



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA, PEDIATRÍA

OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA

Caracterización Biológica del Adenocarcinoma Lobulillar

Infiltrante de Mama.

D^a. Beatriz Abellán Rosique

2015

**Caracterización biológica del adenocarcinoma lobulillar
infiltrante de mama.**

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a mis directores de tesis, Doctor Piñero y el Profesor Francisco Martínez, por su inestimable ayuda en este proyecto, por su predisposición , sus palabras de ánimo y sobre todo, por saber entender y comprender mis inquietudes, mis necesidades y mi inexperiencia en esta empresa.

Al profesor Pascual Parilla, por mostrarme desde mis inicios en el campo de la cirugía, como proyectar una mente maravillosa y convertirse en un ejemplo de tenacidad, trabajo, responsabilidad y buen hacer.

Al Dr Albarracín, por su apoyo, comprensión y su condescendencia en los buenos y en los malos momentos laborales y personales.

Por compartir contigo nuestros mejores años, por ser el mejor ejemplo que cualquiera pudiera desear como amiga, por tu saber estar, por el gran apoyo que supones para mí en todas las esferas de mi vida y por tu cariño, Ana.

A mis padres... por todo, y porque si volviera a nacer, sin duda, les elegiría de nuevo, sólo que les querría más.

*A mis padres ... ,
por su apoyo inconsciente, incondicional e infinito.*

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

- AC.....anticuerpo
- Ag.....antígeno
- Ca mama.....carcinoma de mama
- CD.....carcinoma ductal
- CDI.....carcinoma ductal infiltrante
- CDIS.....carcinoma ductal in situ
- CL.....carcinoma lobulillar
- CLI.....carcinoma lobulillar infiltrante
- CLIS.....carcinoma lobulillar in situ
- HLA.....hiperplasia lobulillar atípica
- SLE.....supervivencia libre de enfermedad
- SG.....supervivencia global
- IHQ.....Inmunohistoquímica
- MFQ.....mastopatía fibroquística
- RE.....receptor estrogénico
- RP.....receptor progesterona
- RH.....receptor hormonal
- HER2..... oncoproteína erb-b2
- GC.....ganglio centinela
- BSGC.....biopsia selectiva de ganglio centinela
- LA.....linfadenectomía axilar
- CC.....cirugía conservadora
- MRM.....mastectomía radical modificada
- CSE.....cuadrante súperoexterno
- CSI.....cuadrante súperinterno
- CIE.....cuadrante ínferoexterno
- CII.....cuadrante ínferointerno
- UCS.....unión de cuadrantes superiores
- UCI.....unión de cuadrantes inferiores

- UCE.....unión de cuadrantes externos
- UCI.....unión de cuadrantes internos
- PAP.....complejo peroxidasa-antiperoxidasa
- DAB.....tetraclorhidrato de diaminobencida
- AF.....antecedentes Familiares
- HGURS.....Hospital General universitario Reina Sofía.
- MF.....multifocalidad
- MC.....multicentricidad
- Hormonodp.hormonodependiente
- Qx.....quirúrgico
- Núm.....número
- Postmenop...postmenopaúsica
- Premenop.....premenopaúsica
- THS.....terapia hormonal sustitutiva.

INDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1 Epidemiología.....	15
1.1 Factores de Riesgo.....	16
1.3 Tratamiento del cáncer de mama.....	19
1.4 Carcinoma lobulillar de mama.....	21
1.4.1 Factores clínicos y epidemiológicos.....	21
1.4.2 Histopatología.....	22
1.4.3 Presentación clínica	27
1.5 Clasificación Molecular del Carcinoma de Mama.....	30
1.6 Marcadores biológicos valorados por inmunohistoquímica	34
2. JUSTIFICACIÓN.....	43
3. OBJETIVOS.....	44
4. MATERIAL Y MÉTODO.....	45
4.1 Descripción de la población a estudio.....	46
4.1.1 Población.....	46
4.1.2 Criterios de inclusión y exclusión.....	45
4.1.3 Metodología diagnóstica.....	47
4.1.4 Metodología de estudio Histopatológico.....	48
Estudio	
macroscópico	
Estudio	
microscópico.	
Clasificación	TMN

4.1.5 Metodología del estudio Inmunohistoquímico.....	53
Definición	
Descripción de la técnica inmunohistoquímica	
Biomarcadores de función celular	
4.2 Diseño del Estudio.....	56
4.3 Definición de variables.....	58
4.3.1 Variables Clínicoepidemiológicas.....	58
4.3.2 Variables Histopatológicas.....	60
4.3.3 Variables Inmunohistoquímicas.....	60
4.3.4 Agrupación de variables Inmunohistoquímicas.....	72
4.4 Metodología Estadística.....	73
5. RESULTADOS	75
5.1 Análisis descriptivo de la población.....	76
5.2 Análisis descriptivo de las variables estudiadas.....	76
5.2.1 Estudio descriptivo de las variables Clínicoepidemiológicas.....	77
5.2.2 Estudio descriptivo de las variables Histopatológicas.....	82
5.2.3 Estudio descriptivo de las variables Inmunohistoquímicas	84
5.2.4 Estudio descriptivo de la agrupación Inmunohistoquímica.....	88
5.3 Análisis comparativo de las variables	89
5.3.1. Estudio comparativo de las variables Clínicoepidemiológicas.....	89
5.3.2 Estudio comparativo de las variables Histopatológicas.....	95
5.3.3 Estudio comparativo de las variables Inmunohistoquímicas.....	100
5.3.4 Estudio comparativo de la agrupación de variables Inmunohistoquímicas	113
6. DISCUSIÓN	116
6.1 Evaluación de los datos poblacionales.....	117
6.2 Evaluación de los datos del estudio en el CLI.....	118
6.2.1 Evaluación de los datos Clínicoepidemiológicos.....	118

6.2.2 Evaluación de los datos Histopatológicos.....	126
6.2.3 Evaluación de los datos Inmunohistoquímicos.....	129
6.2.4 Evaluación de las agrupaciones de variables Inmunohistoquímicas	137
6.3. Limitaciones y expectativas del estudio.....	140
7. CONCLUSIONES	141
8. BIBLIOGRAFÍA.....	144

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.1 EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer de mama constituye actualmente, en la población femenina europea, la causa más frecuente de muerte por cáncer de los países desarrollados en las mujeres entre 40 y 45 años, y es la segunda causa de muerte por cáncer tras el cáncer de pulmón si se considera de forma global¹. Se describe así, como el tumor maligno más frecuente en las mujeres de este rango de edad, con una incidencia que en las últimas décadas continúa en ascenso en los países industrializados. Afortunadamente en las últimas dos décadas se ha registrado un descenso de la mortalidad por esta enfermedad, que se estima alrededor de un 1,8% anual, principalmente en mujeres en edad fértil, gracias a los programas de *screening* y a los progresos en las terapias adyuvantes^{2,3}.

Se estima un incremento anual de la incidencia en torno al 2%. En el continente europeo existe cierta variabilidad en cuanto a la tasa de incidencia en mujeres siendo mayor en países del norte y más occidentales (60-90/100000 mujeres/año) mientras que en las regiones mediterráneas y países de la zona este europea la tasa de incidencia disminuye instaurándose alrededor de 30-60/100000 mujeres/año. En cualquier caso, el aumento global de la incidencia se atribuye en la actualidad a un incremento en el diagnóstico gracias a los avances en los programas de cribado, a los progresos tecnológicos. Aun así, existen países europeos en los que a pesar de mejorar en las técnicas de detección del mismo, no se ha conseguido un incremento sustancial en la supervivencia de las pacientes afectas. A nivel mundial países como EEUU y Canadá siguen a la cabeza en cuanto frecuencia de cáncer de mama.

Como ocurre en estos países desarrollados, en España existe un incremento de la incidencia anual en la última década con aproximadamente 14000 nuevos casos, lo que supone 1 de cada 14 mujeres afectadas a lo largo de su vida. Al igual que ocurre en el resto de Europa, a pesar de que se ha detectado un aumento en la incidencia, los índices de supervivencia también han mejorado por los mismos motivos y gracias a los avances en los tratamientos. En España, la provincia de Navarra fue la primera en registrar este descenso de la mortalidad, al erigirse pionera en protocolizar los programas de cribado a la población femenina de riesgo, registrando un descenso de 8% anual a partir del año 1995⁴. Pero la patología mamaria no es exclusiva del sexo femenino⁵ y con una frecuencia mucho menor, se sabe que también afecta al varón. En el sexo masculino suele presentarse a edades más avanzadas, unos 10 años más tarde que en mujeres. Se considera que aproximadamente representa entre 0.38%-0.90% de los tumores en varones, con cierta predilección por la raza negra y judía. En la actualidad, la proporción de casos de cáncer de mama del varón respecto a la mujer se estima en 1/20.

Como ocurre con enfermedades poco frecuentes, el diagnóstico en éstos suele ser tardío y con una afectación locoregional mayor²², lo que condiciona un peor pronóstico a pesar del tratamiento.

1.2 FACTORES DE RIESGO

Muchos han sido los esfuerzos en intentar identificar factores que puedan asociarse con el desarrollo del cáncer de mama, en cualquiera de sus modalidades clínicas.

El factor de riesgo que más fuerza cobra en la aparición de esta patología es la historia familiar de cáncer de mama. Principalmente aquellas pacientes que presentan mutaciones en los oncogenes BRCA-1(Cr 17) y BRCA -2 (Cr13), con un elevado riesgo de desarrollar carcinoma de mama principalmente de tipo ductal infiltrante y carcinoma medular. En estas pacientes los tumores suelen aparecer en

edades más tempranas y con un comportamiento clínico y biológico más agresivo, presentando además un riesgo mayor de desarrollar carcinoma en la mama contralateral. En ocasiones se asocian a la aparición de otros tumores extramamarios, destacando el cáncer ovárico en primer lugar. La presencia de asociación familiar de carcinoma de mama y/u ovario en varias líneas generacionales también se considera un factor de riesgo, que cobra más fuerza a medida que la aparición de estos se suceden en más miembros de la familia y en distintas líneas generacionales. El campo de la genética y la carcinogénesis en los tumores de mama sigue en la actualidad en pleno desarrollo. Se conocen algunos genes con moderada o baja penetrancia implicados en el desarrollo del cáncer de mama familiar, entre los que destacan entre otros: CHECK2, ATM, PALB2. Sin embargo en más del 50% de los tumores de mama en los que objetiva una fuerte asociación familiar, no se alcanza un diagnóstico genético. Recientemente un grupo de investigadores españoles del hospital Monte Naranco de Oviedo, participando en un estudio multicéntrico a nivel mundial, han identificado una mutación genética relacionada con el carcinoma lobulillar de mama: se trata de un polimorfismo ubicado en el cromosoma 7q34¹¹.

En cuanto a la historia personal de la paciente la condición de elevada densidad mamaria²⁵, la presencia de hiperplasia atípica (ductal o lobulillar)³¹, así como un diagnóstico previo de lesiones tumorales in situ (CDIS, CLIS) también suponen un aumento del riesgo relativo de desarrollar carcinoma de mama. Otras patologías clínicas como la hiperinsulinemia, la diabetes mellitus o la exposición a radiación ionizante previa^{14,15,16}, pueden estar relacionadas con un incremento del riesgo relativo respecto a la población general. Entre algunas condiciones biológicas asociadas con el estímulo hormonal prolongado que destacan: la menarquia precoz, la menopausia tardía, una primera gestación con edad avanzada, pacientes nuligestas, la administración de terapias hormonales sustitutivas prolongadas o el uso prolongado de contraceptivos orales, aunque este último continúa siendo un tema muy discutido¹¹.

El estilo de vida y los hábitos nutricionales se relacionan también con cierto incremento del riesgo de desarrollar carcinoma de mama. El factor que cobra más fuerza es el elevado consumo de grasa, seguida por el exceso de ingesta de alcohol

que se ha asociado principalmente con tumores de mama hormonodependientes. La obesidad incluso desde edades tempranas de la vida, una nula actividad física y la baja ingesta de vegetales, son las únicas condiciones de riesgo, relacionadas con el estilo de vida sobre las que se puede actuar de forma activa^{9,10,14}.



Figura 1. Factores de riesgo y protectores para el cáncer de mama.

- THS: terapia hormonal sustitutiva
- DCIS: carcinoma ductal in situ
- LCIS: carcinoma lobulillar in situ
- AF: antecedentes familiares

1.3 TRATAMIENTO CÁNCER DE MAMA

En el tratamiento del cáncer de mama la cirugía sigue siendo actualmente el tratamiento de elección, y se establece en general como primera terapia, sobre todo si se trata de estadios precoces de la enfermedad I y II. En estos casos la cirugía conservadora seguida de radioterapia local del lecho ha demostrado en la última década, ser equivalente a la mastectomía radical^{21,22} en términos de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global. En estadios más avanzados (III y IV), y en muchas ocasiones de forma individualizada, la cirugía se posterga a un segundo tiempo tras la administración de tratamiento con quimioterápicos durante varios ciclos (mínimo 4), que se prolongan en función de la eficacia de los mismos sobre el tumor. Esto permite en la actualidad aumentar la tasa de cirugías conservadoras en la mujer con resultados similares en cuanto a supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global, así como monitorizar la respuesta biológica del tumor a dichos fármacos en una terapia posterior a la cirugía mamaria. En el tratamiento quirúrgico de la posible afectación nodal la BSGC (biopsia selectiva de ganglio centinela) en mujeres en estadio NO ha supuesto un gran avance en el tratamiento regional axilar, evitando linfadenectomías innecesarias donde no se objetiva la afectación ganglionar o esta se reduce a una microinvasión (N1mic)^{23,24,31}. De este modo se ha conseguido reducir la morbilidad asociada a la misma en pacientes sin extensión ganglionar axilar, aunque este tema está siendo en la actualidad un punto importante de controversia en la comunidad científica, conjuntamente con el tratamiento neoadyuvante.

En la actualidad la radioterapia sigue teniendo un papel fundamental en el tratamiento complementario del cáncer de mama para el control de la enfermedad locoregional.^{21, 36} La aparición de nuevas técnicas y los nuevos avances en la física médica han permitido procedimientos dirigidos al tratamiento de la neoplasia reduciendo los efectos secundarios tan indeseables y limitantes para las pacientes. En la última década avances como la radioterapia conformacional, IMRT o la aparición de dispositivos de radioterapia intraoperatoria, junto con pautas de hipofraccionamiento

o boost, han propiciado aplicar una irradiación más ajustada a cada paciente y con dosis más idóneas en el campo a tratar^{22,28}.

En cuanto a la quimioterapia, las antraciclinas y taxanos siguen constituyendo el principal armamento para los tratamientos a costa de una toxicidad nada despreciable, principalmente cardíaca y neurológica. A estos se suman otras terapias como los alcaloides de la Vinca, la ciclofosfamida o el cisplatino y sus análogos. Los progresos en el ámbito del tratamiento quimioterápico se han desarrollado en gran medida a partir de los estudios que han logrado mejorar las pautas y las secuencias de administración (dosis densas), para optimizar los resultados y disminuir los efectos citotóxicos de los fármacos clásicos (aun no desbancados por otros nuevos) El momento de administración en relación al diagnóstico de la enfermedad, al subtipo intrínseco del tumor y el estadio tumoral (neoadyuvancia, adyuvancia, terapias de rescate...) ^{28,38} han contribuído también a estos progresos. Es en las terapias biológicas donde el tratamiento médico ha experimentado grandes avances gracias al desarrollo de la inmunohistoquímica y a la biología molecular, que ha dado lugar a “terapias diana” dirigidas al bloqueo de determinados receptores sobreexpresados en células neoplásicas en el cáncer de mama. Quizá el mayor avance de nuestra era en cáncer de mama , hasta el momento ha sido el trastuzumab ^{24,25,26} que ha supuesto un aumento medio de la supervivencia libre de enfermedad de las pacientes que expresan HER-2 , respecto a su introducción en la práctica clínica, en la que la positividad de este marcador condicionaba un pronóstico sombrío, tanto en adyuvancia como en neoadyuvancia³³. Otras terapias similares y con anticuerpos monoclonales están demostrando aumentar la eficacia y por tanto mejorar la supervivencia en mujeres afectas de esta neoplasia, como describen Suzuki E y cols³³. Destacan la aparición de moléculas como el pertuzumab que aunque con distintos mecanismos actúan sobre las familias de receptores Erb, o el nab–paclitaxel : que se trata de un taxano envuelto en moléculas de albúmina, con la que consigue introducirse en la célula tumoral como nanopartícula; y el everólimus que actúa inhibiendo vías de replicación celular^{31,32}

En lo que se refiere al tratamiento hormonal, supone un arma terapéutica más en pacientes con tumores hormonosensibles que expresan RH (receptores hormonales), más eficaz a mayor grado de sobreexpresión. Las terapias más aceptadas

y administradas en la actualidad engloban a los bloqueantes selectivos del receptor estrogénico (tamoxifeno), con los que se trata a las pacientes premenopáusicas, aunque también, en ocasiones a las postmenopáusicas; y los inhibidores de la aromatasas, ya sean esteroideos o no (anastrozol, letrozol, exesmetano) más adecuados para el tratamiento de postmenopáusicas. La tendencia a suspender el tratamiento con hormonoterapia tras 5 años, está cambiando con los últimos estudios clínicos que se están llevando a cabo, en los que parece que el beneficio de este tratamiento se aumenta si el tratamiento se prolonga de 7 a 10 años, para algunos subgrupos de pacientes. Del mismo modo parece existir un beneficio mayor en el control local de la enfermedad en mujeres tratadas con letrozol respecto a las tratadas con tamoxifeno, según predicen los últimos ensayos en fase III, aun no concluidos.^{33,38}

1.4 CARCINOMA LOBULILLAR

1.5.1 FACTORES CLINICOEPIDEMIOLÓGICOS

Como ocurre con el carcinoma ductal de mama (que se origina del epitelio de los ductos mamarios), la variante lobulillar es una neoplasia originada por una proliferación descontrolada de las células epiteliales localizadas en la unidad ducto-lobulillar terminal de la mama (localizados en los acini mamarios), pudiendo afectar a uno de los aproximadamente veinte lobulillos mamarios, o a varios a la vez. Este último suceso justificaría la tendencia a multifocalidad de la enfermedad lobulillar, especialmente si se trata de su modalidad “in situ” (CLIS).

Se trata del segundo subtipo más frecuente de cáncer de mama con una frecuencia que oscila entre el 10 y el 15% aproximadamente, según series recogidas de distintas poblaciones.^{4,2} Como en el carcinoma ductal, se presenta tanto en su forma no invasiva, “carcinoma lobulillar in situ”(CLIS), como en su modalidad infiltrante “carcinoma lobulillar infiltrante”(CLI), con peores connotaciones pronósticas en el caso de éste último, tal y como ocurre con la variante ductal. Según publicaciones

recientes el CLIS se considera más como un indicador de riesgo de enfermedad que como una verdadera forma premaligna ya que su existencia no implica necesariamente una progresión a formas invasivas. Se describe además otra modalidad especial, o forma de presentación denominada "Pagetoide", y descrita como grupos de células tumorales aisladas y ubicadas en el área ductolobulillar, que puede presentarse tanto en CLIS como en CLI.

Aunque puede diagnosticarse a cualquier edad, es frecuente que aparezca en mujeres pasada la década de los 50, con un pico de presentación en los primeros años de la década de los 60, mientras que la variedad ductal suele tener su pico de incidencia de presentación a principio y mediados de la década de los 50 y su forma de presentación más característica es un nódulo palpable.

1.5.2 HISTOPATOLOGÍA

La glándula mamaria es una glándula apocrina tubulo-acinar ramificada que se distribuye en la mama formando lóbulos, originados de la proliferación de los ductos mamarios, tras el estímulo hormonal en el momento de la menarquia. Estos lóbulos se distribuyen en número de 15 a 20, entre el tejido graso y las fascias y ligamentos constituyendo la mama de la mujer. Del epitelio de los ductos y de los acini que componen los lobulillos mamarios se originan la gran mayoría de los carcinomas de mama.

En el carcinoma lobulillar es característico el patrón de crecimiento, con una disposición de las células tumorales en hileras llegando incluso a invadir el estroma. Cuando esto ocurre la neoplasia se hace infiltrante y por lo tanto estamos ante un tumor más agresivo que la modalidad no invasiva o "*in situ*", aunque frecuentemente se encuentra asociado a componente *in situ*. Es bien conocido que este patrón de crecimiento e invasión del estroma está íntimamente relacionado con la pérdida de cohesividad intercelular, originada por alteraciones en las moléculas de adhesión celular, ubicadas en la membrana de las células epiteliales lobulillares^{36,40}. Estas proteínas no sólo mantienen a las células unidas, sino que en su dominio intracelular interactúan con el citoesqueleto de la célula, manteniendo la arquitectura tisular. La

alteración de las mismas, explica el patrón de crecimiento característico del Carcinoma Lobulillar Infiltrante (CLI)^{27,36}, que suele coexistir con frecuencia con focos de carcinoma lobulillar in situ (CLIS), dado que el fenómeno infiltrativo no ocurre sincrónicamente en todas las células epiteliales afectas. A este característico patrón de crecimiento se le ha denominado coloquialmente como “crecimiento en hileras”, “crecimiento en fila india”, o más técnicamente como “patrón de crecimiento targetoide”. Una vez perdida la cohesividad celular en el acino mamario la proliferación celular descontrolada alcanza el estroma, distribuyéndose de forma difusa pero no masiva entre los distintos componentes estromales.³⁴En la práctica clínica este patrón de crecimiento hace más dificultoso el diagnóstico a la palpación e incluso pueden llegar a hacerse invisibles en la mamografía, principalmente en estadios precoces del tumor, lo que justificaría un retraso diagnóstico y con grados histológicos más avanzados¹¹.

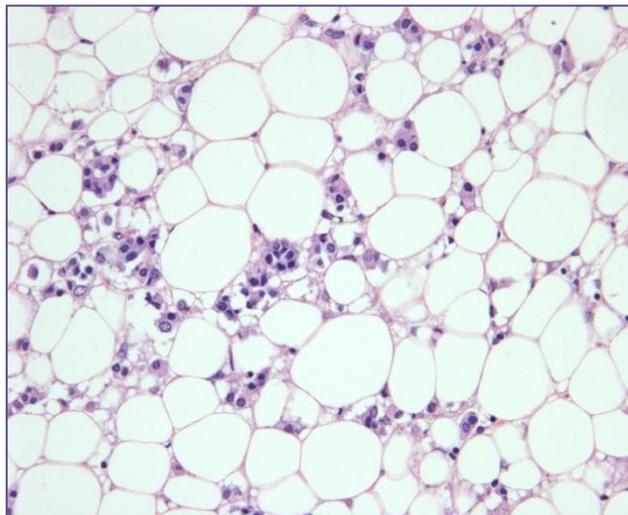


Foto1. Detalle imagen microscópica H-E de CLI

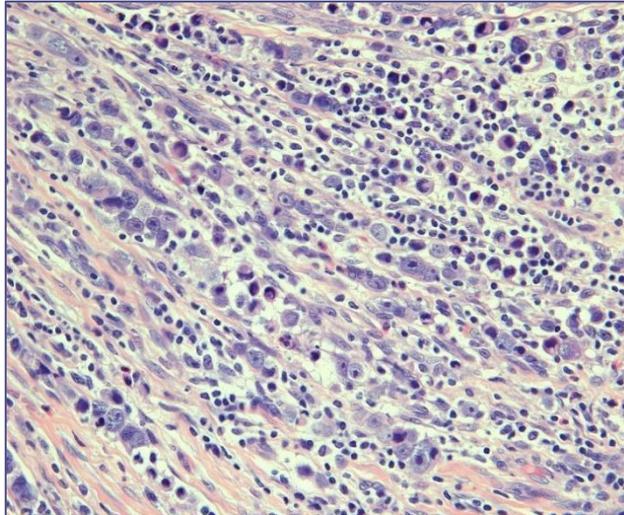


Foto2.disposición "en hileras" de CLI. Imagen H-E

Dado que la disposición clásica de las células invasivas en el tejido circundante a la unidad ductolobulillar, donde se origina el tumor, no siempre se corresponde al patrón descrito, se ha establecido una clasificación con carácter descriptivo para el carcinoma lobulillar invasor definiendo tres variantes según la distribución del tejido neoplásico en el estroma mamario:

variante clásica *trabecular*: en el que las filas de células se distribuyen en bandas más anchas intercaladas con el tejido estromal aunque sigue predominando las hileras de células epiteliales monomorfas y pequeñas. Es la forma de carcinoma lobulillar infiltrante más frecuentemente encontrada en los estudios histopatológicos de los especímenes y, aunque predomine, suele coexistir con las otras dos variantes que se describen a continuación.

variante *alveolar*: donde las células invaden y forman pequeños grupos de 20-30 células separadas por bandas de tejido estromal adquiriendo una morfología globular en dos dimensiones.

la variante *sólida*: donde aparece un infiltrado difuso de las células epiteliales transformadas hacia el tejido estromal del acini ocupando prácticamente en su totalidad, entre los que se distingue escasas bandas fibroadiposas separando los nidos compactos de células.^{34,11}

A pesar de los esfuerzos del sistema inmune por controlar esta invasión, algunas células neoplásicas consiguen salvar esta barrera inmunológica y alcanzar los vasos linfáticos y el torrente sanguíneo, convirtiendo una enfermedad confinada al tejido mamario en una enfermedad locorregional o sistémica, con un pronóstico más sombrío. La respuesta del estroma mamario a la invasión tumoral de estas células puede dar lugar a una reacción desmoplásica intensa, no siempre presente.

Otro dato que traduce el grado de agresividad del tumor y que se asocia a las características histológicas, es la morfología celular que adquieren las células neoplásicas epiteliales transformadas. Ésta puede variar y diferenciarse hasta llegar a constituir tres variedades o subtipos distintos de carcinoma lobulillar con diferente implicación pronóstica. Se definen característicamente tres variedades:

La variedad clásica : caracterizada por la presencia de células pequeñas, monomorfas y uniformes con núcleos redondeados centrados y nucléolos poco prominentes. Algunas de estas células pueden presentar mucina intracitoplasmática (que se pone de manifiesto mediante tinciones especiales), cuando esta es muy abundante desplaza todo el componente intracitoplasmático y al núcleo dando lugar al patrón de "células en anillo de sello". Aunque éstas las podemos encontrar también en el carcinoma ductal

La variedad pleomorfica: en la que las células adquieren un tamaño mayor que en la variedad clásica, secundario a un aumento del citoplasma que se torna eosinofílico y se asocia a un núcleo pleomórfico, hipercromático y excéntrico con un nucléolo muy prominente.

En este caso el tumor suele adquirir un comportamiento clínico más agresivo que se distancia del patrón del CLI clásico y con mayor tendencia a las recurrencias.

Las formas intermedias presenta características mixtas entre estos dos patrones.

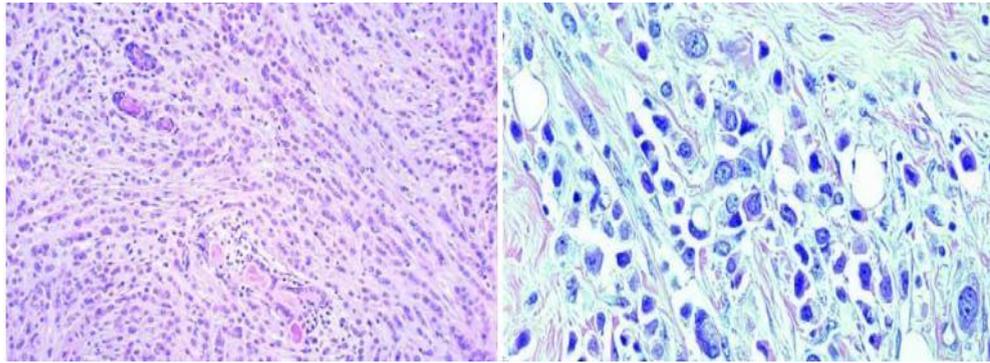


Foto 3 . H-E CLI clásico
Clasificación WHO de CLI

Foto 4. H-E CLI pleomórfico

La infiltración perineural en el CLI suele ser infrecuente aunque podemos encontrarla en el caso de tumores extensos. En cuanto al grado de neoangiogénesis en relación a la neoplasia lobulillar no se ha relacionado con el subtipo histológico de lesión, ni estado hormonal ni la edad de la paciente, por lo tanto no se comporta como un factor predictivo ni pronóstico de la enfermedad en estos casos. En los últimos años han aparecido estudios que afirman una mayor asociación del CLI respecto al CDI con pacientes que han sido tratadas terapias hormonales sustitutivas y a nivel molecular destacan una importante presencia de receptores estrogénicos en CLI (que parece ser menor en los pleomórficos), grado histológico 2 y característicamente pérdida de la expresión de e-cadherina.^{11,27}

Se ha de reseñar que con cierta frecuencia, y dado que el origen de los dos subtipos de carcinoma de mama (CDI y CLI) se originan a distintos niveles en el epitelio lobulillar, pueden coexistir de manera sincrónica o metacrónica en una misma paciente. Aunque existen estudios que afirman que entre ambos, existe una clara diferencia en cuanto a la susceptibilidad genética individual.⁸

1.5.3. PRESENTACIÓN CLÍNICA

Clínicamente encontramos diferencias al diagnóstico de las dos variantes lobulillares de cáncer de mama. Mientras que la forma “in situ” (CLIS), se mantiene característicamente silente y con mayor frecuencia suele ser un hallazgo casual en biopsias de mama realizadas por otras sospechas la forma “infiltrante” con frecuencia de manifiesta como nódulo palpable de límites imprecisos o incluso masa. Probablemente estas manifestaciones clínicas están originadas por su patrón de crecimiento y por la reacción estromal a partir del momento en que el tumor se hace invasivo. Otra característica del carcinoma lobulillar infiltrante que lo distancia de su homólogo ductal, es su mayor tendencia a metastatizar vía hematológica, con preferencia por tejidos como el peritoneo, ovario, el tubo digestivo, tejido óseo, y sistema nervioso⁴³.

Radiológicamente también se traduce este patrón de crecimiento. En el caso de la lesión in situ las imágenes mamográficas no suelen detectar estas lesiones que permanecen silentes al radiólogo, las microcalcificaciones, que traducen fenómenos de necrosis, también suelen ser infrecuentes y cuando aparecen suelen deberse a otras lesiones proliferativas asociadas con frecuencia a la neoplasia lobulillar in situ. En el caso de la forma infiltrante podemos encontrar mamografías silentes con lesión palpable en la mama; nódulos o áreas densas y mal definidas asociadas a masa palpable, y que con frecuencia se correlaciona con la reacción estromal a la invasión tumoral y/o a un alto componente proliferativo tumoral. Ello comporta que con cierta frecuencia se diagnostique como “carcinoma de intervalo”, con manifestación entre dos revisiones mamográficas. Además cabe reseñar que justificado por el patrón de crecimiento “en hileras”, la mamografía suele infraestimar el tamaño tumoral real de la lesión¹¹. Estos datos hacen imprescindible el uso de otras herramientas de radiodiagnóstico complementarias, indiscutibles hoy en día en el diagnóstico del cáncer de mama, como son la ecografía y la RMN⁴⁰. Ecográficamente se puede manifestar como masa heterogénea, hipoecoica con bordes mal definidos y sombra acústica posterior en más del 60% de los casos, una sombra irregular con

discreta lesión densa focal e incluso formas mejor definidas y polilobuladas en algunas variedades. Hay que considerar que las formas in situ y silentes clínicamente, pueden pasar desapercibidas en el mapeo ecográfico de la mama durante la exploración si no se tienen en consideración. Por este motivo, y por la mayor tasa de multifocalidad, multicentricidad y bilateralidad cobra especial importancia el estudio por RMN de la mama. Como ya se ha comentado tanto en el diagnóstico como o estudio de extensión se debe de tener en cuenta la mayor tendencia de este subtipo de neoplasia a metastatizar por vía hematológica, sin olvidar las vías de posible extensión linfática, manteniendo especial atención a la cadena mamaria interna. Característicamente también se le atribuye al CLI una menor tasa de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante con una respuesta clínica menor y respuesta radiológica parcheada, lo que conlleva menor tasa de cirugía conservadora en estas pacientes^{44,45,47}.

En la práctica asistencial, el carcinoma lobulillar de mama con frecuencia se manifiesta con unas presentaciones clínicas particulares. Es frecuente que se manifieste en mujeres, nunca en hombres, entre la década de los 50-60 años, característicamente el pico de presentación de esta variante de carcinoma mamario se retrasa aproximadamente una década con respecto al pico de aparición de la variante ductal, en el caso de cáncer esporádico. La presentación del carcinoma lobulillar de mama es poco frecuente en edades extremas de la vida (35-75 años), y de aparecer en estas edades es más frecuente que las formas invasivas ocurran en mujeres jóvenes que en ancianas. La manifestación como carcinoma multicéntrico (entendida como la presencia de grupos de células tumorales en un cuadrante distinto al nódulo primario) y carcinoma bilateral adquiere en el tipo lobulillar una atención especial, en general se puede estimar una media de aproximadamente entre un 15- 20% de bilateralidad^{27,29}. Lee et als. concluyen que la probabilidad de desarrollar un carcinoma en la mama contralateral tras diez años de seguimiento es aproximadamente del 10%, principalmente en las formas infiltrantes. Se presupone que las pacientes que presentan afectación linfática local y tumores multicéntricos muestran mayor probabilidad de desarrollar un tumor contralateral.

