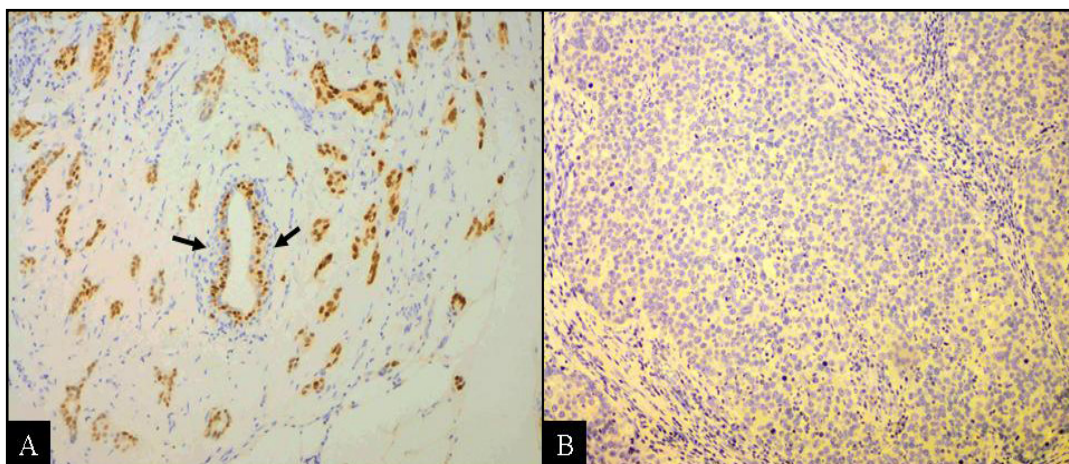


Figura 4.5- Receptors d'estrògens. A) Positivitat de les cèl·lules tumorals, i de les cèl·lules luminals d'un ducte mamari (fletxes), 40X. B) Negativitat per receptors d'estrògens en un tumor poc diferenciat, 100X.

4.4.17.2.2 Receptors de progesterona

És un marcador nuclear que detecta si les cèl·lules expressen la proteïna receptora de la progesterona, es valora com a positiu si s'expressa com a mínim en el 10% de les cèl·lules.

S'utilitza el producte de la casa Novocastra clona 16ySAN27 prediluit per la casa comercial distribuïdora, amb recuperació antigènica a pH 6 i un temps d'incubació de 30 minuts.

4.4.17.2.3 C-erb-B2 (Her2/neu)

És un marcador de membrana cel·lular que permet avaluar mitjançant tècnica immunohistoquímica l'expressió del gen Her-2/neu (**Figura 4.6**), es grada en dos grups:

- **Negatiu:** quan l'expressió és nul·la (0+) ó molt dèbil i discontinua (1+). També es consideren negatius els casos d'expressió intensa i quasi total (2+), que l'estudi de l'amplificació gènica sigui negatiu per FISH.

- **Positiu:** quan l'expressió és intensa i total de la membrana (3+) o en els casos d'expressió intensa i quasi total (2+), que l'estudi de l'amplificació gènica resulti positiu per FISH.

S'utilitza el kit de detecció Oracle de la casa comercial Menarini, amb un temps d'incubació de 15 minuts.

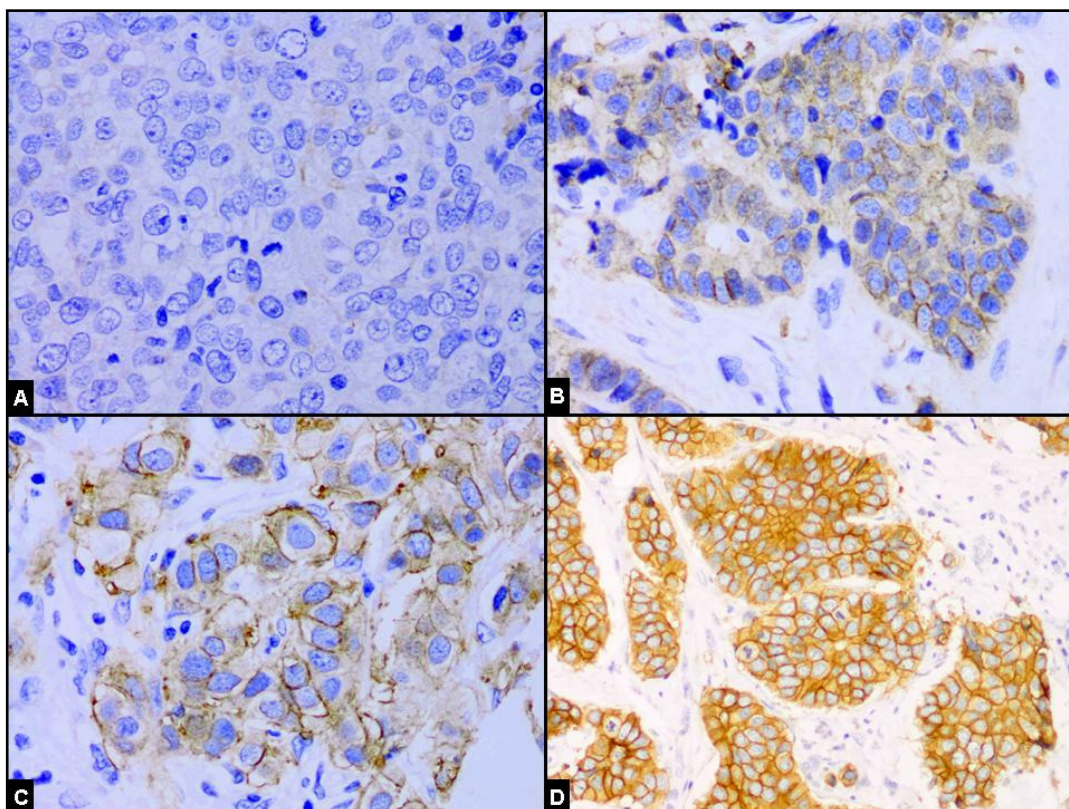


Figura 4.6- Estudi immunohistoquímic del c-erb-B2, 400X. A) Negatiu 0. B) Negatiu 1+. C) Indeterminat 2+. D) Positiu 3+.

4.4.17.2.4 Citoqueratina 5/6

És un marcador de membrana que valora l'expressió del tipus 5 i 6 de citoqueratina, s'avalua de la forma següent: negatiu o positiu (expressió de qualsevol intensitat en més del 10% de les cèl·lules tumorals).

S'utilitza la clona CK 5/6.007 prediluída de la casa comercial DAKO, amb recuperació antigènica a pH 9 i un temps d'incubació de 15 minuts.

4.4.17.2.5 Citoqueratina 14

És un marcador de membrana que valora l'expressió del tipus 14 de citoqueratina, s'avalua de la forma següent: negatiu o positiu (expressió de qualsevol tipus d'intensitat en més del 10% de les cèl·lules tumorals).

S'utilitza la clona LL002 prediluïda de la casa comercial Novocastra, amb recuperació antigènica a pH 6 i un temps d'incubació de 15 minuts.

4.4.17.2.6 Citoqueratina 34 β E12

És un marcador de membrana que valora l'expressió del tipus 34 β E12 de citoqueratina, una citoqueratina d'alt pes molecular, s'avalua de la forma següent: negatiu o positiu (si s'expressa amb qualsevol intensitat en més del 10% de les cèl·lules tumorals) (**Fig 4.7**).

S'utilitza la clona 34 β E12 prediluïda de la casa comercial Novocastra, amb recuperació antigènica a pH 6 i un temps d'incubació de 15 minuts.

4.4.17.2.7 EGFR (HER1)

És un marcador de membrana que valora l'expressió dels receptors dels factors de creixement epitelial I, s'avalua en dos grups: negatiu o positiu (quan l'expressió de qualsevol tipus és superior en el 20% de les cèl·lules tumorals).

S'utilitza la clona EGFR.25 prediluïda de la casa Novocastra, amb recuperació antigènica a pH 9 i un temps d'incubació de 15 minuts.

4.4.17.2.8 c-kit (CD117)

És un marcador de membrana cel·lular i citoplasmàtic, s'avalua de la manera següent: negatiu o positiu (qualsevol tipus de positivitats en més del 10% de les cèl·lules tumorals).

S'utilitza l'anticòs prediluit de la casa comercial Biocare Medical, amb recuperació antigènica a pH 9 i un temps d'incubació de 30 minuts.

4.4.17.2.9 Receptors d'andrògens

És un marcador nuclear que marca la presència de receptors d'andrògens, s'avalua per percentatge de cèl·lules tumorals que l'expressen, considerant-se positiu quan l'expressió es dona en el 10% o més dels nuclis de les cèl·lules tumorals.

S'utilitza la clona F39.4.1 de la casa comercial Biogenex, amb recuperació antigènica a pH 9 i un temps d'incubació de 40 minuts.

4.4.17.2.10 p16

És un marcador nuclear i citoplasmàtic, no s'interpreten com a positives les cèl·lules que només tenen positivitat citoplasmàtica, es considera positiu quan l'expressió es dona en el 10% o més dels nuclis de les cèl·lules tumorals.

S'utilitza la clona JC8 prediluit, de la casa comercial Biocare Medical, amb recuperació antigènica a pH 9 i un temps d'incubació de 15 minuts.

4.4.17.2.11 p53

Es valora la positivitat nuclear de les cèl·lules tumorals fent un recompte de 200 cèl·lules i expressant-ne el resultat en percentatge, es considera positiu si s'expressa en més del 10% de les cèl·lules tumorals (amb qualsevol intensitat), i negatiu si l'expressió és del 10% o menys (**Fig 4.7**).

S'utilitza la clona DO-7 prediluïda de la casa comercial Novocastra, amb recuperació antigènica a pH 6 i un temps d'incubació de 15 minuts.

4.4.17.2.12 ki-67 (Índex de proliferació cel·lular)

És un marcador nuclear que és positiu en totes les cèl·lules que no es troben en fase G0 del cicle cel·lular, s'avalua fent el recompte de 200 cèl·lules, expressant-se el resultat en percentatge. S'ha realitzat una valoració per agrupació de percentatges, grup 1 del 0 al 10% de positivitat cel·lular i grup 2 més del 10%.

S'utilitza la clona MM1 prediluída de la casa comercial Novocastra, amb recuperació antigènica a pH9 i un temps d'incubació de 15 minuts.

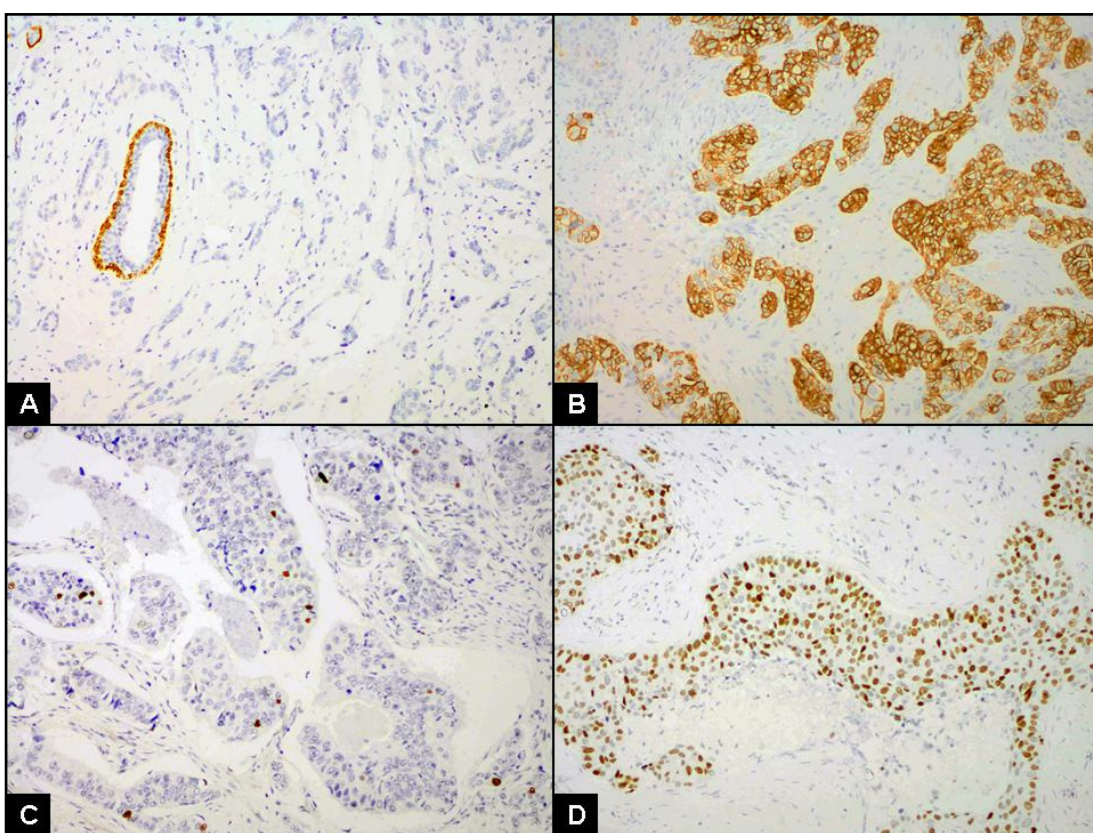


Figura 4.7- Estudi immunohistoquímic: exemple de marcador de membrana (A,B) i de marcador nuclear (C,D), 100X. A) Citoqueratines basals, s'observa la negativitat de les cèl·lules tumorals contrastant amb la positivitat de les cèl·lules basals d'un ducte mamari sense alteracions. B) Citoqueratines basals, positivitat intensa i extensa de membrana a les cèl·lules tumorals. C) p53, expressió als nuclis de les cèl·lules tumorals <10% (negatiu). D) p53, expressió als nuclis de les cèl·lules tumorals >10% (positiu).

4.4.18 Classificació Molecular

Es divideix en quatre grups:

4.4.18.1 Grup luminal A

S'inclouen totes les pacients en que l'estudi immunohistoquímic mostri positivitat de les cèl·lules tumorals pels receptors d'estrògens i progesterona, independentment del resultat del c-erb-B2 i altres marcadors immunohistoquímics.

