

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGÍAS EN SALUD

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIATURA EN
HISTOCITOTECNOLOGÍA

Aplicación de la microscopía electrónica y la inmunohistoquímica para el estudio de los dos subtipos más frecuentes de carcinomas de la glándula mamaria en el Hospital Dr. Maximiliano Peralta Jiménez de la provincia de Cartago, Costa Rica, durante el primer semestre del año 2021.

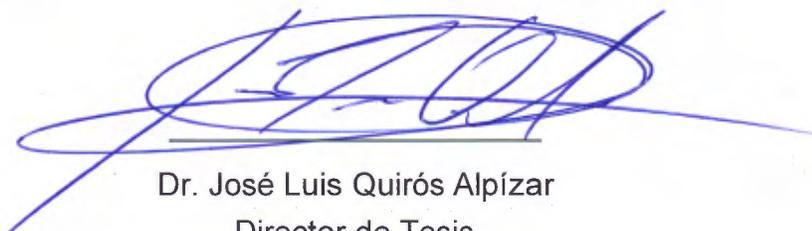
Sergio E. Blanco Fallas. Carné: A50859
Jeison M. Varela Solano. Carné: B06547

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
San José, Costa Rica
Enero de 2023

Este Trabajo Final de Graduación fue aceptado por la Escuela de Tecnologías en Salud de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en Histocitotecnología, el día 24 de noviembre de 2022.



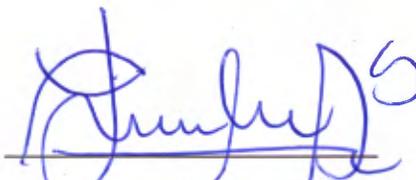
M. Sc. Xinia Alvarado Zeledón
Directora de la Escuela de Tecnologías en Salud



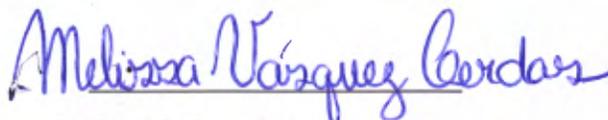
Dr. José Luis Quirós Alpízar
Director de Tesis



Dr. Warner Alpízar Alpízar
Lector



Dra. Lisa Miranda Solís
Lectora



M.Sc. Melissa Vásquez Cerdas
Profesora asignada

Derechos de propiedad intelectual

Los suscritos Sergio Esteban Blanco Fallas, cédula 304100857 y Jeison Mauricio Varela Solano, cédula 114240625, estudiantes de la carrera de Licenciatura en Histocitotecnología de la Universidad de Costa Rica, manifestamos que somos los autores intelectuales del presente Trabajo Final de Graduación. Se prohíbe la reproducción parcial o total sin previa autorización de los autores.

Dedicatoria

Consuelo Alpízar Chaverri

Isabel Solano Alpízar

Alejandra Varela Solano

Julita Fallas Valverde

Milena N. Blanco Fallas

Adriana Blanco Fallas

Agradecimientos

Al comité asesor Dr. José Luis Quirós Alpízar (director), Dr. Warner Alpízar Alpízar y Dra. Lisa Miranda Solís (lectores).

A la M. Sc. Xinia Alvarado Zeledón, directora de la Escuela de Tecnologías en Salud y a Jéssica Calderón Barboza (Trabajos Finales de Graduación de TS).

A los médicos especialistas colaboradores Dr. Genaro Flores Monge y Dra. Carolina Román Salas, (Servicio de Gineoncología - HMPJ). Dra. Alejandra Chinchilla Cob, (Servicio de Rayos X - HMPJ). Dr. Fernando Mena Umaña y Dra. Karol Martínez Granados (Servicio de Patología - HMPJ). Dr. Rodolfo Guzmán Cervantes (Servicio de Patología - HSJD). Jeniffer Díaz Villalobos (Comité Ético Científico - HMPJ).

Índice General

INTRODUCCIÓN.....	1
Capítulo I. Planteamiento del problema.....	2
1.1 Descripción del problema de investigación	2
1.1.1 Preguntas de investigación	7
1.2 Objetivos	8
1.2.1 Objetivo general	8
1.2.2 Objetivos específicos	8
1.3 Justificación.....	9
Capítulo II. Marco teórico.....	14
2.1 Situación epidemiológica mundial del cáncer de mama.....	14
2.2 La incidencia de cáncer en mujeres en Costa Rica.....	15
2.3 Mortalidad por tumores malignos más frecuentes en mujeres en CR.....	16
2.4 Glándula mamaria no neoplásica	17
2.4.1 Generalidades.....	17
2.5 Características biológicas del cáncer	18
2.6 Glándula mamaria neoplásica	26
2.6.1 Generalidades de la clasificación de los tumores de mama.....	27
2.7 Técnicas para el análisis de tejido de mama.....	29
2.7.1 Inmunohistoquímica (IHQ)	29
2.7.2 Panel inmunohistoquímico para la clasificación del cáncer de mama...30	
2.7.3 Microscopía electrónica (ME).....	31
Capítulo III. Marco metodológico	34
3.1 Descripción general de la estrategia metodológica	34

3.2 Descripción metódica de cada experiencia investigativa.....	34
3.2.1 Tipo de estudio.....	34
3.2.2 Población de interés, objeto de estudio y unidad de análisis	35
3.2.3 Criterios de inclusión y exclusión	35
3.2.4 Alcances del diseño propuesto	36
3.2.5 Controles negativos.....	36
3.3 Definición y operacionalización de las variables de estudio	37
3.4 Definición de los procedimientos de recolección de información	39
3.4.1 Muestreo	39
3.5 Definición de los procesamientos y técnicas de análisis	40
3.5.1 Análisis para IHQ	40
3.5.2 Análisis para MET	42
3.6 Consideraciones éticas	47
Capítulo IV. Resultados	49
4.1 Hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos	49
4.1.1 Caso C1	52
4.1.2 Caso F1.....	57
4.1.3 Caso G2	62
4.1.4 Caso H1	67
4.2 Hallazgos ultraestructurales de la microscopía electrónica de transmisión .	73
4.2.1 Caso C1 Luminal A	74
4.2.2 Caso F1 Luminal B.....	76
4.2.3 Caso G2 Luminal B	78
4.2.4 Caso H1 Luminal B	81

4.3	Análisis de resultados.....	83
4.3.1	Descripción de los hallazgos inmunohistoquímicos y los patrones ultraestructurales.....	83
4.3.2	Otros hallazgos	96
4.3.3	Artefactos	97
4.4	Limitaciones de la investigación	98
Capítulo V. Conclusiones y recomendaciones		100
5.1	Conclusiones.....	100
5.2	Recomendaciones.....	101
Referencias bibliográficas.....		101
Anexo 1. Sistema de visualización. Protocolo para los receptores		112
Anexo 2. Sistema de visualización. Protocolo para HER/neu y Ki-67		113
Anexo 3. Registro de preparación de muestras para MET.....		114
Anexo 4. Instrumento de medición para IHQ.....		115
Anexo 5. Instrumento de medición para IHQ. Caso 1 (C1)		117
Anexo 6. Instrumento de medición para IHQ. Caso 2 (F1)		119
Anexo 7. Instrumento de medición para IHQ. Caso 3 (G2)		121
Anexo 8. Instrumento de medición para IHQ. Caso 4 (H1)		123
Anexo 9. Instrumento de medición para MET		125
Anexo 10. Instrumento de medición para MET. Caso 1 (C1)		127
Anexo 11. Instrumento de medición para MET. Caso 2 (F1)		129
Anexo 12. Instrumento de medición para MET. Caso 3 (G2)		131
Anexo 13. Instrumento de medición para MET. Caso 4 (H1)		133
Anexo 14. Inserto de HER2/neu.....		135
Anexo 15. Inserto de Ki-67		138

Anexo 16. Inserto de Receptor de Estrógenos	140
Anexo 17. Inserto de Receptor de Progesterona	144

Índice de Figuras

Figura 1. Incidencia y mortalidad de tumores malignos más frecuentes	17
Figura 2. Glándula mamaria femenina. Disección sagital.....	18
Figura 3. Actuales sellos distintivos del cáncer. <i>Hallmarks of cancer</i>	23
Figura 4. Sellos distintivos emergentes propuestos.....	24
Figura 5. Proceso estandarizado de la técnica de inmunohistoquímica	41
Figura 6. Bloque elegible para análisis por MET	43
Figura 7. Corte semifino descartado para análisis por MET	44
Figura 8. Proceso general de la técnica de microscopía electrónica.	45
Figura 9. Diagrama de flujo de la metodología	46
Figura 10. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria a 4X.	52
Figura 11. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria a 10X ...	53
Figura 12. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria a 20X ...	53
Figura 13. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria a 40X ...	54
Figura 14. Microfotografía de un corte histológico de un carcinoma, teñido con el Anticuerpo HER2/neu a 20X.....	54
Figura 15. Microfotografía de un corte histológico de un carcinoma, teñido con el Anticuerpo Ki-67 a 20X.....	55
Figura 16. Microfotografía de un corte histológico de un carcinoma, teñido con el Anticuerpo Receptor de Estrógenos a 20X.....	56
Figura 17. Microfotografía de un corte histológico de un carcinoma, teñido con el Anticuerpo Receptor de Progesterona a 20X	56
Figura 18. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria a 4X.	57
Figura 19. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria a 10X. ...	58

Figura 20. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria a 20X. ...	58
Figura 21. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria a 40X. ...	59
Figura 22. Microfotografía de un corte histológico de un carcinoma, teñido con el Anticuerpo HER2/neu a 20X.....	59
Figura 23. Microfotografía de un corte histológico de un carcinoma, teñido con el Anticuerpo Ki-67 a 20X.....	60
Figura 24. Microfotografía de un corte histológico de un carcinoma, teñido con el Anticuerpo Receptor de Estrógenos a 20X.....	60
Figura 25. Microfotografía de un corte histológico de un carcinoma, teñido con el Anticuerpo Receptor de Progesterona a 20X.	61
Figura 26. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria a 4X.	62
Figura 27. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria a 10X. ...	63
Figura 28. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria a 20X. ...	63
Figura 29. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria a 40X. ...	64
Figura 30. Microfotografía de un corte histológico de un carcinoma, teñido con el Anticuerpo HER2/neu a 20X.....	64
Figura 31. Microfotografía de un corte histológico de un carcinoma, teñido con el Anticuerpo Ki-67 a 20X.....	65
Figura 32. Microfotografía de un corte histológico de un carcinoma, teñido con el Anticuerpo Receptor de Estrógenos a 20X.....	65
Figura 33. Microfotografía de un corte histológico de un carcinoma, teñido con el Anticuerpo Receptor de Progesterona a 20X.	66
Figura 34. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria a 4X.	67
Figura 35. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria a 10X. ...	68
Figura 36. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria a 20X ...	68
Figura 37. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria a 40X. ...	69

Figura 38. Microfotografía de un corte histológico de un carcinoma, teñido con el Anticuerpo HER2/neu a 20X.....	69
Figura 39. Microfotografía de un corte histológico de un carcinoma, teñido con el Anticuerpo Ki-67 a 20X.....	70
Figura 40. Microfotografía de un corte histológico de un carcinoma, teñido con el Anticuerpo Receptor de Estrógenos a 20X.....	70
Figura 41. Microfotografía de un corte histológico de un carcinoma, teñido con el Anticuerpo Receptor de Progesterona a 20X.	71
Figura 42. Microfotografía de un carcinoma de mama, empleando la técnica de MET a 3000X.....	74
Figura 43. Microfotografía de un carcinoma de mama, empleando la técnica de MET a 3500X.....	74
Figura 44. Microfotografía de un carcinoma de mama, empleando la técnica de MET a 3500X.....	75
Figura 45. Microfotografía de un carcinoma de mama, empleando la técnica de MET a 3000X.....	75
Figura 46. Microfotografía de un carcinoma de mama, empleando la técnica de MET a 3000X.....	76
Figura 47. Microfotografía de un carcinoma de mama, empleando la técnica de MET a 3000X.....	76
Figura 48. Microfotografía de un carcinoma de mama, empleando la técnica de MET a 4000X.....	77
Figura 49. Microfotografía de un carcinoma de mama, empleando la técnica de MET a 2000X.....	78
Figura 50. Microfotografía de un carcinoma de mama, empleando la técnica de MET a 3000X.....	78
Figura 51. Microfotografía de un carcinoma de mama, empleando la técnica de	

MET a 9000X.....	79
Figura 52. Microfotografía de un carcinoma de mama, empleando la técnica de MET a 3000X.....	79
Figura 53. Microfotografía de un carcinoma de mama, empleando la técnica de MET a 3000X.....	80
Figura 54. Microfotografía de un carcinoma de mama, empleando la técnica de MET a 1000X.....	80
Figura 55. Microfotografía de un carcinoma de mama, empleando la técnica de MET a 3000X.....	81
Figura 56. Microfotografía de un carcinoma de mama, empleando la técnica de MET a 3000X.....	81
Figura 57. Microfotografía de un carcinoma de mama, empleando la técnica de MET a 3000X.....	82
Figura 58. Microfotografías de cortes histológico de glándula mamaria, procesados por la técnica de IHQ a 20X.....	82
Figura 59. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria del caso C1, procesado por la técnica de IHQ a 20X	82
Figura 60. Microfotografías de cortes histológicos de glándula mamaria de biopsias por aguja gruesa, procesados por la técnica de IHQ a 20X	82
Figura 61. Microfotografías de cortes histológicos de glándula mamaria de biopsias por aguja gruesa, procesados por la técnica de IHQ a 20X.	87
Figura 62. Microfotografías de cortes histológicos de glándula mamaria de biopsias por aguja gruesa, procesados por la técnica de IHQ a 20X.	89
Figura 63. Microfotografías de cortes histológicos y ultraestructurales de un carcinoma mamario procesados por las técnicas de IHQ y MET.	89
Figura 64. Microfotografías de cortes histológicos y ultraestructurales de un carcinoma mamario procesados por las técnicas de IHQ y MET.	90

Figura 65. Microfotografías de cortes histológicos y ultraestructurales de un carcinoma mamario procesados por las técnicas de IHQ y MET.	91
Figura 66. Microfotografías de cortes histológicos y ultraestructurales de un carcinoma mamario procesados por las técnicas de IHQ y MET.	92
Figura 67. Microfotografías del caso C1, bloque C en un carcinoma mamario del subtipo Luminal A, empleando la técnica de MET.....	92
Figura 68. Microfotografía del caso G2, bloque A en un carcinoma mamario del subtipo Luminal B. empleando la técnica de MET.....	92
Figura 69. Imágenes de MET. Diferencias entre una célula epitelial y célula inflamatoria.	96
Figura 70. Mediciones de los gránulos de una célula inflamatoria.	96
Figura 71. Artefactos presentes en los cortes ultrafinos de MET.	97

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Incidencia de tumores malignos más frecuentes	16
Cuadro 2. Clasificación de los tumores malignos de la glándula mamaria.	27
Cuadro 3. Matriz de operacionalización de variables.	38
Cuadro 4. Muestras incluidas en el estudio y su diagnóstico histológico.	49
Cuadro 5. Subclasificación histológica de los casos para MET.....	50
Cuadro 6. Criterios diagnósticos del carcinoma invasivo de mama.....	51
Cuadro 7. Resumen de las estructuras histológicas y los hallazgos inmunohistoquímicos identificados en los cuatro casos.	72
Cuadro 8. Cantidad de imágenes tomadas en MET por caso.	73
Cuadro 9. Resultados inmunohistoquímicos del biomarcador HER2/neu	83
Cuadro 10. Resultados de las pruebas inmunohistoquímicas sobre el índice de proliferación y de los receptores hormonales.	85
Cuadro 11. Comparación de las mediciones de las distintas microestructuras presentes en los subtipos luminal A (C1) y luminal B (G2).....	92

Lista de abreviaturas y siglas

Ac	Anticuerpo
ACS	Sociedad Americana Contra el Cáncer, por sus siglas en inglés
CCSS	Caja Costarricense de Seguro Social
CIEMIC	Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas de la Universidad de Costa Rica
CM	Cáncer de mama
CMI	Cáncer de mama invasivo
CT	Células tumorales
DAB	Diaminobencidina tetrahidrocloreuro
FDA	Agencia de Drogas y Alimentos, por sus siglas en inglés
FISH	Hibridación Fluorescente in Situ, por sus siglas en inglés
GLOBOCAN	<i>Global Cancer Statistics</i> , por sus siglas en inglés
HER2/neu	Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano
HMP	Hospital Dr. Maximiliano Peralta Jiménez
IHQ	Inmunohistoquímica
H&E	Hematoxilina y eosina
INEGI	Instituto Nacional de Estadísticas y Geografía de México
kV	Kilovoltios
MEC	Matriz extracelular
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
NGS	Secuenciación de Nueva Generación, por sus siglas en inglés

NIH	Instituto Nacional del Cáncer, por sus siglas en inglés
nm	Nanómetro
OMS	Organización Mundial de la Salud
SIMS	Espectrometría de Masas de Iones Secundarios, por sus siglas en inglés
PCR	Reacción de la Cadena de Polimerasa, por sus siglas en inglés
RAE	Real Academia Española
RE	Receptor de estrógenos
RP	Receptor de progesterona
TFG	Trabajo Final de Graduación
TS	Escuela de Tecnologías en Salud
UCR	Universidad de Costa Rica
VEGF-A	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular, por sus siglas en inglés
\bar{X}	Promedio

Resumen

El objetivo principal de esta investigación fue determinar los dos subtipos de carcinoma mamario más frecuentes, aplicando las técnicas de inmunohistoquímica y microscopía electrónica de transmisión, para obtener un diagnóstico más preciso del carcinoma de glándula mamaria en la provincia de Cartago, Costa Rica, durante el primer semestre del año 2021.

La presente investigación fue de tipo observacional descriptiva no intervencionista donde se describieron características, como las dimensiones de los patrones ultraestructurales propios de los carcinomas Luminal A y Luminal B que se presentaron en mujeres mayores de 18 años, atendidas en los distintos servicios del Hospital Dr. Maximiliano Peralta Jiménez, dentro del período de desarrollo de este proyecto. En total como objeto de estudio se seleccionaron 4 muestras provenientes de biopsias de tejido de la glándula mamaria.

La investigación permitió generar información de los subtipos Luminales A y B sobre sus características ultraestructurales, haciendo uso de la técnica de microscopía electrónica de transmisión que visualizó componentes celulares a más de 3000 aumentos. Sin embargo, se concluyó que el diagnóstico más preciso para la subclasificación de los carcinomas de la glándula mamaria es a través de la inmunohistoquímica y se reconoció el alto nivel de complejidad empleado y el aporte de estandarizar una técnica de gran valor para otras investigaciones.

INTRODUCCIÓN

La histocitotecnología es una palabra compuesta por histología y citodiagnóstico. La Real Academia Española (RAE), define a la primera como la parte de la anatomía que trata del estudio de los tejidos orgánicos. Por otra parte, el diagnóstico citológico corresponde a los procedimientos basados en el examen de las células contenidas en un líquido (1). Uno de los principales ámbitos de acción de esta carrera es la anatomía patológica.

Hoy en día las investigaciones en cáncer a nivel mundial y en la región, constituyen una importante herramienta para disminuir la mortalidad de miles de personas cada año, mejorando el diagnóstico, el pronóstico y brindando nuevos tratamientos. En Costa Rica no es la excepción, la incidencia del cáncer de mama en mujeres está en aumento (2). Por esta razón, es necesario contribuir con investigaciones que hasta el momento no se han realizado en el país, mediante técnicas diagnósticas actuales para estudiar el tejido neoplásico mamario.

La actual generación de histocitotecnólogas e histocitotecnólogos tienen la responsabilidad de aplicar los conocimientos adquiridos durante su formación en la Universidad de Costa Rica (UCR). Esto con el fin de desarrollar investigaciones propias y enriquecer con sus colaboraciones proyectos interdisciplinarios con el propósito de mejorar la salud pública.

En esta investigación se determinaron los dos subtipos más frecuentes de carcinoma mamario mediante la técnica de Inmunohistoquímica (IHQ) y de las muestras procesadas por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET). Esto para la determinación de un diagnóstico más preciso del carcinoma de la glándula mamaria en el Hospital Dr. Maximiliano Peralta Jiménez (HMP), de la provincia de Cartago, Costa Rica, durante el primer semestre del 2021.

Capítulo I. Planteamiento del problema

1.1 Descripción del problema de investigación

El cáncer de la glándula mamaria es la neoplasia maligna no cutánea más común en mujeres alrededor del mundo con 2,3 millones de nuevos casos en el 2020. Ha superado al cáncer de pulmón como el cáncer más comúnmente diagnosticado (3, 4).

Esta neoplasia presenta la mayor tasa de mortalidad en mujeres diagnosticadas con cáncer a nivel global, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), citado por Salinas et al. (5) el cáncer de mama (CM) causó aproximadamente el 15% de todas las muertes por cáncer durante el 2015, con un total de 570 000 defunciones y para el año 2020 esta cifra aumentó a 684 996 defunciones (3), principalmente en países subdesarrollados (4, 6, 7). En el continente europeo durante el 2020 se diagnosticaron cerca de 531 086 casos de CM y se produjeron alrededor de 141 765 muertes (8). Estas cifras convierten al CM en una prioridad del sector salud a nivel mundial.

En el continente asiático, específicamente en Indonesia, el cáncer con la incidencia más alta es el CM (18,6 pacientes por cada 100 000 habitantes anualmente). La mayoría de las pacientes (63%) fueron diagnosticadas en estadios avanzados, usualmente III o IV. Se reporta que mujeres con el mismo nivel de estadio no tienen el mismo resultado ante los regímenes de quimioterapia por la necesidad de precisión de los marcadores inmunohistoquímicos previos a la exposición a los tratamientos (9).

En España, la tasa de incidencia estandarizada por edad en el año 2015 refería 65,2 por 100 000 mujeres y la tasa de incidencia correspondiente a la población europea fue de 88,3 por 100 000 mujeres. El país se encuentra en una posición intermedia con respecto a todo el mundo (10). Aunque la mortalidad ha descendido gracias a los programas de cribado y a la mejora de los tratamientos, esta enfermedad sigue siendo la primera causa de muerte por cáncer en España en la población femenina (11).

Estados Unidos posee datos muy desalentadores; el Instituto Nacional del Cáncer (NIH, por sus siglas en inglés) y la Agencia de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés), advierten que 1 de cada 8 mujeres presentarán CM en algún momento de sus vidas. Además, la Sociedad Americana Contra el Cáncer (ACS), señala que 9 de cada 10 muertes por cáncer de la glándula mamaria ocurren en mujeres mayores de 50 años (5).

En Brasil, la incidencia del CM es similar a la incidencia de los países desarrollados, pero varía de acuerdo con la región, mostrando índices más altos al sur del país. Ha disminuido la mortalidad en los estados más desarrollados gracias a la implementación de seguros de salud en las ciudades principales (6).

Países como Perú reconocen la importancia de la aplicación del perfil molecular del CM para la determinación del riesgo individual de cada paciente, tratamiento y pronóstico. Sin embargo, las técnicas moleculares como la IHQ, no están disponibles en la mayoría de sus hospitales y su aplicación es muy limitada (12). Por este motivo, es importante diversificar las técnicas diagnósticas que lleven a cabo una clasificación precisa del CM.

En los países de la región, los datos actualizados sobre incidencia y letalidad por CM indican que la mortalidad por esta causa en la mayoría de Latinoamérica va en aumento, particularmente en Colombia, Costa Rica, Ecuador, México y Venezuela que recientemente contaban con tasas relativamente bajas (13).

A pesar de los esfuerzos para fomentar los diagnósticos tempranos en la región, mueren alrededor de 92 000 mujeres al año (5). Las cifras del Instituto Nacional de Estadísticas y Geografía de México (INEGI), señalan a los tumores malignos como la tercera causa de muerte de su población, de este grupo el CM es el número uno en mujeres mayores de 25 años, desplazando al cáncer de cérvix desde el 2006. Para el 2008 la incidencia del CM fue de 14,63% en mujeres mayores de 15 años y el porcentaje de defunciones fue de 7,6% contra un 2,7% de las producidas por cáncer de cérvix. Durante el 2010 murieron 5 000 mujeres por CM solo en México (14).

En Guatemala, según las estimaciones reportadas en el 2020 por *Global Cancer Statistics* (GLOBOCAN), por sus siglas en inglés, las tasas de incidencia y mortalidad por cada 100 000 mujeres indicaron que el CM fue el más frecuente, con una tasa de incidencia de 11, mientras que la tasa de mortalidad fue 5,3 (3, 15).

En Costa Rica, la incidencia de esta condición ha pasado de una tasa de 47,9 casos por cada 100 000 mujeres en el año 2013 a 55,87 casos por cada 100 000 mujeres en el 2014 (2). Llama la atención que esta enfermedad es la primera causa de muerte entre la población femenina a nivel nacional (3), lo cual coloca a Costa Rica en el primer lugar en Centroamérica y México en mortalidad e incidencia por dicha neoplasia (5).

Estas cifras hacen que el CM sea considerada una patología de interés público en el ámbito de la salud costarricense, lo cual justifica la necesidad de llevar a cabo investigaciones que ayuden a descifrar aspectos celulares y moleculares relacionados con la etiología y progresión de la enfermedad. Lo anterior con la finalidad de identificar biomarcadores de utilidad en la detección temprana, la evaluación pronóstica, la predicción de respuestas a los tratamientos farmacológicos y la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas. En última instancia, esto se traduciría en la disminución de efectos adversos provocados por el tratamiento y la mortalidad de las pacientes de CM.

Costa Rica cuenta con la tecnología y metodologías avanzadas ya estandarizadas en algunos centros de investigación y docencia, como la Secuenciación de Nueva Generación (NGS, por sus siglas en inglés), diversos tipos de Reacción de la Cadena de Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), la Hibridación Fluorescente in Situ (FISH, por sus siglas en inglés), y la IHQ, tanto para la práctica clínica como para fines de investigación (16).

La clasificación del CM por medio de la IHQ se fundamenta en la identificación y cuantificación de proteínas específicas que sirven como biomarcadores con fines diagnósticos y pronósticos o predictivos. La positividad de los receptores de estrógeno (RE), de progesterona (RP) y del

factor de crecimiento de tipo epidérmico humano 2 (HER2/neu) definen y fundamentan esta clasificación (17). De acuerdo con la expresión de estas proteínas, los tumores se clasifican en tumores luminales (expresan RE o RP) y no luminales (carecende la expresión de dichos receptores) (17). Dependiendo de la expresión del receptor HER2, las lesiones tumorales del grupo luminal se diferencian en otros dos subtipos, siendo los tumores luminales A los que expresan los receptores hormonales (RE o RP) pero no expresan el HER2; mientras que los tumores luminales B son aquellos tumores positivos tanto para receptores hormonales como para HER2 (17).

El abordaje terapéutico de la enfermedad depende del esquema de clasificación mencionado, lo cual evidencia la importancia de un diagnóstico apropiado. Esta clasificación es muy exhaustiva debido a la heterogeneidad del CM. Primeramente, deben clasificarse de acuerdo con el tipo de CM, que se determina mediante el origen de las células específicas que se ven afectadas. Según ese origen, estos tumores pueden dividirse entre carcinomas que surgen del componente epitelial de la mama o sarcomas que surgen del estroma, células de los vasos sanguíneos o de los miofibroblastos. Esta categorización no es excluyente, ya que existen tumores que combinan ambos tipos celulares (5). Adicionalmente, los carcinomas se dividen por sus características patológicas e invasividad en tres grupos que son: no invasivos, invasivos y metastásicos.

La clasificación de mayor interés para este proyecto de investigación es la de los subtipos histológicos. Dicha clasificación se lleva a cabo por la expresión o ausencia de RE, RP, HER2 y Ki-67; dicho panel de anticuerpos divide los CM en Luminal A, Luminal B, HER2 positivo y triple negativo (5), para fines prácticos, la investigación se concentra en los dos primeros subtipos, esto porque presentan una mayor incidencia.

La Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) y la IHQ son técnicas utilizadas en diagnóstico e investigación que han contribuido de forma sustancial al estudio de los tumores, especialmente para conocer más sobre su comportamiento biológico, así como para la identificación de biomarcadores de utilidad diagnóstica, pronóstica y predictiva. La aplicación

conjunta de estas técnicas ha generado conocimiento en tumores de hipófisis (18), carcinoma rabdoide del canal anal (19), tumor trabecular hialinizante (20), melanoma (21). Actualmente el Hospital San Juan de Dios (HSJD), trabaja en conjunto con el Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas (CIEMic), de la Universidad de Costa Rica, para aplicar la MET en muestras de riñón. No obstante, el uso de la MET para estudiar el CM es muy reducido.

En un estudio realizado en colaboración con varios centros de investigación en Suiza durante el 2017, se usó esta herramienta de manera complementaria con otras técnicas; la Espectrometría de Masas de Iones Secundarios (SIMS, por sus siglas en inglés). Se logró visualizar de manera exacta la distribución del fármaco organometálico rutenio (Ru), y las células de CM a nivel subcelular. Se demostró que al ser aplicado el medicamento se localiza mayormente en la membrana celular y en el nucléolo (22).

En Costa Rica, no hay evidencia de estudios que hayan explorado una relación entre los hallazgos inmunohistoquímicos y la MET en el CM. Por lo anterior, el presente estudio realizó una descripción de los tumores de mama según sus características de expresión de proteínas específicas mediante los análisis inmunohistoquímicos y de la morfología ultraestructural de las imágenes de MET.

La razón principal que motivó esta investigación se deriva de la alta incidencia y mortalidad del CM, a nivel nacional e internacional, el impacto social y económico que tiene esta patología y la necesidad de conocer con mayor detalle su ultraestructura. Desde la visión de los trabajadores en salud involucrados directamente en el diagnóstico de la enfermedad, se debe invertir tiempo y recursos en estudios que incorporen nuevas tecnologías para refinar la clasificación actual del CM.

1.1.1 Preguntas de investigación

Las preguntas de investigación asociadas a este proyecto son las siguientes:

¿Puede la MET brindar más información sobre las características morfológicas de los dos subtipos de tumores de mama más frecuentes, así como un diagnóstico más específico dentro de la actual clasificación internacional de carcinomas mamarios?

¿Permite la MET clasificar los tumores de igual manera que la IHQ o pueden ambas técnicas ser utilizadas de forma complementaria?

¿Permite la MET realizar un diagnóstico más robusto si se suma a la actual clasificación internacional de carcinomas mamarios?

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Determinar los dos subtipos de carcinoma mamario más frecuentes mediante inmunohistoquímica (IHQ) y microscopía electrónica de transmisión (MET), para la obtención de un diagnóstico más preciso del carcinoma de glándula mamaria en la provincia de Cartago, Costa Rica, durante el primer semestre del año 2021.

1.2.2 Objetivos específicos

1. Describir mediante inmunohistoquímica los dos subtipos de carcinomas mamarios más comunes de acuerdo con la expresión de los marcadores RE, RP, HER2/neu y el Ki-67.

2. Caracterizar los dos subtipos de carcinomas mamarios más frecuentes mediante la microscopía electrónica de transmisión (MET) para la identificación de patrones ultraestructurales propios de cada subtipo.

3. Determinar si los hallazgos inmunohistoquímicos y los patrones ultraestructurales se complementan para el diagnóstico del carcinoma de glándula mamaria.

1.3 Justificación

El cáncer es un grupo de enfermedades de origen complejo y multifactorial para las que aún se desconocen muchos aspectos relacionados con su inicio, desarrollo y progresión (23). Por esto surge la necesidad de conocer más a fondo el cáncer a nivel ultraestructural, y en eso se basó el presente trabajo. El impacto que tiene el cáncer en la salud pública es lo que promueve que en la actualidad se lleven a cabo investigaciones, con el propósito de disminuir la mortalidad asociada a esta patología.

La clasificación fidedigna de una patología tan heterogénea como el CM es de suma importancia, porque al obtener un diagnóstico más acertado se puede brindar un tratamiento más efectivo. Actualmente, el diagnóstico de los tipos de cáncer en Costa Rica se hace por las técnicas tradicionales de histología y citología, apoyado por la IHQ y técnicas moleculares como la FISH. Estas permiten la identificación de cambios, principalmente en la expresión de proteínas, que se dan cuando una célula de este tejido se vuelve cancerosa (7, 23); sin embargo, los enfoques modernos de medicina de precisión en el contexto del cáncer demandan la búsqueda de alternativas para confirmar el diagnóstico, o hacerlo más preciso.

Hace tres décadas el papel del tecnólogo en histología dentro del sistema de salud costarricense, se limitaba a preparar láminas histológicas mediante técnicas y procedimientos de manera artesanal y con personal empírico. Posteriormente, estas láminas, serían evaluadas por parte del personal médico para emitir su diagnóstico; en algunos casos se requerían estudios más específicos donde se utilizaban reactivos químicos para demostrar la presencia o ausencia de microorganismos o para identificar algún componente celular, lo que consolidó la base de la histoquímica. Hoy en día la labor de las y los profesionales en histocitotecnología va más allá, lo cual se asocia a los avances científicos, tecnológicos y gracias al proceso de actualización y automatización en los centros de educación superior y hospitalarios. Uno de los objetivos principales de las y los

histocitotecnólogos durante su formación actual, es contribuir en el desarrollo de la investigación en el proceso del diagnóstico clínico. Además, este profesional participa activamente en el registro, manipulación y preparación de las muestras de tejido mamario, aplicando los conceptos académicos en la labor diaria y propiciando el uso de técnicas que generen conocimiento de lo que sucede a nivel celular y molecular.

La necesidad de incorporar estas técnicas diagnósticas ha propiciado que la Caja Costarricense de Seguro Social (CCSS), se comprometa a fortalecer los Servicios de Patología con la implementación de la IHQ en sus laboratorios. A pesar de que esta técnica tiene un alto impacto a nivel diagnóstico, pronóstico y predictivo, no se ha aprovechado todo su potencial en investigación y en innovación, por lo que se deben impulsar proyectos de investigación que contemplen su aplicación a lo interno de la CCSS. Como respuesta a esta problemática, y por los altos índices de incidencia y mortalidad del CM a nivel nacional e internacional, es que se presentó esta propuesta de investigación, misma que recibió el apoyo del servicio de Patología Clínica del Hospital Dr. Maximiliano Peralta Jiménez (HMP); donde existió interés de incluir la IHQ en un estudio descriptivo con la técnica de MET, en conjunto con el CIEMic de la UCR. El análisis entre ambas técnicas diagnósticas permitió obtener datos que pueden eventualmente traducirse en un mejor abordaje clínico de las patologías relacionadas con la glándula mamaria; de este modo se buscó crear un precedente para motivar futuras investigaciones relacionadas con el cáncer.

En el caso de la CCSS, el desarrollo de esta investigación contribuyó con sus políticas, dado que con ello se buscó mejorar las alternativas diagnósticas en pro del beneficio de la población que atiende. Además, ayudó a generar datos para que, en conjunto con otras investigaciones, se actualicen las clasificaciones del CM. Por consiguiente, garantizar los tratamientos más asertivos para cada subtipo de CM, tiene un impacto en la disminución de los costos económicos de las intervenciones terapéuticas, especialmente cuando no se obtiene un beneficio clínico en las pacientes o, por el contrario, les genera efectos adversos perjudiciales.

Este estudio pretendió fortalecer los procesos de generación y utilización del conocimiento científico y tecnológico en salud, como base para la toma de decisiones basada en evidencia (24). Los resultados que se obtuvieron de esta investigación son una herramienta enfocada en generar datos que permitan abordar el CM, con el objetivo de desarrollar acciones que mejoren el estado de salud físico, mental y social de las personas usuarias.

La MET ha sido utilizada para el análisis morfométrico de las células transformadas del tejido mamario, pero no es un método de uso clínico frecuente. Por medio de la MET se pueden evaluar las características morfológicas de la membrana celular, nuclear, tamaño del núcleo, tipo de cromatina y alteraciones en diferentes constituyentes celulares que afectan la función celular. Esta evaluación permite obtener datos que, sistematizados, pueden servir para la elaboración de un patrón de modificación ultraestructural que caracteriza al mecanismo de transformación, relacionando los componentes involucrados en la síntesis de proteínas (25, 26) y la conformación del citoesqueleto (27).

El estudio sistemático del CM utilizando la MET, podría refinar la clasificación actual al estudiar las características de las células cancerosas con mayor detalle. Esto brindaría una mejor predicción del comportamiento del tumor y permitiría realizar un abordaje terapéutico acorde a características más exactas del mismo. También se introduce una nueva metodología de trabajo para establecer futuras líneas de investigación colaborativas entre la UCR y la CCSS.

El desarrollo de esta investigación abarcó varios aspectos que podrían ser de relevancia. En primer lugar, la sociedad y específicamente la población femenina podrían verse beneficiadas a largo plazo, ya que tendrían un panorama diagnóstico más amplio, que se podría implementar en los servicios de Patología como se hace actualmente con las muestras de riñón. Este estudio puede arrojar resultados e hipótesis que pueden servir para llevar a cabo estudios más grandes y complejos que pueden tener un

impacto aún mayor.

El beneficio para la Universidad de Costa Rica se derivó de uno de sus principios, que es generar conocimiento que sirva como herramienta para mejorar la calidad de vida de los costarricenses y proyectarlo a nivel internacional. La misma, reconoce lo prioritario que es el tema del cáncer a nivel país por lo que a través de la Escuela de Tecnologías en Salud (TS), se elevó el grado académico de los diplomados en Histología al Plan Especial de Bachillerato y Licenciatura en Histocitotecnología, con el propósito de incursionar en campos innovadores de la patología y contribuir a mejorar los procedimientos propios de esta área del conocimiento. Como fruto de este esfuerzo institucional es que se desarrollan Trabajos Finales de Graduación (TFG) como este, cuya finalidad es evidenciar la calidad de enseñanza que la UCR imparte. Cabe mencionar que para la primera generación de los profesionales en Histocitotecnología de Costa Rica, los proyectos de graduación significan un gran compromiso de excelencia, no solo por representar a la UCR y a la Escuela de TS, sino por el alto grado de complejidad que demanda trabajar en aspectos tan delicados como el diagnóstico de cáncer en humanos.

Para la Escuela de TS de la UCR, la formación de los profesionales en histocitotecnología, ha sido un proceso y un reto, porque constituyen la primera generación en el país de bachilleres y licenciados, cuyo desempeño abarca áreas que van desde la patología animal hasta la vegetal y que llevan en sus principios la investigación como base para la generación de conocimiento y acción social. La Escuela de TS comenzó a ampliar su área investigativa, siendo las ciencias morfológicas uno de los principales ejes, debido a que la contribución actual de los profesionales en Histocitotecnología se enfoca en esta área, pero propiciando siempre otros temas novedosos y emergentes que hasta el momento no han sido parte de la unidad académica y que repercutirían positivamente en la salud de la sociedad costarricense. Además, los resultados de esta investigación podrían llevar a la formulación de otros trabajos complementarios a éste.

Entre los beneficios para la carrera de Histocitotecnología, se pueden mencionar que este TFG se tradujo en una mayor visualización de esta y promocionó a sus futuros profesionales para colaboraciones con otros centros de enseñanza e investigación. Por lo tanto, es la puesta en práctica de los conocimientos técnicos adquiridos en una carrera de reciente surgimiento en el país.

Algunos estudios epidemiológicos (2, 7), han servido para que las autoridades de salud costarricenses consideren al CM como una patología de interés público. Esto evidenció la necesidad de llevar a cabo investigaciones que ayuden a conocer los aspectos moleculares y celulares que definen la enfermedad, su evolución, su diagnóstico, los posibles tratamientos y la prevención, con el fin de disminuir la mortalidad de las usuarias. Un fin importante de la investigación en cáncer, y en este caso específico CM, fue establecer esquemas que permitan la prevención y detección temprana de la enfermedad, o bien maximizar el beneficio asociado al tratamiento de las y los pacientes.

Con este proyecto se pretendió, entonces, estudiar características morfológicas y celulares de los dos subtipos más comunes de neoplasias en la glándula mamaria. Esto ayudó a discernir características morfológicas que podrían ser de utilidad para mejorar la clasificación de este tipo de tumores.

Capítulo II. Marco teórico

El siguiente capítulo incluye la discusión teórica de los conceptos y temas más relevantes de esta investigación, como son la situación epidemiológica del CM a nivel mundial y nacional (incidencia y mortalidad), generalidades de la mama (neoplásica y no neoplásica), clasificación de los tumores malignos, técnicas de análisis como la microscopía electrónica de transmisión y la inmunohistoquímica (anticuerpos usados en el panel de mama).

2.1 Situación epidemiológica mundial del cáncer de mama

La carga de las enfermedades no transmisibles está creciendo en el mundo. Esto se atribuye principalmente al aumento de la expectativa de vida, lo cual implica un período más prolongado de exposición a factores de riesgo (28).

La incidencia mundial de CM femenino alcanzará aproximadamente 3,2 millones de nuevos casos para el 2050 (25). Según la base de datos *GLOBOCAN*, el CM es el más incidente y mortal en mujeres a nivel mundial. La tasa de incidencia del CM varía entre 19,4 por cada 100 000 personas, en el este de África, y 89,7 por 100 000 en Europa occidental. La incidencia de CM en los países desarrollados es más alta, mientras que la mortalidad es mayor en los países menos desarrollados (28). Las mujeres latinoamericanas son más propensas a desarrollar CM en edades más tempranas y a ser diagnosticadas en una etapa más avanzada, comparadas con mujeres de otros sectores del occidente. Estas cifras reflejan la imperiosa necesidad de medidas preventivas y estrategias de tratamiento novedosas. Por este motivo, es necesaria una clasificación detallada de los subtipos de tumores para mejorar la identificación de factores de riesgo (25, 26).