La bilateralidad y la multifocalidad pueden modificar la actitud terapéutica, tanto quirúrgica como adyuvante, dado que en estos casos el índice de recaídas locales se ve incrementado incluso de forma tardía²⁶. Este punto sigue suscitando controversia en la actualidad en lo que respecta al planteamiento quirúrgico conservador y oncoplastico, dado que hay autores que consideran de entrada el CLI y la multicentricidad, junto con CDIS factores predictivos “per se” de fracaso de la cirugía conservadora y conversión a cirugía más radical⁴⁶. Sin embargo a pesar de verse afectado el periodo libre de enfermedad, en estos casos, no existen datos que confirmen una menor tasa de supervivencia⁴⁵. Los datos epidemiológicos han registrado un aumento de las tasas de cirugía conservadora en el cáncer de mama, especialmente en estadios precoces de la enfermedad y gracias al tratamiento adyuvante local con radioterapia, tal y como apuntaba Giuliano, sin embargo estos datos no se reproducen en los casos de CLI dada la tendencia constatada de multicentricidad, lo que condiciona que el aumento de las tasas de cirugía conservadora haya sido menor en el caso del CLI, con respecto a la variedad ductal (CDI)^{18,48}.

A pesar de que en la actualidad la terapéutica quimioterápica del cáncer de mama esté íntimamente vinculada al patrón inmunohistoquímico de tumor, una característica que se asocia con frecuencia al CLI es una menor respuesta al tratamiento quimioterápico neoadyuvante, que se traduce en una mayor tasa de repuestas fragmentadas²⁶, es por este motivo que algunos autores lo consideran un factor predictivo de fracaso de la cirugía conservadora oncoplastica.^{43,46}.

Entre las más actuales investigaciones que se están llevando a cabo en relación al CLI, destaca la identificación de una mutación genética que corresponde con el polimorfismo 7q34, implicado en la presencia de cierta heterogeneidad entre los receptores estrogénicos asociados al CDI y al CLI y que se relaciona directamente con éste último.¹¹

Siguiendo con la línea de la genómica, Conlon N y cols valoraron desde el punto de vista pronóstico, mediante plataforma Oncotype, los dos subtipos de carcinoma lobulillar infiltrante, comparando la forma clásica y la pleomófica de CLI y objetivaron

una fuerte asociación con riesgo intermedio o incluso alto de recurrencia local del subtipo pleomófico respecto al clásico, con un porcentaje mayor de tasa de recurrencia local^{47,48}

1.6 CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CARCINOMA DE MAMA

Pasada la fase clínica y de diagnóstico nos encontramos ante dos grandes grupos histopatológicos, que se correlacionan con el comportamiento biológico, constituyen la clasificación más elemental del carcinoma de mama, así pues distinguimos dos grandes grupos, carcinomas in situ y los carcinoma infiltrantes o invasivos, entre ellos aproximadamente el 80% corresponde a la variedad ductal , el 10%- 15% a la variante lobulillar y el resto a otras variantes poco frecuentes como son el carcinoma tubular, ca papilar, ca medular, ca metaplásico....,³⁰ con implicaciones pronósticas que se traducen principalmente en términos de supervivencia. En los últimos años se añade estudio histopatológico la presencia de infiltración linfovascular del estroma por estas células neoplásicas, las presencia de infiltrado linfocítico estromal y sus características (TILS), y la afectación perineural ^{30,48}.

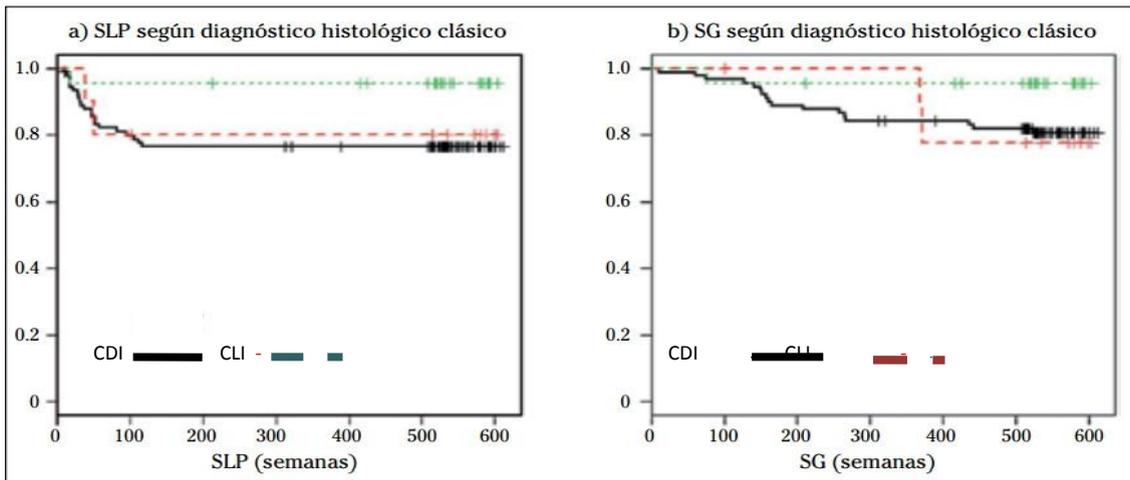


Figura 1. Curvas Kaplan-Meier de supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global(SG) según el diagnóstico histológico: carcinoma ductal infiltrante (CDI), carcinoma lobulillar infiltrante (CLI).

Fuente: MA Arrechea y cols.An.Sist.Sanit.Navar 2011.

Actualmente los avances en las técnicas histopatológicas e inmunohistoquímicas, en biología molecular y la aparición de las plataformas de secuenciación genómica, han hecho posible una nueva clasificación molecular del carcinoma de mama. La clasificación molecular inmunohistoquímica engloba tradicionalmente a 4 grupos de cáncer de mama en función de la expresión de 3 componentes en las células neoplásicas que los conforman : R hormonales, Receptor de estrógenos (RE), Receptor de progesterona(RP) y expresión de Erb-2 . Esto origina la aparición de subtipos moleculares : Luminal A (RE+,RP+, Erb-2 -), Luminal B (RE+,RP-,Erb-2-),No luminal, Erb-2 positivo(RE-,RP-, Erb-2+), Triple Negativo(RE-,RP-, Erb-2 neg), asociada a estas se incluye con carácter pronóstico el índice de replicación celular , medido mediante Ki 67. Con intención de dar soporte a la gran heterogeneidad clínica y anatomopatológica del cáncer de mama, estas técnicas aparecen enfocadas a mejorar las estrategia terapéuticas y con ello el pronóstico del carcinoma de mama⁴⁹.

SUBTIPOS IHQ	RE	RP	Erb-2	Ki 67	SUBTIPOS INT
Luminal A	+	+	-	Cualquier valor	Luminal A
Luminal B	+	-/bajo	-	>14%	Luminal B
Luminal B	+	Cualquier valor	+	Cualquier valor	Luminal B
HER2, No luminal	-	-	+	Cualquier valor	HER2
Triple negativo	-	-	-	Cualqui valor	Basal Like

Tabla 1. Inmunofenotipos de carcinoma mamario.

De plena actualidad y aun en desarrollo en el cáncer de mama está el estudio y el conocimiento de genes, proteínas y vías de transcripción implicados en la tumorigénesis. Se están desarrollando plataformas de secuenciación específicas, en las que se agrupan multitud de genes implicados en la origen del cáncer de mama, que se intentan correlacionar con los subtipos intrínsecos y atribuirles en función del grado de expresión un valor pronóstico y predictivo (Perou y cols, Nature , 2000⁵⁰), aún con escasa aplicabilidad clínica .

En la actualidad nos encontramos ante la “next generation sequencing” (NGS). Las últimas investigaciones han derivado en el hallazgo de un nuevo sutipo de tumor con características biológicas específicas que se clasificó como “claudin low”⁵¹.

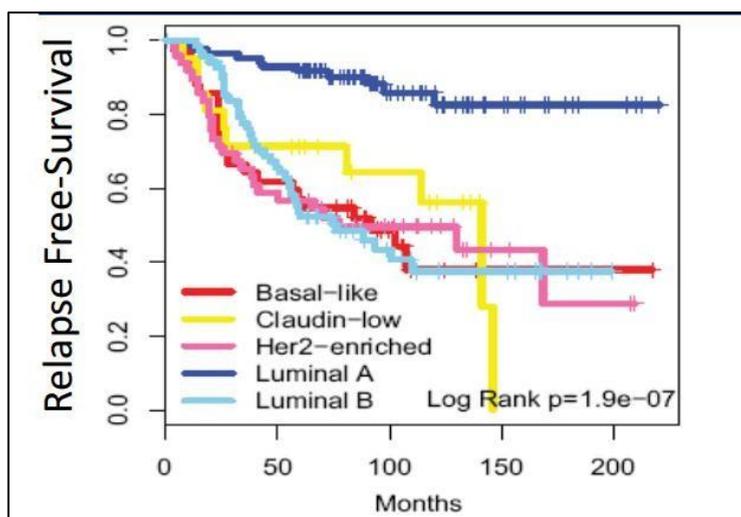


Figura 2.Supervivencia libre de enfermedad (SLE) atribuida a los subtipos intrínsecos de cancer de mama

Fuente: Perou et als., Intrinsic subtypes, Nature;2000

Entre las nuevas plataformas, existen algunas que nos sirven como herramienta para atribuir valor de riesgo "score risk" a determinados tipos intrínsecos de carcinoma de mama (luminal) y consecuentemente asignarles un índice pronóstico (medido en tasas de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global). De modo que se permite seleccionar aquellas pacientes que se pueden beneficiar de ciertos tratamientos quimioterápicos⁴⁸. Éstas han nacido de la genómica y entre ellas destacan: *oncotype* (analiza 21 genes), *mamaprint* (con determinación de 70 genes) y *PAM50* (analiza 50 genes)^{47,48}.

Sin embargo, dado el gran volumen de información que se ha generado con los nuevos avances científicos está resultando muy difícil ensamblar y acoplar dicha información con los modelos de clasificación histopatológicos clásicos, tanto es así, que a pesar de ello aún no se han desbancado a estos últimos, que siguen siendo muy útiles en la práctica clínica diaria.

Dado que la información que están originando las nuevas técnicas en biología molecular y genética muestran un alto grado de complejidad, y que aún están en pleno desarrollo, nos quedamos en el escalón inmediatamente inferior con la intención de hallar o identificar posibles patrones histopatológicos y de expresión molecular mediante técnicas de inmunohistoquímica, que apoyen a las nuevas

tecnologías y que nos aporten datos con valor pronóstico y terapéutico en la variante lobulillar del carcinoma de mama y sus subtipos.

1.7 MARCADORES BIOLÓGICOS EN CÁNCER DE MAMA VALORADOS POR INMUNOHISTOQUÍMICA

Por todo lo desarrollado en el epígrafe anterior, la clasificación inmunohistoquímica sigue siendo la principal herramienta en la práctica asistencial incluso antes del tratamiento quirúrgico, cobrando especial importancia en el estudio del espécimen quirúrgico ya extirpado. En el caso del carcinoma lobulillar es conocida una asociación más intensa con receptores estrogénicos positivos y con una baja sobreexpresión de oncogen Erb-2^{42,74}. Sin embargo sabemos que la variedad pleomórfica, a la que se le atribuye un comportamiento clínico y biológico distinto no se ajusta a este modelo de expresión.

Otras moléculas determinadas desde el punto de vista inmunohistoquímico han sido estudiadas y valoradas por su posible implicación en fenómenos en el funcionamiento de la dinámica intracelular e intercelular de algunas neoplasias⁵². Muchas de estas han sido caracterizadas y están relacionadas con mecanismos implicados en el ciclo celular interactuando a distintos niveles.

Los principales avances en la caracterización molecular del cáncer de mama se han dirigido al carcinoma ductal, y que el carcinoma lobulillar presenta un comportamiento biológico incierto en muchos casos, a pesar de que se le atribuye una menor agresividad que el anterior. Se valoran otros parámetros desde el punto de vista histopatológico e inmunohistoquímico que nos permitan extrapolar una caracterización más aproximada al tipo lobulillar del cáncer de mama y sus subtipos. Se valoran datos histopatológicos posiblemente asociados al mismo y la sobreexpresión o supresión de las distintas proteínas y oncogenes mediante estas técnicas de

inmunohistoquímica, basados en las posibles implicaciones pronósticas que ha sido descritas en numerosos estudios ⁵⁴.

Receptor estrogénico

Su isoforma RE-alfa es una proteína nuclear con dominios que interactúan con el ADN de la célula tras formar complejo con el estradiol, actuando mediante una vía de señalización que está mediada por el factor de transcripción AP-1. Clásicamente el receptor estrogénico presenta una íntima relación con la función proliferativa y un papel muy representativo en el desarrollo del carcinoma de mama. ^{42,51}. En el caso de los tumores lobulillares se estima que se encuentran el más del 95% de las células, y con una frecuencia en torno al 70% asociado a la expresión del receptor de progesterona. En el carcinoma mamario, incluyendo todos los subtipos histológicos, la medida del estado de este receptor de estrógeno (ER α) se relaciona con una mejor supervivencia general y con una respuesta favorable a la terapia endocrina.

Receptor Progesterona

Proteína nuclear dependiente de ligandos cuya función es interactuar con factores de transcripción, mediada por factores de crecimiento de los tejidos en los que se encuentra sobreexpresada. Es bien conocido el papel de los receptores hormonales esteroideos en el cáncer de mama. La ausencia del receptor de estrógenos (ER) y el receptor de progesterona (PR) predice la recurrencia temprana y la escasa supervivencia de las pacientes con cáncer de mama. Individualizando en este receptor, es conocido que niveles reducidos del mismo se asocia a tumores más agresivos y con peor pronóstico, aunque parece que no presenta un valor predictivo tan marcado ⁵³.

E-Cadherina

Especial importancia cobra también en la variante lobulillar la E- cadherina. Se trata de una proteína de membrana celular calcio- dependiente, íntimamente relacionada con el citoesqueleto de la misma. La e-cadherina actúa mediante la asociación de su dominio intracelular con las cateninas de membrana responsables de las uniones celulares , así como con la actina del citoesqueleto celular. De esta forma se convierte en una molécula de gran relevancia para el mantenimiento de la adhesión celular durante el desarrollo de la neoplasia de mama. A las alteraciones en las vías de expresión y regulación de estas proteínas se les atribuye el patrón de crecimiento tan característico del carcinoma lobulillar " en hileras" , así como se infiere también su implicación en la capacidad infiltrativa. Cuando el citoesqueleto celular se ve alterado por defectos de esta proteína , la célula entra en ciclo de muerte programada (anoikis).

En los distintos tipos de tumores lobulillares se presentan formas modificadas o mutadas de esta proteína como like-e- cadherina o" e-cadherina aberrante" (^{38,66}). Es conocido que esta alteración funcional se encuentra en los estadios iniciales de la tumorigénesis, el resultado de estos cambios en la proteína condiciona una disfunción en las interacciones de la misma con las distintas cateninas de membrana y alteración en sus mecanismos de autorregulación^{63,72}. Este proceso parece implicar una reubicación intracitoplasmática de dichas proteínas que confieren a la célula tumoral una especial resistencia a la autólisis a pesar de presentar pérdida o alteración en las uniones intercelulares .Otras vías de señalización intracitoplasmática, también se activan favoreciendo el crecimiento y la proliferación celular. La mutación de la e-cadherina parece ubicarse en la localización 16q22.1 y es conocido que esta está presente desde los estadios iniciales de la carcinogénesis, incluyendo las lesiones preneoplásicas. Esto debería hacer cuestionar la implicación de estas lesiones como lesiones benignas precursoras del cáncer ⁷¹.

Se trata de una proteína nuclear de gran tamaño (345 kDa), que se expresa fundamentalmente en las fases replicativas y activas del ciclo celular ($G_{1,S}$ y G_2), poco sobreexpresada en fases de latencia del mismo (G_0). Desde la perspectiva de la biología del cáncer esta molécula en la actualidad constituye el principal factor de proliferación celular, actuando a modo de indicador de la agresividad tumoral. En la clasificación por subtipos intrínsecos, una tasa de proliferación de Ki 67 por encima del 14% se relaciona con peor pronóstico de tumores clasificados como luminales, aunque en el último consenso de St Gallen se propugnó el 20% como punto de corte.

Proteína P21

Se trata de una proteína de la familia de los inhibidores de quinasa dependientes de ciclina (Cip/kip), con los que forman complejos. Estos intervienen en la regulación del ciclo celular, con capacidad para detener el paso de la fase G1 a la S. Otras vías de regulación del ciclo celular conocidas son mediante unión al antígeno nuclear de proliferación PCNA, inhibiendo la replicación del ADN y mediante interacción con proteínas específicas que intervienen en el control del ciclo celular⁷².

La expresión de la proteína P21 es inducida por la proteína P53 principalmente, aunque puede inducirse de manera independiente, y no en todas las ocasiones se traduce como inhibidor del crecimiento celular sino que parece tener doble función moduladora doble función como modulador positivo de la formación de los complejos ciclina/CDK y de su localización nuclear.

Proteína P53

Se trata de una proteína con función nuclear, aunque se conoce actividad citoplasmática en la célula. Esta codificada por el gen P 53, que es el gen que con mayor frecuencia se encuentra mutado en los cánceres humanos, aproximadamente en un 40% en el cáncer de mama.

La alteración de este gen, en pacientes con tumores, se traduce en una pérdida de la función de la proteína (reguladora de la transcripción), aumentando

considerablemente su vida media, por lo que se hace más fácilmente detectable con anticuerpos monoclonales mediante técnicas de inmunohistoquímica.

Entre las últimas investigaciones sobre P53, se describe la mutación de esta proteína con un papel esencial implicado en el proceso de cancerogénesis mediando en la actividad de otras moléculas como EGRF y erb-B2 tanto en cáncer de mama esporádico como familiar⁵⁴.

Aislada por primera vez en linfoma de Hodgkin, línea 428⁵⁶. Es una proteína nuclear no relacionada con histonas. Juega un papel muy importante en la regulación de proliferación celular, asociado al núcleo celular en las fases G1, S y G2 del ciclo celular, muy sobreexpresada en las fases G2 y M del mismo, tanto en células tumorales como en células sanas.

PCNA.

Codificada por el gen PCNA, uno de los pocos genes conocidos en el proceso de la reparación celular, especialmente en células dañadas por la radiación⁵⁷.

Codifica una proteína celular no perteneciente a la familia de las ciclinas, como originalmente se atribuía, con carácter multifuncional a nivel de ciclo celular. Es una herramienta esencial en la replicación del ADN actuando como proteína complementaria de la ADN polimerasa (δ

y ϵ) con la que interviene en la síntesis, recombinación y reparación del ADN. La carencia de ésta puede conducir hacia la apoptosis celular. Encontraremos esta proteína sobreexpresada en células tumorales que presenta una especial resistencia a la radiación.

C-erbB-2/neu.

Oncogen humano ubicado en el cromosoma 17q21, que da lugar a una glicoproteína de membrana de la familia de las tirosincinasas, estructuralmente muy

parecida al factor de crecimiento epidérmico EGFR. Estas glicoproteínas de membrana presenta un gran dominio intracitoplasmático con función enzimática. Se ha objetivado una sobreexpresión y amplificación con alta frecuencia en adenocarcinomas humanos y principalmente se le conoce una importante implicación con los tumores de mama y ovario ⁵⁸. Así aproximadamente entre el 25 y el 30% de los tumores de mama presentan una amplificación genómica de C-erbB-2, y esta se correlaciona con un comportamiento agresivo y una disminución de la supervivencia, como ocurre también con el cáncer ovárico. No se ha observado sobreexpresión en las enfermedades mamarias benignas. En las dos últimas décadas, se han desarrollado anticuerpos monoclonales que bloquean la activación de la oncoproteína c-erbB-2 y se ha documentado la actividad clínica de un anticuerpo monoclonal humanizado: herceptín que ha supuesto uno de los mayores avances en el tratamiento de las pacientes que presentaban sobreexpresión de ésta oncoproteína.

Proteína Rb

Proteína que se aisló por su implicación en retinoblastoma, de ahí su nombre. Se trata de una fosfoproteína nuclear implicada activamente en la regulación del ciclo celular. En su estado activo (hipofosforilada) ejerce el papel de freno al progreso de la célula desde la fase G1 a la fase S en el ciclo celular. Esta acción está condicionada a la presencia intracelular de factores de transcripción E2F, con los que forma un complejo pRb-E2F que se une al DNA de la célula e inhiben activamente la transcripción de los genes de la fase S ⁵⁹ de ADN, proliferación celular y diferenciación celular.

La sobreexpresión del EGFR no es específico, sino que aparece en diversas neoplasias. La sobreexpresión de la proteína en células tumorales es el resultado de la amplificación genética y/o de una mayor transcripción ^{63,64}.

Se ha encontrado una correlación inversa entre el receptor de estrógeno y la expresión del EGFR en los tumores mamarios primarios. Proteína BCL2

c-erb -B2 neu (HER 2)

Proteína codificada por el oncogen BCL2 (18q21), implicado en una mutación translacional cromosómica t(14;18) muy expresado en linfomas B foliculares (80%) y difusos (20%) en humanos⁶⁰. Su mutación provoca una expresión desequilibrada de la oncoproteína BCL2, ubicada en el retículo endoplásmico de la membrana externa mitocondrial y de la cubierta nuclear, con función bloqueadora de la apoptosis celular. Así pues, niveles elevados de esta molécula pueden proteger a la célula de una amplia variedad de estímulos que conducen a la muerte celular programada.

PTEN

Gen oncosupresor localizado en una subbanda cromosómica 10q23.3, mutado en una gran variedad de cánceres avanzados. Codifica una oncoproteína que antagoniza la función intracelular de fosfatidil-inositol (PI-3), como resultado de la mutación del gen se produce la activación de multitud de rutas de señalización que intervienen en la proliferación, apoptosis y migración celular. También se ha implicado en el control de los niveles y actividad de la proteína P53. En cáncer de mama la pérdida de expresión se ha visto asociada tanto al Síndrome de Cowden como al cáncer de mama esporádico⁶¹.

Proteína P63

Proteína localizada en la membrana nuclear de algunas células basales epiteliales, perteneciente a la familia de la proteína P53 y P73, codificadas en el mismo gen supresor. Actúa como factor de transcripción intracelular, regulando el ciclo celular y en la inducción a la apoptosis en respuesta a la hipoxia o daños del DNA. En el cáncer de mama se mantiene expresada en lesiones con crecimiento in situ, pero su expresión se ve afectada cuando la neoplasia se hace infiltrante, como señal de proliferación desmesurada⁶². También presente en otros tejidos, nos ayuda a diferenciar lesiones benignas de próstata del adenocarcinoma protático y entre adenocarcinomas y tumores escamosos tanto de cérvix como de pulmón.

EGFR

Glicoproteína transmembrana que puede unirse a diversos ligandos y ser activada por estos, que incluyen el factor de crecimiento epidérmico (EGF), transformando el factor de crecimiento alfa ($TGF\alpha$) y otros factores de crecimiento codificados viralmente. Detectada la señal del ligando, activa la vía tirosina quinasa intrínseca del receptor y su dominio intracelular. La activación de la quinasa produce varios fenómenos de fosforilación entre los que destaca la del EGFR y fosfolipasa C-II. Como consecuencia se suceden varios eventos de señalización, mediado por el calcio intracelular, de la que resultan varias respuestas celulares que incluyen síntesis incrementada. Además, EGFR aparece en un porcentaje más elevado de metástasis de tumor de mama en comparación con los tumores primarios.

Proteína Ps-2

La proteína pS-2 (péptido espasmolítico o TFF-1 -«trefoil factor family») mayoritariamente activa en el epitelio de mucosa gástrica, y tracto intestinal en segundo lugar, donde desarrolla un papel fundamental en la defensa y reparación de dicho epitelio. También se expresa en algunos especímenes mamarios, donde se ha especulado que puede ejercer una acción motógena sobre los ductos mamarios. Pero el mayor interés de la pS2 se origina tras el descubrimiento de sus elevados niveles en pacientes con cáncer de mama mediante estímulo directo de la señal estrogénica MCF-7. Posteriormente, estudios basados en experiencias clínicas han constatado que las concentraciones intratumorales bajas de la pS2 están ligadas con un pronóstico desfavorable en las pacientes con cáncer de mama. Otros estudios resaltan el valor de la proteína para predecir una respuesta clínica favorable a la terapia hormonal antiestrogénica, ya que la expresión de la pS2 podría reflejar unos receptores estrogénicos funcionalmente intactos en el cáncer de mama.

BCRA

Se trata de un gen con un papel básico en distintos procesos del ciclo celular como son la reparación de ADN, la transcripción genómica, la ubiquitinación y los fenómenos de apoptosis. Tiene funciones tanto de coactivación como de correpresión en la transcripción proteica, entre estas, destaca su implicación con las histonas. Ejerce también función reguladora en la transcripción de numerosos genes que se interrelacionan entre otras con las ciclinas. (G2/M; GADD45) .Quizá su actividad intracelular más destacado estriba en su implicación en la reparación del ADN, actuando en distintas fases del ciclo celular. La metilación de este gen se ha relacionado con la aparición de cáncer de mama esporádico. La mutación epigenética del BRCA1 se ha relacionado aproximadamente con el desarrollo de cáncer de mama en un 30% y en un 70% con el cáncer ovárico. En la actualidad se conoce que se implica también en la respuesta a algunos agentes quimioterápicos como son las antraciclinas y el cisplatino, por lo que niveles bajos de mRNA de BRCA1 podrían predecir la respuesta a un esquema de quimioterapia determinado.

Catepsina D

Se trata de una proteína lisosomal glicosilada, originada de la familia de peptidasas A1, con función proteasa que interviene en la proteólisis por daños irreparables del ciclo celular. Se conoce que está implicada en distintas enfermedades degenerativas como el Alzheimer y en el desarrollo del cáncer de mama^{67,68}.

2. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad siguen teniendo gran relevancia clínica y aplicabilidad las técnicas inmunohistoquímicas en el estudio de neoplasias, con especial implicación en el diagnóstico y el tratamiento del carcinoma de mama, a pesar de los avances en genética que en la actualidad tienen poca aplicación en la práctica médica diaria por su complejidad y la gran cantidad de datos que están generando.

Se conocen la existencia de diferencias tanto a nivel clínico, morfológico y pronóstico de ciertos tipos de carcinoma de mama, por su frecuencia el más estudiado clásicamente ha sido el carcinoma ductal (CD) y a pesar de haber sido menos valorado por la comunidad científica, se atribuye un comportamiento especial al subtipo de carcinoma lobulillar, aún en la actualidad un gran desconocido.

En la actualidad parece aceptada la clasificación histopatológica del carcinoma lobulillar en: clásico y pleomórfico, existiendo otros que comparten características de los dos. A éstos se les atribuye diferencias marcadas en su comportamiento biológico y en el nivel de agresividad tumoral, asignando a la variedad pleomórfica un peor pronóstico, que presumiblemente se traduce en una menor supervivencia como ya apuntaban en el año 1979 Martínez y Azzopardi⁶⁹. Y sin embargo, en los últimos años hay estudios que arrojan datos acerca de la inexistencia de estas diferencias en la supervivencia de la variedad pleomórfica con respecto a la clásica, identificando otros factores que se pueden asociar a este peor comportamiento y al subtipo histopatológico concreto. Generada esta cuestión y dadas las distintas implicaciones pronósticas y terapéuticas que implican uno u otro subtipo de CLI, nos plantea la posibilidad de estudiar distintos parámetros, mediante técnicas inmunohistoquímicas, aplicadas a una población de pacientes afectas de carcinoma lobulillar de mama con la intención de identificar aquellos posibles marcadores celulares que se asocian a los subtipos clásico y pleomórfico del carcinoma lobulillar de mama y valorar sus relaciones con los parámetros clínicos, poblacionales e histopatológicos que puedan generar hipótesis a posteriori de las posibles implicaciones pronósticas⁷⁰.

En resumen: Se valoran otros parámetros desde el punto de vista histopatológico e inmunohistoquímico que nos permitan extrapolar una caracterización más aproximada al tipo lobulillar del cáncer de mama y sus subtipos. Se evalúan datos histopatológicos posiblemente asociados al mismo y la sobreexpresión o supresión de las distintas proteínas y oncogenes mediante estas técnicas de inmunohistoquímica, basados en las posibles implicaciones pronósticas que ha sido descritas en numerosos estudios ⁵⁴.

3. OBJETIVOS

1 .Estudiar las características clínicoepidemiológicas en las tres variantes tradicionales del carcinoma lobulillar infiltrante de mama.

2. Estudiar las características histopatológicas entre las tres variantes tradicionales de carcinoma lobulillar infiltrante de mama

3. Estudiar las características inmunohistoquímicas entre las tres variantes tradicionales de carcinoma lobulillar infiltrante de mama y establecer la posible relación con su fisiopatología como marcadores de función celular.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN A ESTUDIO.

4.1.1. POBLACIÓN

La población objeto de estudio, incluye mujeres diagnosticadas en la Unidad de Mama del Hospital General Universitario Reina Sofía de Murcia, derivadas para estudio desde programas de screening que corresponden a su área de salud, desde los servicios de atención primaria del mismo área o pacientes remitidas directamente a la unidad desde otras especialidades médicas del ámbito hospitalario, entre los años 2007 y 2014.

4.1.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Criterios de inclusión

- Mujeres de cualquier edad y estadio de la enfermedad mamaria ,derivadas a la unidad de mama como primera visita desde atención primaria, medicina interna o programa de cribado.
- Mujeres con diagnóstico previo de BAG, realizada en el servicio de patología del hospital.
- Pacientes valoradas en comité de mama del hospital e intervenidas por cirujanos de la Unidad de mama.
- Pacientes con diagnóstico de neoplasia lobulillar infiltrante.

-Pacientes en estadio IV con diagnóstico histológico de carcinoma lobulillar de mama.

Criterios de exclusión

- Varones

- Mujeres valoradas inicialmente en otras unidades, fuera de nuestra unidad de mama y con diagnóstico AP realizado en otros laboratorios, no confirmado en una segunda biopsia realizada en el centro hospitalario del estudio .

-Pacientes en las que el diagnóstico anatomopatológico describe exclusivamente lesiones “in situ” de carcinoma lobulillar de mama.

- Mujeres con diagnóstico definitivo anatomopatológico de carcinoma ductal de mama.

- Se excluyeron así también pacientes que presentaran concomitantemente alguna otra neoplasia activa en tratamiento o aquejadas de enfermedades médicas y/o características clínicas que dificultase el tratamiento y/o seguimiento del carcinoma mamario.

4.1.3 METODOLOGÍA DIAGNÓSTICA

- Evaluación clínica : A todas las pacientes se les somete a una primera entrevista clínica estandarizada, en el momento en las que son remitidas a la unidad, en la que se registran datos personales y clínicos previos al diagnóstico. Se registran los datos extraídos de la exploración física bilateral de la mama. Asociamos al registro clínico los datos radiológicos complementarios:

- Evaluación radiológica:
 - Ecografía mamaria y axilar bilateral, mamografía bilateral, PAAF/ citología ocasional.
 - BAG ecoguiada o radioguiada en la/s lesión/es.
 - BAV en caso de microcalcificaciones y
 - RMN mamaria bilateral: en la práctica asistencial se realiza en pacientes con un solo nódulo y posibles candidatas a cirugía conservadora. La exploración se apoya en una ecografía de “second look “en caso de la aparición de otras lesiones sospechosas sumando una nueva biopsia si esta sospecha fuera consolidada. Se realizó RMN a todas las pacientes diagnosticadas de carcinoma lobulillar mediante BAG, ante la mayor frecuencia de multicentricidad y multifocalidad que pudiera contraindicar una cirugía conservadora.

4.1.4 METODOLOGÍA DEL ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

Para el estudio de la pieza quirúrgica, ya se trate de un espécimen de cirugía conservadora o mastectomía radical, se toma como referencia aquella sección de la misma más representativa del tejido tumoral. También se documenta las características del tejido circundante no neoplásico.

Una vez extirpada la lesión con margen adecuado y referenciada para su correcta orientación, los especímenes quirúrgicos son conservados en solución de formaldehído tamponado al 10% para su correcta fijación un mínimo de 24 h. A continuación se realizan cortes representativos de la lesión, incluidos en un cassette y procesado de forma automática para su inclusión en parafina, sometiéndose en ese procesamiento a un tratamiento de deshidratación (pasos secuenciales por alcoholes de 70, 80, 90 y

100% y xileno para ser embebidos posteriormente en parafina líquida. Tras enfriarse y solidificar, proporciona un bloque de tejido preparado para su estudio. Tras realizar cortes de un espesor aproximadamente de 3-4 micras la pieza se procede a la rehidratación del corte para su tinción mediante la técnica clásica de histopatológico. hematoxilina-eosina, quedando dispuesta para estudio.