4.4.18.2 Grup luminal B

S'inclouen totes les pacients en que l'estudi immunohistoquímic mostri positivitat de les cèl·lules tumorals pels receptors d'estrògens i negativitat pels receptors de progesterona, independentment del resultat del c-erb-B2 i altres marcadors immunohistoquímics.

4.4.18.3 Grup c-erb-B2

S'inclouen totes les pacients en que l'estudi immunohistoquímic mostri negativitat de les cèl·lules tumorals pels receptors d'estrògens i negativitat pels receptors de progesterona, i positivitat per c-erb-B2 3+ o 2+ amb confirmació de l'amplificació per tècnica de FISH.

4.4.18.4 Triple negatiu

S'inclouen totes les pacients en que l'estudi immunohistoquímic mostri negativitat de les cèl·lules tumorals pels receptors d'estrògens, pels receptors de progesterona i pel c-erb-B2.

Dins d'aquest es realitzarà el subgrup de fenotip basal quan un o més dels següents marcadors immunohistoquímics siguin positius: la CK14, la CK5/6 o el EGFR.

4.4.19 Noves propostes de classificació molecular

Ens proposem comprovar si algunes modificacions en la classificació molecular poden donar-li un millor valor pronòstic i col·laborar en el tractament de la pacient.

Les propostes són:

- 1) Agrupar els grups luminal A i B en un sol grup de luminals.
- 2) Dividir els triples negatius en basals i no basals. Considerant basals aquells que expressin Citoqueratina 5/6, Citoqueratina 14 i/o EGFR.

4.4.20 Estudi estadístic

Per realitzar l'estudi estadístic s'utilitza el paquet estadístic SPSS versió 15.

Primer de tot es realitza un estudi descriptiu de totes les variables, tant de les dades clíniques-personals, com de les histològiques i les obtingudes en l'estudi immunohistoquímic. Les variables categòriques expressem els resultats mitjançant freqüències absolutes (N) i relatives (%). A les variables contínues es calcula la mitjana i desviació, quan la variable presenta una distribució normal, i la mitjana i els percentils 25 i 75, quan la variable no sigui normal o bé sigui un score. El Kolmogorov-Smirnov test serà emprat per a testar la normalitat.

Després es realitza un estudi univariant per a comparar totes les variables amb les variables d'interès (èxitus i recidiva), seguint la metodologia següent:

Per a determinar diferències a nivell de mitjana entre 2 grups, s'aplicarà un t-test quan la mostra sigui normal, i una prova de Mann-Whitney quan la mostra sigui no paramètrica. Quan es vulguin comparar 3 o més grups, s'empraran l'ANOVA i la prova de Kruskal-Wallis, respectivament.

L'associació entre variables categòriques es realitza amb la prova de Xi-quadrat. Per avaluar l'associació entre les dues variables es calcularà l'Odds Ratio (OR) i el seu interval de confiança (IC) al 95%.

La supervivència i el temps de recidiva s'expressen mitjançant les seves mitjanes i es representen amb les corbes Kaplan-Meier.

En l'anàlisi multivariant s'empra la regressió de Cox, i s'inclouen als models les variables estadísticament significatives de l'anàlisi univariant. Per analitzar la magnitud de l'associació entre les variables considerades com probables predictores, expressant-se els resultats amb OR utilitzant un IC del 95 %.

Totes les proves estadístiques corresponen a proves bilaterals, fixant-se el nivell de significació estadística en menys del 0'05 ($p < 0'05$).

5. RESULTATS

5.1 ANÀLISI ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

Es realitza l'anàlisi descriptiva de totes les variables estudiades tant de les dades clíniques, com de les característiques histològiques i dels resultats dels estudis immunohistoquímics.

En l'estudi s'han inclòs un total de 311 pacients que presenten una mitjana d'edat de 58'21 anys, amb una mediana de 57 i una desviació típica de 14,082.

D'aquestes, 81 pacients va patir una recidiva de la malaltia (**Figura 5.1**) i d'aquestes 21 van patir una segona recidiva, i 5 d'aquestes van presentar una tercera recidiva. A la **taula 5.1** podem observar en quin estat es troben les pacients actualment, destacant un 15'43% de mortalitat (**Figura 5.2**) en relació a la neoplàsia i un 67'52% de pacients vives sense signes de malaltia.

Estat de la pacient al final del temps de seguiment (2010)		
Vives lliures de malaltia	210	(67'52%)
Vives amb malaltia activa	16	(5'14%)
Exitus per la neoplàsia	48	(15'43%)
Exitus per altres motius	33	(10'62%)
Seguiment perdut	4	(1'29%)
<i>Supervivència acumulada del 71'1%</i>		
<i>Recidiva acumulada del 29'3%</i>		

Taula 5.1- Estat de les pacients en el moment de finalitzar el seguiment.

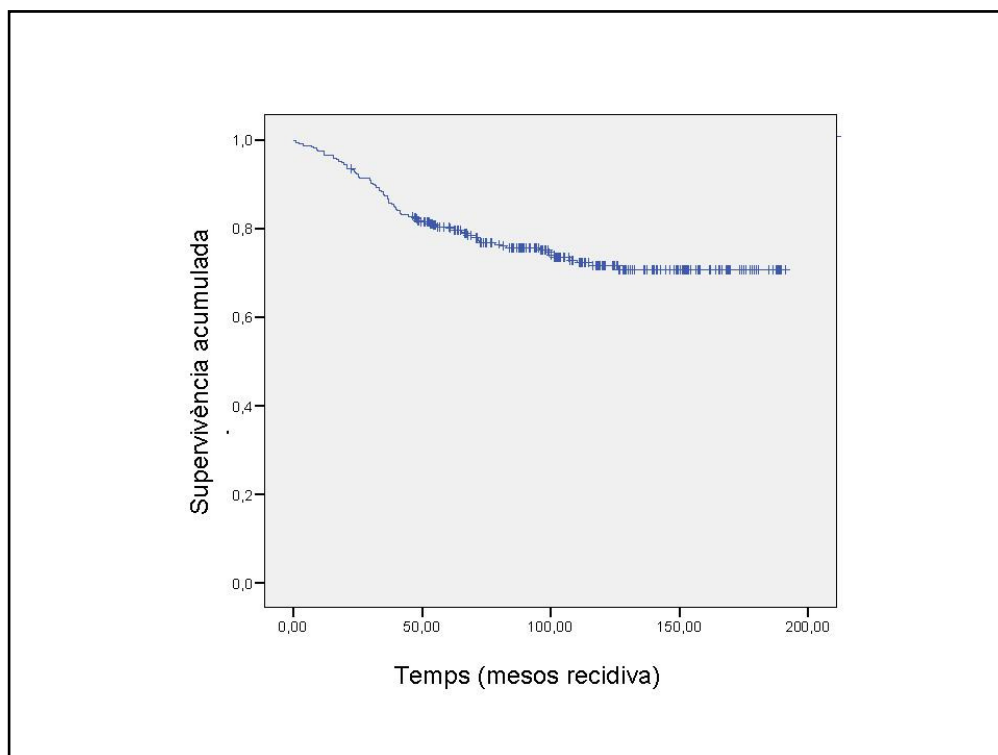


Figura 5.1- Taula de la recidiva acumulada.

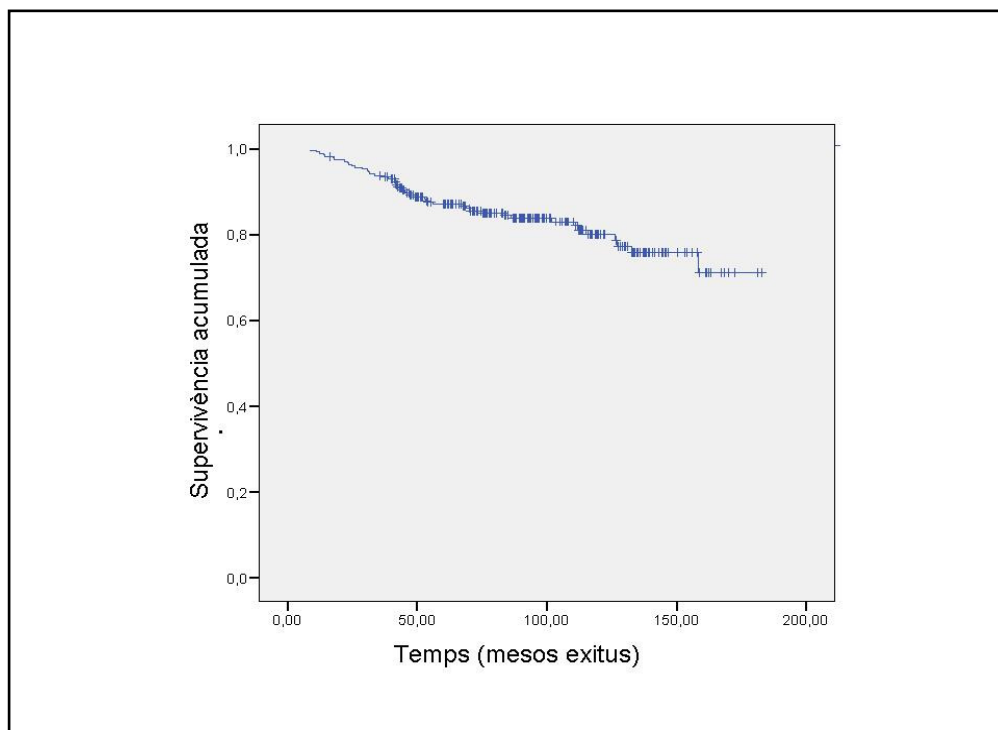


Figura 5.2- Taula de la supervivència acumulada.

La mitjana de temps de seguiment és de 2562'98 dies, amb una desviació típica de 1240'395; i una mediana de 2409 dies. El temps lliure de malaltia mig ha estat de 2379'14 dies i la mediana de 2165.

La mida tumoral mitja és de 2'55 cm amb una desviació típica d'1'86, i una mediana de 2'10 cm. El grau histològic predominant és el 2 (46'33%) seguit del 3 (33'33%) i el menys freqüent és el 1 (20'34%). Un 43'67% de les pacients (131) presenten ganglis metastàsics en el moment de la cirurgia, 78 de les quals amb ruptura de la càpsula ganglionar (**Taula 5.2**).

Variable	Núm de casos	%
Mida tumoral (pT)		
pT1	151	48'55
pT2	137	44'05
pT3	18	5'79
pT4	1	0'32
Ganglis metastàsics (pN)		
0	180	56'33
1 a 3	74	23'79
4 o més	57	19'88
Grau histològic		
Grau 1	61	20'34
Grau 2	139	46'33
Grau 3	100	33'33

Taula 5.2- Distribució de les pacients per mida tumoral, afectació tumoral de ganglis limfàtics i grau histològic de la tumoració.

El 27'65% dels tumors presenten necrosi (86).

Un 8'68% de les pacients presenten una segona neoplàsia, ja sigui en el moment del diagnòstic o posteriorment en aquest (**Taula 5.3**).

<u>Segona neoplàsia. Localitzacions i proporció en %.</u>	
Pell i mucoses	10 (37'37%)
Carcinoma basocel·lular	5
Carcinoma escamós	3
Fibrohistiocitoma maligne	1
Hemangioendotelioma retiforme	1
Tracte digestiu	6 (22'22%)
Adenocarcinoma colon	3
Adenocarcinoma gàstric	2
Adenoma de còlon	1
Àrea ginecològica	4 (14'81%)
Adenocarcinomes endometrial	3
Adenocarcinoma ovàric	1
Hematològic	3 (11'11%)
Limfoma	2
Mieloma	1
Pulmó	2 (7'47%)
Adenocarcinoma	2
Mama	2 (7'47%)
Carcinoma mucinós	1
Carcinoma lobelar	1

Taula 5.3- Localització de les segones neoplàsies.

A la **Taula 5.4** podem veure les dades d'expressió dels estudis immunohistoquímics, tant en nombre de casos positius com en percentatge.

Anticòs	Casos positius	%
Receptors d'estrogens	240	77'17
Receptors de progesterona	175	56'27
C-erb-B2	28	9'00
Citoqueratina 14	19	6'27
Citoqueratina 5/6	28	9'93
Citoqueratina 34βE12	187	62'96
EGFR	36	12'12
C-kit	30	10'03
Ki-67	51	26'78
p16	179	61'30
p53	62	20'33
Receptors d'andrògens	216	74'48

Taula 5.4- Distribució de l'expressió de les variables immunohistoquímiques.

L'expressió de receptors d'andrògens es dona en 216 casos (74'48%), sent major en el grup Her2 (82'36%), seguit de luminals A (78'86%) i B (78'87%), i per últim el grup de triple negatiu (29'17% tan basals com no

basals). El percentatge mig d'expressió de receptors d'andrògens és de 54'04% amb una desviació típica de 38'29 i una mediana de 65%.

A la **Taula 5.5** es representa la divisió per subtipus moleculars en nombre de casos i en percentatge, hi ha un clar domini del grup luminal A.

Grup	Núm de casos	%
Luminal A	175	56'27
Luminal B	71	22'83
Grup Her2	17	5'47
Triple negatiu	48	15'43

Taula 5.5- Distribució dels casos segons la classificació molecular.

5.2 ANÀLISI ESTADÍSTICA UNIVARIANT

5.2.1 Anàlisi estadística univariant respecte a la recidiva

Destaquen com a significants alguns factors morfo-histològics (mida tumoral, ganglis metastàsics, grau histològic, presència de necrosi intratumoral) i alguns de l'estudi immunohistoquímic (citoqueratina 5/6 i citoqueratina 34 β E12, receptors de progesterona i d'andrògens) (**Taula 5.6**).

Variable	Significància (p)
Edat	0'76
Mida	0'000
Ganglis metastàsics	0'000
Grau histològic	0'002
Necrosi	0'003
Receptors d'estrògens	0'41
Receptors de progesterona	0'03
C-erb-B2	0'18
Citoqueratina 14	0'26
Citoqueratina 5/6	0'01
Citoqueratina 34βE12	0'012
C-kit	0'58
EGFR	0'29
Ki-67	0'32
P16	0'43
P53	0'234
Receptors d'andrògens	0'007

Taula 5.6- Estudi univariant respecte a la recidiva.