El consumo de tabaco y de alcohol, la mala alimentación y la inactividad física son los principales factores de riesgo de cáncer en el mundo. Aunque poco se sabe sobre los factores de riesgo específicos para

el CM, los cambios en los patrones reproductivos (paridad y lactancia), los estilos de vida y la predisposición genética, podrían contribuir al incremento de la incidencia del CM (26, 27).

De acuerdo con un estudio observacional descriptivo de corte transversal en Cuba, el riesgo de CM a los 30 años es menor de 0,5%; a los 50 años el riesgo llega a 2%, y a los 70 años el riesgo alcanza a 7%. Además, existe correlación entre la duración de la vida menstrual y reproductiva de la mujer con el riesgo de desarrollar CM, lo cual está probablemente relacionado con mayor exposición a hormonas esteroideas; tanto la menopausia tardía como la nuliparidad aumentan el riesgo de CM (29).

Las sustancias químicas del medio ambiente con propiedades cancerígenas influyen directa o indirectamente en el citoplasma y el núcleo de las células y conducen a alteraciones (epi)genéticas. Los virus, las bacterias y la radiación son otros factores que se asocian con el riesgo de desarrollar cáncer, que comprenden aproximadamente el 7% de todos los cánceres (30). Por otro lado, el embarazo y la lactancia a temprana edad por al menos seis meses son reportados como factores protectores (28, 29).

2.2 La incidencia de cáncer en mujeres en Costa Rica

El CM era el segundo tumor maligno más frecuente en mujeres para el año 2013 (31). Aunque el cáncer de piel es el más común entre las costarricenses y su incidencia ha crecido en un 25% en la primera década del siglo, es el CM el que cobra más vidas (32).

A continuación, se presenta la incidencia de los 6 tumores malignos más frecuentes en mujeres en el 2013 (cuadro 1), de acuerdo con la provincia de residencia (31).

Cuadro 1. Incidencia de tumores malignos más frecuentes en la población femenina, según localización anatómica y provincia de ocurrencia, Costa Rica, 2013. Tasas estandarizadas por edad por 100.000, método directo, población estándar mundial.

PROVINCIA DE OCURRENCIA								
Localización	Costa Rica	San José	Alajuela	Cartago	Heredia	Guanacaste	Puntarenas	Limón
<i>Piel</i>	48.90	55.63	53.00	15.35	51.39	28.37	62.09	41.42
Mama	47.90	56.55	43.45	39.85	57.31	36.08	34.45	29.47
<i>Cérvix</i>	28.00	37.33	22.21	14.64	17.84	49.51	17.61	16.59
<i>Tiroides</i>	22.71	32.25	14.45	29.91	14.45	11.84	11.26	17.10
<i>Estómago</i>	11.43	12.57	8.52	12.33	13.17	10.84	8.59	10.56
<i>Colon</i>	10.91	13.47	10.87	7.24	11.19	6.44	9.07	5.69

Fuente: Elaboración propia, 2022. Adaptado del Registro Nacional de Tumores Estimaciones y Proyecciones distritales 2000- 2025: 4.

2.3 Mortalidad por tumores malignos más frecuentes en mujeres en Costa Rica

El tipo de cáncer que provocó más muertes en mujeres para el año 2014 fue el CM, seguido por las neoplasias de estómago y colon. Haciendo un análisis específicamente en los cantones de Cartago, debido a que el presente estudio se desarrolla en esta provincia, las tasas más altas de mortalidad por CM se presentan en los cantones Central, Oreamuno, Paraíso y La Unión (33). San Pablo de León Cortés presenta altas tasas de mortalidad y aunque pertenece a la Provincia de San José, por área de atracción, el HMP atiende a la población de la zona de Los Santos. Una comprensión más completa de la epidemiología de los CM tiene importantes implicaciones para la salud pública en la evaluación de riesgos, prevención y tratamiento (34).

Según los últimos datos de *GLOBOCAN* dados a conocer por la OMS, el CM es el más frecuente en la población femenina y genera la mayor cantidad de defunciones asociadas al cáncer en Costa Rica. En la figura 1 se observa que el segundo tumor más frecuente es el de colon, pero es superado en mortalidad por el cáncer de pulmón, el cuarto lugar lo ocupa el cáncer de cérvix y el quinto el de tiroides (35).

Tasas estimadas de incidencia y mortalidad estandarizadas por edad (mundo) en Costa Rica, 2020, mujeres de todas las edades



Figura 1. Incidencia y mortalidad de tumores malignos más frecuentes en la población femenina, en Costa Rica, 2020. *Fuente:* Elaboración propia, 2022. Adaptado de *Globocan*. International Agency for Research on Cancer 2020.

2.4 Glándula mamaria no neoplásica

2.4.1 Generalidades

La función principal de este órgano estructuralmente dinámico es la producción de nutrientes para el lactante, pero varían según la edad, el ciclo menstrual y el estado reproductivo. Las glándulas mamarias son una característica distintiva de los mamíferos (36) pero también tiene relevancia a nivel cultural, social y personal.

Las estructuras anatómicas principales son los conductos y los lobulillos, y los tipos de células más representativas son las luminales y las mioepiteliales. También posee dos tipos de estroma que son el inter y el intralobulillar. Macroscópicamente, la mama se compone de una parte de tejido glandular, tejido adiposo, piel, la aureola y el pezón (36) como se detalla en la figura 2.

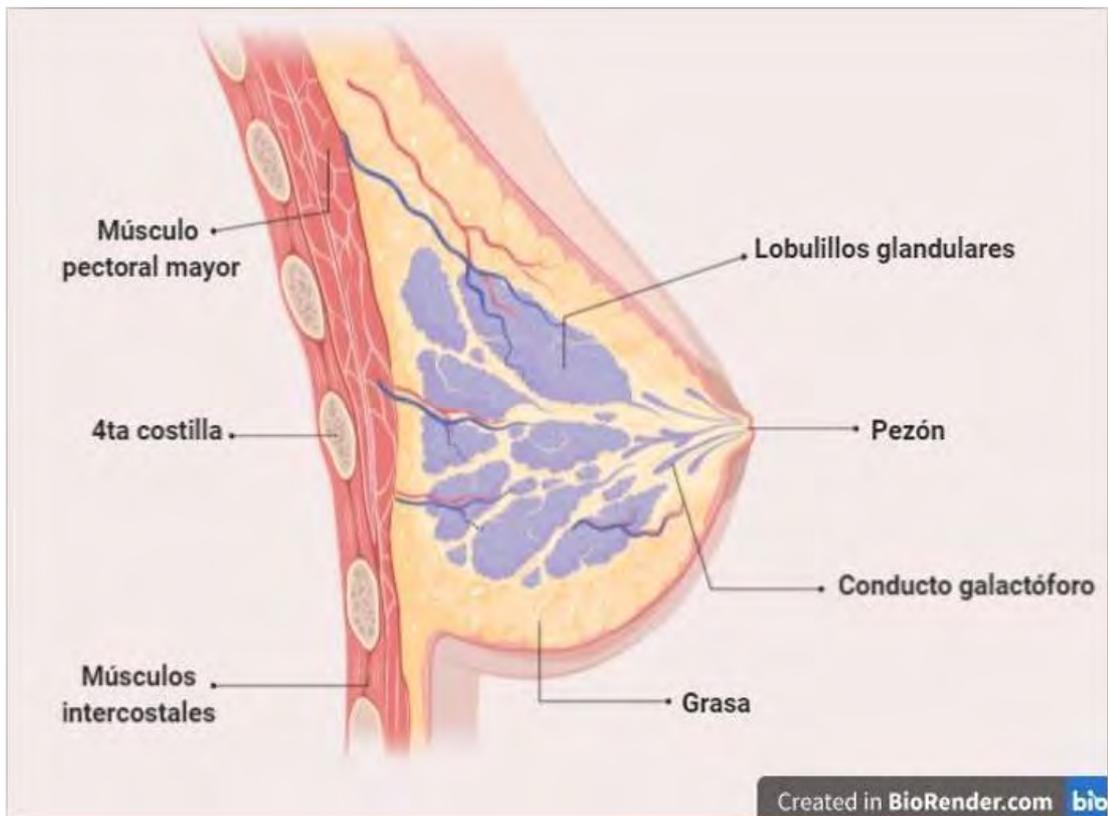


Figura 2. Glándula mamaria femenina. Disección sagital. Fuente: Elaboración propia, 2022.

De manera general la mama adulta inactiva está constituida por tejido conjuntivo, tejido adiposo y estructuras glandulares epiteliales, de hecho, es la glándula cutánea más grande del cuerpo femenino. Está conformada por entre 12 a 20 lóbulos glandulares, los cuales desembocan por un conducto excretor en la superficie del pezón (36, 37).

Los conductos principales de este sistema son los galactóforos (o interlobulillares) los cuales están conectados con los conductos terminales. En los preparados histológicos los conductos galactóforos están compuestos por epitelio biestratificado cúbico, compuesto por células mioepiteliales, y están rodeados de fibras elásticas densas (38).

2.5 Características biológicas del cáncer

El cáncer abarca más de 100 enfermedades distintas con diversos factores de riesgo y epidemiología; se caracterizan por una proliferación descontrolada de células que pueden invadir más allá de los límites normales

del tejido a órganos distantes (39, 40). El desarrollo del cáncer, denominado carcinogénesis, se puede modelar y caracterizar de varias maneras; una forma es ilustrar las características esenciales tanto de las células cancerosas como de los tumores (41). En términos generales, el cáncer para la OMS corresponde un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Una de sus características principales es la multiplicación rápida de células anormales que se pueden extender más allá de sus límites normales y propagarse a otros órganos. Este proceso de invasión es conocido como metástasis y es la principal causa de muerte de las personas con cáncer (27).

La génesis de este grupo de enfermedades se centra en la aparición de mutaciones o epimutaciones sucesivas en los genes, que se traduce en alteraciones de las funciones celulares. Esta perturbación es efectiva en el ciclo celular y conduce a una proliferación anormal (30).

Desde una perspectiva más molecular, el cáncer consta de tres fases: iniciación, promoción y progresión. La iniciación se caracteriza por cambios genómicos y epigenómicos en la célula, que la convierte en pre-cancerosa, como mutaciones puntuales, eliminación y amplificación de genes y reordenamientos cromosómicos que conducen a cambios celulares irreversibles, entre otros. El desarrollo del tumor es impulsado por la supervivencia y la expansión clonal de estas células iniciadas. La progresión abarca un crecimiento sustancial en el tamaño del tumor y la metástasis (40).

El cáncer es un proceso que se ajusta a varios de los principios evolutivos darwinianos. Cada tumor maligno surge a partir de procesos de selección natural de las poblaciones celulares heterogéneas como resultado de presiones selectivas impuestas por el sistema inmune y los microambientes de los tejidos en los que estas células crecen. Análogo a la evolución darwiniana, una sola célula adquiere un conjunto de (epi)mutaciones que, si son ventajosas, le conferirán una ventaja selectiva para sobrevivir en un microambiente específico. Esto, eventualmente, podría significar que estas células proliferen de forma autónoma, invadan tejidos y

hagan metástasis (40).

En el desarrollo del cáncer son fundamentales los cambios genéticos y epigenéticos que dotan a estas células cancerosas de las características distintivas del cáncer, como el crecimiento autosuficiente y la resistencia a las señales anti-crecimiento y pro-muerte. Aunque los cambios (epi)genéticos que ocurren en las células cancerosas, como la activación oncogénica o inactivación de supresores de tumores, son responsables de muchos aspectos del desarrollo del cáncer (41).

Los proto-oncogenes, responsables de la división celular y el crecimiento en condiciones normales, se convierten en oncogenes como resultado de mutaciones (epi)genéticas, lo cual es un evento crucial en la biología tumoral. Lo anterior, aunado a la pérdida de las señales supresoras de tumores, desencadena la división descontrolada de las células (30).

Los tumores son más que masas tisulares de células cancerígenas en proliferación, son tejidos complejos compuestos de múltiples tipos de células distintas que participan en interacciones heterotípicas entre sí (42). Para su desarrollo se conocen seis capacidades biológicas que son adquiridas durante el desarrollo y progresión tumoral, se les conoce como *Hallmarks of cancer* o sellos distintivos del cáncer y fueron propuestas por Hanahan y Weinberg en el 2000, para racionalizar la enfermedad neoplásica debido a su complejidad. Estas incluyen la pérdida de las señales antiproliferativas, evasión de la apoptosis (muerte celular), potencial replicativo ilimitado, autosuficiencia en señales de crecimiento, inducción de la angiogénesis, invasión tisular y metástasis (41, 42).

Con respecto al primero, mantener la capacidad de proliferación es uno de los rasgos fundamentales de las células cancerosas. Los tejidos normales logran controlar estas señales asegurando la homeostasis celular, es decir, el número de células y su arquitectura, mediante factores de crecimiento que se unen por medio de receptores a la superficie celular, pero las cancerosas evaden estas vías de señalización e influyen en otras como la supervivencia celular y el metabolismo energético (42).

La apoptosis es una barrera natural contra el cáncer, pero se atenúa en los tumores que progresan en malignidad, evadiendo así la muerte celular. En un tejido normal, se activan las señales por medio de reguladores que inician una cascada de degradación de las proteínas por medio de las caspasas 8 y 9 principalmente (42).

Otro de los signos del cáncer es el potencial replicativo ilimitado. En la mayoría de las células normales hay ciclos de crecimiento y división limitados, por un lado, debido a la senescencia que es un estado donde las células no proliferan, pero son viables, y el otro por medio de la muerte celular. Los telómeros (extremos de los cromosomas) tienen la capacidad de la proliferación ilimitada. Los tumores pueden mantener el ADN telomérico, que induce a la resistencia de la senescencia y la apoptosis (42).

Con la autosuficiencia en señales de crecimiento, las células cancerosas evitan las señales que regulan el crecimiento y la proliferación celular que depende de genes supresores de tumores, como el RB y el TP53. El RB (retinoblastoma) integra las señales que determinan si una célula debe pasar por su ciclo de división. Si existe estrés celular o un daño en el genoma el TP53 detiene el avance al ciclo celular hasta que se vuelva normal o induce a apoptosis (42).

Por inducción de la angiogénesis se comprende que la neovascularización inicia mediado por proteínas reguladoras como el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF-A), por sus siglas en inglés. Estos inductores activan la formación de nuevos vasos por medio de las células endoteliales que logran mantener el crecimiento neoplásico mediante la irrigación de nutrientes y oxígeno y la evacuación de residuos como el dióxido de carbono (CO₂), (42).

La invasión local y a distancia, hace que aumente la malignidad de los carcinomas, los cuales desarrollan alteraciones en su forma y en la matriz extracelular (MEC). Las moléculas de adhesión como la E-cadherina, permiten la adherencia con las células adyacentes. En la invasión local y metástasis sucede una cascada que inicia con la invasión local, luego la

extravasación, por medio de vasos linfáticos y sanguíneos cercanos al tumor, luego esas células se escapan a la luz de los vasos en el parénquima de tejidos distantes, formando así pequeñas lesiones que finalmente crecerán (42).

Detrás de estas características se encuentran dos procesos auxiliares proporcionados por las células del entorno del tumor, como la inestabilidad del genoma, que genera la diversidad genética y el segundo es la inflamación, que fomenta múltiples funciones distintivas (34, 41, 42).

En el 2011 Hanahan y Weinberg, realizaron una nueva revisión y con el progreso conceptual en la última década, agregaron dos sellos distintivos emergentes a esta lista: la reprogramación del metabolismo energético y evasión de la destrucción del sistema inmune.

La primera implica la capacidad de modificar, o reprogramar el metabolismo celular para apoyar de manera más efectiva la proliferación neoplásica. La segunda permite que las células cancerosas evadan la destrucción inmunológica, en particular por los linfocitos T y B, los macrófagos y las células asesinas naturales (42), como se ilustra en la siguiente figura 3.

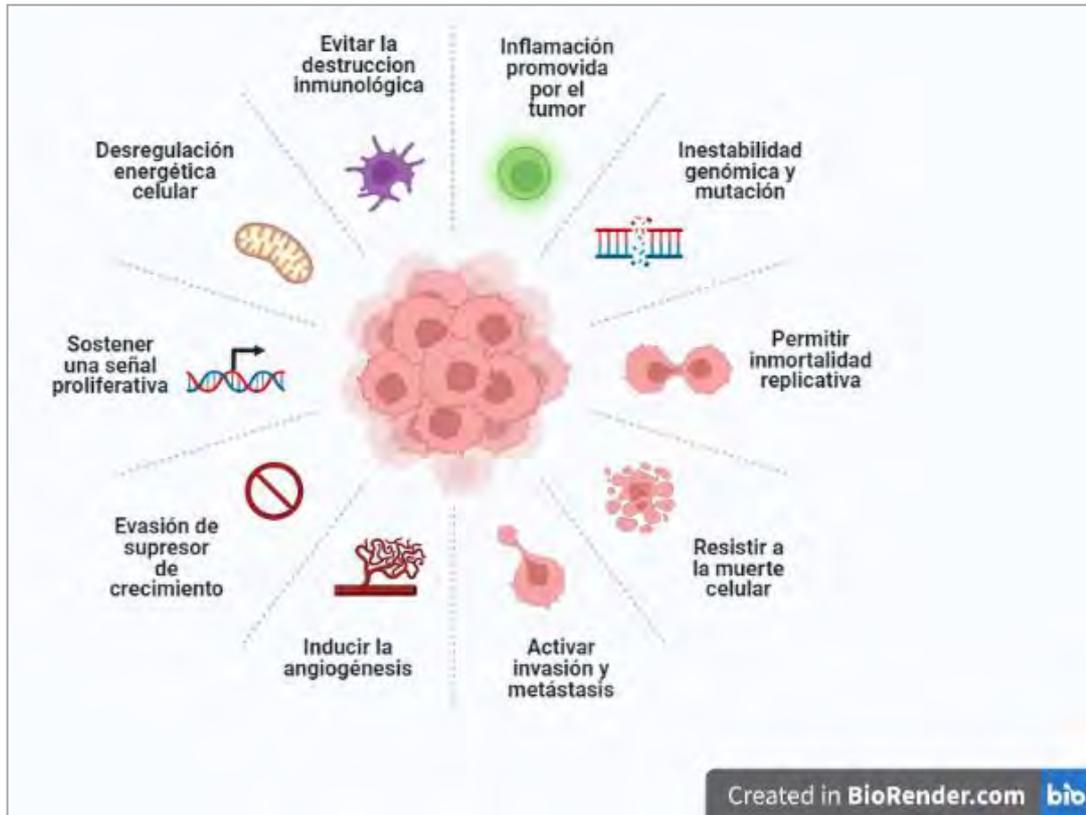


Figura 3. Actuales sellos distintivos del cáncer. Hallmarks of cancer: the next generation. *Fuente:* Elaboración propia. Adaptado de Hanahan y Weinberg, 2011: 668.

Además de las células cancerosas, los tumores exhiben otra dimensión de complejidad, ya que contienen un repertorio de células no neoplásicas reclutadas. Estas contribuyen a la adquisición de rasgos distintivos mediante la creación del microambiente tumoral, revelando que la biología de los tumores no puede ser entendido simplemente enumerando los rasgos propios de la célula de cáncer. La aplicabilidad generalizada de estos conceptos repercute cada vez más el desarrollo de nuevas estrategias para tratar el cáncer (42).

La investigación realizada durante las últimas dos décadas ha consolidado el concepto de que el desarrollo y la malignidad del tumor son el resultado de procesos que involucran tanto a las células cancerosas como a las células no cancerosas, que componen el tumor heterocelular. Un ejemplo es el requisito de la neoangiogénesis para el crecimiento tumoral y, por lo tanto, la contribución de las células endoteliales vasculares (41).

A inicios del año 2022 se dio a conocer una nueva revisión realizada por Douglas Hanahan donde se incorporó dos nuevas características distintivas. La reconceptualización del cáncer requiere destilar su complejidad debido a la gran diversidad genética, tisular y patológica para comprender los mecanismos del desarrollo del cáncer, la formación de tumores malignos y sus distintas manifestaciones (43).

Estos dos nuevos parámetros abarcan: el desbloqueo de la plasticidad fenotípica y la reprogramación epigenética no mutacional. Además, la importancia de los microbiomas polimórficos y células senescentes para el desarrollo y progresión de algunos tumores (43), estos nuevos rasgos distintivos se incorporan en la figura 4.

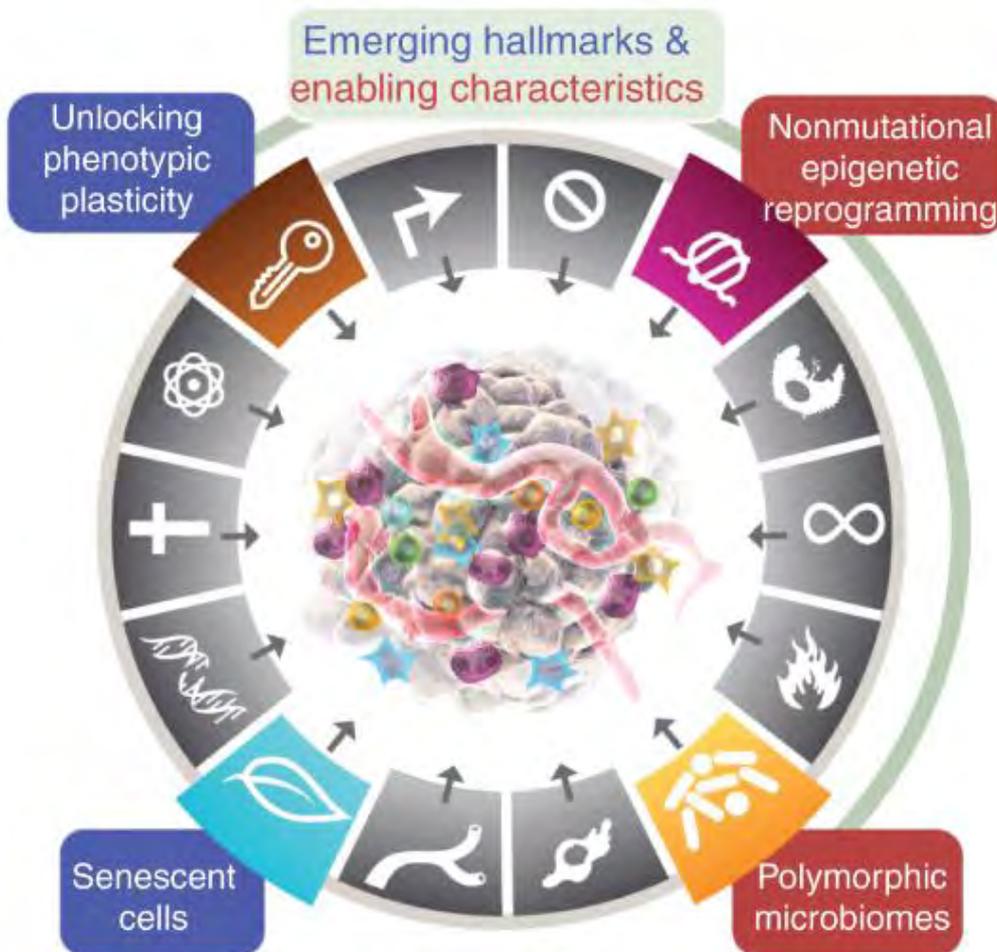


Figura 4. Sellos distintivos emergentes propuestos y características habilitadoras. *Fuente:* Adaptado de Hanahan y Weinberg 2022: 32.

Desbloquear la plasticidad fenotípica significa que las células cancerosas provenientes de una célula normal estaban programadas para diferenciarse en células específicas, pero esta nueva capacidad adquirida hace que puedan revertir su curso al desdiferenciarse a estados celulares parecidos a sus progenitoras. Este cortocircuito en el proceso mantiene las células cancerosas en expansión en un estado similar al progenitor como se lleva a cabo, por ejemplo, en las células de los carcinomas de colon en estadios avanzados, que característicamente expresan marcadores de células madre en lugar de ser solamente células epiteliales (43).

Alternativamente, puede presentarse la transdiferenciación, en la que las células que inicialmente se comprometieron en una vía de diferenciación van a cambiar a un programa de desarrollo completamente diferente, adquiriendo rasgos específicos de tejido que no estaban predeterminadas. Un ejemplo de esto es la célula acinar pancreática que puede transdiferenciarse en un fenotipo de célula ductal durante el inicio del adenocarcinoma ductal pancreático (43).

La reprogramación epigenética no mutacional del genoma se considera fundamental para la formación, desarrollo y metástasis de prácticamente todos los tipos de cáncer. Consiste en cómo las mutaciones en los genes organizan, modulan y mantienen la arquitectura de la cromatina, alterando así la expresión génica de las células (43).

Es importante recordar que el microbiota corresponde a la variedad de microorganismos que simbióticamente viven dentro del cuerpo humano y que interactúan con este a través de la epidermis, la mucosa interna del tracto gastrointestinal, del pulmón, el sistema urogenital, entre otros. Los microbiomas polimórficos son ecosistemas compuestos por bacterias y hongos residentes que además de beneficiar también pueden impactar la salud y promover enfermedades como el cáncer. Un ejemplo es la mutagénesis que sufre el epitelio del colon como consecuencia de su interacción con toxinas producidas por bacterias que dañan la integridad genómica del ADN, afectando su replicación y reparación (43).

Y por último la senescencia celular se define como la acción de detener la proliferación de las células, se considera un mecanismo complementario a la muerte celular programada y se lleva a cabo para inactivar o eliminar células enfermas o disfuncionales. En algunos casos estas células estimulan la progresión tumoral maligna contribuyendo de varias maneras a la señalización proliferativa, a la inducción de la angiogénesis, evitando la apoptosis y estimulando la invasión y la metástasis (43).

2.6 Glándula mamaria neoplásica

Los principales factores de riesgo para el desarrollo del CM son la predisposición genética y la exposición a hormonas (35). Los tumores de la glándula mamaria deben abordarse de manera integral, tomando en consideración las características individuales de la paciente, el estadio, el tamaño y el estado de los ganglios linfáticos principalmente. Recientemente, se ha propuesto que los cambios en las propiedades mecánicas, específicamente la rigidez (stiffnes) del estroma tumoral, podría ser un parámetro importante de considerar y ha sido correlacionado con la progresión de la enfermedad (44). Estos cambios se caracterizan por una acumulación anormal de depósitos de MEC que progresivamente va aumentando la rigidez del estroma (41).

Con el objetivo de ampliar la manifestación clínica de la neoplasia mamaria se puede mencionar la presencia de una masa palpable, nodularidad difusa, es decir, sin una masa definida, pero sensible al tacto, cambios en el tamaño y morfología de la mama. Otros hallazgos menos comunes son el hundimiento del pezón, retracción, lesiones eccematosas, irregularidades en el contorno, alteraciones en la piel como enrojecimiento, úlceras, descamación y secreción por el pezón (23, 37). Alrededor del 5% de todos los CM se relacionan con la mutación de los genes del CM autosómicos dominantes (BRCA1 y BRCA2), (36).

2.6.1 Generalidades de la clasificación de los tumores de la glándula mamaria

La mayoría de los tumores malignos de mama son adenocarcinomas, y estos a su vez se dividen en varios subtipos de acuerdo con el estado de los receptores hormonales RE, RP (+/-), la amplificación o sobreexpresión de HER2/neu y el marcador de proliferación Ki-67 (Cuadro 2). Estos subtipos se detallan a continuación (6, 11, 44).

Cuadro 2. Clasificación de los tumores malignos de la glándula mamaria.

Subtipo Histológico	Receptores Hormonales (RE y RP).	HER2/neu	Índice de proliferación (Ki-67)	Pronóstico
<i>Luminal A</i>	RE y RP (+)	(-)	Bajo	Bueno
<i>Luminal B</i>	RE y RP (+)	(-) baja expresión	Alto	Bueno
<i>HER2/neu positivo</i>	RE y RP (-)	Alta expresión	Alto	Malo
<i>Triple negativo</i>	RE y RP (-)	(-)	Alto	De peor pronóstico

Fuente: Elaboración propia, 2022. Adaptado de Actualización del cáncer de mama en Atención Primaria (III/IV). ELSEVIER. 2014; 40(8):460-472.

El subtipo luminal es positivo para receptores hormonales y negativo para HER2/neu, representa el 50-65% de los casos y es la forma más frecuente de cáncer de mama invasivo (CMI). Este se subdivide de acuerdo con la tasa de proliferación, la cual es determinada mediante tinción inmunohistoquímica para Ki-67. Cuando el porcentaje de reactividad sea menor al 20%, según las nuevas clasificaciones, el cáncer se considera del tipo luminal A, mientras que cuando este porcentaje es mayor al 20% este se clasifica como luminal B. El subtipo luminal A representa el 40 al 55% de todos los CMI, y es el más común en mujeres mayores de 65 años y hombres (11, 14). Estos pueden ser ductales infiltrantes o lobulillares (23). Produce metástasis usualmente en hueso y tras un largo período. El tratamiento con mejores resultados para las pacientes que presentan este subtipo son los moduladores del RE, como tamoxifeno en mujeres premenopáusicas, y los

inhibidores de la aromatasa en pacientes posmenopáusicas. Se asocian a una mejor supervivencia general y mejor pronóstico con respecto a recidivas (23, 45).

Los luminales B, por su parte, tienen un fenotipo más agresivo que los A y la supervivencia luego de una reincidencia es menor (1,6 años). También, se caracteriza por su alta tasa de proliferación, expresión de RP escasa o ausente y la posibilidad de ser positivo para HER2/neu. Este es el tipo de carcinoma que más se asocia a las mutaciones germinales del gen BRCA2 y tiene una peor respuesta al tamoxifeno, pero buen pronóstico de respuesta a la quimioterapia (23, 37, 46).

El segundo grupo más común de CMI son los positivos para HER2/neu (20% de los casos). Este es más frecuente en mujeres jóvenes de raza no blanca. Característicamente, presentan translocaciones inter cromosómicas complejas, amplificaciones del proto-oncogén HER2 en el cromosoma 17 y alta carga mutacional. A menudo se presentan metástasis viscerales y cerebrales, aun cuando los tumores primarios pequeños se encuentran en estadios tempranos. Es de buen pronóstico gracias al tratamiento con Trastuzumab, el cual es un anticuerpo (Ac) monoclonal humanizado que se une al HER2 y bloquea su actividad (36).

El tercer grupo de CMI son los triples negativos (15%), también conocido como basal, y se distinguen por no expresar RE, RP y HER2. Es frecuente en mujeres jóvenes premenopáusicas y afroamericanas e hispanas (45, 47). Mayoritariamente está relacionado con mutaciones de BRCA1 (48). Es de mal pronóstico cuando existe metástasis a distancia (visceral), comúnmente a cerebro y pulmón en los 3 primeros años posteriores al diagnóstico (49). En el caso de las recidivas, éstas aparecen generalmente a los 5 años siguientes al tratamiento, incluso luego de la mastectomía (36, 48). La quimioterapia es la opción de tratamiento más común para pacientes con CM triple negativo. A pesar de su comportamiento agresivo, aproximadamente del 30 al 40% de estas pacientes responden muy bien cuando se les aplican neoadyuvantes (previo a la cirugía) y tienen

tasas más altas de supervivencia. Sin embargo, las pacientes que muestran una evidencia de enfermedad residual luego de la quimioterapia con neoadyuvantes son 6 veces más propensas a la recurrencia y 20 veces más de morir por enfermedad metastásica (50). Los parámetros clínico-patológicos de este subgrupo de CM, de manera general, consisten en tamaños tumorales grandes, suelen aparecer en edades tempranas, múltiples células apoptóticas, alto índice de proliferación, células muy indiferenciadas, necrosis central y con frecuente afectación linfática (23, 50).

Los CM triple negativos pueden dividirse en subtipos de acuerdo con las diferencias en las respuestas clínicas y supervivencia luego de la terapia con neoadyuvantes. Estos serían 2 tipos basales (BL1 y BL2), un inmunomodulatorio (IM), uno tipo mesenquimal (M), mesenquimal madre o mesenchymal stem-like (MSL) y el receptor de andrógeno luminal (LAR) (49). El subtipo BL1 es caracterizado por un aumento del ciclo y daño celulares, el BL2 tiene un aumento en marcadores mioepiteliales. Ambos, M y MSL, comparten expresiones elevadas de genes involucrados en la transmisión epitelial-mesenquimal, pero solo el MSL presenta una disminución de la expresión de los genes encargados de la proliferación (49).

2.7 Técnicas para el análisis de tejido de mama

2.7.1 Inmunohistoquímica (IHQ)

Este método inició con el descubrimiento del profesor Albert H. Coons en 1941, cuando se demostró que era posible localizar antígenos en láminas con tejidos usando anticuerpos contra *Streptococcus pneumoniae*, marcado con fluorescencia y visualizado con luz ultravioleta (51). Hoy en día, la IHQ es aplicada para determinar la expresión de proteínas en el tejido que sirven como biomarcadores para diagnósticos diferenciales, clasificación de tumores y análisis de algunas enfermedades como las infecciones. Los protocolos presentan un sinnúmero de variaciones y pueden hacerse de manera manual o automatizada. Para llevar a cabo la técnica pueden emplearse muestras quirúrgicas por escisión abierta o biopsias por punción con aguja (52). Para los estudios de CM, esta última se ha posicionado como

la muestra estándar, pues cumple con los requerimientos necesarios para llevar a cabo análisis por IHQ, sin repercutir tanto en la cotidianidad de las y los pacientes y reducir el tiempo de recuperación (53). Uno de los parámetros cruciales, que puede repercutir enormemente en el éxito de la evaluación final, es la fijación de los tejidos. Se recomienda el formol tamponado al 10% y que el tiempo sea suficiente para que se garantice una buena perfusión en toda la muestra (54).

2.7.2 Panel inmunohistoquímico para la clasificación del cáncer de mama

Ki-67: la quimioterapia es un tratamiento estándar para el CM, pero el esquema de tratamiento a seguir debe definirse correctamente. El Ki-67 es un biomarcador de proliferación que juega un papel crucial en la determinación del abordaje quimioterapéutico a seguir en tumores sólidos, debido a que su expresión revela la proyección de la respuesta antes del tratamiento (6). El Ki-67 es una proteína nuclear no histona que se expresa en G1, S, G2 y M. Esta proteína es de las más comúnmente utilizadas en IHQ como biomarcador de proliferación y ha sido confirmado como un parámetro predictivo independiente y factor pronóstico en el CM (50). La sobreexpresión en CM está asociada con un mal pronóstico, pero es predictivo de una buena respuesta a neoadyuvantes quimioterapéuticos. Se considera que una prueba es positiva para Ki-67 si su expresión es mayor a un 14% y negativa si es menor a dicho valor umbral (9).

HER-2/neu: La determinación de la expresión de esta oncoproteína es crucial para el manejo y pronóstico del CM (45). Su expresión elevada está ligada a un período libre de la enfermedad menor, una progresión rápida hacia la metástasis, la resistencia al tamoxifeno y la predicción de respuesta del Trastuzumab (53, 55, 56). El método para interpretar la tinción de este marcador se basa en una escala de 0 a 3+, donde 0 (negativo) corresponde a ausencia de tinción, o a tinción de membrana <10% en las células tumorales (CT). 1+ (negativo) se asigna cuando la tinción de membrana es levemente perceptible en más del 10% de las CT. 2+ (débilmente positivo)

corresponde a la observación de tinción débil a moderada de membrana completa en más del 10% de las CT. En los casos 3+ (fuertemente positivo) se puede observar una reacción de tinción de las membranas fuerte es más del 30% de las CT (56).

Los receptores hormonales: El RE es una proteína dimérica de 65 kDa que se localiza usualmente en el núcleo celular, y pertenece a una clase de proteínas trans-ejecutoras que estimulan la transcripción al unirse a elementos específicos del ADN (45). Cuando este receptor ha sido reportado como disminuido en CM, se ha relacionado con la iniciación o desarrollo de la malignidad. Algunos estudios clínicos confirman que la pérdida o disminución de la expresión de RE está asociada con una pobre diferenciación de las células del cáncer y un peor pronóstico (57).

El RP es activado por la hormona esteroidea, progesterona, y es codificado por el gen PGR que está en el cromosoma 11q22. El estado de los receptores es crítico para la terapia hormonal como tratamiento (45). Estos marcadores son considerados positivos cuando más del 1% de los núcleos de las CT son inmunoreactivos. Al igual que todos los anticuerpos, estas pruebas se invalidan si los controles positivos en la laminilla no manifiestan inmunoreacción (56).

2.7.3 Microscopía electrónica (ME)

El primer microscopio electrónico fue construido por los ingenieros eléctricos Ernst Ruska y Max Knott en 1931. En sus inicios y hasta la década de 1940 se utilizó para estudios biológicos, como definir el tamaño y la forma de los virus y macromoléculas (58). Posteriormente, se incorporaron a la lista de estudios gran cantidad de materiales. La ME sigue siendo una de las técnicas más utilizadas para el análisis de muestras biológicas, por la alta resolución (59), y es por esta razón que las biopsias de mama se pueden analizar utilizando este tipo de técnica.

La ME en Costa Rica se inicia en los años 70 con la donación de un microscopio por parte del Gobierno de Japón, mediante la Agencia Japonesa

de Cooperación Internacional (JAICA), por sus siglas en inglés. A partir de este precedente, se fundó la Unidad de Microscopía Electrónica (UME) en la Universidad de Costa Rica. En el 2001 se consolidó como el Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas (CIEMic), (62). Los convenios cooperativos se mantuvieron por un lapso de 14 años lo que cimentó las bases de la ME en nuestro país (61). En la actualidad el CIEMic cuenta con tres microscopios electrónicos de transmisión (MET) y dos de barrido (MEB). Esta entidad realiza investigación propia y brinda apoyo a diferentes dependencias de la UCR, universidades estatales y del sector privado (57). Los principales aportes de la ME en Costa Rica han sido en el área biomédica, tanto en el diagnóstico histopatológico de enfermedades como en la identificación de los agentes microbianos causantes de cuadros poco comunes, especialmente aquellos de etiología viral (60).

En un microscopio electrónico la imagen es obtenida por un haz de electrones emitido de un filamento de tungsteno (W), al calentarse mediante un voltaje de aceleración, que en la MET usualmente es de 100 Kilovoltios (kV) y en la MEB es de unos 15 kV, y que lleva a la generación de imágenes distintas (60). Las diversas técnicas y protocolos para preparar muestras biológicas y más específicamente biomoleculares, para el estudio por MET, han sido documentadas a fondo desde la década de 1950 hasta la actualidad (58).

La MET ha sido una tecnología importante en biología celular (59). Tiene una resolución miles de veces más alta que la de los microscopios de luz clásicos (62). Su aplicación implica obtener imágenes de secciones delgadas embebidas en resinas especiales mediante el paso de un haz de electrones a través de la muestra. Cuando el haz se absorbe y se disemina, se produce una imagen de proyección bidimensional (2D) con detalles estructurales finos que al final impactan en una pantalla fotosensible, donde se convierten en destellos. Esta intensidad depende de su energía y forman la imagen (60, 62, 63).

Usualmente sus imágenes son planas; no obstante, con algunas

técnicas especiales se pueden obtener imágenes tridimensionales (60). Desde la invención de la MET, cada vez más laboratorios en todo el mundo contribuyen a los estudios de estructura macromolecular con esta técnica (58). Simplemente, no hay forma de visualizar la complejidad de las células y ver estructuras celulares sin MET (62). Esta técnica ha demostrado ser valiosa en el análisis de los componentes celulares, incluidos el citoesqueleto, los sistemas de membrana, los orgánulos y los cilios, así como las estructuras especializadas en células diferenciadas, como las microvellosidades (62).

Algunos autores concluyen que la ME debe incluirse como una herramienta diagnóstica de rutina, por sus aportes ultraestructurales, pero otros solo la consideran útil para dilucidar casos con mayor complejidad, porque es una técnica costosa y que consume mucho tiempo para obtener resultados (64). A pesar de su poder, el uso de MET tiene limitaciones como el uso obligatorio de células fijas y el potencial siempre presente de artefactos producto de esa fijación (62) entre otros factores.

Capítulo III. Marco metodológico

3.1 Descripción general de la estrategia metodológica

La estrategia general para responder el problema planteado es por medio del diseño transversal descriptivo, debido a que se realizaron descripciones de las técnicas diagnósticas (IHQ y MET).

Se realizó una descripción de las características morfológicas entre los dos subtipos de carcinomas mamarios más frecuentes (luminal A y luminal B). Esto para estudiar las muestras por MET de manera multidisciplinaria (entre patología, histología y bioquímica) y generar datos que permitan refinar la clasificación actual o ser parte de investigaciones futuras.

En la primera fase, para la selección de las muestras se trabajó interdisciplinariamente a lo interno del Hospital Dr. Maximiliano Peralta Jiménez, de manera regulada por el Comité Ético Científico del Hospital, con el protocolo de investigación (HMPJ-CEC 001-2020) y con los permisos de la dirección del centro médico y del servicio de Patología. Este equipo interdisciplinario incluyó a los médicos especialistas de los servicios de Gineoncología, Radiología y Patología. En la segunda etapa las muestras seleccionadas se procesaron en el CIEMic de la Universidad de Costa Rica, para la obtención de imágenes de MET que fueron analizadas por el equipo asesor y los sustentantes.

3.2 Descripción metódica de cada experiencia investigativa

3.2.1 Tipo de estudio

La presente investigación fue de tipo observacional descriptiva no intervencionista. Se buscó medir y especificar características, como las dimensiones de los patrones ultraestructurales propios de ambos subtipos de carcinoma mamario (tamaño nuclear, tamaño del nucléolo, relación núcleo- citoplasma y relación tejido epitelial-estroma) para posteriormente describirlas. Esta descripción es más o menos profunda, aunque en

cualquier caso se basa en la medición de uno o más atributos del fenómeno de interés. Este estudio descriptivo analiza cómo es el fenómeno, en este caso el CM y cómo se manifiestan los componentes anteriormente mencionados (6).