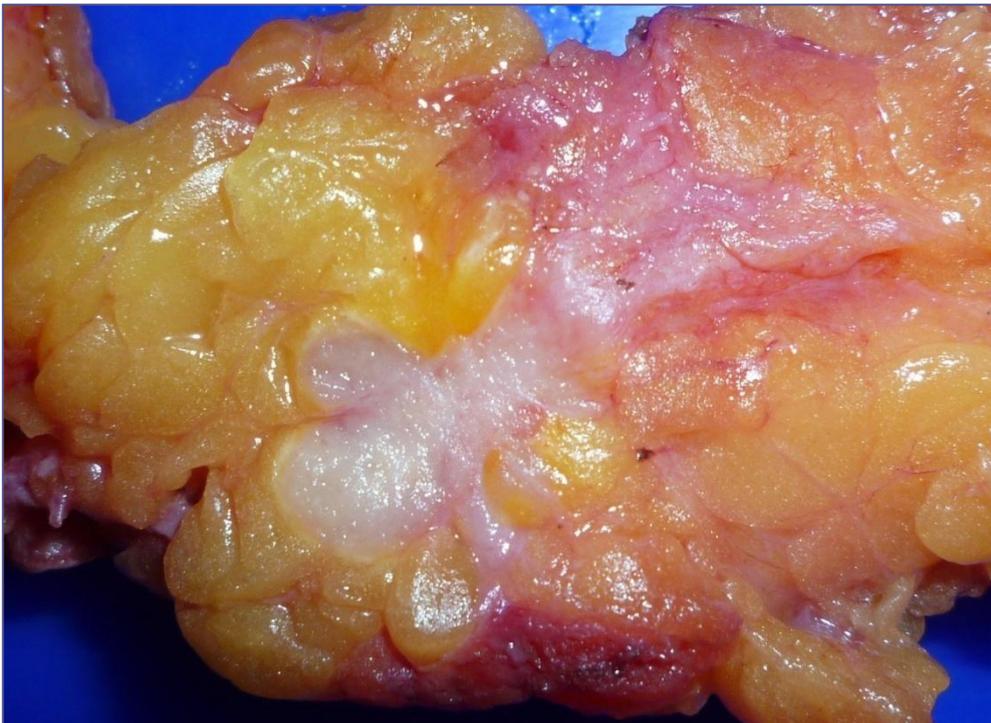


Foto4 .Estudio macroscoscópico CLI

El análisis histopatológico de la pieza quirúrgica se lleva a cabo en dos tiempos tras la preparación de la misma, tras estos se han extraído algunas variables para nuestro estudio.

I.- Estudio macroscópico:

- Tamaño de la pieza quirúrgica referenciada por sus márgenes en el acto operatorio, tanto si se trata de un espécimen de cirugía local, como si se trata de una mastectomía radical. Las referencias nos orientan la pieza y la localización de la /s lesión/es en la mama.

- Morfología macroscópica de la lesión y distancia a los márgenes quirúrgicos, dato que se documenta en todo informe histológico de lesiones mamarias y que plantea posibilidades diagnósticas, a pesar de los datos de biopsia previos. La distancia en mm de los márgenes de la lesión al borde de resección, considerando estos como suficientes cuando son mayores o iguales a 3 mm, aunque se estima que el margen óptimo es a partir de 5mm. Las características del tejido sano circundante es otro parámetro que puede orientar al patólogo, en ocasiones. En el caso de CLI las lesiones pueden no mostrar un patrón nodular y quedar semiocultas entre el tejido normal mamario.

- Tamaño de la lesión, ya que es un factor pronóstico de enfermedad. Siguiendo la clasificación TMN (Tabla 2) se agrupan a las pacientes en 4 grupos, según el tamaño de la lesión sea menor de 10 mm, mida entre 10 y 20 mm, entre 20 y 50 mm y lesiones mayores de 50 mm. En el caso de tumores multicéntricos se recoge el tamaño del nódulo mayor y en el caso de tumores multifocales se suman si los focos están muy próximos constituyendo una sola lesión.

II.- Estudio microscópico:

Tipo de carcinoma lobulillar: infiltrante, “in situ” o ambos. Ya que las pacientes en las que sólo se detectó componente in situ (CLIS) exclusivamente fueron excluidas del estudio.

Subtipo de carcinoma lobulillar: clásico, intermedio o pleomórfico³⁶. Para ello se estudia el tamaño de las células tumorales, características de su citoplasma, del

núcleo y nucléolos, la presencia o ausencia de atipias y el número de mitosis por 10 campos de gran aumento (40x).

La presencia o ausencia de multifocalidad o multicentricidad, considerándose multicéntrica si todos los focos de carcinoma se localizan en el distinto cuadrante o en la mama contralateral, mientras que si se ubican en el mismo cuadrante de la mama se considera una lesión multifocal.

Las características del parénquima circundante, la infiltración linfática o de vasos sanguíneos, la presencia de otras lesiones asociadas en la pieza quirúrgica.

Tras la cirugía se recoge la información de las variables que hacen referencia a la pieza quirúrgica y a la afectación axilar (véase descripción variables pag 51) .

Para el estudio de ganglio centinela en todas las pacientes se realizó uno o varios cortes sobre el ganglio o ganglios aislados, sobre los que se realizaron improntas citológicas y cortes por congelación, dado que en aquel momento aún no se había implantado el método OSNA en nuestro hospital.

En el tejido de linfadenectomía se hizo un contaje del número de ganglios que se estudiaron por separado tras seriación y cortes histológicos de la pieza teñidos con técnica de hematoxilina-eosina .

Con los datos histopatológicos tanto del tumor como de la afectación ganglionar, y conocida la existencia o ausencia de metástasis ganglionares se clasificaron a las pacientes en estadio tumoral correspondiente según la clasificación TMN (séptima edición), que se resume en la siguiente tabla.

CLASIFICACIÓN TMN

ESTADIO	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T(T1mic)*	N0	M0
IB	T0	N1 mic**	M0
	T1 (T1mic)		
IIA	T0	N1	M0
	T1mic	N1	
	T2	N0	
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	
	T2	N2	
	T3	N1	
	T3	N2	
IIIB	T4	N0	M0
		N1	
		N2	
IIIC	Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

Tabla 2 . Clasificación pronóstica TMN

- T(T1mic)*: microinvasión ≤ 0.1 cm
- N(N1 mic)**: micrometástasis >0.2 mm y < 2 mm o >200 células

4.1.5 METODOLOGÍA INMUNOHISTOQUÍMICA

Tras el estudio morfológico, se procede a la caracterización inmunohistoquímica de la neoplasia. Las técnicas inmunohistoquímicas nos permiten identificar moléculas o fracciones de las mismas (antígenos), características de algunas líneas celulares o incluso, propias de determinados tipos de células, en función de la presencia o ausencia de estas moléculas. Estas técnicas se fundamentan en una reacción de tipo antígeno-anticuerpo que se pone de manifiesto generalmente mediante colorimetría, tras un procesamiento enzimático.

I. Descripción de la Técnica Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica se define como toda técnica que permite detectar “in situ” componentes celulares y extracelulares (antígenos) por medio de anticuerpos específicos mediante métodos de detección enzimáticos.

El antígeno es la molécula que se desea detectar, en muchos casos una fracción de la misma (epítipo). El anticuerpo suele corresponder a una inmunoglobulina de tipo IgG producida de células plasmáticas tras la diferenciación del linfocito B al contactar con el antígeno. Para las técnicas aplicadas en cáncer de mama en laboratorio se utilizan principalmente anticuerpos monoclonales que tienen como principal característica la especificidad y la reproducibilidad. En este estudio se han utilizado anticuerpos primarios y kits comerciales de las casas Dako® y abcam®.

A continuación se describe la técnica inmunohistoquímica para la determinación de los marcadores que pueden caracterizar a estas neoplasias. Algunas de estas presentan cierta especificidad, otros no se presentan exclusivamente en los tumores de mama. Para el estudio se relatan también las particularidades de las técnicas de análisis de dichos parámetros, para cada uno de ellos.

I.- Preparación de las muestras

Para la detección inmunohistoquímica molecular se han utilizado las muestras de tejido fijadas inicialmente en formaldehído tamponado a pH7 con fosfato sódico monobásico y dibásico y una concentración final al 10%. Estas muestras deben mantenerse en la solución de fijación durante un mínimo de 24 h evitando sobrepasar las 48 h (sobrefijación que enmascara los epítomos y reduce la antigenicidad).

Para la inclusión en parafina los especímenes fijados son sometidos a una cadena de procesamiento para convertir el material biológico en un material sólido, homogéneo y duro para estudio. Las muestras tras la fijación son sometidas secuencialmente a un proceso de deshidratación mediante lavados en alcohol a concentraciones crecientes. Posteriormente un proceso de aclaramiento para que la parafina pueda a posteriori embeber el tejido, para ello el alcohol es reemplazado por un líquido intermedio como el xilol. Finalmente se realiza la inclusión del tejido mamario en parafina líquida con un punto de fusión a 60°C que solidifica una vez se enfría lista para proceder al estudio. Posteriormente se realizan cortes de 4 micras. Los cortes almacenados se conservan a una temperatura de -20°C.

II.-Recuperación antigénica

Para la recuperación antigénica, se utiliza un proceso de incubación con el tampón Tris (10mM) evitando que los cortes se sequen (principalmente con antígenos de localización nuclear): Después del tratamiento térmico, utilizando el sistema PTLINK (Dako®), se deja enfriar el recipiente con el tampón (solución de citrato de pH alto o bajo de Dako®) y los portaobjetos durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los cortes son enjuagados cuidadosamente con tampón o agua desionizada.

Mediante el desenmascaramiento antigénico se reactivan los antígenos que quedan ocultos tras el proceso de fijación de la muestra, de manera que pueden reaccionar con los anticuerpos primarios que se suministran en los kits comerciales.

III.- Procesamiento conjugación y revelado.

Tras la realización de las técnicas y determinación mediante método de conjugación PAP (peroxidasa-antiperoxidasa). Este presentan anticuerpo primario que

reconoce el antígeno, un Ac secundario, puente o de unión, específico contra el primario y el complejo peroxidasa-antiperoxidasa (3 molec de peroxidasa y 2 moléculas de Ac antiperoxidasa), obtenido de la misma especie que el Ac primario., formando un complejo de 400 a 430kDa. Este complejo se revela mediante tetraclorhidrato de 3,3`diaminobencida (DAB), tras añadir el sustrato: H₂O₂ a la muestra con los complejos, amplificando posteriormente la señal según el procesamiento estándar de los kits comercializados para cada molécula a estudio se procede a la lectura de las muestras con método semicuantitativo, realizando las lecturas de los resultados en 10 campos de gran aumento

Para evaluar los resultados se utilizan controles positivos y negativos, internos o externos comercializados

II. Biomarcadores de función celular

Con los resultados obtenidos previamente y dada la asociación existente entre los marcadores inmunohistoquímicos seleccionados, en cuanto a mecanismos implicados en el proceso de carcinogénesis (que origina la transformación neoplásica de células epiteliales benignas), se seleccionaron para estudio agrupaciones de los mismos en base al mecanismo de actuación a nivel celular recogiendo seis categorías. Se registraron como variables positivas o negativas en función de que las pacientes estudiadas presentaran positividad de todos los incluidos en un grupo. Se registraron como negativos aquellas pacientes en las que no se expresaba alguna de las moléculas del grupo.

4.2. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se valoramos y agrupamos las características de las pacientes incluidas a estudio con carcinoma lobulillar infiltrante. Se describen dos subtipos dentro de carcinoma lobulillar infiltrante, el clásico y el atípico o pleomórfico, y un tercer subtipo intermedio que puede compartir características con los otros dos. Quedan definidas de este modo tres variantes de carcinoma lobulillar infiltrante en la población a estudio: clásico, pleomórfico e intermedio. Se examina dicha población agrupando los datos reclutados en 4 unidades a estudio para cada subtipo de carcinoma lobulillar.

Se realiza un protocolo de recogida de datos donde se incluyen datos clínico-epidemiológicos previos, datos clínicos al diagnóstico, filiación anatomopatológica de los mismos y datos inmunohistoquímicos de las biopsias desglosados en distintas variables y agrupados según criterios moleculares de función celular.

Variables	Variables	Variables IHQ
clinicoepidemiológicas	Histopatológicas	
<i>Edad</i>	<i>Subtipo CLI</i>	<i>RE</i>
<i>Premenop/postmenop</i>	<i>Mastopatía Permeacion</i>	<i>RP</i>
<i>AP mamarios</i>	<i>linfovascular Lesión in</i>	<i>Ki67</i>
<i>AF cáncer hormonodp</i>	<i>situ asociada HLA</i>	<i>Herceptest</i>
<i>Fecha diagnóstico Tipo</i>	<i>Ca ductal asociado</i>	<i>PTEN P21</i>
<i>lesión diagnóstico</i>	<i>Tamaño de la lesión AP</i>	<i>P53</i>
<i>Tamaño</i>	<i>Número de lesiones AP</i>	<i>P63</i>
<i>Núm de lesiones</i>	<i>GC/LA</i>	<i>BRCA</i>
<i>Lateralidad</i>	<i>Afectación GC</i>	<i>EGRF</i>
<i>Localización mamaria</i>	<i>Nº ganglios afectados</i>	<i>Bcl-2</i>
<i>Técnica quirúrgica</i>	<i>TMN Subtipos</i>	<i>Ps-2</i>
<i>Reintervención qx</i>	<i>molecular</i>	<i>Catepsina</i>
		<i>e-cadherina</i>

Tabla 3 . Variables del estudio

Establecidas los tres grupos a estudio de CLI (clásico, intermedio y pleomórfico), que han sido clasificados bajo criterios histológicos, se estudian su correlación respecto a cuatro grupos de variables extraídas de los datos poblacionales registrados. Se comparan los subtipos carcinoma lobulillar con la finalidad de encontrar un patrón inmunofenotípico que nos aproxime a su caracterización.

GRUPOS VARIABLES	MARCADORES IHQ		
V. RESPUESTA HORMONAL	RE	RP	P-S2
V. PROLIFERACION CLR	KI67	PCNA	
V. RELAC CON APOPTOSIS	P53	Bcl-2	
V. RELAC GENES SUPRESORES	PRB	PTEN	
V.RELAC ONCOGENES	PRB	P53	P21
V.RELAC ADHESIÓN CELULAR	E-CADH	CATEPSINA D	

Tabla4. Agrupación de variables IHQ.

4.3 DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES.

4.3.1. VARIABLES CINICOEPIDEMIOLÓGICAS

Entre éstas se incluyen:

- Edad: Documentada en el momento en el que consultan o son remitidas para estudio, en años.
- Estado hormonal:
 - Premenopáusica: pacientes que aun preservan la función ovárica. En este grupo se incluyen las pacientes perimenopáusicas constatada por descenso hormonal y baches de amenorrea.
 - Postmenopáusica: pacientes con ausencia de menstruación durante un mínimo de un año y disminución significativa de la función ovárica.
- Antecedentes personales previos de cirugía mamaria y/o ginecológica: Intervenciones previas en mama o aparato genital.
- Antecedentes familiares: de carcinoma mamario u ovárico de cualquier tipo histológico.

Los datos del estudio al inicio del del episodio: fueron:

- Síntoma de inicio: entre los que se recogen: diagnóstico casual por un síntoma mamario inespecífico, nódulo o masa palpable de nueva aparición y retracción, o induración mamaria.
- Tamaño a la exploración física del nódulo: clínicamente se establece tamaño según la valoración radiológica ecográfica al diagnóstico, en milímetros.
- Localización del nódulo en la mama: para el estudio se clasificaron en tres localizaciones: cuadrantes superiores y externos (la localización más frecuente de forma global), inferiores e internos, y retroareolares y/o difusos. Se opta por

esta clasificación dada la gran diversidad y posible variabilidad en la exploración física.

- Detección de bilateralidad o no a la exploración, dado que está descrita una mayor frecuencia de bilateralidad en el subtipo histológico lobulillar.
- la técnica quirúrgica realizada, de la mama y la axila como tratamiento local inicial de la enfermedad: se describen 6 estrategias quirúrgicas en esta variable: CC y BSGC, CC y LA , MRM y BSGC , MRM y LA , MRM y LA bilateral y las pacientes que no recibieron cirugía por distintos motivos. **Técnica Quirúrgica:** una vez confirmada la sospecha de cáncer de mama se planificó la cirugía en función de los datos clínicos y radiológicos, tras ser evaluadas por el comité de mama del hospital. El estudio de extensión se postergó a la cirugía de forma protocolizada, con la finalidad de no demorar el tratamiento quirúrgico excepto en algún caso de aquellas pacientes que recibieron tratamiento neoadyuvante, pacientes con sospecha de afectación sistémica metastásica o en pacientes que no fueron candidatas a cirugía en el momento diagnóstico por enfermedad metastásica de debut .
- La necesidad de reintervención quirúrgica : supone la posible existencia de enfermedad residual en el espécimen quirúrgico y el consecuente empeoramiento pronóstico. Se agrupan tres categorías: pacientes que no precisaron nueva cirugía, reintervención axilar (por afectación ganglionar metastásica), reintervención mamaria (por multifocalidad o afectación de márgenes quirúrgicos). Tabla 3.

4.3.2_VARIABLES HISTOPATOLÓGICAS

- Tamaño del tumor en milímetros (mm), incluido en el espécimen quirúrgico.

- Metástasis ganglionar: conocida preoperatoriamente o postoperatoriamente. Se documenta también como variable dicotómica en función de afectación o ausencia de ella.
- Número de ganglios aislados: Se considera en tres grupos a estudio: pacientes sin afectación axilar (GC negativo), pacientes con afectación axilar de dos o menos ganglios y pacientes con afectación axilar de más de dos ganglios.
- Subtipo histológico de CLI: Clásico , Pleomórfico o Intermedio.
- Presencia o ausencia de infiltración linfática o vascular
- Presencia o ausencia de focos de carcinoma lobulillar "in situ",
- Presencia o ausencia de focos de HLA,
- Presencia o ausencia de focos asociados de carcinoma ductal,

Obtenidos los datos del estudio histopatológico definitivo se clasifican a las pacientes en función de la variable :

- Estadío tumoral atendiendo a las pautas de clasificación TMN (ver tabla 2)

4.3.3. VARIABLES INMUNOHISTOQUÍMICAS

4.3.3.a. Estudio Inmunohistoquímico

Para nuestro estudio, los marcadores analizados mediante técnicas de inmunohistoquímica protocolizados fueron los siguientes. El procesamiento específico de cada molécula se detalla de forma individual:

- Receptores hormonales y su expresión en estos tumores: RE, RP, indicadores de hormonosensibilidad tumoral
- Sobreexpresión o no de herB-2

- Índice de proliferación Ki 67 y PCNA
- Oncoproteína Rb(P-Rb)
- Sobreexpresión de proteína P53
- Sobreexpresión de P63
- Determinación de la presencia o ausencia de E-Cadherina
- Determinación de la presencia o ausencia de Catepsina D
- Sobreexpresión de oncogen P21 RAS
- Determinación de la presencia o ausencia de EGFR
- Determinación de la presencia de mutación del gen BRCA-1
- Expresión de la proteínas P-S2
- Expresión de la proteína Bcl-2

- **Receptor estrogénico:**

Para diagnóstico in vitro, se ha utilizado el anticuerpo monoclonal de ratón contra el receptor de estrógeno humano α , Clon 1D5, indicado para su uso en inmunocitoquímica. El anticuerpo marca las células positivas que expresan al receptor de estrógenos alfa y es útil en la evaluación del estado del receptor alfa de estrógenos en los carcinomas mamarios humanos. La interpretación clínica de los resultados de cualquier tinción, o su ausencia, debe complementarse con controles morfológicos adecuados. En el cáncer de mama, la medición del estado del ER α generalmente se considera útil porque la presencia de este receptor de estrógeno se relaciona con una mejor supervivencia general y con una respuesta favorable a la terapia endocrina

En laboratorio esta detección se realiza mediante el reactivo comercializado por la industria (Dako®). Se proporciona anticuerpo monoclonal murino suministrado en forma líquida como sobrenadante de cultivo celular dializado en Tris/HCl a 0,05 mol/L, pH 7,2 y con un contenido de NaN₃ a 15 mmol/L. El anticuerpo mediante técnicas inmunohistoquímica reacciona específicamente con el ER α (no presenta reacción con el ER β), un polipéptido de aproximadamente 67 kDa que corresponde al dominio amino-terminal receptor de estrógeno (ER α).

El patrón de tinción molecular obtenido de RE es nuclear.

Se considera valor positivo en el caso que la sobreexpresión supere el 5% de las células en campo de gran aumento, y negativo cuando no se alcanza este porcentaje de sobreexpresión.

- **Receptor Progesterona**

Para el estudio del biomarcador se ha precisado de el anticuerpo monoclonal de ratón contra el receptor de la progesterona humana (Anti-PR, PgR 636, Dako®), tras el análisis en el laboratorio se consigue una detección semicuantitativa del receptor de la progesterona de las células tumorales que podemos objetivar mediante microscopía de luz normales incluidos en parafina procesados en formol tamponado neutro (también es cuantificable en otros tejidos humanos sanos y patológicos que lo expresen). Este anticuerpo está indicado para su uso como ayuda en el tratamiento, pronóstico y predictivo de la evolución del cáncer de mama. Los resultados positivos ayudan a la clasificación de los tejidos y células normales y anormales en función del grado de sobreexpresión del mismo, apoyado por la histopatología convencional.

El manejo del reactivo en el laboratorio el anticuerpo de ratón monoclonal es comercializado en forma líquida como sobrenadante de cultivo de tejido en Tris-HCl de

0,05 mol/L (pH 7,2) y azida de sodio de 0,015 mol/L. asociado a una proteína estabilizante. Obtenemos de nuevo, como ocurre con RE, un patrón de tinción nuclear.

Se considera valor positivo en el caso que la sobreexpresión supere el 5% de las células en campo de gran aumento, y negativo cuando no se alcanza este porcentaje de sobreexpresión.

- **E-Cadherina**

Para su diagnóstico se ha precisado de kit comercial (Dako®) que realiza detecciones de esta molécula mediante un anticuerpo monoclonal purificado de ratón Monoclonal Mouse Anti-Human E-cadherin (Anti-E-cadherin, NCH-38). Analiza cualitativamente por microscopía óptica, células E-cadherina positivas en tejidos normales y neoplásicos aplicando métodos de análisis inmunohistoquímico (IHQ).

Para la técnica el anticuerpo es proporcionado en forma líquida como sobrenadante de cultivo de tejido en Tris-HCl de 0,05 mol/L (pH 7,2) y azida de sodio de 0,015 mol/L. Mediante esta técnica la Anti-E-cadherina, reconoce la forma madura de 120 kD y el fragmento de 82 kD de E-cadherina de las células estudiadas.

El patrón de tinción obtenido con esta proteína es un patrón de membrana celular. En la inmensa mayoría de los CLI esta tinción obtiene un resultado débil o nulo.

Se considera valor positivo en el caso que la sobreexpresión supere el 5% de las células en campo de gran aumento, y negativo cuando no se alcanza este porcentaje de sobreexpresión.

- **Proteína P-21**

Para el estudio de este marcador se ha utilizado otro anticuerpo monoclonal purificado de ratón, Anti-Human p53 Protein (Dako®). El anticuerpo marca la proteína

p53 de tipo natural y de tipo mutante y constituye un método de identificación de la acumulación de p53 en las neoplasias humanas, en nuestro caso en el carcinoma lobulillar de mama. La identificación diferencial es facilitada por los resultados de un panel de anticuerpos.

El anticuerpo monoclonal murino es comercializado en forma líquida como sobrenadante de cultivo celular dializado en Tris/HCl 0,05 mol/L, pH 7,2 y con un contenido en NaN₃ de 15 mmol/L.. Mediante la técnica inmunohistoquímica se detecta el epítipo que se ubica entre los aminoácidos N-terminales 1 y 45 y, posiblemente entre los aminoácidos 37 y 45 de la proteína p53 humana. Obtenemos un patrón de tinción nuclear.

Se considera valor positivo en el caso que la sobreexpresión supere el 5% de las células en campo de gran aumento, y negativo cuando no se alcanza este porcentaje de sobreexpresión.

- **P53**

En este caso se presenta un anticuerpo monoclonal purificado de ratón: Monoclonal Rabbit Anti-Human p53, clon 318-6-11(Dako®) para la determinación inmunohistoquímica. Este anticuerpo es útil para la identificación de p53 en tejidos normales y neoplásicos. La identificación diferencial se complementa con los resultados de un panel de anticuerpos. En células normales, la concentración de la proteína p53 generalmente está por debajo del nivel de detección de los métodos inmunohistoquímicos. El inmunógeno corresponde al péptido sintético de la región de p53 humano con aminoácidos 49-68.

El reactivo es suministrado en forma líquida como sobrenadante de cultivo celular (con suero fetal bovino) dializado contra Tris/HCl de 0,05 mol/L (pH 7,2) y con azida de sodio de 0,015 mol/L asociando una proteína estabilizante. El patrón de tinción celular corresponde con un patrón nuclear.

Se considera valor positivo en el caso que la sobreexpresión supere el 5% de las células en campo de gran aumento, y negativo cuando no se alcanza este porcentaje de sobreexpresión.

- **P63**

Para el diagnóstico in vitro, se ha utilizado de nuevo otro anticuerpo monoclonal de ratón (Mouse Anti-Human p63 Protein) que reacciona contra la proteína p63, que regula la proliferación de células epiteliales basales. Como ya se comentó con anterioridad, el anticuerpo anti-p63 puede resultar de utilidad para diferenciar el carcinoma localizado de mama del carcinoma de mama, pero también el carcinoma escamoso del adenocarcinoma de pulmón y para diferenciar el carcinoma escamoso de cuello uterino del adenocarcinoma de cuello uterino y lesiones benignas y malignas en células de tejido prostático. La interpretación clínica de cualquier tinción, o su ausencia, debe complementarse con estudios morfológicos y mediante uso de controles adecuados.

El reactivo comercializado se presenta en forma líquida como sobrenadante de cultivo celular (con suero fetal de ternero), dializado contra 0,05 mol/l de Tris/HCl, pH 7,2 y con 0,015 mol/l de azida sódica. El patrón de tinción celular es nuclear, aunque se ha documentado tinción citoplasmática en tejido anómalo.

Se considera valor positivo en el caso que la sobreexpresión supere el 5% de las células en campo de gran aumento, y negativo cuando no se alcanza este porcentaje de sobreexpresión.

- **Ki-67**

Para uso en diagnóstico se utilizó anticuerpo monoclonal derivado de ratón: FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen, Clon MIB-1 (Dako®), para su valoración inmunohistoquímica. Este anticuerpo es eficaz para detectar el antígeno Ki-67 en células normales y neoplásicas, entre otros en el carcinoma de mama, La identificación diferencial se complementa con los resultados de un panel de anticuerpos. Las células marcadas por el anticuerpo muestran un patrón de tinción nuclear, con la excepción de las células mitóticas, en las que se marcan los cromosomas y el citoplasma.

Se presenta listo para usar suministrado en forma líquida en un tampón que contiene proteína estabilizadora y 0,015 mol/l de azida sódica. El anticuerpo MIB-1 marca las bandas de 345 y 395 kDa, idénticas a las marcadas por el anticuerpo Ki-67 original. Tanto MIB-1, como el anticuerpo Ki-67 original, reacciona con un epítipo codificado por un elemento repetitivo de 66 bp del gen Ki-67. En inmunohistoquímica, los anticuerpos MIB-1 y Ki-67 producen patrones de tinción idénticos en cortes en serie amigdalinos congelados El anticuerpo MIB-1 reconoce el antígeno Ki-67 y los fragmentos recombinantes de la molécula Ki67.

El patrón de tinción obtenido con esta determinación es nuclear. Se considera valor positivo en el caso que la sobreexpresión supere el 5% de las células en campo de gran aumento, y negativo cuando no se alcanza este porcentaje de sobreexpresión.

Se considera valor positivo en el caso que la sobreexpresión supere el 5% de las células en campo de gran aumento, y negativo cuando no se alcanza este porcentaje de sobreexpresión.

- **PCNA**

Para su determinación se usó de nuevo un anticuerpo comercial monoclonal Monoclonal Mouse Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), Clone PC10, (Dako).

El anticuerpo marca a las células humanas que expresan el PCNA y puede ser una herramienta útil para la identificación de células proliferativas en tejidos normales y en algunas formas de neoplasia. La identificación diferencial es facilitada por los resultados de un panel de anticuerpos. La interpretación de los resultados debe realizarla un patólogo cualificado teniendo en cuenta el historial clínico del paciente y otras pruebas diagnósticas.

Es suministrado en forma líquida como sobrenadante de cultivo celular dializado en Tris/HCl 0,05 mol/L, pH 7,2 y con un contenido en NaN₃ de 15 mmol/L. Para valorar los resultados de la técnica se ha tenido en cuenta que las células marcadas por el anticuerpo muestran una tinción casi completamente limitada al núcleo, siguiendo un patrón difuso o granular, o una mezcla de ambos y que escasas ocasiones se observa una tinción citoplasmática, sólo en casos donde la membrana nuclear haya desaparecido.

Se considera valor positivo en el caso que la sobreexpresión supere el 5% de las células en campo de gran aumento, y negativo cuando no se alcanza este porcentaje de sobreexpresión.

- **C-erbB-2/neu.**

En este caso se ha utilizado para su cuantificación un anticuerpo policlonal purificado de conejo : Polyclonal Rabbit Anti-Human c-erbB-2 Oncoprotein, éste identifica las células epiteliales normales que, generalmente, expresan la proteína c-erbB-2 a un nivel muy bajo. En los casos en los que existe sobreexpresión dicha oncoproteína c-erbB-2, como ocurre en una variedad de neoplasias epiteliales, y entre ellos nuestro objeto de estudio: el carcinoma mamario.

Se presenta como purificado mediante péptido de oncoproteína c-erbB-2 inmovilizado y suministrado en estado líquido en Tris/HCl 0,05 mol/L, NaCl 0,1 mol/L, NaN₃ 15 mmol/L. Las células marcadas específicamente por el anticuerpo presentan un patrón de tinción limitado a la membrana celular. Es inusual observar una tinción

citoplasmática y si aparece no debe tomarse en consideración, sólo la del producto tinción de la membrana celular debe considerarse específica de la oncoproteína c-erbB-2. En tejidos sanos: la oncoproteína es un componente del tejido normal y el anticuerpo puede marcar débilmente a las células epiteliales en éstos, en algunos casos de tejido mamario epitelial estudiado este biomarcador mostró sobreexpresión de la oncoproteína c-erbB-2 (tinción completa de la membrana - entre leve y fuerte - en más del 10% de las células tumorales) al probarse con el anticuerpo.

Se considera valor positivo en el caso que la sobreexpresión supere el 5% de las células en campo de gran aumento, y negativo cuando no se alcanza este porcentaje de sobreexpresión.

- **Proteína Rb**

Proteína que se aisló por su implicación en retinoblastoma, de ahí su nombre. Se trata de una fosfoproteína nuclear implicada activamente en la regulación del ciclo celular. En su estado activo (hipofosforilada) ejerce el papel de freno al progreso de la célula desde la fase G1 a la fase S en el ciclo celular. Esta acción está condicionada a la presencia intracelular de factores de transcripción E2F, con los que forma un complejo pRb-E2F que se une al DNA de la célula e inhiben activamente la transcripción de los genes de la fase S. Para su detección se ha utilizado un anticuerpo monoclonal IgG purificado de ratón (abcam®), que reacciona con los amino ácidos 1582-1692 de la fracción recombinante de la proteína ligada al retinoblastoma.

Se comercializa de forma líquida, mantenido a 4°C y para técnicas de detección inmunohistoquímicas se usa a una concentración de 3µg/ml.

El patrón de tinción que se obtiene es nuclear.

Se considera valor positivo en el caso que la sobreexpresión supere el 5% de las células en campo de gran aumento, y negativo cuando no se alcanza este porcentaje de sobreexpresión.

- **Proteína BCL2**

Para uso diagnóstico se ha utilizado otro anticuerpo monoclonal purificado murino: Anti-Human BCL2 Oncoprotein, Clon 124 (Dako®). El anticuerpo marca células que expresan la oncoproteína BCL2. Presenta especial protagonismo en procesos linfoproliferativos, aunque puede tener jugar un papel importante en la oncogénesis de tumores de mama. La interpretación clínica de los resultados de cualquier tinción, o su ausencia, debe complementarse con estudios morfológicos con controles adecuados.

Como los anteriores se comercializa en forma líquida como sobrenadante de cultivo celular dializado en Tris/HCl a 0,05 mol/L, pH 7,2 y con NaN₃ a 15 mmol/L. Las células marcadas por el anticuerpo muestran un patrón de tinción citoplasmático.

Se considera valor positivo en el caso que la sobreexpresión supere el 5% de las células en campo de gran aumento, y negativo cuando no se alcanza este porcentaje de sobreexpresión.

- **PTEN**

Mediante este anticuerpo monoclonal: Anti-Human PTEN Clon 6H2.1, depurado de ratón, se consigue identificar cualitativamente por microscopía óptica las células que expresan PTEN en tejidos normales y neoplásicos, utilizando métodos de pruebas inmunohistoquímicas (IHQ). La identificación diferencial se complementa con los resultados de una serie de anticuerpos.

