



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA

TESIS DE MAESTRIA

**ASOCIACIÓN DE LA INMUNOEXPRESIÓN DE PROTEÍNA P53 CON FACTORES
PRONÓSTICOS EN MUJERES CON CARCINOMA MAMARIO INVASOR**

NADIA JUDITH GOMEZ HERNANDEZ

DIRECTOR

M. EN C. JESUS MARTIN SANCHEZ AGUILAR

ASESORES

**M. EN C. FRANCISCO JAVIER VALADEZ CASTILLO
MED. CUAUHEMOC OROS OVALLE
MED. MARY CARMEN GUTIERREZ GIL**

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P. SEPTIEMBRE 2016

DIRECTOR	
M. en C. Jesús Martín Sánchez Aguilar	
ASESORES	
M. en C. Francisco Javier Valadez Castillo	firma
Med. Mary Carmen Gutierrez Gil	firma
Med. Cuauhtemoc Oros Ovalle	firma
SINODALES	
D. en C. Antonio Augusto Gordillo Moscoso	firma
M. en C. Amado Nieto Caraveo	firma
Med. Reynaldo Falcón Escobedo	firma
Med. Ricardo Díaz de León Medina	firma
M. en C. Ma. del Pilar Fonseca Leal Jefa de Investigación y Posgrado Clínico de la Facultad de Medicina	M. en C. Mauricio Pierdant Pérez Coordinador de la Maestría en Ciencias en Investigación Clínica

AGRADECIMIENTOS

A Dios, como generador de mi fe.

A mi familia: Nadia, Arturo y Moisés de quien siempre recibí su apoyo incondicional al otorgarme su comprensión, paciencia y amor. A mis padres Gilberto, Carmen y mi hermana Verónica por su entusiasmo y apoyo.

A mis asesores Dr. Martin Sánchez y Dr. Francisco Valadez, quienes creyeron en mi y con su experiencia, enseñanza y profesionalismo me guiaron en este proyecto.

A los doctores y maestros Kiko, Peter, Amado Nieto, Antonio Gordillo y Mauricio Pierdant a quienes admiro, respeto y les agradezco que sin interés alguno, siempre compartieran sus conocimientos, sus críticas y recomendaciones que contribuyeron a la generación de este producto.

A Martita por sus atenciones, disposición y sus incentivadas palabras.

A mi jefe y compañero Cuauhtémoc Oros Ovalle, que con su colaboración fue posible la realización y culminación de este proyecto.

A mi compañera y colega Mary Carmen Gutiérrez y a los médicos residentes de Anatomía Patológica en quienes siempre palabras de aliento y entusiasmo.

A todos mis amigos y compañeros de la maestría José Luis, América, Blanca, Jessica, Uciel, Memo y Emilio con quienes compartí sueños y desvelos.

RESUMEN

INTRODUCCION. El cáncer mamario es una enfermedad con gran variabilidad en la evolución clínica. Es de utilidad la demostración del comportamiento del tumor a través de la expresión de la proteína mutada p53 como factor de mal pronóstico.

OBJETIVO. Determinar la asociación entre la inmunexpresión de p53 mutada con el tamaño tumoral, afección ganglionar y metástasis a distancia en mujeres con carcinoma mamario invasor.

MATERIALES Y METODOS. Para la realización de este estudio se han utilizado 200 casos de pacientes con diagnóstico de carcinoma mamario invasor, en el que se realizó marcaje con inmunohistoquímica para proteína p53, del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” de San Luis Potosí, desde el 01 de enero del año 2008 al 31 de diciembre del año 2012.

RESULTADOS. El presente estudio demuestra que la positividad para p53 está directamente relacionada con una mayor probabilidad de presencia de metástasis en ganglios axilares al momento de la mastectomía.

CONCLUSIONES. En la actualidad no existe consenso de realizar de forma rutinaria estudios de p53 en el cáncer de mama. Es necesario realizar estudios con un número elevado de casos, para considerar de forma definitiva la inclusión de la determinación inmunohistoquímica de p53 en el estudio patológico clínico de rutina del cáncer de mama.

INDICE

○	INDICE.....	1
○	INDICE DE CUADROS Y FIGURAS.....	3
○	ABREVIATURAS EMPLEADAS.....	4
○	ANTECEDENTES.....	6
	▪ Epidemiología del cancer mamario.....	6
	▪ Anatomía y patología del cancer mamario.....	7
	▪ Carcinogenesis y cáncer mamario.....	11
	▪ La proteína 53 y su rol en carcinogenesis	12
	▪ Factores Pronósticos en el cancer mamario	14
○	JUSTIFICACION	16
○	PREGUNTA DE INVESTIGACION.....	17
○	HIPOTESIS	17
○	OBJETIVOS	18
	▪ Objetivo general	18
	▪ objetivo especificos	19
○	SITIO, MATERIALES Y METODOS	19
	▪ Sitio.....	19
	▪ Diseño del Ensayo	19
	▪ Universo	19
	▪ Recursos Materiales.....	19
	▪ Criterios de Inclusión	19
	▪ Criterios de Exclusión	20
	▪ Variable Independiente	21
	▪ Variable Dependiente	21
	▪ Definición Operacional de las variables	21
○	ANALISIS ESTADISTICO	24
○	CONSIDERACIONES ETICAS Y DE BIOSEGURIDAD.....	25
○	PLAN DE TRABAJO	26
○	RESULTADOS	27
	▪ características del universo de población del estudio	26
	▪ asociación del p53 con tamaño tumoral, ganglios linfáticos y presencia de metastasis	28

- **DISCUSIÓN** 32
- **CONCLUSIONES** 33
- **BIBLIOGRAFIA** 34
- ANEXO 1: CARTA DE APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA..... 37
- ANEXO 2: CARTA DE APOYO PIFI..... 38
- ANEXO 3:clasificacion del pTNM.....39
- ANEXO 4: ESTADIOS CLINICOS DEL CANCER MAMARIO.....41
- ANEXO 5: TECNICA DE INMUNOHISTOQUIMICA PARA DETECCION DE p53..... 42
- ANEXO 6: CONCORDANCIA INTEROBSERVADOR DE LA PROTEINA p53.....44
- ANEXO 7: INTERPRETACION DE LA INMUNOHISTOQUIMICA EXPRESION p53.....45

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1: Esquema de gradación Scarff- Bloom – Richardson.....	9
Cuadro 2: Cuadro de variables.....	22
Cuadro 3: Cuadro de resultados de las variables estudiadas.....	28
Cuadro 4: Frecuencias y porcentajes de estadios clínicos.....	28
Cuadro 5: Frecuencia y porcentaje de sitios de metástasis por carcinoma.....	28
Figura 1: Gráfica de edad y expresión p53.....	29
Figura 2: Mosaico-plot ganglios linfáticos y expresión de proteína p53.....	29
Figura 3: Imágenes histológicas de inmunexpresión nuclear de proteína p53.....	30

ABREVIATURAS

OMS: Organización Mundial De La Salud

RHNM: Registro Histopatológico De Neoplasias Malignas

TDLU: unidad lobular de ductos terminales

CIS: carcinoma in situ

CISD: carcinoma in situ ductal

CISL: carcinoma in situ lobulillar

SBR: Scarf- Bloom- Richardson

BRCA 1 y2: Genes Supresores “Breast Cancer 1 Y 2 “

TP53: Gen Supresor De Crecimiento Tumoral

p53: Proteína P53

p16: proteína cíclica dependiente de inhibidor de kinasa

IARC: International Agency for Research of Cancer

IHQ: Inmunohistoquímica

CI: Carcinoma Invasor

CDI: Carcinoma Ductal Invasor

CLI: Carcinoma Lobulillar Invasor

TNM: Estadificación de las neoplasias

UICC: Union For International Cancer Control

AJCC: American Joint Committee on Cancer

pTNM: Clasificación anatomopatológica del estadio de las neoplasias

cTNM: Clasificación clínica del estadio de las neoplasias

ANTECEDENTES

Epidemiología del cáncer mamario

El cáncer a nivel mundial es la principal causa de muerte. Se le atribuyó 8.2 millones de defunciones en el 2012. Los tipos de cáncer con mayor tasa de mortalidad son el pulmonar, hepático, gástrico, colorrectal y mamario en ese orden; respecto a la tasa de incidencia el primer lugar lo ocupó el pulmonar, seguido por el cáncer mamario. ⁽¹⁾