3.2.2 Población de interés, objeto de estudio y unidad de análisis

Se establecieron con claridad las características de la población de interés (mujeres mayores de 18 años con CM), que fueron atendidas en los distintos servicios del HMP, dentro del período de desarrollo del estudio. Esto con el propósito de definir los parámetros de la muestra (65). El objeto de estudio fueron las muestras provenientes de biopsias de tejido mamario tomadas por la técnica de punción con aguja gruesa, procedimiento que también se le conoce como *trucut*. Fue necesario delimitar la población que no cumplía con los objetivos del estudio (65).

3.2.3 Criterios de inclusión y exclusión

Dentro de los criterios de inclusión se consideraron los siguientes:

- Se incluyen los estudios de mujeres con CM atendidas en las diferentes especialidades en el HMP, dentro del periodo de desarrollo del TFG.
- La población de donde provienen los datos y las muestras son de usuarias que se les realizó la toma de biopsia por punción con aguja gruesa, ya fuera guiada o no por ultrasonido.
- Se incluyeron mujeres mayores de 18 años y no se distinguió raza, nivel cultural, estado socioeconómico ni profesión.
- Mujeres que presentaran alguno de los dos subtipos de CM luminales y que las muestras fueran fijadas en glutaraldehído.

Como criterios de exclusión se contemplaron los siguientes:

- Muestras de usuarias con discapacidades cognitivas.
- Muestras de usuarias cuya muestra (unidad de análisis), fue insuficiente para realizar ambos estudios.
- Muestras de usuarias que fueron sometidas a quimioterapia.

3.2.4 Alcances del diseño propuesto

El análisis de las imágenes de IHQ fueron valoradas por un médico especialista en anatomía patológica; el Dr. José Luis Quirós Alpizar con amplia experiencia en caracterización morfológica de los tumores, para determinar si eran de tipo de células basales o luminales, así como la visualización del estado de los componentes celulares: núcleo, nucléolos, membrana nuclear, membrana citoplasmática, retículos de las células neoplásicas y otras características del tejido conjuntivo, matriz extracelular, fibroblastos u otros, mediante la técnica de la MET.

Para garantizar la confiabilidad y validez de las pruebas de IHQ y MET, se siguieron con rigurosidad los protocolos previamente validados por los centros donde se realizaron las pruebas, estos protocolos (Véase anexos 1, 2 y 3), se adjuntan en este TFG y se describen detalladamente en los siguientes apartados. El uso de los controles negativos en las pruebas de IHQ brindaron la consistencia a las mismas, minimizando el porcentaje de error en la clasificación tumoral.

3.2.5 Controles negativos

No es común la utilización de controles negativos para IHQ en los distintos servicios de patología debido a que se optimizan los recursos y el tiempo de preparación de las laminillas, sin embargo, en esta investigación se consideran cruciales. Por lo tanto, se incluyó un control negativo además del positivo en cada uno de los portaobjetos con el propósito de hacer control de calidad de todos los procesos.

Para el marcador HER2/neu se usó una muestra de trompas de Falopio; para los receptores hormonales una muestra de amígdala, control ampliamente utilizado en IHQ y para el Ki-67 se utilizó una muestra de piel.

Los controles deben ser especímenes procedentes de autopsia o biopsia fijados, procesados e incluidos de la misma forma que las muestras de las usuarias. Los controles de tejido positivos indican si los tejidos se han preparado correctamente y si se han utilizado las técnicas de tinción oportunas (66).

3.3 Definición y operacionalización de las variables de estudio

En el siguiente cuadro se incluye la descripción de las variables, los indicadores, la unidad de análisis y los tipos de instrumentos utilizados.

Cuadro 3. Matriz de operacionalización de variables a partir de los objetivos específicos.

Objetivos Específicos	VARIABLES	Indicadores	Unidad de análisis	Técnicas o metodología
1. Describir mediante IHQ los dos subtipos de carcinomas mamarios más comunes de acuerdo con la expresión de los marcadores RE, RP, HER2/neu y el Ki-67.	<p>Inmunomarcaje +/- de RE.</p> <p>Inmunomarcaje +/- de RP.</p> <p>Inmunomarcaje +/- de HER2.</p> <p>Inmunomarcaje de Ki-67 mayor o menor al 20%</p>	<p>Reacción citoplasmática, nuclear o de membrana.</p> <p>Controles positivos de los estudios.</p> <p>Impregnación del cromógeno sin tinción de fondo.</p>	Láminas inmunohistoquímicas del HMPJ.	Técnica de IHQ.
2. Caracterizar los dos subtipos de carcinomas mamarios más frecuentes mediante la MET para la identificación de patrones ultraestructurales propios de cada subtipo.	<p>Características morfológicas de los tumores.</p> <p>Estado de los componentes celulares como, retículos, membrana plasmática, membrana nuclear y matriz extracelular.</p>	<p>Forma.</p> <p>Distribución celular.</p> <p>Diferencia de tamaño entre células.</p>	Microfotografías de los estudios celulares en el CIEMIC.	Técnica de MET.
3. Determinar si los hallazgos Inmunohistoquímicos y los patrones ultraestructurales se complementan para el diagnóstico del carcinoma de glándula mamaria.	Datos de IHQ. Datos de MET.	Similitudes morfológicas entre los carcinomas de la glándula mamaria analizados por MET e IHQ.	Datos obtenidos de los estudios de IHQ y de MET.	<p>Microscopía análisis y valoración patológica.</p> <p>Sesiones interdisciplinarias.</p>

Fuente: Elaboración propia, 2019.

3.4 Definición de los procedimientos de recolección de información

Sobre los investigadores se dice que son los encargados de recolectar los datos para obtener la información mediante diversos métodos o técnicas; Además, tienen el reto de mimetizarse en el ambiente y adquirir la comprensión del fenómeno estudiado (65). En este caso la recolección de la información se realizó por medio de los denominados: Instrumentos de recolección de información. En primer lugar, para determinar el subtipo de CM se empleó el instrumento llamado: *“Hoja de recolección de datos histopatológicos, carcinoma invasivo de mama”* (Véase anexos del 4 al 8), y fue en el Servicio de Patología donde se llenó con los datos necesarios. El otro instrumento fue *“Hoja de recolección de datos para Microscopía Electrónica de Transmisión”* (Véase anexos del 9 al 13).

Se consultó literatura para comprender los datos a profundidad e incluso conocer los retos de otros estudios donde se emplean técnicas de investigación y de diagnóstico.

Para la organización de los datos se analizaron las imágenes para distinguir los patrones ultraestructurales de ambos subtipos de carcinoma como tamaño nuclear, tamaño del nucléolo, relación núcleo-citoplasma y relación tejido epitelial-estroma.

3.4.1 Muestreo

Se rastrearon 15 muestras de punciones con aguja gruesa de la glándula mamaria en un periodo comprendido entre abril y setiembre del 2021 (Ver cuadro 4) y de esos casos se seleccionaron según los criterios de inclusión y exclusión, 4 casos a los que se les realizó la MET. Es importante aclarar que no se alteró de ninguna manera el proceso diagnóstico de la biopsia, ni el tratamiento ni pronóstico de las usuarias. En los casos en que las muestras se registraron en el sistema, pero estaban a la espera de que se determinara la clasificación por IHQ, el análisis mediante esta técnica se realizó según el protocolo de análisis para IHQ que se detalla más adelante.

3.5 Definición de los procesamientos y técnicas de análisis

3.5.1 Análisis para IHQ

Los bloques de parafina fueron cortados en un micrótopo con un grosor de 4 micras, los cortes fueron recogidos en láminas electrocargadas positivamente para facilitar su adherencia. Se colocó un control positivo y otro negativo en cada una de las laminillas lo cual garantiza calidad, confiabilidad y validez de la prueba de acuerdo con el anticuerpo que se le aplicó (9). Para el proceso de desparafinado se utilizó xileno, seguidamente se hidrataron con alcoholes en concentraciones decrecientes y luego se lavaron en agua del tubo.

Se realizó una recuperación de los epítomos de las muestras que pueden afectarse por los pasos anteriores, como en la fijación con formaldehído. Para esto se sumergieron en un recuperador con pH alto (9.0) o pH bajo (6.0), según el protocolo, utilizando el equipo PT Link de la marca Dako. En el caso del panel utilizado para el CM los receptores de estrógeno y progesterona y el HER2/neu, se incubaron en pH alto y el Ki-67 en pH bajo. Esta recuperación llevó las muestras hasta los 97 °C aproximadamente, por un tiempo estimado de 20 minutos y luego descendió la temperatura a 80 °C; este paso también puede hacerse en microondas en menor tiempo (55).

Las láminas se sometieron a un bloqueo de peroxidasa endógena (H_2O_2), en una solución de 0.3%. Se dispensaron los anticuerpos primarios correspondientes a cada prueba: receptor de estrógenos (Clona 1D5), referencia IR657, receptor de progesterona (Clona PgR 636), referencia IR068, Ki-67 (Clona MIB-1), referencia IR626 y C-erbB-2/HER2/NEU (Clon SP3), referencia MAD-000308QD-12, tomando las indicaciones brindadas en los insertos propuestos por Dako (Véase anexos 14, 15, 16 y 17) y se incubaron por un rango de hora y media.

Se realizaron lavados con el buffer específico para este propósito y se agregó el anticuerpo secundario, el cual se incubó por un período de 20 minutos a temperatura ambiente. Para la detección de las reacciones se usó

diaminobencidina tetrahidrocloruro (DAB), cromógeno color marrón que revela las uniones antígeno-anticuerpo, finalmente la tinción se contrastó con hematoxilina, que tiñe por afinidad los componentes ácidos como los núcleos (54, 55). Para estos procesos se utilizó el equipo AutoStainer 48, Agilent Technologies, Glostrup, Dinamarca y los sistemas de visualización correspondientes para HER2/neu, Ki-67 y los receptores hormonales (Véase anexos 1 y 2). Las láminas se deshidrataron con alcoholes en concentraciones de manera creciente y se aclararon en xileno. Se colocó un cubreobjetos con un medio de montaje sobre cada lámina para poder ser valorada por microscopía de luz (9, 55).

En la figura 5 se muestra el proceso general actual, que se realiza de manera estandarizada en la técnica de IHQ.

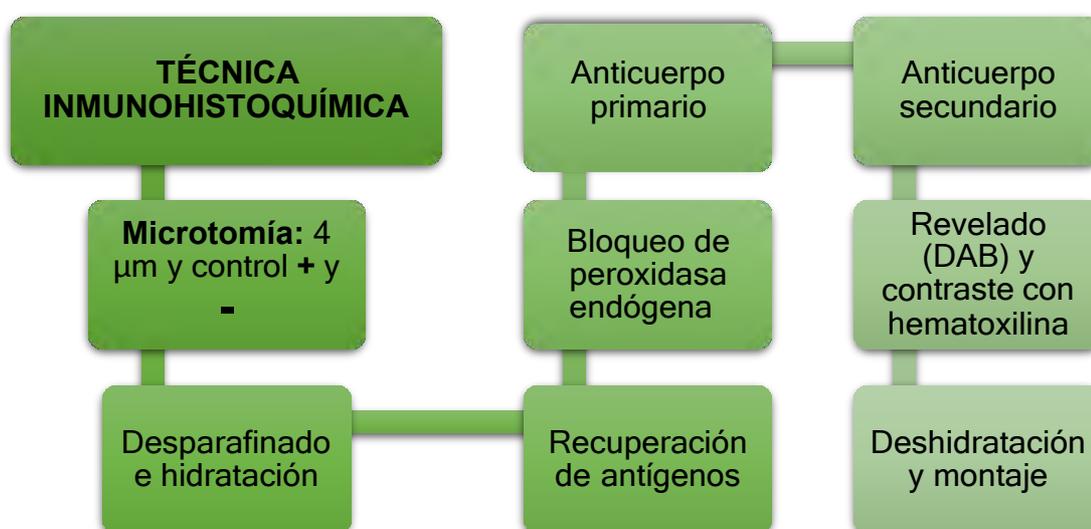


Figura 5. Proceso estandarizado de la técnica de inmunohistoquímica.

Fuente: Elaboración propia, 2022.

Se tomaron las microfotografías digitales de las láminas con los resultados inmunohistoquímicos para seleccionar los casos. Cuando estos estaban debidamente caracterizados, se seleccionaron los más aptos de acuerdo con los niveles de positividad de los anticuerpos de cada uno de los 2 subtipos de CM (como se detalla en el diagrama de flujo de la página 46, objetivo específico 1, paso 8).

Se realizó una descripción anatomopatológica a nivel macroscópico

del espécimen, el cual no se debía fijar en formaldehído. Se tomaron las muestras correspondientes para diagnóstico y adicionalmente una muestra se colocó en el fijador para MET (glutaraldehído al 4%).

3.5.2 Análisis para MET

Las muestras preservadas en fijador para MET en un tiempo menor a los 90 días fueron llevadas al CIEMic, las cuales fueron transportadas juntas para su procesamiento. Esto se determinó por las fechas en que se realizó la toma de las muestras. Los 4 casos, se procesaron para MET siguiendo el protocolo establecido en el CIEMic: Preparación de Muestras para MET (Registro N°22), (Véase anexo 3). Específicamente, las muestras se fijaron en glutaraldehído, que preserva la estructura celular, y se hizo una post-fijación en tetróxido de osmio (OsO_4), que reacciona fuertemente con los lípidos de membrana (62, 67, 68). Debido a la excepcional resolución del MET, la calidad de la fijación, es decir, el grado de conservación de la estructura subcelular, debe ser la mejor que se pueda lograr (67) por ello, se requiere que todo el proceso se lleve a cabo con los cuidados que amerita la manipulación de una muestra muy pequeña para evitar alterar su estructura. Después las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de un disolvente, como la acetona, que tiene la capacidad de extraer el agua celular y sirvió como solvente para la resina de incrustación (62).

Las 4 muestras se diseccionaron en 3 partes cada una y se incluyeron en resina Epoxy, dicho número de bloques dependió de la cantidad de la muestra. Para este estudio se usaron desde 1 hasta los 3 bloques de material en algunos casos. Los bloques de resina se resguardan en un banco de tejidos que se ubica en el Laboratorio de histología del HMP, dicha área cumple con las condiciones (temperatura, luz y humedad) que garantizan la preservación de la calidad de las muestras para investigaciones posteriores.

Anterior a la obtención de las secciones ultrafinas, se seleccionaron los bloques con el espécimen que presentaba mayor área de tejido, estas secciones eran más gruesas, es decir, semifinas (entre $0.1 \mu\text{m}$ a $2 \mu\text{m}$) (69).

De esta manera se permitió la identificación de las regiones celulares de interés para la investigación. Estas secciones semifinas se tiñeron con azul de toluidina como coloración de rutina, permitiendo así su visualización. Las regiones de interés se identificaron en un microscopio de luz (69). En las siguientes figuras se observan los cortes semifinos de dos secciones distintas, una con características ideales para el estudio de MET (Figura 6) y otro que no aplicó para la investigación (Figura 7).

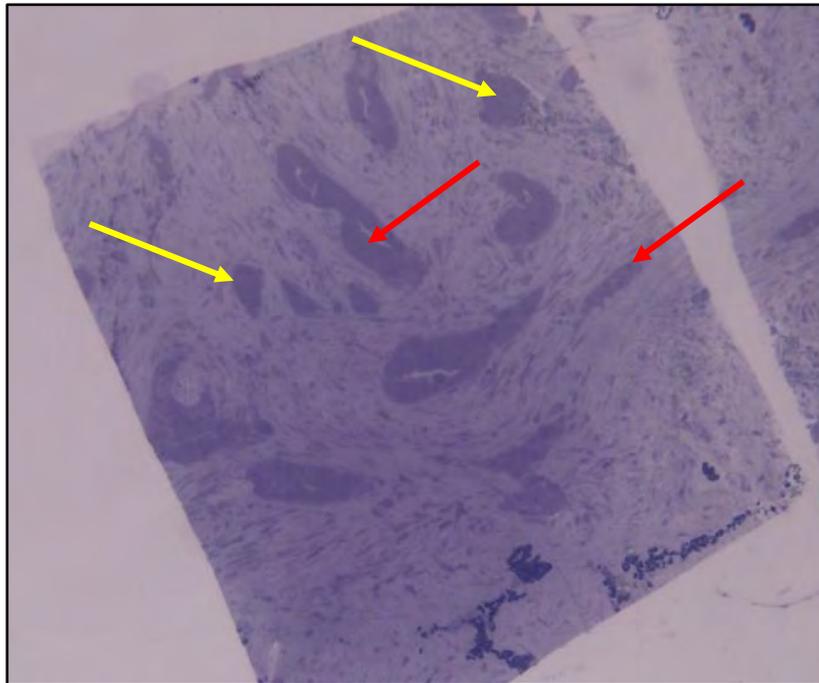


Figura 6. Bloque elegible para análisis por MET. El corte semifino presenta trabéculas (flechas rojas) y nidos de células neoplásicas infiltrantes (flechas amarillas). Los núcleos están aumentados de tamaño y los nucléolos son prominentes. Hay escaso citoplasma y escasa formación de lúmenes. Aumento 4X.

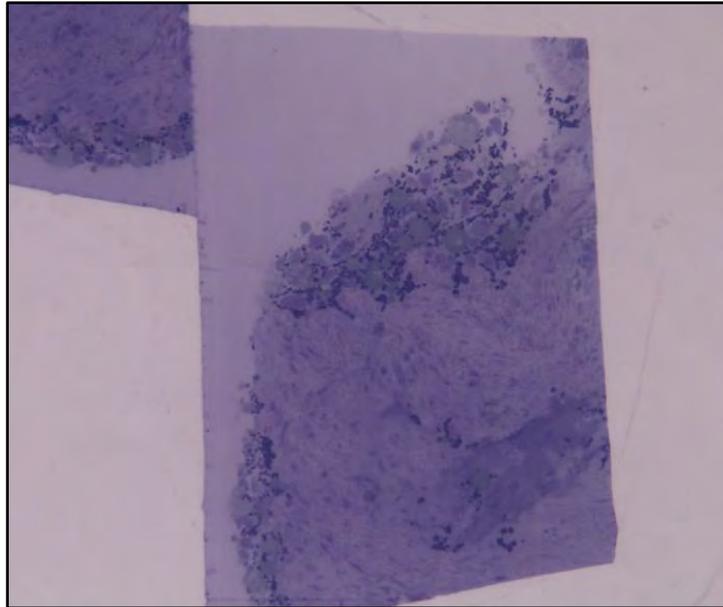


Figura 7. Corte semifino descartado para análisis por MET. La glándula se encuentra dilatada, el estroma es poco celular. Las células inflamatorias se encuentran dispersas. Aumento 4X.

En la figura 6, se evidenciaron glándulas neoplásicas con lúmenes visibles y se logró identificar el estroma alrededor. La figura 7 presentó solo estroma sin células neoplásicas evidentes. De esta manera se definieron los criterios para determinar cuáles bloques resultaron adecuados y cuales se descartaron para realizar el seccionamiento de cortes ultrafinos. Estos cortes son sumamente importantes para poder definir el área de estudio.

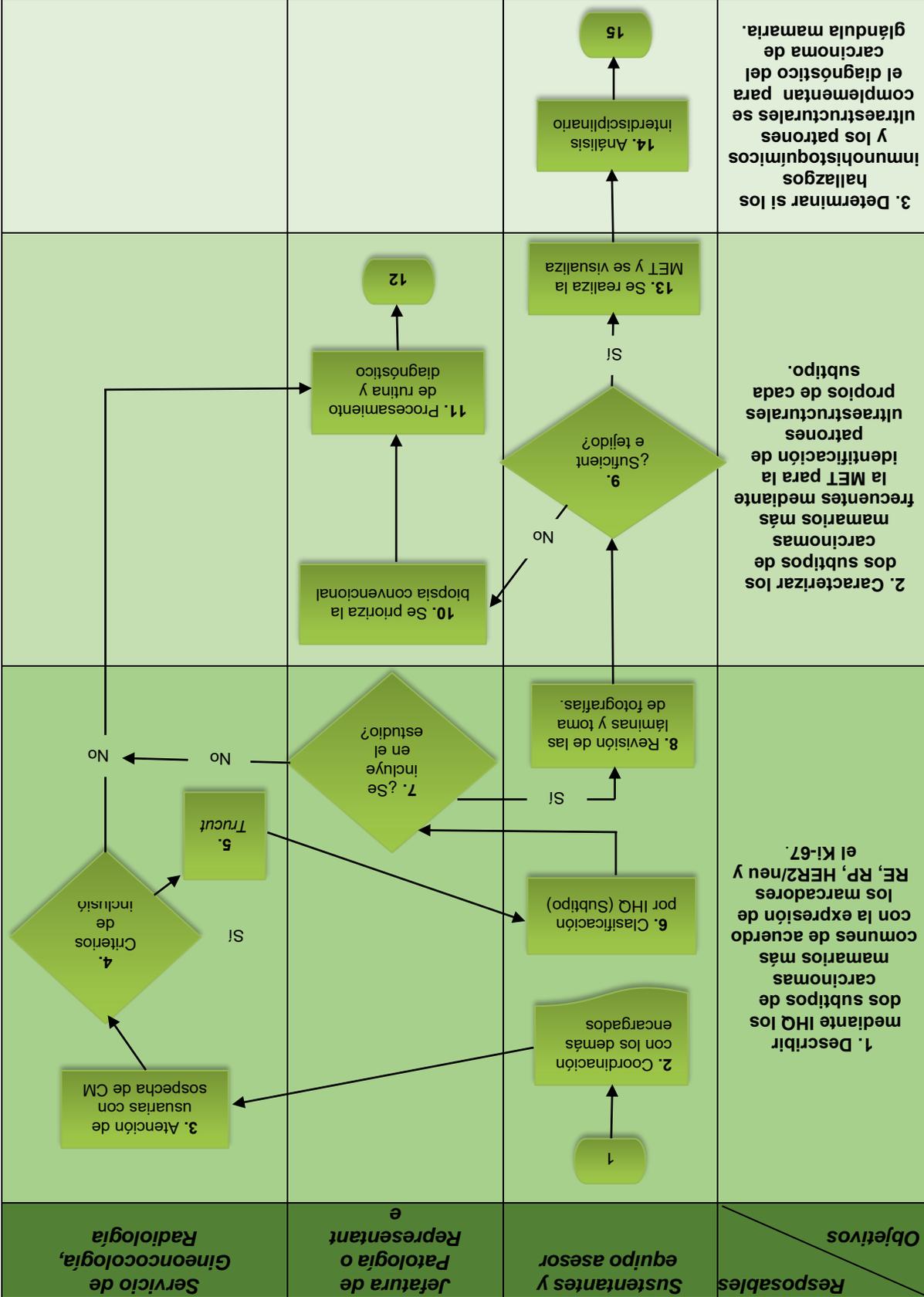
Para la microtomía, se cortaron secciones ultradelgadas (60-80 nm) del bloque de resina en un ultramicrotomo Power XL, RMC Products, Chennai, India. El último paso antes de la obtención de las imágenes fue la tinción post-exposición con acetato de uranilo ($\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), seguido de citrato de plomo $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{Pb}_3\text{O}_{14}$, para mejorar el contraste (60). Posteriormente se procesó por medio del microscopio electrónico Hitachi HT7100, Tokio, Japón y se efectuó una descripción de la morfología celular de variantes como: tamaño nuclear, membrana nuclear, presencia y tamaño del nucléolo, relación núcleo-citoplasma.

En la figura 8 se muestra el proceso general que se realiza en la técnica de MET. Algunos datos recopilados con el microscopio electrónico de transmisión fueron: la distribución de las células neoplásicas, condiciones del estroma, tamaños y formas nucleares, presencia de nucléolos, entre otras.



Figura 8. Proceso general de la técnica de microscopía electrónica de transmisión. *Fuente:* Elaboración propia, 2022.

Al final se preservaron los bloques de parafina, las láminas histológicas de la IHQ y las microfotografías de ambas técnicas para futuras investigaciones en una vitrina de almacenamiento en el laboratorio de histología del HMP que cumple con las condiciones óptimas de preservación tomando en cuenta las condiciones de luz, temperatura y humedad. En el siguiente diagrama de flujo (figura 9) se ilustra la metodología que se siguió de acuerdo con los objetivos planteados.



Responsables

Sustentantes y equipo asesor

Jefatura de Patología o Representante

Servicio de Ginecología, Radiología

1. Describir mediante IHQ los dos subtipos de carcinomas mamarios más comunes de acuerdo con la expresión de los marcadores RE, RP, HER2/neu y el Ki-67.

2. Caracterizar los dos subtipos de carcinomas mamarios más frecuentes mediante la MET para la identificación de patrones ultraestructurales propios de cada subtipo.

3. Determinar si los hallazgos inmunohistoquímicos y los patrones ultraestructurales se complementan para el diagnóstico del carcinoma de glándula mamaria.

Figura 9: Diagrama de flujo de la metodología. Fuente: Elaboración propia, 2021.

3.6 Consideraciones éticas

Las muestras fueron anonimizadas para garantizar la confidencialidad, al ser una investigación observacional descriptiva, no intervencionista, se decidió tanto por los sustentantes como por el comité asesor, prescindir del uso del consentimiento informado, debido a que no corresponde a una investigación biomédica, esto fue aceptado por el comité ético en su documento de aprobación CEC-HMPJ 001-2020 y por el CEC-UCR en el CEC-453-2021. Los datos fueron analizados, suministrados y supervisados por la jefatura del departamento o su representante durante la consulta del sistema interno de información, de esta manera se resguardó la confidencialidad (ver diagrama de flujo página 46, objetivo específico 1, paso 7).

Tanto los sustentantes como el equipo asesor solo tuvieron acceso a los datos referentes al diagnóstico patológico (subtipo de CM). Para interés del TFG no se extrajeron datos de las usuarias, como el nombre, apellidos, dirección de residencia ni médicos tratantes. Respecto a la muestra (unidad de análisis), no se solicitaron autorizaciones ya que se considera material de archivo y la realización de los estudios de MET no afectó de ninguna manera el proceso de diagnóstico de las pacientes, ni su tratamiento o pronóstico.

El bienestar y la dignidad de las usuarias son aspectos muy importantes y siempre presentes en el pensamiento y el actuar de todos los colaboradores de esta investigación. Los principios de la ética fueron los encargados de garantizar el respeto hacia las usuarias y sus muestras, la beneficencia sobre el valor que tiene el nuevo conocimiento sobre el CM y la búsqueda de diagnósticos más precisos, además de la no maleficencia al reducir al máximo los riesgos. Por lo tanto, los riesgos potenciales para las usuarias dueñas de las muestras de tejido tumoral mamario fueron nulos ya que no existió la posibilidad de daños psicológicos, sociales, económicos y físicos.

El comité asesor y los sustentantes garantizaron la confidencialidad, respeto y resguardo de los datos, la privacidad y la anonimización de las

participantes, durante y después de la realización de la investigación, así mismo tanto al CEC-HMPJ como al CEC-UCR se les entregaron los respectivos informes trimestrales: Formulario INF-1, “Informe de avance trimestral de Investigación Biomédica Observacional” y el “Formulario para el reporte trimestral de investigaciones biomédicas”, respectivamente, esto con el objetivo de cumplir con las disposiciones de la Ley Reguladora de Investigación Biomédica N° 9234.

Capítulo IV. Resultados

A continuación, se presentan los hallazgos recopilados durante la observación de los dos subtipos de carcinoma mamario más frecuentes mediante inmunohistoquímica (IHQ) y microscopía electrónica de transmisión (MET). Primero se detalla el muestreo y los casos seleccionados, luego se describen los hallazgos inmunohistoquímicos, seguidos de las estructuras identificadas en las microfotografías de microscopía electrónica de transmisión, discusión de resultados, dos apartados que, si bien no responden de manera directa a los objetivos de este TFG, pero que se consideraron que pueden ser de valor para futuras investigaciones (otros hallazgos y artefactos) y finalmente las conclusiones y recomendaciones.

4.1 Hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos

A cada caso en estudio se le asignó un código alfanumérico con dos propósitos principales, uno para su anonimización y por otro lado para su descripción histológica y posteriormente de microscopía electrónica de transmisión.

En el cuadro 4 se indican las muestras tomadas para utilizar en la investigación. Cada letra del alfabeto corresponde a la fecha de la toma de la biopsia y el número el orden en que se recibieron los cilindros de tejido mamario ese día. El diagnóstico permitió posteriormente seleccionar los casos aptos para el estudio, estos se detallan en el cuadro 5.

Cuadro 4. Muestras incluidas en el estudio y su diagnóstico histológico.

Código	Diagnóstico
A1	Luminal A
A2	Adenosis
A3	Fibroadenoma
A4	Adenosis
B1	Fibroadenoma
C1	Luminal A

D1	Adenosis
D2	Adenosis
E1	Fibroadenoma
E2	Luminal B
F1	Luminal B
G1	Luminal B
G2	Luminal B
H1	Luminal B
I1	Cambios fibroadenomatoides

Fuente: Elaboración propia, 2022.

El cuadro 5 indica el código asignado y el subtipo histológico como resultado de su descripción y clasificación histológica, a estos casos se les realizó la IHQ y la MET. Su selección obedece a los criterios de inclusión y exclusión del TFG. Además, se suma el factor del tiempo porque muestras que superan los 3 meses de fijación en glutaraldehído no son aptas para MET, este fue el caso de la muestra A1 lo que generó que se seleccionaran un caso de Luminal A y 3 Luminales B.

Cuadro 5. Subclasificación histológica de los casos seleccionados para MET.

Caso	Código	Subtipo
1	C1	Luminal A
2	F1	Luminal B
3	G2	Luminal B
4	H1	Luminal B

Fuente: Elaboración propia, 2022.

Para la clasificación del subtipo histológico y, por consiguiente, del diagnóstico anatomopatológico, se deben tomar en cuenta varios criterios

(Cuadro 6), como lateralidad, grado histológico de acuerdo con la clasificación de Nottingham, la focalidad del tumor o si hay o no necrosis o microcalcificaciones dependerá de las características biológicas propias de cada tumor. Estos son aspectos importantes de evaluar para determinar la ruta terapéutica.

Cuadro 6. Criterios diagnósticos del carcinoma invasivo de mama.

Caso	C1	F1	G2	H1
Lateralidad	Derecha	Izquierda	Derecha	Derecha
Grado histológico	Bien diferenciado (1)	Bien diferenciado (1)	Poco diferenciado (2)	Poco diferenciado (2)
Necrosis	No identificada	Ausente	Ausente	Ausente
Micro- Calcificaciones	Presente	No identificadas	No identificadas	No identificadas
Invasión linfocascular	No se identifica	No se identifica	No se identifica	Presente

Fuente: Elaboración propia, 2022.

Con la finalidad de promover una mejor comprensión antes del análisis, se elaboró una descripción histológica de las láminas con la tinción de rutina Hematoxilina y Eosina (H&E) y de los anticuerpos de cada uno de los 4 casos. Este apartado es de gran valor tanto para personas relacionadas con patología, como para profesionales de otras ramas de la ciencia con interés en aprender sobre morfología y fisiología celular.

4.1.1 Caso C1

Luminal A: en el primer caso en estudio se observaron 6 cilindros de tejido infiltrados por una neoplasia maligna, la cual se caracterizó por formar algunos túbulos con lúmenes visibles. Además, formaba trabéculas gruesas (de 4 a 5 células de espesor) y nidos. El estroma presentó desmoplasia. Los núcleos eran redondos, hiper cromáticos de aproximadamente 14 μm con pleomorfismo leve. No se observaron nucléolos. El citoplasma era relativamente amplio, anfófilico. Las figuras mitóticas eran escasas, no se observaron linfocitos intratumorales (1%) y no presentó necrosis ni microcalcificaciones (figura 10). La invasión angiolinfática y perineural fueron indeterminadas.

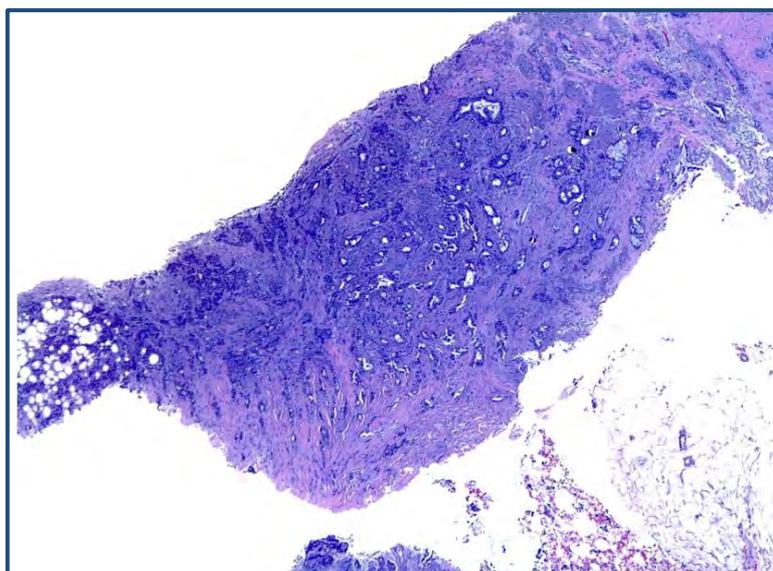


Figura 10. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria de una biopsia por aguja gruesa (*trucut*), teñido con la tinción H&E, de un carcinoma ductal bien diferenciado. Aumento 4X.

En la figura 10 se observó un cilindro de tejido mamario totalmente infiltrado por un carcinoma de mama que formaba glándulas con lúmenes irregulares, trabéculas y nidos. También presentó infiltración del tejido adiposo.

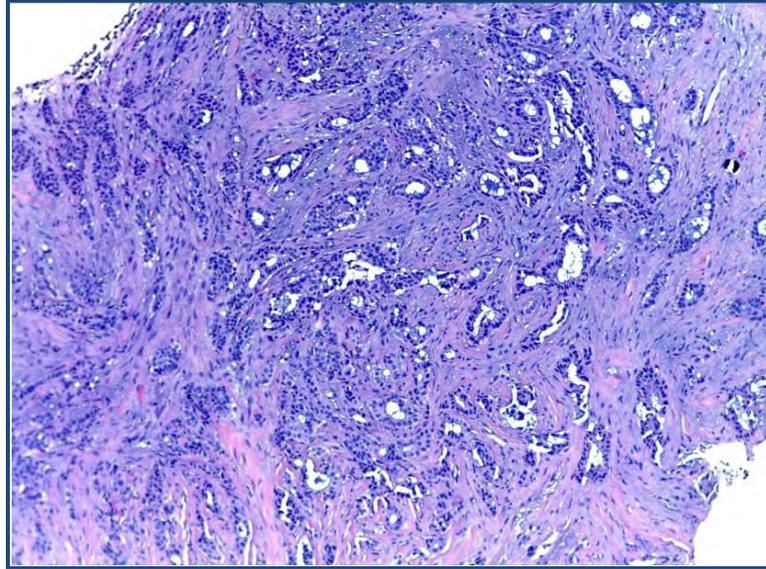


Figura 11. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria de una biopsia por aguja gruesa (*trucut*), teñido con la tinción H&E de un carcinoma ductal bien diferenciado. Aumento 10X.

En la figura 11 se observó un carcinoma con diferenciación glandular con lúmenes visibles y glándulas irregulares en un estroma desmoplásico.

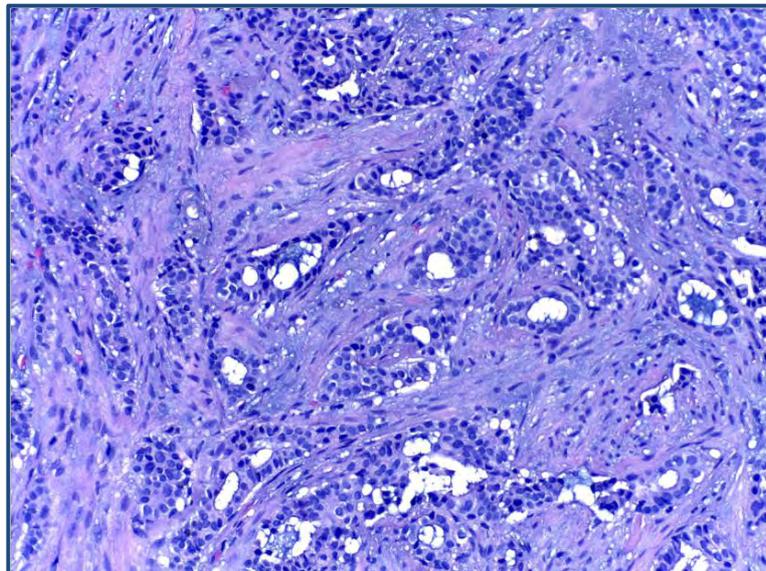


Figura 12. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria de una biopsia por aguja gruesa (*trucut*), teñido con la tinción H&E de un carcinoma ductal bien diferenciado. Aumento 20X.

En la figura 12 se observó un carcinoma de mama bien diferenciado que formaba glándulas con lúmenes visibles, tenía algunas trabéculas infiltrantes en un estroma desmoplásico.

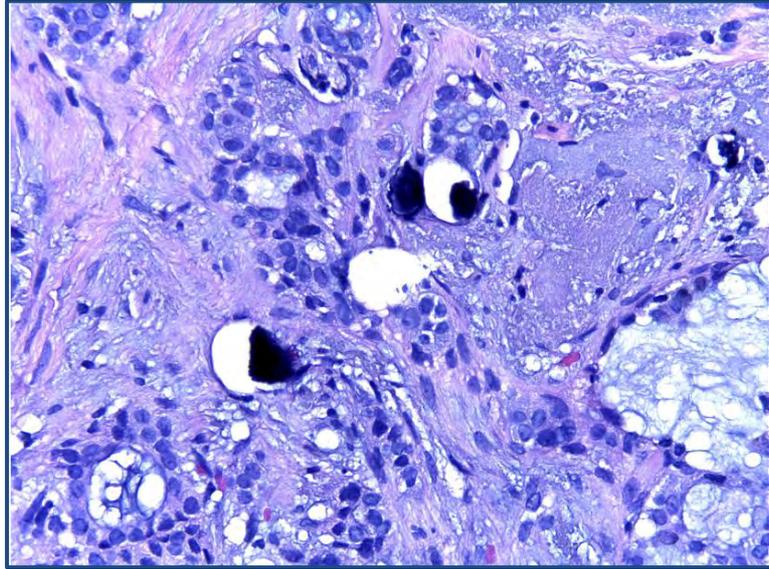


Figura 13. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria de una biopsia por aguja gruesa (*tru-cut*), teñido con la tinción H&E de un carcinoma ductal bien diferenciado. Aumento 40X.

En la figura 13 se observó un carcinoma de mama con glándulas irregulares formadas por células con escaso citoplasma y mal definido; los núcleos eran en su mayoría redondos con pleomorfismo leve y los nucléolos inconspicuos. No se observaron figuras de mitosis, sin embargo, había presencia de microcalcificaciones (señaladas con flechas).

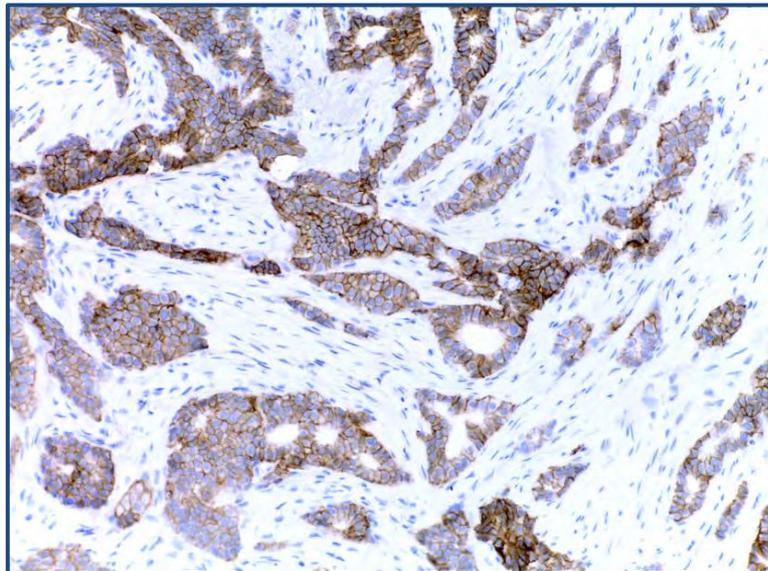


Figura 14. Microfotografía de un corte histológico de un carcinoma ductal bien diferenciado, teñido con el Anticuerpo HER2/neu empleando la técnica de Inmunohistoquímica. Aumento 20X.

En la figura 14, las células neoplásicas se organizaban formando glándulas irregulares, algunas se fusionaban y otras formaban trabéculas infiltrantes. El anticuerpo empleado tiñó las membranas celulares de las células neoplásicas con un nivel de intensidad intermedio (2+) en el 95% de las células.