Anti-PTEN se suministra en forma líquida como sobrenadante de cultivo de tejido (conteniendo suero fetal bovino) dializado contra 0,05 mol/L de tris-HCl, pH 7,2 y 0,015 mol/L de azida de sodio junto con proteínas estabilizadoras.

Muestra en las determinaciones un patrón de tinción celular citoplasmático y/o nuclear.

Se considera valor positivo en el caso que la sobreexpresión supere el 5% de las células en campo de gran aumento, y negativo cuando no se alcanza este porcentaje de sobreexpresión.

- **EGFR (factor de crecimiento epidérmico)**

Se utilizó para su diagnóstico, el anticuerpo monoclonal purificado de ratón : Anti-Human Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), Clon E30 (Dako®).

El anticuerpo marca subtipos de carcinomas humanos que expresan altos niveles de EGFR. La sobreexpresión de EGFR se ha relacionado con la progresión del cáncer, identifica cualitativamente por microscopía óptica las células positivas de receptor del factor de crecimiento epidérmico en tejidos normales y neoplásicos. La identificación diferencial es facilitada por los resultados de un panel de anticuerpos. Las células marcadas por el anticuerpo presentan principalmente tinción de la membrana celular. En tejidos sanos donde se objetiva, el anticuerpo tiñe intensamente las membranas de las células epiteliales. La intensidad del marcado disminuye progresivamente de la capa basal a la capa de células más superficial. En otros tejidos neoplásicos, se observa una expresión creciente del EGFR a medida que aumentaba el grado tumoral (por ejemplo ocurre en el carcinoma escamoso).

Se comercializa es suministrado en forma líquida como IgG purificada procedente de líquido ascítico, en Tris/HCL 0,05 mol/L, Na₃N 15 mmol/L, seroalbúmina bovina al 1%, pH 7,2.

Se considera valor positivo en el caso que la sobreexpresión supere el 5% de las células en campo de gran aumento, y negativo cuando no se alcanza este porcentaje de sobreexpresión.

- **Proteína Ps-2**

Para su análisis en nuestro estudio se ha utilizado el anticuerpo comercial policlonal antiestrogénico, denominado anti-estrogen inducible Protein pS-2 antibody (abcam®), purificado de proteínas de conejo. Péptido sintético que se complementa con la secuencia de los 20 aminoácidos finales de la misma proteína humana. El patrón de tinción que se obtiene es citoplasmático.

Se considera valor positivo en el caso que la sobreexpresión supere el 5% de las células en campo de gran aumento, y negativo cuando no se alcanza este porcentaje de sobreexpresión.

- **BRCA-1**

Para determinarlo se ha utilizado el kit de diagnóstico abcam que incluye el anticuerpo monoclonal derivado de ratón: Anti-BRCA1 antibody [MS110], que reacciona contra la fracción amino-terminal del amino ácido 304 de BRCA1, se diagnostica mediante técnica inmunohistoquímica con un contaje semicuantitativo. El patrón de tinción puede ser nuclear o citoplasmático en función de donde actúe el complejo BRCA para reparar daños en la cadena de ADN. Se conoce que la isoforma 3 de BRCA está poco expresada en células tumorales en el carcinoma mamario y ovárico.

Se considera valor positivo en el caso que la sobreexpresión supere el 5% de las células en campo de gran aumento, y negativo cuando no se alcanza este porcentaje de sobreexpresión.

- **Catepsina D**

Para la identificación en tejido mamario de la proteína lisosomal glicosilada, con función proteasa se ha utilizado el Kit comercial de Abcam[®], que incluye un anticuerpo policlonal purificado de conejo (IgG). Mediante técnicas inmunohistoquímicas se detectan estas proteínas con un patrón de tinción citoplasmática (lisosomal) y extracelular.

El anticuerpo es comercializado diluido a 4°C, en solución de preservación con acida sódica al 0.1% En células neoplásicas y degenerativas traduce muerte celular al estar implicada en fenómenos de apoptosis en ausencia de reparación celular.

Se considera valor positivo en el caso que la sobreexpresión supere el 5% de las células en campo de gran aumento, y negativo cuando no se alcanza este porcentaje de sobreexpresión.

4.3.4 AGRUPACIÓN DE VARIABLES INMUNOHISTOQUÍMICAS

Se seleccionaron cinco grupos de variables, en estos se ha considerado valor positivo en este grupo de variables la sobreexpresión de los tres marcadores en su conjunto, mientras que la presencia de algún marcador negativo se señala como valor nulo.

- **Moléculas relacionadas con la respuesta hormonal:** En esta variable se agrupan los marcadores inmunohistoquímicos: Receptor estrogénico, Receptor de progesterona y Ps-2, todos ellos relacionados con la hormonosensibilidad de la célula tumoral.
- **Moléculas relacionadas con el proceso de proliferación celular:** en las que se incluyen dos variables, el marcador de proliferación tumoral por excelencia

Ki67 y otra molécula con menos protagonismo, también íntimamente relacionada con la proliferación tumoral PCNA^{55,57}.

- **Variables inmunohistoquímicas relacionadas con la apoptosis:** Se trata de las variables P-53 y Bcl-2, sobreexpresadas a nivel celular favorecen el proceso de muerte celular programada en células que acumulan daños en el material genético. De modo que déficits de las mismas aboca a la célula a una proliferación descontrolada en ausencia de otros mecanismos de freno.
- **Variables inmunohistoquímicas implicadas con la expresión de oncogenes:** P-Rb, P53 y P21^{59,60}.
- **Variables inmunohistoquímicas implicadas con la sobreexpresión de genes supresores:** entre las que se seleccionan P-Rb y PTEN^{60,61}.
- **Variables relacionadas con la expresión de moléculas de adhesión celular:** como son la Cathepsina D y e-Cadherina, cuyo déficit de expresión favorece el proceso de infiltración tumoral en el caso de CLI, tras la pérdida de cohesividad celular en la que éstas moléculas están implicadas.

Los grupos de variables inmunohistoquímicas descritos se resumen en la tabla 4.

4.METODOLOGÍA ESTADÍSTICA DEL ESTUDIO

Se realiza un estudio descriptivo en el que las variables numéricas se resumieron como media, desviación típica y rango, las variables cualitativas con frecuencias y porcentajes.

Esto se elabora tanto para la población general como por grupo de estudio.(Variedad del tumor)

Para los contrastes de hipótesis, tras estudiar la normalidad en la distribución de las variables continuas mediante el test de *Kolmogorov-Smirnoff* se utiliza la *T-Student* y ANOVA en caso de normalidad y test no paramétricos en caso contrario (*U-Mann-Whitney, Kruskall-Wallis*).

Para las variables cualitativas se aplica el test de la Chi-Cuadrado con la corrección de Yates en caso de ser necesario y un estudio de residuos tipificados para analizar la dirección de las asociaciones.

Todos los resultados se considerarán significativos para un nivel $\alpha < 0.05$.

El estudio fue realizado con el programa SPSS v.19.0 .

En el estudio de agrupación de variables inmunohistoquímicas se consideró positiva la sobreexpresión de todos los marcadores en cada uno de los grupos inmunohistoquímicos, en sentido opuesto se consideró no positiva en los casos en los que presentasen algún biomarcador no sobreexpresado.

Se realizó un análisis comparativo entre las variantes histológicas de CLI: clásica, pleomorfica e intermedia para estos grupos de variables consideradas mediante análisis de tablas de contingencia y test de la Chi- Cuadrado (con $p < 0.05$).

RESULTADOS

RESULTADOS

5.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA POBLACIÓN

Se registraron para el estudio un total de 73 pacientes durante el periodo comprendido entre mayo de 2007 y noviembre de 2014.

Se excluyeron del estudio tres mujeres, con diagnóstico inicial de CLI, tras identificar en el estudio anatomopatológico definitivo que el tipo histológico correspondía a carcinoma ductal.

Se incluyeron 6 pacientes en las que, tras la valoración, se desestimó cirugía por distintos motivos, que presentaban biopsias previas de carcinoma lobulillar y continuaron seguimiento en la unidad. Entre éstas una paciente de 88 años, cuyo tratamiento quirúrgico se desestimó por decisión familiar y recibió exclusivamente tratamiento con bloqueo hormonal. La cirugía se desestimó por indicaciones médicas en otras dos pacientes con edad de 86 años. El resto correspondió a pacientes en estadio avanzado (estadios IIIb ,IV), metastásico y en 2 de ellas bilateral. A todas ellas a las que se les administró tratamiento paliativo con quimioterapia y hormonoterapia u hormonoterapia en exclusiva, en pacientes hormonosensibles y con comorbilidad asociada a la edad.

5.2 ANALISIS DE LAS VARIABLES ESTUDIADAS

5.2.1 ESTUDIO DESCRIPTIVO DE VARIABLES CLÍNICOEPIDEMIOLÓGICAS

La edad registrada de las pacientes del estudio oscila entre 36 y 86 años, con una media de edad de 57 años, y una desviación típica de 13.7. La mediana de la edad se establece en 52 años. La distribución por edades de la población estudiada se representa en la siguiente gráfico (figura3).

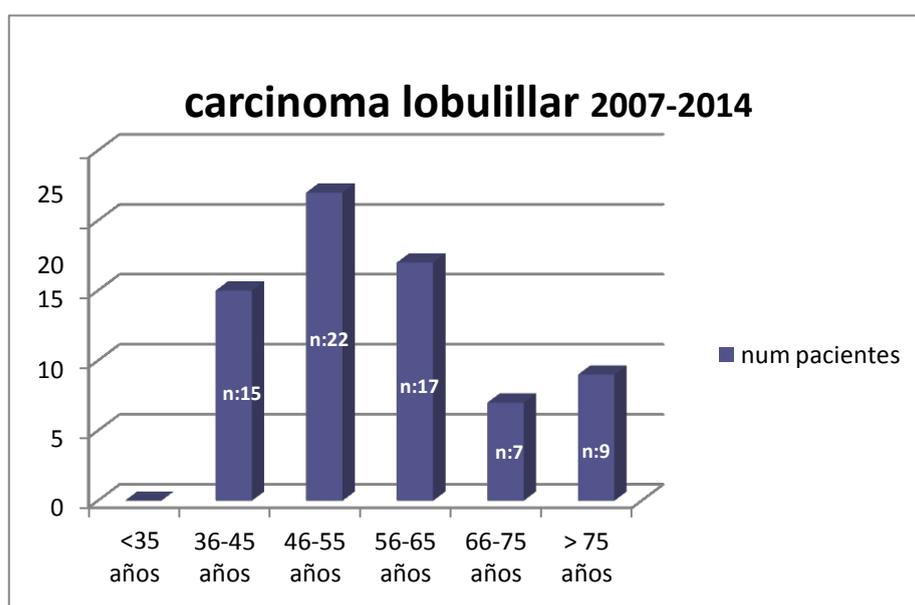


Figura 3. Distribución de la población por edad al diagnóstico

Los resultados del estudio respecto a las variables clínicoepidemiológicas se recogen en la siguiente tabla. (tabla 5)

VARIABLES CLINICO- EPIDEMIOLOGICAS	n	%
EDAD _(años)	70	57+/-13.7 años
MENOPAUSIA		
SI	38	59.4
NO	26	40.6
AF		
SI	19	29.2
NO	46	70.8
AP		
SI	12	17.4
NO	57	82.6
TIPO DE LESIÓN		
NODULO	49	71
DX CASUAL	4	5.8
RETRACCIÓN- MASA	16	23.2
TAMAÑO mm		
<10mm	4	6.2

10-20mm	21	32.3
20-50mm	29	44.6
>50mm	11	16.9

LATERALIDAD

DCHA	27	42.9
IZQDA	34	54.0
BILAT	2	3.2

CUADRANTES

SUP-EXT	46	65.2
INF-INT	11	45.9
CENTRAL-DIF	13	23.2

TECNICA QUIRÚRGICA

INOP	7	10.8
CC-BSGC	20	30.8
CC-LA	6	9.2
MRMR-BSGC	10	15.4
MRM-LA	20	30.8

	MRMRbilat- LAbilat	2	3.1
REINTERVENCION QUIRÚRGICA			
	SI	11	16.9
	NO	49	75.4

Tabla 5 .Variables clinicoepidemiológicas

Los antecedentes que se recopilaron fueron tanto médicos como quirúrgicos, aunque dada la diversidad de los mismos, el estudio se enfocó: la existencia de patología mamaria previa: benigna o maligna y cirugía mamaria o ginecológica previa. Se documentaron 7 pacientes (10%) con antecedentes quirúrgicos ginecológicos previos; 4 pacientes con patología mamaria benigna (5,7%) intervenida, 2 mujeres intervenidas de fibroadenoma mamario, 1 paciente intervenida de ectopia mamaria y otra con mamoplastia de reducción. Entre la patología maligna registrada (4,2%) se registró una paciente con carcinoma lobulillar de mama previo, otra paciente con carcinoma ductal de mama previo y finalmente una mujer intervenida de cáncer ovárico. El resto de pacientes no registraban antecedentes de esta índole. En resumen podemos decir que los antecedentes familiares de cáncer asociado a estímulo estrogénico se presentaron en 29.2% de la población. El 70.8% de las mujeres no presentaban o no podían precisar esta condición familiar.

En lo referente al estatus hormonal al diagnóstico se registró una tasa de pacientes menopáusicas afectas de CLI de mama del 59.4%, mientras que el resto 40.6% se trató de pacientes en edad fértil.

El tipo de lesión más que más frecuentemente se presentó como síntoma de inicio fue el nódulo palpable que aparece en 71.4% de los casos, que correspondieron a 50 pacientes. Solo en 4 casos, 5.7%, la enfermedad se presentó de forma silente, como hallazgo casual mamográfico.

El tamaño tumoral osciló entre 20 y 50 mm con una tasa global de 44.6%, con una distribución casi simétrica en los subtipos de CLI.

En las formas clásicas y pleomórficas no existe prevalencia de presentación en ninguna localización, mostrando unas tasas similares, aunque ambos discretamente superiores para el lado izquierdo (55,6% frente a 46,2%). Las diferencias de presentación entre el lado derecho e izquierdo son algo mayores en el tipo intermedio, a favor del lado izquierdo, con una tasa del 60%.

Sin embargo, existe un evidente predominio de la localización en cuadrantes súpero-externos con 46 casos (65,7%), mientras que los cuadrantes ínfero-internos solo se detectó en un 15.9% (11 pacientes). La situación retroareolar-difusa fue discretamente superior a la anterior con 13 casos (18.8%).

En lo que se refiere a la técnica quirúrgica, íntimamente asociada al tamaño tumoral y a la afectación ganglionar, se detectan idénticas tasas de las técnicas más conservadoras (CC-BSGC) y las más radicales (MRM-LA). La cirugía conservadora en pleomórficos se redujo al 15.4%, no se registra en estos casos necesidad de linfadenectomía inicialmente, aunque la anatomía patológica definitiva informó en 1 caso de la presencia de afectación ganglionar a posteriori y fue necesaria una linfadenectomía en un segundo tiempo. El otro caso precisó también de una segunda resección debido a que en el diagnóstico anatomopatológico definitivo del espécimen quirúrgico se detectó un extenso componente intraductal, que hacía muy posible la presencia de focos residuales.

La necesidad de una reintervención quirúrgica se registró en 16 casos; 11 pacientes precisaron linfadenectomía tras corroborar afectación metastásica de GC. En 5 pacientes se precisó reintervención mamaria. La mayoría de casos correspondieron a la variedad clásica

5.2.2 ESTUDIO DESCRIPTIVO DE VARIABLES HISTOPATOLÓGICAS

Los resultados obtenidos de las variables histopatológicas se muestran en la siguiente tabla.

VARIABLES	n	%
HISTOPATOLÓGICAS		
TIPO HISTOLÓGICO		
Clásico	50	71.42
Pleomórfico	14	20
Intermedio	6	8.57
MFQ		
SI	18	28.1
NO	46	71.9
PLV		
SI	23	58.2
NO	32	41.8
CLIS		
SI	31	54.4
NO	26	45.6
HLA		
SI	8	15.1
NO	45	84.9
COMP DUCTAL		
SI	13	23.6
NO	42	76.4
MC/MF		
SI	19	27.5
NO	50	72.5
TAMAÑO AP		
<10mm	4	6.2
10-20mm	21	32.3

	20-50mm	29	44.6
	>50mm	11	16.9
AFECTACIÓN GANGLIONAR			
	SI	30	48.4
	NO	32	51.6
NUM GANGLIOS AFECTOS			
	0	32	51.6
	1	6	9.7
	2	9	14.5
	>2	15	24.2
ESTADIO TMN			
	I	22	33.8
	II	32	49.2
	III	8	12.3
	IV	3	4.6

Tabla 6. Variables histopatológicas

El tamaño tumoral registrado tras la medición histopatológica fue de 20 a 50 mm, presentando una similar distribución al que se describe en los datos hallados en las variables clínicoepidemiológicas, siendo similar tanto en los tipos de CLI, clásico como en los tipos pleomórficos. La distribución por tamaños se muestran en la siguiente figura.

La afectación ganglionar alcanzó casi a la mitad de las pacientes del estudio. Los datos de este parámetro se muestran en el gráfico (figura5).

Respecto a los hallazgos histopatológicos asociados a los tipos de CLI, destaca la presencia de componente *in situ* concomitante en un elevado porcentaje,

principalmente en la variedad clásica en la que alcanza el 54.4% (24 pacientes). El resto de lesiones histológicas asociadas se presentaron con valores inferiores, le siguen la presencia de permeación linfovascular que se detectó en 41.8%, la presencia de mastopatía fibroquística (28.1%), los hallazgos de HLA (15.1%) y el componente intraductal asociado (23.6%).

El estadio tumoral según la clasificación TMN, que predominó fue el estadio II, principalmente a expensas de la variedad clásica, mientras que la variedad pleomorfa mostró una prevalencia por un estadios más avanzado (III y IV). La distribución de la población por estadio tumoral TMN se muestra en la figura (figura 7).

5.2.3 ESTUDIO DESCRIPTIVO DE VARIABLES INMUNOHISTOQUÍMICAS

Los resultados obtenidos de las variables inmunohistoquímicas incluidas en el estudio se muestran en la tabla 6

VARIABLE IHQ		N	%
RE	Positivo	66	95.7
	Negativo	3	4.3
RP	Positivo	54	78.3
	Negativo	15	21.7
HERB2	Positivo	4	5.8
	Negativo	65	94.2
Ki67	Positivo	44	64.7
	Negativo	24	35.3
PTEN	Positivo	13	20.6
	Negativo	50	79.4
P53	Positivo	17	25.4
	Negativo	50	74.6
P63	Positivo	6	10.9
	Negativo	49	89.1
Prb	Positivo	54	85.7
	Negativo	9	14.3

P21			
	Positivo	12	18.8
	Negativo	52	81.3
BCRA			
	Positivo	43	67.2
	Negativo	21	32.8
EGRF			
	Positivo	3	5.2
	Negativo	55	94.8
PCNA			
	Positivo	54	96.4
	Negativo	2	3.6
	Positivo	38	60.3
	negativo	25	39.7
Bcl-2			
	Positivo	44	93.6
	Negativo	3	6.4
CATEPSINA D			
	Positivo	10	16.4
	Negativo	51	83.6
E-CADHERINA			
	Positivo	11	17.7
	Negativo	51	82.3

Tabla 6 . Variables inmunohistoquímicas

Los resultados de inmunohistoquímica permitió establecer la clasificación de los subtipos intrínsecos. La distribución según los datos obtenidos se muestran en la siguiente figura .(figura 4)

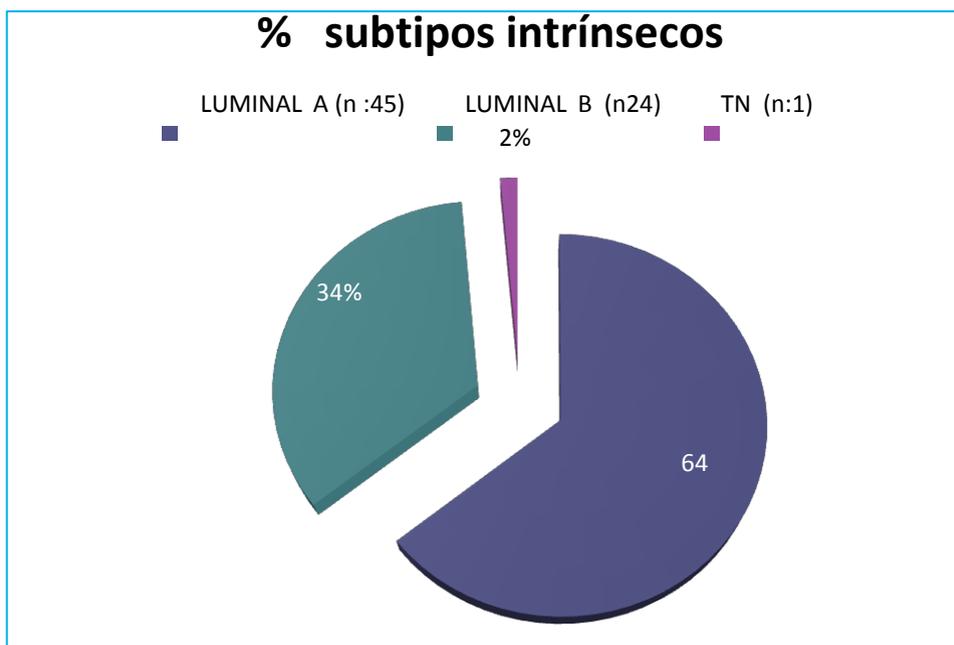


Figura 4a. Distribución de la población por subtipos intrínsecos

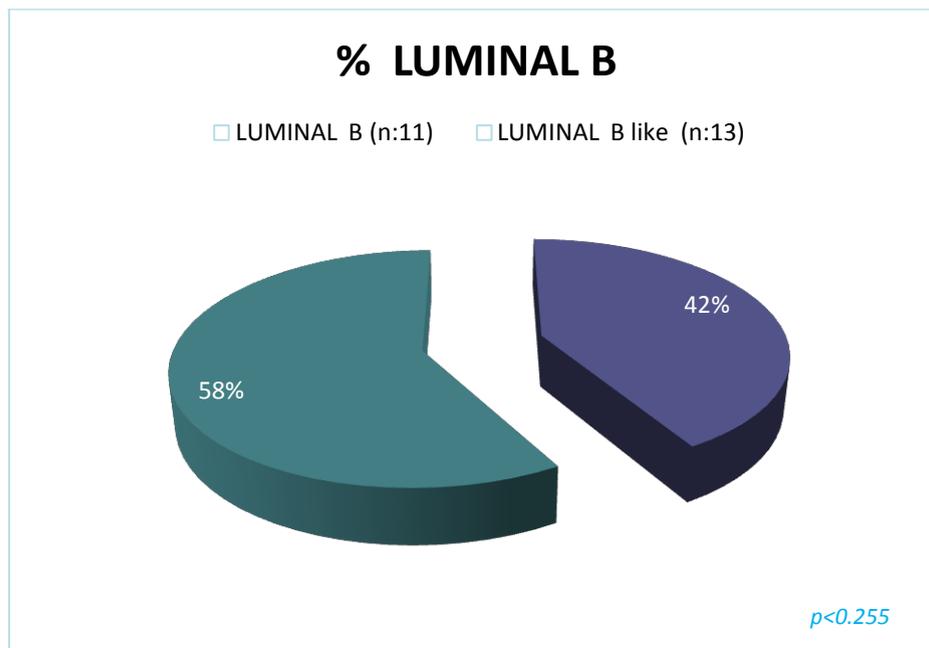


Figura 4b . Distribución de la población según subtipos luminales

Obtenidos los parámetros inmunohistoquímicos hormonales, erb-b2 y el índice de proliferación Ki 67, se clasificaron a las pacientes atendiendo a los subtipos intrínsecos establecidos por la comunidad científica y corroborados en el último consenso de St Gallen¹⁸. Prácticamente la totalidad de las pacientes excepto una, se presentaron como subtipos luminales. Predominó el subtipo luminal A con 45 casos, mientras que 24 casos fueron luminales B. Sin embargo de éstos destaca que 13 de éstos correspondieron al subtipo “B like”. La paciente no Luminal resultó un subtipo triple negativo.

En cuanto a los datos obtenidos del estudio inmunohistoquímico se objetivó un alto índice de sobreexpresión de receptores hormonales. El receptor estrogénico

únicamente no se detectó en 1 caso, y el receptor de progesterona, aunque con valores más bajos, generalmente fue negativo (con valores inferiores al 5%) en 15 pacientes. Una paciente que no expresó receptores hormonales ni de estrógenos ni de progesterona.

En cuanto a las tasas de HER 2 se obtuvo una sobreexpresión del 20%, del total de la población que correspondieron a 14 casos; con mayor representatividad en la variedad pleomorfica .En el caso de CLI clásico se reduce a discretamente a más de la mitad (14.3%)

Ki 67 tuvo una tasa de sobreexpresión del 64.7%, que correspondió a 44 mujeres del estudio, con una distribución uniforme en los tres subtipos, aunque en este marcador se suele presentar sobreexpresado en condiciones de replicación celular fisiológica.

En relación al resto de variables inmunohistoquímicas estudiadas: PTEN, P53, P63, EGRF, P 21, e cadherina y Catepsina D se evidenciaron tasas muy discretas de sobreexpresión molecular, no superan el 25%. En el lado opuesto se encontraron muy elevadas tasas de sobreexpresión Prb, PCNA y Bcl-2 que superaban el 85%. La proteína Ps-2 y BCRA mostraron positividad aunque entre el 60 y 70% de las pacientes.

5.2.4 ESTUDIO DESCRIPTIVO DE AGRUPACIÓN DE VARIABLES INMUMOHISTOQUÍMICAS

AGRUPACIÓN DE VARIABLES IHQ	n	%
V. ASOCIADAS A		

R HORMONAL			
	positivo	31	47.7
	Negativo	34	52.3
V. ASOCIADAS A APOPTOSIS			
	Positivo	11	17.5
	Negativo	52	82.5
V. ASOCIADAS A PROLIFERACIÓN CELULAR			
	Positivo	34	54.83
	Negativo	27	43.54
V. RELACIONADAS ONCOGENES			
	Positivo	13	19.7
	Negativo	53	80.3
V. RELACIONADAS GENES SUPRESORES			
	Positivo	12	18.2
	Negativo	54	81.8
V. RELACIONADAS ADHESION CLR			
	Positivo	2	3.3
	Negativo	58	96.7

Tabla 7 Agrupación de variables IHQ de función celular.

En cuanto a los grupos de marcadores asociados a función celular, predominaron valores negativos en los datos del grupo de las variables asociadas a

apoptosis, y las relacionadas con oncogenes y genes supresores . Algo superior y concordante con el comportamiento biológico de los CLI, es la alta tasa de negatividad para el grupo de proteínas de adhesión celular, que mostraron conjuntamente una tasa de negatividad del 96.7%. Los grupos de sobreexpresión de proteínas vinculadas con la respuesta hormonal y la proliferación celular obtuvieron valores de sobreexpresión superiores (47.7% y 54.8% respectivamente).

5.3 ANALISIS COMPARATIVO DE LAS VARIABLES

5.3.1 ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS VARIABLES CLÍNICOEPIDEMIOLÓGICAS

El resultado del estudio respecta a las variables clínico-epidemiológicas se muestra en la siguiente tabla

VARIABLES CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS	CLÁSICO (n:50)	PLEOMÓRFICO (n:14)	INTERMEDIO (n:6)	P
EDAD_(años)	56.28 +/-13.08	63.77+/- 14.99	45.33+/-3.89	<i>P<0.019</i>
MENOPAUSIA				<i>P<0.007</i>
SI	26 (56.5%)	11 (91.7%)	1 (16.7%)	
NO	20 (43.5%)	1 (8.3%)	5 (83.3%)	
AF				<i>P<0.008</i>

	SI	10 (21.7%)	4 (30.8%)	5 (83.3%)
	NO	36 (78.3%)	9 (69.2%)	1 (16.7%)
AP				<i>P<0.347</i>
	SI	9 (18.4%)	1 (7.1%)	2 (33.3%)
	NO	40 (81.6%)	13 (92.9%)	4 (66.7%)
TIPO DE LESIÓN				<i>P<0.514</i>
	NODULO	37 (75.5%)	8 (57.1%)	4 (66.7%)
	CASUAL/Mx	2(4.1%)	1 (7.1%)	1 (16.7%)
	RETRACCIÓN	10 (20.4%)	5 (35.7%)	1 (16.7%)
TAMAÑO mm				<i>P< 0.078</i>
	<10mm	3 (6.5%)	0 (0%)	1 (16.7%)
	10-20mm	17 (37%)	3 (23.1%)	1 (16.7%)
	20-50mm	22 (47.8%)	6 (46.2%)	1 (16.7%)
	>50mm	4 (8.7%)	4 (30.8%)	3 (50%)
LATERALIDAD				<i>P<0.092</i>
	D	20 (44.4%)	5 (38.5%)	2 (40.0%)
	I	25 (55.6%)	6 (46.2%)	3 (60.0%)

bilateral	0 (0%)	2 (15.4%)	0 (0%)
CUADRANTES	<i>P<0,250</i>		
SUP-EXT	34 (65.4%)	8 (57.1%)	3 (50.0%)
INF-INT	8 (16.3%)	3 (21.4%)	0 (0%)
CENTRAL	7 (14.7%)	3 (21.4%)	3 (50%)
TECNICA QUIRÚRGICA	<i>P<0.056</i>		
IRRES	4 (8.7%)	3 (23.1%)	0 (0%)
CC+BSGC	17 (37.0%)	2 (15.4%)	1 (16.7%)
CC+LA	6 (13.0%)	0 (0%)	0 (0%)
MRM+BSGC	7 (15.2%)	0 (0%)	3 (50.0%)
MRM+LA	11 (23.9%)	7 (53.8%)	2 (33.3%)
MRM+LA bil	1 (2.2%)	1 (7.7%)	0 (0%)
REINTERVENCION QUIRÚRGICA	<i>P<0.215</i>		
NO	35 (76.1%)	11 (84.6%)	3 (50.0%)
GC+/LA	7 (15.2%)	1 (7.7%)	3 (50.0%)
RESECC MAMA	4 (8.7%)	1 (7.7%)	0 (0%)

Tabla 8. Variables clinicoepidemiológicas

Los antecedentes familiares se documentaron en función de que se tratase de familiares de primer grado o de segundo grado, aunque en el estudio se consideraron de forma global. Se registran un total de 20 pacientes (28,6%) de pacientes con antecedentes familiares, de las cuales en 10 de ellas (14,3%)se trataba de familiares de primer grado y en otras 10 pacientes (14,3%) los familiares pertenecían a un segundo o tercer grado familiar.

En el análisis estadístico demostró una relación estadísticamente significativa en comparación de los tres grupos (clásico, pleomórfico e intermedio). Mostrando una asociación familiar en las pacientes diagnosticadas de CLI tipo intermedio (presente en el 83.3% de las mismas, que correspondieron a 6 pacientes). Por el contrario, en las mujeres que presentaron la variedad clásica, presentan tendencia a ser independientes respecto de esta variable, encontrando un 78,3% de las pacientes sin antecedentes previos. Los resultados obtenidos de esta variable alcanzaron significación estadística ($p < 0.008$).

La valoración del estado hormonal femenino en el momento del diagnóstico en la población a estudio objetivó, 30 pacientes en edad fértil (42,8%), entre estas 3 pacientes ya presentaban un estado perimenopáusico. Las 40 restantes paciente ya presentaban menopausia constatada con más de 1 año de ciclo amenorreico. En el estudio se encontró que el 91,7% de las pacientes que clasificadas con la variante pleomorfica ya presentaban un estado hormonal menopáusico. Se detecta así mismo una fuerte tendencia a la asociación con el estatus premenopáusico. El estudio alcanzó valores de significación estadística($p < 0.007$).

En el caso de la variedad clásica se encontró más independencia del estado hormonal y sin una tendencia de las pacientes a presentar uno u otro estado. En éstas predominó el estado menopáusico en el el 56.5% de las pacientes.

La presentación clínica más frecuentemente registrada como síntoma de diagnóstico fue nódulo o masa palpable con 49 casos (71.9%). Otras formas de presentación fueron induración y retracción localizada de la mama o del complejo areola-pezones, o diagnóstico casual o mamográfico. La segunda manifestación clínica en frecuencia con 16 casos (23.2%) fue la retracción mamaria. La asociación más evidente

se encontró entre la variante clásica de CLI y la presentación en forma de nódulo palpable, sin embargo no se obtuvo significación estadística suficiente y ninguna de estas formas de presentación se ha asociado claramente a algún tipo de carcinoma lobulillar.

En lo que concierne al tamaño de la lesión, el carcinoma lobulillar clásico mostró variedad clásica se ha detectado una tendencia a manifestarse con lesiones de tamaño inferior a 50mm, los datos muestran una tasa baja de tumores mayores de 50mm (8.7%), predominando tumores con tamaños que oscilan entre 10mm y 50mm. Por el contrario, en los pacientes que mostraron la variante intermedia parece existir una tendencia a presentar lesiones mayores de 50mm al diagnóstico, registrando una tasa del 50%, con tasas equitativamente similares en el resto de tamaños para CLI intermedio.