5.2.2 Anàlisi estadística univariant respecte als èxits

Destaquen com a significatius alguns factors morfo-histològics (mida tumoral, ganglis metastàsics, grau histològic i necrosi intratumoral) i alguns paràmetres immunohistoquímics (receptors de progesterona i d'andrògens i citoqueratina 14) (**Taula 5.7**).

Variable	Significància (p)
Edat	0'31
Mida	0'000
Ganglis metastàsics	0'000
Grau histològic	0'004
Necrosi	0'01
Receptors d'estrògens	0'051
Receptors de progesterona	0'01
C-erb-B2	0'27
Citoqueratina 14	0'036
Citoqueratina 5/6	0'091
Citoqueratina 34 β E12	0'07
C-kit	0'331
EGFR	0'39
Ki-67	0'78
P16	0'492
P53	0'26
Receptors d'andrògens	0'001

Taula 5.7- Estudi univariant per la mortalitat.

5.3 ANÀLISI ESTADÍSTICA MULTIVARIANT

5.3.1 Anàlisi estadístic multivariant per recidiva

Al realitzar l'estudi multivariant mitjançant regressió de Cox, obtenim els resultats expressats a la **taula 5.8**.

Variable	p	OR	IC95%
Ganglis metastàsics	0'008	1'072	1'018-1'129
Grau (score)*	0'040	1'167	1'007-1'352
Mida (cm)**	0'000	1'347	1'165-1'558
Necrosi	0'192	1'516	0'811-2'834
Receptors de progesterona	0'211	0'671	0'360-1'253
Citoqueratina 34βE12	0'020	0'498	0'277-0'897
Citoqueratina 5/6	0'025	2'106	1'100-4'030
Receptors d'andrògens	0'029	0'993	0'987-0'999

*Per cada número del score que s'augmenta, l'OR augmenta en 1'167
**Per cada centímetre que augmenta el tumor, l'OR augmenta en 1'347

Taula 5.8- Estudi multivariant per les variable significatives en l'estudi univariant per la recidiva.

De tots els paràmetres significatius estadísticament en l'estudi univariat, mantenen la significància la mida tumoral (p 0'000), el grau histològic (p 0'040), la presència de ganglis metastàsics (p 0'008) i l'expressió de CK 34βE12 (p 0'020) (**Figura 5.8**).

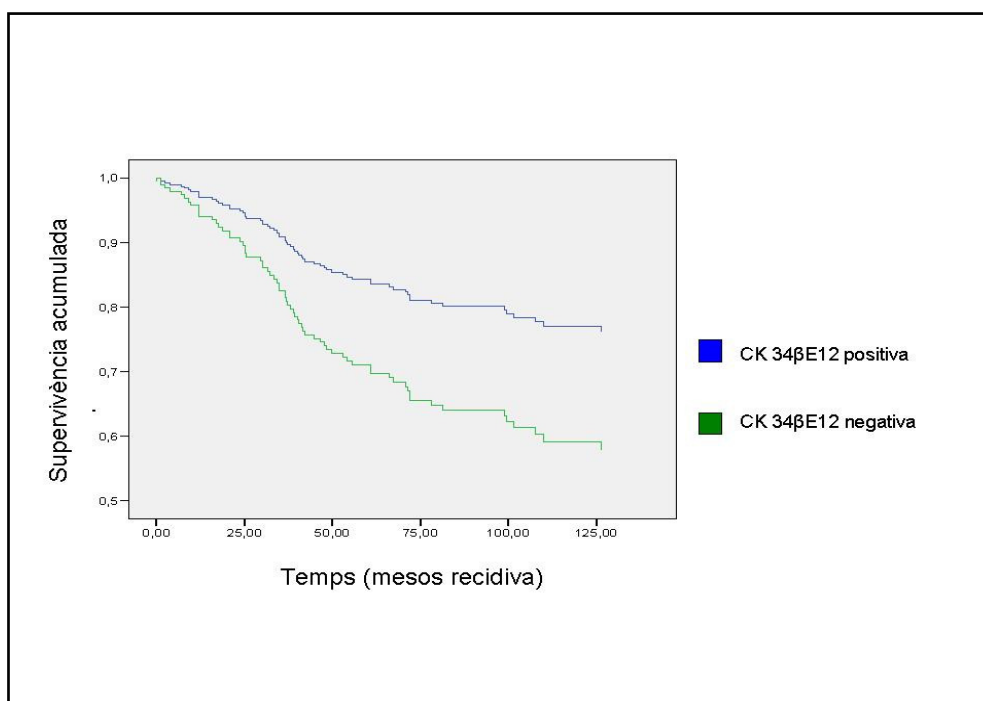


Figura 5.3- Comportament de l'expressió de CK 34βE12 per la recidiva.

5.3.2 Anàlisi estadístic multivariant per èxitus

Es realitza l'estudi multivariant mitjançant regressió de Cox, resultats expressats a la **taula 5.9**.

Variable	p	OR	IC95%
Ganglis metastàsics	0'000	4'900	2'342-10'252
Grau (score)*	0'010	1'306	1'065-1'602
Mida (cm)**	0'014	1'266	1'050-1'527
Necrosi	0'402	1'404	0'635-3'101
Receptors de progesterona	0'678	0'828	0'339-2'022
Citoqueratina 14	0'270	1'889	0'610-5'849
Receptors d'andrògens	0'015	0'449	0'236-0'853

*Per cada número del score que s'augmenta, l'OR augmenta en 1'306
 **Per cada centímetre que augmenta el tumor, l'OR augmenta en 1'266

Taula 5.9- Estudi multivariant de les variables significativament estadístiques en l'estudi univariant per la mortalitat.

De tots els paràmetres estadísticament significatius en l'estudi univariat, mantenen la significància la mida tumoral (p 0'014), el grau histològic (p 0'010), la presència de ganglis metastàsics (p 0'000) (**Figura 5.4**) i l'expressió de receptors d'andrògens (p 0'015) (**Figura 5.5**).

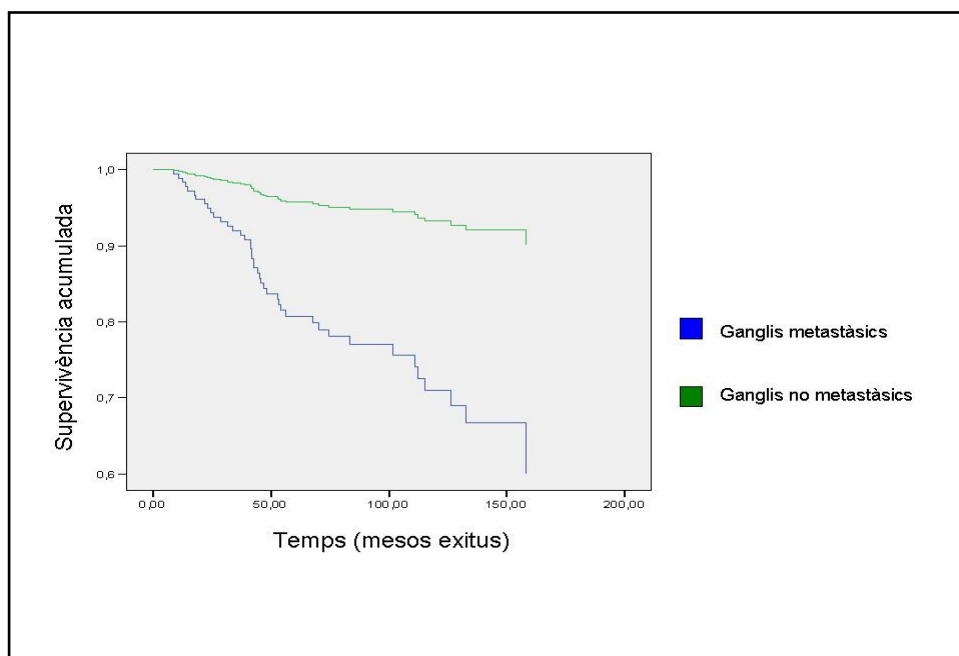


Figura 5.4- Mortalitat en funció de l'estat dels ganglis limfàtics axil·lars.

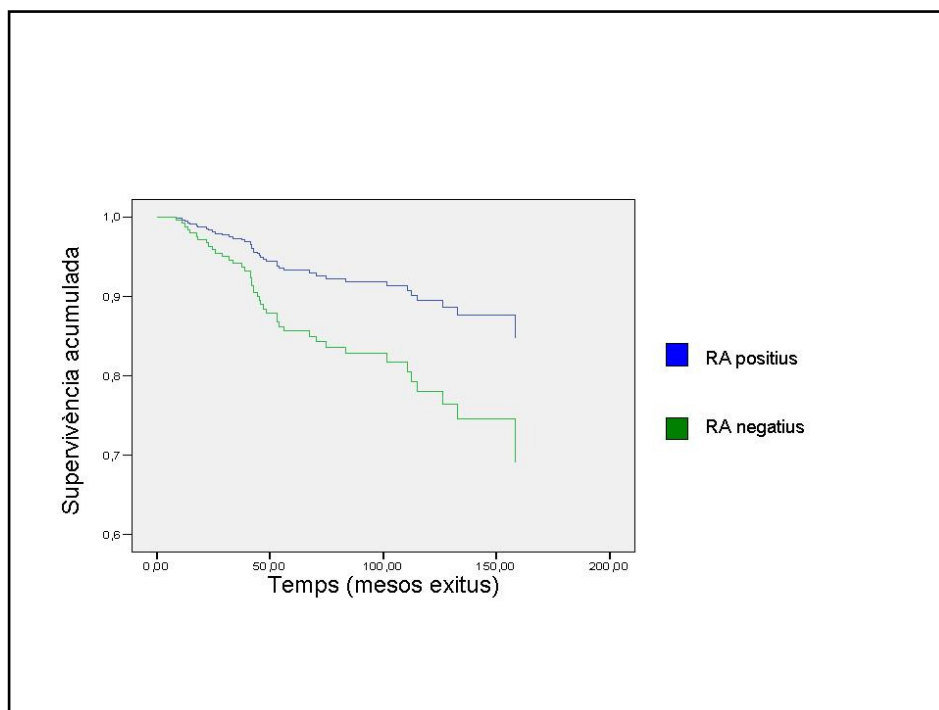


Figura 5.5 - Mortalitat en funció de l'estat dels receptors d'andrògens.

5.3.3 Anàlisi estadística del nombre de ganglis limfàtics

5.3.3.1 En relació a la recidiva

S'agrupen les pacients en: sense ganglis limfàtics metastàsics, les que presenten d'1 a 3 ganglis afectes i les que presenten 4 o més. El comportament entre els diferents grups és estadísticament significatiu entre els casos sense ganglis afectats i els que tenen 1-3 o més de 4, entre els grups de ganglis afectats no mostra diferències significatives en quant a recidiva (**Taula 5.10**).

La ruptura de la càpsula ganglionar és un fet significatiu en quant la probabilitat de recidiva.

Ganglis Metastàsics	p	RR	IC(95%)
0 vs 1-3	0'004	2'49	1'32-4'71
0 vs 4 o més	0'000	4'67	2'40-9'06
1-3 vs 4 o més	0'082	1'87	0'92-3'82
Càpsula íntegra vs trencada	0'021	2'57	1'14-5'81

Taula 5.10- Comparació de grups de ganglis metastàsics per recidiva.

5.3.3.2 En relació a l'èxitus

Com per la recidiva, el comportament entre els diferents grups és estadísticament significatiu entre els casos sense ganglis afectats i els que tenen 1-3 o més de 4, entre els grups de ganglis afectats no mostra diferències significatives en quant a mortalitat (**Taula 5.11**).

La ruptura de la càpsula ganglionar no és un fet significatiu en quant la probabilitat de mortalitat.

Ganglis Metastàsics	p	RR	IC(95%)
0 vs 1-3	0'000	5'01	2'19-11'48
0 vs 4 o més	0'000	8'13	3'52-18'80
1-3 vs 4 o més	0'23	1'62	0'73-3'60
Càpsula íntegra vs trencada	0'12	2'08	0'82-5'27

Taula 5.11- Comparació de grups de ganglis metastàsics per èxitus.

5.3.4 Anàlisi estadística del grau histològic

5.3.4.1 En relació a la recidiva

Estratificant el grau histològic en ben diferenciats, moderadament diferenciat i mal diferenciats, trobem diferències estadísticament significatives entre el grup de carcinomes ben diferenciats i els altres dos grups pel que fa al risc de recidiva (**Taula 5.12**).

Grau histològics comparats	p	RR	IC(95%)
Moderat diferenciat vs ben	0'038	2'47	1'03-5'96
Mal diferenciat vs ben	0'001	4'26	1'75-10'35
Mal diferenciat vs moderat	0'058	1'72	0'98-3'02

Taula 5.12- Comparació dels graus histològics per recidiva

5.3.4.2 En relació a l'èxitus

En quant a la mortalitat també trobem diferències estadísticament significatives entre el grup de carcinomes ben diferenciats i els altres dos grups (**Taula 5.13**).

Grau histològics comparats	p	RR	IC(95%)
Moderat diferenciat vs ben	0'003	11'79	1'55-89'99
Mal diferenciat vs ben	0'001	15'38	2'0-118'02
Mal diferenciat vs moderat	0'438	1'30	0'67-2'55

Taula 5.13- Comparació dels graus histològics per èxitus.

5.3.5 Anàlisi estadística de la classificació molecular

5.3.5.1 En relació a la recidiva

Primer es comparen els grups de classificació molecular quan aquesta es divideix en luminal A, luminal B, grup Her2 i triple negatiu (Classificació 1) (**Taula 5.14**) on trobem diferències significatives entre els grup luminal A i el B, entre els luminal A i els triple negatiu, i entre els triple negatiu i els Her2. (**Figura 5.6**)

Grups comparats	p	RR	IC(95%)
Luminal A vs Luminal B	0'042	1'88	1'02-3'46
Luminal A vs Triple negatiu	0'000	3'43	1'83-6'44
Luminal A vs grup Her2	0'35	0'49	0'11-2'24
Luminal B vs Triple negatiu	0'68	1'17	0'55-2'52
Luminal B vs grup Her2	0'074	0'26	0'05-1'24
Triple negatiu vs grup Her2	0'048	4'50	0'92-21'99

Taula 5.14- Comparació grups de la classificació molecular 1 per recidiva.