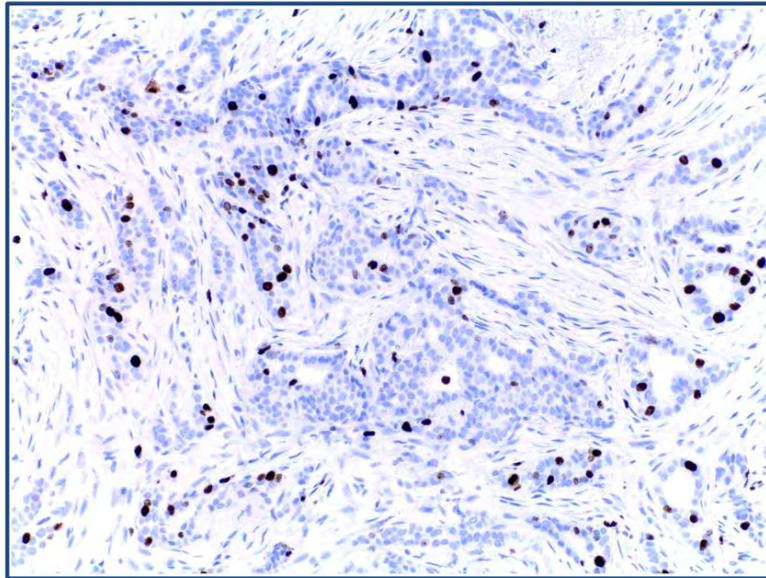


Figura 15. Microfotografía de un corte histológico de un carcinoma ductal bien diferenciado, teñido con el Anticuerpo Ki-67 empleando la técnica de Inmunohistoquímica. Aumento 20X.

En la figura 15 se observaron glándulas neoplásicas irregulares dispersas, en las cuales se tiñeron los núcleos en el 10% de las células neoplásicas de forma intensa (3+).

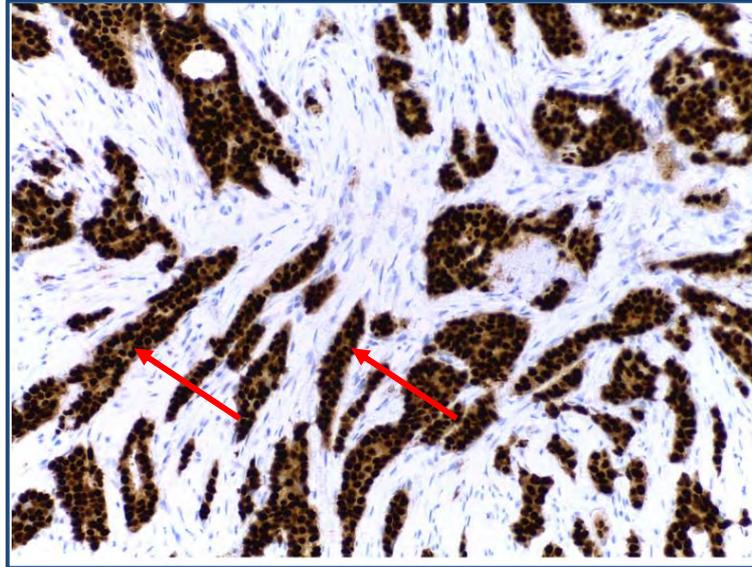


Figura 16. Microfotografía de un corte histológico de un carcinoma ductal bien diferenciado, teñido con el Anticuerpo Receptor de Estrógenos (RE), empleando la técnica de Inmunohistoquímica. Aumento 20X.

En la figura 16 se observaron algunas glándulas neoplásicas y trabéculas infiltrantes (obsérvese las flechas), cuyas células presentaban tinción nuclear intensa (3+) en el 100% de los núcleos.

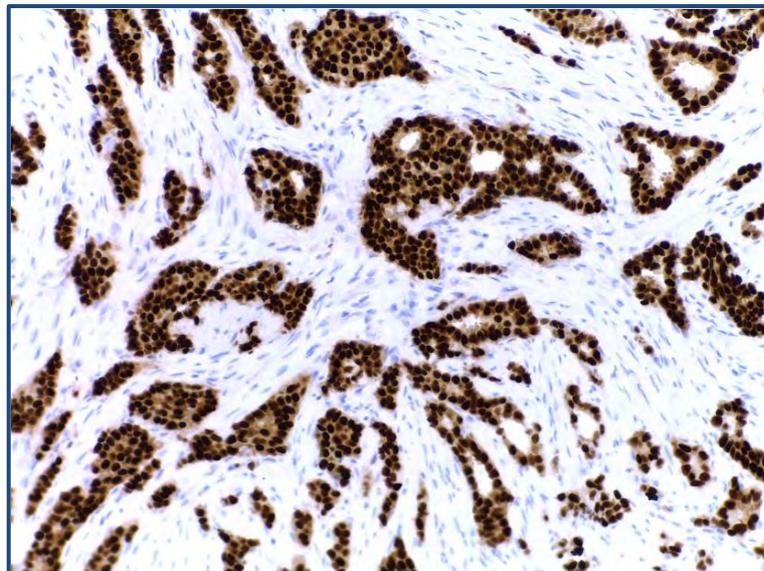


Figura 17. Microfotografía de un corte histológico de un carcinoma ductal bien diferenciado, teñido con el Anticuerpo Receptor de Progesterona (RP), empleando la técnica de Inmunohistoquímica. Aumento 20X.

En la figura 17 se observaron algunas glándulas neoplásicas y trabéculas infiltrantes cuyas células presentaron tinción nuclear intensa (3+) en el 100% de los núcleos.

4.1.2 Caso F1

Luminal B: en el segundo caso en estudio se observaron 3 cilindros de tejido estromal y adiposo que presentaba infiltración neoplásica que formaba pequeños nidos y trabéculas de 1 o 2 células de grosor. Los núcleos eran redondos, regulares con nucléolos inconspicuos. El citoplasma era claro o eosinofílico relativamente amplio, a veces se observaron las membranas nucleares. Las mitosis eran escasas. En el tejido graso las células tumorales infiltraban formando pequeños nidos. En el estroma el colágeno era rosado desmoplásico. Con trabéculas de 2 o 3 células de espesor y en otras ocasiones con formación de filas indias.

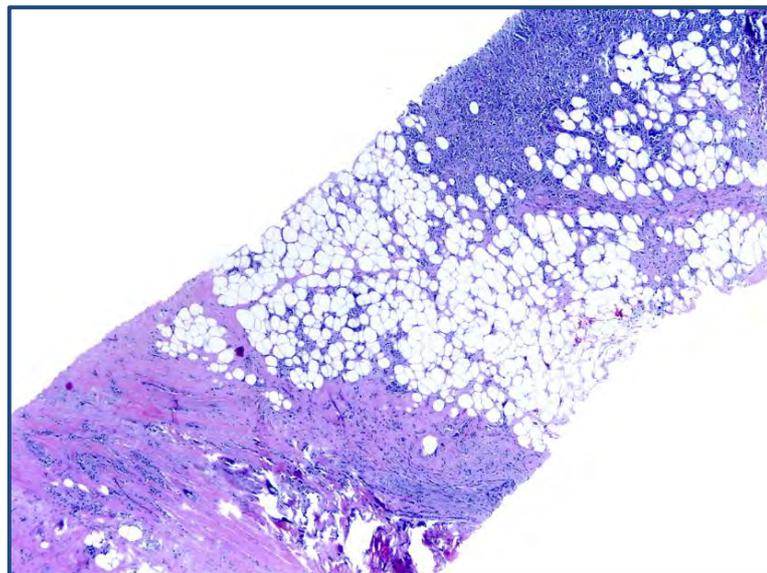


Figura 18. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria de una biopsia por aguja gruesa (*trucut*), que presenta un carcinoma teñido con la tinción H&E. Aumento 4X.

En la figura 18 se observó un cilindro de tejido mamario que presentaba un cáncer de mama aproximadamente en un 30% de la muestra. También se identificó tejido adiposo en un 30% de la muestra con infiltración tumoral (flecha). El otro 30% de la muestra era tejido conectivo de aspecto fibroso.

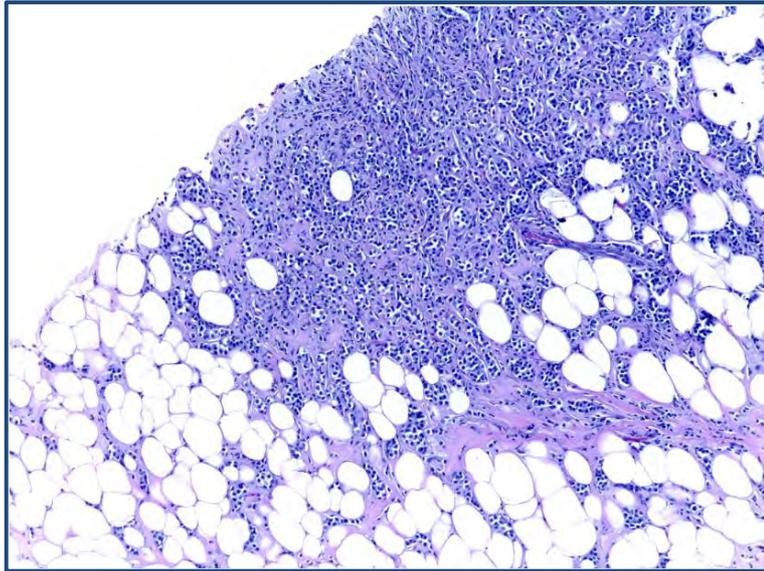


Figura 19. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria de una biopsia por aguja gruesa (*tru-cut*), que presenta un carcinoma teñido con la tinción H&E. Aumento 10X.

En la figura 19 se observó un carcinoma de mama que formaba principalmente nidos y algunas trabéculas infiltrantes que se proyectaban hacia el tejido adiposo.

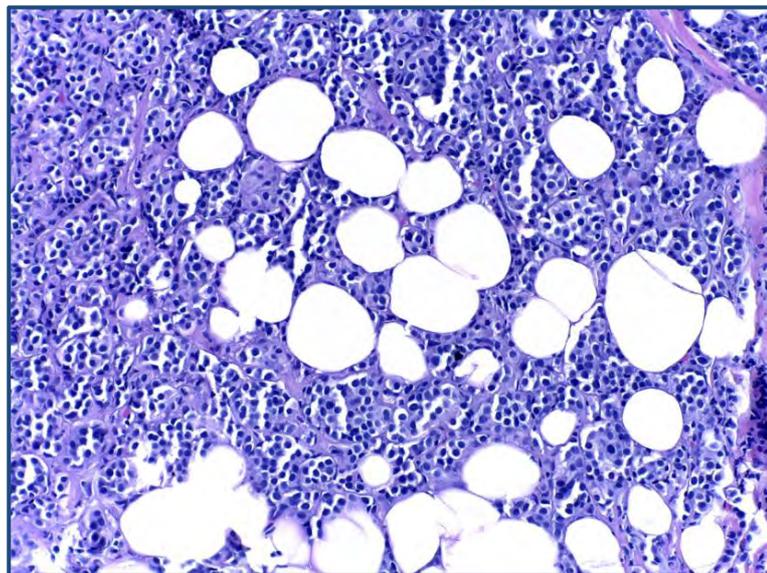


Figura 20. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria de una biopsia por aguja gruesa (*tru-cut*), que presenta un carcinoma teñido con la tinción H&E. Aumento 20X.

En la figura 20 se observó tejido adiposo infiltrado ampliamente por un carcinoma que formaba principalmente nidos.

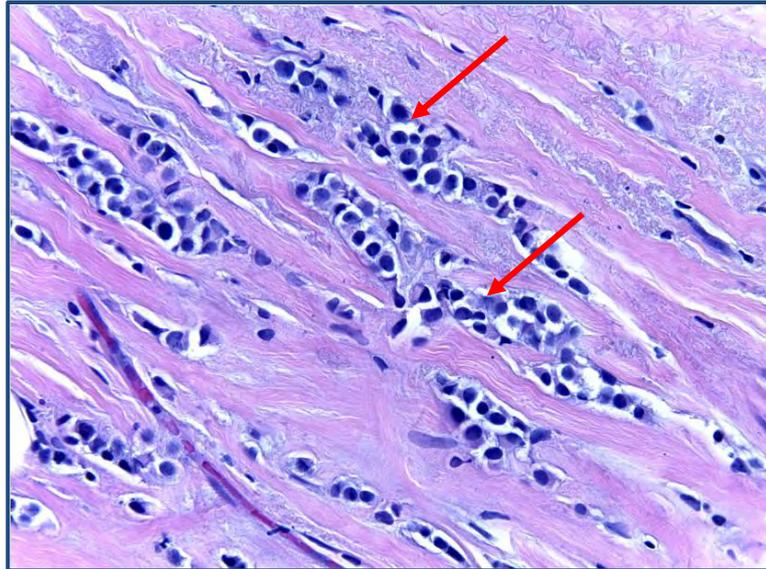


Figura 21. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria de una biopsia por aguja gruesa (*trucut*), que presenta un carcinoma teñido con la tinción H&E. Aumento 40X.

En la figura 21 se observaron trabéculas de neoplasia maligna (flecha), infiltrando el tejido conectivo. Los núcleos eran hiper cromáticos con nucléolos inconspicuos con pleomorfismo de leve a moderado. El citoplasma era visible.

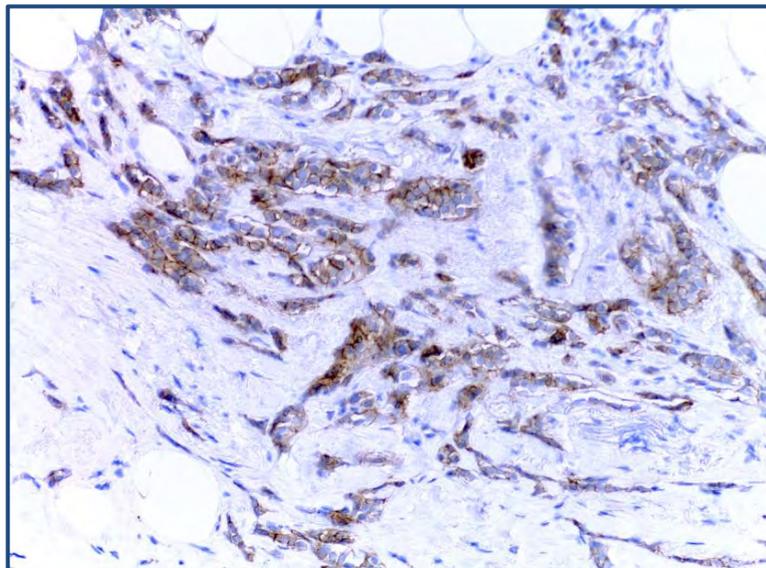


Figura 22. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria de una biopsia por aguja gruesa (*trucut*), que presenta un carcinoma teñido con el Anticuerpo HER2/neu empleando la técnica de Inmunohistoquímica. Aumento 20X.

En la figura 22 las células neoplásicas se organizaban formando nidos y algunas trabéculas, presentó tinción de membrana incompleta y débil (1+).

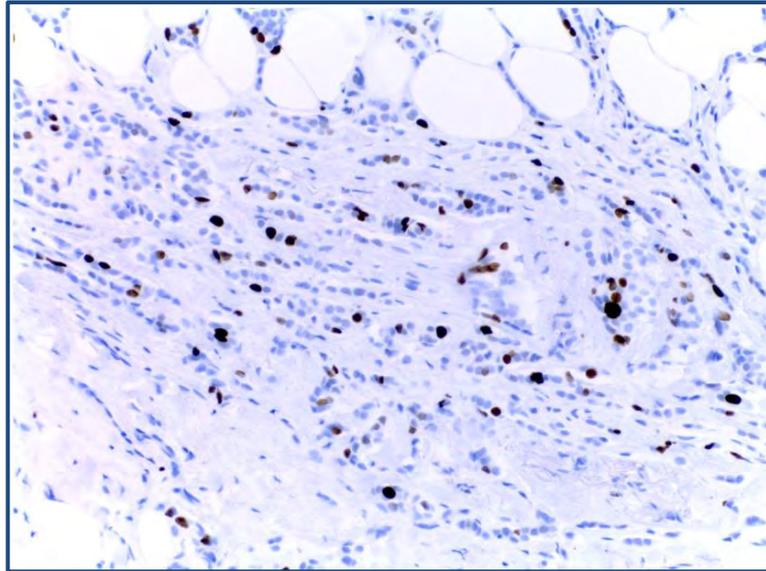


Figura 23. Microfotografía de un corte histológico de un carcinoma de mama teñido con el Anticuerpo Ki-67 empleando la técnica de Inmunohistoquímica. Aumento 20X.

En la figura 23 se observó un carcinoma de mama con 20% de los núcleos con tinción positiva fuerte (3+).

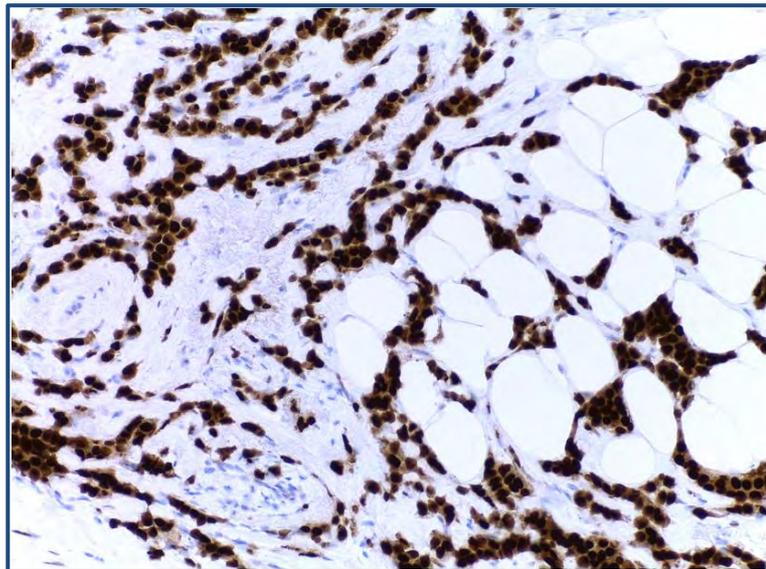


Figura 24. Microfotografía de un corte histológico de un carcinoma de mama, teñido con el Anticuerpo Receptor de estrógenos (RE), empleando la técnica de Inmunohistoquímica. Aumento 20X.

En la figura 24 las células neoplásicas presentaron tinción positiva nuclear en el 100% (3+) para el receptor de estrógenos.

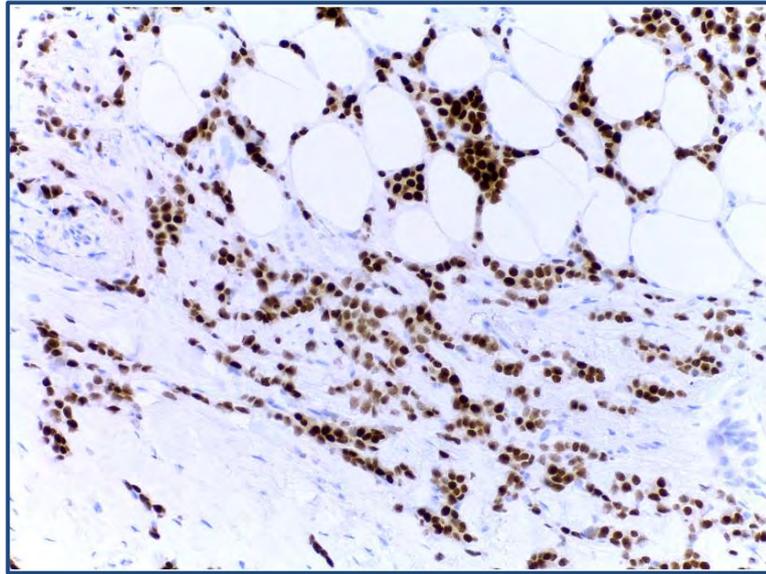


Figura 25. Microfotografía de un corte histológico de un carcinoma de mama, teñido con el Anticuerpo Receptor de Progesterona (RP), empleando la técnica de Inmunohistoquímica. Aumento 20X.

En la figura 25 se observaron algunas células con tinción nuclear de moderada a intensa (2+/3+) en el 80% de los núcleos.

4.1.3 Caso G2

Luminal B: en el caso número 3 se observaron 3 cilindros de tejido estromal y adiposo que presentaban infiltración neoplásica que formaba pequeños nidos y trabéculas de una o dos células de grosor. En todos había presencia de tumor. Los núcleos eran redondos, regulares con nucléolos inconspicuos. El citoplasma era visible, claro o eosinofílico relativamente amplio, a veces se logró observar las membranas nucleares. En la grasa las células tumorales infiltraban formando pequeños nidos. En el estroma el colágeno era rosado, con trabéculas de 2 o 3 células de espesor y en otras ocasiones con formación de filas indias.

También se identificaron zonas de esclerosis y de tejido adiposo con infiltración neoplásica. Linfocitos intratumorales presentes formaban 2 agrupaciones. Las células neoplásicas presentaban núcleos monótonos, pleomorfismo leve y escasas mitosis.

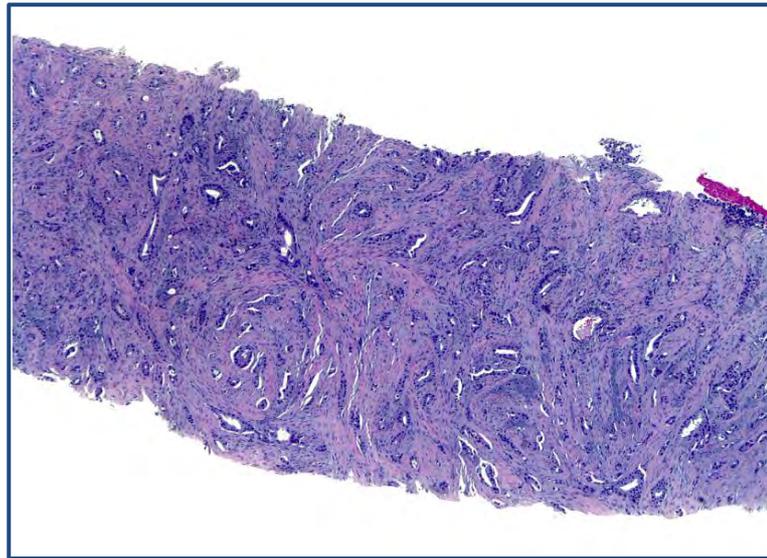


Figura 26. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria de una biopsia por aguja gruesa (*trucut*), que presenta un carcinoma ductal teñido con la tinción H&E. Aumento 4X.

En la figura 26 se observó un cilindro de tejido mamario totalmente infiltrado por un carcinoma ductal de mama que formaba glándulas con lúmenes irregulares. El tejido conjuntivo presentaba desmoplasia.

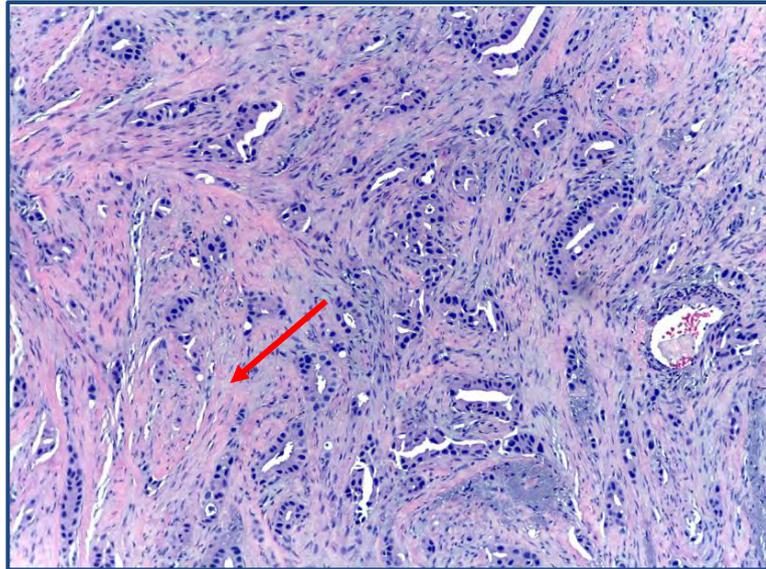


Figura 27. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria de una biopsia por aguja gruesa (*tru-cut*), que presenta un carcinoma ductal teñido con la tinción H&E. Aumento 10X.

En la figura 27 se observó un carcinoma de mama infiltrante que formaba glándulas irregulares con lúmenes visibles, dispersas, tapizadas por núcleos en su mayoría redondos hiper cromáticos. En el estroma se identificó desmoplasia de tipo fibrosa (flecha).

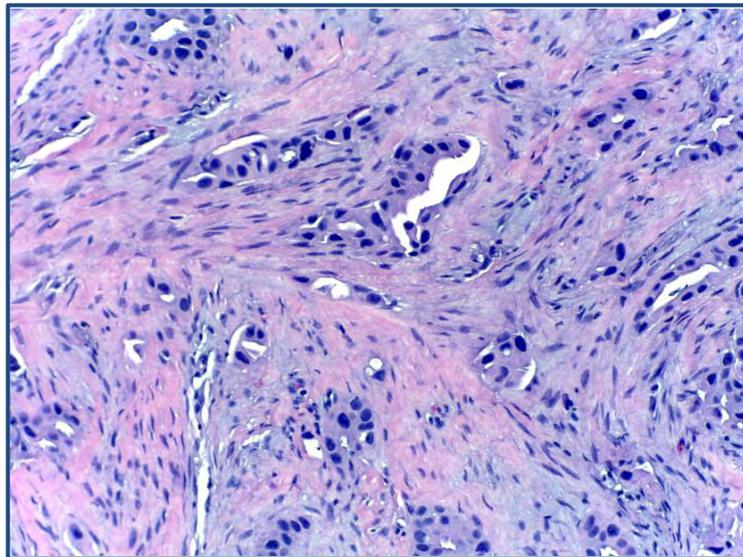


Figura 28. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria de una biopsia por aguja gruesa (*tru-cut*), que presenta un carcinoma ductal teñido con la tinción H&E. Aumento 20X.

En la figura 28 se observó un carcinoma de mama infiltrante con la misma descripción de la imagen 27, pero a un mayor aumento, en 20X.

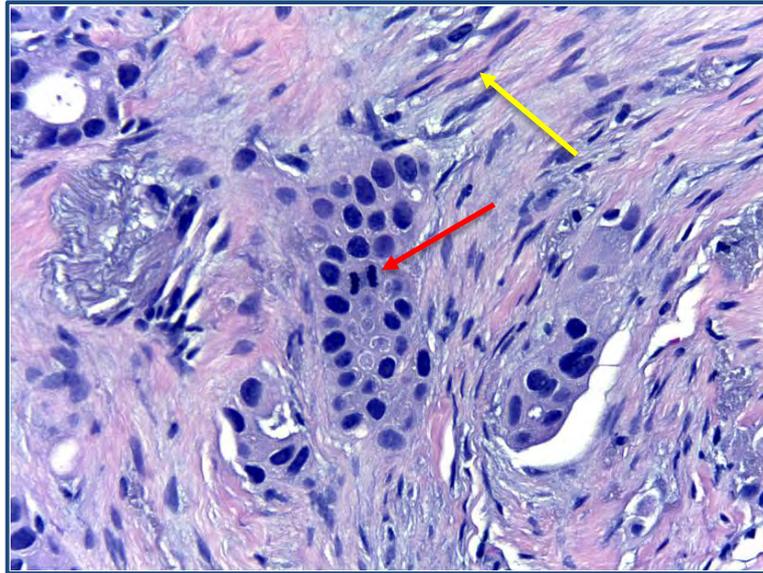


Figura 29. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria de una biopsia por aguja gruesa (*trucut*), que presenta un carcinoma ductal teñido con la tinción H&E. Aumento 40X.

En la figura 29 se observaron 4 glándulas neoplásicas revestidas por núcleos redondos u ovales, hipercromáticos con nucléolos inconspicuos y una figura de mitosis (flecha roja). El estroma presentaba desmoplasia con fibroblastos alargados (flecha amarilla).

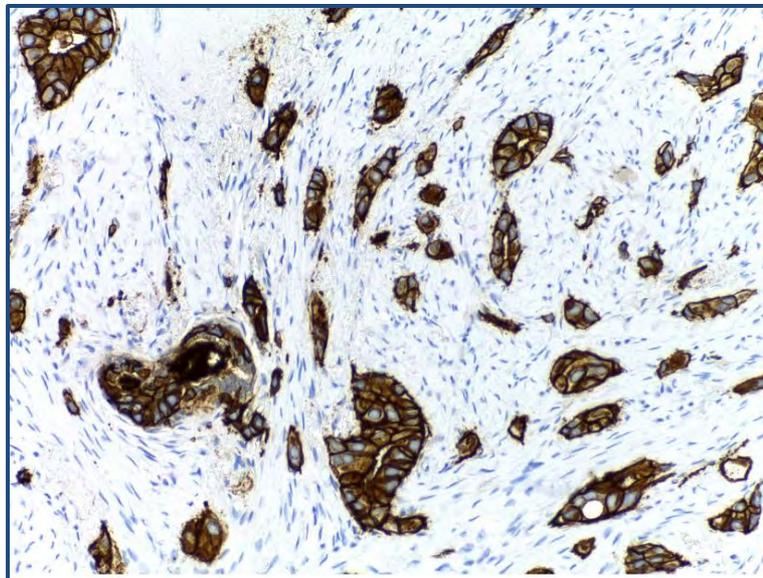


Figura 30. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria de una biopsia por aguja gruesa (*trucut*), que presenta un carcinoma teñido con el Anticuerpo HER2/neu empleando la técnica de Inmunohistoquímica. Aumento 20X.

En la figura 30 se observaron glándulas neoplásicas y trabéculas pequeñas que presentaban células con tinción de membrana completa e

intensa (3+) en el 100% de las células.

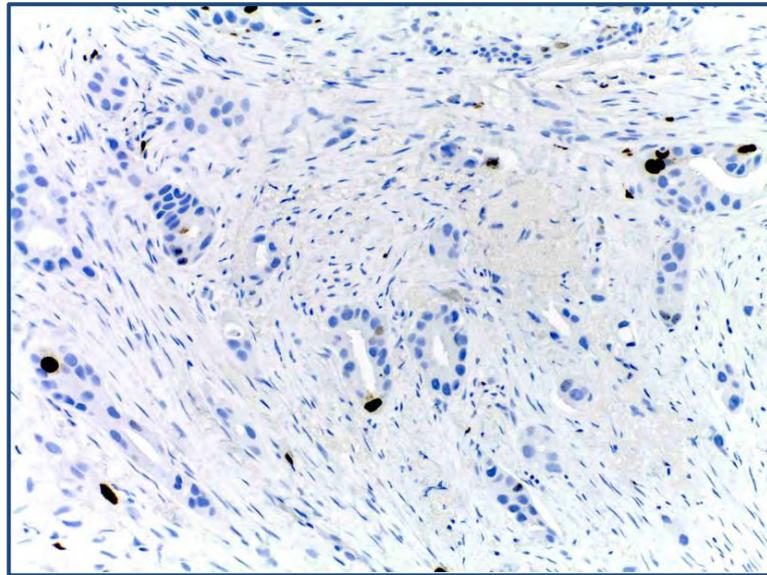


Figura 31. Microfotografía de un corte histológico de un carcinoma de mama teñido con el Anticuerpo Ki-67 empleando la técnica de Inmunohistoquímica. Aumento 20X.

En la figura 31 se observaron glándulas neoplásicas irregulares dispersas en las cuales se tiñeron los núcleos en menos de un 10% de las células neoplásicas de forma intensa (3+).

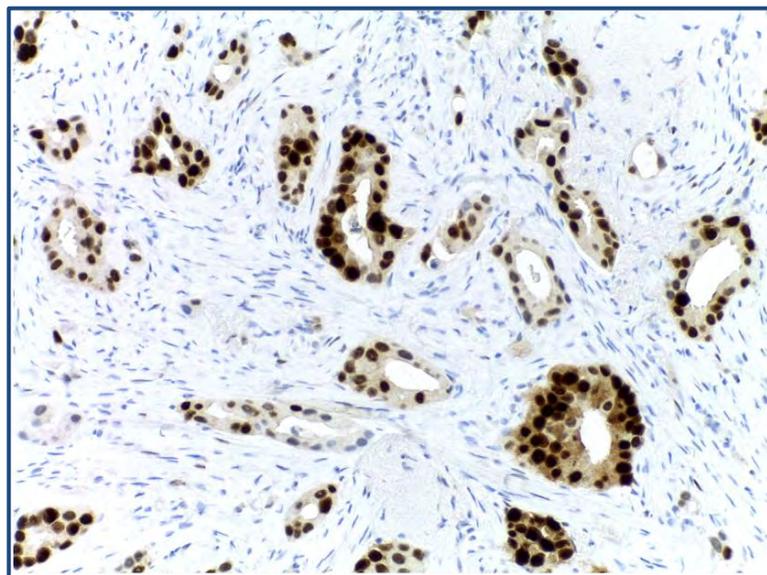


Figura 32. Microfotografía de un corte histológico de un carcinoma de mama, teñido con el Anticuerpo Receptor de estrógenos (RE), empleando la técnica de Inmunohistoquímica. Aumento 20X.

En la figura 32 se observaron algunas glándulas neoplásicas cuyas

células presentaron tinción nuclear intensa (3+) en el 90% de las células.

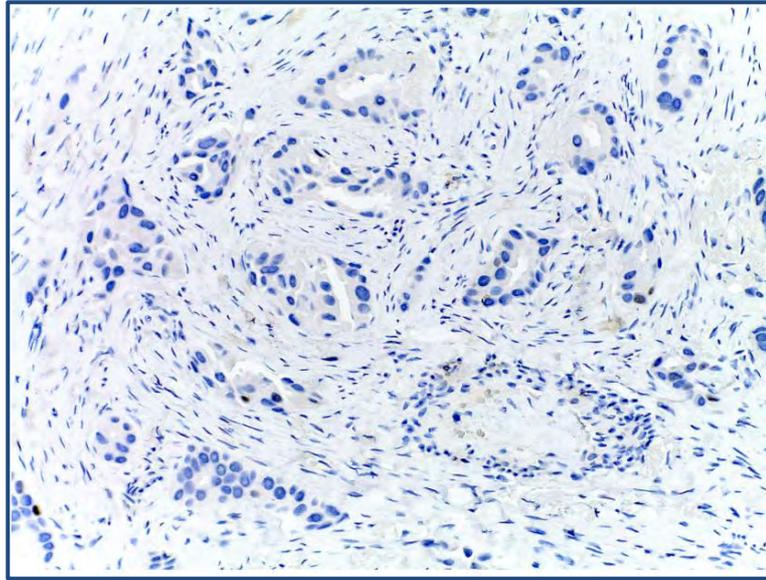


Figura 33. Microfotografía de un corte histológico de un carcinoma de mama, teñido con el Anticuerpo Receptor de progesterona (RP), empleando la técnica de Inmunohistoquímica. Aumento 20X.

En la figura 33 se observaron algunas glándulas neoplásicas cuyas células no presentaron tinción para el anticuerpo de progesterona.

4.1.4 Caso H1

Luminal B: en el estudio número 4, en las figuras 34, 35, 36 y 37 se identificaron 2 cilindros de tejido los cuales presentaron infiltración por neoplasia maligna. Esta se caracterizó por formar principalmente trabéculas de células infiltrantes y nidos. Los núcleos estaban aumentados de tamaño y presentó pleomorfismo moderado. Medían aproximadamente 42 μm . Los nucléolos estaban aumentados de tamaño y la mayoría de ellos eran rojizos y centrales. Se identificaron células neoplásicas sueltas. La formación de lúmenes y el citoplasma eran escasos. El estroma presentaba desmoplasia. También se identificaron pocas células mononucleares inflamatorias. Las figuras mitóticas eran escasas, no se observó necrosis ni hubo presencia de tejido mamario normal ni tejido adiposo.

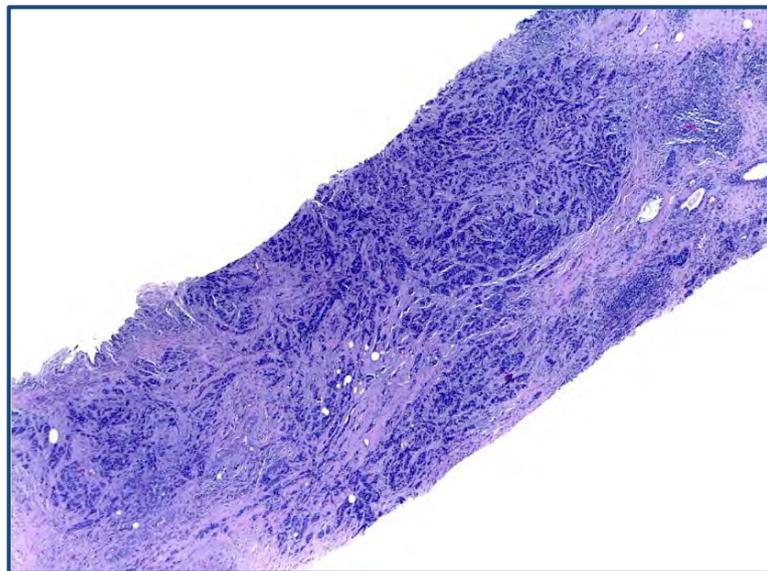


Figura 34. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria de una biopsia por aguja gruesa (*trucut*), teñido con la tinción H&E en un carcinoma. Aumento 4X.

En la figura 34 se observó un cilindro de tejido mamario totalmente infiltrado por un carcinoma de mama que formaba cordones, trabéculas y algunos nidos con bandas de fibrosis.

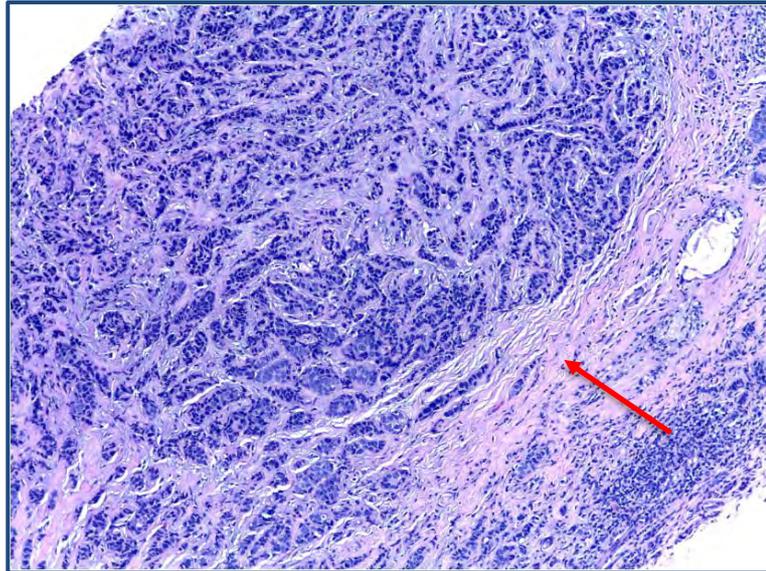


Figura 35. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria de una biopsia por aguja gruesa (*trucut*), teñido con la tinción H&E en un carcinoma. Aumento 10X.

En la figura 35 se identificó un carcinoma de mama que infiltraba formando trabéculas con desmoplasia (flecha) a su alrededor. En el margen inferior había un cúmulo de linfocitos.

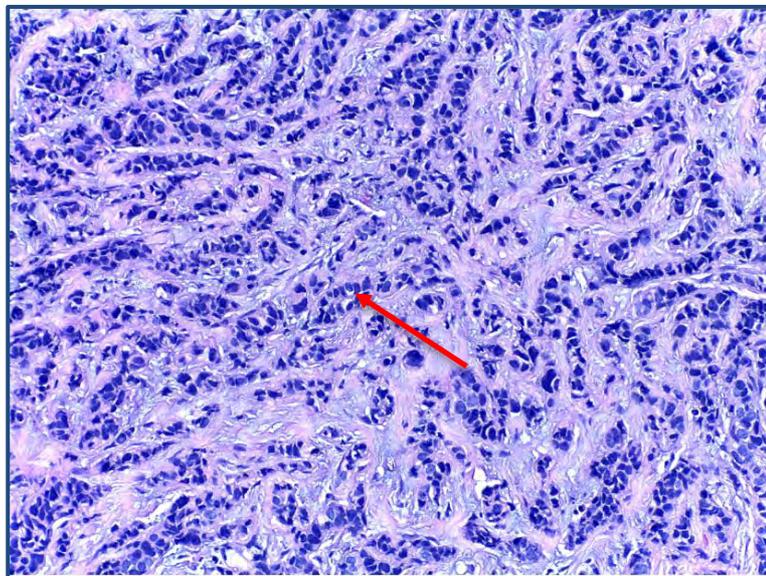


Figura 36. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria de una biopsia por aguja gruesa (*trucut*), teñido con la tinción H&E en un carcinoma. Aumento 20X.

En la figura 36 se observó un cáncer de mama que formaba principalmente trabéculas infiltrantes (flecha) con desmoplasia a su alrededor.

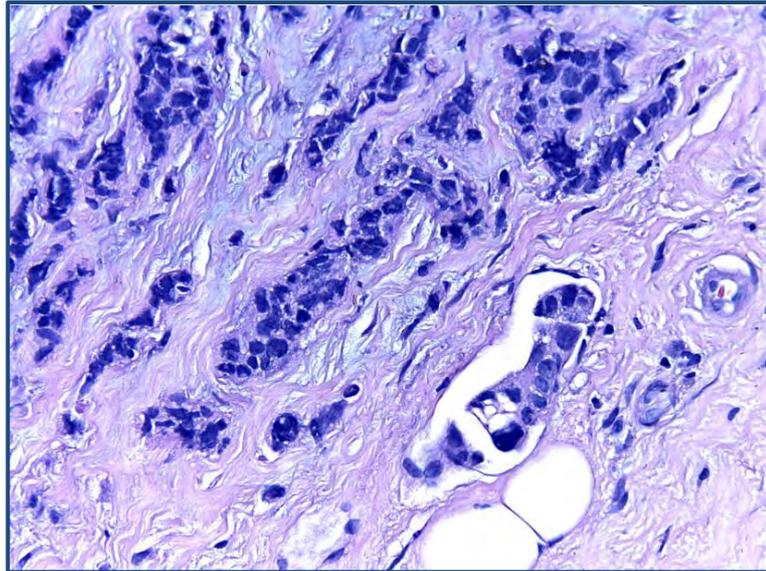


Figura 37. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria de una biopsia por aguja gruesa (*trucut*), teñido con la tinción H&E en un carcinoma. Aumento 40X.