El cáncer mamario es considerado un problema de salud a nivel mundial, siendo la primera causa de muerte por neoplasia en mujeres entre 40-55 años. Datos de la Organización Mundial de la Salud (**OMS**) señalan que para el 2013 ocurrieron 458 mil muertes por esta enfermedad. ⁽¹⁾

En México, en el 2008 murieron 4 818 mujeres mexicanas, lo cual implica un fallecimiento cada 2 horas. La tasa de mortalidad por cáncer mamario en México ha registrado un aumento sustancial de 1950 a 2008. ⁽²⁾ para el 2013 la tasa fue de 14.8 de cada 100 mil mujeres; sobrepasando la tasa de mortalidad de 13.4 por cáncer cervicouterino. ⁽³⁾

Respecto a la incidencia cada año se detectan 1.38 millones de casos nuevos. De los cuales el 70% ocurre en países desarrollados, considerando un aumento en la prevalencia de esta enfermedad y que la población mexicana presenta patrones de envejecimiento similares a los de países desarrollados, se proyecta que la carga de la enfermedad será en el futuro similar al observado hoy día en Norteamérica. ⁽⁴⁾

Según datos del Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas (**RHNM**), en 2006 se presentaron 13 706 nuevos casos de cáncer de mama (316 más que en el año

anterior), la mayor parte en los grupos de edad de 40 a 59 y 70 años, con diagnóstico en etapas avanzadas. ⁽⁴⁾ El porcentaje promedio de diagnósticos, de acuerdo con el estadio clínico, es el siguiente: Estadios 0 y I, 7.4%; estadio II, 34.4%; estadios III y IV, 42.1%; no clasificables, 16.1%. ⁽⁴⁾

Anatomía y Patología del cáncer mamario

Las glándulas mamarias están presentes en ambos sexos. En el hombre se mantienen rudimentarias, mientras que en la mujer el desarrollo de la mama desde la infancia hasta la pubertad consiste en el crecimiento del parénquima de la glándula mamaria bajo el estímulo de la pituitaria y las hormonas del ovario. El crecimiento de la glándula mamaria es el resultado de la elongación de los ductos mayores en áreas cercanas al pezón y la ramificación progresiva de ductos menores que forman la unidad lobular de ductos terminales (**TDLU**). ⁽⁶⁾ Después de la pubertad, los lóbulos tipo 1 se ramifican en numerosos ductos, exhibiendo una morfología más compleja que caracteriza los lóbulos tipo 2.

El tejido mamario presenta tres tipos tisulares principales: el **glandular** que forma los lóbulos epiteliales ducto – lobulillares; las células especializadas mioepiteliales que forman la membrana basal donde descansan las células epiteliales; el tejido **conjuntivo** que descansa y conecta los lóbulos y el tejido **adiposo** que ocupa los espacios interlobulares. Los lóbulos mamarios están constituidos por numerosos lobulillos que se encuentran unidos entre sí por tejido conectivo, vasos sanguíneos y por su sistema excretor, los conductos lactíferos. ⁽⁶⁾

La progresión, transformación y diferenciación maligna de las células epiteliales ductales y/o lobulillares dan origen al carcinoma mamario que a su vez se divide en carcinoma in situ e invasor. ⁽⁷⁾

El **carcinoma in situ (CIS)** corresponde a proliferación de células epiteliales malignas confinadas en la luz de los ductos o de los lobulillos glandulares, sin rebasar la membrana basal y sin invadir los tejidos adyacentes. ⁽⁸⁾ Adopta diferentes patrones arquitectónicos de crecimiento intraductal e intralobulillar y presenta características citológicas y de necrosis variables. Se conoce también con el nombre de carcinoma intraductal y carcinoma intralobulillar. Es importante su identificación ya que su biología, comportamiento clínico y tratamiento es diferente al carcinoma invasor **(CI)**. Con la creciente utilización de la mamografía, **CIS** representa el 15% a 25% de casos de cáncer mamario. ⁽⁸⁾

El **carcinoma invasor (CI)** llamado también infiltrante es una proliferación de células epiteliales malignas con diferenciación ductal, o lobulillar o indiferenciada que rompen y traspasa la membrana basal con extensión e infiltración al tejido adiposo y fibroso que rodean a los ductos y lobulillos mamarios, incluyendo permeación linfovascular y a espacios perineurales. Consecuencia de esta proliferación neoplásica induce a la proliferación de fibroblastos, vasos sanguíneos de neoformación que corresponde reacción desmoplásica que acompaña a los tumores malignos, que clínicamente se manifiestan por abultamiento tumoral y consistencia pétreo. ⁽⁸⁾

El comportamiento clínico del carcinoma invasor es invariable respecto al tipo histológico sea ductal y/ lobulillar ya que por si solo no define el pronostico; la pauta

mas importante para el pronostico es el grado de diferenciación; grado nuclear y actividad mitótica. ⁽⁹⁾

La clasificación de la **OMS** contempla 18 tipos histológicos de tumores malignos infiltrantes de la mama puede ser epiteliales, mesenquimatosos, mixtos, linfoproliferativos o metástasis. El origen más frecuente corresponde a las células epiteliales de la unidad ducto-lobulillar. ⁽¹⁰⁾

El Carcinoma ductal invasor (CDI) con sus variantes histológicas (clásico, tubular, medular, mucinoso, secretor, papilar, adenoideo quístico, metaplásico, cribiforme, apócrino) es el más frecuente con 90-85% de los casos. Se caracteriza por una proliferación de células ductales que varían en tamaño, contenido citoplasmático y grado de diferenciación. Suele estar asociado **CIS**. La inmunexpresion de E-cadherina permite diferenciarlo de otros tipos histológicos. ⁽¹⁰⁾ El carcinoma ductal invasor y todas sus variantes con excepción del carcinoma medular, deberán ser graduados con la escala de **SBR: Scarff- Bloom-Richardson**. ⁽¹²⁾

Formación de túbulos	Grado nuclear tamaño	Mitosis: numero de mitosis por 10 csf	GRADIFICACION DIFERENCIACION PUNTUACION
1: más del 75%	1: pequeño, uniforme	1: Menos de 10 mitosis	GRADO I BIEN 3-5 puntos
2: de 10 a 75%	2: mediano, variación de forma	2: 10 -20 mitosis	GRADO II MODERADAMENTE 6-7
3: menos del 10%	3: grande nucléolo prominente	3: Más de 10 mitosis	GRADO III POCO 8-9

Cuadro 1 Esquema de gradación histológica Scarff- Bloom-Richardson (SBR). Es la suma de la formación de túbulos más grado nuclear más mitosis, el total de la puntuación se aplica la graduación. csf: campo a seco fuerte. Fuente: Prognostic factors in breast cancer college of American pathologists consensus statement 1999. Arch Pathol Lab Med 2000; 124:966-78.