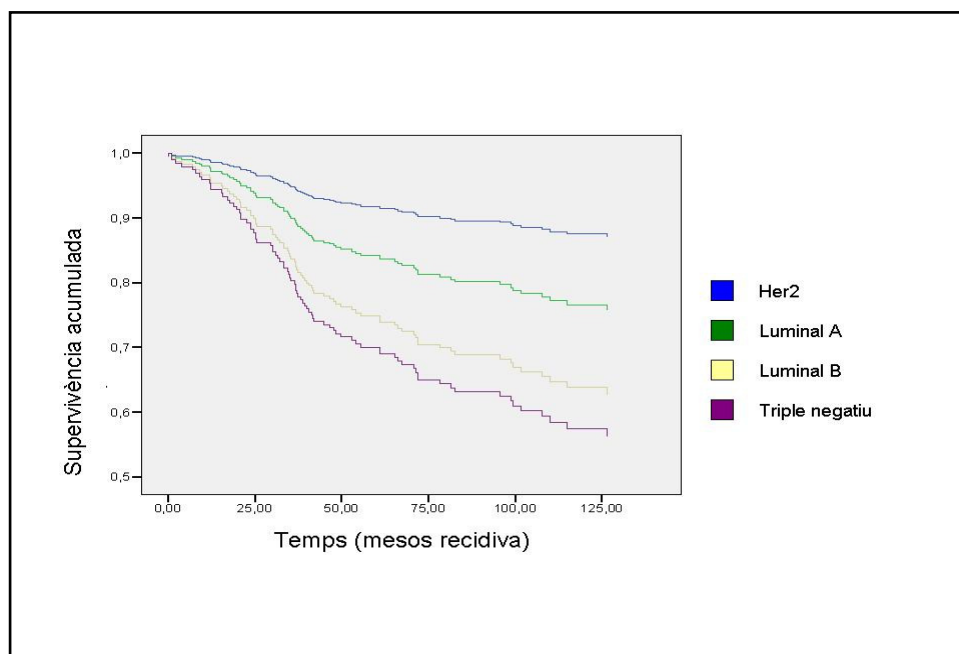


Figura 5.6- Gràfica de recidiva per patrons moleculars del model 1.

Després es comparen els grups obtinguts de la fusió dels luminals i la separació dels triple negatius en basal i no-basal (classificació 2) (**taula 5.15**), on no trobem diferències significatives entre grups (**Figura 5.7**).

Grups comparats	p	RR	IC(95%)
Luminal vs Triple negatiu basal	0'180	0'593	0'27-1'28
Luminal vs Triple negatiu no basal	0'21	0'51	0'17-1'49
Luminal vs grup Her2	0'197	2'034	0'68-6'10
Triple negatiu basal vs grup Her2	0'051	3'43	0'96-12'26
Triple negatiu no basal vs grup Her2	0'057	4'00	0'91-17'55
Triple negatiu basal vs no basal	0'809	0'857	0'24-3'01

Taula 5.15- Comparació grups de la classificació molecular 2 per recidiva.

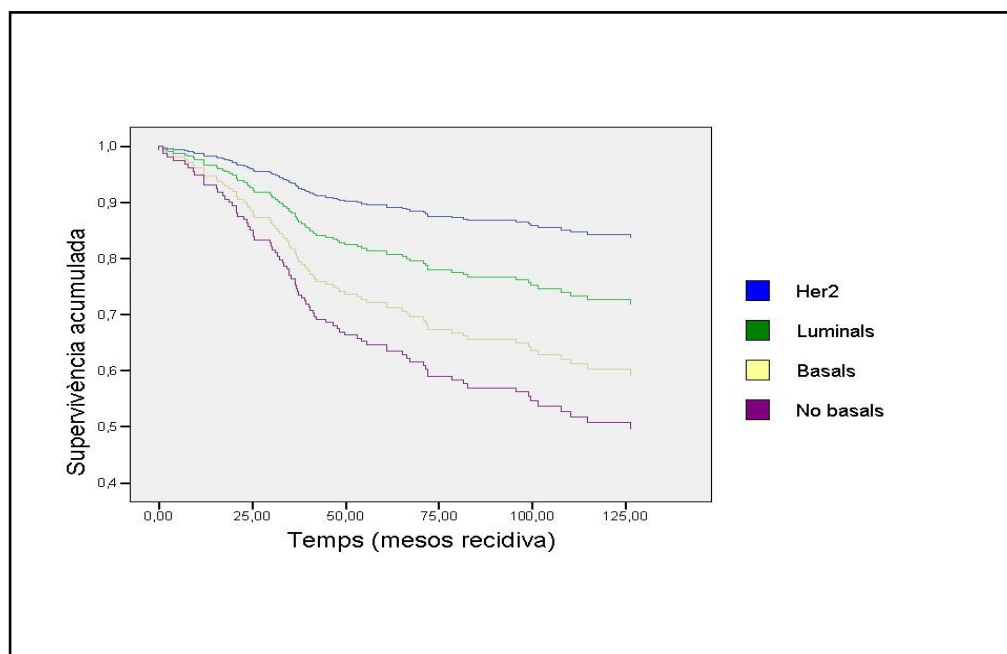


Figura 5.7- Gràfica de recidiva per patrons moleculars del model 2.

5.3.5.2 En relació a èxits

En la comparació de grups de la classificació molecular 1 (**Taula 5.16**), trobem diferències de comportament entre els grups luminal A i B, entre els luminal A i els triple negatius i entre els triple negatius i el grup Her2, igual que ens trobavem a l'estudiar la recidiva. (**Figura 5.8**)

Grups comparats	p	RR	IC(95%)
Luminal A vs Luminal B	0'049	2'13	0'99-4'59
Luminal A vs Triple negatiu	0'002	3'46	1'55-7'68
Luminal A vs grup Her2	0'52	0'51	0'06-4'11
Luminal B vs Triple negatiu	0'28	1'62	0'68-3'88
Luminal B vs grup Her2	0'15	0'24	0'03-1'99
Triple negatiu vs grup Her2	0'049	6'76	0'81-56'68

Taula 5.16- Comparació dels grups de la classificació molecular 1 per èxits.

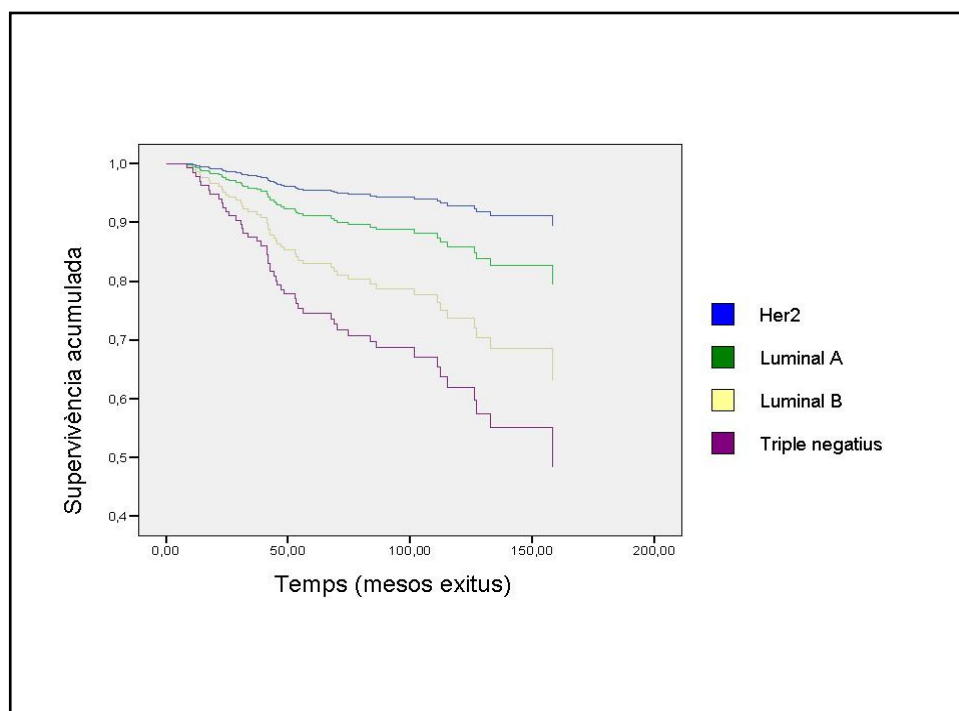


Figura 5.8- Gràfica de mortalitat per patrons moleculars del model 1.

Al comparar els grups de la classificació 2 (**Taula 5.17**) trobem diferències significatives entre el comportament dels luminal A i els triple negatiu basals, i entre els triple negatiu basals i el grup Her2. (**Figura 5.9**)

Grups comparats	p	RR	IC(95%)
Luminal vs Triple negatiu basal	0'017	0'37	0'16-0'85
Luminal vs Triple negatiu no basal	0'148	0'41	0'18-1'42
Luminal vs grup Her2	0'351	2'01	0'45-8'98
Triple negatiu basal vs grup Her2	0'028	5'50	1'07-28'20
Triple negatiu no basal vs grup Her2	0'077	4'89	0'76-31'60
Triple negatiu basal vs no basal	0'869	1'125	0'28-4'57

Taula 5.17- Comparació dels grups de la classificació molecular 2 per èxits.

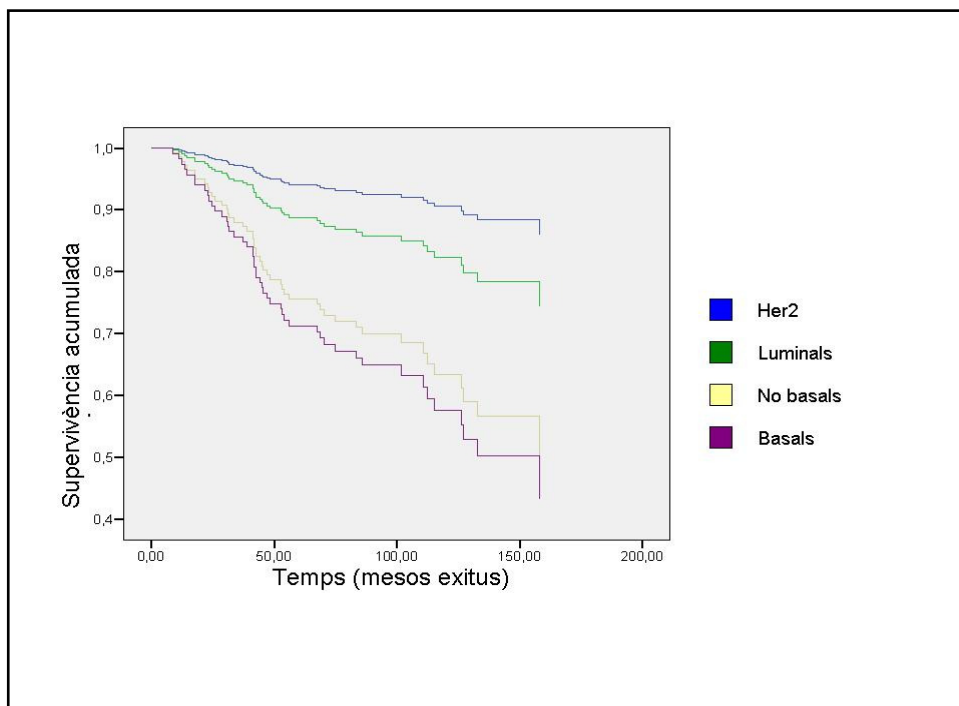


Figura 5.9- Gràfica de mortalitat per patrons moleculars del model 2.

6. DISCUSSIÓ

El carcinoma de mama és la neoplàsia més freqüent entre les dones de totes les races, per això és motiu d'estudi de molts investigadors. En els darrers temps s'apunta cap a una classificació genètica/molecular del càncer de mama per a poder concretar més el tractament i pronòstic esperat per a cada pacient. Aquesta classificació es basa en l'estudi dels gens de les cèl·lules tumorals, per estudis d'ADN, o s'estudia la sobreexpressió de proteïnes, per estudis d'immunohistoquímics. S'ha vist que hi ha una clara relació entre el genotip i el fenotip, sobretot en els subtipus especials de càncer de mama (els tipus no ductals invasius com per exemple el carcinoma medul·lar, carcinoma metaplàstic, ...).¹⁰⁰

En aquest estudi hem valorat la relació existent entre la classificació molecular del càncer de mama i alguns factors més (descrits en l'apartat de materials i mètodes) amb l'índex de recidiva i el temps de supervivència de les pacients amb càncer de mama de tipus ductal infiltrant NOS, és a dir, carcinoma ductal infiltrant pur, exclouent els tumors mixtes que inclouen carcinoma ductal infiltrant. S'han inclòs a l'estudi tant les pacients que presenten afectació tumoral dels ganglis limfàtics axil·lars com les que no.

Les dones de la mostra tenen una edat promig de presentació de la tumoració de 58'21 anys, amb una rang que oscil·la entre 26 i 91 anys. En l'estudi de Wong et al. (2011) en dones asiàtiques sense afectació ganglionar pel tumor presenten una mediana d'edat de presentació menor, 49 anys, però el rang és semblant al nostre, 26-89 anys,⁷⁵ mentre que en l'estudi italià de Rausei et al. (2010), país de característiques geogràfiques i socials semblant al nostre, la mediana és més pròxima (61'1 anys).¹⁰¹ Com en la majoria d'estudis no s'ha observat una relació amb el subtipus molecular tumoral ni les incidències de recidiva o mortalitat, encara que autors descriuen una relació significativa entre la presència de carcinomes del tipus triple negatiu subtipus basal i l'edat de presentació, donant-se aquests en dones més joves.¹⁰²

81 dels casos presenten una recidiva loco-regional (26'04%), xifra molt elevada en comparació al 8'5% dels casos descrits per Rausei a Itàlia,¹⁰¹ però semblant a la presentada per Aleskandarany et al. de 21'7%.¹⁰³

La supervivència global acumulada en el nostre estudi és del 71'1%, si no tenim en compte els casos de pacients mortes per motius no relacionats amb la neoplàsia la supervivència és de 84'57%.; tot i així és inferior significativament al 96'4% descrit pels italians, però igual a la descrita en el registre del càncer de la província de Tarragona (85% als 5 anys) i a d'altres estudis europeus, i superior a la descrites en països menys desenvolupats com Tailàndia (63%).^{101,104}

En el moment del diagnòstic la majoria de casos es troben en estadi T1 (48'55%) o T2 (44'05%), és a dir, el diàmetre major és inferior a 5 cm. En el nostre estudi sembla que el percentatge de T1 (≤ 2 cm) és menor que en d'altres, Rausei et al. (2010) a Itàlia parlen d'un 68'8% de T1 i un 26'6% de T2,¹⁰¹ en l'estudi anteriorment citat de Wong et al. (2010) descriuen el 72'1% de casos diagnosticats en T1 i el 27'55% de casos en T2,⁷⁵ i Aleskandarany et al. (2011) descriuen un 61'8% de la mostra com a T1 i un 38'25% en T2.¹⁰³ Tot i la diferència existent entre el percentatges de tumors diagnosticats en estadi T1 i T2 entre la nostra mostra i les d'altres estudis, el percentatge conjunt de T1 i T2 és semblant.