En la figura 37 se observaron trabéculas infiltrantes formadas por núcleos aumentados de tamaño con nucleólo conspicuo, pleomorfismo moderado-severo, escaso citoplasma, no se observaron mitosis, inmersas en un estroma desmoplásico. Se observó invasión vascular.

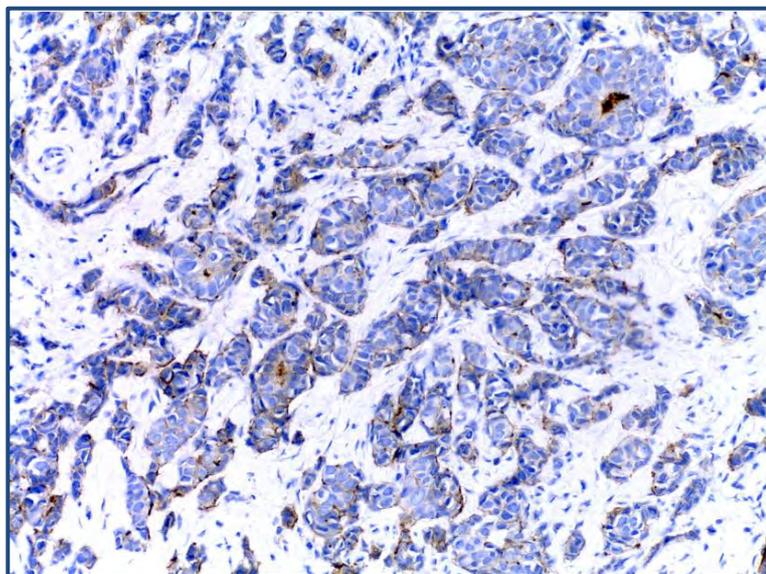


Figura 38. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria de una biopsia por aguja gruesa (*trucut*), que presenta un carcinoma teñido con el Anticuerpo HER2/neu empleando la técnica de Inmunohistoquímica. Aumento 20X.

En la figura 38 se observaron nidos y trabéculas, cuyas células

mostraron tinción de membrana incompleta en un 10% y débil negativo (0).

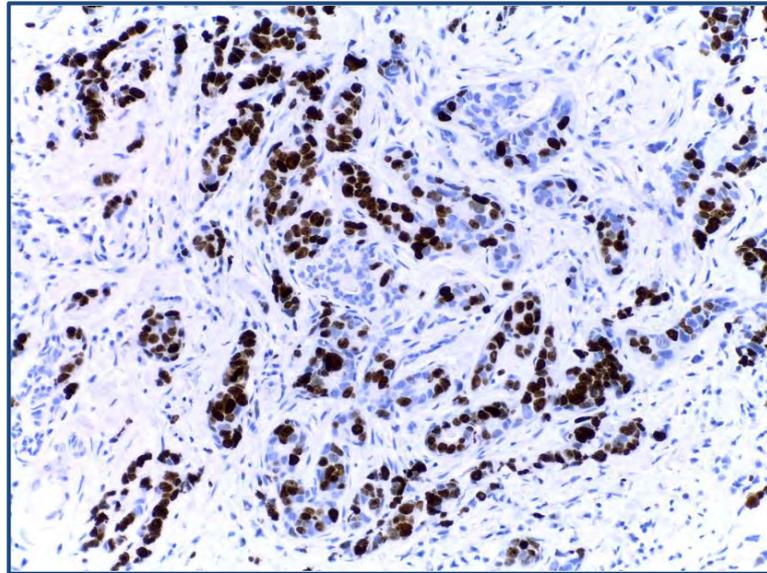


Figura 39. Microfotografía de un corte histológico de un carcinoma de mama teñido con el Anticuerpo Ki-67 empleando la técnica de Inmunohistoquímica. Aumento 20X.

En la figura 39 se observaron algunas glándulas neoplásicas irregulares dispersas, en las cuales se tiñeron los núcleos en el 90% de las células neoplásicas de forma intensa (3+).

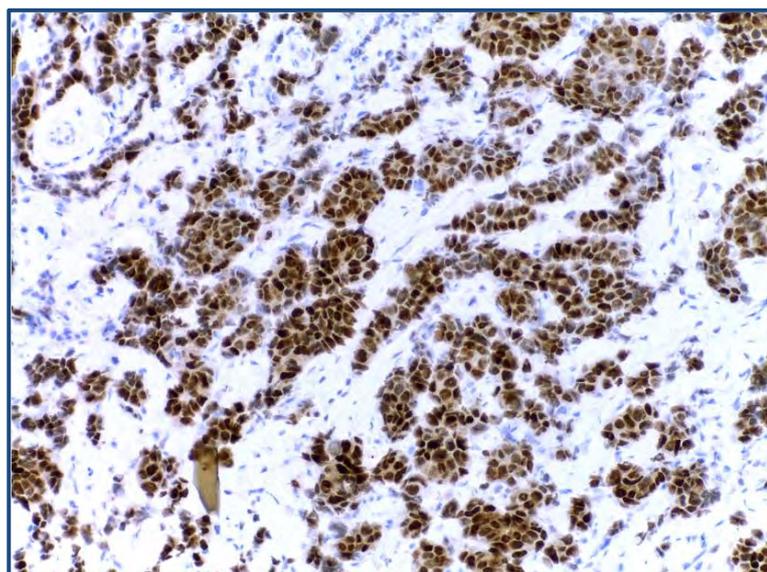


Figura 40. Microfotografía de un corte histológico de un carcinoma de mama, teñido con el Anticuerpo Receptor de estrógenos (RE), empleando la técnica de Inmunohistoquímica. Aumento 20X.

En la figura 40 se observaron nidos y trabéculas de neoplasia maligna con tinción nuclear positiva en el 95% de las células (3+).

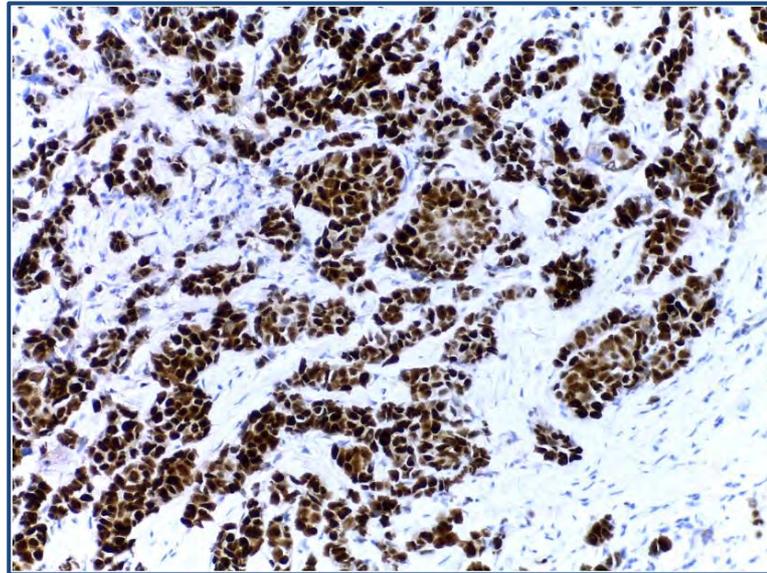


Figura 41. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria de una biopsia por aguja gruesa, teñido con la técnica de Inmunohistoquímica con el anticuerpo Receptor de progesterona (RP), en un carcinoma. Aumento 20X.

En la figura 41 se observaron nidos y trabéculas de neoplasia maligna con tinción nuclear positiva en el 95% de las células (3+).

Las estructuras que se identificaron en los estudios histológicos de H&E y los hallazgos inmunohistoquímicos de los cuatro casos estudiados, se resumen en el cuadro 7:

Cuadro 7. Resumen de las estructuras histológicas y los hallazgos inmunohistoquímicos identificados en los cuatro casos.

Estructuras	Luminal A C1	Luminal B F1	Luminal B G2	Luminal B H1
Núcleos	Redondos hiper cromáticos	Redondos, regulares, hiper cromáticos	Redondos, regulares hiper cromáticos	Aumentados de tamaño, pleomorfismo moderado
Nucléolos	Inconspicuos	Inconspicuos	inconspicuos	Aumentados de tamaño, rojizos
Citoplasma	Anfofílico	Claro, eosinofílico	Claro, eosinofílico	Escaso
Mitosis	Escasas/nulas	Escasas	Presente	Escasas
Túbulos o Glándulas	Sí	Sí y con filas indias	Sí	Sí
Trabéculas	Sí	Sí	Sí	Sí
Nidos	Sí	Sí	Sí	Sí
Estroma	Con desmoplasia	Rosado, desmoplásico de tipo fibroso	Rosado desmoplásico de tipo fibroso con fibroblastos alargados	Desmoplásico
Linfocitos intratumorales	1%	1%	1%	1%
Necrosis	Ausente	Ausente	1%	Ausente
Micro- Calcificaciones	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
Infiltración del tejido adiposo	Sí	Sí	No	No
Her-2/neu	Intensidad 2+ 95%	Intensidad débil 1+, tinción incompleta	Intensidad 3+, tinción completa 100%	Intensidad débil, tinción incompleta
Ki-67	Intensidad 3+ 10%	Intensidad 3+ 20%	Intensidad 3+ 10%	Intensidad 3+ 90%
RE	Intensidad 3+ 100% de los núcleos	Intensidad 3+ 100% de los núcleos	Intensidad 3+ 90% de las células	Intensidad 3+ 95% de las células
RP	Intensidad 3+ 100% de los núcleos	Intensidad moderada a intensa 2+/3+ 80% de los núcleos	Intensidad nula 0%	Intensidad 3+ 95% de las células
FISH	Negativo	No requirió	No requirió	No requirió

Fuente: Elaboración propia, 2022.

4.2 Hallazgos ultraestructurales de la microscopía electrónica de transmisión

Se realizaron 3 sesiones de visualización en el CIEMic con la cámara digital del Microscopio Electrónico de Transmisión Hitachi, modelo H-7000 donde se generaron 72 fotografías, los números de caso presentan una letra más para especificar a cuál de las 3 muestras por caso corresponden (ver cuadro 8). Se decidió dedicar más tiempo a los casos C1C y G2A porque fueron los que más células neoplásicas tenían en los cortes semifinos. Además, para tener representación de los dos subtipos luminales. Estas incluyeron imágenes de células epiteliales neoplásicas, fibroblastos y células inflamatorias como otros hallazgos no contemplados en la investigación, pero que igual cumplieron un papel importante en el desarrollo de la patología y por eso se describen más adelante. Se apreciaron los componentes celulares como núcleos, nucléolos, membranas, citoplasma, fibras de colágeno, entre otras.

Cuadro 8. Cantidad de imágenes tomadas en MET por caso.

Magnificación	200X a 1000X	2000X a 2500X	3000X a 3500X	4000X a 6000X	7000X a 9000X	10000X a 17000X	Total
Caso							
C1C	0	1	15	4	2	0	22
F1B	0	1	3	4	2	0	10
G2A	5	8	7	2	4	4	30
H1A	0	0	6	1	2	1	10
						TOTAL	72

Fuente: Elaboración propia, 2022.

4.2.1 Caso C1, Luminal A

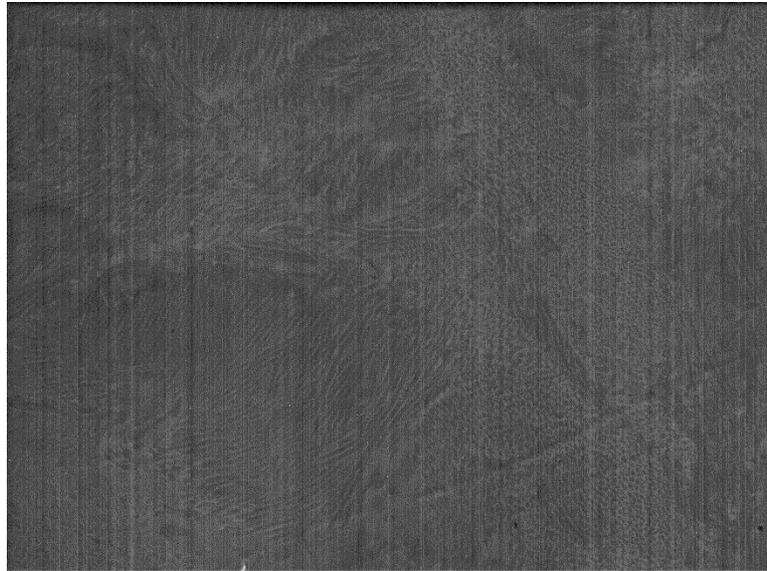


Figura 42. Microfotografía de un carcinoma de mama, empleando la técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión. Aumento 3000X.

En la figura 42 se observó fibrosis y abundantes fibras de colágeno. Estas estructuras para efectos de la investigación no brindaron información relevante porque no hay celularidad. Además, se logró observar varios artefactos provocados durante la visualización en el microscopio electrónico.



Figura 43. Microfotografía de un carcinoma de mama, empleando la técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión. Aumento 3500X.

En la figura 43 se logró identificar una célula, su membrana (flecha roja)

y un núcleo alargado e irregular (flecha amarilla) rodeado de citoplasma.

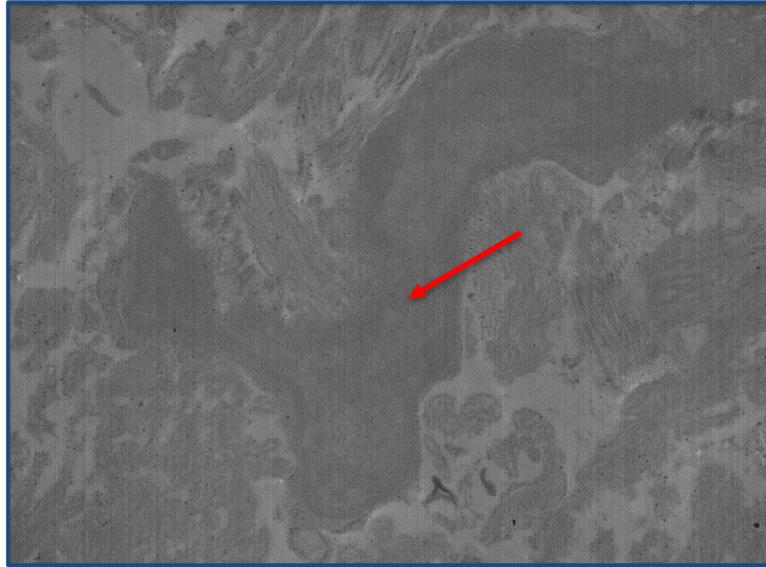


Figura 44. Microfotografía de un carcinoma de mama, empleando la técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión. Aumento 3500X.

En la figura 44 se observó una célula con un núcleo sumamente irregular (flecha), característica esperable en una célula neoplásica.

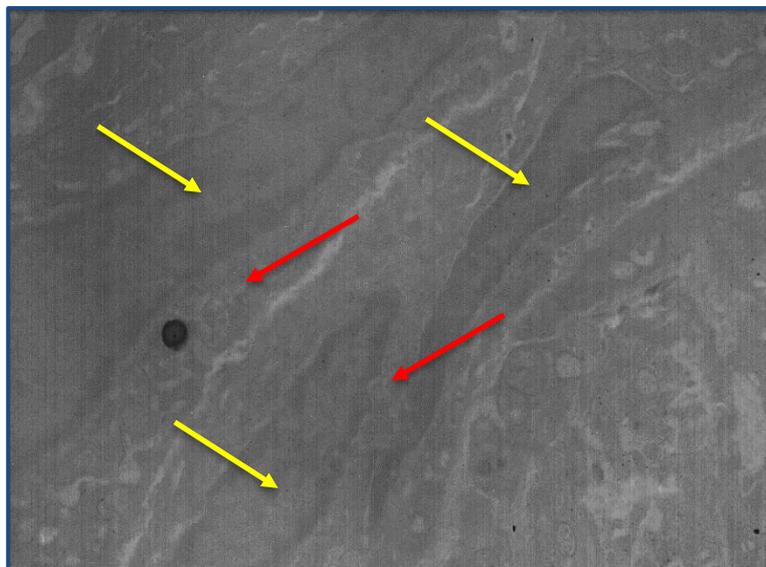


Figura 45. Microfotografía de un carcinoma de mama, empleando la técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión. Aumento 3000X.

En la figura 45 se observaron 3 núcleos de células (flechas amarillas) los cuales eran alargados e irregulares, además, el citoplasma de las células (flechas rojas).

4.2.2 Caso F1, Luminal B

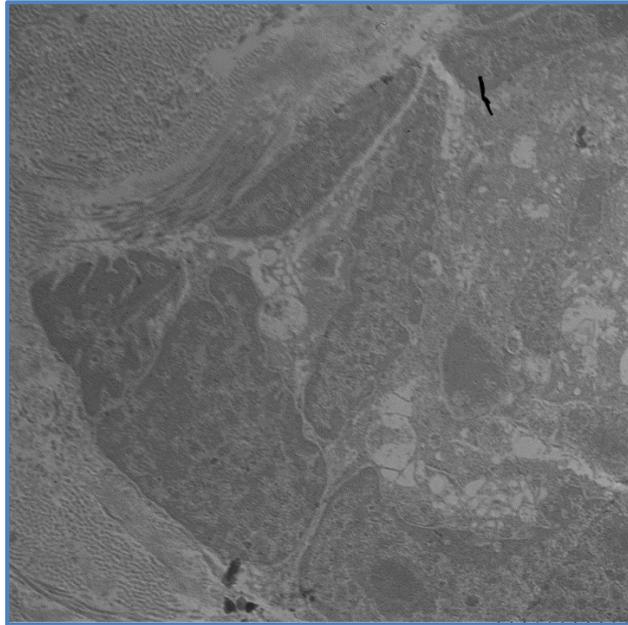


Figura 46. Microfotografía de un carcinoma de mama, empleando la técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión. Aumento 3000X.

En la figura 46 se identificó un grupo de células que presentaban pleomorfismo nuclear y un citoplasma escaso.

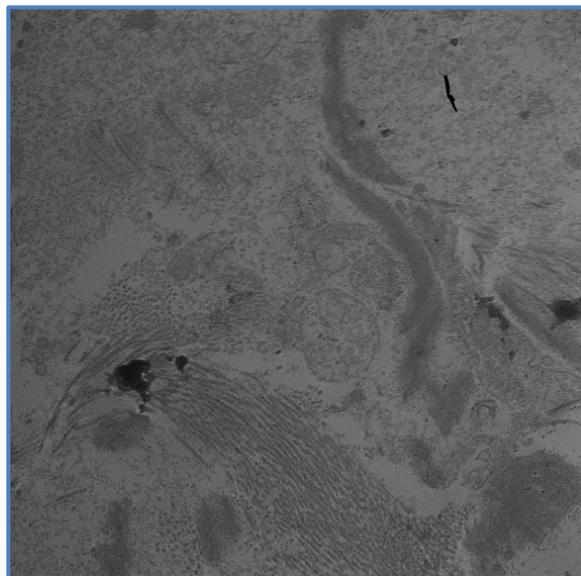


Figura 47. Microfotografía de un carcinoma de mama, empleando la técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión. Aumento 3000X.

En la figura 47 se observó miofibrillas en corte horizontal y transversal. Además, se identificó una zona sin celularidad.

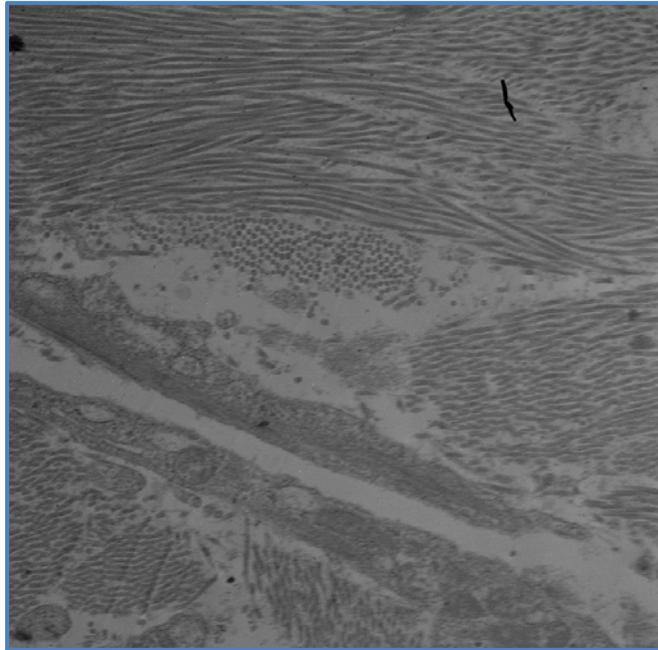


Figura 48. Microfotografía de un carcinoma de mama, empleando la técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión. Aumento 4000X.

En la figura 48 se identificaron miofibrillas dispuestas en corte horizontal y transversal. No se identificaron células.

4.2.3 Caso G2, Luminal B



Figura 49. Microfotografía de un carcinoma de mama, empleando la técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión. Aumento 2000X.

En la figura 49 se observó ultraestructuralmente un fibroblasto con un núcleo alargado (véase la flecha), rodeado de citoplasma y sin membrana basal. También había abundantes fibras de colágeno alrededor con cortes transversales y horizontales.



Figura 50. Microfotografía de un carcinoma de mama, empleando la técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión. Aumento 3000X.

En la figura 50 se observó una célula neoplásica con un núcleo irregular con varias invaginaciones (flecha), que estaba rodeado de citoplasma y sin membrana basal.

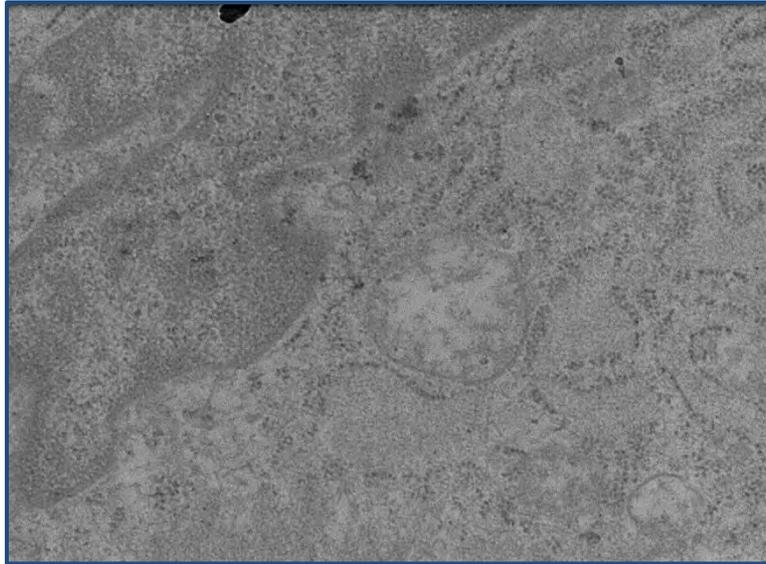


Figura 51. Microfotografía de un carcinoma de mama, empleando la técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión. Aumento 9000X.

En la figura 51 con mayor magnificación de la fotografía anterior, se detalló una estructura que se sugiere era un ribosoma con retículos endoplasmáticos a su alrededor.

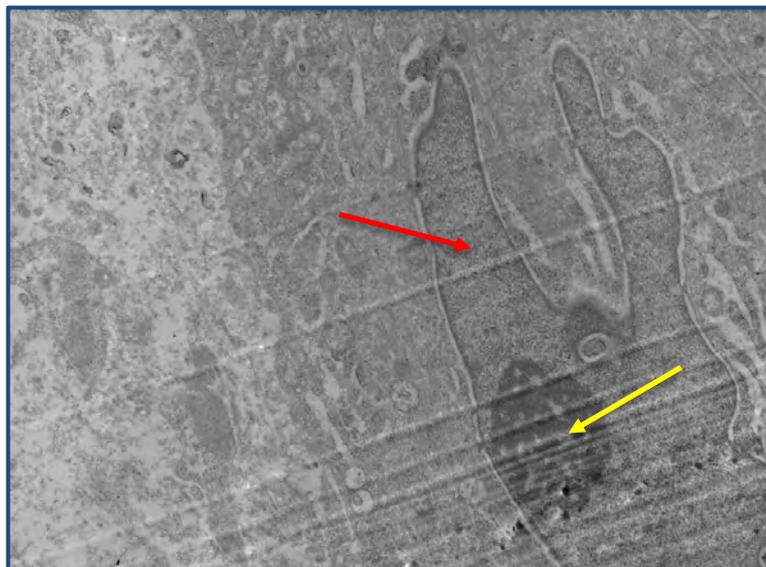


Figura 52. Microfotografía de un carcinoma de mama, empleando la técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión. Aumento 3000X.

En la figura 52 se observó una célula neoplásica con borde celular, su núcleo era irregular (flecha roja) y se logró apreciar el nucléolo (flecha amarilla)

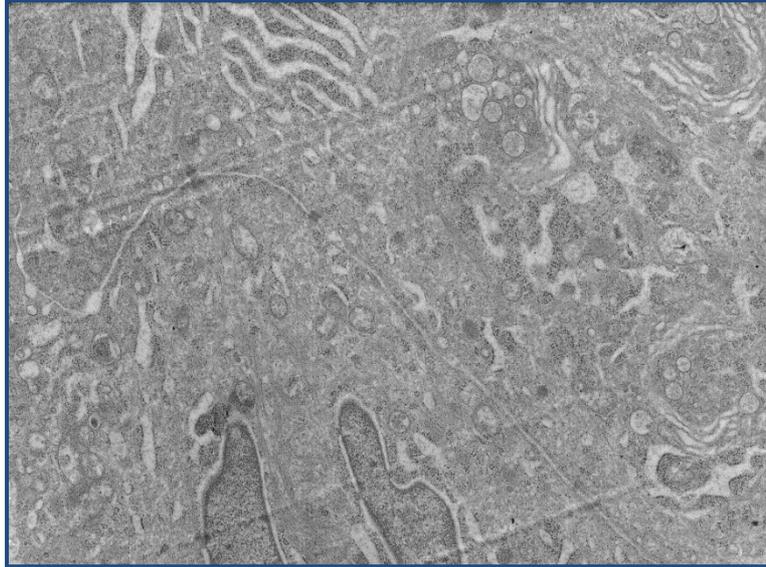


Figura 53. Microfotografía de un carcinoma de mama, empleando la técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión. Aumento 3000X.

En la figura 53 con una mayor magnificación de la fotografía anterior, se apreció con detalle el borde celular.

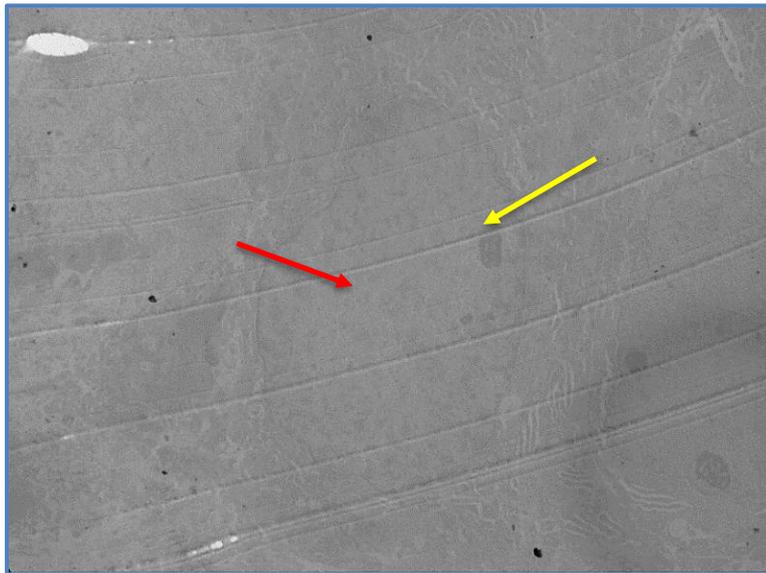


Figura 54. Microfotografía de un carcinoma de mama, empleando la técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión. Aumento 1000X.

En la figura 54 se observó una célula neoplásica que presentaba un núcleo gigante (flecha roja) y un nucléolo (flecha amarilla). La célula vecina cumplía características similares, se apreciaron 2 nucléolos.

4.2.4 Caso H1, Luminal B

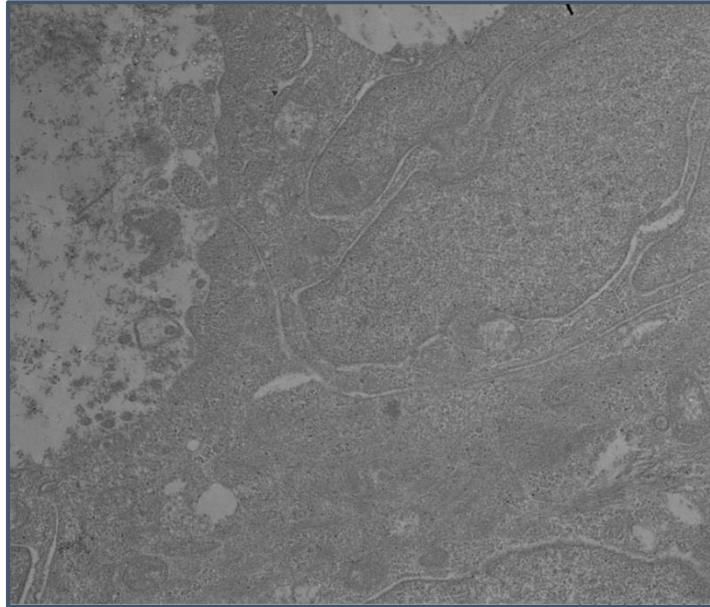


Figura 55. Microfotografía de un carcinoma de mama, empleando la técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión. Aumento 3000X.

En la figura 55 se observaron varias células que podrían ser fibroblastos por su apariencia alargada con borde celular, se logró apreciar el nucléolo. El citoplasma era escaso.

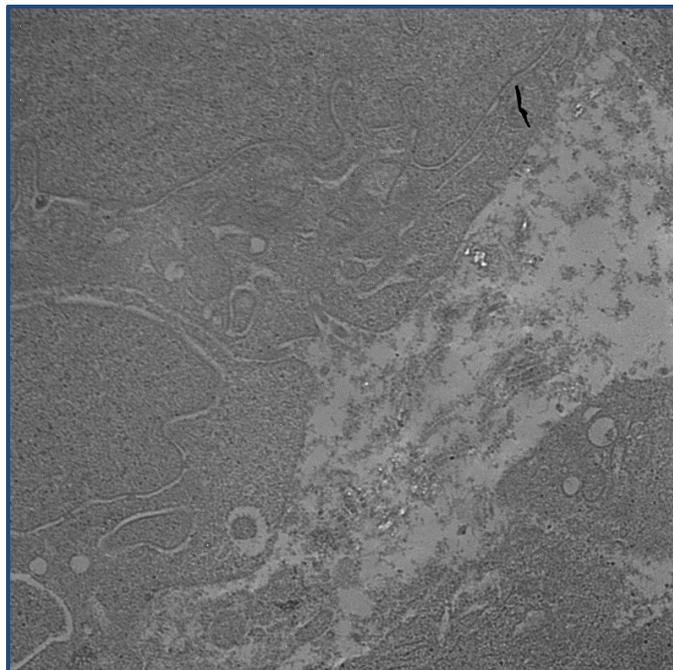


Figura 56. Microfotografía de un carcinoma de mama, empleando la técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión. Aumento 3000X.

En la figura 56 se observó una célula neoplásica con borde celular acompañada de múltiples estructuras difíciles de identificar.

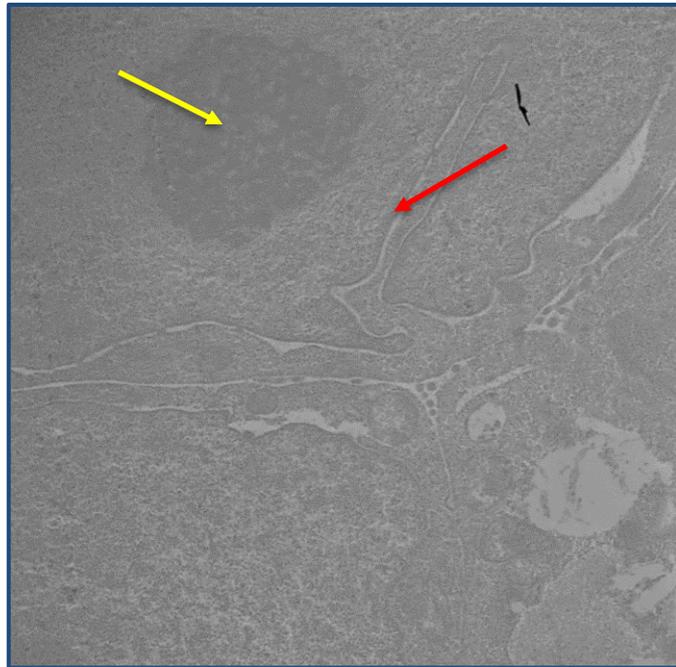


Figura 57. Microfotografía un carcinoma de mama, empleando la técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión. Aumento 3000X.

En la figura 57 se observó una célula neoplásica con borde celular, su núcleo era irregular (flecha roja) y se logró apreciar el nucléolo (flecha amarilla),

4.3 Análisis de resultados

4.3.1 Descripción de los hallazgos inmunohistoquímicos y los patrones ultraestructurales

Para determinar el subtipo histológico se deben evaluar las principales características recopiladas en el instrumento de recolección de información. No siempre es sencillo porque la heterogeneidad del carcinoma mamario requiere un cuidadoso estudio de los biomarcadores, no siempre se puede explicar solamente por parámetros clínicos y anatomopatológicos clásicos como el grado, tamaño tumoral e invasión ganglionar o linfovascular entre otros, debido a los comportamientos biológicos distintos en tumores semejantes (11, 23), como fue el caso en esta investigación. Estos parámetros se representan en el siguiente orden: en primer lugar, el receptor HER2/neu, seguido del índice de proliferación (Ki-67), y finalmente los receptores hormonales.

Con respecto al primer anticuerpo HER2/neu (marcador de membrana) después de la visualización, los principales resultados se muestran en el cuadro 9.

Cuadro 9. Resultados inmunohistoquímicos del biomarcador HER2/neu.

N° caso	HER2	0 Negativo	1+ Negativo	2+ Indeterminado	3+ Positivo
C1				X	
F1			X		
G2					X
H1		X			

Fuente: Elaboración propia, 2022.

Morfológicamente al establecerse comparaciones entre los 4 casos de HER2/neu, se identificaron los siguientes hallazgos:

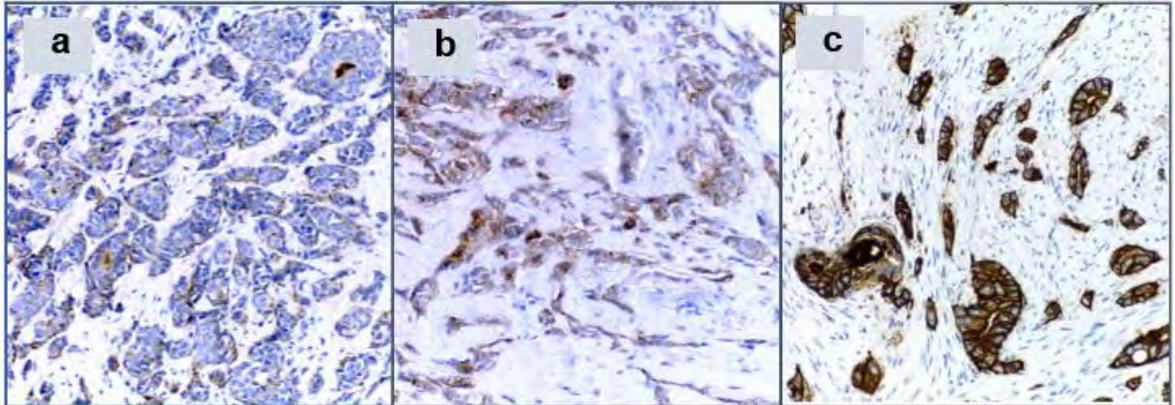


Figura 58. Microfotografías de cortes histológico de glándula mamaria, procesados por la técnica de IHQ de los subtipos Luminales B. HER2/neu. (58a caso H1, 58b caso F1 y 58c caso G2). Aumento 20X.

La reacción del anticuerpo HER2/neu (figura 58) para estos casos de carcinomas de mama del subtipo luminal B pueden presentarse como negativo (0), (figura 58a), donde se observó una tinción de membrana débil e incompleta en las células neoplásicas en aproximadamente en el 10%. En la figura 58b, había una tinción completa de membrana débil en más del 10 % de las células tumorales (1+), ambas eran negativas para este marcador. En la figura 58c, el tumor mostró una tinción membranosa circunferencial completa e intensa en más del 10 % de las células tumorales, por lo tanto, era positiva (3+).

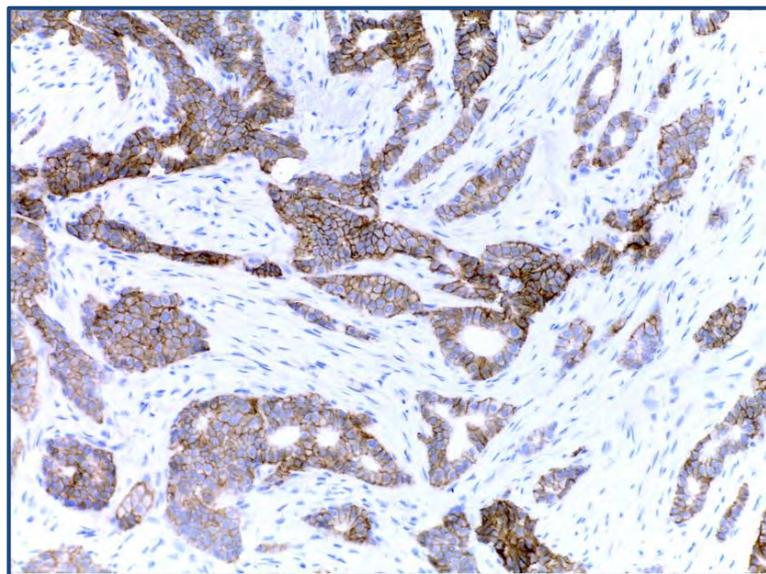


Figura 59. Microfotografía de un corte histológico de glándula mamaria del caso C1, procesado por la técnica de IHQ del subtipo Luminal A. HER2/neu. Aumento 20X.

En la figura 59 el anticuerpo empleado tiñó las membranas celulares de las células neoplásicas con un nivel de intensidad intermedio (2+) en el 95% de las células. Este anticuerpo no fue determinante para subclasificar los luminales de tipo A y B, por esta razón requirió el empleo de otra técnica diagnóstica como el FISH. Para el caso C1, no se detectó amplificación del gen HER2, por lo tanto, es un Luminal A.

En los casos de la proteína Ki-67 que mide la proliferación celular tumoral, se establece un porcentaje para diferenciar entre Luminal A y Luminal B. No se ha conseguido establecer un punto de corte óptimo, algunos estudios sugieren un parámetro del 14% de proliferación Bajo (<14%) o Alto (>14%), sin embargo, esta clasificación está abierta a posibilidades de mejora y estandarización porque se basa en los nuevos descubrimientos (23). Para efectos de esta investigación se acepta el valor del 20% (cuadro 10), tomando en consideración el Consenso de la 14.^a Conferencia Internacional sobre el cáncer de mama de St. Gallen de 2015 (70).

Cuadro 10. Resultados de las pruebas inmunohistoquímicas sobre el índice de proliferación y de los receptores hormonales.

Caso Subtipo	Índice de proliferación (Ki-67)	Receptor de Estrógenos (RE)	Receptor de Progesterona (RP)
C1 Luminal A	Bajo 10%	100%	100%
F1 Luminal B	20%	100%	80%
G2 Luminal B	Bajo 10%	90%	Negativo
H1 Luminal B	Alto 90%	95%	95%

Fuente: Elaboración propia, 2022.

Llamó la atención el caso G2 porque el porcentaje no era lo suficientemente determinante para indicar el subtipo, por lo que se requirió la evaluación de los demás biomarcadores para clasificarlo como Luminal B. En

este caso se evaluó el Receptor HER2/neu (cuadro 9), el cual es fuertemente positivo.