El carcinoma lobulillar invasor (CLI) Es el segundo tipo histológico en frecuencia y suele ser multicéntrico y bilateral. Representa entre el 5 y el 15% de los carcinomas invasivos. ⁽¹⁰⁾ Se clasifica en sólido o clásico, alveolar y pleomórfico. No expresa E-cadherina. Este carcinoma se destaca por presentar dificultades diagnósticas desde el punto de vista clínico y radiológico, clínicamente se muestra como una masa palpable y en la mamografía aparece una distorsión arquitectural. En esta variante histológica no se aplica la escala de SBR. ⁽¹¹⁾

Carcinogénesis y cáncer mamario

El cáncer se desarrolla a partir de la pérdida de control de crecimiento celular normal, con aumento en la proliferación celular, cambios celulares en su morfología, en su funcionalidad, resistencia a la muerte celular, invasión y diseminación. ⁽¹²⁾

La enfermedad de cáncer se considera un desorden genético como consecuencia de la adquisición de mutaciones (somáticas o hereditarias) en los genes responsables de mantener la función celular. Para que puedan acumularse un número suficiente de mutaciones deben perturbarse los mecanismos de reparación y de eliminación de células mutadas. ⁽¹³⁾

Las mutaciones en los genes pueden producirse por mutaciones puntuales, amplificación, deleción o translocaciones, interfiriendo en su capacidad de regulación de señales o codificando proteínas que emiten señales incorrectas a las células. ⁽¹⁴⁾

La combinación de los mecanismos de activación de oncogenes (factores de crecimiento, receptores de los factores de crecimiento, etc); Inactivación de genes supresores (**BRCA**, **p53**, y **p16**) y alteración de genes responsables de la estabilidad del genoma (genes reguladores o reparadores del **ADN**) dará lugar al fenotipo característico de las células cancerígenas. ⁽¹⁵⁾

La p53 y su rol en carcinogénesis

La proteína p53 es una fosfoproteína nuclear que contiene 393 aminoácidos. Su gen p53 (**TP53**) es un miembro de los denominados “supresores del crecimiento tumoral”, localizado en el brazo corto del cromosoma 17 en la banda 17p 13.15, interviene en la reparación del **ADN**, juega un papel central en la detección del estrés genotóxico y no genotóxico, así como en la transducción de efectos celulares anti-proliferantes. ⁽¹⁶⁾

En el ciclo celular, la proteína p53 es imprescindible para la progresión del ciclo celular normal. El bloqueo de los ciclos celulares tiene lugar al final de G1 cerca del punto de restricción (R-point) y la fase S. La actividad supresora tumoral de la p53 consiste en inhibir el paso de G1 a la fase S, este bloqueo transitorio justo antes de la duplicación del ADN permite a la célula la reparación del ADN. Si la célula no es capaz de reparar el daño del ADN, entonces la p53 inducirá la muerte celular por apoptosis. ⁽¹⁷⁾

La pérdida de la actividad supresora tumoral de la p53 se asocia con una incapacidad para detener la transición de G1 a la fase S en el ciclo celular en las células que han acumulado daño del DNA. En respuesta a las alteraciones del DNA aumenta la concentración de proteína p53 en la célula. ⁽¹⁸⁾ la localización celular de la p53 varía durante del ciclo celular en la fase G1 se encuentra en el citoplasma luego entra en el núcleo fase S hasta el final de la fase M; en las células tumorales la proteína p53 es estrictamente nuclear, llamada p53 mutada que forma complejos con la p53 normal bloqueando así su función normal.

La proteína **p53** normal (silvestre) tiene una estructura muy lábil, derivada de las interacciones entre dominios plegados y no plegados dentro de ella, por lo que se

estima que su vida media es de 15 a 20 minutos, sin ser detectada habitualmente. En cambio, la proteína **p53** mutada le confieren una elevada estabilidad, lo que provoca su acumulación en el núcleo de las células neoplásicas, con una vida media de aproximadamente 24h. ⁽¹⁸⁾ permitiendo su detección mediante técnicas de IHQ, ⁽¹⁹⁾ las cuales son más accesibles en nuestro medio que las pruebas de biología molecular.

La pérdida de la función normal de **p53** es la alteración genética más común en todo tipo de cáncer; su mutación se ha relacionado con la aparición de tumores esporádicos. ⁽¹⁷⁾ La mutación de **TP53** se observa entre el 20%-30% de los carcinomas de mama, y parece asociarse a un pronóstico adverso, y en algunos estudios a resistencia a la quimioterapia. ⁽¹⁷⁾

Se ha observado que la frecuencia de las mutaciones de **TP53** depende del tipo de neoplasia, habiéndose encontrado una alta proporción en tumores de pulmón, media en tumores gastrointestinales y baja en melanomas. Varias de las mutaciones identificadas producen proteínas anormales que tienen la capacidad de activar oncogenes, además que las mutaciones de p53 se han asociado con la presencia de mutaciones de los genes **BRCA1 y BRCA2**, así como con tumores más agresivos. ⁽²⁰⁾

Se estima que del 20 al 35% de los casos de tumores esporádicos de mama se deben a mutaciones somáticas de p53, y a pesar de que se han enlistado 2,274 mutaciones de p53 en el carcinoma de mama, de acuerdo a la base de datos de la International Agency for Research of Cancer (**IARC**), el 90% de ellas son en la secuencia del puente de **ADN** entre el exon 5 al 8. ⁽²¹⁾ Mas del 95% de las mutaciones del **TP53** producen la proteína mutada. ⁽²⁴⁾ Algunos autores refieren la existencia de sobreexpresión de la proteína mutada en mas del 50% de los canceres de mama. ⁽²⁵⁾ pero se ha reportado que del 5-10% de las mutaciones pueden no expresar p53 mutada. ⁽²⁶⁾

Factores pronósticos de cáncer mamario

El cáncer de mama es una enfermedad que debido a su variabilidad en la evolución clínica y heterogeneidad de pacientes, es importante identificar y definir factores pronósticos que muestren el comportamiento del tumor y la respuesta a terapias coadyuvantes.

Un factor pronóstico se define como cualquier medición, que, al momento de la cirugía, guarde asociación con el intervalo libre de enfermedad o con la supervivencia global, en ausencia de terapias sistémicas adyuvantes; por lo que es un reflejo de la agresividad inherente del tumor encontrado. ⁽²⁸⁾

Los avances en el tratamiento quirúrgico y oncológico que elevan la tasa de supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad, así como la tipificación a través de técnicas de inmunohistoquímica obligan a realizar un análisis de los factores pronósticos clásicos y modernos para planificación de tratamiento y pronóstico de supervivencia. ⁽²⁹⁾

Entre los factores pronósticos considerados como clásicos se encuentra la afección a ganglios linfáticos axilares. El número de ganglios obtenidos por disección axilar es variable. Cuanto mayor es el número de ganglios identificados, mayor es el número de ganglios positivos. ⁽³⁰⁾ Cuando no hay evidencia de metástasis ganglionares, la supervivencia a los diez años es del 76%; la presencia de un ganglio linfático positivo disminuye la supervivencia en un 25%; con cuatro o más ganglios linfáticos positivos hasta un 86.5%. ⁽³⁰⁾ Por lo que la presencia de ganglios linfáticos axilares macroscópicamente tumorales afecta desfavorablemente al pronóstico. ⁽³⁰⁾

La supervivencia a los cinco años de pacientes con metástasis en los ganglios axilares o de la mamaria interna es del 56% y 52% respectivamente, pero cuando ambas regiones son afectadas la supervivencia es tan solo del 24%. ⁽³¹⁾

La afectación de los ganglios supraclaviculares indica etapa avanzada; ya que estos ganglios son generalmente alcanzados después de la invasión de los ganglios axilares o de los de la mamaria interna. ⁽³²⁾

El tamaño macroscópico (diámetro máximo) del tumor es considerado como un de los mas importantes factores pronósticos, ⁽³¹⁾ junto con la afectación ganglionar y metástasis a distancia constituyen los tres criterios utilizados para el estadiaje.

Existe una relación directa entre tamaño tumoral y la probabilidad de metástasis ganglionares axilares; se ha reportado metástasis en el 26% de las pacientes con tumores igual o menores a 1cm de diámetro; comparando el 78% de metástasis en tumores mayores a 5cm. ⁽³⁰⁾ Las pacientes en las que el tumor es de 2 cm. o menos de diámetro máximo tienen un pronóstico y una supervivencia significativamente mejor comparada con las pacientes con tumores de mayor diámetro. ⁽³²⁾

JUSTIFICACION

El cáncer mamario es una enfermedad multifactorial de evolución compleja, que ha adquirido mayor importancia por su prevalencia, morbi-mortalidad e impacto socioeconómico.

El aumento en la incidencia y prevalencia del carcinoma mamario hace necesaria la incorporación a la práctica clínica de marcadores que aporten información del comportamiento biológico del tumor, a fin de establecer un diagnóstico, estrategias terapéuticas y establecer un mejor pronóstico para las pacientes afectadas.