En el nostre estudi la mida és un factor pronòstic important tant per la recidiva (p 0'000) amb un augment del risc de 1'347 per cada centímetre de diàmetre, i del 1'266 per la mortalitat (p 0'014). És a dir, per una tumoració de 2 centímetres el risc de recidiva és de 2'7 i el de mortalitat de 2'53, mentre que per una de tres centímetres el risc de recidiva és de 4'05 i el de mortalitat de 3'79, per tant els tumors en estadi pT1 tindran un millor pronòstic que els pT2 o superiors.

L'afectació ganglionar axil·lar és el factor pronòstic independent més important en el càncer de mama. El experts de St. Gallen han definit com grup d'alt risc les pacients amb 4 o més ganglis afectats i les pacients amb

d'1 a 3 ganglis afectats amb sobreexpressió de HER2/neu; la resta de pacients amb d'1 a 3 ganglis les inclouen en un grup intermedi de risc. En estudis univariants es relaciona significativament amb l'edat de la pacient, la mida tumoral, la presència d'invasió de vasos limfàtics, la invasió perineural, la presència de carcinoma in situ i d'hiperplàsia epitelial, amb la presència de necrosi, amb l'expressió immunohistoquímica d'EGFR i amb el grup de triple-negatiu subtipus basal. Al realitzar l'estudi multivariant només es relaciona significativament amb la invasió de vasos limfàtics i/o sanguinis (OR 17'94, $p < 0'001$) i la positivitat per CK5/6 (OR 0'003, $p 0'009$). Les micrometàstasis han mostrat importància pel que fa a la supervivència en alguns estudis, mentre que la presència de cèl·lules tumorals aïllades no mostra cap tipus de relació amb el pronòstic de la pacient.¹⁰⁵

La presència de ganglis axil·lars regionals metastàsics en el moment del diagnòstic és del 43'67%, mentre que en altres estudis es lleugerament inferior (Rausei et al. (2010) 27'2%, Aleskandarany et al. (2011) 38'7%);^{101,104} quan observem el nombre de ganglis afectats un 24'67% presenten entre 1 i 3 ganglis afectats, i un 19% 4 o més. A l'estudiar la relació entre la presència de ganglis limfàtics axil·lars metastàsics i la recidiva o la supervivència, el nostre estudi confirma la tendència descrita en la literatura, observant un augment de la recidiva i mortalitat per cada gangli metastàtic en 1'072 i 1'076 respectivament. Al comparar els grups de pacients per nombre de ganglis, trobem que tenir d'1 a 3 ganglis afectes augmenta un 2'489 el risc de recidiva i un 5'014 la mortalitat respecte les pacients sense afectació ganglionar; mentre que si tenen 4 o més ganglis afectes l'augment és del 4'667 i 8'135 respectivament. Quan comparem el grup de 4 o més ganglis afectats amb el grup d'1 a 3, no mostren significància estadística en quant a recidiva ($p 0'082$) ni mortalitat ($p 0'23$). Per tant queda demostrat que la presència de ganglis limfàtics axil·lars regionals metastàsics aporta un pitjor pronòstic en quan a recidiva i mortalitat per la pacient, i no tan sols això, sinó que el nombre de ganglis limfàtics afectats és important, amb cada gangli afectat augmenta el risc de recidiva i mortalitat. Quan agrupem les pacients amb ganglis metastàsics en dos

subgrups, utilitzant com a punt de tall 3 ganglis afectats (com es descriu en la literatura), trobem que el grup de 4 ó més ganglis afectats presenten pitjor pronòstic que les pacients amb 3 o menys ganglis afectes, però els resultats no són estadísticament significatius.

De les pacients amb ganglis afectats quelcom més de la meitat (57'25%) presenten ruptura de la càpsula ganglionar, factor de mal pronòstic clàssic en la majoria de tipus tumorals de tot l'organisme. En el nostre estudi la ruptura de la càpsula ganglionar en els ganglis metastàsics es mostra significativa (p 0'021) pel que fa referència a la recidiva augmentant-ne el risc en un 2'571; mentre que no es mostra significativa en quan la supervivència (p 0'118). Per tant podem dir que la ruptura de la capsula ganglionar té un paper important per predir la recidiva però no en quan la supervivència de la pacient.

Podem pensar que el fet de tenir un menor nombre de pacients diagnosticades amb tumors en estadi T1 ($\leq 2\text{cm}$), un major nombre de casos amb afectació ganglionar axil·lar i un major nombre de recidives loco-regionals, significa que el diagnòstic en la població és més tardà que en aquests indrets, ja que la geografia i els costums són semblants. Aquest fet, probablement, és degut a que la majoria de casos estudiats són de l'època quan encara no estava implementat el control-screening poblacional al nostre país, mentre que en d'altres països de nivells similar ja ho estava; a més a més, s'ha demostrat en diversos estudis^{14,15} que la mida tumoral és un factor pronòstic independent; és a dir, a major mida pitjor pronòstic. Aquest dos motius poden ser la causa d'aquestes variacions, també pot influir el fet d'estudiar només els carcinomes ductals infiltrants NOS, ja que es descarten tumors menys agressius que farien augmentar tant el percentatge de tumors en estadi T1 com el percentatge de supervivència.

Pel que fa al grau histològic la majoria de casos són grau 2, seguits dels grau 3 i els grau 1 en aquest ordre, com en la majoria d'estudis, encara que les sèries varien bastant degut a els diferents sistemes de gradació, les

diferències entre les cohorts estudiades i els diferents tipus de preservació de les mostres.¹⁰⁶ En estudis recents basats en l'expressió gènica s'observa que dins el grup de carcinomes grau histològic 1 el patró d'expressió és comú, el mateix passa entre els tumors de grau histològic 3; mentre que el grau histològic 2 no mostren una expressió comú i es poden dividir en dos grups, un de comportament similar als tumors de grau 1 i un similar als tumors de grau 3, utilitzant el ki-67 o altres marcadors immunohistoquímics.^{107,108}

Rausei et al. (2010) en l'anàlisi multivariant l'únic factor predictor independent de recidiva loco-regional és el grau histològic, inclús independent de l'expressió d'estrògens, i pel que fa a la supervivència global, a part del grau histològic també apareixen com a factors predictors independents l'estat dels ganglis limfàtics i dels receptors de progesterona.¹⁰¹ En el nostre estudi amb l'augment de l'score del grau histològic augmenta la probabilitat de recidiva de la malaltia, per cada punt d'score la probabilitat augmenta en 1'162, mentre que no mostra significança pronòstica per la supervivència. Quan comparem per grups (ben, moderadament i mal diferenciat) trobem que els tumors ben diferenciats tenen menor risc de recidiva que els moderadament diferenciats (risc augmentat en 2'475 p 0'038) i que els mal diferenciats (risc augmentat en 4'259 p 0'001). Els mal diferenciats també tenen un risc major de recidiva que els moderadament diferenciats encara que no és significatiu estadísticament (OR 1'721 p0'058), però si s'observa una tendència. Pel que fa a la supervivència, els ben diferenciats segueixen sent els de millor pronòstic tan si comparem amb els moderadament diferenciats (risc 11'794 p 0'003), com comparant amb els mal diferenciats (risc 15'380 p 0'001). No trobem diferències significatives entre els moderadament i els mal diferenciats (p 0'438).

Resumint, el grau histològic és un factor pronòstic important com ja fa temps està descrit a la literatura, tant pels grups de classificació d'Elson i

Ellis, com pel propi nombre d'score, és a dir, dins del mateix grau a menor score millor pronòstic.

La necrosi en la zona de tumor infiltrant, sobretot quan és extensa, es correlaciona amb un major grau histològic, un major nombre de ganglis metastàsics, un període de recidiva menor (p 0'007) i una disminució de la supervivència (p 0'003), una vegada passats dos anys sense presentar recidiva, la presència o no de necrosi és irrellevant pel pronòstic.^{109,110} La presència de necrosis central en el tumor s'ha vist que està associat a subtipus de tumors de pitjor pronòstic en graus 1-2 (OR 2'5, IC95% 1'4-4'3) però no en grau 3 (OR 1'1, IC95% 0'7-1'8), i també és un factor de mal pronòstic independent pel que fa a la supervivència. També serveix per identificar grups biològics (triple negatius sobretot el subtipus basal), aquest fet dóna un factor pronòstic negatiu a la presència de necrosi en l'estudi histològic.^{111,112} Un estudi demostra que la presència de necrosis tumoral és un factor predictor de resposta completa a la quimioteràpia neoadjuvant amb docetaxel i doxorubicina. El valor predictiu positiu és baix però el valor predictiu negatiu és alt, amb això pot tenir certa utilitat clínica per realitzar una neoadjuvència diferent en els pacients sense necrosis en la core-biòpsia o fer un tractament primari quirúrgic.¹¹³

En el nostre estudi la necrosi és dóna en el 27'65% dels casos, quasi tots ells del subtipus molecular triple negatiu. En l'estudi univariant la presència de necrosi té un valor significatiu en quant a la recidiva de la tumoració, augmentant-ne el risc en poc més que el doble (p 0'003, OR 2'270), com en la mortalitat (p 0'010 OR 2'306). Al realitzar l'estudi multivariant, ambdues deixen de tenir significació (recidiva p 0'192, supervivència p 0'402), aquest fet pot ser degut a l'associació entre la necrosi i els tumors d'alt grau (grau 3) i el subtipus molecular triple negatiu, sent el factor pronòstic independent el grau histològic, i la necrosi una mera associació a aquests tumors de més alt grau.

El risc de desenvolupar un segon tumor primari en pacients diagnosticats de càncer s'ha doblat en els darrers vint anys, entre els motius destaquen la millora de les proves de screening i l'augment de la supervivència dels pacients amb càncer. Independentment del tumors que poden apareixer per atzar, en els càncers de mama, trobem que tant l'ús de la quimioteràpia, com de la radioteràpia, com del tamoxifè fa augmentar el risc d'aparició de nous càncers, ja siguin tumors hematològics per la quimioteràpia, carcinomes de pulmó i tumors vascular per la radioteràpia, o d'úter per l'hormonoteràpia. Tot i això és major el benefici de les proves diagnòstiques i del tractament que el risc que tenen de provocar una segona neoplàsia.^{114,115,116,117} En el nostra mostra 8'68% de les pacients presenten una segona neoplàsia, hi ha estudis que descriuen que el 1'14% de tots els pacients amb un tumor primari, de qualsevol origen, acabaran desenvolupant un segon tumor primari al mateix òrgan o en un altre.¹¹⁸ Aquesta diferència entre els nostres resultats i els generals es podria explicar principalment per dos motius: un d'ells és el fet de que valoren tots els tipus tumorals de tots els òrgans en un sol grup, i hi ha tumors molt agressius que no permeten l'aparició d'un nou tumor, i l'altre fet és l'elevada supervivència de les pacients amb càncer de mama, comparant amb altres tumors, també fa que augmenti la probabilitat d'aparició d'un nou càncer.

L'expressió d'estrògens és present en el 77'17% dels casos, aquestes dades es mouen en el rang d'altres estudis de característiques similars que parlen des del 62'8% fins al 85%. Passa el mateix amb els receptors de progesterona (56'27%), el rang es mou entre el 56'1% i el 76'9%.^{75,101,103}

En l'estudi univariant l'expressió de receptors d'estrògens no té significació pronòstica ni en quant a recidiva tumoral ni per la supervivència, per aquesta última la p és de 0'051, encara que no significativa si mostra una tendència cap a un efecte protector en quan el risc d'èxitus de 0'511, com es descriu a la majoria d'estudis, seria d'esperar que si la mostra fos més gran, aquesta tendència que apunta cap un efecte protector agafés significança estadística ja que el valor de p és molt proper a 0'05. Probablement aquest

efecte protector es veu augmentat per l'ús de medicaments antiestrogènics que utilitzen aquests receptors com diana terapèutica, aconseguint que la tumoració respongui millor que en pacients en que no es pot usar aquests fàrmacs.

Pel que fa a l'expressió dels receptors de progesterona si que mostren un efecte protector tant pel que fa a la recidiva (OR 0'569 p 0'030) com per la supervivència (OR 0'434, p 0'010), com es demostra en molts estudis anteriors, fins i tot algun article apunta a que l'expressió de receptors de progesterona en tumors amb receptors d'estrògens positius millora la supervivència de les pacients que reben teràpia antiestrogènica.¹¹⁷ En l'estudi multivariant els receptors de progesterona perden la significança pronòstica de l'univariant tant pel que fa referència a la recidiva (p 0'211) com per la supervivència (p 0'678), i els receptors d'estrògens són clarament no significatius (p 0'428 i p 0'812, respectivament).

Un 9% dels tumors expressen c-erb-B2 de forma contínua i intensa (3+) o es confirma l'amplificació del gen per estudi FISH, aquest percentatge és proper al de la majoria d'estudis revisats.^{75,101,103,104} Es descriu a la literatura que les pacients amb sobreexpressió d'HER2 tenen una menor supervivència amb el doble de mortalitat que les dones sense sobreexpressió, sent el segon factor independent pronòstic més important després de l'estat dels ganglis axilars.¹⁰⁵ En el nostre estudi l'expressió de c-erb-B2 positiva (3 creus en l'estudi immunohistoquímic o FISH amplificat) no mostra una significança pronòstica ni en quant a recidiva (p 0'18) ni per la supervivència (p 0'27), probablement per la baixa quantitat de casos que conformen la mostra amb aquestes característiques.