En el caso de las pacientes de nuestro estudio con lesiones pleomórficas, cabe señalar que no se registró ninguna lesión de tamaño inferior a 10mm (0%), pero esta tendencia, aunque patente, no es significativa ($p < 0.07$). La mayoría de los casos pleomórficos, presentaron un tamaño tumoral entre 20mm y 50 mm(46.2%). (figura7)

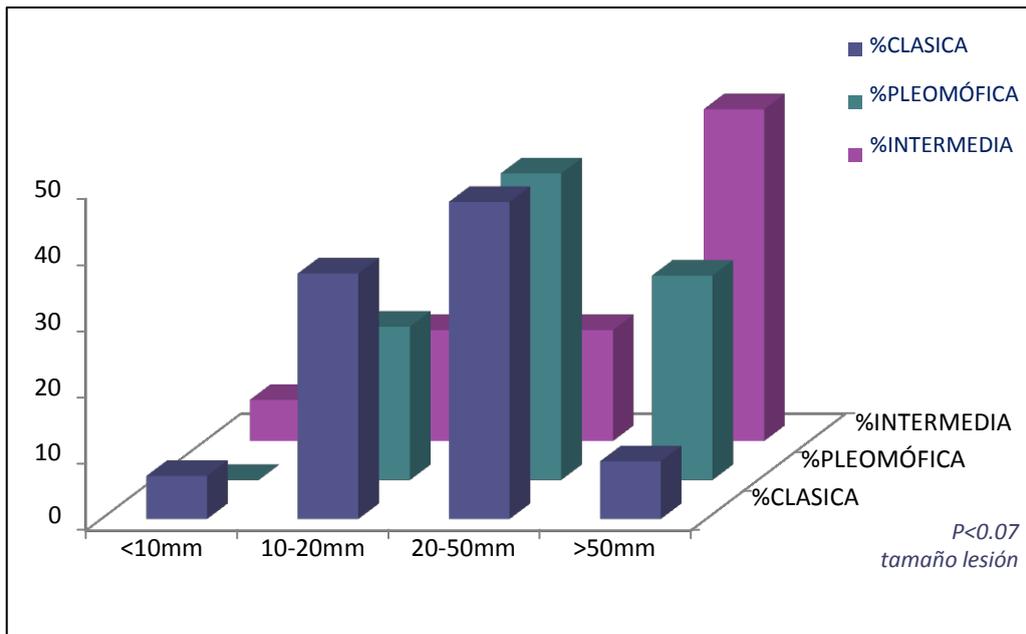


Figura5 .Distribución de la población por tamaños de lesión

La variable clínica de lateralidad, mostró una discreta tendencia a presentar formas bilaterales al diagnóstico en la variante pleomorfica (el 15.4%, que correspondieron a pacientes con tamaños tumorales que excedían de los 4 cm al diagnóstico). Respecto los tipos clásico e intermedio de CLI no parece tender a manifestar presentaciones clínicas bilaterales al diagnóstico, tampoco se observa preferencia por el lado derecho o izquierdo, en ningún caso. El análisis en esta variable no alcanzó una significación estadística de, con valor de $p < 0.09$.

En lo que respecta a la localización por cuadrantes la distribución dada la gran variabilidad de este dato se agrupó para tres localizaciones fundamentales: cuadrantes súpero-externos (incluyendo: LICS, CSE-cola mama, UCE, CIE) , cuadrantes ínfero-internos (LICI,CII,UCI y CSI) y la localización retroareolar o difusa. Entre los resultados destaca una tendencia a presentarse en localización retroareolar o difusa en las formas intermedias (50% de los casos), respecto a las formas clásica y pleomófica. En las formas clásicas se descubre una discreta tendencia a la presentación en cuadrantes supero-externos. El estudio no arroja datos sobre esta variable que nos

permita inferir en las formas pleomórficas. A pesar de los datos los resultados de esta variable no alcanzaron significación estadística.

En relación a las técnica quirúrgica, se ha identificado asociación de cirugía radical (MRM y LA) con la variedad pleomórfica en relación a la clásica (53,8%), y una tendencia mayor a la cirugía conservadora tanto a nivel mamario como axilar en la variante clásica. Destaca una tasa de pleomórficos inoperables del 23.1%. Esta asociación alcanzó significación estadística; $p < 0.05$.

Las reintervenciones por afectación metastásica ganglionar muestran una tendencia mayor hacia los casos de tipo intermedio. En el caso de reintervenciones mamarias, ya sea por de reexcisión de mama o completar una cirugía más radical fue discretamente más frecuente en mujeres que presentaron la variedad clásica, aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos.

5.3.2 ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS VARIABLES HISTOPATOLÓGICAS

Los datos obtenidos de las variables histopatológicas se presentan en la siguiente tabla 9 y en las figura 7 .

VARIABLES HISTOPATOLÓGICAS		CLÁSICO (n:50)	PLEOMÓRFICO (n:14)	INTERMEDIO (n:6)	P
MFQ	SI	15 (32.6%)	0 (0%)	3 (50%)	$p > 0.037$
	NO	31 (67.4%)	12 (100%)	3 (50%)	
PLV	SI	14 (36.8%)	7 (63.6%)	2 (33.3%)	$P < 0.257$
	NO	24 (63.2%)	4 (36.4%)	4 (66.7%)	
CLIS	SI	24 (58.5%)	5 (50%)	2 (33.3%)	$P < 0.488$
	NO	16 (41.5%)	5 (50%)	4 (66.7%)	

	NO	17 (41.5%)	5 (50%)	4 (66.7%)	
HLA					<i>P<0.331</i>
	SI	7 (18.9%)	0 (0%)	1 (16.7%)	
	NO	30 (81.1%)	10 (100%)	5 (83.3%)	
COMP DUCTAL					<i>P<0.095</i>
	SI	7 (17.9%)	5 (50%)	1 (16.7%)	
	NO	32 (82.1%)	5 (50%)	5 (83.3%)	
TAMAÑO AP					<i>P<0.076</i>
	<10mm	3 (6.5%)	0 (0%)	1 (16.7%)	
	10-20mm	17 (37.0%)	3 (23.1%)	1 (16.7%)	
	20-50mm	22 (47.8%)	6 (46.2%)	1 (16.7%)	
	>50mm	4 (8.7%)	4 (30.8%)	3 (50%)	
MF/MC					<i>P<0.935</i>
	SI	13 (26.5%)	4 (28.6%)	2 (33.3%)	
	NO	36 (73.5%)	10 (71.4%)	4 (66.7%)	
AFECTACIÓN GANGLIONAR					<i>P<0.082</i>
	SI	20 (43.5%)	8 (80.0%)	2 (33.3%)	
	NO	26 (56.5%)	2 (3.2%)	4 (66.7%)	
NUM GANGLIOS AFECTOS					<i>P<0.330</i>
	0	26 (57.8%)	2 (18.2%)	4 (66.7%)	
	1	4 (8.9%)	2 (18.2%)	0 (0%)	
	2	5 (11.1%)	3 (27.3%)	1 (16.7%)	
	>2	10 (22.2%)	4 (36.4%)	1 (16.7%)	

Tabla 9 .Distribución variables por subtipo CLI

La distribución por estadios de los tres subtipos de CLI se muestra en la siguiente figura (figura 6).

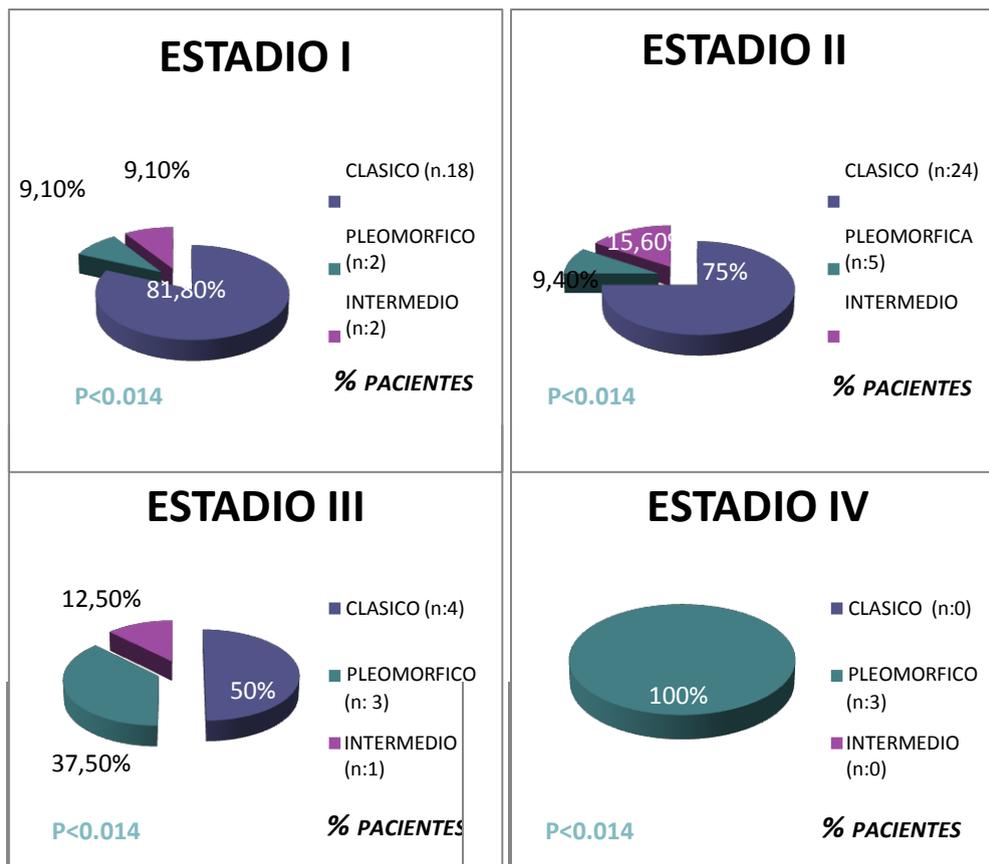


Figura 6. Distribución por estadios –subtipos CLI

Tras el estudio histopatológico de los especímenes quirúrgicos que permitió clasificarlas en los subtipos clásico, pleomórfico e intermedio. El análisis objetivó notoriamente la ausencia de mastopatía asociada a las formas pleomórficas de CLI, no presentándose en el 100% de los casos. La presencia de la misma se relaciona con la variedad clásica e intermedia de carcinoma lobulillar, con una tasa de presentación en este última del 50%. En general, dada la baja frecuencia de aparición, observamos que la presencia de MFQ en CLI no es un hallazgo habitual. Las determinaciones de esta variable mostraron significación estadística ($p < 0.03$)

El estudio de la presencia de infiltración linfovascular del estroma, la presencia de componente in situ, la existencia de HLA y la identificación de componente intraductal con ninguno de los subtipos de carcinoma lobulillar no mostró significación

estadística. Se observa una tendencia (en el 50% de los casos) a presentar mayor grado de infiltración linfovascular en tumores de estirpe pleomórfica, y elevada tasa de componente intraductal. Sin embargo, en el estudio de la presencia de componente in situ no observamos una propensión clara a manifestarse alguna variante de CLI, sólo observamos que tiene baja frecuencia de presentación en los de tipo intermedio. La presencia de HLA, aunque poco frecuente, se manifiesta principalmente en la variedad clásica, mientras que en el estudio no tiende a manifestarse en la variedad pleomorfica. En estas variables no se alcanza significación estadística.

En cuanto al tamaño tumoral ajustado a la medición histopatológica no encontramos diferencias destacables en relación a los resultados obtenidos a la medición clínica con resultados de nuevo, muy próximos a la significación estadística(figura 7).

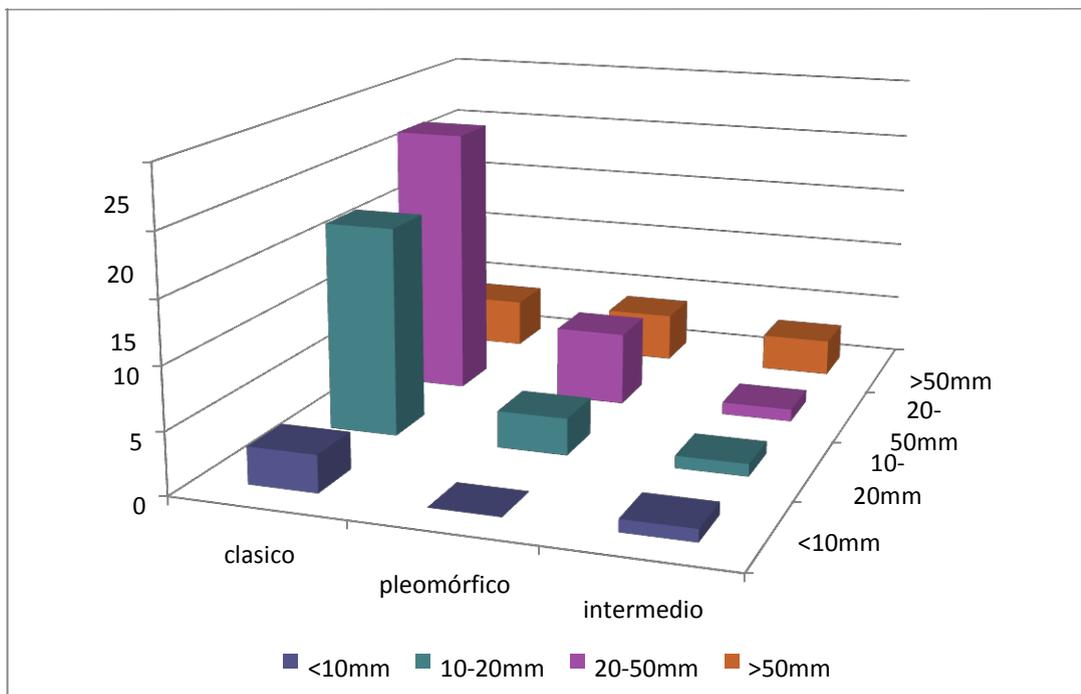


Figura 7 . Distribución de la población por tamaño AP –subtipo CLI.

La valoración de la afectación ganglionar detecta una tasa del 48.4% de ganglios afectados, con claro predominio en los tumores pleomórficos. En este subtipo, la afectación ganglionar alcanza tasas del 80%, con 8 casos. La ausencia de afectación

ganglionar predominó en los subtipos clásico e intermedio. En concordancia con los datos previos sólo se detecta una ausencia de invasión ganglionar en 18.2% de las pacientes con variedad pleomorfica. Los datos registrados se encuentran próximos a la significación estadística (figura 8).

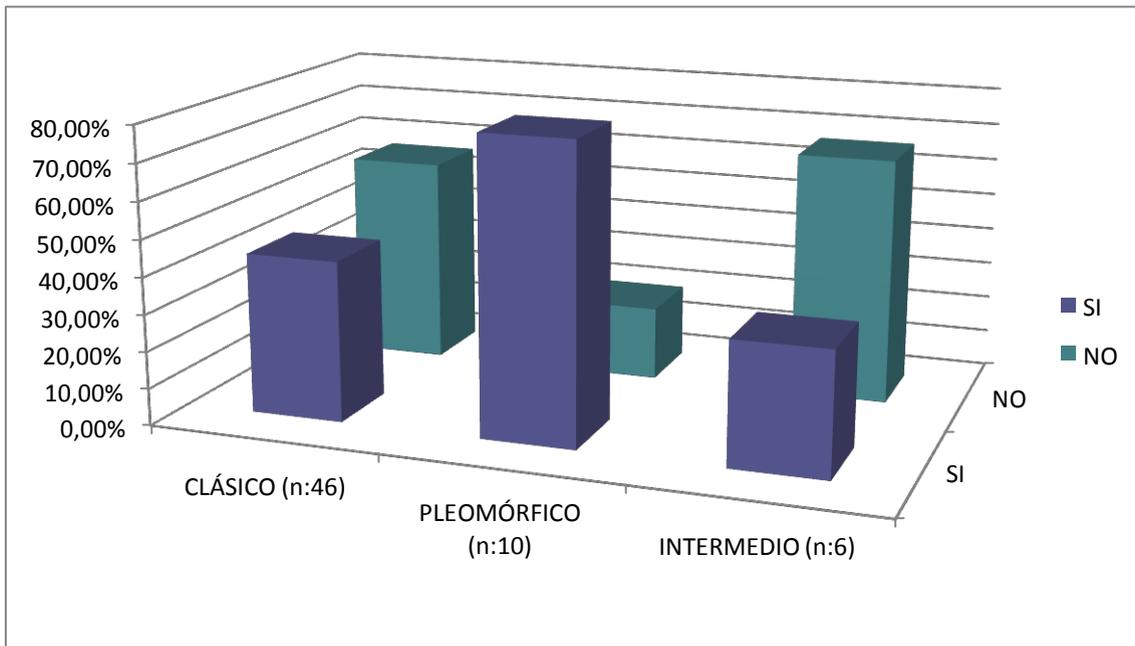


Figura 8. Afectación ganglionar- subtipos CLI.

Tras valorar el tamaño y la afectación ganglionar, adecuamos a las pacientes y los subtipos según el estadio tumoral y de acuerdo a la última clasificación TMN¹⁸. Se objetiva una clara asociación entre los estadios II y III y la variedad pleomórfica y estadios más precoces I y II en el caso de los subtipos clásico e intermedio con tasas superiores al 90% y al 83% respectivamente. Así mismo todas las pacientes que fueron diagnosticadas en estadio IV presentaban la variedad pleomorfica ($p < 0,01$)

5.3.3 ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS VARIABLES INMUNOHISTOQUÍMICAS

Los resultados obtenidos en el estudio de los tres subtipos de CLI , se muestran en la siguiente tabla 10.

VARIABLES IHQ		CLÁSICO (n:50)	PLEOMÓRFICO (n:14)	INTERMEDIO (n:6)	p
RE	Positivo	47 (95.9%)	13 (92.2%)	6 (100%)	p<0.762
	Negativo	2 (4.1%)	1 (7.1%)	0 (0%)	
RP	Positivo	39 (79.6%)	9 (64.3%)	6 (100%)	P<0.190
	Negativo	10 (20.4%)	5 (35.7%)	0 (0%)	
HERB2	Positivo	7 (14.3%)	5 (35.7%)	2 (33.3%)	P<0.151
	Negativo	42 (85.7%)	9 (64.3%)	4 (66.7%)	
Ki67	Positivo	32 (65.3%)	8 (61.5%)	4 (66.7%)	P<0.963
	Negativo	17 (34%)	5 (38.5%)	2 (33.3%)	
PTEN	Positivo	8 (18.2%)	3 (23.1%)	2 (40.0%)	P<0.640
	Negativo	36 (81.8%)	11 (78.6%)	3 (60.0%)	
P53	Positivo	12 (25.0%)	4 (30.8%)	1 (16.7%)	P<0.801
	Negativo	36 (75%)	9 (69.2%)	5 (83.3%)	
P63	Positivo	5 (13.2%)	1 (8.3%)	0 (0%)	P<0.519
	Negativo	33 (86.8%)	11 (91.7%)	5 (100%)	
Prb	Positivo	37 (84.1%)	12 (22.2%)	5 (83.3%)	P<0.747
	Negativo	7 (15.9%)	1 (7.7%)	1 (16.7%)	
P21	Positivo	8 (17.8%)	4 (30.8%)	0 (0%)	P<0.266
	Negativo	37 (82.2%)	9 (69.2%)	6 (100%)	
BCRA	Positivo	33 (73.3%)	7 (53.8%)	3 (50%)	P<0.269
	Negativo	12 (26.7%)	6 (46.2%)	3 (50%)	
EGRF	Positivo	3 (7.3%)	0 (0%)	0 (0%)	P<0.519
	Negativo	2 (5.0%)	0 (0%)	0 (0%)	
PCNA	Positivo	38 (95.0%)	10 (100%)	6 (100%)	P<0.660
	Negativo	2 (5.0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Ps-2	Positivo	26 (59.1%)	8 (61.5%)	4 (66.4%)	P<0.934
	Negativo	18 (40.9%)	5 (38.5%)	2 (33.3%)	

Bcl-2				P<0.608
Positivo	35 (94.6%)	6 (85.7%)	3 (100%)	
Negativo	2 (5.4%)	1 (14.3%)	0 (0%)	
CATEPSINA D				P<0.067
Positivo	10 (23.8%)	0 (0%)	0 (0%)	
Negativo	32 (76.2%)	13 (100%)	6 (100%)	
E-CADHERINA				P<0.990
Positivo	8 (18.2%)	2 (16.7%)	1 (9.1%)	
Negativo	36 (81.8%)	10 (83.3%)	5 (83.3%)	
SUBTIPOS INTRÍNSECOS				P<0.255
LUMINAL A	41 (83.7%)	9 (64.3%)	5 (83.3%)	
LUMINAL B	8 (16.3%)	4 (28.6%)	1 (16.7%)	
HER 2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
TN	0 (0%)	1 (7.1%)	0 (0%)	

Tabla10 . Resultados variables IHQ.

La presencia en las células epiteliales de carcinoma lobulillar de mama de receptores estrogénicos aparece casi como una constante en el estudio llevado a cabo. Se encontró una frecuencia de expresión de RE en éstas células mayor del 95%. Si los estudiamos por variantes de carcinoma lobulillar objetivamos que esta frecuencia es discretamente menor en los pleomórficos respecto a los carcinomas lobulillares clásicos y a la variante intermedia, disminuyendo al 92,9%. Sólo se registró un caso que no manifestó positividad de RE, que correspondió a una paciente menopaúsica con un tumor de 35mm de diámetro y afectación ganglionar. Los resultados no arrojan datos que nos permitan inferir tendencia y no alcanzaron significación estadística.

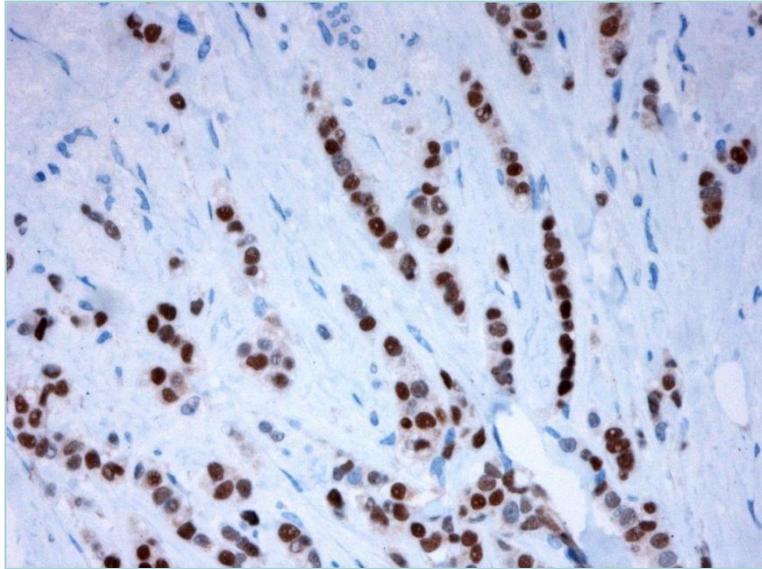


Foto 5. Imagen IHQ obtenida de RE

En el caso de la presencia de receptores de progesterona, ésta se detectó en porcentajes menores que los RE. Como ocurre con el RE, se presentó con una frecuencia de sobreexpresión menor en los tumores pleomórficos que en los clásicos e intermedios (64.3% versus 79.6% y 100%), no detectándose en más de un tercio de los casos (35.7%). Se objetiva cierta tendencia a la positividad tanto RE como RP en 100% de los tumores clasificados como intermedios, y a una menor expresión en los pleomórficos, aunque no mostró significación estadística.

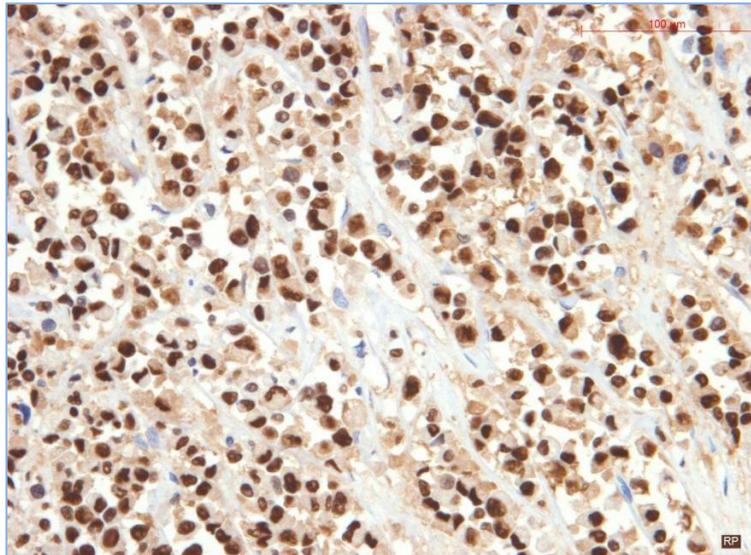


Foto 6. Imagen IHQ obtenida de RP

La sobreexpresión del receptor Erb b-2 no arrojó un resultado significativo en el estudio pero mostró tendencia a no encontrarlo sobreexpresado en la variedad clásica. Se objetivó una mayor representación en las pacientes que presentaron la variedad pleomorfica, observándose en el 35.7% de éstas. ($p < 0.151$)

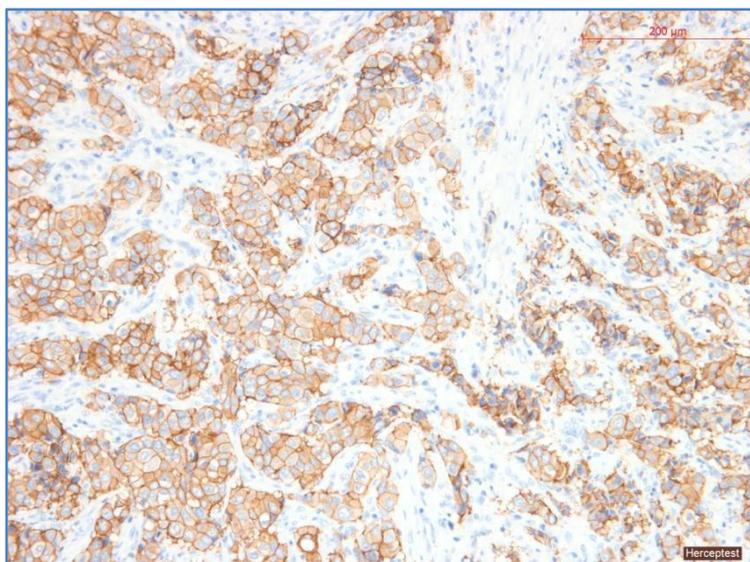


Foto7 . Imagen IHQ obtenida de HER 2

El marcador de proliferación celular Ki 67, representó tanto valores positivos como negativos muy similares en los tres tipos de carcinoma lobulillar por lo que no nos permite inferir asociaciones, a favor de su sobreexpresión en los tres subtipo de CLI

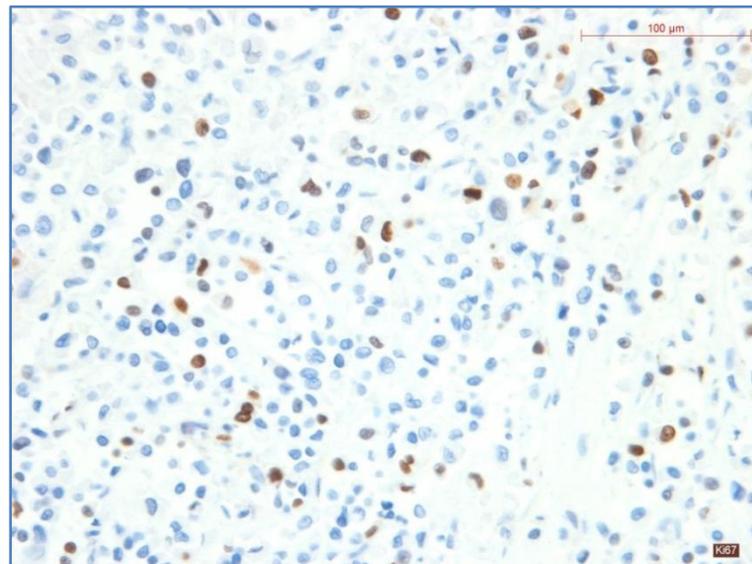


Foto 8. Imagen IHQ obtenida de Ki67

Cuando se valora la sobreexpresión en la población estudiada del marcador PTEN, los resultados muestran valores duplicados para sobreexpresión del marcador en la variante intermedia, respecto a los pleomórficos y clásico, aunque se detecta un predominio de la ausencia del marcador en los tres tipos. No se obtuvo una significación estadística suficiente que apoye asociación con estos datos.

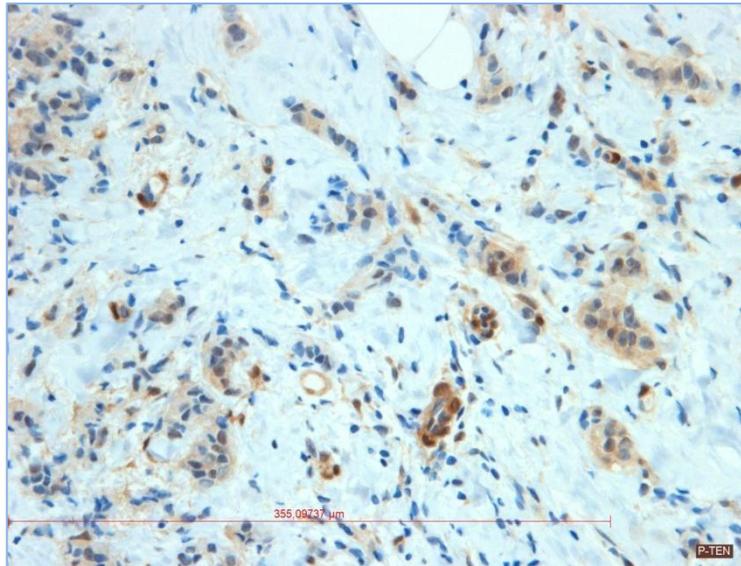
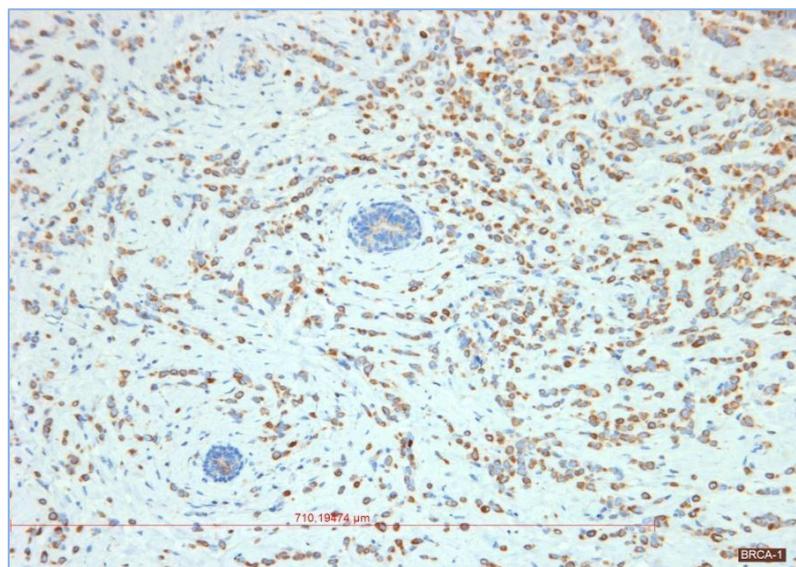
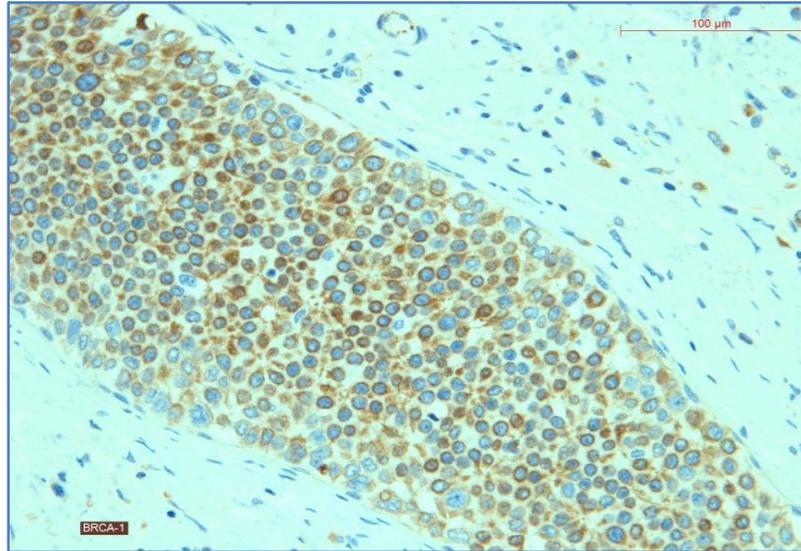


Foto 9. Resultado IHQ de PTEN

En cuanto a la sobreexpresión del oncogen BRCA 1, se registra una suave tendencia a la sobreexpresión en el subtipo clásico de CLI y presenta ausencia de expresión en el 46.2% de los tumores pleomórficos. En el tipo intermedio se representa en un 50% positivos y negativos. No se obtuvo significación estadística.