A pesar de que el tamaño tumoral, número de ganglios axilares afectados y la presencia de metástasis a distancia son considerados actualmente como los factores pronóstico más importantes, existen otros factores relacionados con el pronóstico, tales como los mecanismos de p53. Determinar el grado de asociación entre ellos es fundamental para evaluar el comportamiento de la enfermedad. El estudio genético del TP53 en nuestro medio es difícil realizar, sin embargo, su análisis histopatológico, a través de técnica de inmunohistoquímica, es factible, en el estudio del carcinoma mamario. Una de las propiedades de la proteína p53 mutada es su estabilidad con una vida media de 24hrs y acumulación en el núcleo lo que permite su detección por métodos histoquímicas con una buena correlación entre análisis molecular (presencia de mutación) y análisis inmunohistoquímico (sobre expresión de proteína mutada)

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la asociación entre la inmunexpresión de p53 mutada con el tamaño tumoral, la presencia de afección ganglionar y metástasis a distancia en mujeres con carcinoma mamario invasor?

HIPOTESIS

La expresión de la proteína p53 presenta una asociación positiva con el tamaño tumoral, la presencia de afección ganglionar y metástasis a distancia, en mujeres con carcinoma mamario invasor.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la asociación entre la inmunoexpresión de p53 mutada con el tamaño tumoral, afección ganglionar y metástasis a distancia en mujeres con carcinoma mamario invasor

Objetivos específicos

1. Determinar la presencia y grado de asociación de la inmunoexpresión de la proteína p53 y tamaño tumoral en las mujeres con carcinoma mamario invasor.
2. Determinar la presencia y grado de asociación de la inmunoexpresión de la proteína p53 y afección ganglionar en las mujeres con carcinoma mamario invasor.
3. Determinar la presencia y grado de asociación de la inmunoexpresión de la proteína p53 y metástasis a distancia en las mujeres con carcinoma mamario invasor.

SITIO, MATERIALES Y METODOS

Sitio

El estudio se realizó en el Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” de la ciudad de San Luis Potosí, México.

Diseño del Ensayo

Estudio transversal analítico.

Universo

Mujeres con diagnóstico de carcinoma mamario invasor en el servicio de Anatomía Patológica en el periodo de tiempo comprendido entre el 01 de enero del año 2008 al 31 de diciembre del año 2012.

Muestreo

Por conveniencia.

Recursos Materiales

APOYO POR LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI

C13-PIFI-04-01.25 (**anexo 2**)

Criterios de inclusión

1. Todas las mujeres con diagnóstico de carcinoma mamario invasor con registro clínico y registro histopatológico del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”, en el periodo de tiempo comprendido del 1 de enero 2008 al 31 de diciembre 2012.
2. Que cuenten con informe (s) histopatológico (s) que indique tamaño tumoral, número de ganglios axilares y con material de espécimen quirúrgico archivado en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”.
3. Que cuenten con expediente clínico para determinar la presencia o ausencia de metástasis a distancia.
4. Del espécimen quirúrgico, el bloque de parafina con tejido tumoral suficiente para análisis de la expresión de la proteína p53, mediante técnicas de inmunohistoquímica.

Criterios de exclusión

1. Mujeres con diagnóstico de carcinoma mamario invasor cuyo informe histopatológico mencione cambios post radioterapia.
2. Bloque de parafina del tejido tumoral del espécimen quirúrgico con condiciones que no permitan su análisis mediante técnicas de inmunohistoquímica.
3. Mujeres con diagnóstico de carcinoma mamario invasor que no cuente con expediente clínico.

Variable Independiente

1. Inmunexpresión de Proteína p53

Variabes Dependientes

1. Tamaño tumoral.
2. Presencia o ausencia de metástasis a ganglios linfáticos axilares.
3. Presencia o ausencia de metástasis a distancia.
4. Edad.

Definición Operacional de las Variables

Inmunexpresión de p53: A partir de cortes histológicos de 4mm de grosor sometidos a reacción por inmunohistoquímica con un anticuerpo monoclonal contra la proteína p53 humana (Clon DO-7. Dako, Carpintería, EUA; cf. Anexo 3) se identificó la presencia o ausencia de inmunexpresión de proteína p53 en los núcleos del >10% de las células tumorales.

Tamaño tumoral: Se registró el diámetro mayor del tumor medido en centímetros del informe histopatológico de la pieza quirúrgica emitido por el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”.

Presencia de afección ganglionar: Se registró la presencia o ausencia de metástasis de carcinoma en los ganglios linfáticos axilares a partir del informe histopatológico emitido por el Departamento de Patología del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”.

Presencia de metástasis a distancia: Se determinó con el informe de estudios de imagen y/o especímenes patológicos, documentado en expediente clínico del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” la presencia o ausencia de metástasis a distancia.

Edad: Intervalo en años transcurrido entre la fecha de nacimiento de la paciente y la fecha del diagnóstico histopatológico del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”.

Código	Nombre de la Variable	Significado	Valor	Unidades	Escala de medición
p53	Expresión de p53	Presencia de inmunoreacción nuclear para p53 en >10% de los núcleos celulares	0 = Negativo 1 = Positivo		Dicotómica
T	Tamaño tumoral	Diámetro mayor del tumor según el reporte anatomopatológico	0 - ∞	centímetros	Continua
N	Presencia de afección ganglionar	Presencia de ganglios linfáticos positivos para metástasis por carcinoma	0 = Negativo 1 = Positivo		Dicotómica
M	Presencia de metástasis a distancia	Presencia de metástasis a distancia según el expediente clínico	0 = Negativo 1 = Positivo		Dicotómica
E	edad	Edad de la paciente al momento del diagnóstico	0 - ∞	Años	Continua

ANALISIS ESTADISTICO

El análisis estadístico se llevó a cabo con los programas: JMP 8 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) y R 2.15.1. (48) Se calcularon medidas de tendencia central y dispersión de todas las variables. Se calculó normalidad a través de qqPlot de residuales de Fox. (49) EL análisis descriptivo se llevo a cabo de acuerdo a la naturaleza de la variable estudiada; las variables categóricas se describieron con frecuencias y porcentajes; las numéricas con distribución normal se expresaron en promedio y desviación estándar, las que presentaron no normalidad en su distribución con medianas y rangos (valor máximo y mínimo).

El análisis bivariado de variables continuas se realizó con T de Student (distribución normal) y con U de Man Whitney (no paramétricas). El análisis de las variables categóricas se realizó con Chi cuadrada y en caso de casillas con valores esperados menores de 5 con la prueba exacta de Fisher. Los valores de p menores de 0.05 fueron considerados como significativos.

Para el control de la edad como posible confusor se llevó a cabo análisis de regresión logística en el caso de los ganglios linfáticos axilares y metástasis a distancia y de regresión lineal para el tamaño tumoral.

Para el cálculo del tamaño de la muestra para nódulos linfáticos ($N \sim p53 + Edad$) se consideraron 2 grados de libertad con un estimado de 0.229 como probabilidad del evento (PMID: 23873310), por lo que se estimó en 90.9 a 181 pacientes los requeridos para este modelo (Peduzzi, Concato y Feinstein. ⁽⁵⁰⁾). Con respecto a la presencia de metástasis ($M \sim p53 + Edad$) la probabilidad del evento se refiere en 60%. Con una n calculada de $= 2 \times 10 / 0.60$ por lo que se estimó en 33 a 66 pacientes los requeridos para este modelo (Peduzzi, Concato y Feinstein. ⁽⁵⁰⁾).

Por ultimo en el caso del modelo de regresión lineal para el análisis de la variable continua de tamaño tumoral la muestra calculada ($T \sim p53 + Edad$) fue de $2 \times 20 = 40$ pacientes. Por lo anterior se consideró un mínimo de 181 pacientes a incluir en el estudio.

CONSIDERACIONES ETICAS

El estudio cuenta con aprobación del Comité de Ética en Investigación del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” a través del registro 81-14 (**anexo 1**). Por ser un estudio basado en registros clínicos, no se trabajó en ningún momento con seres humanos en forma directa, por lo que no se requirió la obtención de consentimiento informado. Todos los datos se mantuvieron en estricta confidencialidad y se hicieron todos los esfuerzos necesarios para que la información no pudiera ser relacionada con la persona de quien provino. La información obtenida solo fue utilizada para el análisis descrito.