Pel que fa a l'expressió de les citoqueratines basals (5/6,14, 34βE12) Jumppanen et al. (2007) comenten que no queda clar si és un factor pronòstic independent o no, van realitzar un estudi excoent els tumors amb receptors d'estrògens positius perquè aquesta positivitat i el tractament d'aquests (diferent als receptors d'estrògens negatius) podien ser factors

confusors, van demostrar que entre els tumors negatius per als receptors d'estrògens l'expressió de citoqueratines basals no és un factor pronòstic independent, l'única diferència trobada és una major tendència a la recidiva durant el primer any dels tumors subtipus basal, que amb el temps tendeix a igualar-se amb els tumors del grup no-basal.¹¹⁹ Rahka et al. (2010) en el seu estudi només troben que l'expressió de CK5/6 i de CK14 és útil per establir el grup de carcinomes de tipus basal,¹⁰⁶ mentre que Thike et al. (2010) asseguren que amb l'estudi de la CK14, EGFR i CK34βE12 pot classificar correctament un 84% dels casos de carcinoma basal.¹⁰²

A l'estudiar l'expressió de les citoqueratines basals en la nostra població trobem que la Citoqueratina 14 s'expressa en el 6'27% dels casos, la CK 5/6 en el 9'93% dels casos i la CK 34βE12 en el 62'96%. L'estudi univariant per la recidiva no mostra significança pronòstica de la CK 14 (p 0'261); però si mostra un efecte pronòstic negatiu la CK 5/6 (p 0'010 OR 2'773), i en efecte pronòstic positiu per la CK 34βE12 (p 0'012 OR 0'439); que es confirmen en l'estudi estadístic multivariant, mostrant el doble de risc de recidiva les pacients que expressen CK 5/6 (p 0'025 OR 2'106), mentre que l'expressió de CK 34βE12 mostra un efecte protector (p 0'015 OR 0'490). Pel que fa referència a la mortalitat l'estudi univariant mostra significança pronòstica de l'expressió de CK 14 (p 0'036 OR 2'951), mentre que la CK 5/6 (p 0'091) i la CK 34βE12 (p 0'736) no en tenen; però en l'estudi multivariant també es perd la significança de la expressió de CK14 (p 0'270).

Resumint tenim que l'expressió de CK 5/6 indica mal pronòstic pel que fa a la recidiva i la CK14 mostra pitjor pronòstic en quan a supervivència en l'estudi univariant, però perd la significància en el multivariant; mentre que l'expressió de CK 34βE12 mostra un efecte protector en quan a la recidiva tumoral, Mehta et al. (2010) descriuen que els tumors triple negatius que expressen CK 34βE12 tenen millor comportament en quan al temps lliure de malaltia i en quan a la supervivència de la pacient.¹²⁰

Pel que fa a l'EGFR en la nostra població s'expressa en un 12'12% dels casos, i no mostra una significança pronòstica pel que fa a recidiva (p 0'395) ni mortalitat (p 0'464), alguns article descriu que dins del grup triple negatiu basal, el fet de expressar EGFR no té significança pronòstica per si mateix.¹⁰²

El c-kit s'expressa entre el 84 i el 90% de lesions benignes, a les cèl·lules mioepitelials. En el carcinoma ductal in situ l'expressió baixa fins al 43%, i segueix baixant fins al 20-36% en els carcinomes infiltrants. Tot i que en els tumors d'alt grau l'expressió és menor, es detecta en el 82% dels càncers mamaris amb metàstasis.^{121,122} També s'associa l'expressió de c-kit al subtipus basal del carcinoma triple negatiu, en aquest subgrup, el fet d'expressar c-kit s'acompanya d'una disminució de la supervivència.¹⁰² En el nostre estudi, el c-kit, s'expressa en el 10'04% dels casos, no sent significativa la seva expressió en quant a la recidiva (p 0'842) ni per a la supervivència (p 0'583).

El paper del ki67 no està molt clar ja que és una tècnica de difícil estandardització, realització i valoració, i els estudis existents parteixen des de diferents punts de tall a l'hora de formar grups d'expressió per immunohistoquímica. També s'ha observat que la presència de major expressió de ki67 es relaciona amb l'absència de receptors d'estrògens i la sobreexpressió de HER2/neu, amb això també es planteja si el punt de tall del ki67 ha de ser el mateix en tots els subtipus tumorals.¹²³ A la literatura cada autor proposa un punt de tall diferent per a l'estudi, molts proposen un 10% d'altres majors i d'altres menors, per exemple Rausei et al. (2010) proposen com punt de tall l'expressió en el 20% de les cèl·lules tumorals obtenint un 49'9% dels casos per sota i un 50'1% per sobre, per contra Aleskandarany et al. (2011) agafen el 10% com a punt de tall i troben resultats semblants, el 49'8% per sota i el 50'2% per sobre; diferenciant pel grau histològic mostra que en els tumors de grau histològic 1 el 85'5% estan per sota del 10%, mentre que en els grau 2 és un 49'8% i en els grau 3 només un 10'6%.^{101,103}

Nosaltres en l'estudi de l'expressió de ki67 hem agafat com punt de tall el 10%; trobant el 84% dels casos en el grup de $\leq 10\%$ i la resta per sobre, al comparar aquest dos grups no hi hem trobat significança pronòstica ni per la recidiva ($p 0'321$) ni per la mortalitat ($p 0'329$). En la literatura, l'expressió de ki67 només s'ha mostrat pronòstic en els casos estudiats post-tractament hormonal, en aquests està associat amb la recidiva, a major expressió de ki67 menor és el temps lliure de malaltia, mentre que l'elevada expressió abans del tractament no té una relació significativa.¹²⁴ També en un altre estudi post tractament quimioteràpic, el ki-67, va ser l'únic factor pronòstic independent pel temps lliure de malaltia, mentre que els receptors d'estrògens, els receptors de progesterona, l'expressió d' HER2, l'estadi clínic i la histologia no ho foren.¹²³

La mutació de p16 s'ha estudiat en molts càncers, veient una certa relació amb la presència del virus del papil·loma humà (VPH), sobretot en càncer d'aparell reproductor femení. En el càncer de mama no està molt clar el paper de la p16 i de moment no s'ha constatat influència del VPH, s'ha descrit que la mutació de p16 és més freqüent en tumors de tipus triple negatiu, això suposaria que la p16 s'associa a un pitjor pronòstic, però més que l'expressió de p16 en si és l'associació amb l'expressió de citoqueratines basals la que dona un pitjor pronòstic a les pacients amb tumors triple negatius.¹²⁵ En la nostra mostra s'expressa en la meitat dels casos, sense significança pronòstica (recidiva $p 0'997$; supervivència $p 0'990$).

Està descrit que la sobreexpressió de p53 en les cèl·lules tumorals s'associa a una mutació del gen i un comportament més agressiu de la tumoració; també, s'ha descrit com a factor independent de pronòstic desfavorable, encara que aquest fet en el càncer de mama està discutit. En la literatura es descriu que entre un 26 i un 54% dels casos de càncer de mama tenen una expressió de p53 en el 10% o més de les cèl·lules, associant-se amb un alt grau histològic i nuclear. També s'ha trobat relació amb la necrosi tumoral en els carcinomes intraductals, i amb la negativitat per als receptors d'estrògens i progesterona, per contra no s'ha associat

amb la mida tumoral.^{111,126} Alguns estudis mostren que l'acumulació de p53 per immunohistoquímica és un factor pronòstic en els càncers de mama sense afectació ganglionar, sobretot en alguns subtipus com el luminal A i els triple negatius.¹²⁷ En la nostra mostra l'expressió de p53 (> 10% de les cèl·lules) la trobem en poc més del 20% dels casos (20'33%); però no té significança pronòstica ni per la recidiva (p 0'234) ni per la supervivència (p 0'430).

L'expressió de receptors d'andrògens (RA) en el càncer de mama és freqüent es dona en el 60-85% dels casos i en el 53'2% dels tumors amb receptors d'estrògens i progesterona negatius, però el seu rol en l'etiogènia i l'evolució d'aquest càncer està poc estudiada. Alguns estudis afirmen que l'expressió de receptors d'andrògens està relacionada significativament amb la de receptors d'estrògens (p<0'001) i progesterona (p=0'035).^{127,128} Els tumors amb RA positius tenen una mida més petita, un menor grau histològic, un estadiatge més baix, més freqüentment els ganglis axil·lars no es troben afectats per la tumoració comparant amb els tumors amb receptors d'andrògens negatius.¹²⁸ L'evidència suggereix que els receptors d'andrògens i els receptors d'estrògens tenen efectes adversos, recolzant que els receptors d'andrògens tenen un paper protector en el desenvolupament del càncer de mama, com s'ha demostrat en alguns estudis, sobretot en tumors receptors d'estrògens positius.¹²⁸ La majoria de tumors receptors d'estrògens positius mostren expressió de receptors d'andrògens, encara que també s'expressen en el grup HER2 i triple negatiu en menor freqüència, l'expressió més alta és en luminals A (83-88%), seguits de luminal B (65-75%), HER-2 (54-56%), triple negatiu (72%), basals (31-39%); i en aquests basals, que expressen en menor percentatge els receptors d'andrògens que els triple negatius en general, s'observa pitjor pronòstic.^{128,129}

En la nostra mostra hem vist que l'expressió de receptors d'andrògens és un factor protector pel que fa a la supervivència (p 0'001, OR 0'310) i a la recidiva (p 0'007, OR 0'460). S'expressen en el 71'38% del total, per subgrups l'expressió és d'un 78'86% en els tumors luminals A, un 78'87% en els luminal B, un 82'36% en els Her2 i un 29'17% en els triple negatius (tant dels basals com dels no-basals). En la nostra mostra trobem un augment de l'expressió en el grup Her2 respecte els estudis de la literatura així com una menor expressió en els grups triple negatius, aquest fet podria ser degut a l'escassa mostra de tumors Her2, també podria explicar el comportament relativament bo que trobem en la nostre sèrie d'aquest grups de tumors.

També, s'ha observat que els tumors amb major expressió de RA responen millor a la quimioteràpia amb 5-fluorascil i metotrexat,¹²⁸ fins i tot s'ha vist en estudis recents que l'utilització d'antiandrògens frena l'evolució dels tumors amb receptors d'estrògens i progesterona negatius i receptors d'andrògens positius.¹²⁹

Quan estudiem els subgrups moleculars (luminal A, luminal B, grup Her2, triple negatius) trobem que el grup luminal B té un 1'877 més de risc de recidiva que el luminal A (p 0'042) i un 2'132 més de risc de mortalitat (p 0'049), aquest fet està descrit en la literatura, tant com a subgrups moleculars com per la presència de receptors de progesterona positius. El grup triple negatiu mostra un 3'431 més risc de recidiva que els luminal A (p 0'000) i un 4'5 més que el grup Her2, aquest últim fet no està descrit a la literatura, en aquesta tenen ambdós (triple negatius i grup Her2) un mal pronòstic similar,¹¹³ probablement l'escassa mostra del grup Her2 emmascara el resultat del nostre estudi. També mostra major risc de mortalitat, un 3'456 més que els luminals A (p 0'002) i un 6'759 més que els Her2 (p 0'049).

El grup luminal A és el que presenta millor pronòstic tan pel temps lliure de malaltia com per la supervivència, en l'altre extrem trobem el grup triple negatiu. Els luminal B tenen un pronòstic entremig, mentre que el grup Her2

es descriu de mal pronòstic però en el nostre estudi té un pronòstic semblant als luminal A, segurament degut a l'escassa mostra que conforma aquest grup que no permet una correcta valoració estadística. Alguns estudis descriuen que els luminals B o els tumors receptors d'estrògens negatius tenen en els primers anys pitjor pronòstic que els luminal A, però que amb el temps tendeixen a unir-se les corbes fins igualar-se aproximadament als 8-10 anys.^{113,130} Da Silva et al. (2007) afirmen que totes les recidives de carcinoma basal es donen en els primers 5 anys, per això sembla tenir pitjor pronòstic i si no recidiva en aquests primers 5 anys el pronòstic és relativament bó.¹³¹ En el nostre estudi s'observa aquesta mortalitat inicial més elevada en els tumors que no expressen receptors d'estrògens, però no tendeixen a igualar-se amb els anys, les corbes de supervivència segueixen un trajecte paral·lel en el temps (**Figura 5.8**).

També s'han descrit un augment del nombre de metàstasis en dones amb tumors triple-negatius, sobretot de tipus basal,¹⁰² Luck et al descriuen que els principals llocs de metàstasi dels carcinomes de subtipus basal són el pulmó (52%, mentre que els altres tipus 23%) i cervell (18%, els altres 2%).^{131,132}

Pel que fa referència a la classificació molecular 2 (agrupem els luminals A i B en un grup, separem els triple negatius en basals i no-basals), no trobem diferències significatives entre cap dels grups pel que fa a la recidiva. Des del punt de vista de la supervivència s'observa una major mortalitat pels basals en comparació als luminals (risc 2'734 p 0'017) i també si comparem amb el grup Her 2 (risc 5'5 p 0'028), en canvi els no-basals no presenten diferències significatives versus els luminals (p 0'148) ni versus el grup Her2 (p 0'077), entre els dos grups de triple negatius no hi ha diferències significatives (p 0'869).

Resumint, el subgrup basal dels triple negatius és el que té pitjor pronòstic almenys pel que fa a la supervivència al comparar-lo amb el grup de luminals. Al subdividir el grup de triple negatius en basals i no-basals, la

mostra de cada grup disminueix molt i, a l'igual que el grup Her2, pot ser que sigui insuficient perquè al realitzar l'estudi estadístic apareguin diferències significatives. Fadare et al. (2007) descriuen que quan la determinació del subtipus basal es realitza per estudis genètics, si que mostren un pitjor pronòstic, mentre que si la classificació es realitza per estudis immunohistoquímics el grup format és més heterogeni i de vegades no queda clar el pitjor pronòstic.¹³³

Podem arribar a la conclusió, si obviem el grup Her2 pels problemes ja citats, que el grup luminal A seria el que tindria millor pronòstic tant per temps lliures de malaltia com per supervivència, mentre que el subtipus basal dels triple negatius seria el que tindria pitjor pronòstic per a tot.¹³⁰ Recomanem utilitzar la classificació molecular que dividiria els tumors en els grups luminal A, luminal B, grup Her2, triple negatius basals i triple negatius no basals; ja que dins dels luminals el subgrup A i B presenten diferències significatives entre ells, i dins dels triple negatius, tot i que estadísticament la diferència entre basals i no-basals no és significativa, els basals mostren un pitjor pronòstic quan comparem amb els subtipus luminal.