Fotos 10 y 11. Resultado IHQ de BRCA1

La proteína Prb se sobreexpresa con valores elevados en los tres tipos de carcinoma lobulillar con porcentajes que abarcan del 92.3%, 84.1% y 83.3% para los carcinomas pleomórfico, clásico e intermedio, respectivamente. No se confirma asociación estadística en este parámetro.

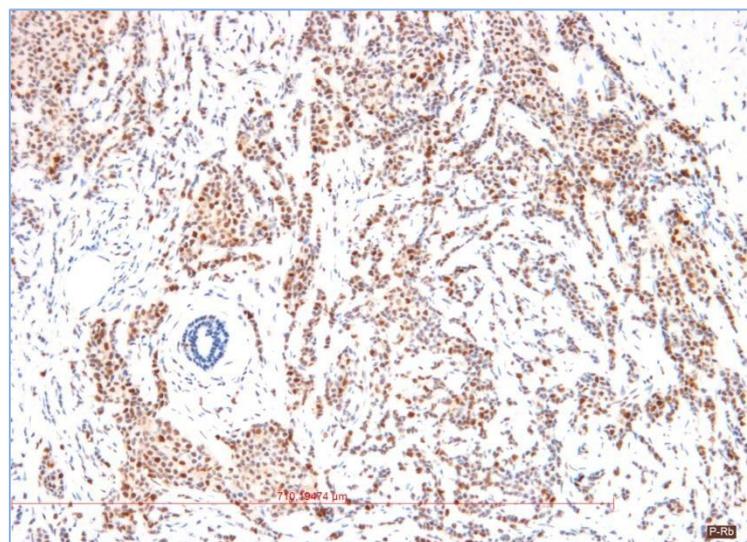


Foto 12 . Resultado IHQ de Pr-b

En lo que respecta a la presencia de las proteínas P53 y P63, cabe reseñar que muestran tasas muy bajas de sobreexpresión en todos los carcinomas lobulillares de la serie, algo mayor en el caso de la P53: La proteína p53 ha mostrados su mayor tasa de expresión, de 30.8% para los carcinomas pleomórficos, seguida de los clásicos con un 25% y los de tipo intermedio en un 16.7%. Estos últimos no muestran sobreexpresión alguna para P63 siendo del 13.2% en los CLI clásicos y del 8.3% en los de tipo pleomórfico, sin alcanzar asociación estadísticamente válida ni datos de tendencias.

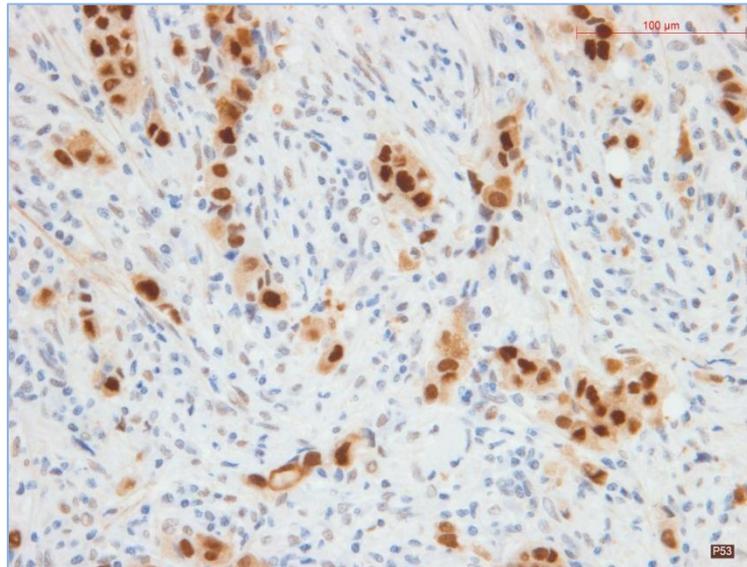


Foto13 . Resultado IHQ de P53

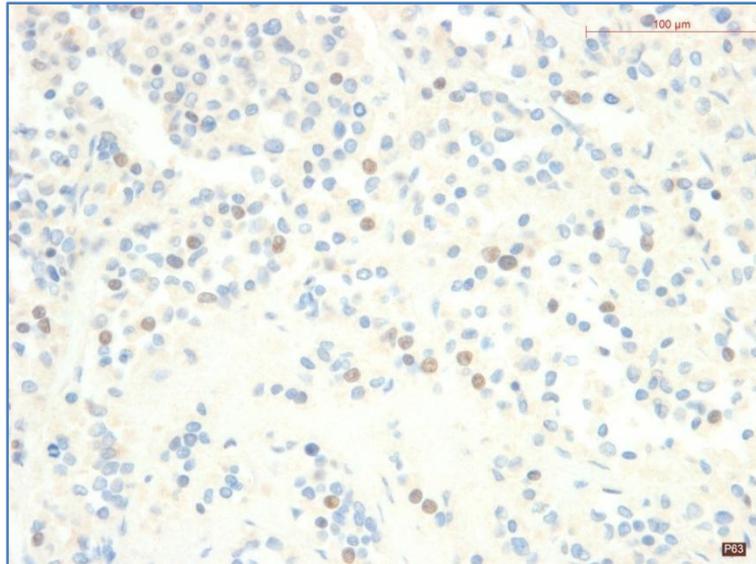


Foto 14 . Resultado IHQ de P63

Los resultados que se obtienen en el estudio de la expresión de P21, cabe destacar dos situaciones: posible tendencia a la pérdida de expresión en las formas intermedias, en la que no se objetiva esta proteína en el 100% de los casos y una sobreexpresión de esta proteína en el 30.8% del subtipo pleomórfico, que duplica las tasas respecto al clásico de CLI. Sin resultados estadísticamente significativos.

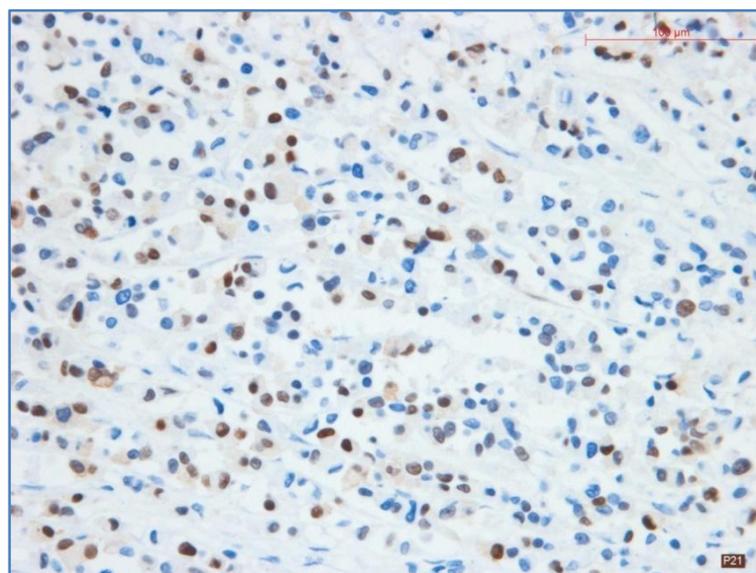


Foto15 . Resultado IHQ de P21

En cambio PCNA alcanza una representatividad prácticamente absoluta en las tres variedades, del 100% excepto en los tumores de tipo clásico que desciende al 95%. Aunque no alcanzamos significación estadística suficiente.

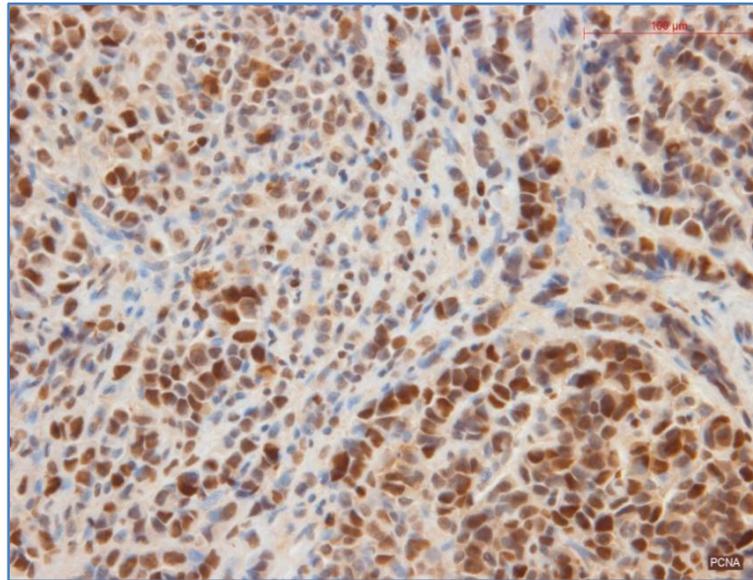


Foto 16 . Resultado IHQ de PCNA

En el caso de factor de crecimiento EGRF hemos obtenido datos absolutamente opuestos, totalmente ausente en los subtipos pleomórfico e intermedio y con una representación de sólo el 7.3% en el clásico, sin obtener significación estadística.

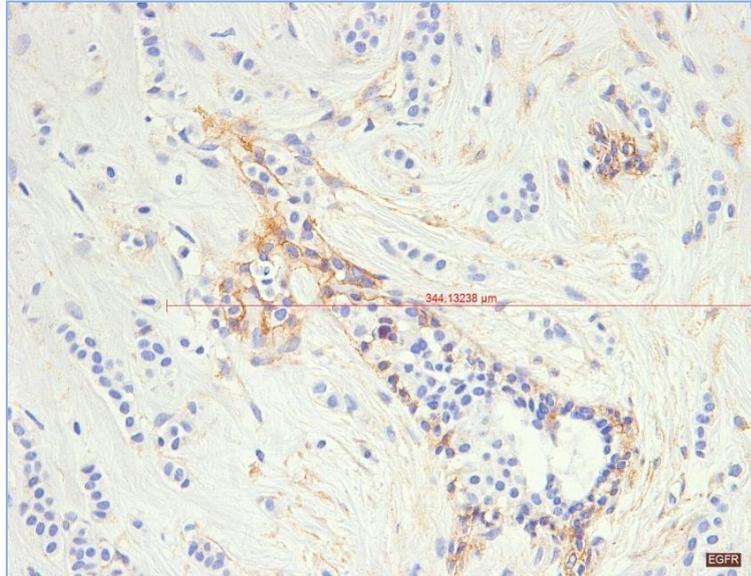


Foto 17. Resultado IHQ de EGFR

Bcl-2 está muy representado en los tipos clásico e intermedio con unas tasas del 94% y 100% respectivamente y desciende al 85.7% en los subtipos pleomórficos, sin asociación estadística comprobada para esta sobreexpresión proteica.

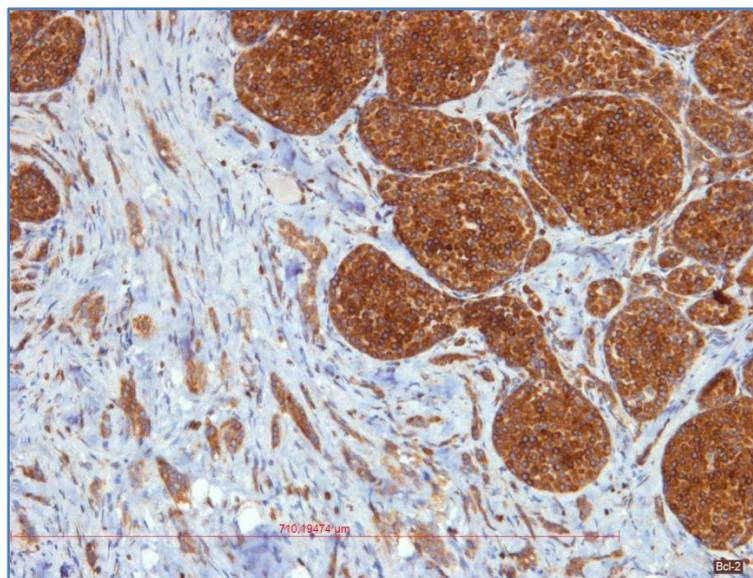


Foto 18 . Resultado IHQ de bcl-2

En el caso de Ps-2 no se hallaron datos reseñables, con tasas muy similares de sobreexpresión, discretamente más elevadas en el tipo intermedio del 66.7 %, respecto al lobulillar clásico y pleomórfico con tasas del 59% y 61% respectivamente. Datos que no mostraron ser significativos ni indicaron tendencias de asociación con subgrupos.

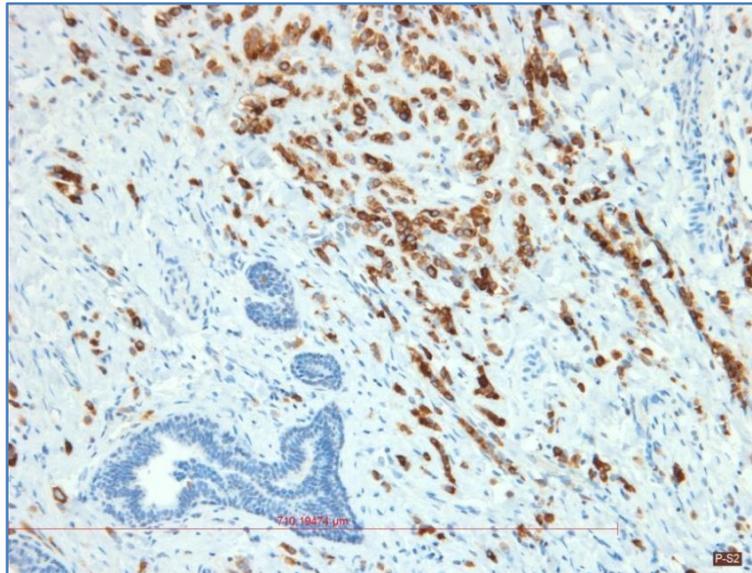


Foto 19 . Resultado IHQ de Ps-2

En el caso de la proteína estructural celular, catepsina D, mayoritariamente ausente en los tumores lobulillares se encontró sobreexpresión del 23.8% en la variedad clásica con valores muy cercanos a la significación estadística y una tendencia de asociación patente. Sin embargo la principal proteína de adhesión celular, e-Cadherina no mostró resultados estadísticamente significativos con expresión presente de la proteína en el 16.7% de los casos pleomórficos e intermedios y del 18.2 % en los tumores de índole clásica.

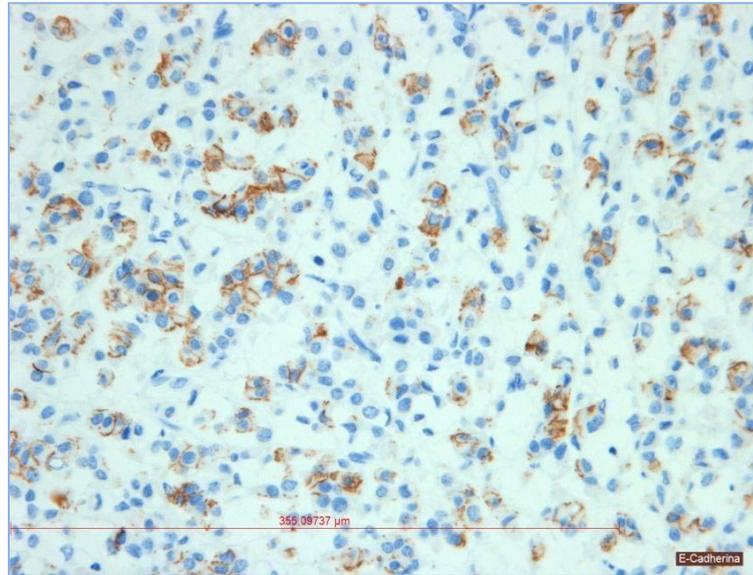


Foto 20 . Resultado IHQ de e- cadherina

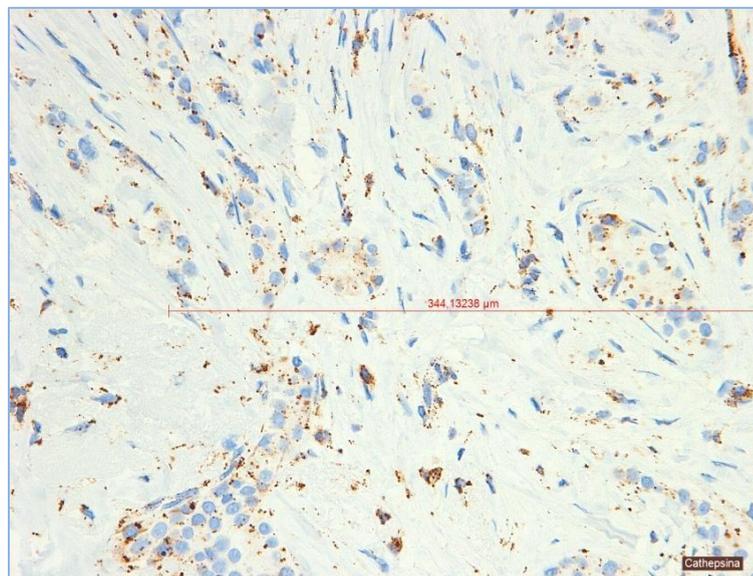


Foto 21. Resultado IHQ de Catepsina-D

5.3.4 ESTUDIO COMPARATIVO DE LA AGRUPACIÓN DE VARIABLES INMUNOHISTOQUÍMICAS

Se agruparon variables siguiendo los criterios de función celular posiblemente implicados en la cancerogénesis, se estudian de forma individual en cada variedad de carcinoma lobulillar en la serie de casos registrada.

Los resultados obtenidos representan en la siguiente tabla. Tabla 11

AGRUPACIÓN DE VARIABLES IHQ		CLÁSICO	PLEOMÓRFICO	INTERMEDIO	p
V. ASOCIADAS A R HORMONAL					<i>P<0.0602</i>
	positivo	21 (46.7%)	6 (42.9%)	4 (66.7%)	
	Negativo	24 (53.3%)	8 (57.1%)	2 (52.3%)	
V. ASOCIADAS A APOPTOSIS					<i>P<0.712</i>
	Positivo	9 (19.6%)	1 (9.1%)	1 (9.1%)	
	Negativo	37 (80.4%)	10 (90.9%)	5 (93.3%)	
V. ASOCIADAS A PROLIFERACIÓN CELULAR					<i>P<0.881</i>
	Positivo	25 (56.8%)	6 (54.5%)	4 (66.7%)	
	Negativo	19 (43.2%)	5 (45.5%)	2 (33.3%)	
V. RELACIONADAS ONCOGENES					<i>P<0.933</i>
	Positivo	9 (19.7%)	3 (23.1%)	1 (16.7%)	

	Negativo	38 (80.9%)	10 (76.9%)	5 (83.3%)
V.RELACIONADAS				
GENES				<i>P<0.360</i>
SUPRESORES				
	Positivo	7 (14.9%)	3 (21.4%)	2 (40.0%)
	Negativo	40 (85.1%)	11 (78.6%)	3 (60.0%)
V.				
RELACIONADAS				<i>P<0.642</i>
ADHESION CLR				
	Positivo	2 (4.8%)	0 (0%)	0 (0%)
	Negativo	40 (95.2%)	12 (100%)	6 (100%)

Tabla 11 .Distribución de grupos de variables de función celular – subtipos CLI

Se analizan variables de respuesta hormonal obteniendo positividad del grupo del 66% en los subtipos intermedios sin una tendencia constatada mientras que en los clásicos y pleomórficos no se ha demostrado asociación por grupo de variables

En cuanto al grupo de biomarcadores implicados en el proceso de apoptosis celular, se detectó la mayor sobreexpresión de ambos oncogenes en la variedad pleomórfica con tasas del 19.6 % que descienden al 9.1% en los clásicos y al 16.7% en los intermedios. Pero no se demuestra tendencia ni significación estadística en el grupo.

Las moléculas asociadas a proliferación celular aparecen en frecuencia absolutas más sobreexpresadas en algo más de la mitad de la población a estudio, en todos los subgrupos. Sin embargo no se obtuvo significación estadística ni los datos marcaron tendencia en ningún subgrupo.

La asociación de genes supresores analizados en la serie, en el grupo de los lobulillares intermedios, intuye una a discreta tendencia a mayor sobreexpresión, en un 40% .Predominan la ausencia de éste grupo molecular , principalmente en la variedad clásica (85.1%). Sin suficiente significación estadística.

En el grupo de proteínas de adhesión celular, sólo se obtiene un pequeño porcentaje de positividad en el grupo clásico, con cifras del 4.8%, pero sin confirmar significación estadística.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

6.1 EVALUACIÓN DE LOS DATOS POBLACIONALES

El objetivo principal de la investigación del cáncer de mama es alcanzar el tratamiento adecuado que conduzca a la curación de las mujeres afectas de esta patología.

Es indiscutible que se han conseguido grandes avances en este campo, y que en la actualidad todos ellos van encaminados al tratamiento individualizado de cada grupo de pacientes, con la finalidad de lograr un aumento de la supervivencia con una calidad de vida cada vez mejor, retrasando la recaída local y minimizando los efectos secundarios de los tratamientos, ya sean médicos o quirúrgicos y porqué no, alcanzar la curación.

Con esta finalidad los mayores avances en la ciencia y la medicina han tratado de discernir, identificar y clasificar los distintos tipos de carcinoma mamario, apoyándose en técnicas cada vez más sofisticadas y a menudo complementarias que nos permitan detectar a las pacientes diana, identificar factores de riesgo, diagnosticar y definir las neoplasias mamarias que afectan a cada mujer e inferir en el comportamiento biológico de la mismas.

El carcinoma lobulillar de mama, a pesar de ser la segunda neoplasia más frecuente de la mama, continúa hoy siendo un gran desconocido. La descripción anatomopatológica inicial ha servido durante décadas para establecer una clasificación que aún hoy tiene validez en la práctica clínica, pero que ha experimentado pocos avances. Esto se debe a que la mayoría de los estudios han estado focalizados al estudio, diagnóstico y tratamiento del carcinoma ductal de mama, que supone el 80-85% de todos los cánceres y los resultados se han aplicado casi de forma global al tratamiento de todos los tipos de cáncer de mama.³⁸

Registramos un total de 70 pacientes en el periodo comprendido entre 2007 y 2014, de pacientes con un diagnóstico histopatológico confirmado de carcinoma lobulillar de mama. En el registro, los datos clínico-epidemiológicos y los estudios histopatológicos que se inician con los datos que arrojaron las core-biopsias. A pesar de que las biopsias con aguja gruesa en cáncer de mama pueden infradiagnosticar tumores infiltrantes, la presencia de microinfiltración o infiltración en las piezas de biopsia presentan una alta tasa de correlación con el estudio histopatológico definitivo.^{116,117}

Las 70 pacientes diagnosticadas de carcinoma lobulillar representaron el 14.1 % del total de los carcinomas diagnosticados en nuestra unidad de mama. En el diagnóstico el 100% de las biopsias con aguja gruesa que detectaron invasión o microinvasión se confirmaron con el estudio histopatológico.

6.2 EVALUACION DE LAS VARIABLES

6.2.1 VARIABLES CLINICOEPIDEMIOLOGICAS

En cuanto a la edad de diagnóstico, tanto si valoramos el valor de la media de edad obtenida del grupo como si tenemos en cuenta el valor de la varianza de edad podemos observar que la edad de diagnóstico en nuestras pacientes ha sido menor a la media de edad del diagnóstico que se presupone para la variedad lobulillar, alcanzando una edad de diagnóstico muy próxima al subtipo ductal. Si dividimos la edad de diagnóstico por variedades del carcinoma lobulillar observamos que dentro de las pacientes diagnosticadas de variedad intermedia solo una de ellas supera los 50 años de edad al diagnóstico, siendo el 66,6% de estas menores de 45 años. Mostrando una tendencia de las 13 pacientes con tumores pleomórficos a manifestarse a partir de la menopausia y en edades extremas de la vida. La variedad clásica es más frecuente en la perimenopausia, con tendencia a reactivarse la incidencia en edades extremas, mientras que los tumores de clasificación intermedia, aunque en un escaso número se

diagnosticaron en el rango de edad fértil. Sin embargo, estudios similares, como el realizado sobre una población noruega, publicado en noviembre de 2014⁸⁰ y llevado a cabo entre 1956 y 1959 de CLI, con números poblacionales mayores estiman la edad media de diagnóstico en 73,3 años para los CLI, lo que coincidiría con el incremento de frecuencia que hemos encontrado en nuestro estudio a edades avanzadas de la vida. La diferencia en las edades de incidencia entre este estudio, que recoge datos en dicho periodo, y el nuestro puede deberse a que los avances tecnológicos, los programas de *screening* y las características de la población hayan influido de forma importante en una edad de diagnóstico más precoz⁸⁰. En el estudio de Naendra S. y cols., publicado en abril de 2015⁷², encontraron una edad media al diagnóstico de 60 años, tanto para la variedad clásica como la pleomófica, no encontrando grandes diferencias en cuanto a la distribución por edades, aunque presentan también pacientes en pacientes ancianas.

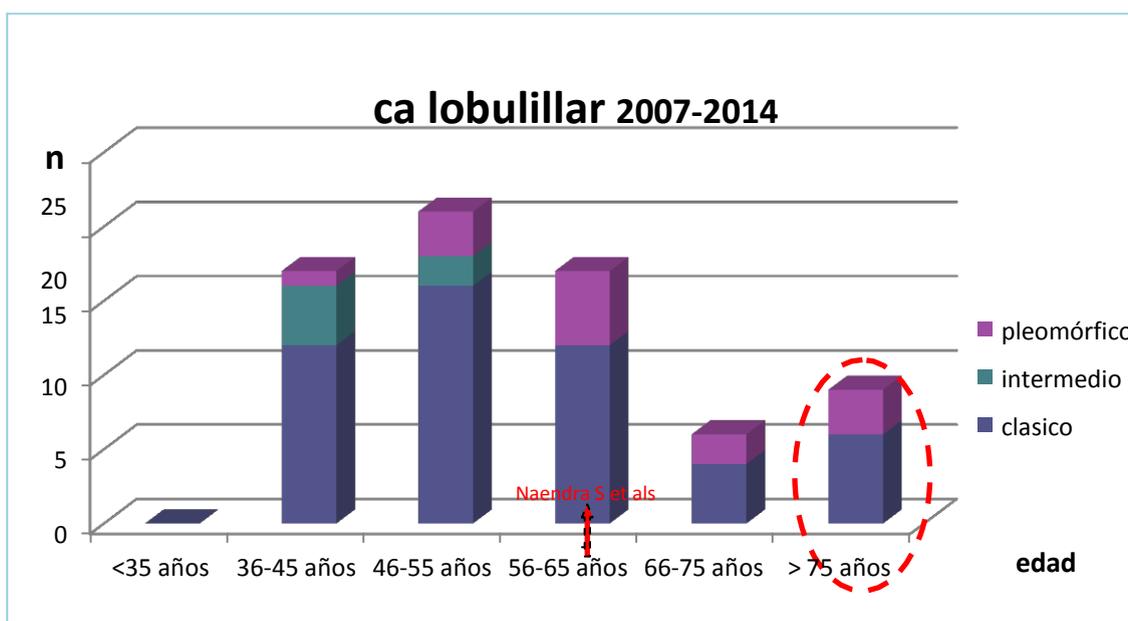


Figura 8 . Distribución por edades en la población a estudio

Respecto a la distribución de la población por edades extremas de la vida en lo que refiere a CLI, observamos que tanto en la variedad clásica como en los pleomóficos, vuelve a existir cierta tendencia a reaparecer en edades más avanzadas

de la vida de la vida aunque la tendencia central en contra de lo que las publicaciones clásicamente describen se observa en la perimenopausia^{25,33,131}.

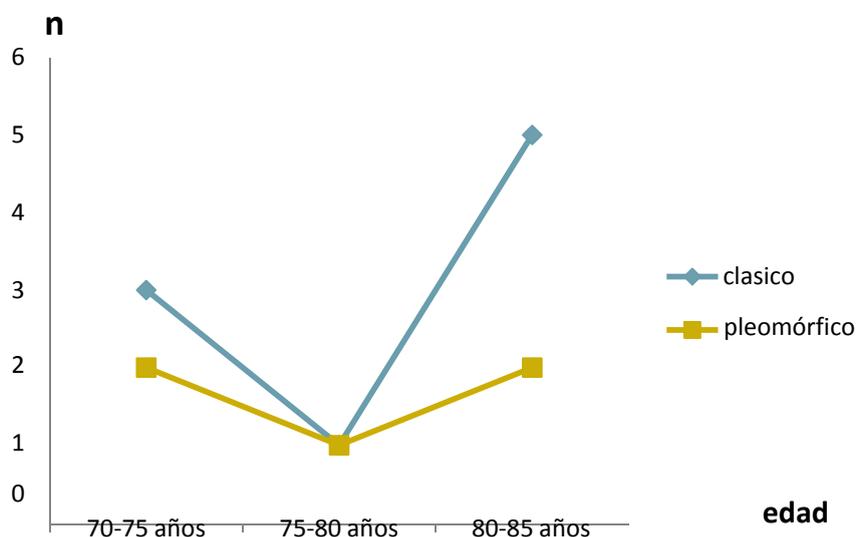


Figura 9. CLI edades avanzadas

La hormonosensibilidad y los cánceres de mama en general, es un dato bien conocido que también se da en los CLI¹¹, entre los antecedentes ginecológicos que pueden reflejar dicha hormonosensibilidad se incluyen: ingesta de anticonceptivos hormonales orales, cirugía mamaria y cirugía ovárica previa por patología benigna o maligna. La mayoría, se relacionaron con la variedad clásica en nueve casos, y dos casos se relacionaron respectivamente con las variedades intermedia y pleomórfica. Llama la atención en nuestro estudio, una frecuencia relativamente baja de solo un 15%, pero dada la muestra y la heterogeneidad de la misma, no nos es posible inferir ninguna asociación a un determinado subtipo de CLI. Sin embargo, parece que es la forma clásica la que con más fuerza se asocia a la presencia de antecedentes con relación hormonal.

El estado hormonal intrínseco de las pacientes fue comparado con las tres variedades de CLI, encontrándose una asociación entre este y la distribución por edades al diagnóstico, lo nos induce a pensar que existe una relación más intensa de la

forma clásica con los niveles hormonales/estrogénicos, a lo que se suma una relación más intensa con antecedentes ginecológicos hormonodependientes previos. Sin embargo no encontramos esta relación con la forma pleomórfica, que se presentan en su mayoría una vez establecida la menopausia y en edades más avanzadas de la vida. Estos datos coinciden con los aportados en las series de carcinoma lobulillar¹⁸, donde se postula: que la hormonosensibilidad en la variedad pleomórfica no esta tan relacionada como con la variedad clásica, a pesar de que ambos se presentan en intervalos de edad muy próximos. La variedad intermedia, con pocos casos para inferir asociaciones se manifiesta con presentaciones más atípicas del carcinoma lobulillar, pero por la edad temprana de presentación en nuestro estudio, no muestra independencia del estado hormonal, sin embargo muy pocos datos encontramos para este pequeño subgrupo de pacientes con los que podamos contrastar estos resultados.

El tamaño tumoral tanto si se trata del carcinoma ductal como del carcinoma lobulillar u otros subtipos más infrecuentes, continúa siendo hoy un factor pronóstico independiente para el carcinoma de mama, e íntimamente ligado a la recurrencia local¹¹⁸. La clasificación TMN así lo refleja convirtiéndolo en el primer parámetro a valorar, a pesar de la complejidad creciente que está alcanzando dicha clasificación. Cuando consideramos este ítem en el estudio del carcinoma lobulillar hemos de tener en cuenta que los carcinomas lobulillares suelen presentarse con nódulos de mayor tamaño de lo habitual y como se ha señalado a veces ocultos a la mamografía, por su disposición y crecimiento hacia el estroma. En el 14 consenso de St Gallen (www.ecancer.org) se valora el tamaño tumoral conjuntamente con el subtipo intrínseco y la afectación ganglionar como los principales elementos predictivos de las recurrencias locales y a distancia a los 5 o 10 años, a la vez que se consideran puntos importantes en la toma de decisiones para la continuación o no del tratamiento con hormonoterapia. Dado que la mayoría de los tumores que se recogieron en la serie fueron luminales con en sus variantes clásicas y pleomórficas se ajustarían a este consenso. En el caso de los pleomórficos, bajo estos parámetros consideraríamos un patrón de respuesta más desfavorable dado que presentan habitualmente un tamaño mayor.

Si revisamos la serie de pacientes que nos ocupa observamos que, en más del 75% de

los casos se diagnosticaron como nódulos mayores de 20 mm, y en ningún caso se detectó nódulos menores de 10 mm, en los 13 casos. Resultados distintos arrojó el estudio de Naendra S et als⁷², que registró en prácticamente un 50%, tanto en las formas clásicas como en las pleomórficas, tumores por debajo y por encima de 20 mm de diámetro. En nuestra serie, llama la atención, que aproximadamente el 50% de los tumores con clasificación histopatológica intermedia (3 casos) que se registraron presentaran un tamaño mayor de 50 mm. Resulta llamativo también, que sólo en 4 casos se diagnosticaran pacientes con tumores menores de 10 mm de diámetro. Este parámetro muestra cierta concordancia con un reciente estudio francés, multicéntrico y retrospectivo publicado en octubre de 2015, en el que participaron 940 mujeres afectas de carcinoma lobulillar en estadio T1 y T2, diagnosticadas entre los años 1999 y 2008 en el que más del 72% de las pacientes presentaron tumores con más de 10 mm de diámetro aunque no individualizaron en el subtipo lobulillar¹²⁰.