El proyecto no se opone a lo establecido a la declaración de Helsinki y a la ley general de salud, por lo que cubre los lineamientos éticos en base a los principios de La Declaración de la 18ª Asamblea Mundial de Helsinki, Finlandia en su revisión 2013,(46) y a la NOM-012-SSA3-2012 que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos (47).

Durante todo el proceso se siguió en forma estricta la metodología y buenas prácticas clínicas que marca el manual de bioseguridad del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”.

PLAN DE TRABAJO

1. Se obtuvo la aceptación del Comité de Ética en Investigación del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” para la recolección de datos del expediente clínico de las pacientes sometidas a mastectomía radical modificada en el periodo de tiempo comprendido entre el 01 de enero del año 2008 al 31 de diciembre del año 2012.
2. Se analizó cada informe anatomopatológico del que se obtuvo el tamaño tumoral, número y positividad de ganglios linfáticos axilares.
3. Se revisaron los expedientes clínicos para determinar la calidad de los datos y compilar la base de datos clínica. Se recopiló la fecha de la última cita; presencia o ausencia de metástasis.
4. Se recabaron y se evaluó la calidad de las muestras de tejido de las piezas quirúrgicas de los expedientes clínicos seleccionados para su análisis.
5. Se realizaron dos cortes histológicos en promedio para la aplicación de la técnica de inmunohistoquímica (**anexo 5**).
6. Posterior a un análisis de concordancia inter e intraobservador, se determinó la positividad o negatividad de la expresión de p53 en 10 campos a seco fuerte (objetivo de 40x) microscópico por muestra (**anexo 6**).
7. Se dieron valores de negativo y positivo a la inmunoexpresión nuclear de más del 10% de las células neoplásicas (**anexo 7**).
8. Se analizaron los datos y se hizo inferencias estadísticas de los resultados obtenidos.
9. Se buscará publicar el resultado de este trabajo en alguna revista del área pertinente. Se publicarán tanto los resultados positivos, como los negativos.

NOTA: Para la descripción detallada de la metodología, consultar los anexos.

RESULTADOS

Características de la población de estudio

En un periodo de 5 años (enero 2008- diciembre 2012) se recolectaron 195 casos de pacientes con diagnóstico de carcinoma mamario invasor, todos los casos correspondieron a sexo femenino; en un rango de edad de 25 a 97 años; con una media de edad 52.4 años y desviación estándar de 1.2 años **Cuadro 3.**

Respecto al estadio clínico el 81% de las pacientes se encontraba en los estadios II y III. Ver **cuadro 4.**

El tamaño tumoral fue medido en centímetros; con una media de 3.20cm, y desviación estándar de 0.16cm; IC superior del 3.50cm y IC inferior de 2.90cm.

Se observó la presencia de ganglios linfáticos axilares positivos para metástasis se observó en 100 pacientes (51.2%). **Cuadro 3.**

Se demostró metástasis a distancia a través de estudios de imagen y especímenes patológicos en 17 casos, los sitios de metástasis fueron: hígado, pulmón, medula ósea pleura, piel y en 8 casos recurrencia en el sitio de mastectomía; siendo este el sitio más frecuente **cuadro 5.**

La inmunexpresión nuclear de la proteína p53 se observó en 94 casos (48.2%). **Cuadro 3.**

Asociación del p53 con tamaño tumoral, ganglios linfáticos y presencia de metástasis

Se realizó un modelo de regresión logística para evaluar la presencia de asociación entre la expresión de p53 y la presencia de ganglios linfáticos axilares positivos a malignidad. El modelo máximo a evaluar fue $N \sim p53 + Edad + p53: edad$. Se evaluó la presencia de relaciones curvilíneas, por lo que el modelo que se evaluó fue $N \sim p53 + Edad^2 + p53: edad$. Se realizaron pruebas de verosimilitud, eliminando la variable con menor probabilidad de ser significativa. El modelo final fue $N \sim p53$. ($\text{Chi}^2 = (1,195) = 15.0$, $p < 0.001$). Por lo que si existe expresión de p53 el OR calculado es de 3.167, IC 95% [5.64 - 1.7629], es decir mas de tres veces más probable que exista presencia de ganglios linfáticos positivos ante la presencia de p53 positivo. **Figura 2.** No existió evidencia de sobredispersión en los residuos ($p = 0.31$).

El modelo **final** de análisis regresión logística para ganglios axilares

Coefficients de regresión:

	Estimado	Error Est	z	p
Intercepto	-0.481	0.210	-2.29	0.02174
p531	1.120	0.307	3.64	0.00027

Con respecto al tamaño tumoral ($T \sim p53 + Edad$), no se encontró significancia con las variables propuestas, al igual que la presencia de metástasis a distancia ($M \sim p53 + Edad$), tanto en el análisis bivariado como en el multivariado.

Cuadro 3.- características clínicas de la cohorte de pacientes incluidos en este estudio, grupo completo, y dividido en pacientes con proteína p53 positiva y negativa

VARIABLE	Grupo completo	Con expresión positiva de p53	Sin expresión de p53	p
Número de pacientes	195	94(48%)	101(52%)	-
Edad de las pacientes	52.4 años +0.91	50.5 años +2.5	54.0 años +2.6	0.0499*
Tamaño tumoral	3.2cm	3.0cm +0.3	2.8 cm +0.3	0.4080*
Ganglios linfáticos axilares positivos	100(51%)	62(62%)	38 (38%)	0.0001**
Ganglios linfáticos axilares negativos	95(48%)	32(33.6%)	63(66%)	0.0001**
Presencia de metástasis	17	11(64.7%)	6(35.2%)	0.1521**

*T de Student ** prueba de chi cuadrada.

Cuadro 4. Estadios clínicos de pacientes con carcinoma mamario

Estadio	Numero	Porcentaje
I	4	2.0
IA	23	11.7
IB	3	1.5
IIA	50	25.6
IIB	42	21.5
IIIA	37	8.9
IIIB	27	13.8
IIIC	3	1.5
IV	3	1.5
NO EXP	3	1.5
Total	195	100

Cuadro 5. Sitios de metástasis de pacientes con carcinoma mamario

Sitio	casos	porcentaje
Líquido pleural	1	5.8
hígado	1	5.8
Pulmón	1	5.8
Medula ósea	1	5.8
Piel	5	29.2
Recurrencia en sitio quirúrgico	8	47.0
Total	17	100

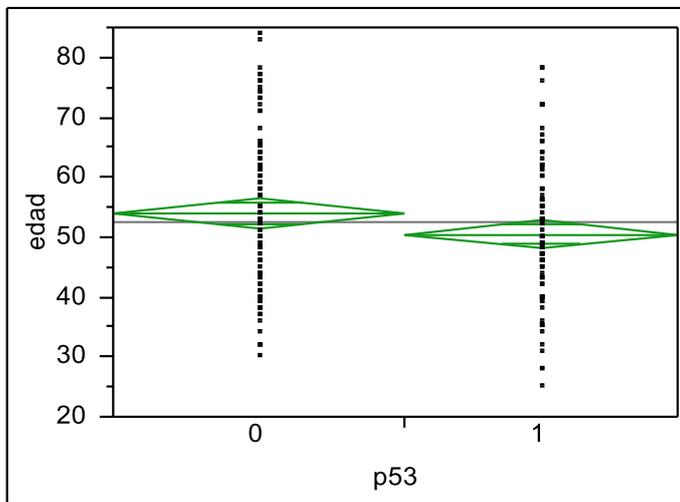


Figura.1 Grafica de análisis de varianza de la asociación de edad y la expresión de proteína p53