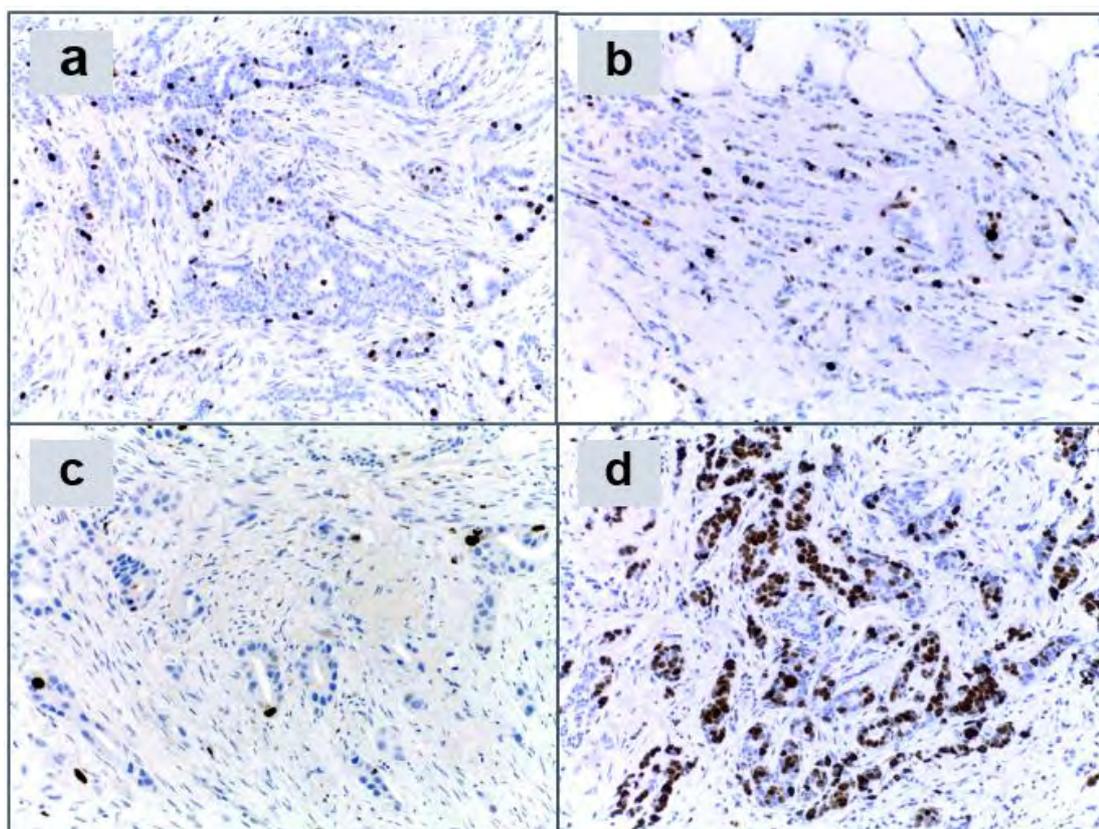


Figura 60. Microfotografías de cortes histológicos de glándula mamaria de biopsias por aguja gruesa (*trucut*), procesados por la técnica de IHQ de los subtipos luminales. Ki-67. (60a caso C1, 60b caso F1, 60c caso G2 y 60d caso H1). Aumento 20X.

Las figuras 60a, 60b y 60c presentaron un índice de proliferación bajo comparado con la tinción nuclear para Ki-67 del tumor presente en la figura 60d que tenía un alto índice de proliferación nuclear.

En el caso C1 para que sea Luminal A, debe ser positivo para ambos receptores hormonales o que el RP mayor o igual que el 20%, negativo para HER2/neu y un Ki-67 menor o igual al 20% (11). Todos estos criterios se cumplieron a cabalidad.

Para los criterios de clasificación para el subtipo Luminal B, los receptores de estrógeno deben ser positivos, en los 3 casos se aplica, para los receptores de progesterona pueden ser positivos (Caso F1 y H1), o negativos como el caso G2 que es negativo en el 100%. Con respecto al Ki-

67 el índice de proliferación debe ser mayor del 20%, esto aplica para el caso H1, en el F1 apenas se cumple y el caso G2 no cumple los criterios. Esto se puede explicar por la heterogeneidad de los tumores y la imperiosa necesidad de complementarlo con otras técnicas para un diagnóstico más acertado.

Histológicamente los receptores de estrógenos (RE) de los 4 casos se describen en la figura 61.

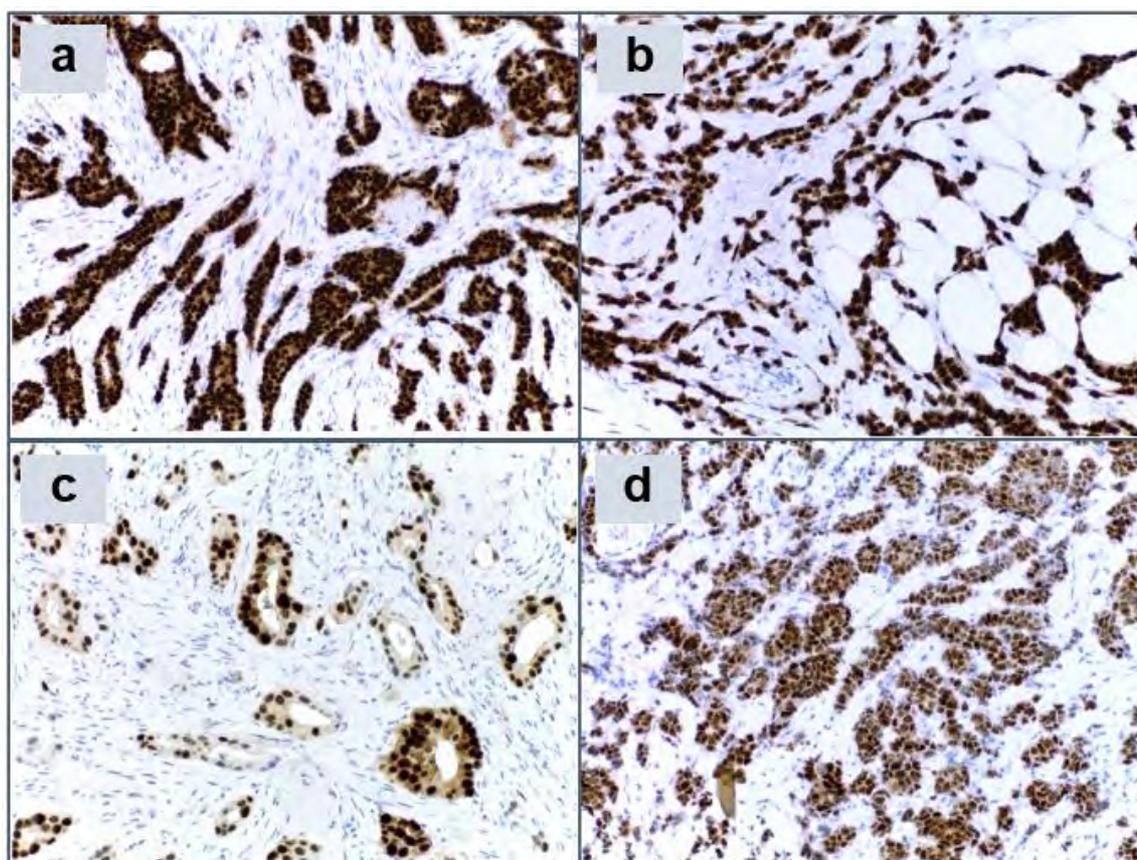


Figura 61. Microfotografías de cortes histológicos de glándula mamaria de biopsias por aguja gruesa (*trucut*), procesados por la técnica de IHQ de los subtipos luminales. RE. (61a caso C1, 61b caso F1, 61c caso G2 y 61d caso H1). Aumento 20X.

Los cuatro tumores presentaron una expresión alta de receptores de estrógenos (RE), que se mostró con la inmunotinción nuclear en las células neoplásicas. En las figuras 61a y 61d, el tumor formó trabéculas y nidos. En la figura 61b, se observó infiltración de las células tumorales en el tejido adiposo formando filas y trabéculas. En la figura 61c, se apreció la formación de túbulos irregulares.

Histológicamente los receptores de progesterona (RP) de los 4 casos

se describen en la figura 62.

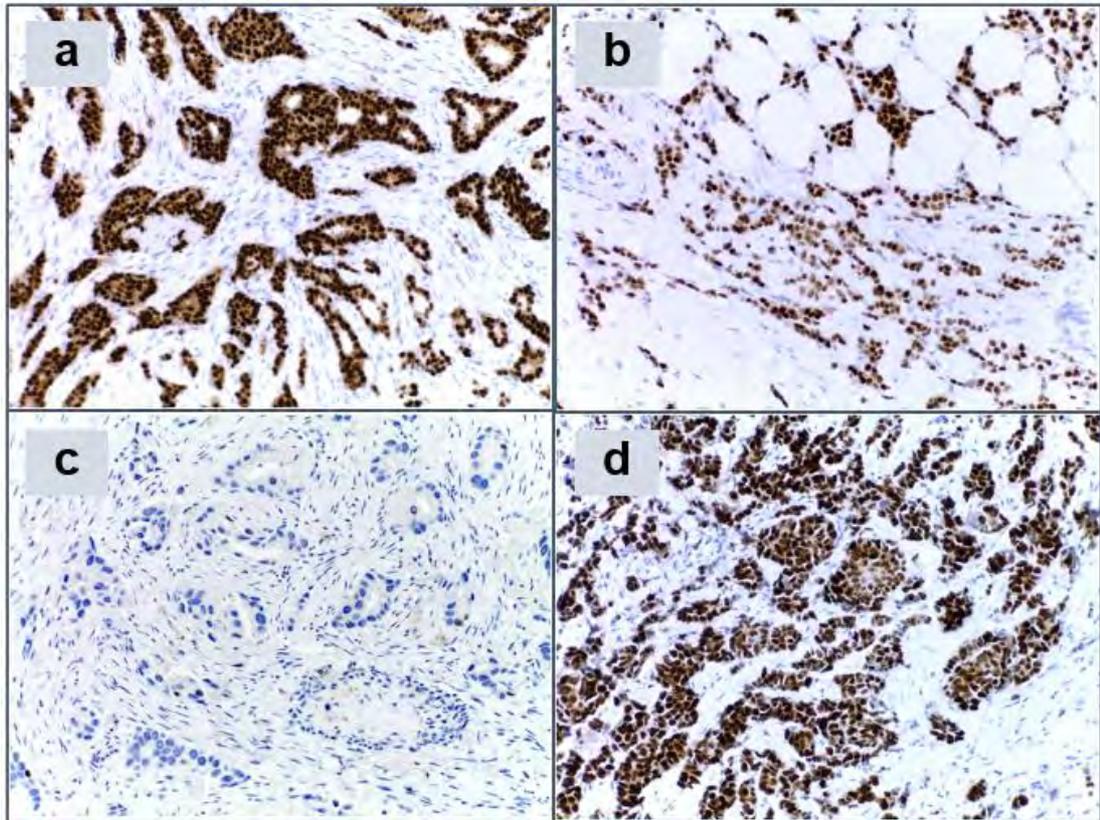


Figura 62. Microfotografías de cortes histológicos de glándula mamaria de biopsias por aguja gruesa (*trucut*), procesados por la técnica de IHQ de los subtipos luminales. RP. (62a caso C1, 62b caso F1, 62c caso G2 y 62d caso H1). Aumento 20X.

En figura 62a, 62b y 62d las células neoplásicas tenían una alta expresión del receptor de progesterona con núcleos que se tiñeron color marrón, en cambio en la figura 60c, no hubo expresión para este marcador nuclear.

A continuación, se detalla una comparación de los hallazgos encontrados en los 4 casos analizados en forma paralela entre IHQ y MET.

4.3.1.1 Caso C1, Luminal A

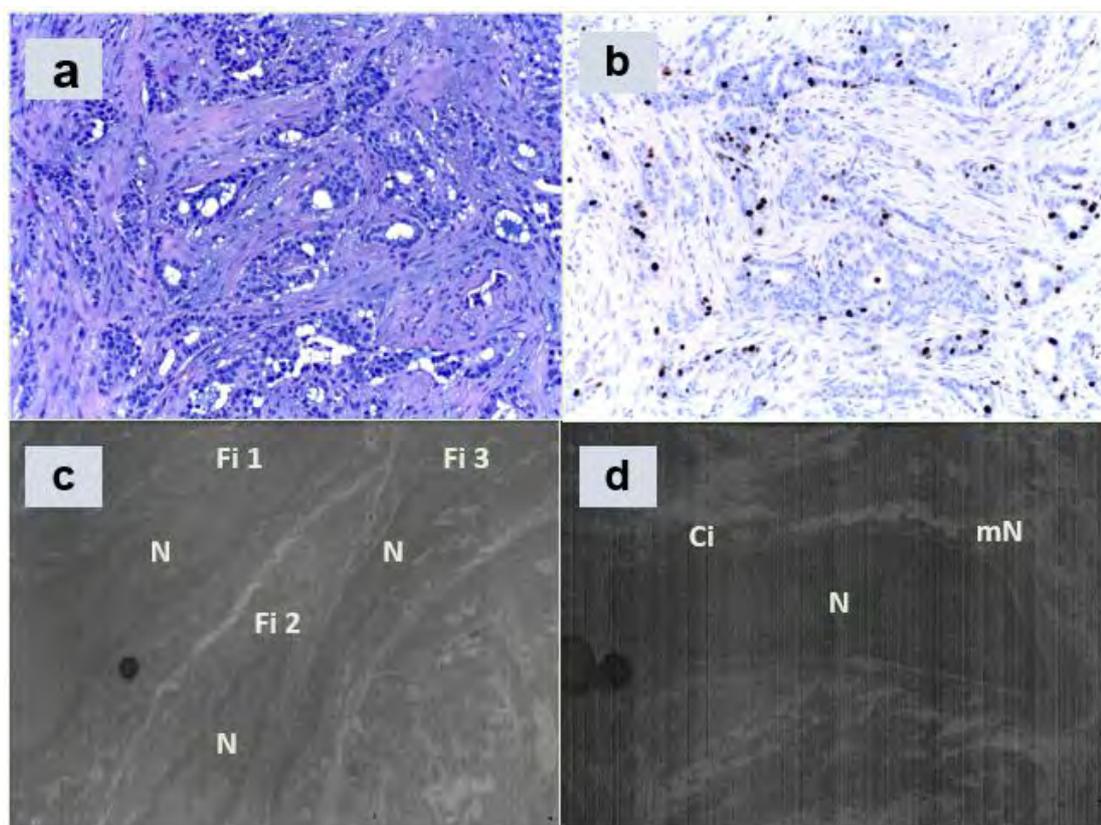


Figura 63. Microfotografías de cortes histológicos y ultraestructurales de un carcinoma mamario procesados por las técnicas de IHQ (63a y 63b, aumento 20X) y MET (63c y 63d a 3000X). Fi: fibroblasto, N: núcleo, Ci: citoplasma, mN: membrana nuclear.

Las células principales en este tumor fueron los fibroblastos (Fi) de núcleos alargados presentes en el estroma y las células epiteliales glandulares (figura 63). La imagen de H&E (63a) mostró un aumento en el número de fibroblastos en un estroma desmoplásico de tejido conjuntivo.

En la tinción inmunohistoquímica de Ki-67 (63b) se apreciaban las células epiteliales cuyos núcleos eran en su mayoría redondos, con pleomorfismo leve y rodeados de escaso citoplasma (20X). La imagen (63c) presentaba una magnificación de los fibroblastos, se observaron 3 núcleos (N) alargados e irregulares que estaban rodeados de citoplasma y separados por la interfase. La célula en (63d) se asemejaba a las células epiteliales por su forma ovalada, una membrana nuclear (mN) y su escaso citoplasma (Ci).

4.3.1.2 Caso F1, Luminal B

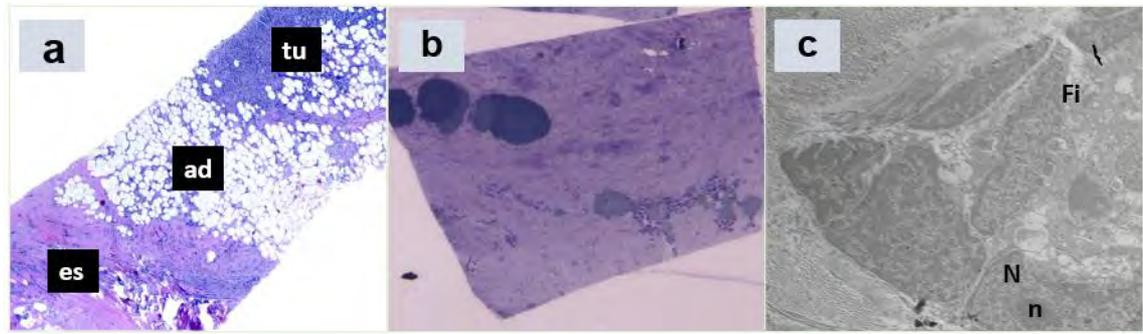


Figura 64. Microfotografías de cortes histológicos y ultraestructurales de un carcinoma mamario procesados por las técnicas de IHQ (64a y 64b, aumento 40X), y MET (64c, aumento 3000X. Fi: fibroblasto, N: núcleo, n: nucléolo.

En la figura 64 se evidenciaba que el cilindro (64a) tenía una zona estromal (es), una zona de tejido adiposo (ad) y una tercera de tejido tumoral (tu) infiltrando al tejido adiposo. En el corte semifino (64b) se observó tejido adiposo y celularidad concordante con el cilindro de tejido en tinción de H&E.

La MET (64c) mostraba muchas miofibrillas. Una célula con un núcleo (N) y un nucléolo (n) y además de otra célula alargada que sugirió ser un fibroblasto (Fi) con cromatina (cr) hacia la parte externa.

4.3.1.3 Caso G2, Luminal B

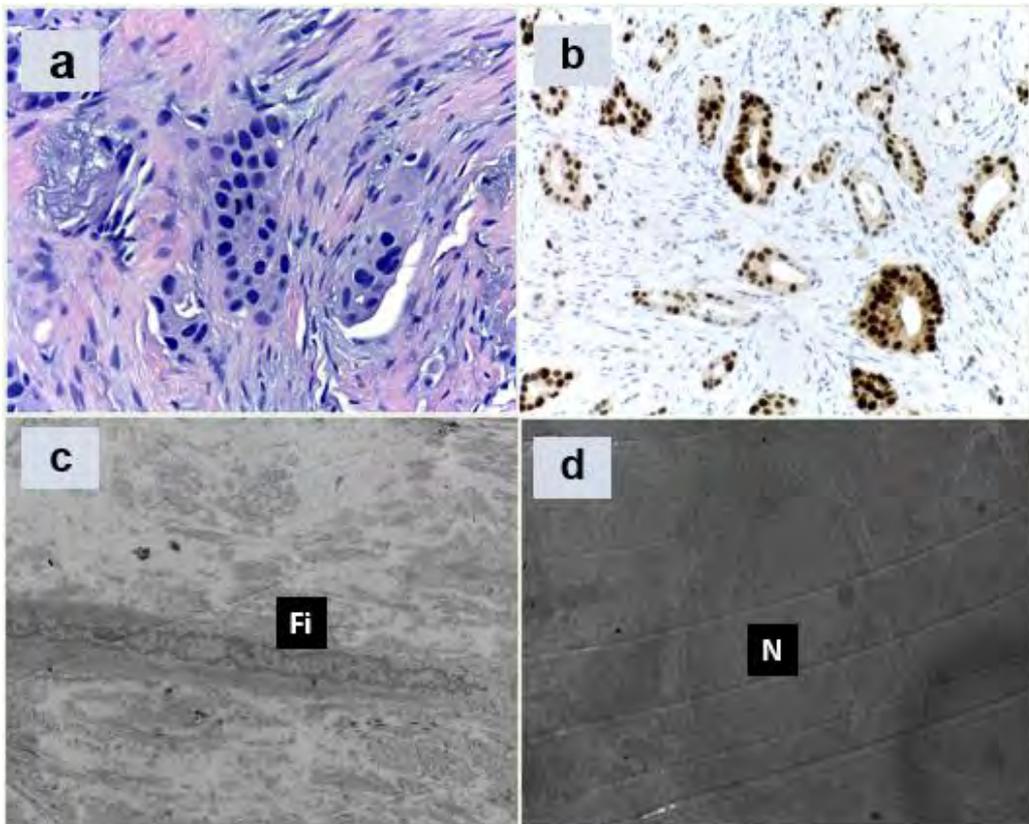


Figura 65. Microfotografías de cortes histológicos y ultraestructurales de un carcinoma mamario procesados por las técnicas de IHQ (65a, aumento 40X y 65b a 20X) y MET (65c, aumento 2000X y 65d a 1000X).

En la microfotografía de la figura 65a se evidenció tejido compuesto por células neoplásicas que presentó núcleos redondos y un estroma denso desmoplásico con células alargadas. El receptor de estrógenos en (65b) realzó la morfología de las glándulas neoplásicas las cuales insinuaron unos lúmenes, había mucha distancia entre una glándula y otra.

En las imágenes (65c) y (65d) se lograba comparar la forma nuclear de los dos tipos celulares presentes en el carcinoma de mama: los fibroblastos (Fi) se caracterizaron por su forma alargada, mientras que las células tumorales eran redondas como se apreció en el núcleo (N).

4.3.1.4 Caso H1, Luminal B

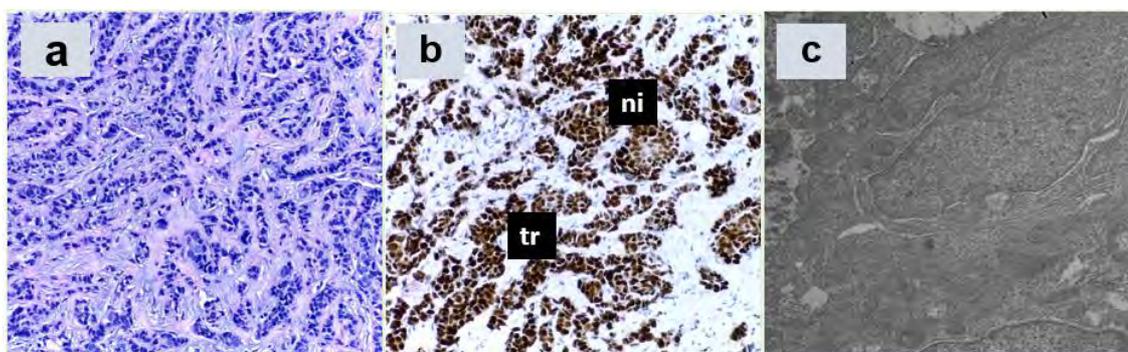


Figura 66. Microfotografías de cortes histológicos y ultraestructurales de un carcinoma mamario procesados por las técnicas de IHQ. (66a y 66b, aumento 20X) y MET (66c, aumento 3000X). ni: nidos, tr: trabéculas.

En la figura 66 había un tumor sin formación de glándulas, la tinción de H&E (66a) y la del receptor de progesterona (RP) (66b) mostraron un patrón morfológico compuesto por abundante tejido epitelial en nidos (ni) y trabéculas (tr) y poco estroma. Estas características fueron las mismas en la imagen de MET (66c) donde se evidenció el escaso tejido estromal entre célula y célula, poca desmoplasia y baja relación núcleo - citoplasma.

La tecnología del microscopio permite medir estructuras de interés como por ejemplo núcleos, nucléolos y gránulos. Esto permitió hacer una comparación de los tamaños de microestructuras entre los subtipos Luminal A (C1) y Luminal B (G2).

Cuadro 11. Comparación de las mediciones de las distintas microestructuras presentes en los subtipos luminal A (C1) y luminal B (G2) obtenidas de las fotografías de MET.

C1		G2		
Núcleo	Nucléolo	Núcleo	Nucléolo	Núcleo del fibroblasto
7570 nm	7440 nm	10000 nm	1020 nm	9150 nm
9040 nm	7600 nm	13200 nm	1570 nm	
	9370 nm	16900 nm	1770 nm	
	10300 nm		1880 nm	

Fuente: Elaboración propia, 2022.

Al comparar los datos generados se puede concluir que los núcleos de las células epiteliales neoplásicas de CM de tipo Luminal A cuyo promedio (\bar{X}) es de 8305 nm, eran más pequeños que los del Luminal B. Tenían un \bar{X} de 13366,6 nm. La diferencia entre estos promedios sería de 5061,6 nm. En el caso de los fibroblastos se determinó que igualmente eran más pequeños los de la muestra del subtipo Luminal A (\bar{X} =8677 nm) en comparación con los del Luminal B (\bar{X} =9150 nm), pero este resultado no es confiable ya que del caso G2 solo se logró medir un fibroblasto y la muestra C1 tiene 2 con medidas aún mayores.

No fue posible comparar los nucléolos ya que por problemas de contraste no se pudieron observar en la muestra C1, sin embargo, la media del tamaño de estos en la muestra G2 fue de 1560 nm.

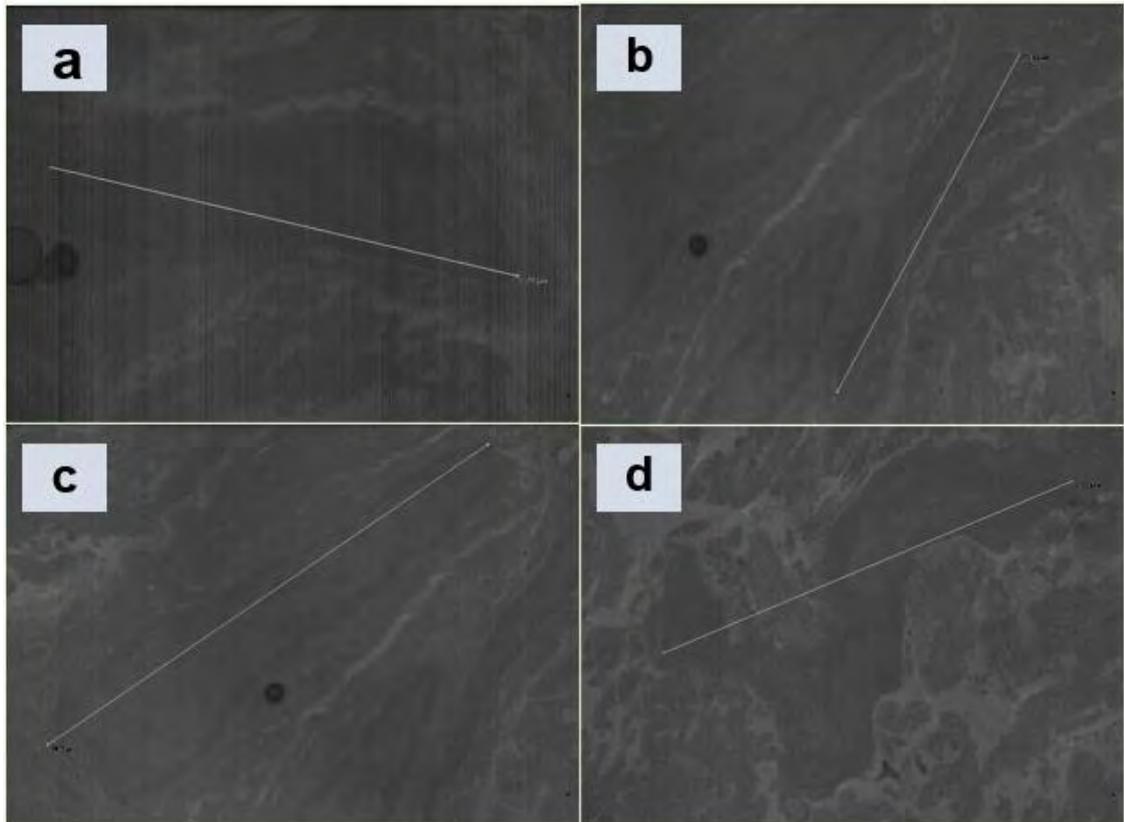


Figura 67. Microfotografías del caso C1, bloque C en un carcinoma mamario del subtipo Luminal A, empleando la técnica de MET. Imágenes tomadas a 3000X (67a), (67b), (67c) y a 3500X la (67d).

Se detallaron las mediciones de las distintas estructuras celulares. Las microfotografías (67a), (67b) y (67c) a una magnificación de 3000X mostraron núcleos alargados de distintos tamaños que iban desde 7440 nm hasta los 1030 nm. En (67d) a una magnificación de 3500X se detalló el núcleo de un fibroblasto. Todos los núcleos eran alargados e irregulares rodeados de citoplasma y en el caso de (67b) y (67c) estaban separados por la interfase de sus células vecinas. La célula en (67a) se asemejaba a las células epiteliales por su forma ovalada y su escaso citoplasma (3000X).

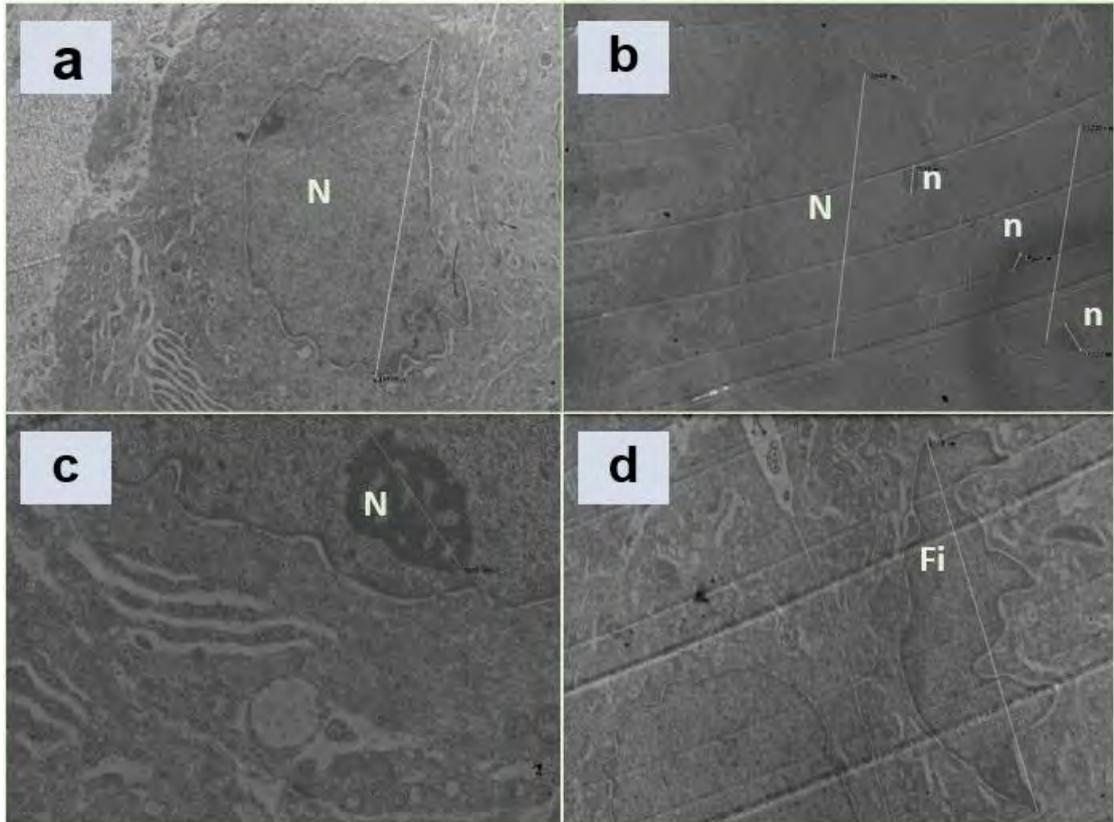


Figura 68. Microfotografía del caso G2, bloque A en un carcinoma mamario del subtipo Luminal B. empleando la técnica de MET. Imágenes tomadas a 2000X (68a), 1000X (68b), 5000X (68c) y a 2500X (68d).

En la figura (68a) se apreció una célula epitelial neoplásica cuyo núcleo (N) medía 10000 nm. En la fotografía (68b) había dos células; la de la izquierda tenía un núcleo que medía 16900 nm y un nucléolo (n) de 1570 nm. El núcleo de la célula de la derecha midió 13200 nm y presentó 2 nucléolos, uno de 1020 nm y otro más grande de 1770 nm. En (68c) se detalló un nucléolo que midió 1880 nm, este correspondió a una célula epitelial maligna. En la imagen (68d) se visualizó un fibroblasto (Fi) con un núcleo alargado e irregular. Esta característica lo diferencia de las células epiteliales neoplásicas.

4.3.2 Otros hallazgos

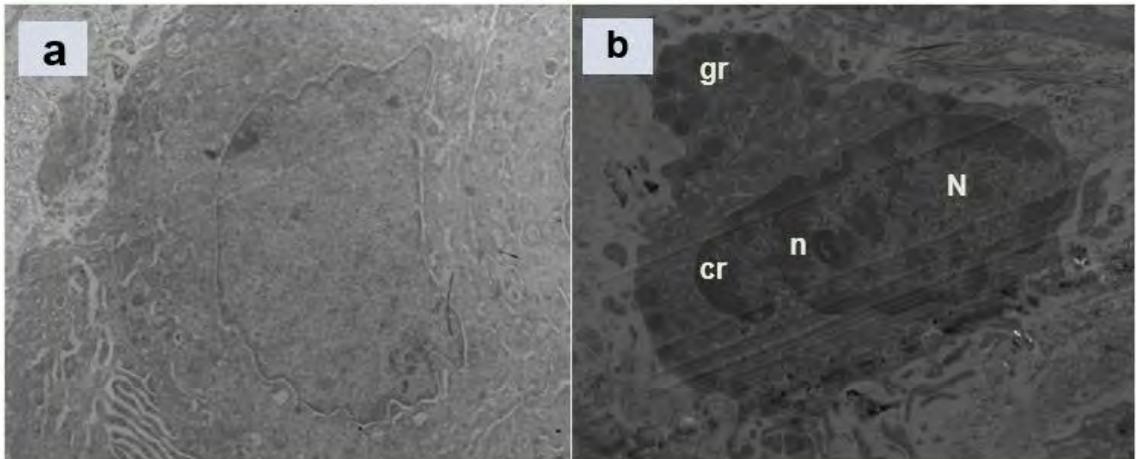


Figura 69. Imágenes de MET. Diferencias entre una célula epitelial (69a) y célula inflamatoria (69b. gr: gránulos, n: nucléolo, N: núcleo, cr: cromatina).

Las características que permiten diferenciar entre una célula epitelial (Figura 69a) y una célula inflamatoria o mastocito (Figura 69b) se pueden determinar por la presencia de los gránulos (gr). En el mastocito el núcleo (N) era ovalado, su cromatina (cr) se dispersaba hacia la periferia y se le observó un pequeño nucléolo (n).

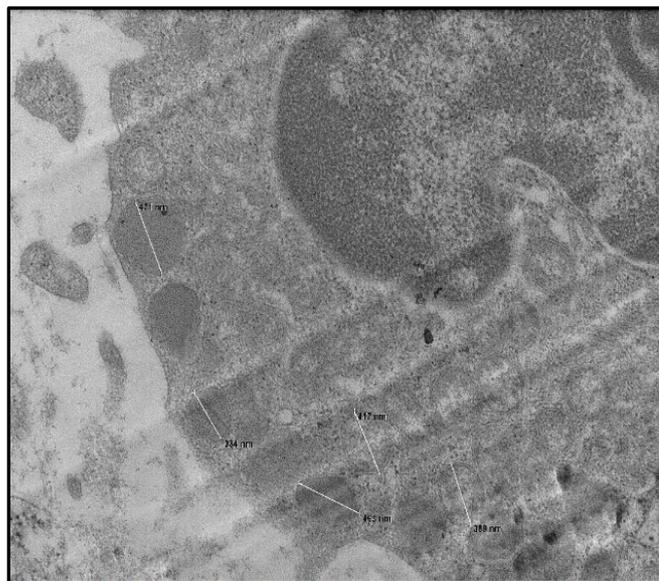


Figura 70. Mediciones de los gránulos de una célula inflamatoria. Imagen obtenida por MET. Mastocito a 7000X.

A mayor detalle se logró realizar la medición de los gránulos del mastocito, los cuales presentaron los siguientes valores: 471 nm, 334 nm, 417 nm, 463 nm, 389 nm, generando una media de: 414 nm.

4.3.3 Artefactos

Durante el procesamiento, se pueden presentar varios factores que afectan el corte ultrafino. Más allá de la experiencia de la persona técnica durante la microtomía, estos son algunos de los factores que provocaron artefactos en las muestras estudiadas: el glutaraldehído reacciona muy poco con los lípidos, la deshidratación, el tamaño y el tallado de la superficie de corte, la calidad de la cuchilla, su ángulo de inclinación y la velocidad del corte entre otros (69). En la figura 71 se detallan los principales artefactos presentes en las muestras analizadas.

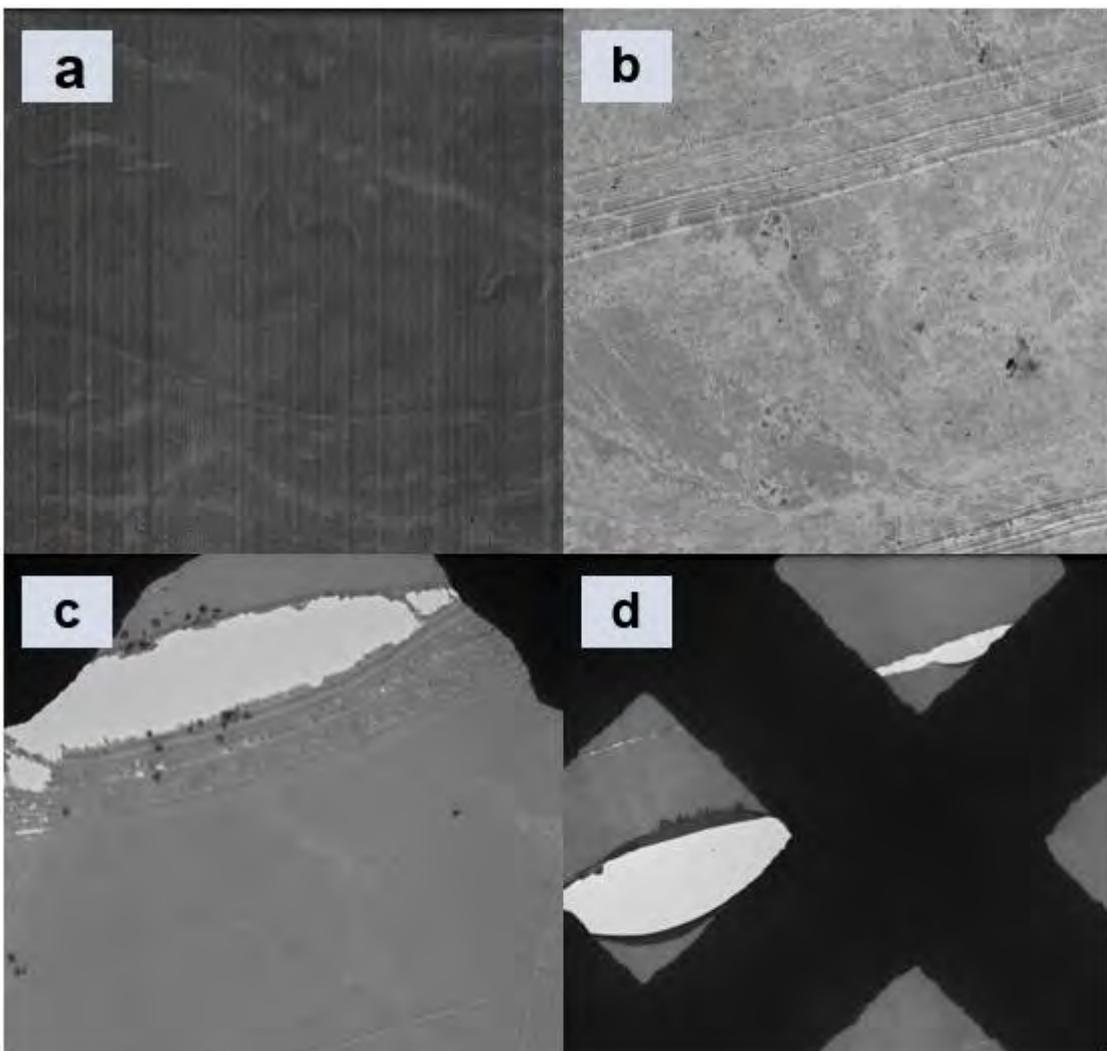


Figura 71. Artefactos presentes en los cortes ultrafinos de MET. (71a: vibración de las secciones). (71b: marcas de la cuchilla en la imagen). (71c: formación deficiente de la cinta). (71d: rasgado de la muestra y formación de pliegue).

Los hallazgos inmunohistoquímicos, ultraestructurales y el apartado de artefactos, que se describieron anteriormente, son el resultado de la sinergia entre los sustentantes, el equipo asesor, el CIEMic y el Hospital Dr. Maximiliano Peralta Jiménez, lo que demostró que la suma de las acciones individuales llevó a superar las distintas situaciones e imprevistos que se detallan en el siguiente apartado y que se presentaron durante los últimos cinco años que llevó la elaboración de este proyecto.

4.4 Limitaciones de la investigación

Cuando se plantea el proyecto a mitad del 2017 se decidió incluir muestras de los 4 subtipos de CM, pero en el tiempo de reclutamiento de casos que comprendió entre el 25 de abril al 20 de agosto del 2021, no se recibieron tejidos que presentaran los subtipos HER2/neu positivo ni los Triple negativo, por lo tanto, se delimitó la investigación a trabajar solo biopsias de tejido mamario con los 2 subtipos más frecuentes. Algunas de las razones por las cuales no se registraron casos de los subtipos mencionados fue debido a que por la pandemia del SARS-CoV-2, la CCSS tuvo que enfocarse en atender la emergencia sanitaria, disminuyendo la cantidad de atenciones en servicios como Gineoncología y Rayos X, muchas pacientes no asistieron al centro hospitalario a realizarse la toma de biopsia y la implementación del teletrabajo disminuyó la disponibilidad de los especialistas colaboradores para realizar los procedimientos, dichos motivos limitaron la inclusión de más muestras en el estudio.

Localizar campos de interés en MET es una tarea laboriosa ya que, aunque en los cortes semifinos se identifiquen estructuras para amplificar como las células neoplásicas, al visualizar las muestras a magnificaciones tan potentes como las de la microscopía electrónica, estas pueden ser difíciles de hallar. Además, que gran parte de la muestra no puede visualizarse por la sobreposición de las rejillas (ver imagen d, figura 71) que brindan el sostén al tejido dentro del microscopio.