Limitacions de l'estudi

A l'incloure només el carcinoma ductal pur fa que en l'estudi de la classificació molecular ens apareguin desavinences amb d'altres estudis, ja que la majoria de carcinomes lobel·lars són del grup luminal A, i també deixem de banda alguns carcinomes metaplàstics o medul·lars que serien del grup triple negatiu, alguns d'ells de subtipus basal. Aquest fet pot fer desaparèixer alguna diferència estadísticament significativa en d'altres estudis que no discriminen per patró histològic, per exemple els carcinomes ductals pur representen només un 80% dels tumors basals.¹³⁴

A l'hora de classificar els tumors basals per immunohistoquímica tenim dos problemes principals: un és la complexitat de la realització de l'estudi amb CK 5/6, i l'altre és l'heterogeneïtat d'expressió de les citoqueratines basals. En un estudi s'ha vist que només un terç dels carcinomes de

subtipus basals expressen citoqueratines en més del 50% de les cèl·lules tumorals,¹³⁵ fet que provoca una mala classificació d'alguns tumors basals si no està representada la zona d'expressió en la mostra estudiada; sobretot aquest fet afecta als estudis realitzats amb tissue-microarrays.¹³⁶

L'estudi retrospectiu dels deu anys fa que algunes pacients, les més recents, tinguin menor temps de seguiment que d'altres, podent ser infraestimada l'aparició d'alguna recidiva.

El fet de tenir pocs casos en el grup c-erb-B2 (Her2) fer que la mostra estudiada sigui insuficient per tenir uns resultats estadísticament significatius pel que fa a supervivència i recidiva al valorar els grups de la classificació molecular.

7. CONCLUSIONS

1.- Tal i com apareix a la literatura l'afectació dels ganglis axil·lars és el factor pronòstic més important tant pel que fa a la recidiva com a la supervivència. Amb l'augment del nombre de ganglis limfàtics afectats augmenta proporcionalment el risc de recidiva i mortalitat. La ruptura de la càpsula ganglionar augmenta el risc de recidiva, però no el de mortalitat.

2.- Confirmem també, com es descriu a la literatura, que la mida tumoral és el segon factor pronòstic en quant a recidiva i mortalitat.

3.- El grau histològic és un altre factor pronòstic descrit a la literatura. Reafirmem aquesta punt i observem que mesura que augmenta el grau, inclús l'score, augmenta el risc de recidiva i la mortalitat. Per tant la classificació d'Elston i Ellis és de gran utilitat ja sigui amb els grups (ben/moderada/mal diferenciat) com en la puntuació obtinguda a l'score (3-9).

4.- Al realitzar l'estudi univariant la necrosi es mostra com a factor de mal pronòstic, però al realitzar el multivariant perd la significança. Això pot ser degut a que la necrosi s'associa als tumors de més alt grau histològic, sobretot al subgrup triple negatiu. Podem arribar a la conclusió que no és la necrosi la que aporta mal pronòstic sinó l'alt grau tumoral, sent la necrosi una mera associació a aquests tipus de tumors.

5.- La presència de receptors d'andrògens són un factor de bon pronòstic tant pel que fa a la recidiva com a la supervivència. Aquest punt obre un nou camp tant en l'avaluació del pronòstic de la pacient, com a futures dianes terapèutiques.

6.- Dels marcadors immunohistoquímics mostren una utilitat pronòstica per la recidiva la CK 5/6 (n'augmenta el risc) i la CK 34 β E12 (en disminueix el risc).

7.- Des del punt de vista molecular el grup luminal A és el que presenta millor pronòstic tant per recidiva com per a supervivència, seguits dels

luminals B. Els de pitjor pronòstic són els triple negatius, sobretot els de subgrup basal.

8.- Actualment, la classificació molecular del càncer de mama no està estesa en la pràctica diària. Només aplicant l'estudi immunohistoquímic, per receptors d'estrògens i progesterona, HER2, EGFR, CK 14 i CK 5/6, es podria realitzar una classificació molecular bastant acurada pel maneig diari de la pacient sense uns costos exagerats.

9.- Recolzem una classificació molecular amb cinc subtipus luminal A, luminal B, grup Her2, triple negatius basals i triple negatius no-basals; per les diferències pronòstiques existents tant entre els subgrups de luminals com entre els subgrups de triple negatius.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murria T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2007; 57: 43-66
2. Globocan 2002 Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. Ferlay J, Bray F. Pisani P, Parkin DM, editors. Lyon: International Agency for Research on Cancer. 2002 Version 1,0. Cancer Base No. 5
3. Galceran J, Ameijide A, Cardó X, Piñol JL, Gumà J, Saladié F et al. El càncer a Tarragona, 1980-2001. incidència, mortalitat, supervivència i prevalença. Registre de Càncer de Tarragona. Fundació Lliga per a la Investigació i Prevenció del Càncer. Reus, 2008
4. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E et al. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 1004; 54: 8-29
5. Willet W. Nongenetic factors in the causation of càncer. In: Harris J, Lippman M, Morrow M, Osborne K, editors. *Diseases of the Breast*. 3th ed. Philadelphia. USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 223-76
6. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast càncer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; 365: 1687-717
7. Rosai and Ackerman's *Surgical pathology* 9rd edition. Mosby, London 2004
8. Parkin M, editor. *Cancer incidence in five continents*. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2002
9. EUROCORE-3: survival of càncer patients diagnosed 1990-94, results and commentary. Sant M, Aareleid T, Berrino F, Bielska Lasota M, Carli PM, Faivre J et al. EUROCORE Working Group. *Ann Oncol* 2003; 14 Suppl 5:v61-118.

- 10.** Ragaz J. Impact of HER-2/NEU expression on natural history and outcomes of human breast cancer. In: Harris J, Lippman M, Morrow M, Osborne K, editors. Diseases of the breast. 3th ed. Philadelphia. USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 619-52
- 11.** Nixon AJ, Neuberger D, Hayes DF, Gelman R, Connolly JL, Schnitt S et al. Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *J Clin Oncol* 1994; 12: 888-94
- 12.** Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L et al., editors. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2002. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2003
- 13.** Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24740 breast cancer cases. *Cancer* 1989; 63: 181-87
- 14.** Jatoi I, Hilsenbeck SG, Clark GM, Osborne CK. Significance of axillary lymph node metastasis in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17:2334-40
- 15.** Van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347: 1999-2009
- 16.** Espinosa E, Vara JA, Redondo A, Sanchez JJ, Hardisson D, Zamora P et al. Breast Cancer Prognosis Determined by Gene Expression Profiling: A Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction Study. *J Clin Oncol* 2005; 23: 7278-85
- 17.** Gloyeske NC, Goreal W, O'Neil M, Connor C, Tawfik OW, Fan F. Outcomes of breast cancer patients with micrometastases and isolated tumor cells in sentinel lymph nodes. *In Vivo*. 2011 Nov;25: 997-1001.

18. Houvenaeghel G, Bannier M, Nos C, Giard S, Mignotte H, Jacquemier J et al. Non sentinel node involvement prediction for sentinel node micrometastases in breast cancer: Nomogram validation and comparison with other models. *Breast*. 2011 Oct 18. [Epub ahead of print].

19. Michaelson JS, Silverstein M, Wyatt J, Weber G, Moore R, Halpern E et al. Predicting the survival of patients with breast carcinoma using tumor size. *Cancer* 2002; 95: 713-23

20. Gianni L, Baselga J, Eiermann W, Guillem Porta V, Semiglazov V, Lluch A et al. European cooperative trial in operable breast cancer (ECTO): improved freedom from progression (FFP) from adding paclitaxel (T) to doxorubicin (A) followed by cyclophosphamide methotrexate and fluorouracil (CMF). ECTO Study Group. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002

21. Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 1957; 11: 359-77

22. 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

23. Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, deutsch M, Fisher ER et al. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 364: 858-68

24. Elledge R, Allred C. Clinical aspects of estrogen and progesterone receptors. In: Harris J, Lippman M, Morrow M, Osborne K, editors. *Diseases of the Breast*. 3th ed. Philadelphia. USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 603-18

25. Smith IE, Dowsett M, Ebbs SR, Dixon JM, Skene A, Blohmer JU et al. Neoadjuvant treatment of postmenopausal breast cancer with

anastrozole, tamoxifen, or both in combination: the Immediate Preoperative Anastrozole, Tamoxifen, or Combined with Tamoxifen (IMPACT) multicenter double-blind randomized trial. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5108-16

26. Gelber RD, Goldhirsch A. Predicting response to systemic treatments: learning from the past to plan for the future. *Breast* 2005; 14(suppl): s11

27. Hilsenbeck SG, Ravdin PM, de Moor CA, Chamness GC, Osborne CK, Clark GM. Time-dependence of hazard ratios for prognostic factors in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 52: 227-37

28. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D. Prognostic factors in breast cancer. Collage of American Pathologist Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 966-978

29. Sirvent JJ, Santafe M, Salvado MT, Alvaro T, Raventos A, Palacios J. Hormonal receptors, cell proliferation fraction (ki-67) and c-erbB-2 amplification in breast cancer. Relationship between differentiation degree and axillary lymph node metastases. *Histol Histopathol* 1994; 9: 563-70

30. Fabian CJ, Kimler BF. Selective estrogen-receptor modulators for primary prevention of breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1644-55.

31. Fox SB, Smith K, Hollyer J, Greenall M, Hastrich D, Harris AL. The epidermal growth factor receptor as a prognostic marker: results of 370 patients and review of 3009 patients. *Breast Cancer Res Treat* 1994; 29: 41-9

32. Muss HB, Berry DA, Cirrincione CT, Theodoulou M, Mauer AM, Kornblith AB, Partridge AH et al. Adjuvant chemotherapy in older women with early-stage breast cancer. *N Engl J Med*. 2009 May 14;360(20):2055-65

- 33.** De Placido S, Carlomagno C, De Laurentiis M, Bianco AR. C-erbB2 expression predicts tamoxifen efficacy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 52: 55-64
- 34.** Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *Ann Oncol* 2005; 16: 1569-83
- 35.** Konecny G, Pauletti G, Pegram M, Untch M, Dandekar S, Aguilar Z et al. 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
- 36.** Rosen's breast pathology 3rd edition Paul Peter Rosen, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2009
- 37.** Helzlsouer KJ, Selmin O, Huang HY, et al. Association between glutathione-S-transferase M1, P1, and T1 genetic polymorphisms and development of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:512-518
- 38.** Rebbeck TR, Kantoff PW, Krithivas K, et al. Modification of breast cancer risk in BRCA1 mutation carriers by the AIB1 gene. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1999; 91:259-263
- 39.** Seery LT, Knowlden JM, Gee Jm, et al. BRCA1 expression levels predict distant metastasis of sporadic breast cancers. *Int J Cancer* 1999; 84:258-262
- 40.** Couch FJ, weber BL. Mutations and polymorphisms in the familial early-onset breast cancer (BRCA1) gene. *Breast cancer Information Core. Hum Mutat* 1996; 8:8-18
- 41.** Tavtigian SV, simard J, rommens J, et al. The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nat Genet* 1996; 12:333-337

42. Struewing JP, Hartge P, Wacholder S, et al. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 1997; 336:1401-1408
43. Ford D, easton DF, Bishop DT, et al. Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet* 1994; 343:692-695.
44. Rebbeck TR. Inherited genetic predisposition in breast cancer: A population-based prespective. *Cancer* 1999; 86:1673-1681.
45. Chu PG, Weiss LM. Expression of Cytokeratin 5/6 in Epithelial Neoplasms: An Immunohistochemical Study of 509 Cases. *Mod pathol* 2002; 15(1): 6-10
46. Bhalla A, Manjari M, Kahlon SK, Kumar P, Kalra N. Cytokeratin 5/6 expression in benign and malignant breast lesions. *Indian J Pathol Microbiol.* 2010; 53(4):676-8
47. Abd El Rehim DM, Pinder SE, Paish CE, Bell J. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J Pathol* 2004; 203: 661-71
48. Laakso M, Ioman N, Borg A, Isola J. Cytokeratin 5/14-positive breast cancer: trae basal phenotype confined to BRCA1 tumors. *Mod Pathol* 2005; 18(10): 1321-8
49. Thike AA, Igbal J, Cheek PY, Chong AP, Tse GM, Tan B et al. Triple negative breast cancer outcome correlation with immunochemical detection of basal markers. *Am J Surg Pathol* 2010; 34(7): 956-64
50. Li M, Zhang Q, Liu L, Zhou L, Wang Z, Yue S et al. The different clinical significance of EGFR mutations in exon 19 and 21 in non-small cell lung cancer patients of China. *Neoplasma* 2011; 58(1): 74-81

- 51.** Badovinac-Cmjevic T, Jakic-Razumovic J, Podolski P, Plestina S, Sarcevic B, Munjas R et al. Significance of epidermal growth factor receptor expression in breast cancer. *Med Oncol* 2010 Nov 23. [Epub ahead of print]
- 52.** Rossi S, Gasparotto D, Toffolatti L, Pastrello C, Gallina G, Marzotto A et al. Molecular and clinicopathologic characterization of gastrointestinal stromal tumors (GISTs) of small size. *Am J Surg Pathol* 2010; 34(10): 1480-91
- 53.** Molderings GJ, Meis K, Kolck UW, Homann J, Frieling T. Comparative analysis of mutation of tyrosine kinase kit in mast cells from patients with systemic mast cell activation syndrome and healthy subjects. *Immunogenetics* 2010; 62(11-12): 727-7
- 54.** Miettinen M and Lasota J. Kit (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2005; 13: 205-20
- 55.** Reis-Filho JS and Tuut AN. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology* 2008; 52: 108-118)
- 56.** Charpin C, Giusiano S, Charfi S, Secq V, Carpentier S, Andrac L et al. Quantitative immunohistochemical expression of c Kit in breast carcinomas is predictive of patients' outcome. *Br J Cancer* 2009; 101(1): 48-54
- 57.** Yu Q, Niu Y, Liu N, Zhang JZ, Liu TJ, Zhang RJ et al. Expression of androgen receptor in breast cancer and its significance as prognostic factor. *Ann Oncol* 2010; 25
- 58.** Li L, Lu Y. Inhibition of Hypoxia-Induced Cell Motility by p16 in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *J Cancer* 2010; 1: 126-35