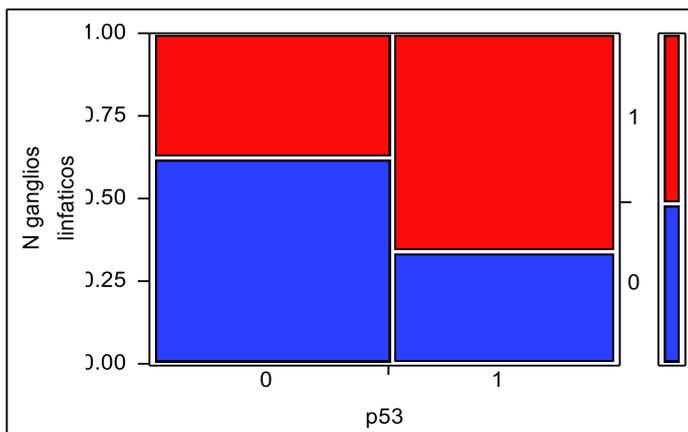


Figura.2 diagrama de mosaic-plot de la asociación de ganglios linfáticos axilares y expresión de proteína p53. Negativo (0) Positivo (1)

IMÁGENES DE INMUNOEXPRESION NUCLEAR DE p53

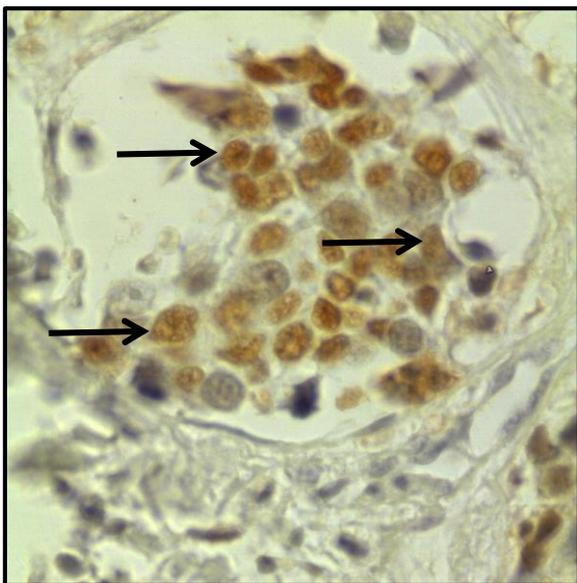
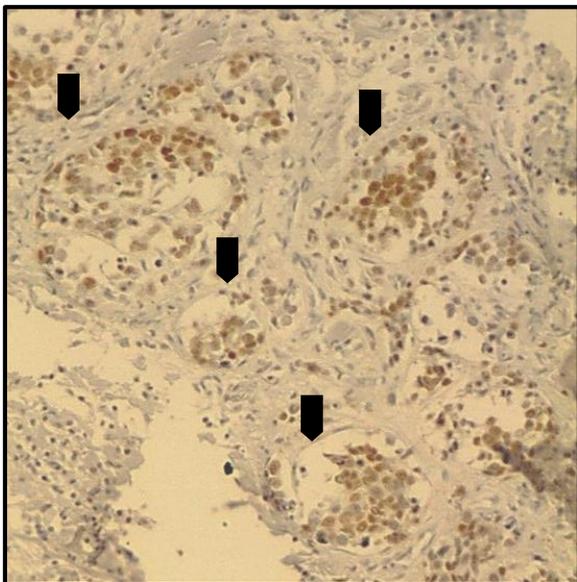


Figura.3

Fotomicrografías a 10 y 40x:

Corte histológico con técnica de IHQ se observa la presencia de grupos tumorales ▾ con positividad en su núcleo →

DISCUSION

La población estudiada incluyo pacientes en estadio II y III. A pesar de ser una muestra reducida, en nuestro estudio hemos encontrado una asociación significativa entre la positividad de expresión de la proteína p53 y ganglios linfáticos axilares positivos. La posibilidad de tener ganglios axilares positivos aumenta hasta tres veces si expresa la p53 el tumor. En algunos estudios, se demuestra que el mal pronóstico que confiere la positividad a p53 mutada se aplica tanto a pacientes con ganglios positivos axilares como para pacientes con ganglios negativos. ⁽²⁵⁾ Por otro lado no fue posible demostrar la asociación de la expresión de la proteína p53 con el tamaño tumoral ni con la presencia de metástasis a distancia.

En nuestro estudio se observó que la edad de las pacientes y la expresión de la proteína p53 tuvo asociación significativa (0.0499) con la edad de las pacientes demostrándose que los casos positivos para la expresión de p53 se observó en un grupo de edad (50.2 +0.5) menor que la media; confirmando así el comportamiento agresivo del tumor en este grupo de edad. En este estudio la población correspondió a estadios clínicos II y III similares al comportamiento descrito de la población mexicana. ^(3,5)

El gen supresor p53 es un regulador negativo esencial en el control de la proliferación celular, actuando a través de la proteína p53, la cual se activa en respuesta a radiaciones u otros agentes que alteran el ADN, bloqueándose la replicación del ADN al parar el ciclo celular en G1 y haciendo así posible la reparación del mismo. En caso de que ésta no fuera posible, la proteína p53 induce apoptosis.

CONCLUSIONES

El carcinoma mamario en nuestro medio es un problema no solo médico, sino socioeconómico ya que gran parte de los recursos de salud para la población adulta son destinados para el diagnóstico y tratamiento de esta patología.

La realización de un acertado diagnóstico y tratamiento otorga un mejor pronóstico y calidad de vida a las pacientes afectadas con carcinomas mamarios, además reduce eficazmente la erogación de recursos en este rubro. El presente estudio demuestra que la positividad para p53 está directamente relacionada con una mayor probabilidad de presencia de metástasis en ganglios axilares al momento de la mastectomía por lo que sería un recurso invaluable realizar este estudio de Inmunohistoquímica sobre todo en las biopsias previas a la mastectomía, ya que de ser positivo sería una recomendación de primera línea para realización de linfadenectomias en todos estos casos independientemente del tamaño tumoral y/o negatividad del ganglio centinela en transoperatorio. En la actualidad no existe consenso de realizar de forma rutinaria estudios de p53 en el cáncer de mama ni tampoco que metodología emplear para su determinación (inmunohistoquímica o genética). Habrá que considerar la existencia de técnicas inmunohistoquímicas en los laboratorios de Anatomía Patológica. Es necesario realizar estudios con un número elevado de casos, seguimientos largos y utilizando el mismo anticuerpo y criterio de positividad y un procesamiento técnico similar, así como estudios de tipo meta-análisis basados en las series publicadas para considerar de forma definitiva la inclusión de la determinación inmunohistoquímica de p53 en el estudio patológico clínico de rutina del cáncer de mama.

BIBLIOGRAFIA

1. Cancer Incidence and Mortality worldwide: Source, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* 2014; 136. Article first published online
2. De la Vara, E. (2011, junio 23). Tendencias de la mortalidad por cáncer de mama en México. *Salud pública de México* 2011, 30, pp.240-245.
3. Palacio LS, Lazcano E, Allen B, Hernández M. Diferencias regionales en la mortalidad por cáncer de mama y cérvix en México entre 1979–2006. *Salud Pública Mex* 2009; 51(supl. 2):S208–S218.
4. Knaut FM, Nigenda G, Lozano R, Arreola-Ornelas H, Langer A, Frenk J: Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante. *Salud Pública de México* 2009;51(2):S335-S344
5. Flores L, Salazar E, Duarte RM, et al.: Factores pronósticos relacionados con la supervivencia del cáncer de mama. *Salud Pública México* 2008; 50:119-125.
6. Weigelt B, Horlings H, Kreike B, et al.: Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol.* 2008 Oct;216(2):141-50
7. Hoda S, Brogi E, Koerner F. et al.: *Rosen's Breast Pathology*. 3era Edition. 2010
8. Leonard G), Swain S. Ductal carcinoma in situ, complexities and challenges. *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96(12):906-920
9. Tavassoli FA, Devile P: *Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. World Health Organization Classification of tumours 2007
10. Anderson BO et al.: Guideline implementation for breast healthcare in low-income and middle-income countries: overview of the Breast Health Global Initiative Global Summit 2007; *Cancer* (113):2221–43
11. Dabbs D, Bhargava R, Chivukula M. Lobular versus ductal breast neoplasms: the diagnostic utility of p120 catenin. *Am J Surg Pathol.* 2007 Mar; 31(3):427-37
12. Chi V: c-Myc Target Genes Involved in Cell Growth, Apoptosis, and Metabolism. *MOL. CELL. BIOL.* 1999; 19(1): 1–11
13. Penzo M, Casoli L, Ceccarelli C, et al.: DKC1 gene mutations in human sporadic cancer. *Histol Histopathol.* 2013;28(3):365-72
14. García F, Ramón de Fata, G. Andrés, et al. : Genes reparadores del ADN y pronóstico en formas esporádicas de carcinoma urotelial del tracto urinario superior. *Actas Urológicas Españolas* 2004; 38 (9):600-607
15. Milne RL, Osorio A, Ramon y Cajal T. et al.: Parity and the risk of breast and ovarian cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Breast Cancer Research and Treatment.* 2010; 119(1): 221-232
16. Olivier M, Eeles R, Hollstein M, et. al.: The IARC TP53 Database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat* 2002; 19: 607–614
17. Toyama T, Zhang Z, Nishio M,. Association of TP53 codon 72 polymorphism and the outcome of adjuvant therapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2007;9:R34
18. Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol.* 1999;19:1092–1100