La cantidad de casos fue acorde a los recursos económicos disponibles para la realización del TFG. Además, la cantidad de tiempo de

procesamiento y las horas necesarias para la visualización de imágenes generaban que los tiempos establecidos en el cronograma se prolongaran más allá del disponible para la elaboración del proyecto.

La cantidad de fotografías se vieron limitadas por el tiempo al que se tuvo acceso al microscopio.

Para inicios del año 2022 el equipo asesor consideró la posibilidad de aumentar la cantidad de casos ya que la incidencia y mortalidad de Covid-19 habían disminuido lo suficiente como para que los servicios hospitalarios volvieran a funcionar con regularidad, pero a finales del mes de mayo los sistemas informáticos de la CCSS se vieron afectados por un “hackeo” que impidió el acceso a la información hasta finales de agosto. Para ese momento los sustentantes se encontraban cursando el III semestre de elaboración del TFG que, según el reglamento, es el último disponible para su finalización.

Capítulo V. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

La investigación realizada hizo la descripción de los dos subtipos de carcinoma mamarios más frecuentes mediante las técnicas de IHQ y MET y se demostró que para la clasificación de neoplasias de la glándula mamaria, la inmunohistoquímica al revelar la presencia o ausencia de productos celulares in vitro con la utilización de distintos anticuerpos es la opción más rápida, económica y precisa, en comparación con la MET que no aportó para refinar el procedimiento diagnóstico.

Sin embargo, al describir mediante IHQ los dos subtipos de carcinomas mamarios más comunes de acuerdo con la expresión de los marcadores RE, RP, HER2/neu y el Ki-67 se concluyó que en algunos casos clasificar los carcinomas de mama entre luminales A y luminales B demanda de la prueba de FISH porque la morfología y la expresión de marcadores es muy similar entre estos subtipos.

Las ampliaciones que se alcanzan por medio de la MET ayudan a conocer mejor la ultraestructura celular y esto es de gran valor, como en el caso de los diagnósticos de enfermedades renales, para lo cual el CIEMic está aportando sus microscopios electrónicos en el marco de convenio de cooperación con el Hospital San Juan de Dios. Si bien estas ampliaciones en tejido tumoral no tienen una repercusión en el área diagnóstica, enriquecen grandemente el conocimiento morfológico y celular al pasar de una capacidad máxima de 100 aumentos en microscopía óptica a más de 3000 aumentos en los microscopios electrónicos.

Específicamente en microscopía electrónica de transmisión para obtener fotografías de las estructuras de interés, es muy importante la valoración de los cortes semifinos teñidos con azul de toluidina porque la visualización de los cortes ultrafinos puede ser muy complicada y demandar mucho tiempo en zonas de baja celularidad. Otro aspecto importante es contar con la experticia para reconocer estructuras a magnificaciones muy

altas ya que son muy distintas a las observadas en la microscopía óptica.

Los protocolos para IHQ y MET utilizados en este estudio demostraron muy buenos resultados a pesar de que el tejido de la glándula mamaria por sus componentes anatómicos suele ser difícil de procesar. Estos protocolos pueden ser utilizados en otras investigaciones que se interesen en analizar la ultraestructura y fisiología de células de tejido adiposo, fibroblastos y células tumorales.

Para los sustentantes esta experiencia investigativa fue muy enriquecedora porque con resiliencia y con el apoyo del equipo asesor se logró desarrollar una metodología aplicable a futuras investigaciones que deseen trabajar en morfología y fisiología en cáncer de mama. Que se hayan logrado estas imágenes en Costa Rica posiciona a los centros de investigación de la UCR a nivel internacional y promueve el trabajo interinstitucional.

5.2 Recomendaciones

El CM es un tema de interés público por su alta incidencia y mortalidad por lo que desarrollar investigación en oportunidades de mejora en el diagnóstico es muy importante. Para llevar a cabo esta tarea es necesario que estudiantes de grado y posgrado de distintas carreras universitarias muestren interés en aplicar sus conocimientos y trabajen en conjunto con profesionales en la salud de la CCSS y otros institutos de investigación. La necesidad de conocer mejor una enfermedad tan común requiere que estas acciones se desarrollen a corto plazo.

El tejido mamario al estar compuesto por tejido adiposo presenta dificultades para ajustarse a los protocolos de procesamiento junto con el resto de material biológico. Por lo tanto, variar los tiempos de fijación o añadir mecanismos químicos o físicos para ayudar a preservar estos tejidos es vinculante para los profesionales encargados de manipularlos. El protocolo empleado en este TFG puede replicarse en los demás hospitales de la CCSS para el diagnóstico de biopsias o por otros investigadores que decidan

trabajar con este tejido en sus investigaciones.

La metodología aplicada en el presente TFG tiene el potencial de ayudar a conocer mejor enfermedades raras como la enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry, enfermedad de Pompe, que si bien afectan a una parte minoritaria de la población se les debe dar una atención justa, digna y solidaria. Esta ampliación podría desarrollarse con recursos de la seguridad social y de los fondos universitarios para investigación.

Como recomendación para la CCSS y la UCR se puede plantear una ampliación del proyecto de diagnóstico de enfermedades renales del HSJD y el CIEMic. De igual manera incorporar la MET para el diagnóstico de patologías pediátricas como la enfermedad de inclusiones microvellositarias, pseudoobstrucción intestinal, enteropatía de penachos, glomerulopatías pediátricas, enfermedades metabólicas, hepáticas, entre otras.

La CCSS tiene la capacidad para desarrollar investigaciones que beneficien la salud de la población costarricense si construye puentes de comunicación con los distintos institutos de las universidades públicas. Para esto es necesario que se promueva la cultura del desarrollo de proyectos interinstitucionales para resolver problemas de salud pública. Los recursos gubernamentales aportados por la población deben utilizarse en mejorar y prolongar la vida de estos y puede llevarse a cabo a través de la inversión en investigación.

Referencias bibliográficas

1. Real Academia Española: Diccionario de la lengua española (23.^a ed.). Madrid, España. 2010.
2. Ministerio de Salud Pública. Boletín Estadístico de Incidencia de Tumores malignos más frecuentes en la población femenina en Costa Rica 2014. Unidad de Estadística, Registro Nacional de Tumores.
3. Sung H, Ferlay J, Siegel R. L, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN. Estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* 2021; 71(3), 209-249.
4. Zhao Y, Zhang J, Shi F, et al. Expression of PD-1 on CD4+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Tumor Microenvironment Associated with Pathological Characteristics of Breast Cancer. *Journal of Immunology Research*. 2018; 1–8.
5. Salinas Meza A. et al. Cáncer de mama triple negativo: generalidades, situación en Costa Rica y nuevas tendencias para su tratamiento. *Rev. Méd. de la UCR*. 2018;12(2):33-50.
6. De Lima Mota A, Evangelista A, Macedo T, et al. Molecular characterization of breast cancer cell lines by clinical immunohistochemical markers. *Oncology Letters*. 2017;13(6):4708-4712.
7. Quirós et al. Carcinomas invasores triples negativos de la glándula mamaria: incidencia y características clínico-patológicas. *Acta Méd. Costarric*. 2012; 52: 90-95.
8. WHO. IARC. The Global Cancer Observatory. [Internet] Summary statistic: *Europe* 2020. Incidence, Mortality and Prevalence by cancer site. March, 2021. Available from:

<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/908-europe-factsheets.pdf>

9. Prihantono P, Hatta M, Binekada C, et al. Ki-67 Expression by Immunohistochemistry and Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction as Predictor of Clinical Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Locally Advanced Breast Cancer. *Journal of Oncology*. 2017; 1(8).

10. Baeyens-Fernández JA, Molina-Portillo E, Pollán M, et al. Trends in incidence mortality and survival in women with breast cancer from 1985 to 2012 in Granada, Spain: a population-based study. *BMC Cancer*. 2018;18(1):1–14.

11. Alcaide M, Rodríguez CJ, de Reyes S, et al. Clasificación actual del cáncer de mama. Implicación en el tratamiento y pronóstico de la enfermedad. *Molecular classification of breast cancer. Treatment and prognosis implications*. *Cir Andal*. 2021; 32(2), 155-59.

12. Medina Bueno G. Características clínicas y pronósticas de los subtipos moleculares de cáncer de mama determinados por inmunohistoquímica. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2017;34(3):472-477.

13. González-Robledo LM, González-Robledo MC, Nigenda G, López-Carrillo L. Acciones gubernamentales para la detección temprana del cáncer de mama en América Latina. Retos a futuro. *Salud Pública de México*. 2010;52(6):533–43.

14. Guzmán K, Morales V, Hernández A, et al. Carcinoma ductal infiltrante, el tipo de cáncer de mama más común. *iMedPub Journals*. 2012; 8(1): 1-9.

15. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Programa de enfermedades crónicas no transmisibles. “Política Nacional contra el cáncer”. (Plan Nacional 2010-2015). Consejo nacional de lucha

contra el cáncer. Guatemala, 2010.

16. Patil Okaly G, Panwar D, Lingappa K, et al. FISH and HER2/neu equivocal immunohistochemistry in breast carcinoma. *Indian Journal of Cancer*. 2019;56(2):119–23.

17. Melo-Sánchez S, Gelvez-Parra L, Osma-Zambrano S. Clasificación Inmunohistoquímica del cáncer de mama y su importancia en el diagnóstico, pronóstico y enfoque terapéutico. *Medunab*. 2015; 18(3): 193-203.

18. Mendoza Cardozo, Alfredo. Inmunohistoquímica y microscopía electrónica en tumores de hipófisis [Tesis de Maestría]. Universidad El Bosque. Facultad de Medicina, Bogotá, 1993.

19. Shetuni B, Irtaza U, Melnyk J, et al. Rhabdoid Carcinoma of Anal Canal: Role of Electron Microscopy and Immunohistochemistry in Establishing Lineage. *Ultrastructural Pathology*. 2014; 38(6): 425-429.

20. Ohtsuki Y, Kimura M, Murao S, et al. Immunohistochemical and electron microscopy studies of a case of hyalinizing trabecular tumor of the thyroid gland, with special consideration of the hyalinizing mass associated with it. *Medical Molecular Morphology*. 2009; 42(3): 189-194.

21. Eyden B, Moss J, Shore I, Banerjee S. Metastatic Small Cell Malignant Melanoma: A Case Requiring Immunoelectronmicroscopy for the Demonstration of Lattice-deficient Melanosomes. *Ultrastructural Pathology*. 2005; 29(1):71-78.

22. Lee RFS, Dyson PJ, Stéphane Escrig, et al. The Differential Distribution of RAPTA-T in Non-Invasive and Invasive Breast Cancer Cells Correlates with Its Anti-Invasive and Anti-Metastatic Effects. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(9):1869.

23. Álvarez C, Vich P, Brusint B, et al. Actualización del cáncer de mama en Atención Primaria (III/V). Medicina de Familia (SEMERGEN). 2014; 40(8):460- 472.
24. Reglamento Orgánico del Ministerio de Salud. Poder Ejecutivo. Decreto Ejecutivo 34510. Marco Estratégico del Ministerio de Salud. Art. 32. Capítulo VI.2016.
25. Tao Z, Shi A, Lu C, et al. Breast cancer: epidemiology and etiology. Cell biochemistry and biophysics. 2015; 72(2): 333-338.
26. Amadou A, Torres-Mejía G, Hainaut P, Romieu I. Breast cancer in Latin America: global burden, patterns, and risk factors. Salud Pública De México. 2014; 56(5): 547-554.
27. OMS. Cáncer, datos y cifras. Ginebra. Organización Mundial de la Salud. 2018.
28. Ghoncheh M, Pournamdar Z, Salehiniva H. Incidence and Mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2016; 17:43-46.
29. Mariño M. ER., Rivera L. E., Padrón O. ME., et al. A. Factores de riesgo del cáncer de mama en un consultorio médico. Revista Cubana de Medicina General Integral. 2018; 34(2): 1-9.
30. Hassanpour, S. H., & Dehghani, M. Review of cancer from perspective of molecular. Journal of Cancer Research and Practice. 2017; 4(4): 127-129.
31. Ministerio de Salud Pública. Dirección de Vigilancia de la Salud. Boletín Estadístico de Incidencia de Tumores Malignos más frecuentes en Costa Rica del año 2013. Unidad de Seguimiento de Indicadores de Salud.
32. Mairena J. El riesgo por cáncer de piel es en todo país y todo el año. CCSS. 2013.

33. Ministerio de Salud Pública. Dirección de Vigilancia de la Salud. Boletín Estadístico de Mortalidad por Tumores Malignos más frecuentes en Costa Rica del año 2014. Unidad de Seguimiento de Indicadores de Salud.
34. Mavaddat N, Rebbeck T. R, Lakhani S. R, et al. Incorporating tumour pathology information into breast cancer risk prediction algorithms. *Breast Cancer Research: BCR*. 2010;12(3): R28.
35. Cancer today [Internet]. IARC.fr. [citado el 4 de octubre de 2022]. Disponible en: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode_population
36. Ross, M. H. y W. Pawlina. *Histología: Texto y Atlas. Correlación con Biología Molecular y Celular*. 8ª ed. Ed. Panamericana; 2020. p 910.
37. Robbins., Cotran., Kumar V, et al. *Patología estructural y funcional*. Amsterdam: Elsevier; 2015.
38. Sobotta, W. U. *Histología*. 2ª ed. Ed. Panamericana; 2009. p 538
39. Campoy E, Laurito S, Branham M, et al. Asymmetric Cancer Hallmarks in Breast Tumors on Different Sides of the Body. *Plos ONE*. 2016; 11(7): 1-20.
40. Stratton, M. R., Campbell, P. J., & Futreal, P. A. The cancer genome. *Nature*. 2009; 458(7239): 719-24.
41. Rakoff-Nahoum S. Why cancer and inflammation? *The Yale journal of biology and medicine*. 2007; 79(3-4): 123-30.4
42. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144(5): 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
43. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer*

Discov 1. 2022; 12 (1): 31-46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

44. Denis M, Gregory A, Bayat M, et al. Correlating Tumor Stiffness with Immunohistochemical Subtypes of Breast Cancers: Prognostic Value of Comb- Push Ultrasound Shear Elastography for Differentiating Luminal Subtypes. *Plos ONE*. 2016;11(10):1-14.

45. Poorolajal J, Nafissi N, Akbari M, et al. Breast Cancer Survival Analysis Based on Immunohistochemistry Subtypes (ER/PR/HER2): a Retrospective Cohort Study. *Archives Of Iranian Medicine (AIM)*. 2016;19(10):680-686.

46. Quirós J. et al. Cáncer de mama en mujeres jóvenes características clínicas y patológicas. *Revista Med. de la Universidad de Costa Rica*. 2010;4(2) 54-64.

47. Oliva Anaya C, Cantero Ronquillo H, García Sierra J. Dieta, obesidad y sedentarismo como factores de riesgo del cáncer de mama. *Revista Cubana de Cirugía*. 2015; 54(3): 274-284.

48. Quirós J. Espinoza K. Supervivencia a los 5 años de pacientes con cáncerde mama triple negativo. *Asociación costarricense de medicina legal y disciplinas afines*. 2017;34(1).

49. Lehmann B, Jovanović B, Chen X, et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection *Plos ONE*. 2016; 11(6): 1-22.

50. Pan Y, Yuan Y, Liu G, Wei Y. p53 and Ki-67 as prognostic markers in triple-negative breast cancer patients. *Plos ONE*. 2017;12(2): 1-13.

51. Taylor C. Rudbeck L. *Inmunohistochemical Staining Methods: DAKODenmark*; 2013.

52. Besusparis J, Plancoulaine B, Rasmusson A, et al. Impact of

tissuesampling on accuracy of Ki67 immunohistochemistry evaluation in breast cancer. *Diagnostic Pathology*. 2016; 111-10.

53. Xiaosong C, Long S, Yan M, et al. Preoperative core needle biopsy is accurate in determining molecular subtypes in invasive breast cancer. *BMC Cancer*. 2013;13(1):1-7.

54. Sato M, Kojima M, Nagatsuma A, et al. Optimal fixation for total preanalytic phase evaluation in pathology laboratories. A comprehensive study including immunohistochemistry, DNA, and mRNA assays. *Pathology International*. 2014;64(5):209-216.

55. Musa Z, Qasim B, Al Shaikhly A. Evaluation of Immunohistochemistry- Equivocal (2+) HER2 Gene Status in Invasive Breast Cancer by Silver DNA in Situ Hybridization (SISH) and its Association with Clinicopathological Variables. *Iranian Journal of Pathology*. 2017;12(1):9-19.

56. Bansal C, Sharma A, Pujani M, et al. Correlation of Hormone Receptor and Human Epidermal Growth Factor Receptor-2/neu Expression in BreastCancer with Various Clinicopathologic Factors. *Indian Journal of Medical & Paediatric Oncology*. 2017; 38(4): 483-489.

57. Ruizhi T, Li W, Jie S, et al. Expression and significance of Twist, estrogenreceptor, and E-cadherin in human breast cancer cells and tissues. *Journal of Cancer Research & Therapeutics*. 2017; 13(4): 707-714.

58. Harris, J. Transmission electron microscopy in molecular structural biology: a historical survey. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2015; 581:3-18.

59. Hughes L, Hawes C, Monteith S, Vaughan S. Serial block face scanning electron microscopy-the future of cell ultrastructure imaging. *Protoplasma*. 2014;251(2):395-401.

60. Hernández-Chavarría F. 35 años de microscopía electrónica en Costa Rica. *Rev. Tecnología en Marcha*. 2011;24(2):53-58.
61. Hernández-Chavarría F. Una visión de la biología tropical a través del microscopio electrónico. *Rev. biol. trop.* 2002;50(3-4):927-940.
62. Winey M, Meehl J. B, O'Toole E. T. Giddings T. H. Conventional transmission electron microscopy. *Molecular Biology of the Cell*. 2014;25(3):319–323.
63. Frankl A, Mari M, Reggiori F. Electron microscopy for ultrastructural analysis and protein localization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell*. 2015;2(11),412–428.
64. Darouich S, Goucha R, Jaafoura M, et al. Value of Electron Microscopy in the Diagnosis of Glomerular Diseases. *Ultrastructural Pathology*. 2010, 34(2),49-61.
65. Hernández Sampieri, Roberto; et al. Metodología de la Investigación. 6ª. ed. McGraw-Hill. México, D.F., 2014. p 92 -174.
66. Dako. HercepTest para tinción inmunohistoquímica en Autostainer. 20ª. ed. Dinamarca., 2016. p15.
67. Skepper J. N. Immunocytochemical strategies for electron microscopy: choice or compromise. *Journal of Microscopy*. 2000; 199:1–36.
68. Romero G. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET). Área biomédica: Teoría y práctica. Bogotá, D.C., Colombia: Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. 2003.
69. Romero G. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET). Área biomédica: Teoría y práctica. Bogotá, D.C., Colombia: Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. 2003.
70. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnant M,

Piccart-Gebhart M, et al. Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol.* 2015 Aug;26(8):1533-46.

Anexo 1. Sistema de visualización. Protocolo para los receptores hormonales (RE y RP).



Hospital Dr. Maximiliano Peralta Jiménez
Servicio de Patología. Lab. Inmunohistoquímica
Cartago, Costa Rica 2021



Informe de sistemas de visualización

HMP/IHQ (Protocolo RE /RP)

Categoría	Código	Nombre reactivo	Incubación
1 Rinse		Buffer	
2 Enzyme Pretreatment			
3 Rinse		Buffer	
4 Endogenous Enzyme Block	SM801	FLEX Peroxidase Block	5
5 Rinse		Buffer	
6 Primary Antibody			
7 Rinse		Buffer	
8 Secondary Reagent	SM804	FLEX+ Mouse (LINKER)	15
9 Rinse		Buffer	
10 Labelled Polymer	SM802	FLEX /HRP	20
11 Rinse		Buffer	
12 Rinse		Buffer	5
13 Substrate-Chromogen	SM803	FLEX DAB+ Sub-Chromo	10
14 Rinse		Buffer	
15 Counterstain	SM806	FLEX Hematoxylin	15
16 Rinse		DI Water	
17 Rinse		Buffer	5
18 Rinse		DI Water	

Anexo 2. Sistema de visualización. Protocolo para el HER2/neu y el Ki-67.



Hospital Dr. Maximiliano Peralta Jiménez
Servicio de Patología. Lab. Inmunohistoquímica
Cartago, Costa Rica 2021



Informe de sistemas de visualización

HMP/IHQ (Protocolo HER2 / Ki-67)

Categoría	Código	Nombre reactivo	Incubación
1 Rinse		Buffer	
2 Enzyme Pretreatment			
3 Rinse		Buffer	
4 Endogenous Enzyme Block	SM801	FLEX Peroxidase Block	5
5 Rinse		Buffer	
6 Primary Antibody			
7 Rinse		Buffer	
8 Secondary Reagent	SM804	FLEX+ Mouse (LINKER)	15
9 Rinse		Buffer	
10 Labelled Polymer	SM802	FLEX /HRP	20
11 Rinse		Buffer	
12 Rinse		Buffer	5
13 Substrate-Chromogen	SM803	FLEX DAB+ Sub-Chromo	10
14 Rinse		Buffer	
15 Counterstain	SM806	FLEX Hematoxylin	15
16 Rinse		DI Water	
17 Rinse		Buffer	5
18 Rinse		DI Water	

Anexo 3. Registro de preparación de muestras para MET.



CIEMIC

Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas

Registro de Preparación de Muestras para MET (Registro N°22).

Nombre de la Muestra: Tejido tumoral de mama

Código de la muestra: C1C, F1B, G2A, H1A

Responsable del procesamiento: Licda Andrea Hernández A.

Nombre de solicitante:	Correo o teléfono:	Encargado de ejecutar el procesamiento:	Cantidad de muestras:
<u>Jeison Varela S.</u>	<u>88524369</u>	<u>Manuel Jimenez R.</u>	<u>4</u>
Procedimiento de operación			Fecha de inicio del procesamiento:
			<u>16/9/2021</u>
1. Fijación	a Fijación inicial: <u>Karnovsky</u> Tiempo: <u>3 meses</u> b Lavados (Buffer): <u>1. 20 min 2. 20 min 3. 20 min</u> c Tetra óxido de Osmio: <u>[2A]</u> Tiempo: <u>1 hora</u> d Lavados con agua: <u>1. 20 min 2. 20 min 3. 20 min.</u>	OBSERVACIONES	
2. Deshidratación	a Acetona 30%: b Acetona 50%: c Acetona 70%: d Acetona 80%: e Acetona 90%: f Acetona 100%: g Acetona 100%: h Acetona 100%:	<u>20 minutos %</u>	
3. Resina	a Acetona : Resina (1:1) 5 horas: b <u>4 horas</u> c Resina Pura 12 horas: <u>1. 12 horas 2. 12 horas</u> d Cantidad de cambios de Resina: <u>2</u>		
4. Inclusión en resina	a Fecha de inclusión de la muestra: <u>24/09/2021</u> b Permanencia en la estufa de 70 °C durante <u>72</u> horas:		
5. Ultramicrotomía	a Cantidad de bloques cortados por muestra: <u>2</u> b Cantidad de fases de luz por muestra: <u>1</u> c Cantidad de rejillas colectadas por bloque: <u>2</u>		
6. Tinción de las rejillas	a Tiempo de inmersión en el plomo: <u>1 min</u> b Tiempo de inmersión en el uranilo: <u>1 min</u>		
7. Almacenaje	A Almacenado en: <u>Laboratorio MET</u> b Fecha de almacenaje: <u>Octubre 2021</u>		

Anexo 4. Instrumento de medición para IHQ.

**HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS HISTOPATOLÓGICOS
CARCINOMA INVASIVO DE MAMA**

Código asignado: _____. **Edad:** _____.
Fecha toma de muestra: __/__/__. **Fecha de diagnóstico:** __/__/__.

Lateralidad del espécimen:

____ Derecha
____ Izquierda

Sitio del tumor (posición del reloj): ____ horas.

____ No especificado

Tamaño del tumor: Dimensión del mayor foco invasivo ____ cm.

Grado histológico (Clasificación Histológica de Nottingham):

____ Grado 1 (Bien diferenciado)
____ Grado 2 (Poco diferenciado)
____ Grado 3 (Indiferenciado)

Focalidad tumoral:

____ Foco único
____ Multifocal

Carcinoma Ductal in Situ (DCIS):

____ No identificado
____ Presente
____ Ausente

Necrosis:

_____ No identificada

_____ Presente

_____ Ausente

Invasión linfovascular:

_____ No identificada

_____ Presente

_____ No puede ser determinada

Invasión linfovascular dérmica:

_____ No identificada

_____ Presente

_____ No puede ser determinada

Microcalcificaciones:

_____ Presente

_____ No identificadas

BIOMARCADORES DE LA BIOPSIA PREVIA

Receptor de Estrógenos (RE):

_____ Negativo

_____ Positivo _____%

Receptor de Progesterona (RP):

_____ Negativo

_____ Positivo _____%

HER2:

_____ Negativo (0)

_____ Negativo (1+)

_____ Indeterminado (2+)

_____ Positivo (3+)

HER2 (Hibridación in Situ)

_____ Positivo

_____ Negativo

_____ Indeterminado

Ki-67: positividad nuclear _____%

SUBTIPO MOLECULAR

Luminal A _____ Luminal B _____

Anexo 5. Instrumento de medición para IHQ. Caso 1 (C1).

**HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS HISTOPATOLÓGICOS
CARCINOMA INVASIVO DE MAMA**

Código asignado: C1. Edad: 83a.
Fecha toma de muestra: 05/05/21. Fecha de diagnóstico: 03/06/21.

Lateralidad del espécimen:

Derecha
 Izquierda

Sitio del tumor (posición del reloj): 9-10 horas.

No especificado

Tamaño del tumor: Dimensión del mayor foco invasivo Na cm.

Grado histológico (Clasificación Histológica de Nottingham):

Grado 1 (Bien diferenciado)
 Grado 2 (Poco diferenciado)
 Grado 3 (Indiferenciado)

Focalidad tumoral:

Foco único
 Multifocal

Carcinoma Ductal in Situ (DCIS):

No identificado
 Presente
 Ausente

Necrosis:

No identificada
 Presente
 Ausente

Invasión linfovascular:

No identificada
 Presente
 No puede ser determinada

Invasión linfovascular dérmica:

No identificada
 Presente
 No puede ser determinada

Microcalcificaciones:

Presente
 No identificadas

BIOMARCADORES DE LA BIOPSIA PREVIA

Receptor de Estrógenos (RE):

Negativo
 Positivo 100 %

Receptor de Progesterona (RP):

Negativo
 Positivo 100 %

HER2:

Negativo (0)
 Negativo (1+)
 Indeterminado (2+) 95.1
 Positivo (3+)

HER2 (Hibridación in Situ)

Positivo
 Negativo
 Indeterminado

Ki-67: positividad nuclear 10 %

SUBTIPO MOLECULAR

Luminal A Luminal B


Dr. José Luis Quirós Alpizar
Médico Especialista en Anatomía Patológica

Anexo 6. Instrumento de medición para IHQ. Caso 2 (F1).

**HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS HISTOPATOLÓGICOS
CARCINOMA INVASIVO DE MAMA**

Código asignado: F1, Edad: 68a.
Fecha toma de muestra: 05/07/21. Fecha de diagnóstico: 27/07/21.

Lateralidad del espécimen:

Derecha
 Izquierda

Sitio del tumor (posición del reloj): 2 horas.

No especificado

Tamaño del tumor: Dimensión del mayor foco invasivo 4 cm.

Grado histológico (Clasificación Histológica de Nottingham):

Grado 1 (Bien diferenciado)
 Grado 2 (Poco diferenciado)
 Grado 3 (Indiferenciado)

Focalidad tumoral:

Foco único
 Multifocal

Carcinoma Ductal in Situ (DCIS):

No identificado
 Presente
 Ausente

Necrosis:

No identificada
 Presente
 Ausente

Invasión linfovascular:

- No identificada
 Presente
 No puede ser determinada

Invasión linfovascular dérmica:

- No identificada
 Presente
 No puede ser determinada

Microcalcificaciones:

- Presente
 No identificadas

BIOMARCADORES DE LA BIOPSIA PREVIA

Receptor de Estrógenos (RE):

- Negativo
 Positivo 100 %

Receptor de Progesterona (RP):

- Negativo
 Positivo 80 %

HER2:

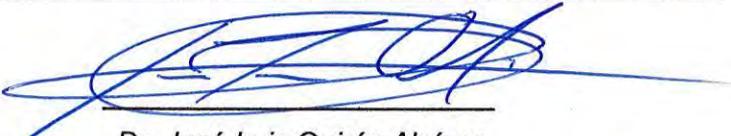
- Negativo (0)
 Negativo (1+)
 Indeterminado (2+)
 Positivo (3+)

Ki-67: positividad nuclear 20 %

SUBTIPO MOLECULAR

Luminal A

Luminal B


Dr. José Luis Quirós Alpizar
Médico Especialista en Anatomía Patológica

Anexo 7. Instrumento de medición para IHQ. Caso 3 (G2).

**HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS HISTOPATOLÓGICOS
CARCINOMA INVASIVO DE MAMA**

Código asignado: G2. Edad: 51.
Fecha toma de muestra: 09/07/21. Fecha de diagnóstico: 19/07/21.

Lateralidad del espécimen:

Derecha
 Izquierda

Sitio del tumor (posición del reloj): 9 horas.

No especificado

Tamaño del tumor: Dimensión del mayor foco invasivo Na cm.

Grado histológico (Clasificación Histológica de Nottingham):

Grado 1 (Bien diferenciado)
 Grado 2 (Poco diferenciado)
 Grado 3 (Indiferenciado)

Focalidad tumoral:

Foco único
 Multifocal

Carcinoma Ductal in Situ (DCIS):

No identificado
 Presente
 Ausente

Necrosis:

No identificada
 Presente
 Ausente

Invasión linfovascular:

- No identificada
 Presente
 No puede ser determinada

Invasión linfovascular dérmica:

- No identificada
 Presente
 No puede ser determinada

Microcalcificaciones:

- Presente
 No identificadas

BIOMARCADORES DE LA BIOPSIA PREVIA

Receptor de Estrógenos (RE):

- Negativo
 Positivo 90 %

Receptor de Progesterona (RP):

- Negativo
 Positivo %

HER2:

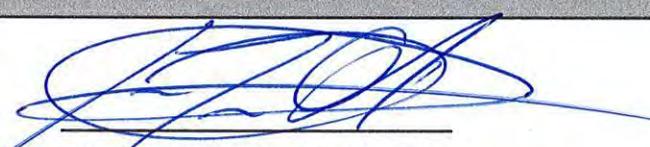
- Negativo (0)
 Negativo (1+)
 Indeterminado (2+)
 Positivo (3+)

Ki-67: positividad nuclear 10 %

SUBTIPO MOLECULAR

Luminal A .

Luminal B .


Dr. José Luis Quirós Alpízar
Médico Especialista en Anatomía Patológica

Anexo 8. Instrumento de medición para IHQ. Caso 4 (H1).

**HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS HISTOPATOLÓGICOS
CARCINOMA INVASIVO DE MAMA**

Código asignado: H1. Edad: 50a.
Fecha toma de muestra: 16/07/21. Fecha de diagnóstico: 29/07/21.

Lateralidad del espécimen:

Derecha
 Izquierda

Sitio del tumor (posición del reloj): _____ horas.

No especificado

Tamaño del tumor: Dimensión del mayor foco invasivo 10 cm.

Grado histológico (Clasificación Histológica de Nottingham):

Grado 1 (Bien diferenciado)
 Grado 2 (Poco diferenciado)
 Grado 3 (Indiferenciado)

Focalidad tumoral:

Foco único
 Multifocal

Carcinoma Ductal in Situ (DCIS):

No identificado
 Presente
 Ausente

Necrosis:

No identificada
 Presente
 Ausente

Invasión linfovascular:

- No identificada
 Presente
 No puede ser determinada

Invasión linfovascular dérmica:

- No identificada
 Presente
 No puede ser determinada

Microcalcificaciones:

- Presente
 No identificadas

BIOMARCADORES DE LA BIOPSIA PREVIA

Receptor de Estrógenos (RE):

- Negativo
 Positivo 95 %

Receptor de Progesterona (RP):

- Negativo
 Positivo 95 %

HER2:

- Negativo (0)
 Negativo (1+)
 Indeterminado (2+)
 Positivo (3+)

Ki-67: positividad nuclear 90 %

SUBTIPO MOLECULAR

Luminal A

Luminal B


Dr. José Luis Quirós Alpizar
Médico Especialista en Anatomía Patológica

Anexo 9. Instrumento de medición para MET.

**HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN**

Nº de identificación de la prueba: MET-_____.

Fecha de diagnóstico IHQ: ____/____/____.

Fecha de la recepción para MET: ____/____/____.

Descripción macroscópica:

Localización del tumor:

Posición del reloj: ____ horas.

____ No especificado

Descripción microscópica:

Fijación de la muestra:

Fecha: ____/____/____.

Fijador 1 _____

Tiempo _____

Solución tampón _____

Tiempo _____

Fijador 2 _____

Tiempo _____

Agente deshidratante (%) _____

Tiempo _____

Resina (tipo) _____

Tiempo _____

Tiempo de polimerización: _____.

Observaciones:

Tallado del taco de resina:

Rótulo del taco: _____

Tipo de cuchilla: _____

Grillas (Mesh): _____

Nombre de portamuestras: _____

Observaciones:

Contraste:

Acetato de uranilo; _____ Tiempo _____
Citrato de plomo: _____ Tiempo _____

Observaciones

Visualización:

Cantidad	Resolución	Descripción

Nombre del proyecto: Aplicación de la microscopía electrónica y la inmunohistoquímica para el estudio de los dos subtipos más frecuentes de carcinomas de la glándula mamaria en el Hospital Dr. Maximiliano Peralta Jiménez de la provincia de Cartago, Costa Rica, durante el primer semestre del año 2021

Anexo 10. Instrumento de medición para MET. Caso 1 (C1).

**HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN**

Nº de identificación de la prueba: MET- C1.

Fecha de diagnóstico IHQ: 3 / 6 / 2021.

Fecha de la recepción para MET: 16 / 9 / 2021.

Descripción macroscópica:

Se recibieron 7 cilindros de tejido mamario infiltrados por neoplasia maligna. Se fija 1 en glutaraldehído y 6 en formalina.

Localización del tumor:

Posición del reloj: 9-10 horas.

No especificado

Descripción microscópica:

Células forman trabéculas y nidos. Desmoplasia en el estroma. Células neoplásicas presentan núcleos redondos con pleomorfismo leve.

Fijación de la muestra:

Fecha: 3 / 6 / 2021.

Fijador 1 Karnovsky

Tiempo 3 meses

Solución tampón Buffer hidrato de sodio 1%

Tiempo 3 (20 min %)

Fijador 2 Tetraóxido de osmio 2%

Tiempo 1 hora

Agente deshidratante (%) Batería de acetona 5

Tiempo 8 (20 min %)

Resina (tipo) Spurr dureza media

Tiempo 2 (12 horas %)

Tiempo de polimerización: 72 horas

Observaciones:

Tallado del taco de resina:

Rótulo del taco: C1C
Grillas (Mesh): 200

Tipo de cuchilla: Diamante
Nombre de portamuestras: C1C

Observaciones:

Contraste:

Acetato de uranilo; _____

Tiempo 1 min

Citrato de plomo: _____

Tiempo 1 min**Observaciones** _____

_____**Visualización:**

Cantidad	Resolución	Descripción
1	2000X	Núcleos.
11	3000X	Fibrosis, Estructuras, Núcleos, Recipitado.
4	3500X	Núcleo.
1	4000X	Estructura.
3	6000X	Estructura, Núcleos.
2	7000X	Núcleo.

Nombre del proyecto: Aplicación de la microscopía electrónica y la inmunohistoquímica para el estudio de los dos subtipos más frecuentes de carcinomas de la glándula mamaria en el Hospital Dr. Maximiliano Peralta Jiménez de la provincia de Cartago, Costa Rica, durante el primer semestre del año 2021.

Anexo 11. Instrumento de medición para MET. Caso 2 (F1).

**HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN**

Nº de identificación de la prueba: MET- F1.

Fecha de diagnóstico IHQ: 27 / 7 / 21.

Fecha de la recepción para MET: 16 / 9 / 2021.

Descripción macroscópica:

Se reciben 4 cilindros de tejido estromal y adiposo, blanquecino que miden casi un centímetro de largo.

Localización del tumor:

Posición del reloj: 2 horas.

___ No especificado

Descripción microscópica:

Infiltración de neoplasia que forma nidos y trabéculas
Citoplasma claro eosinofílico.
Linfocitos intratorales presentes

Fijación de la muestra:

Fecha: 16 / 9 / 2021.

Fijador 1 Karnovsky

Tiempo 3 meses

Solución tampón Buffer hidrato de sodio 1%

Tiempo 3 (20 min %)

Fijador 2 Tetraóxido de osmio 2%

Tiempo 1 hora

Agente deshidratante (%) Batería de acetonas

Tiempo 8 (20 min %)

Resina (tipo) Sputr dureza media

Tiempo 2 (12 horas %)

Tiempo de polimerización: 72 horas

Observaciones:

Tallado del taco de resina:

Rótulo del taco: F1B

Tipo de cuchilla: Diamante

Grillas (Mesh): 200

Nombre de portamuestras: F1B

Observaciones:

Contraste:

Acetato de uranilo; _____
Citrato de plomo: _____

Tiempo 1 min
Tiempo 1 min

Observaciones _____

Visualización:

Cantidad	Resolución	Descripción
1	2500X	Estructuras
3	3000X	Estructuras, Núcleos
1	4000X	Fibras
1	5000X	Fibras colágeno.
2	6000X	Estructuras
2	7000X	Núcleos.

Nombre del proyecto: Aplicación de la microscopía electrónica y la inmunohistoquímica para el estudio de los dos subtipos más frecuentes de carcinomas de la glándula mamaria en el Hospital Dr. Maximiliano Peralta Jiménez de la provincia de Cartago, Costa Rica, durante el primer semestre del año 2021.

Anexo 12. Instrumento de medición para MET. Caso 3 (G2).

**HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN**

Nº de identificación de la prueba: MET- G2.

Fecha de diagnóstico IHQ: 19 / 7 / 21.

Fecha de la recepción para MET: 16 / 9 / 21.

Descripción macroscópica:

Cilindros de tejido humano, blanquecinos

Localización del tumor:

Posición del reloj: 9 horas.

No especificado

Descripción microscópica:

Núcleos aumentados de tamaño,

Núcleos prominentes

Escasa formación de lípidos

Fijación de la muestra:

Fecha: 16 / 9 / 2021.

Fijador 1 Karnovsky

Tiempo 3 meses

Solución tampón Buffer hidrato de sodio 1%

Tiempo 3 (20 min %)

Fijador 2 Tetraóxido de osmio 2%

Tiempo 1 hora

Agente deshidratante (%) Batería de acetonas

Tiempo 8 (20 min %)

Resina (tipo) Spurr dureza media

Tiempo 2 (12 horas %)

Tiempo de polimerización: 72 horas

Observaciones:

Tallado del taco de resina:

Rótulo del taco: G2A

Tipo de cuchilla: Diamante

Grillas (Mesh): 200

Nombre de portamuestras: G2A

Observaciones:

Contraste:

Acetato de uranilo: _____
 Citrato de plomo: _____

Tiempo 1 min
 Tiempo 1 min

Observaciones _____

Visualización:

Cantidad	Resolución	Descripción
5 Z	200X a 1000X	Estructuras, artefactos, Nucleos, Nucleolos
8	2000X a 2500X	Nucleo, Fibroblasto, Nucleolos.
7	3000X a 3500X	Estructuras, interfase, nucleo, nucleolos.
2	5000X	Nucleolo, citoplasma.
2	7000X	Mastocito.
2	8000X a 9000X	Nucleo, Estructuras.
2	10 000X	Fibras, membranas.
2	17 000X	Estructuras.

Nombre del proyecto: Aplicación de la microscopía electrónica y la inmunohistoquímica para el estudio de los dos subtipos más frecuentes de carcinomas de la glándula mamaria en el Hospital Dr. Maximiliano Peralta Jiménez de la provincia de Cartago, Costa Rica, durante el primer semestre del año 2021.

Anexo 13. Instrumento de medición para MET. Caso 4 (H1).

**HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN**

Nº de identificación de la prueba: MET- H1.

Fecha de diagnóstico IHQ: 29 / 7 / 2021.

Fecha de la recepción para MET: 16 / 9 / 2021.

Descripción macroscópica:

3 cilindros de tejido. Se fijen 2 en formaldehído y 1 en glutaraldehído

Localización del tumor:

Posición del reloj: _____ horas.

No especificado

Descripción microscópica:

Núcleos aumentados de tamaño
Células neoplásicas sueltas
Dismatoplasia en el estroma

Fijación de la muestra:

Fecha: 29 / 7 / 2021.

Fijador 1 Karnovsky

Tiempo 3 meses

Solución tampón Buffer hidrato de sodio 1x

Tiempo 3 (20 min 4%)

Fijador 2 Tetraóxido de osmio 2x

Tiempo 1 hora

Agente deshidratante (%) Batería de acetonas

Tiempo 8 (20 min 4%)

Resina (tipo) Spurr dureza media

Tiempo 2 (12 horas 4%)

Tiempo de polimerización: 72 horas

Observaciones:

Tallado del taco de resina:

Rótulo del taco: H1A

Tipo de cuchilla: Diamante

Grillas (Mesh): 200

Nombre de portamuestras: H1A

Observaciones:

Contraste:

Acetato de uranilo; _____

Citrato de plomo: _____

Tiempo 1 min

Tiempo 1 min

Observaciones _____

Visualización:

Cantidad	Resolución	Descripción
6	3000X	Fibroblastos, núcleos.
1	5000X	Nucleolo
1	7000X	Artefactos.
1	8000X	Estructuras
1	12000X	Estructuras

Nombre del proyecto: Aplicación de la microscopía electrónica y la inmunohistoquímica para el estudio de los dos subtipos más frecuentes de carcinomas de la glándula mamaria en el Hospital Dr. Maximiliano Peralta Jiménez de la provincia de Cartago, Costa Rica, durante el primer semestre del año 2021.