- 59.** Zhao YF, Shen SP, Jiang JY, Geng H, Guo JG, Xie LP. Methylation and expression of gene p16INK4 and RB in breast carcinoma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 2010; 39(6): 377-81
- 60.** Kumar, MBBS, MD, FRCPath, V.; Abul K. Abbas, MBBS, Nelson Fausto, MD and Jon Aster, MD. «Molecular basis of cancer». En Saunders (Elsevier). Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease (8th edició)
- 61.** BisofV, Salihovic MP, Narancic NS, Skaric-Juric T, Jakic-Razumovic J, Janicijevic B et al. TP53 gene polymorphisms and breast cancer in Croatian women: a pilot study. *Eur J Gynaecol Oncol* 2010; 31(5): 539-44
- 62.** Chang JC, Hilsenbeck SG, Fuqua SA. Pharmacogenetics of breast cancer: Howard the individualization of therapy. *Cancer Invest* 2009; 27(7): 699-703
- 63.** Klintman M, Bendahl P, Grabau D, Lövgren K, Malmström P, Fernö M. The pronostic value of Ki67 is depenent on estrogen receptor status and histological grade in premenopausal patients with node-negative breast cancer. *Mod Pathol* 2010; 23: 251-9
- 64.** WHO Classification of Tumours. Tumours of the Breast and female genital organs. Tavassoli A, Devilee P. IARC Press. Lyon, 2003
- 65.** Essential of diagnostic breast pathology. Farid Monfeir. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2007
- 66.** Oncoguia de mama 2008. PDO. Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya. Barcelona, 2008
- 67.** Caldarella A, Crocetti E, Bianchi S, Vezzosi V, Urso C, Biancalani M et al. Female breast cancer status according to ER, PR and HER2 expression: a population based analysis. *Pathol Oncol Res*; 2011: 10 (Epub ahead of print)

- 68.** Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA et al. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol* 2005; 23: 7350-60
- 69.** Carey L, Perou C, Livasy C, Dressler L, Cowan D, Conway K et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina breast cancer study. *JAMA* 2006; 295: 2492-2502
- 70.** Pusztai L, Mazouni CH, Anderson K, Wu Y, Symmans F. Molecular classification of breast cancer: limitations and potential. *Oncologist* 2006; 11: 868-77
- 71.** Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8418-23
- 72.** Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5367-74
- 73.** Cheang MC, Voduc D, Bajdik C et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 1368-76
- 74.** Schnitt SJ. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Mod Pathol*. 2010; 23: 560-4
- 75.** Wong FY, Chin FKC, Lee KA, Soong YL, Chua ET. Hormone Receptors and Her-2 Status as Surrogate for Breast Cancer Molecular Subtypes Prognosticate for Disease Control in Node Negative Asian patients treated with Breast Conservation Therapy. *Ann Acad Med Singapore* 2011; 40: 90-6
- 76.** Nguyen PJ, Taghian AG, Katz MS et al. Breast cancer subtype approximated by estrogen receptor, progesterone receptor, and HER-2 is

associated with local and distant recurrence after breast-conserving therapy. J Clin Oncol 2008; 26:2373-8

77. Weigelt B, Horlings HM, Kreik B et al. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. J Pathol 2008; 216: 141-50

78. Piñero-Madrona A, Polo-García L, Alonso-Romero JL, Salinas-Ramos J, Canteras-Jordana M et al. Características inmunohistoquímicas del cáncer de mama: ¿hacia una nueva clasificación? Cir Esp 2008; 84(3): 138-45

79. Voduc KD, Cheang MCU, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast Cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. J Clin Oncol 2010; 28(10): 1684-91

80. Zepeda-Castilla E, Recinos-Money E, Cuéllar-Hubbe M, Robles-Vidal CD, Maafs-Molina. Clasificación molecular del cáncer de mama. E. Cir Ciruj 2008; 76: 87-93

81. Zaha DC, Lazăr E, Lăzureanu C. Clinicopathologic features and five years survival analysis in molecular subtypes of breast cancer. Rom J Morphol Embryol 2010; 51(1): 85-9

82. O'Brien KM, Cole SR, Tse CK et al. Intrinsic breast tumor subtypes, race, and long-term survival in the Carolina Breast Cancer Study. Clin Cancer Res 2010; 16(24): 6100-10

83. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B cancer. J Natl Cancer Inst 2009; 101: 736-50

84. Cancellato G, Maisonneuve P, Rotmensz N et al. Prognosis in women with small (T1mic, T1a, T1b) node-negative operable breast cancer

by immunohistochemically selected subtypes. *Breast Cancer Res Treat.* 2011; 31 (Epub ahead of print)

85. Carey LA, Perou CM, Dressler LG, Livasy CA, Geradts J et al. Race and the poor prognosis basal-like breast cancer (BBC) phenotype in the population-based Carolina Breast Cancer Study. *J Clin Oncol* 2004 (Suppl).

86. Rouzier R, perou CM, Symmans WF et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5678-85

87. Romond EH, Pérez EA, Bryant J et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353:1673-84

88. Buzdar AU, Ibrahim NK, Francis D et al. Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trials in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3676-85

89. Cassol L, Silveira Graudenz M, Zelmanowicz A et al. Basal-like immunophenotype markers and prognosis in early breast cancer. *Tumori.* 2010; 96(6): 966-70

90. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Paish EC, Lee AH, Ellis IO. Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression. *Histopathology* 2007; 50:434-38

91. Perou CM et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406: 747-52

92. Fadare O, Tavassoli F. Clinical and pathologic aspects of basal-like breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 2008; 5(3):149-59

- 93.** Da Silva L, Clarke C, Lakhani SR. Demystifying basal-like breast carcinomas. *J Clin Pathol* 2007; 60: 1328-32
- 94.** TNM classification of Malignant tumours 6th edition. UICC. Sobin Lh, Wittekind C, editors. Wiley-Liss. New York 2002
- 95.** Morris AD, Morris RD, Wilson JF, White J, Steinberg S, Okunieff P et al. Breast-conserving therapy vs mastectomy in early-stage breast cancer: a meta-analysis of 10-year survival. *Cancer J Sci Am* 1997; 3: 6-12
- 96.** Vinh-Hung V, Verschraegen C. Breast-conserving surgery with or without radiotherapy: pooled-analysis for risks of ipsilateral breast tumor recurrence and mortality. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:15-21
- 97.** Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of radiotherapy and surgery in early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy. 133 randomised trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. *Lancet* 1992; 339: 1-5
- 98.** Whelan TJ. Use of conventional radiation therapy as part of breast-conserving treatment. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1718-25).
- 99.** Early Breast Cancer Trialist' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* 1998; 351: 1451-67
- 100.** Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer: How special are they?. *Molec Oncol* 2010; 4: 192-208
- 101.** Rausei S, Rovera F, Dionigi G et al. Predictors of loco-regional recurrence and cancer-related death after breast cancer surgery. *Breast J* 2010 16: Supl1, S29-S33

- 102.** Thike AA, Iqbal J, Cheek PY et al. Triple negative breast cancer: outcome correlation with immunohistochemical detection of basal markers. *Am J Surg Pathol* 2010; 34(7):956-64
- 103.** Aleskandarany MA, Rakha EA, Macmillan RD, Powe DG, Ellis IO, Green AR. MIB1/ki67 labelling index can classify grade 2 breast cancer into two clinically distinct subgroups. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 127:591-99
- 104.** Aphinives P, Puchai S, Vajirodom D, Bhudhisawasdi V. Breast cancer: five-years survival in Srinagarind Hospital, Thailand. *J Med Assoc Thai.* 2010; 93: suppl 3:s25-9
- 105.** Yenidunya S, Bayrak R, Haltas H. Predictive value of pathological and immunohistochemical parameters for axillary lymph node metastasis in breast carcinoma. *Diagn Pathol* 2011; 6:18
- 106.** Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res* 2010; 12:207-19
- 107.** Kondi-Pafiti A, Arkadopoulos N, Gennatas C, Michalaki V, Frangou-Plegmenou M, Chatzipantelis P. Expression of c-kit in common benign and malignant breast lesions. *Tumori* 2010; 96:978-84).
- 108.** Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelman KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol* 2010; 11:174-83
- 109.** Dowsett M, Smith IE, Ebbs SR et al. IMPACT trialists group. Prognostic value of ki67 expression after short-term presurgical endocrine therapy for primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99:167-79
- 110.** Bohn OL, Fuertes-Camilo M, Navarro L, Saldivar J, Sanchez-Sosa S. P16^{INKa} expression in basal-like breast carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2010; 3(6): 600-7

111. Fresno M, Molina P, Pérez del Río MJ et al. p53 expression is of independent predictive value in lymph node-negative breast carcinoma. *Eur J Cancer* 1997; 33: 1268-74

112. Jung S, Jeong J, Shin SH et al. Accumulation of p53 determined by immunohistochemistry as a prognostic marker in node negative breast cancer; analysis according to st Gallen consensus and intrinsic subtypes. *J Surg Oncol* 2011; 103: 207-11

113. Collins LC, Cole KS, Marotti JD, HU R, Schnitt SJ, Tamimi RM. Androgen receptor expression in breast cancer in relation to molecular phenotype: results from the Nurses' Health Study. *Mod Pathol* 2011 epub doi:10.1038/modpathol.2011.54

114. Varras M, Polyzos D, Akrivis Ch. Effects of tamoxifen on the human female genital tract: review of the literature. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2003; 24:258-68

115. Neugut AI, Weinberg MD, Ahsan H, Rescigno J. Carcinogenic effects of radiotherapy for breast cancer. *Oncology (Williston Park).* 1999; 13:1245-56

116. Lorigan P, Califano R, Faivre-Finn C, Howell A, Thatcher N. Lung cancer after treatment for breast cancer. *Lancet Oncol.* 2010; 11: 1184-92

117. Grenader T, Goldberg A, Shavit L. Second cancers in patients with male breast cancer: a literature review. *J Cancer Surviv* 2008; 2: 73-8

118. Mehdi I, Shah AH, Moona MS et al. Synchronous and metachronous malignant tumours expect the unexpected. *J Pak Med Assoc.* 2010; 60:905-9

119. Jumppanen M, Gruvberger-Saal S, Kauraniemi P et al. Basal-like phenotype is not associated with patient survival in estrogen-receptor-negative breast cancers. *Breast Cancer Res* 2007; 9: R16

120. Mehta R, Jain RK, Sneige N, Badve S, Resetkova E. Expression of high-molecular-weight cytokeratin (34 β E12) is an independent predictor of disease-free survival in patients with triple negative tumors of breast. *J Clin Pathol* 2010; 63:744-47

121. Ivshina AV, George J, Senko O et al. Genetic reclassification of histologic grade delineates new clinical subtypes of breast cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 10292-10301

122. Sotiriou C, wirapati P, Loi S et al. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98:262-72

123. Yenidunya S, Bayrak R, Haltas H. Predictive value of pathological and immunohistochemical parameters for axillary lymph node metastasis in breast carcinoma. *Diagn Pathol* 2011; 6: 18

124. Yu L, Yang W, Cai X et al. Centrally necrotizing carcinoma of the breast: clinicopathological analysis of 33 cases indicating its basal-like phenotype and poor prognosis. *Histopathology* 2010; 57: 193-201

125. Maiorano E, Regan MM, Viale G et al. Prognostic and predictive impact of central necrosis and fibrosis in early breast cancer: results from two International Breast Cancer Study Group randomized trials of chemoendocrine adjuvant therapy. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 121:211-8

126. Pu RT, Schott AF, Sturtz DE, Griffith KA, Kleer CG. Pathologic features of breast cancer associated with complete response to neoadjuvant chemotherapy. Importance of tumor necrosis. *Am J Surg Pathol* 2005; 29(3): 354-8

127. Gilchrist KW, Gray R, Fowble B, Torme DC Taylor SG 4th. Tumor necrosis is a prognostic predictor for early recurrence and death in lymph node-positive breast cancer. A 10 year follow-up study of 728 Eastern Cooperative Oncology Group patients. *J Clin Oncol* 1993; 11:1929-35

- 128.** Ulivi P, Zoli W, Medri L et al. c-kit and SCF expression in normal and tumor breast tissue. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 83:33-42).
- 129.** Yu Q, Niu Y, Liu N et al. Expression of androgen receptor in breast cancer and its significance as a prognostic factor. *Ann Oncol* 2011; 22(6): 1288-94
- 130.** Blows FM, Driver Ke, Schmidt MK et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: A collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *Plos Med* 2010; 7(5): e1000279.doi:10.371/journal.pmed.1000279
- 131.** Da Silva L, Clarke C, Lakhani SR. Demystifying basal-like breast carcinomas. *J Clin Pathol* 2007; 60: 1328-32
- 132.** Luck AA, Evans AJ, Green AR et al. The influence of basal phenotype on the metastatic pattern of breast cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2008; 20:40-5
- 133.** Fadare O, Tavassoli FA. The phenotypic spectrum of basal-like breast cancers: a critical appraisal. *Adv Anat Pathol* 2007; 14(5): 358—73
- 134.** Basal-like breast cancers: clinicopathological features and outcome. De Brot M, Soares FA, Stiepcich MM, Cúrcio Vs, Gobbi H. *Rev Assoc Med Bras.* 2009; 55:529-34
- 135.** Hannemann J, Kristel P, van Tinteren H et al. Molecular subtypes of breast cancer and amplification of topoisomerase II alpha: predictive role in dose intensive adjuvant chemotherapy. *Br J Cancer* 2006; 95: 1334-41
- 136.** Fadare O, Tavassoli F. Clinical and pathologic aspects of basal-like breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 2008; 5(3):149-59