19. Bosari S, Lee AK, Viale G, Heatley GJ, Coggi G. Abnormal p53 immunoreactivity and prognosis in node-negative breast carcinomas with long-term follow-up. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*
20. Lo Nigro, C.; Vivenza, D.; Monteverde, M, et al.: High frequency of complex TP53 mutations in CNS metastases from breast cancer. *British Journal of Cancer* 2012; 106(2): 397-400
21. Bertheau P, Espié M, Turpin E, et al. TP53 status and response to chemotherapy in breast cancer. *Pathobiology*. 2008;75:132–9. Epub 2008 Jun 10 Review
22. Tsutsui S, Ohno S, Murakami S, Hachitanda Y, Oda S: ADN aneuploidy in relation to the combination of analysis of estrogen receptor, progesterone receptor, p53 protein and epidermal growth factor receptor in 498 breast cancers. *Oncology* 2002, 63:48-55 5. *Acta Oncol*. 2004;43(3):235-44
23. Bhatavdekar JM, Patel DD, Shah NG, Vora HH, Suthar TP, Chikhlikar PR, Ghosh N Trivedi TI. Prognostic significance of immunohistochemically localized biomarkers in stage II and stage III breast cancer: a multivariate analysis. *Ann Surg Oncol* 2000; 7(4): 305-11
24. Friedrichs K, Gluba S, Eidtmann H, Jonat W. Overexpression of p53 and prognosis in breast cancer. *Cancer* 1993; 72: 3641-3647
25. Korkolis D, Ardavanis A, Yotis J, Kyroudi A, et al.: HER-2/neu overexpression in breast cancer: an immunohistochemical study including correlations with clinicopathologic parameters, p53 oncoprotein and cathepsin D. *Anticancer Res* 2001;21(3C): 2207-2212
26. Pérez J, Palomo M, Bahena J, Córdoba J, et al.: Pronóstico de la expresión inmunohistoquímica de la proteína p53 en el cáncer de mama. *REV ESP PATOL* 2002; 35 (3): 315-324
27. Carter CL, Allen C, Henson DE: Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24740 breast cancer cases. *Cancer* 1989; 63: 181-187
28. Clark GM, McGuire WL: New biologic prognostic factors in breast cancer. *Oncology* 1989; 3: 49-54
29. Ceccarelli C, Santini D, Chieco P, Lanciotti C, Taffurelli MG, Marrano D. Quantitative p21 (waf-1) / p53 immunohistochemical analysis defines groups of primary invasive breast carcinomas with different prognostic indicators. *Int J Cancer* 2001 Mar 20; 95(2): 128-130
30. Fisher B, Slack NH: Number of lymph nodes examined and the prognosis of breast carcinoma. *Surg Gynecol Obstet* 1970; 131: 79-80
31. Ingoldsby H, Callagy G. Pathology of minimal metastatic disease in sentinel lymph nodes in breast cancer, *Diagnostic Histopathology* 2009; 15: 470-477
32. Alderson MR, Hamlin I, Staunton MD: The relative significance of prognostic factors in breast carcinoma. *Br J Cancer* 1971; 25: 646-655.
33. McPherson K et al.: ABC of breast diseases: Breast cancer—epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*. 2000; 321(7261):624-628
34. Singletary SE: Rating de risk factors for breast cancer. *Ann Surg*. 2003; 237(4): 474–478
35. Prognostic factors in breast cancer college of American pathologists consensus statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124:966-78.
36. Knight WA, Livingston RB, Gregory BH, et al: Estrogen receptor as independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer. *Cancer Res* 1997; 37: 4669-4771
37. González-Palacios JF: Una nueva modificación en la Clasificación TNM del cáncer mamario. *REV ESP PATOL* 2004; 37(3): 247-251

38. Mittendorf E, Ballman K, McCall L. Et al: Evaluation of the Stage IB Designation of the American Joint Committee on Cancer Staging System in Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2014; JCO.2014:2957-2958
39. 64th WMA General Assembly, Fortaleza, Brazil, World Medical Association Declaration of Helsinki Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects October 2013. *JAMA* November 27, 2013; 310(20): 2191-2194
40. Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2011, para la Prevención, Diagnóstico, Tratamiento, Control y Vigilancia Epidemiológica del Cáncer de Mama.
41. R Development Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL: <http://www.R-project.org/>.
42. Fox and Weisberg. Wood, S.N. Hothorn, Hornik and Zeileis 2006. URL. CRAN.R-project.org/package=rms
43. Peduzzi P, Concato J, Kemper E, Holford T, Feinstein A. A simulation study of the number of events per variable in logistic regression analysis. *J Clin Epidemiol.* 1996; 49(12): p. 1373-1379.

ANEXO 1: Autorización por parte Del Comité de Ética en Investigación



Hospital Central
"Dr. Ignacio Morones Prieto"



San Luis Potosí, S.L.P. a Martes 19 de Agosto de 2014.

Dra. Nadia Judith Gómez Hernández
Investigador Principal:

Por este conducto se le comunica que el Comité de Ética en Investigación y el Comité de Investigación de esta Institución, **revisaron y aprobaron** su protocolo de estudio clínico denominado:

"Asociación de la expresión de la proteína p53 con factores pronóstico en mujeres con cáncer de mama".

El número de registro es: **81- 14**, el cual deberá agregar a la documentación subsecuente, que presente a este comité.

De igual forma, pido sea tan amable de comunicarnos la fecha de inicio de su proyecto, la evolución y el informe final pertinente.

Atentamente,

Dr. Carlos Gilberto Alonso Rivera
Presidente
Comité de Ética en Investigación y Comité de Investigación
Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto"



C.C.P. Archivo

ANEXO 2: Carta de Apoyo del PIFI



Septiembre 17, 2013.

DR. JORGE F. TORO VAZQUEZ
SECRETARIO DE INVESTIGACION Y POSGRADO
PRESENTE.

Por medio de la presente me permito solicitar un cambio de rubro del convenio: CO-RELACION ENTRE LA EXPRESION DE LA.....

Del rubro 33500002(ANALISIS CLINICOS Y LABORATORIOS) \$36,000.00
Al Rubro 25100001 (SUSTANCIAS QUIMICAS).

Lo anterior lo solicito para poder realizar el análisis de muestras incluidas en el proyecto de Investigación.



Sin más por el momento agradezco a Usted la atención y el trámite positivo que se sirva dar a la presente solicitud.