Como ocurre con otros tipos de carcinoma mamario, la localización más habitual de las lesiones fueron los cuadrantes súpero-externos. No se han encontrado estudios que orienten hacia otra localización

Respecto al tipo de cirugía que se asocia a una variante u otra del carcinoma lobulillar, los datos obtenidos parecen congruentes con la agresividad asociada clásicamente a los subtipos de CLI de mama^{72,113}, que parece relacionarse paralelamente a técnicas quirúrgicas más radicales. Esta asociación, tal y como apuntan estudios de otros autores^{48,121} se justifica porque el riesgo de recidiva local es más elevado debido a diversos factores; Entre los que se incluyen el tamaño y grado tumoral, la mala o respuesta incompleta a la quimioterapia neoadyuvante, el posible infradiagnóstico radiológico por la densidad mamaria, multifocalidad y/o multicentricidad. De aquí se puede deducir una mayor tasa de reintervenciones en la variedad pleomorfica, que frecuentemente presentan tamaños tumorales mayores y grado histológico más agresivo. En nuestra experiencia las tasas de cirugía conservadora que se registraron fueron del 50% en los subtipos clásicos frente al 15,4% en el subtipo pleomórfico.

Se ha constatado una elevada frecuencia de multicentricidad y la multifocalidad de estos tumores (27.5%), a pesar de que los resultados no hayan conseguido significación estadística suficiente. La bilateralidad se ha encontrado en 4 casos (5,71%), en 3 de ellos del tipo lobulillar clásico (1 de estos metastásico), el restante correspondió a un carcinoma pleomórfico. La multifocalidad y multicentricidad que se atribuye clásicamente al carcinoma lobulillar, también ha estado presente en nuestra serie, 13 casos de subtipo clásico (18,57%) y 4 casos en los de subtipo pleomórfico, (que corresponden al 5.71 % del total), en el caso de los CLI de tipo intermedio se detectaron 2 carcinomas multifocales que supone un 2,85% del total de los casos.

Recientemente Kanumuri P y cols⁸³, valoran la asociación de la multifocalidad y la multicentricidad del cáncer de mama, concluyendo que los tumores multifocales se asocian con mayor frecuencia a hormonosensibilidad y sobreexpresión de HER2, con muy poca frecuencia de triple negativos. Además relacionan la multifocalidad con tumores de gran tamaño, que afectan a mujeres en edades más tempranas, y con presencia de afectación ganglionar e infiltración linfo-vascular (que en nuestro estudio muestra un predominio por la variante pleomorfica). Según este reciente estudio la multifocalidad se asocia al tipo lobulillar de carcinoma mamario, mientras que el carcinoma ductal se encuentra más relacionado con la multicentricidad. En la población a estudio, a tenor de los casos detectados, podría apoyar esta hipótesis dado que se ha detectado un mayor porcentaje de tumores multifocales (8 casos), respecto a los multicéntricos. Si bien en los tumores pleomórficos esta superioridad numérica no se constató, aunque probablemente secundario a un tamaño muestral reducido, los datos no mostraron significación estadística, es de esperar que con un aumento del tamaño muestral se confirmen estos datos.

La evaluación de la técnica quirúrgica idónea para los pacientes con carcinoma lobulillar infiltrante con frecuencia suele presentar un severo problema para decidir la actitud terapéutica adecuada. Muchas veces motivada por la multifocalidad y la multicentricidad, que se ha tratado previamente, y por el grado de componente *in situ* o intraductal que puede estar presente en el tumor. Ello condiciona que las tasas de cirugía radical sean más altas en los tipos lobulillares que en el carcinoma ductal de mama. Incluso aún, ante la posibilidad de recibir tratamiento quimioterápico

neoadyuvante dado que las repuestas tanto al tratamiento quimioterápico como al tratamiento hormonal del carcinoma lobulillar de mama son más bajas con respuestas más parcheadas¹², no olvidando el porcentaje de componente *in situ* que puede presentar concomitantemente. Yerushalmi R y cols, *Ann Oncol.* Apr 2012⁸⁷, mediante un estudio en el que compara cirugía conservadora y mastectomía en mujeres con tumores multicéntricos y multifocales respecto a tumores unifocales, concluyen que la técnica conservadora podría ser una opción aceptable en pacientes seleccionadas con tamaños tumorales reducidos (menores de 1 cm), que no presenten un porcentaje de componente *in situ* importante y en rango de edad comprendido entre 50 y 69 años. Sin embargo, en una publicación Irlandesa⁸⁶ el grupo encabezado por Sharma SD en un estudio retrospectivo de en el que comparan dos grupos de pacientes diagnosticadas mediante *screening* entre 50 a 65 años con 5 años de seguimiento, y sometidas a cirugía conservadora concluye que, las tasas de éxito en cirugía conservadora y MRM en pacientes que presentaron con CLI de mama no mostraron diferencia significativas (en lo que respecta a la recidiva local, neoplasia contralateral y supervivencia a los 5 años) respecto a las pacientes diagnosticadas de CDI. Aunque la tasa de pacientes que presentaron CLI en este estudio supuso sólo el 6.3% del total de las pacientes incluídas.

El número de reintervenciones nos puede indicar de manera indirecta la agresividad de estos tumores y sus problemas, sobre todo en cuanto a las decidir la actitud terapéutica, con gran relevancia cuando tratamos especialmente con pacientes que presentan carcinomas lobulillares, como se reseña en muchas publicaciones⁴⁸. El grado y el porcentaje de componente *in situ* que pueden presentar estas pacientes, es un factor que muchos autores ha relacionado con el pronóstico de la enfermedad y con la tasa de reintervenciones, a pesar de protocolizar los estudios intraoperatorios de los márgenes quirúrgicos. En este sentido una revisión¹³⁵ de 600 pacientes con evaluación preoperatoria por RMN versus a estudios por imagen clásico, concluye que la RMN preoperatoria de estas pacientes influye positivamente en la posibilidad de realizar cirugía conservadora (asociada o no a quimioterapia preoperatoria) sin incrementar las tasas de reintervenciones por recurrencia local. Aunque se trata de un estudio que no particulariza en el tipo lobulillar, sí tiene en consideración la tasa de

multifocalidad y multicentricidad, por lo que aunque con más estudios que consoliden estos datos podríamos extrapolarlo al carcinoma lobulillar con unas tasas mayores constatadas, de estos dos parámetros. Entre los 70 casos que hemos recogido en nuestra serie se registraron 7 casos que precisaron resección mamaria, 6 de ellos se trataba de la variedad clásica (8,57% del total y 13% de este subtipo) y en 1 caso de la variedad pleomórfica (que supone 1.4% del total y 8,57% de los pleomórficos)

<i>Subtipo</i>	<i>Edad</i>	<i>Cirugía inicial</i>	<i>Cirugía reintervención</i>	<i>Causa AP</i>	<i>Afectación ganglionar</i>
<i>Paciente 1 C</i>	<i>57años</i>	<i>CC</i>	<i>Ampliación márgenes</i>	<i>Focos aislados CLIS Comp extenso in situ+HLA+ extensión pagetoide</i>	<i>Si</i>
<i>Paciente 2 C</i>	<i>55 años</i>	<i>CC</i>	<i>MRM</i>	<i>Comp in situ+ extensión intraductal+ comp mixto+ MF</i>	<i>No</i>
<i>Paciente 3 C</i>	<i>57 años</i>	<i>CC</i>	<i>MRM</i>	<i>Extensión pagetode y x tractos fibrosos</i>	<i>Si (µmetastasis)</i>
<i>Paciente 4 C</i>	<i>58 años</i>	<i>CC</i>	<i>Ampliación margen afecto</i>	<i>Componente in situ e intraductal asociado</i>	<i>Si (µmetastasis x2)</i>
<i>Paciente 5 C</i>	<i>80 años</i>	<i>CC</i>	<i>MRM</i>	<i>MF</i>	<i>Si (µmetastasis x2)</i>
<i>Paciente 6 P</i>	<i>65 años</i>	<i>CC</i>	<i>MRM</i>		
<i>Paciente 7 C</i>	<i>45 años</i>	<i>CC</i>	<i>MRM</i>		

Tabla 12

6.2.1 VARIABLES HISTOPALÓGICAS

De forma sincrónica con la uni o multifocalidad y la multicentricidad, se objetivan con frecuencia lesiones asociadas a la lesión infiltrante, esta generan dificultades en la interpretación y el manejo clínico y continúan siendo en la actualidad motivo de polémica. Una de las más comúnmente encontradas en el estudio de los especímenes quirúrgicos es el CLIS. Un reciente estudio publicado en Inglaterra Chester R et al⁸⁸, registran la actitud terapéutica de distintos centros ingleses ante el hallazgo de CLIS asociado a carcinoma de mama, o tras biopsias diagnósticas. Se encontró una gran variabilidad en cuanto al manejo clínico y quirúrgico tras estos hallazgos. Entre las opciones terapéuticas se encuentran: una actitud conservadora con seguimiento de la paciente, algunos sin seguimiento, y los que optan por biopsias excisionales ante la posibilidad de asociación de estas lesiones a carcinoma lobulillar o ductal infiltrante. En nuestro estudio, dado que se trataba de lesiones lobulillares infiltrantes, el hallazgo de CLIS asociado y, en especial cuando se encontraron focos aislados, condicionó una reexcisión, a pesar de que no existen protocolos para el seguimiento de estas lesiones, ya se tratase de la variante clásica o pleomorfica de CLI. Sin embargo, tras evaluarlas no encontramos asociación entre estas lesiones y ningún subtipo de CLI, ya que se dieron frecuencias muy similares en ambos grupos de pacientes.

En cuanto a la HLA, siendo ésta poco frecuente de forma global (11.4%), no encontramos datos que nos alejen de la idea de que su presencia, en uno u otro subtipo de neoplasia lobulillar es puramente azaroso/casual. Publicaciones como la de Douglas S y cols⁸², *Diagnostic Pathology* de 2011, presentaron tras el estudio de 5650 especímenes quirúrgicos de todos los tipos histológicos, frecuencias del 2.8% de concomitancia de HLA y CLI (17 casos del total), mientras que la presencia de CLIS asociado a CLI alcanzaba tasas del 33.3%. Sin embargo, no nos resuelve nada este hallazgo, puesto que sigue planteando los mismos problemas de manejo que el CLIS,

sobre todo si consideramos que gran parte de la comunidad científica la considera un precursor del mismo.

En nuestro estudio, este hecho no se ve confirmado puesto que si fuera un precursor de CLIS, ¿Por qué encontramos diferencias en nuestra serie , entre la frecuencia de aparición de ambas conjuntamente con el CLI (15.1% vs el 54.4%)? ¿Se podría considerar CLIS un proceso de malignización avanzado? y entonces, ¿por qué podemos encontrar focos de HLA aislados, asociados a CLI, sin hallar componente in situ? Apple SK y cols⁸⁹, se hicieron preguntas similares hace unos años. Mediante un estudio de una población de 38 mujeres con carcinoma lobulillar, con un seguimiento entre 1 y 109 meses, valoraron la presencia de HLA en el margen de resección, consiguieron concluir que constituía en las mujeres que lo presentaban una causa de recaída local, asociándose fuertemente a CLI y a CLIS especialmente en el lobulillar clásico. En nuestro estudio no hemos alcanzado tal evidencia en estas conclusiones, probablemente un examen más exhaustivo de las piezas, un seguimiento a largo plazo y un tamaño muestral mayor nos aproximaría a estos resultados.

Otro hallazgo relevante de nuestro estudio y que llama la atención, es la nula frecuencia de mastopatía fibroquística con la variante pleomórfica del carcinoma lobulillar, mientras que si la encontramos en un 50% con las formas intermedias, y en las formas clásicas encontramos lesiones mastopáticas aproximadamente en 1/3 de las pacientes. Son muy escasas las publicaciones que tratan de comparar estos hallazgos entre los subtipos clásicos y pleomórficos. En relación a lesiones mastopáticas Ojima y cols.^{79,123} encontraron una asociación entre la presencia de lesiones mastopáticas de tipo adenosis esclerosante y la presencia de carcinoma multicéntrico, especialmente de tipo lobulillar, aunque predominaban neoplasias de bajo grado y poco invasivas. Sin embargo publicaciones como la de Yoshida A¹²⁴, asociaban estas lesiones a CDI

Es muy probable que sea necesario una ampliación del estudio para poder concluir la asociación de permeación linfovascular de las células tumorales con el subtipo pleomórfico de carcinoma lobulillar y la concomitancia de éste con focos de carcinoma ductal, ya se trate de CDIS o CDI. Tanto en frecuencia como en su tendencia a presentarse en tumores pleomórficos coincidimos con el estudio de Naendra S⁷², que

registró tasas de 5.9% en pleomórficos frente a 2.9% en variantes clásicas de CLI. Hay estudios que la relacionan con tumores bilaterales y/o multicéntricos⁸³ Se observa una importante tendencia de estas características histopatológicas a presentarse en esta forma clínica, en detrimento de las formas clásica e intermedia, aunque así lo describen distintos estudios³⁴.

Los datos obtenidos de afectación ganglionar se considerarían en consonancia con una mayor agresividad tumoral del CLI pleomórfico, donde se detectan las tasas más altas. Actualmente las guías para el tratamiento del cáncer de mama así lo consideran, incluyendo éste como factor de riesgo. De nuevo encontramos resultados en cuanto a la afectación nodal, que se correlacionan con los hallados en el estudio de Naendra S⁷², donde se demuestra una asociación entre la afectación ganglionar y el subtipo pleomórfico. Si bien en el estudio y en publicaciones anteriores se realiza linfadenectomía de manera estandarizada ante la sospecha o confirmación de cualquier grado de afectación ganglionar, en la actualidad el debate permanece abierto. Recientes estudios indican tasas similares de recurrencia local en pacientes, en estadios precoces de la enfermedad (T1 y T2) con afectación de 1 o 2 ganglios que han recibido radioterapia axilar en lugar de linfadenectomía quirúrgica^{23.24}. Un resumen de las indicaciones actuales de la linfadenectomía axilar nos ofrece la publicación de Rao R y cols.¹²⁶, en este se concretan varias situaciones clínicas: metástasis axilares confirmadas por biopsia, MRM con BSGC positiva y CC con más de tres GC positivos. Estos datos también se resumen en el último consenso de *St Gallen*, donde tras evaluar los resultados de los estudios IBCSG23-01 y ACOSOG Z0011 se aceptó la sustitución de la linfadenectomía quirúrgica por radioterapia axilar en pacientes sometidas a CC y ausencia clínica de afectación axilar y 1 o 2 ganglios centinela afectados por micrometástasis. Siguiendo estas premisas en el estudio se podrían haber evitado linfadenectomías en 14 casos¹⁸.

6.2.3 VARIABLES INMUNOHISTOQUÍMICAS

La presencia de receptores estrogénicos en los carcinomas lobulillares es un hecho bien conocido y constatado en múltiples estudios. El receptor estrogénico prácticamente se convierte en el denominador común de estas neoplasias. En una revisión publicada en enero en *Breast Cancer Res.*, Amy E McCart Reed y cols.⁹⁰, detectan la presencia del receptor estrogénico por encima del 95% de los casos estudiado, mientras que la expresión del receptor para progesterona disminuye encontrándolo en un 60-70% de los casos. En el análisis de nuestra serie de casos constatamos datos muy similares con una tasa de positividad para RE del 95% en la variedad clásica del carcinoma lobulillar, mientras que se mostró discretamente inferior para la variedad pleomorfica(92,9%), siendo del 100% positivos en los casos intermedios. Tal y como revelan los estudios de Rathka EA y cols. y Arpino G y cols^{90,125}, la presencia de receptores para progesterona disminuyó a unas tasas muy similares a las descritas por éstos, situándose en una expresión del 64.3% para los pleomórficos y del 79,6 % para la variedad clásica, los tumores de tipo intermedio de nuevo mostraron curiosamente una positividad del 100% para progesterona, aunque no se logró alcanzar una significación estadística suficiente, se observa la tendencia a mostrar una menor positividad de expresión hormonal en los pleomórficos.

En cuanto C-erb-b2, se constató una menor representatividad en el subtipo lobulillar clásico con una tasa del 14.3%, siendo duplicada por el subtipo pleomórfico que muestra una tendencia a sobreexpresarse, con tasas del 34% en la población a estudio. No es posible extraer conclusiones de los casos intermedios. Para Butler D y Rosa M¹³² la positividad de esta proteína en las células tumorales de la mama es indicativo de una mayor agresividad tumoral comparable con el carcinoma ductal de alto grado, con lo que dados los resultados y mejorando la potencia estadística del estudio se le podría atribuir a la variante pleomófica . Divani Sn y cols.⁹², en un estudio en enero de 2015, basado en los resultados histopatológicos de 46 pacientes con PAAF de CLI, consideran la ausencia de sobreexpresión de C-erb-b2 como un parámetro para la identificación de los tumores lobulillares de mama de otras estirpes, conjuntamente con los RH y la ausencia de E-cadherina, pero curiosamente, son las

características morfológicas y arquitecturales de las células las que se postulan como criterios diagnósticos y no los inmunohistoquímicos, a pesar de que las muestras se extraen de punciones con aguja fina.

En cuanto al Ki-67, no encontramos en nuestro estudio datos significativos que nos permitiesen asociar el marcador de proliferación con los tipos de CLI, detectándose una alta expresión de Ki 67, en torno al 65% en los tres subtipos. A tenor de las evaluaciones de este parámetro que encontramos en la literatura^{57,95}, el valor de Ki 67 en el carcinoma de mama parece alcanzar mayor valor predictivo que diagnóstico y pronóstico, principalmente cuando se relaciona con los subtipos intrínseco, asociando un riesgo alto de recurrencia local tumoral cuando éste se manifiesta con una expresión elevada por encima del 20%. En un estudio reciente encabezado por Narbe U y cols.⁹⁵, se relaciona bajos niveles de Ki 67, asociado a otros como son los RE, y datos clínicos como tamaño tumoral reducido y ausencia de afectación ganglionar con carcinomas lobulillares de buen pronóstico a largo plazo, en los que no sería necesario un tratamiento quimioterápico en caso de registrar valores reducidos de los parámetros descritos. En caso contrario se identificaría un grupo de mayor riesgo, con necesidades de tratamiento adyuvante¹⁰³.

Al valorar la expresión de PTEN no se encontró asociación con ningún tipo de carcinoma lobulillar, en otros estudios se halló delección del mismo en 78 al 81 % de tumores pleomórficos y clásicos respectivamente, siendo del 60% en los tumores clasificados como intermedios. Así en estos encontramos el gen característicamente en un 40% de los casos, casi el doble que en los anteriores. Aunque pocos son las publicaciones que se datan sobre este parámetro su positividad se ha asociado a la capacidad invasiva y metastásica de los carcinomas mamarios en general⁹⁶. En otros tejidos¹³² (tracto genitourinario) la pérdida de este oncogen se ha asociado a tumores de peor pronóstico, en mama parece estar más relacionado a tumores triple negativos (de peor pronóstico también) y HER2 (en un 35.1% y 10.9%) y se ha considerado independiente de la expresión de receptores hormonales, lo que coincidiría con nuestros resultados. En un estudio publicado en año 2000 en el que se evaluaron 80 tumores infiltrantes lobulillares de mama la mutación de PTEN se detectó en un 2%^{97,98}. En relación al carcinoma de mama, particularmente en el subtipo ductal, un

descenso en los niveles moleculares de PTEN, se ha relacionado con resistencia a la apoptosis y secundariamente al tratamiento con trastuzumab y por lo tanto como factor de mal pronóstico en tumores con sobreexpresión de HER 2¹²⁷.

Las bajas tasas de sobreexpresión de las proteínas P53 y P63, se corresponden con los datos que existen en la comunidad científica^{56,57} en la que se han relacionado a ambas con señales de transcripción intracelular, aunque pocos son los datos de estas que se registran en relación al carcinoma lobulillar de mama.

La proteína P53, se ha intentado relacionar en varios estudios con tumores de mama asociándola a tumores de peor pronóstico y comportamiento más agresivo, y en el caso del carcinoma de mama a la variedad pleomorfica, al que se le atribuye clásicamente peor comportamiento biológico. Pocos datos concretos encontramos de ésta proteína, excepto se que ha comprobado más sobreexpresada, conjuntamente con HER2 en éstos últimos⁹⁵, datos apoyan los obtenidos en nuestra serie de lobulillares, con tasas de sobreexpresión muy similares. En un reciente estudio publicado en agosto de 2015⁹⁹, se evalúa la relación pronóstica en tumores luminales de tipo A (los subtipos intrínsecos más frecuentes en los carcinomas lobulillares) asociando P53 con Ki-67. Se llegó a la conclusión de que la sobreexpresión de ambos parámetros en carcinomas Luminales A, se asociaba a un comportamiento más agresivo de éstos, mientras que la perdida de expresión de ambos parámetros se constituye como la mejor herramienta para predecir el bajo riesgo en carcinomas de mama Luminales A. Con los datos obtenidos de nuestro estudio podemos observar que tal y como se afirma previamente en las publicaciones la mayor sobreexpresión de P53 la encontramos en los tumores lobulillares pleomórficos con una tasa de expresión relativamente alta (30.8%) respecto a la que se registra en las publicaciones, pero que probablemente sea debido a que la positividad en esta proteína se ha considerado con valores > del 5% , mientras que el estudio de Se Kyung Lee⁹⁹ se consideró con valores por encima del 10% . En cuanto al subtipo intrínseco que más se registra en las pacientes con sobreexpresión de P53 es el luminal, aunque en nuestra serie no distinguimos entre luminales A y B, si entre estos y los subtipos “B like”. De estos datos sugerimos que con un periodo de seguimiento más largo y un tamaño muestral mayor, podríamos valorarlos desde una perspectiva pronóstica.

La proteína P63, ha sido poco evaluada en relación con los tumores de mama y en especial, y aún con menor frecuencia en los carcinomas lobulillares. La pérdida de la expresión de esta proteína, ubicada en las células mioepiteliales ductulo-lobulillares, se ha relacionado con el proceso de malignización de lesiones precursoras de cáncer de mama que se desarrolla tras la pérdida de función celular, y se relaciona con el grado de agresividad, favoreciendo la infiltración tumoral¹⁰⁰. No encontramos estudios que relacionen la pérdida de expresión de P63 con variedad lobulillar del cáncer de mama, nuestros resultados arrojan una pérdida casi total de la expresión de la misma, sobre todo en las variedades intermedias y pleomórficas, mostrando positividad sólo en un porcentaje del 13% en los clásicos, con lo que podría la pérdida de la expresión asociarse a tumores más agresivos.

El marcador de proliferación celular PCNA parece estar muy sobreexpresado en carcinoma de mama. En la bibliografía encontramos estudios que intentan vincular este parámetro con la actividad proliferativa asociarlo a Ki67 como índice proliferativo. Sin embargo no se ha encontrado asociación alguna entre el Ki 67 y la sobreexpresión de PCNA. En nuestro estudio los valores obtenidos de PCNA alcanzan prácticamente el 100% de expresión con valores discretamente inferiores en la variante clásica. No se ha valorado una relación con la actividad proliferativa ni con Ki 67 aunque se objetivan valores muy dispares de uno y otro parámetro, y en revisiones previas se postula como un factor independiente y con poca capacidad predictiva. Según la publicación en la revista *Breast*, en agosto 2008, en 11 estudios de PCNA, con 2677 pacientes con carcinoma de mama, la sobreexpresión de esta molécula se asocia a una menor supervivencia en tumores en estadios precoces^{102,104,105}.

Los datos encontrados para el análisis de EGRF en nuestro estudio son similares a los descritos en el *British Journal of Cancer* por G. Terry y cols.¹⁰⁵, aunque con distintos valores, que evalúan conjuntamente PCNA y EGRF (en una serie de 71 casos), pero en lesiones mamarias benignas, premalignas y malignas. Ellos encuentran resultados de sobreexpresión de EGRF bajos y de forma paralela a la potencial agresividad tumoral de la lesión. Sin embargo, este estudio no valora los biomarcadores y tampoco los particulariza en el carcinoma infiltrante. Los resultados de nuestra serie, son similares para las tres variedades de carcinoma lobulillar, por lo

tanto no se relacionan con alguno de los subtipos de CLI. Si parecer presuponerse que como afirman numerosas revisiones clínicas, que la variante clásica es la menos agresiva (o más diferenciada), nuestros datos apoyarían discretamente esta teoría respecto a los resultados de EGRF, ya que se ha mostrado en la variante clásica una sobreexpresión del 7.3%. Aunque en el trabajo de M.A Arrechea e Irigoyen M.A. en 2011¹¹³ afirman que EGRF constituye un buen marcador conjuntamente con otros para la clasificación molecular del carcinoma de mama en general, (no exclusivamente del subtipo lobulillar), en nuestro estudio no hemos obtenido datos relevantes con este marcador¹¹³.

Obtuvimos en el análisis estadístico unos valores de sobreexpresión de BCRA bastante similares en la variedad pleomórfica e intermedia, destacando sobre todo una sobreexpresión de BCRA en los categorizados como clásicos, con un 73.3 % de expresión, aspecto que resulta interesante dado que, en cáncer de mama no familiar, su expresión suele ser reducida. En la variante pleomorfica, aunque la sobreexpresión detectada es menor que la variante clásica, cabe reseñar que en todos los pacientes que sobreexpresaron BCRA, esta superó valores del 80%. A pesar de presuponer que esta positividad se relaciona con la mutación genética, tras realizar la misma en las pacientes no se corroboró su existencia, por lo que debe de haber alguna reacción cruzada entre el anticuerpo relacionado con la proteína y algún componente celular que haga que esté sobreexpresado en la mayoría de los casos de nuestro estudio. El caso más claro fue el de una paciente que desarrolló un tumor con 45 años y presentaba cirugía ginecológica previa, se sospecho pero no se confirmó los antecedentes familiares y el subtipo intrínseco tampoco apoyaban esta sospecha.

Un reciente estudio de **Thike AA** y cols.¹⁰⁶, muestra una débil expresión de BCRA1 en los carcinomas mamarios no hereditarios y lo ha relacionado con la proteína ID-4 (inhibidor proteína ligando a DNA) y la presencia de P53. En este registro los autores, coincidiendo con otros estudios anteriores concluyen que una pérdida de la expresión de BCRA1 y BCRA2 se relaciona principalmente con tumores triple negativo, con peor pronóstico e índices de recurrencia local mayores. Si consideramos que los subtipos predominantes en los carcinomas lobulillares es el subtipo luminal, podemos comprobar cómo nuestro registro, a pesar de que precisaría un estudio genético en

aquellas pacientes más jóvenes y un mayor número de pacientes, apoyaría los datos de publicaciones previas. Sin embargo no hemos encontrado datos que relacionen de forma específica la sobreexpresión de BCRA con carcinomas lobulillares, ni la pérdida de la misma con tumores más agresivos (sólo encontramos una paciente con triple negativo que mostró pérdida de la expresión de BRCA).

El estudio para la proteína P-rb, mostró sobreexpresión con valores elevados, destacando principalmente en el subtipo pleomórfico, en el que supera el 90%, discretamente inferiores para el resto. Aunque los datos no señalan significación estadística, las cifras no impresionan que esta proteína tenga protagonismo especial en el carcinoma lobulillar y/o con algún subtipo concreto. Los pocos estudios que relacionan esta proteína con el diagnóstico o caracterización del carcinoma mamario, las investigaciones se dirigen a relacionar la inactivación de las vías de transcripción de esta proteína, junto con la inactivación de P53, con resistencia al tratamiento a la quimioterapia¹⁰⁷. Sin embargo no es un dato que se haya reseñado en nuestra serie para la caracterización del carcinoma lobulillar. Como proteína mediadora en regulación del ciclo celular, mutaciones de la misma pueden originar su sobreexpresión en procesos tumorales.

Para la proteína P-21, se detectó una baja expresión en los tres tipos de carcinoma lobulillar, sin diferencias significativas en los datos obtenidos, lo cual no nos permite asociar o inferir la baja actividad de esta proteína con algún subtipo y atribuirle un pronóstico. En un reciente estudio molecular en cáncer de mama, publicado en abril de 2015, la sobreexpresión de P-21 se ha relacionado con neoplasias que evolucionan con peor pronóstico, ya que tienen sobreactivadas las vías de proliferación celular mediadas por cinasas y dependientes de la presencia de esta proteína celular¹⁰⁸. Los estudios que se encuentran de P-21 tienen una fuerte carga a nivel molecular y poco se relacionan con las manifestaciones clínicas o el comportamiento del tumor, especialmente en cáncer de mama por lo que no nos permite hacer inferencias acerca del significado clínico y pronóstico de los datos obtenidos en nuestra serie. Es conocido por estudios moleculares que pérdida de expresión de esta molécula, interferiría con la vía intracelular de apoptosis mediada por cinasas y P21 (PIK1) en el momento de una proliferación tumoral descontrolada.

Pero no es específica de carcinoma mamario y no se ha conseguido relacionar con ningún tipo histológico de los que abordamos en nuestra serie¹⁰⁹.

En cuanto a los resultados obtenidos de sobreexpresión de la proteína BCL-2 cabe reseñar, tal y como apuntan algunos estudios, su elevada presencia concomitantemente con tumores de elevada expresión de receptores hormonales ya sean tanto estrógenos como progesterona¹¹¹. Estudios de los que se recogen de estos datos la correlacionan inversamente con el grado de proliferación (Ki 67) y la muestran independiente de HER 2 y EGRF. En este sentido, podemos reforzar esta afirmación puesto que los datos hallados en nuestra serie donde se observa un predominio evidente de expresión de receptores hormonales junto con valores de Bcl-2 mayores del 95% en los tipos clásicos e intermedios. Mientras existe un pequeño porcentaje en torno al 15% de los pleomórficos en los que no se sobreexpresa que, según los estudios previos, se asociaría a un peor índice de supervivencia debido a una diferenciación menor, en caso de tener un seguimiento prolongado de la población^{111,113}. Del mismo modo y como afirman los esta publicación, en nuestro registro también encontramos valores inversamente proporcionales de EGRF y HER 2. Nadler Y cols.¹¹⁵ en su revisión identifica la sobreexpresión de Bcl-2 predictor de buen pronóstico independiente del grado histológico de la neoplasia. Según los datos que recogemos de nuestra serie el subtipo pleomórfico, con menos expresión de la proteína, se asociaría a un peor pronóstico. En relación al índice de proliferación los datos no permiten corroborar esta relación inversa que defienden algunos grupos, dado que los valores obtenidos Bcl-2 y Ki no se discrepan suficientemente. Este hecho probablemente se deba a que en la serie que manejamos la positividad para Ki 67 se aceptó con valores >5% .

La detección de P-S2 en nuestro estudio no reveló datos diferenciales entre los distintos grupos de CLI. Si observamos una tendencia a la sobreexpresión de P-S2 que se aproxima al 60% en todos ellos. Algunos estudios han relacionado la sobreexpresión de esta proteína en células tumorales de mama como factor pronóstico favorable. En cambio si consideramos las pacientes de nuestra serie, los tres subtipos sobreexpresan la proteína con las mismas tasas, sin permitir asociarlo a un mejor pronóstico, por lo que no podríamos estar en consonancia con este estudio, de Xu I y cols⁵⁰.

Los datos obtenidos para Catepsina D valoradas en nuestro estudio mostraron datos sin significación estadística, aunque destaca que apenas existe sobreexpresión proteica, con excepción de la variedad clásica. Dian D et al¹¹² en 2014, relaciona la sobreexpresión de esta molécula con carcinomas ductales principalmente, y parece mucho menos frecuente en los de estirpe lobulillar, con lo que los datos obtenidos en nuestro estudio serían concordantes con ello. Se vincula también la sobreexpresión de esta molécula estructural, con afectación ganglionar y según se encuentra en la serie de Dian D¹¹², parece que niveles mayores de Catepsina D se relacionan con tumores triple negativos, y por lo tanto se le atribuye peor pronóstico. En nuestro estudio y atendiendo a esta pautas nos preguntamos si a la variedad lobulillar clásica entonces, hay que atribuirle un peor pronóstico, cuando se asocia a menor afectación nodal y clásicamente ha sido considerada como menos agresiva que los demás. Por lo tanto parece que el significado biológico en los tumores lobulillares no sea equiparable al del carcinoma ductal.

En cuanto a la expresión de e-cadherina, a pesar de que se ha establecido como un parámetro diagnóstico de exclusión de carcinoma lobulillar⁸⁰, la presencia de esta proteína de membrana en porcentajes que oscilan entre el 16% y el 18 %, no deja de sorprender y parece indicar que los tumores lobulillares con expresión de e-cadherina aberrante son más frecuentes de lo que hasta ahora se había considerado^{80,91}. Además se la ha atribuido protagonismo en lo que se refiere a la capacidad invasiva y metastásica de éstos¹¹⁴. Lo que sugiere que en carcinoma de mama, bajos niveles de expresión de e-cadherina se asocian a peor pronóstico con patrones más infiltrativos⁷⁰. Parece, según informa en su estudio Engstrom MJ⁸⁰ que la pérdida de e-cadherina para tumores con grado histológico 2 implica peor comportamiento, tanto en los carcinomas ductales como en los lobulillares pero no se puede considerar como marcador pronóstico del carcinoma lobulillar. Del mismo modo ocurre con los tumores clasificados según el subtipo molecular intrínseco: luminal A y luminal B, tanto para CLI como CDI. De modo que han inferido que la e-cadherina no constituye sólo un papel de adhesión celular, sino que interviene también en procesos de replicación celular, como gen supresor. En este estudio la presencia de e-cadherina en tumores lobulillares variaba entre 0 y 20%. En nuestro estudio encontramos una frecuencia de

sobreexpresión de e-cadherina muy aproximada, globalmente del 17.7%, los subtipos lobulillares que la expresan, con valores discretamente superiores, son los carcinomas clásicos (8 casos), aunque no alcanzamos la significación suficiente.

Por otra parte la presencia de e-cadherina en neoplasia lobulillares de mama ha sido definida histopatológicamente como “e-cadherina aberrante”. Aunque algunos autores han considerado que la presencia de e-cadherina en tumores lobulillares detectados mediante técnicas de IHQ, puede deberse a que los anticuerpos que se utilicen no reaccionen correctamente con el complejo que a veces hace dicha proteína con otra proteína de adhesión celular, la catenina. Para valorar esta posible asociación se plantea un nuevo estudio con mayor reclutamiento de pacientes. Sin embargo otros estudios inmunohistoquímicos afirman la existencia de un paralelismo absoluto entre la presencia o ausencia de e-cadherina en membrana y catenina intracitoplasmática, por lo que atendiendo a sus resultados no sería necesario valorar la sobreexpresión de ambas proteínas¹¹⁴.

6.2.4 AGRUPACIÓN DE VARIABLES POR FUNCIÓN CELULAR

Sabemos que en el proceso de malignización existen distintos mecanismos que influyen determinados oncogenes, genes supresores y sobreexpresión o pérdida de proteínas que intervienen en las vías de señalización intracelular, en procesos de reparación de la de DNA dañado. Parte de las proteínas y oncogenes que han sido valorados en nuestro estudio han sido reagrupados para valorar que tipo de señal podría predominar en el proceso de desarrollo del carcinoma lobulillar y comprobar si existe un predominio de unos u otros en función de la variante lobulillar que se tratase.

Se valoraron 5 grupos.

En el grupo de variables relacionadas con la respuesta hormonal (RE, RP, Ps-2).

En general las publicaciones que tratan la sensibilidad hormonal del carcinoma lobulillar, les otorga unas tasas muy elevadas de sobreexpresión, como ya hemos dicho anteriormente. No encontramos en la literatura datos que interrelacionen de forma

directa las tres moléculas, aunque en alguna publicación relacionan las tres proteínas en la línea celular epitelial mamaria MCF7, que podría adquirir protagonismo en el desarrollo de neoplasias hormonodependientes, como lo son la mayoría de los tumores luminales, ya se trate de variedad ductal o lobulillar. No nos ha sido posible contrastar estos resultados con otros trabajos. De los datos extraídos de nuestro trabajo comprobamos que aunque sin la suficiente potencia estadística, las mayores tasas de expresión las encontramos en el subtipo intermedio, donde, con expresión de los tres parámetros en más de 66% de los casos. Ante este resultado y si fuese reproducible con un aumento del tamaño muestral y seguimiento prolongado, nos podríamos plantear si son estos los casos de carcinoma lobulillar que muestran la mayor respuesta al tratamiento hormonal. Pero por el contrario, observamos que en los 4 casos que se registran de este pequeño grupo de pacientes se trata de mujeres premenopaúsicas, jóvenes, con un tamaño tumoral grande, con afectación ganglionar muy dispar.

En cuanto a los resultados de la alteración de genes relacionados con la apoptosis que codifican biomarcadores celulares relacionados en carcinoma lobulillar de mama (p53 y Bcl-2), no se mostró ampliamente relacionada con el desarrollo de esta tipo de carcinoma. Probablemente debido a que ambas proteínas se presentaron con unas tasas muy similares en todos los tipos de carcinoma lobulillar y no nos permite inferir diferencias. Solo se observa una positividad discretamente inferior en los tumores pleomórficos, que precisaría de estudios mucho más extensos para interpretar dichos resultados, de forma global. Podemos sobreinterpretar que a menor expresión de estas proteínas, menos fenómenos de apoptosis aparecerán en los tejidos mamarios dañados que conllevaría más acúmulo de mutaciones y de lesiones que favorecería la transformación neoplásica de este epitelio mamario.

La sobreexpresión de oncogenes (p53, P21 y Prb), con fallos en sus mecanismos de control, podría llevar al proceso previo de una proliferación celular descontrolada, obtuvimos valores muy similares en todos los subtipos lobulillares, discretamente mayores en el subtipo pleomórfico sin poder inferir una relación real dada la similitud de los datos y el tamaño muestral. En lo que respecta a los genes supresores, si que se observan mas discrepancias entre los subtipos de carcinoma lobulillar puede existir

una tendencia a la relación de estos con el subtipo intermedio , donde más positividad aparece para todos ellos, aunque de nuevo los escasos casos de esta línea no nos permite hacer inferencias fundadas.

Como ya hemos reseñado antes, tanto PCNA como Ki 67 se consideran indicadores de actividad proliferativa¹³⁴. En general en los tumores lobulillares la mayor actividad proliferativa se ha registrado en los tumores pleomórficos. De momento aunque se ha valorado en algunos estudios PCNA no ha conseguido desbancar a Ki 67 en esta función, y Ki 67 a efectos clínicos, pronósticos y de tratamiento continúa considerándose el principal índice de replicación celular. Nuestra serie Ki 67 es el índice que mayores diferencias muestra dentro de un mismo tipo de carcinoma lobulillar y entre estas, pero con poca variabilidad de datos. Consideramos que con una ampliación del estudio y basándonos en el índice Ki67 los datos nos permitirían confirmar esta discreta tendencia que parece existir.

6.3 LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS DEL ESTUDIO.

Las limitaciones del estudio se derivan principalmente de la fecha en la que comienzan a reclutarse los datos de las pacientes. El estudio comienza en 2007, puesto que fue en esta fecha donde comenzó a constituirse la unidad de mama funcional de este hospital, dado que el hospital fue totalmente reconstruido e inaugurado en 2006, de ahí que el registro no pueda ser mucho mayor. Esto ha limitado varios factores:

1. El tamaño muestral que se consigue para el estudio es pequeño, a lo que habría que sumar el hecho de que el carcinoma lobulillar es una entidad poco frecuente en relación al conjunto de carcinomas de mama que son diagnosticados y la pérdida en el proceso de algunas pacientes por distintos motivos (modificaciones de área sanitaria y cirugía privada en 2 casos), por lo que hemos diseñado un protocolo para seguir recogiendo casos que amplíen la muestra.

2. El seguimiento de las pacientes no ha sido suficiente para hacer estudios de supervivencia puesto que la comunidad científica valora un seguimiento mínimo de 10 años en carcinoma de mama, gracias a las elevadas tasas de sobrevida que se están alcanzando con los avances en el manejo y tratamiento del cáncer de mama en general. Es necesario para poder establecer estos índices de supervivencia, continuar con el estudio para a partir del 2017 estar en condiciones de emitir dichos datos.

Por esto consideramos mantener el seguimiento de las pacientes y aumentar el tamaño muestral con nuevos casos o valorar un estudio multicéntrico para un

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El estudio clínico-epidemiológico de las variables demostró:

- La existencia de diferencias entre el subtipo de CLI clásico (mujeres perimenopausicas, sin asociación familiar, estadio clínicos precoces II, tratamiento quirúrgico conservador) del subtipo de CLI pleomórfico (mujeres postmenopausicas con una edad de presentación más avanzada, estadios clínicos más avanzados III y IV, y un tratamiento quirúrgico más agresivo).
- Los casos de CLI Intermedio se presentaron en mujeres más jóvenes, con lesiones de tamaño superior a 50mm y se relacionaron con historia familiar de cáncer de mama

2. El estudio de las variables histopatológicas demostró:

- Tanto las variantes clásica como la intermedia presentan lesiones de mastopatía fibroquística en aproximadamente un tercio o la mitad de los casos respectivamente, aunque no hubo diferencias en su asociación con el componente neoplásico intraepitelial, lesiones de hiperplasia lobulillar , infiltración linfovascular. No se demostró asociación o independencia de la afectación ganglionar.
- La variante pleomorfica de CLI se presenta con independencia de lesiones de mastopatía fibroquística. Sin embargo se detecta una clara tendencia a presentar asociación con componente intraductal, probablemente debido al tamaño de la muestra y una tendencia a la afectación ganglionar, registrando tasas elevadas de la misma.

3. El estudio de a las variables inmunohistoquímicas demuestra:

- Una elevada sobreexpresión de receptores hormonales, tanto estrogénicos como de progesterona, destacando en la variante clásica .En la misma dirección se presenta un alto índice de proliferación indicado por Ki-67. La sobreexpresión de Her-2 se detecta con tasas muy discretas en la serie, y muestra una tendencia a estar ausente en el subtipo clásico de CLI.

- La variante pleomórfica muestra menor grado de expresión de receptores hormonales y tasas más elevadas de Ki-67 y Her-2, por lo que es más frecuentemente clasificado como carcinoma Luminal B like o incluso mayor tendencia a ser triple negativo.
- La expresión de Catepsina D, mostró tendencia a manifestarse en la variante clásica de CLI, y en sentido opuesto en la variante pleomórfica.
- En el resto de marcadores considerados no se halló asociación ni tendencia a la misma.
- No se encuentra evidencia suficiente para poder asociar las diferentes características relacionadas con marcadores inmunohistoquímicos, agrupados por función celular, y las variantes histopatológicas clásicas de carcinoma lobulillar infiltrante de mama.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFÍA

1. Sanchez MJ et als. Cancer incidence and mortality in Spain: estimates and proyections for the period 1981-2012. *Anna oncol* 2010 may;21
2. Varo- Meca A et als Breast cancer mortality in Spain; has it really declined for all age groups? *Public Health* 2012 Aug 22
3. Marina Pollán et al. Recent Changes in Breast Cancer Incidence in Spain, 1980-2004. *JNCI* November 101(22): 1584-1589
4. Guia clínica de cirugía de la Mama de la AEC, Edit Arán; ©copyright 2006.
5. Eheman CR et al. Teh changing incidence of in situ and invasive ductal and lobular breast carcinomas: United States, 1999-2004. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009; 18 : 18:1763-9
6. Ferlay J et als Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *.Eur J Cancer.* 2013 Apr;49(6):1374-40
7. Arem H et als. Physical Activity and Risk of Male Breast Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2015 Sep 24. pii: cebp.0588.2015.
8. Laure Dossus and Patrick R Benusiglio. Lobular breast cancer: incidence and genetic and non-genetic risk factors. *Breast Cancer Research* 2015 Mar; 17(1):37
9. Christopher I. Li et al. Alcohol consumption and risk of postmenopausal breast cancer by Subtype: The women´s health initiative Observational Study. *JNCI* 2010 sept ;102(18): 1422-1431.
10. Jung S et al. El consumo de alcohol y el cáncer de mama de riesgo por el estado del receptor de estrógeno: en un análisis combinado de 20 estudios. *Int J Epidemiol.* 2015 agosto28.
11. Elinor Sawyer et als. Genetic predisposition to in situ and invasive lobular Carcinoma of the breast *PLOS Genetics.* April 2015;17:12 DOI10.1186
12. Andeas Pettersson et al. Mammographic density Phenotypes and Risk of breast Cancer: A meta-analysis. *Rewiew JNCI* 2014 may; 10; 106(5)
13. Li CI et als Relationship between established breast cancer risk factors and risk of seven different histologic types of invasive breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 May;15(5):946-54.
14. Goodwing PJ et al. Modiificables Factores de estilo de vida y cáncer de pecho Resultados: controversias actuales y de investigación Recomendaciones. *Adv Exp Med biol* 2015; 862: 177-92.

15. Goddwing PJ. Obesidad, resistencia a la insulina y el cáncer de mama, resultados. De mama. 2015 agosto 14.
16. Nguyen C et al Male breast disease: pictorial review with radiologic-pathologic correlation. Radiographics 2013 May; 33(3): 763-79.
17. Anthony Howell et als. Risk determination and prevention of breast cancer. Breast cancer Research 2014, 16:446
18. Goldhirsch A et als. Personalizing the treatment of women with early **breast** cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early **Breast** Cancer 2013. Ann Oncol. 2013 Sep;24(9):2206-23.
19. Newcomb PA et al. Late age at first full term birth is strongly associated with lobular breast cancer, Cancer.2011 May1;117(9):1946-1956.
20. Bernier J et als Partial irradiation of the breast: Old challenges, new solutions. Breast. 2006 Aug;15(4):466-75.
21. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Darby S, et als. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. Lancet. 2011 Nov 12;378(9804):1707-16.
22. Ho A, Morrow M. The evolution of the locoregional therapy of breast cancer. Oncologist. 2011;16(10):1367-79.
23. Piñero A. et als. Tumoral load quantification of positive sentinel Lymph nodes in breast cancer to predict more than two involved nodes. Breast. 2014 Dec;23(6):859-64
24. Moncayo VM et als. Status of sentinel Lymph node for breast cancer. Semin Nucl Med. 2013 Jul; 43(4):281-93
25. WHO classification of tumors of the breast.2012
26. Hüseying K et als .Comparision of the histopathology and prognosis of bilateral versus multifocal multicentric breast cancers. World Journal of Surgical Oncology 2014,12:266.
27. Truin W et als .Differences in response and Surgical Management with Neoadyuvant Chemotherapy in Invasive Lobular Versus Ductal Breast Cancer. Ann Surg Oncol, 2015 May 16.
28. Farese SA, Aebi S. Infiltrating lobular carcinoma of the breast: systemic treatment. Breast Dis. 2008-2009;30:45-52
29. García-Fernández A et als . Comparative Long- term Study of a Large Series of Patients with Invasive Ductal Carcinoma and Invasive Lobular Carcinoma. Loco-Regional Recurrence, Metastasis, and Survival. Breast J. 2015 Sep;21(5):533-7
30. Volker R et als. The evolution of the locoregional therapy of breast cancer. Oncologist 2011october;16(10): 1 367-1379
31. Cao AY, Tumor characteristics and the clinical outcome of invasive lobular carcinoma compared to infiltrating ductal carcinoma in a Chinese population. World J Surg Oncol. 2012 Jul 17;10:152.
32. Esposito A et als. Highligths from the 14th St Gallen International Breast Cancer Conference 2015 in Vienna: Dealing with classification, prognostication, and prediction refinement to personalize the treatment of patients with early breast cancer.
33. Manual de Práctica Clínica en Senología 2015, 3ª edición. Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria

34. Suzuki E et al. trogocytosis- mediated expression of HER2 on inmune cells may be associated witha pathological complete response to trastuzumab-based primary systemic therapy in HER2-overexpressing breast cáncer patients. BMC cancer 2015 Feb 6;15(1): 39.
35. Kümler I et als. A systematic review of dual targeting in HER2-positive breast cancer. Cancer Treat Rev. 2014 Mar;40(2):259-70.
36. Perou CM et als. Molecular portraits of human breast tumours. Nature. 2000 Aug 17;406(6797):747-52
37. Rastelli F, Crispino S. Factors predictive of response to hormone therapy in breast cancer. Tumori. 2008 May-Jun;94(3):370-83.
38. Rosen´Breast Pathology, thrird Edition,©2009 Lippincott Williams&Wilkins. ISBN-13:978-0-7817-7137-5.
39. Park JS et als. Comparison of Clinicopathological Features and Treatment Results between Invasive Lobular Carcinoma and Ductal Carcinoma of the Breast. J Breast Cancer. 2015 Sep;18(3):285-90.
40. Britta el als. Histological types of breast cancer : How special are they?. Molecular Oncology 4(2010)192-208.

41. Jethava A et als . Diagnostic Accuracy of MRI in Predicting Breast Tumor Size: Comparative Analysis of MRI vs Histopathological Assessed Breast Tumor Size. Conn Med. 2015 May;79(5): 261-7.
42. Adkisson CD et als. Is postexcision, preradiation mammogram necessary in patients after breast-conserving surgery with negative margins. Ann Surg Oncol. 2013 Oct;20(10):3205-11.
43. Alkatout I et als . Surgical impact of new treatments in breast cancer. Minerva Ginecol. 2013 Aug;65(4):363-83. Review.
44. Reed Amy E Mc et als. Invasive lobular carcinoma of the breast: morphology, biomarkers and ´omics. Breast Cancer Research(2015)17:12.
45. Petrelli F , Barni S. Response to neoadjuvant chemotherapy in ductal compared to lobular carcinoma of the breast: a meta-analysis of published trials including 1,764 lobular breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2013 Nov; 142(2):227-35.
46. Sikora MJ et als. Invasive Lobullar Carcinoma cell lines are characterized by unique estrogen-mediated gene expression patterns and altered tamoxifen response. Cancer Res. 2014 March 1;74(5): 1463-1474.
47. Korhonen T et als. The impact of lobular and ductal breast cancer histology on the metastatic behavior and long term survival of breast cancer patients. Breast.2013 dec;22(6): 119-24.
48. W Truin et als. Patients with Invasive Lobular Breast Cancer Are Less Likely to undergo Breast-conserving-Surgery: a population Based Study in Netherlands. Ann surg oncol(2015)22:1471-1478.
49. Conlon N et als . Is There a Role for Oncotype Dx Testing in Invasive Lobular Carcinoma? Breast J. 2015 Sep;21(5):514-9.
50. Marchió C et als. Predictive Diagnostic Pathology in the Target Therapy Era in Breast Cancer. Curr Drug Targets.2015 Feb 3.

51. Leong AS, Zhuang Z. The changing role of pathology in breast cancer diagnosis and treatment. *Pathobiology*. 2011;78(2):99-114.
52. Perou CM et als. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747-52.
53. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. Cancer Genome Atlas Network. *Nature*. 2012 Oct 4;490(7418):61-70.
54. Grote A et als. Exploring the spatial dimension of estrogen and progesterone signaling: detection of nuclear labeling in lobular epithelial cells in normal mammary glands adjacent to breast cancer. *Diagn Pathol*. 2014; 9 Suppl 1:S11.
55. Anthony S-Y, Leong Zhenping, Zhuang. The Changing Role of Pathology in Breast Cancer Diagnosis And Treatment. *Pathobiology* 2011;78:99-114.
56. Yallowitz AR et als. Mutant p53 Amplifies Epidermal Growth Factor Receptor Family Signaling to Promote Mammary Tumorigenesis.
57. Shokouh TZ et als. Interrelationships Between Ki67, HER2/neu, p53, ER and PR status and their associations With Tumor Grade and Lymph Node Involvement in Breast Carcinoma Subtypes: Retrospective Observational Analytical Study. *Medicine(Baltimore)* 2015 Aug;94(32):e1359.
58. Nieder C et als. The challenge of p53 as prognostic and predictive factor in Hodgkin's or non-Hodgkin's lymphoma (review). *Ann Hematol* 2001;80:2-8.
59. NH, Lane DP. Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J Cell Sci* 1990;96:121-9
60. Koeppen HKW, et als. Overexpression of HER2/neu in solid tumours: an immunohistochemical survey. *Histopathology* 2001; 38:96-104.
61. Saiz-Ladera C, et als. P21 suppresses inflammation and tumorigenesis on pRB-deficient stratified epithelia. *Oncogene*. 2014 Sep 11;33(37):4599-612.
62. Haralambieva E, et als. Clinical, immunophenotypic, and genetic analysis of adult lymphomas with morphologic features of Burkitt lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2005; 29:1086-94
63. Perren A, et als. Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast. *Am J Pathol* 1999; 155(4):1253-1260
64. Di Como CJ, et als. p63 expression profiles in normal and tumor tissues. *Clin Cancer Res* 2002; 8:494-501.
65. Beckmann MW, et als. Immunohistochemical detection of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in paraffin sections of breast carcinoma tissue: correlation and clinical significance. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 1995 May;55(5):258-65
66. Schlessinger J, et als. Regulation of cell proliferation by epidermal growth factor. *CRC Crit Rev Biochem*. 1983;14:93-111

67. Andrews J L, et als. The role and function of cadherins in the mammary gland. Breast cancer Res 2012;14(1):203
68. Rathka EA, et als. Clinical and biological significance of e-cadherin protein expression in invasive lobular carcinoma of the breast. Am J. Surg Pathol.2010;34:1472-1479.
69. Dian D, et als. Significance of the tumor protease cathepsin D for the biology of breast cancer. Histol Histopathol. 2014 Apr;29(4):433-8.
70. Jeschke U, et als. Expression of sialyl lewis X, sialyl Lewis A, E-cadherin and cathepsin-D in human breast cancer: immunohistochemical analysis in mammary carcinoma in situ, invasive carcinomas and their lymph node metastasis. Anticancer Res. 2005 May-Jun;25(3A):1615-22.
71. Martinez V Azzopardi JG. Invasive lobular carcinoma of the breast: incidence and variants. Histopathology.1979;3:467-488.
72. Narendra S, et als . Clinical outcome in pleomorphic lobular carcinoma: a case-control study with comparison to classic invasive lobular carcinoma. Ann Diagn Pathol.2015 April;19(2):64-69
73. Anna Bozzini, et als. Sensitivity of imaging for multifocal-multicentric breast carcinoma, Gi. BMC Cancer 2008, 8:27518.
74. Lewis JL, et als. The significance of lobular carcinoma in situ and atypical lobular hyperplasia of the breast. Ann Surg oncol.2012 dec; 19(13):4124-8.
75. Thaer Khoury, MD et als. Pleomorphic lobular carcinoma in situ of the breast: clinicopathologic review of 47 cases. Histopathology. 2014 June ; 64(7): 981–993
76. Anderson BO, et als. Evolving concepts in the management of lobular neoplasia. J Natl Compr Canc Netw. 2006 may; 4(5):511-22.
77. Murray M P, et al. Classic Lobular Carcinoma In Situ and Atypical lobular Hyperplasia at Percutaneous Breast Core Biopsy, Outcomes of prospective Excision. Cancer March 1, 2013; 1073
78. Abner AL, et als. The relation between the presence and extent of lobular carcinoma in situ and the risk of local recurrence for patients with infiltrating carcinoma of the breast treated with conservative surgery and radiation therapy. Cancer. 2000 Mar 1;88(5):1072-7.
79. Oiwa , et als. Sclerosing adenosis as a predictor of breast cancer bilaterality and muticentricity. Virchows Arch. 2015 Jul;467(1):71-8.
80. Monica J Engstrom, et als. Invasive lobular breast cancer: the prognostic impact of histopathological grade, E- cadherin and molecular subtypes. Histopathology 2015 Feb; 66(3):409-19.
81. Fredersdorf S, et als. Characterization of a panel of novel P21 monoclonal antibodies and immunochemical analysis of P21 expression in normal human tissue. Am J Pathol 1996; 148:825-35.
82. Douglas S, et als. Lobular neoplasia: frequency and association with other breast lesions. Diagnostic Pathology 2011, 6:74.

83. Kanumuri P, et als . Characteristics of Multifocal and Multicentric Breast Cancers. *Ann Surg Oncol*. 2015 Aug;22(8):2475-82.
84. Lynch SP ,et als. Breast cancer multifocality and multicentricity and locoregional recurrence. *Oncologist*. 2013; (11):1167-73.
85. Pieri A, et als . Pleomorphic lobular carcinoma in situ of the breast: Can the evidence guide practice? *World J Clin Oncol* 2014 August 10; 5(3): 546-55.
86. Sharma SD, et als. Surgical management of lobular carcinoma from a national screening program: a retrospective analysis. *Eur J Surg Oncol*. 2015 Jan;41(1):79-85.
87. Yerushalmi R, et als .Is breast-conserving therapy a safe option for patients with tumor multicentricity and multifocality? *Ann Oncol*. 2012 Apr;23(4):876-81.
88. Chester R, et als. UK national survey of management of breast lobular carcinoma in situ. *Ann R Coll Surg Engl*. 2015 Nov;97(8):574-7.
89. Apple SK, et als. Significance of lobular intraepithelial neoplasia at margins of breast conservation specimens: a report of 38 cases and literature review. *Diagn Pathol*. 2010 Aug 20;5:54.
90. Rakha EA, et als. invasive lobular carcinoma of the breast: response to hormonal therapy and outcomes. *Eur J cancer*.2008;44:73-83.
91. Dabbs DJ, et als .Lobular neoplasia of the breast revisited with emphasis on the role of E-cadherin immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol*. 2013 Jul;37(7):e1-11.
92. Divani SN, Kardasis ND. Analysis of the cytological features supporting the diagnosis of lobular breast cancer. Factors associated with equivocal diagnoses. *J Buon* 2015. Jan-feb;20(1):40-4
93. Yamazaki N, et als. High expression of post-treatment Ki67 status is a risk factor for locoregional recurrence following breast-conserving surgery after neoadjuvant chemotherapy. *Eur J Surg Oncol*.2015 May; 41(5):617-24.
94. Ribelles N, et als. Pattern of recurrence of early breast cancer is different according to intrinsic subtype and proliferation index. *Breast Cancer Res*.2013;15(5):R98.
95. Nishimura R, et als. Changes in the ER, PgR, HER2, P53 and Ki-67. Biological markers between primary and recurrent breast cancer: discordance rates and prognosis. *World J Surg Oncol*. 2011 Oct 17;9:131.
96. Kechagioglou P, et als. Tumor suppressor PTEN in breast cancer: heterozygosity, mutations and protein expression. *Anticancer Res*. 2014 Mar;34(3):1387-400.
97. Esteva FJ, et als. Pten, PIK3CA, p-AKT and p-p70S6K status: association with trastuzumab response and survival in patients with Her-2 positive metastatic breast cancer. *Am J Pathol*. 2010 oct; 177(4):1647-56.
98. Mercapide J, et als. CCND1-and ERB B2 gene deregulation and PTEN mutation analyses in invasive lobular carcinoma of the breast. *Mol Carcinog*. 2002 Sep; 35(1):6-12
99. Lee SK, et als. Distinguishing Low-Risk Luminal A Breast cancer Subtypes with Ki-67 and P53 is More Predictive of Long-term Survival? *PLoS One*. 2015 aug 4;10(8)
100. Xu Z, et als. Aberrant P63 and WT-1 expresion in myoepithelial cells of pregnancy-associated breast cancer: implications for tumor aggressiveness and invasiveness. *Int J Biol Sci*.2009; 5(1):82-96.

101. Hafez NH, et als. The role of P63 Inmunocytochemistry for Myoepithelial cells in the Diagnosis of Atypical and Suspicious cases in Breast Fine needle Aspiration Cytology. J Egypt Natl Canc Inst. 2010 Jun;22(2):123-34.
102. Tuccari G, et als. PCNA/cyclin expression in breast carcinomas: its relationships with Ki-67, ER, PgR immunostainings and clinico-pathologic aspects. Pathologica 1993;85(1095):47-55.
103. Narbe U, et als. Invasive lobular carcinoma of the breast: long-term prognostic value of Ki 67 and histological grade, alone and in combination with estrogen receptor. Springerplus 2014 Feb 6; 3:70.
104. Stuart- Harris R, et als. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and metaanalysis of 85 studies in 32.825 patients. Breast. 2008 Aug;17(4):323-34.
105. Terry G, et als. The expression of FHIT, PCNA and EGRF in benign and malignant breast lesions. British Journal of Cancer (2007)96, 110-117.
106. Thike AA, et als. Increased ID4 expression, accompanied by mutant p53 accumulation and loss of BRCA1/2 proteins in triple negative breast cancer adversely affects survival. Histopathology. 2015 Aug 11.
107. Knappskog S, et als. Concomitant inactivation of the p53- and pRB- functional pathways predicts resistance to DNA damaging drugs in breast cancer in vivo. Mol Oncol. 2015 Oct; 9(8):1553-64.
108. Ong CC, et als. Small molecule inhibition of group I p21-activated kinases in breast cancer induces apoptosis and potentiates the activity of microtubule stabilizing agents. Breast Cancer Res. 2015 Apr 23; 17:59.
109. Ong CC, et als. P21-activated kinase 1: PAK'ed with potential. Oncotarget. 2011 Jun;2(6):491-6.
110. Page DL, et als. Lobular neoplasia of the breast: higher risk for subsequent invasive cancer predicted by more extensive disease. Hum Pathol . 1991 Dec; 22(12)1232-9
111. Xu L, et als. Expressions of Her-2, EGFR, PS-2 and ER in breast cancer and their clinical implications. 2006 Feb;26(2):231-3.
112. Dian D, et als .Significance of the tumor protease cathepsin D for the biology of breast cancer. Histol Histopathol. 2014 Apr; 29(4):433-8.
113. Arrechea Irigoyen M A, et als. Subtipos moleculares del cáncer de mama: implicaciones pronósticas y características clínicas e inmunohistoquímicas.An. Sist Sanit. Navar 2011, vol 34, nº 2 mayo-agosto.
114. Li X, et als. Diagnostic utility of E-cadherin and P120 catenin cocktail immunostain in distinguishing DCIS from LCIS. Int J Clin Exp Pathol. 2014 Apr 15;7(5):2551-7.
115. Nadler Yasmine, et als. Expression patterns and prognostic value of Bag-1 and Bcl-2 in breast cancer. Breast Cancer Research 2008, 10:R35
116. Binder C, et als. Bcl-2 protein expression in breast cancer in relation to established prognostic factors and other clinicopathological variables. Ann Oncol 1995, 6:1005-1010
117. Gee JM, et als. Immunocytochemical localization of BCL-2 protein in human breast cancers and its relationship to a series of prognostic markers and response to endocrine therapy. Int J Cancer 1994, 59:619-628

118. Rezai M. Breast conservative surgery and local recurrence. *Breast*. 2015 Sep 29. pii:S0960-9776(15)00162-9. doi: 10.1016
119. Lips EH et als. Lobular histology and response to neoadjuvant chemotherapy in invasive breast cancer. *Breast cancer Res Treat*:2012 Nov;136(1):35-43
120. Jauffret C et als. Lobular invasive breast cancer prognostic factors: About 940 patients]. *Gynecol Obstet Fertil*. 2015 Oct 16. pii: S1297-9589(15)00266-0
121. Russo AL et als. Margin status and the risk of local recurrence in patients with early-stage breast cancer treated with breast-conserving therapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2013 Jul;140(2):353-61
122. Chung MA et als. Optimal surgical treatment of invasive lobular carcinoma of the breast. *Ann Surg Oncol*. 1997 Oct-Nov;4(7):545-50.
123. Ogura K et als A clinico-pathological study on cancer in sclerosing adenosis. *Breast Cancer*. 2014 Nov;21(6):732-7.
124. Yoshida A et als. Ductal carcinoma in situ that involves sclerosing adenosis: high frequency of bilateral breast cancer occurrence. *Clin Breast Cancer*. 2012 Dec;12(6): 398-403.
125. Arpino G Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome. *Breast Cancer Res*. 2004;6(3):R149-56.
126. Rao R et als Axillary node interventions in breast cancer: a systematic review. *JAMA*. 2013 Oct 2;310(13):1385-94.
127. Ning L et als Inhibition of autophagy induced by PTEN loss promotes intrinsic breast cancer resistance to trastuzumab therapy. *Tumour Biol*. 2015 Nov 12.
128. Biglia N et als. Increased incidence of lobular breast cancer in women treated with hormone replacement therapy: implications for the diagnosis, surgical and medical treatment. *Endocrine-Related Cancer*(2007); 14: 549-567.
129. Viviana Galimberti, IBCSG 23-01 randomised controlled trial comparing axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel node micrometastases. *Lancet Oncology Lancet Oncol*. 2013 April ; 14(4): 297–305.
130. Da Silva L et als Aberrant expression of E-cadherin in lobular carcinomas of the breast. *Am J Surg Pathol*. 2008 May;32(5): 773-83.
131. Moran MS et als. The Yale University experience of early-stage invasive lobular carcinoma (ILC) and invasive ductal carcinoma (IDC) treated with breast conservation treatment (BCT): analysis of clinical-pathologic features, long-term outcomes, and molecular expression of COX-2, Bcl-2, and p53 as a function of histology. *Breast J*. 2009 Nov-Dec;15(6):571-8.
132. Butler D , Rosa M. Pleomorphic lobular carcinoma of the breast.: a morphologically and clinically distinct variant of lobular carcinoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2013. Nov;137(11):1688-92
133. Sfakianos JP et als. The role of PTEN tumor suppressor pathway staining in carcinoma in situ of the bladder. *Urol Oncol*. 2014 Jul;32(5):657-62
134. Terry G et als. The expression of FHIT, PCNA and EGRF in benign and malignant breast lesions. *British Journal of Cancer* (2007);96,110-117.
135. Hollingsworth AB et als .Breast magnetic resonance imaging for preoperative locoregional staging. *Am J Surg*. 2008 Sep;196(3):389-97