Atentamente,

DR. JESUS MARTIN SANCHEZ AGUILAR
RESPONSABLE DEL CONVENIO



ANEXO 3: Clasificación pTNM

Tumor primario	
Tx	Tumor primario no puede ser evaluado
T0	No hay evidencia de tumor primario
Tis	CDIS Carcinoma Ductal in Situ CLIS Carcinoma Lobulillar in Situ Enfermedad de Paget del pezón
T1	Tumor \leq 20 mm
T1mi	Tumor \leq 1 mm en su diámetro mayor
T1a	Tumor $>$ 1mm pero \leq 5 mm en su diámetro mayor
T1b	Tumor $>$ 5 mm pero \leq 10 mm en su diámetro mayor
T1c	Tumor $>$ 10 mm pero \leq 20 mm en su diámetro mayor
T2	Tumor $>$ 20 mm pero \leq 50 mm en su diámetro mayor
T3	Tumor $>$ 50 mm en su diámetro mayor
T4	Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a la pared torácica y/o dermis (ulceración o nódulos cutáneos). La invasión a la dermis, no se considera como T4
T4a	Extensión a la pared torácica, no incluye solo la adherencia o invasión al músculo pectoral
T4b	Ulceración y/o nódulos satélite y/o edema (incluye piel de naranja) de la piel, que no cumple criterios de carcinoma inflamatorio
T4c	T4a y T4b combinados
T4d	Carcinoma inflamatorio

Modificado de Oncoguía: Cáncer de Mama. Arce et. Al. Cancerología 6 (2011): 77 – 86.

ANEXO 3: CLASIFICACION pTNM (continuación)

Ganglios	
Nx	Los ganglios regionales no pueden ser evaluados
N0	No hay metástasis en los ganglios regionales
N1	Metástasis móviles en ganglios ipsilaterales, del nivel I o II de la axila
N2	Metástasis en ganglios ipsilaterales en el nivel I o II de la axila, que están fijos o en conglomerado. Ganglios positivos en la cadena mamaria interna, en ausencia de ganglios axilares clínicamente palpables
N2a	Metástasis en ganglios axilares del nivel I o II, fijos entre ellos o a otras estructuras
N2b	Metástasis en los ganglios de la cadena mamaria interna en ausencia de ganglios axilares clínicamente detectables
N3	Metástasis a ganglios infraclaviculares (nivel III) ipsilaterales con o sin involucro a ganglios de los niveles I o II. Ganglios a en la cadena mamaria interna con afección de los ganglios del nivel I o II axilar Metástasis en ganglios supraclaviculares ipsilaterales con o sin afección de los ganglios axilares o de la cadena mamaria interna
N3a	Metástasis a ganglios infraclaviculares ipsilaterales
N3b	Metástasis a ganglios ipsilaterales de la cadena mamaria interna
N3c	Metástasis a ganglios supraclaviculares ipsilaterales
Metástasis	
M0	No hay evidencia clínica o radiográfica de metástasis a distancia
cM0 (i+)	No hay evidencia clínica o radiográfica de metástasis a distancia, pero existen depósitos moleculares o microscópicos detectados por células tumorales circulantes en sangre, médula ósea o ganglios regionales menores a 0.2 mm in un paciente sin síntomas de metástasis
M1	Metástasis a distancia detectables

ANEXO 4: Estadios clínicos del cáncer mamario

Estadio	T	N	M
0	T _{ix}	N ₀	M ₀
IA	T ₁	N ₀	M ₀
IB	T ₀	N ₁ M ₁	M ₀
	T ₁	N ₁ M ₁	M ₀
IIA	T ₀	N ₁	M ₀
	T ₁	N ₁	M ₀
	T ₂	N ₀	M ₀
IIB	T ₂	N ₁	M ₀
	T ₃	N ₀	M ₀
IIIA	T ₀	N ₂	M ₀
	T ₁	N ₂	M ₀
	T ₂	N ₂	M ₀
	T ₃	N ₁	M ₀
	T ₃	N ₂	M ₀
IIIB	T ₄	N ₀	M ₀
	T ₄	N ₁	M ₀
	T ₄	N ₂	M ₀
IIIC	Cualquier T	N ₃	M ₀
IV	Cualquier T	Cualquier N	M ₁

ANEXO 5: Técnica de inmunohistoquímica para la detección de p53

PREPARACION DE TEJIDO

El tejido tumoral del bloque de parafina midió de 6-15mm, este fue obtenido por biopsia trucut o escisión, e inmediatamente fijado en formaldehído al 10% con buffer.

1. Un anticuerpo monoclonal de conejo p53 fue utilizado como el anticuerpo primario (Clona Y5-BioCare, FC:2014/01), a una dilución de 1:100, con diluyente Van Gogh Yellow
2. Se realizaron cortes histológicos de 4 micras.
3. Retiro de parafina: los cortes y controles se desparafinan a través de inmersiones secuenciales:
 - a. xilol (xilol I: 10 minutos y xilol II: 10 minutos)
 - b. etanol (alcohol 100%: 5 minutos; alcohol 96%: 5 minutos; alcohol 80%: 5 minutos y alcohol 70%: 5 minutos)
 - c. agua destilada durante 5 minutos.
4. Los cortes sin parafina fueron inmersos por 5 minutos en PEROXIDAZED 1 Biocare
5. Utilización de solución pre tratamiento Reveal
6. La peroxidasa intrínseca al tejido se inactiva tras la inmersión en alcohol 100%, con una solución de 0.5% de peróxido de hidrógeno en metanol absoluto por 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Los cortes se lavan 3 veces en PBS por 5 minutos.
8. Utilización de Biocare's cloaking chamber seguido por agua destilada alternando con incubación durante 45 minutos, después enfriarlos con agua destilada por 10 minutos

9. Se realiza el desenmascaramiento antigénico a través de la incubación de los cortes por 20 minutos en suero bovino.
10. Se coloca el anticuerpo primario para p-53, incubación por 30 minutos con polimerasa.
11. incubación por 5 minutos y RT usando biocare DAB-OR.
12. incubación por 10 minutos y RT usando biocare vulcan.
13. Se enjuaga en hematoxilina durante 20 segundos para realizar contraste.
14. enjuague con agua desinoizada.
15. aplicar solución azul por un minuto y enjuague con agua desionizada
16. se aplica a la muestra solución de anticuerpo secundario biotinilado por 30 minutos.
17. aplicar después solución de avidina-peroxidasa, durante 30 minutos.
18. Para el revelado se utiliza una solución con diaminobencidina, la cual forma un precipitado oscuro mediado por la peroxidasa, por 5 minutos.
19. Contraste con hematoxilina, enjuague con agua desinoizada aplicar solución azul por un minuto y enjuague con agua desionizada

ANEXO 6: concordancia inter e intra observador para determinar la positividad o negatividad de la inmunexpresión de p53.

La inmunexpresión para proteína 53 fue evaluada usando sistema semicuantitativo por dos patólogos (N.G) y (C.O) doble ciego. El patólogo e investigador principal (N.G.) reviso todos casos cuantificando la presencia o ausencia de inmunexpresión nuclear de p53 en 10 campos a alto poder (40x). El segundo patólogo (C.O.) colaborador de estudio, se le entregaron 20% de los casos al azar. La concordancia entre ambos patólogos para definir la negatividad y la positividad fue del 100%; solo con discrepancia en el porcentaje de células positivas en 8 casos que con variabilidad entre los valores positivos 1 y 2.

ANEXO 7: interpretación de la inmunoeexpresion de proteína 53

La inmunoeexpresión para proteína 53 fue evaluada usando sistema semicuantitativo con un estimado del porcentaje de células positivas.

La inmunoreactividad solo se expresa en el núcleo de las células neoplásicas tumorales

Sólo la inmunoeexpresión nuclear se considera positiva para la proteína p53, independientemente del grado de intensidad de la misma (52).

En las células normales, la concentración de la proteína p53 está generalmente por debajo del nivel de detección de métodos inmunohistoquímicos, por lo que su observación con la positividad en el núcleo se considera anormal (52).

Nota: El control positivo fue un tumor con presencia del p53 cuya mutación fue comprobada genéticamente.

Valoración de la inmunoeexpresion de la p53

0. (-): Ninguna célula es positiva en el núcleo.
1. (+): Positividad nuclear en 10 - 50 % de las células tumorales.
2. (++) : Positividad nuclear en más del 50% de las células tumorales.

NOTA: Para la valoración estadística solo se considerará como negativo el valor 0 y positivos los valores 1 y 2.