VITRO S.A
Calle Luís Fuentes Bejarano 60
Edificio Nudo Norte Local 3
41020 Sevilla (España)
F: +34 954 922 892
T: +34 954 933 200
www.vitro.bio

Anexo 14. Inserto de HER2/neu

C-erbB-2/HER2/NEU (SP3)

ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-C-erb B-2 (CLON: SP3)

DESCRIPCIÓN DEL REACTIVO

Composición: Anticuerpo monoclonal de conejo anti-c-erbB-2 obtenido de sobrenadante de cultivo y prediluido en tampón Tris, pH 7.6 con 1% BSA (ANTICUERPO "LISTO PARA USO"). La solución contiene 0.375mM de azida sódica como agente bacteriostático y bactericida. La cantidad de anticuerpo activo en la muestra es desconocida.

Sinónimos del antígeno identificado: HER2/Neu

Clon: SP3

Inmunógeno: Péptido recombinante correspondiente a una región del dominio externo de la oncoproteína C-erbB2 hum

Fuente e isotipo de la inmunoglobulina: IgG de conejo.

Uso Previsto : Diagnóstico in vitro en la especie humana. En otras especies el reactivo no ha sido testado.

Aplicación: Determinaciones inmunohistoquímicas sobre tejido incluido en parafina.

Presentación :

- las referencias/presentaciones generales para este anticuerpo en formato listo para uso manual y para inmunoteñidores LabVision Autostainer¹ son:

MAD-000308QD-3 -> Volumen = 3 mL

MAD-000308QD-7 -> Volumen = 7 mL

MAD-000308QD-12 -> Volumen = 12 mL

- las referencias/presentaciones generales para este anticuerpo en formato listo para uso en inmunoteñidores MD-Stainer son:

MAD-000308QD-3/V

MAD-000308QD/V

- Referencia/presentación para este anticuerpo en formato concentrado:

MAD-000308Q -> Volumen = 1 mL

Condiciones de almacenamiento : Frigorífico entre 2 y 8°C.

Periodo de validez : El envase una vez abierto puede conservarse hasta la fecha de caducidad del reactivo señalada en la etiqueta. Si el reactivo ha sido almacenado en otras condiciones a las señaladas en este documento el usuario deberá chequear previamente su correcto funcionamiento teniendo en cuenta que la garantía del producto ya no es válida.

Instrucciones especiales de manipulación: Este reactivo está especialmente diseñado para su manejo en los inmunoteñidores LabVision Autostainer y MD-Stainer.

Para formato concentrado la dilución recomendada es 1:50 (ha sido validada con sistema de inmunodetección Master Polymer Plus Detection System-Peroxidase (MAD-000237QK)).

Advertencias y precauciones: 1) El producto solo debe ser manejado por usuarios entrenados y en laboratorios autorizados. Para su manejo en investigación existen otras presentaciones más idóneas.

¹ Estas referencias son para presentación en envases de Polietileno de Baja Densidad (LDPE) con gotero. Para el caso de que los productos sean usados en equipos automáticos LabVision Autostainer, existe una presentación especial cuyas referencias y volúmenes son los mismos seguidos de /N: para viales poligonales con tapón de rosca (QD-3/N, QD-7/N, QD-12/N). En caso de que el usuario desee otro tipo de presentaciones (referencias/volúmenes diferentes) deberá contactar con el proveedor.

2) Téngase en cuenta que la última responsabilidad en la optimización e interpretación de las inmunotinciones practicadas corresponde al facultativo y técnicos que lo emplean y que, asimismo, este reactivo no es más que una herramienta para la interpretación de los hallazgos morfológicos de cada caso en conjunción con otros tests diagnósticos y los pertinentes datos clínicos del paciente.

3) El reactivo contiene azida sódica (NaN₃) como conservante. Aunque este producto es altamente tóxico y cuando se mezcla con agua o ácidos, principalmente en presencia de metales, existe peligro de explosión estos riesgos están minimizados al máximo cuando se emplea a concentraciones inferiores al 0,05% como es el caso. No obstante deben tomarse las siguientes precauciones para el manejo de este reactivo: a) Uso de guantes y del equipo de protección establecido para las técnicas inmunohistoquímicas establecidas así como estricto respeto de las prácticas generales de seguridad existentes en el laboratorio; b) No almacenar los reactivos en envases metálicos ni emplear utillaje de esta naturaleza para su manejo; c) Almacenar los residuos para su eliminación reglada en contenedores apropiados según la normativa vigente en cada laboratorio. Nunca arrojarlos por el desagüe.

ESPECIFICIDAD

Este anticuerpo reconoce a un antígeno de 185 kDa correspondiente al dominio extracelular de una proteína de membrana denominada C-erbB-2 codificada por el gen C-erbB-2/HER2/Neu.

Este anticuerpo reacciona con el dominio extracelular del producto génico del C-erbB-2.

SENSIBILIDAD Y EXPRESIÓN EN TEJIDOS NORMALES

El C-erbB-2 es un proto-oncogen localizado en el cromosoma humano 17, banda 21.

Presenta semejanzas estructurales con el EGFr (Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico).

APLICACIONES DIAGNÓSTICAS

Diferentes estudios han demostrado niveles de expresión detectables por inmunohistoquímica en más del 20% de adenocarcinomas de diferentes localizaciones, incluyendo ovario, tracto gastro-intestinal y mama.

En el caso del cáncer de mama la sobreexpresión de esta oncoproteína ha demostrado estar asociado a un peor pronóstico. La tinción inmunohistoquímica de la oncoproteína se encuentra relacionada con la amplificación génica. Este anticuerpo está recomendado para determinar los niveles de expresión de la oncoproteína C-erb B-2 en adenocarcinomas de mama y otras localizaciones y en carcinomas de células transicionales de vías urinarias.

CALIBRADORES Y CONTROLES

Patrón de Inmunotinción: Membrana citoplásmica.

Control Positivo: Sección tisular procedente de carcinoma de mama con sobreexpresión de la oncoproteína.

Control Negativo: Preparación homóloga a la muestra problema incubada con un anticuerpo isotipo no específico para C-erbB-2.

LIMITACIONES DEL REACTIVO

No recomendado para Western-blotting. El uso sobre tejido congelado no ha sido evaluado.

TIPOS DE MUESTRA

Secciones a 4 micras de espesor montadas sobre portaobjetos especiales para inmunohistoquímica y obtenidas de tejidos incluidos en parafina, preferiblemente fijados en formalina tamponada aunque también son adecuados los tratados con soluciones que contienen cloruro mercurio (B5).

DESENMASCARAMIENTO ANTIGÉNICO

Las secciones han de ser sometidas a recuperación antigénica por calor según el procedimiento estándar de cada laboratorio aunque los mejores resultados se obtienen empleando tampón EDTA 1mM pH 8.0 en módulo PT de desmascaramiento a 95°C durante 20 minutos y protocolo habitual. En síntesis el proceso incluye desparafinación de los cortes, desmascaramiento por calor y sucesivos lavados en tampón. Para más detalles consultar las instrucciones de uso del módulo PT. Para conocer las condiciones técnicas de este anticuerpo en el MD-Stainer, contacte con su distribuidor.

EQUIPOS Y PRODUCTOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS CON EL REACTIVO

Aunque es posible realizar manualmente la inmunotinción el reactivo ha sido optimizado para su uso en los inmunotefidores LabVision Autostainer y MD-Stainer. Para su empleo en otros equipos automáticos en el catálogo de Vitro S.A existen otras presentaciones más idóneas del reactivo. Todo el proceso de inmunotinción de los cortes y los códigos de sistema que permiten el reconocimiento online del reactivo y los portaobjetos sometidos a estudio se encuentra programado en el software del inmunotefidor. Por ello, cuando se implemente por primera

vez este procedimiento de análisis en un laboratorio será imprescindible cerciorarse de que la información acumulada en el instrumento está correctamente programada. En caso de necesidad contactar con su Distribuidor Autorizado. Téngase en cuenta que las condiciones óptimas de trabajo pueden variar dependiendo del tipo de tejido y que, en todo caso, deberán ser establecidas individualmente para cada laboratorio. De forma general y para optimizar el proceso se recomienda el empleo en el inmunotefidor de los diferentes productos de amplificación, revelado y tinción de contraste en forma de kits producidos por Vitro S.A y los tampones y consumibles específicos para estos instrumentos. Para más detalles consúltese el manual de instrucciones del equipo y catálogo de la compañía VITRO S.A.

PRINCIPIO DEL MÉTODO ANALÍTICO

Detección antigénica sobre tejidos y células empleando un procedimiento inmunohistoquímico en varias etapas que al menos incluya la incubación con el anticuerpo primario, la incubación con un reactivo inmune puente (idealmente multiespecie) marcado enzimáticamente, el revelado de dicha actividad por una reacción colorimétrica, la contratinción con hematoxilina y los correspondientes lavados entre paso y paso. Para más detalles seguir los procedimientos estándar de cada laboratorio, consultar las instrucciones recomendadas por el fabricante de cada producto y seguir los procedimientos programados en el inmunotefidor.

INCIDENCIAS Y RECLAMACIONES

Se recomienda seguir exhaustivamente todas las indicaciones contenidas en estas instrucciones técnicas. En caso de que se produzcan resultados atípicos o no esperados se ruega contacten con su Proveedor / Distribuidor Autorizado o en caso de necesidad, directamente con Vitro S.A.

RECOMENDACIONES DE SEGURIDAD

El producto está destinado únicamente para el uso profesional en un laboratorio, y no como fármaco, para uso doméstico ni otros fines. La versión actual de la ficha de datos de seguridad de este producto puede ser descargada a través de la búsqueda de su referencia en www.vitro.bio o puede ser solicitada a regulatory@vitro.bio.

LIMITACIONES Y GARANTÍA

Si se han cumplido todas las condiciones de almacenamiento y manejo en el laboratorio, este reactivo está garantizado durante todo su tiempo de caducidad. Vitro S.A no es responsable de los daños, lesiones personales o pérdidas económicas en que este reactivo pueda encontrarse implicado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 237 :177-182 (1987).
2. Gusterson BA, Gullick WJ, Venter DJ, Powles TJ, Elliott C, Ashley S, Tidy A, Harrison S. Immunohistochemical localization of c-erbB-2 in human breast carcinomas. *Molecular and Cellular Probes*. 2 :383-391 (1987).
3. Wright C, Angus B, Nicholson S, Sainsbury JR, Cairns J, Gullick WJ, Kelly P, Harris AL, Horne CH. Expression of c-erbB-2 oncoprotein: a prognostic indicator in human breast cancer. *Cancer Research*. 49 :2087-2090 (1989).
4. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast cancer. *Cancer Cells 7/Molecular Diagnostics of Human Cancer*. Cold Spring Harbor Laboratory. (1989).
5. McGuire H C and Greene M I. The neu (c-erbB2) oncogene. *Seminars in Oncology*. 16(2):148-155 (1989).
6. Barnes D M. Breast cancer and a proto-oncogene. *British Medical Journal*. 299 :1061-1062 (1989).
7. Corbett IP, Henry JA, Angus B, Watchorn CJ, Wilkinson L, Hennessy C, Gullick WJ, Tuzi NL, May FE, Westley BR. NCL-CB11: A new monoclonal antibody recognising the internal domain of the c-erbB-2 oncogene protein, effective for use on formalin fixed, paraffin embedded tissue. *Journal of Pathology*. 161 :15-25 (1990).
8. Wright C, Nicholson S, Angus B, Sainsbury JR, Farndon J, Cairns J, Harris AL, Horne CH. Relationship between c-erbB-2 oncoprotein expression and response to endocrine therapy in advanced breast cancer. *British Journal of Cancer*. 65 :118-121 (1992).
9. Etorh A, Parache RM, Migeon C, N'Sossani B, Rihn B. Expression of the c-erbB-2 oncoprotein in mammary Paget's disease. *Immunohistochemical study by using 3 antibodies*. *Pathol. Biol*. 43 (7):584-589 (1995).
10. Crosier M, Scott D, Wilson RG, Griffiths CD, May FE, Westley BR. High expression of the trefoil protein TFF1 in interval breast cancers. *American Journal of Pathology*. 159 (1):215-221 (2001).
11. Faló C, Moreno A, Lloveras B, Figueras A, Varela M, Escobedo A. Algorithm for the diagnosis of HER-2/neu status in breast-infiltrating carcinomas. *Am J Clin Oncol*. 26:465-70 (2003).
12. Varga Z, Zhao J, Ohlschlegel C, Odermatt B, Heitz PU. Preferential HER-2/neu overexpression and/or amplification in aggressive histological subtypes of invasive breast cancer. *Histopathology*. 44:332-338 (2004).

**Monoclonal Mouse
Anti-Human
Ki-67 Antigen
Clon MIB-1
Nº de catálogo M7240**

Indicaciones de uso	<p>Para uso diagnóstico in vitro.</p> <p>Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen, Clon MIB-1, está indicado para su uso en inmunohistoquímica. Con más de 400 citas en la literatura médica, el anticuerpo MIB-1 ha sido establecido ahora como un anticuerpo monoclonal murino de referencia para la identificación del antígeno Ki-67 en muestras incluidas en parafina, fijadas en formol. En histopatología diagnóstica y biología celular, el anticuerpo se ha mostrado valioso para la identificación del antígeno Ki-67 en células normales y neoplásicas, por ejemplo, en el sarcoma de tejidos blandos (1), adenocarcinoma prostático (2) y carcinoma de mama (3). La interpretación clínica de los resultados de cualquier tinción, o su ausencia, debe complementarse con estudios morfológicos con controles adecuados y debe evaluarla un patólogo calificado dentro del contexto de la historia clínica del paciente y de otras pruebas diagnósticas.</p>
Introducción	<p>El antígeno Ki-67 es una proteína nuclear que se define por su reactividad con el anticuerpo monoclonal del clon Ki-67 (4). Se han identificado dos isoformas, de 345 y 395 kDa respectivamente (5). El antígeno Ki-67 se expresa predominantemente durante todas las fases activas del ciclo celular (fases G₁, S, G₂ y M), estando ausente en las células en reposo (fase G₀) (4). Durante la interfase, el antígeno se detecta exclusivamente dentro del núcleo, mientras que durante la mitosis la mayoría de la proteína detectada está localizada en la superficie de los cromosomas. El antígeno se degrada rápidamente conforme la célula entra en su estado no proliferativo (6), y parece que no existe expresión del Ki-67 durante los procesos de reparación del ADN (7).</p>
Reactivos suministrados	<p>Anticuerpo monoclonal murino suministrado en forma líquida como sobrenadante de cultivo celular dializado en Tris/HCl 0,05 mol/L, seroalbúmina bovina al 1%, pH 7,2 y con un contenido en NaN₃ de 15 mmol/L.</p> <p><u>Clon:</u> MIB-1 (8). <u>Isotipo:</u> IgG1, kappa. <u>Concentración de Ig murina:</u> ver la etiqueta del vial.</p> <p>La concentración de proteína puede variar de un lote a otro, pero este cambio no afecta a la dilución óptima de uso. El título de cada lote se compara y ajusta mediante un lote de referencia para asegurar que el resultado de la tinción inmunohistoquímica sea consistente entre los distintos lotes.</p>
Inmunógeno	<p>Péptido recombinante humano que se corresponde con un fragmento de cADN de Ki-67 de 1002 pb (8).</p>
Especificidad	<p>Cuando se aplica la técnica Western blotting a lisados de la línea celular de mieloma múltiple IM-9, el anticuerpo MIB-1 marca a una banda de 345 kDa y a otra banda de 395 kDa, idénticas a las bandas marcadas por el anticuerpo anti-Ki-67 original. Es más, el Western blotting y los experimentos de unión competitiva demuestran claramente que el MIB-1, al igual que el anticuerpo anti-Ki-67 original, reacciona con un epítipo codificado por un elemento repetitivo de 66 pb presente en el gen del Ki-67. En inmunohistoquímica, los anticuerpos MIB-1 y anti-Ki-67 muestran idénticos patrones de tinción en secciones congeladas de amígdalas en serie (8). El anticuerpo MIB-1 reconoce al antígeno Ki-67 nativo y a fragmentos recombinantes de la molécula de Ki-67 (8).</p> <p>Como se demuestra mediante inmunohistoquímica, el anticuerpo reacciona de forma cruzada con proteína equivalente a la Ki-67 en diversos mamíferos, incluyendo vaca, perro, caballo, oveja (6) y cerdo.</p>
Precauciones	<ol style="list-style-type: none"> 1. Para uso por profesionales. 2. Este producto contiene azida sódica (NaN₃), un compuesto altamente tóxico en su forma pura. A las concentraciones en que está presente en el producto, aunque no se clasifican como peligrosas, la azida sódica puede reaccionar con las cañerías de plomo y cobre, formando acumulaciones de azidas metálicas altamente explosivas. Tras desechar el producto, abra el grifo y deje que salga abundante agua para despejar las cañerías de cualquier acumulación de azidas. 3. Como con cualquier producto derivado de fuentes biológicas, deben utilizarse los procedimientos de manipulación apropiados. 4. Utilice el equipo de protección personal adecuado para evitar el contacto con los ojos y la piel. 5. La solución que no se utilice deberá desecharse de acuerdo con las normativas locales, provinciales y nacionales.
Almacenamiento	<p>Almacenar a 2-8 °C. No utilizar después de la fecha de caducidad impresa en el vial. Si los reactivos se almacenan en condiciones diferentes a las especificadas, el usuario debe comprobarlas. No existen signos evidentes que indiquen inestabilidad de este producto. Por lo tanto, los controles positivo y negativo deberán analizarse de manera simultánea con las muestras del paciente. En caso de observarse una coloración inesperada que no pueda ser explicada por las variaciones en los procedimientos del laboratorio y se sospeche un problema con el anticuerpo, contáctese con la Asistencia Técnica de Dako.</p>
Preparación de las muestras	<p><u>Secciones de parafina:</u> el anticuerpo puede utilizarse para marcar secciones de tejido incluidas en parafina fijadas en formol.</p>

Pretratamiento: se requiere el pretratamiento de las secciones de tejido incluidas en parafina y fijadas en formol con epítipo de recuperación inducido por calor (HIER). Los mejores resultados se obtienen al tratar los tejidos con HIER usando Dako Target Retrieval Solution, Low pH (10x) (nº de catálogo S1699) diluido o EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (nº de catálogo K8005) diluido durante 20 minutos. Las secciones de tejido no deben secarse durante el tratamiento ni durante el procedimiento de tinción inmunohistoquímica posterior.

Secciones congeladas y preparaciones celulares: el anticuerpo puede utilizarse para marcar secciones congeladas fijadas en acetona y frotis de células fijados.

Procedimiento de tinción **Dilución:** Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen, número de catálogo M7240, puede utilizarse a un rango de dilución de 1:75-1:150 al aplicarlo en cortes de amígdala humana o mucosa intestinal humana fijados con formol e incluidos en parafina, con una recuperación del epítipo inducida por calor de 20 minutos en Target Retrieval Solution, Low pH (nº de catálogo S1699/K8005), y una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo primario. Las condiciones óptimas pueden variar según la muestra y el método de preparación, por lo que deberán determinarse individualmente en cada laboratorio. El control negativo recomendado es Dako Mouse IgG1, número de catálogo X0931, diluido a la misma concentración de IgG de ratón que el anticuerpo primario. A menos que se haya establecido la estabilidad del anticuerpo diluido y del control negativo en el procedimiento de tinción propiamente dicho, se recomienda diluir estos reactivos inmediatamente antes de su uso, o bien diluirlos con Dako Antibody Diluent, nº de catálogo S0809. Los controles positivo y negativo deberán realizarse de manera simultánea con la muestra del paciente.

Visualización: el sistema de visualización recomendado es EnVision™ FLEX, High pH (nº de catálogo K8000/K8010) o **Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse** (nº de catálogo K5007*) con una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente. Siga el procedimiento incluido con el kit de visualización.

Nota: utilice Dako Target Retrieval Solution, **Low pH** (10x) (nº de catálogo S1699) diluido EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, **Low pH** (50x) (nº de catálogo K8005) diluido para la HIER.

**K5007 no está disponible en los Estados Unidos.*

Automatización: el anticuerpo es adecuado para la tinción inmunohistoquímica mediante plataformas automatizadas tales como Dako Autostainer y Autostainer Link 48.

Limitaciones específicas del producto En inmunohistoquímica se ha observado un marcado ocasional de componentes de los tejidos en las paredes de los vasos y en el estroma pancreático.

Características de tinción Las células marcadas por el anticuerpo muestran un patrón de tinción nuclear, excepto en las células mitóticas, en las que el anticuerpo marca a los cromosomas y al citoplasma.

Tejidos normales: en el intestino delgado y el colon, el anticuerpo marca a las células del cuello y a las células profundas de las criptas de la mucosa. Lo mismo ocurre con las células de los centros germinativos de las placas de Peyer. Las células del epitelio superficial y otras células de la mucosa, por ejemplo, las células de Paneth y las células del tejido conjuntivo de la submucosa, dan completamente negativo con el anticuerpo. Lo mismo ocurre con las células musculares, exceptuando unas cuantas células positivas en los músculos lisos. Riñón, hígado, páncreas y cerebro dan negativo (9).

Tejidos anormales: en un estudio realizado sobre 123 sarcomas de tejidos blandos, el anticuerpo MIB-1 mostró una expresión máxima del antígeno Ki-67 en los histiocitomas fibrosos malignos y una expresión mínima en los liposarcomas. Asimismo, el anticuerpo se aplicó satisfactoriamente para la identificación del antígeno Ki-67 en 221 carcinomas de próstata (2) y en 919 carcinomas mamarios (3). Se ha comunicado tinción membranosa/citoplasmática en un estudio de 322 carcinomas ductales invasivos, y que la Ki-67 membranosa citoplasmática se asocia a tumores de grado 3, negatividad ER y amplificación *HER2* (10).

Referencias

- Huhtanen RL, Blomqvist CP, Wiklund TA, Böhling TO, Virolainen MJ, Tukiainen EJ, et al. Comparison of the Ki-67 score and S-phase fraction as prognostic variables in soft-tissue sarcoma. *Br J Cancer* 1999; 79:945- 51.
- Borre M, Bentzen SM, Nerstrøm B, Overgaard J. Tumor cell proliferation and survival in patients with prostate cancer followed expectantly. *J Urol* 1998; 159:1609-14.
- Seshadri R, Leong AS-Y, McCaul K, Firgaira FA, Setlur V, Horsfall DJ. Relationship between *p53* gene abnormalities and other tumour characteristics in breast-cancer prognosis [published erratum appears in *Int J Cancer* 1996; 69:354]. *Int J Cancer* 1996; 69:135-41.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker H-H, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133:1710-5.
- Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 1991; 138:867-73.
- Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown [review]. *J Cell Physiol* 2000; 182:311-22.
- Key G, Kubbutat MH, Gerdes J. Assessment of cell proliferation by means of an enzyme-linked immunosorbent assay based on the detection of the Ki-67 protein. *J Immunol Methods* 1994; 177:113-7.
- Key G, Becker MHG, Baron B, Duchrow M, Schlüter C, Flad H-D, et al. New Ki-67-equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. *Lab Invest* 1993; 68:629-36.
- Cattoretti G, Becker MHG, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 1992; 168:357-63.
- Faratian D, Munro A, Twelves C, Bartlett JMS. Membranous and cytoplasmic staining of Ki67 is associated with *HER2* and ER status in invasive breast carcinoma. *Histopathology* 2009;54:254-257.

FLEX
Monoclonal Mouse
Anti-Human
Estrogen Receptor α
 Clon 1D5
Ready-to-Use
 (Dako Autostainer/Autostainer Plus)

Nº de catálogo IS657

Uso previsto	<p>Para uso en diagnóstico <i>in vitro</i>.</p> <p>FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Estrogen Receptor α, Clon 1D5, Ready-to-Use (DakoAutostainer/Autostainer Plus) está indicado para su uso en inmunohistoquímica junto con los instrumentos Dako Autostainer/Autostainer Plus. El anticuerpo marca las células α-positivas del receptor del estrógeno y resulta de utilidad para la evaluación del estado del receptor de estrógeno en carcinomas de mama humanos (1-3). La interpretación de los resultados de cualquier tinción o su ausencia debe complementarse con estudios morfológicos con controles adecuados y debe evaluarla un anatomopatólogo cualificado en el contexto de la historia clínica del paciente y de otras pruebas diagnósticas.</p>
Sinónimos del antígeno ERα	
Resumen y explicación	<p>Los receptores de esteroides muestran un alto grado de afinidad y especificidad por sus ligandos. El receptor de estrógeno humano (ER) es una proteína dimérica de 65 kDa localizada principalmente en los núcleos celulares y que pertenece a una clase de proteínas transactivadoras que estimulan la transcripción mediante la unión a elementos de ADN específicos, también conocidos como elementos de respuesta hormonal. Mediante la unión del estrógeno, el ER es inducido a estimular la transcripción de genes, por lo cual también es conocido como factor potenciador inducible (4, 5).</p> <p>Los estudios históricos han demostrado que la presencia del ER guarda relación con la evolución sin tratamiento (es decir, pronóstico de carcinoma mamario invasivo bien diferenciado) y con la respuesta al tratamiento antihormonal (p. ej. tamoxifeno). Se ha observado que en animales los estrógenos se concentran preferentemente en los órganos a los que el estrógeno se dirige selectivamente y en el carcinoma mamario humano y está bien documentado que el ER media los efectos mitógenos del estrógeno. Las investigaciones sobre los mecanismos biológicos del crecimiento del carcinoma mamario han hallado que el porcentaje de crecimiento depende de la presencia de estrógeno o progesterona, o de ambos, en la mayor parte de los carcinomas mamaros (5). Así, la presencia del receptor de estrógeno en los carcinomas mamaros se considera un factor pronóstico y predictivo validado para aplicar tratamiento antihormonal al paciente (5, 6).</p> <p>Consulte las <i>General Instructions for Immunohistochemical Staining</i> de Dako o las instrucciones del sistema de detección de los procedimientos de IHQ para: 1) Principio del procedimiento, 2) Material necesario, pero no suministrado, 3) Almacenamiento, 4) Preparación de la muestra, 5) Procedimiento de tinción, 6) Control de calidad, 7) Solución de problemas, 8) Interpretación de la tinción y 9) Limitaciones generales.</p>
Reactivo suministrado	<p>Anticuerpo monoclonal de ratón listo para usar suministrado en forma líquida en un tampón que contiene proteína estabilizadora y 0,015 mol/L de azida de sodio.</p> <p><u>Clon:</u> 1D5 (7). <u>Isotipo:</u> IgG1, kappa.</p>
Inmunógeno	<p>Receptor de estrógeno humano recombinante soluble (7).</p>
Especificidad	<p>El anticuerpo reacciona de forma específica con ERα y no muestra reacción con ERβ (8, 9). El epítipo se encuentra en el dominio terminal N (región A/B) de ERα. En inmunotransferencia de Western en la que se emplean extractos proteicos de células COS transferidas con un plásmido vóctor en que el que se expresaba ER, la estirpe celular del cáncer de mama humano MCF-7 y el tejido endometrial humano, el anticuerpo marca un polipéptido de aproximadamente 67 kDa que corresponde a ER. No se observó ninguna marca en células COS transferidas con plásmidos que contuvieran un mutante borrado del que faltaran secuencias que codificasen para la región A/B de ER (7).</p> <p>El anticuerpo reacciona con la proteína equivalente a ERα en ratas (8), según puso de manifiesto la inmunohistoquímica.</p>
Precauciones	<ol style="list-style-type: none"> 1. Para usuarios profesionales. 2. Este producto contiene azida de sodio (NaN₃), un compuesto químico altamente tóxico en su forma pura. Aunque a las concentraciones presentes en el producto no está clasificada como peligrosa, la azida de sodio puede reaccionar con cañerías de plomo y cobre formando acumulaciones de azidas metálicas altamente explosivas. Una vez desechado el producto, deje correr abundante cantidad de agua para evitar acumulaciones de azidas metálicas en las cañerías. 3. Al igual que con cualquier producto derivado de fuentes biológicas, deberán aplicarse los procedimientos adecuados de manejo. 4. Utilice el equipo de protección personal adecuado para evitar el contacto con los ojos y la piel. 5. La solución no utilizada debe desecharse con arreglo a las normativas locales, provinciales y nacionales.

Almacenamiento

Almacenar a 2-8 °C. No utilizar después de la fecha de caducidad impresa en el vial. Si los reactivos se almacenan en condiciones diferentes a las especificadas, el usuario debe comprobarlas. No existen signos evidentes que indiquen la inestabilidad de este producto. Por lo tanto, los controles positivo y negativo deberán realizarse de manera simultánea con las muestras del paciente. En caso de observarse una coloración inesperada que no pueda explicarse por las variaciones en los procedimientos del laboratorio y se sospeche de la existencia de un problema con un anticuerpo, contáctese con la Asistencia Técnica de Dako.

Preparación de las muestras incluido material necesario, pero no suministrado

El anticuerpo puede utilizarse para marcar cortes de tejido fijados con formol e incluidos en parafina. Las muestras de tejido deben cortarse en secciones de aproximadamente 4 µm.

Se requiere el tratamiento previo con recuperación del epítipo inducida por calor (HIER) usando Dako PT Link (nº de catálogo PT100/PT101). Para más detalles, consulte la Guía del usuario de PT Link. Se recomienda pretratar los tejidos con EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (nº de catálogo K8004) durante 20 minutos a 97 °C seguidos de 5 minutos en EnVision™ FLEX Wash Buffer (nº de catálogo K8007).

Cortes incluidos en parafina: se recomienda el tratamiento previo de los cortes de tejido, fijados en formol e incluidos en parafina usando el procedimiento de preparación de la muestra 3 en 1 para Dako PT Link. Siga el procedimiento de tratamiento previo explicado en el prospecto de Envision™ FLEX + Mouse High pH (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (nº de catálogo K8012). Nota: después de la tinción, se deben deshidratar, enjuagar y montar los cortes usando un medio de montaje permanente.

Los cortes de tejido no se deben secar durante el tratamiento ni durante el siguiente procedimiento de tinción inmunohistoquímica.

Procedimiento de tinción incluido material Necesario, pero no suministrado

El sistema de visualización recomendado es EnVision™ FLEX+ Mouse, High pH (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (nº de catálogo K8012) empleado de acuerdo con el protocolo que se especifica a continuación. Los reactivos deberán diluirse adecuadamente antes de su uso. Todos los pasos se deben realizar a temperatura ambiente (20-25 °C).

1. Incube el corte de tejido con 200 µL de EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (nº de catálogo K8010) durante 5 (±1) minutos
2. Enjuague en EnVision™ FLEX Wash Buffer (nº de catálogo K8007) durante 1-5 minutos
3. Incube el corte de tejido con 200 µL de anticuerpo primario (nº de catálogo IS657) durante 20 (±1) minutos
4. Enjuague en EnVision™ FLEX Wash Buffer (nº de catálogo K8007) durante 1-5 minutos
5. Incube el corte de tejido con 200 µL de EnVision™ FLEX+ Mouse (LINKER) (nº de catálogo K8022) durante 15 (±1) minutos
6. Enjuague en EnVision™ FLEX Wash Buffer (nº de catálogo K8007) durante 1-5 minutos
7. Incube el corte de tejido con 200 µL de EnVision™ FLEX/HRP (nº de catálogo DM802) durante 20 (±1) minutos
8. Enjuague en EnVision™ FLEX Wash Buffer (nº de catálogo K8007) durante 1-5 minutos
9. Incube el corte de tejido con 200 µL de EnVision™ FLEX Wash Buffer (nº de catálogo K8007) durante 5 (±1) minutos
10. Enjuague en EnVision™ FLEX Wash Buffer (nº de catálogo K8007) durante 1-5 minutos
11. Incube el corte de tejido con 400 µL de EnVision™ FLEX Substrate Working Solution (nº de catálogo DM823 y DM827) durante 10 (±1) minutos
12. Enjuague en EnVision™ FLEX Wash Buffer (nº de catálogo K8007) durante 1-5 minutos
13. Contratiña el portaobjetos con EnVision™ FLEX Hematoxylin (nº de catálogo K8018) durante 5 (±1) minutos
14. Enjuague en agua desionizada durante 1-5 minutos
15. Incube el corte de tejido con 200 µL de EnVision™ FLEX Wash Buffer (nº de catálogo K8007) durante 5 (±1) minutos
16. Enjuague en agua desionizada durante 1-5 minutos
17. Monte los portaobjetos en un medio de montaje permanente.

Tabla de programación para el ensayo recomendado:

Programming Grid												
Slides	File	Edit lists		Copy			Auto		Neg.Ctl		Pos.Ctl	
Slide #	Dispense	End. Enz. Block	Pretreatment	Primary Antibody	Secondary Reagent	Tertiary Reagent	Auxiliary	Substrate	Auxiliary	Auxiliary	Auxiliary	Auxiliary
2	0 0 µl	200 µl	pH 9 TRS (Manual Step)	ER 1D5 IS6 20'	Mouse Link 15'	FLEX HRP 20'	TBST 5'	DAB+ 10'	Hematoxyli 5'	TBST 5'		
2	0 0 µl	200 µl	pH 9 TRS (Manual Step)	NCR (ER) 20'	Mouse Link 15'	FLEX HRP 20'	TBST 5'	DAB+ 10'	Hematoxyli 5'	TBST 5'		
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												
11												
12												
13												
14												
15												
16												

Program: ER1D5

Slide Info Protocol Template Next Print Exit Help

V4.2.0 IHC 9/21/10 11:40 AM a(**) DAKO CORPORATION DC3400

Todos los pasos de incubación deben realizarse a temperatura ambiente. Consulte el Manual del usuario para más detalles sobre el instrumento correspondiente. El paso Auxiliar debe configurarse a "tampón de enjuague" en sesiones de tinción con ≤10 portaobjetos. En el caso de sesiones de tinción con > 10 portaobjetos, el paso Auxiliary debe configurarse a "none". De esta manera se aseguran tiempos de lavado semejantes.

Se recomienda realizar los controles positivo y negativo de manera simultánea empleando el mismo protocolo que para las muestras del paciente. El tejido de control positivo debe incluir el cuello uterino y las células y estructuras deben mostrar patrones de reacción como se describe para este tejido en "Características de resultados" en todas las muestras positivas. El reactivo de control negativo recomendado es FLEX Negative Control, Mouse (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (nº de catálogo IS750).

Interpretación de la tinción

Las células marcadas con el anticuerpo muestran una tinción nuclear. Las marcas citoplasmáticas, en caso de que se observen, se deberán considerar como no específicas. En las evaluaciones positivas se han informado de valores límite comprendidos entre >0% y 45% (10-18).

Limitaciones del producto

1. Los resultados falso negativos podrían ser causados por la degradación del antígeno en los tejidos con el transcurso del tiempo. Las muestras deben teñirse dentro de los 2 meses siguientes al montaje de los tejidos en los portaobjetos, cuando se almacenan a temperatura ambiente (19).
2. Para obtener resultados óptimos y reproducibles, la proteína ER requiere la recuperación del epitopo inducida por calor (HIER) cuando los tejidos se fijan de la forma habitual (formol tamponado neutro) y se incluyen en parafina.
3. No se ha validado el empleo del Dako Monoclonal Mouse Anti-Human ERα, Clone 1D5, en tejidos con otros fijadores que el formol.
4. Los parámetros preanalíticos, incluidos la fijación y el procesamiento de tejidos, pueden influir en las condiciones del procedimiento de tinción.

Características de resultados

Tejidos normales: en el cuello del útero, las células epiteliales escamosas y las células estromales muestran una reacción nuclear de moderada a fuerte, y las células escamosas superficiales e intermedias muestran una reacción a la tinción nuclear de moderada a débil. Se ha probado el anticuerpo en una amplia gama de tejidos normales diferentes. Se observa marcado nuclear positivo en la glándula mamaria, la amígdala (tinción focal débil de las células epiteliales escamosas y células del centro germinativo), el útero (endometrio) y las células de revestimiento mesenquimales y alveolares del pulmón. En ocasiones quedan marcados los granulocitos, los macrófagos y las células estromales fibromusculares de la próstata en el citoplasma. Se ha observado ocasionalmente la tinción no específica de tejido necrótico y secreciones pulmonares (20).

Tejidos anormales: numerosos estudios en secciones de tejido de cáncer de mama fijados con formol e incluidos con parafina han puesto de manifiesto que el Anti-ERα, clon 1D5, resulta fiable y eficaz cuando se trata de evidenciar el estado de la ERα (1, 2, 21, 22). El anticuerpo permite asimismo pronosticar de forma precisa la respuesta a los tratamientos endocrinos (2, 21, 22). Se han presentado unos datos de sensibilidad del 90% (2) y el 89% (21), y datos de especificidad del 51% (2) y el 73% (21) al comparar el marcado de los anticuerpos con la respuesta al tratamiento con tamoxifeno. En (2), se utilizó un índice H con una referencia arbitraria para la positividad de 50, mientras que en (21) se utilizó un punto de referencia del 10% de células positivas. En otro estudio, el anticuerpo marcó 10/25 insulinomas pancreáticos (23). En algunos casos han quedado marcados tumores linfoides y neoplasias no linfoides, como los melanomas.

Referencias bibliográficas

- Mauri FA, Veronese S, Frigo B, Giraldo S, Losi L, Gambacorta M, et al. ER1D5 and H222 (ER-ICA) antibodies to human estrogen receptor protein in breast carcinomas. *Appl Immunohistochem* 1994; 2:157-63.
- Goulding H, Pinder S, Cannon P, Pearson D, Nicholson R, Snead D, et al. A new immunohistochemical antibody for the assessment of estrogen receptor status on routine formalin-fixed tissue samples. *Hum Pathol* 1995; 26:291-4.
- Shaw JA, Udokang K, Mosquera J-M, Chauhan H, Jones JL, Walker RA. Oestrogen receptors alpha and beta differ in normal human breast and breast carcinomas. *J Pathol* 2002; 198:450-7.
- Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin J-R, Chambon P. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 1987; 51:941-51.
- Elledge RM, Fuqua SAW. Ch. 31: Estrogen and Progesterone Receptors. In: *Diseases of the Breast*. Harris JR et al. eds. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2000:471-85.
- Fitzgibbons FK, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, et al. Prognostic factors in breast cancer: College of American Pathologists consensus statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124:966-78.
- Al Saati T, Clamens S, Cohen-Knafo E, Faye JC, Prats H, Coindre JM, et al. Production of monoclonal antibodies to human estrogenreceptor protein (ER) using recombinant ER (RER). *Int J Cancer* 1993;55: 651-4.
- Nishihara E, Nagayama Y, Inoue S, Hiroi H, Muramatsu M, Yamashita S, et al. Ontogenetic changes in the expression of estrogen receptor α and β in rat pituitary gland detected by immunohistochemistry. *Endocrinology* 2000; 141:615-20.
- Pettersson K, Grandien K, Kuiper GGJM, Gustafsson J-Å. Mouse estrogen receptor β forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor α . *Mol Endocrinol* 1997;11:1486-96.
- Chebil G, Bendahl PO, Fernö M; South Sweden Breast Cancer Group; North Sweden Breast Cancer Group. Estrogen and progesterone receptor assay in paraffin-embedded breast cancer--reproducibility of assessment. *Acta Oncol* 2003; 42:43-7.
- Fernö M, Andersson C, Fallenius G, Idvall I. Oestrogen receptor analysis of paraffin sections and cytosol samples of primary breast cancer in relation to outcome after adjuvant tamoxifen treatment. The South Sweden Breast Cancer Group. *Acta Oncol* 1996; 35:17-22.
- Andersen J. Determination of estrogen receptors in paraffin-embedded tissue. Techniques and the value in breast cancer treatment. *Acta Oncol* 1992; 31:611-27.
- Ferrero-Poüs M, Trassard M, Le Doussal V, Hacène K, Tubiana-Hulin M, Spyrtos F. Comparison of enzyme immunoassay and immunohistochemical measurements of estrogen and progesterone receptors in breast cancer patients. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2001; 9:267-75.
- Santeusano G, Mauriello A, Ventura L, Liberati F, Colantoni A, Lasorella R, et al. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in breast carcinomas using monoclonal antibodies that recognize different domains of the receptor molecule. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2000; 8:275-84.
- Grabau DA, Thorpe SM, Knoop A, Vach W, Schröder HD, Blichert-Toft M, et al. Immunohistochemical assessment of oestrogen and progesterone receptors: correlations with the DCC method and clinical outcome in primary breast cancer patients. *Breast* 2000; 9:208-17.
- Molino A, Micciolo R, Turazza M, Bonetti F, Piubello Q, Corgnati A, Sperotto L, Martignoni G, Bonetti A, Nortilli R, et al. Estrogen receptors in 699 primary breast cancers: a comparison of immunohistochemical and biochemical methods. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 34:221-8.
- Layfield LJ, Gupta D, Mooney EE. Assessment of tissue estrogen and progesterone receptor levels: A survey of current practice, techniques, and quantitation methods. *Breast J* 2000; 6:189-96.
- Leers MP, Hoop JG, van Beers M, van Rodijnen N, Pannebakker M, Nap M. Determination of threshold values for determining the size of the fraction of steroid hormone receptor-positive tumor cells in paraffin-embedded breast carcinomas. *Cytometry B Clin Cytom* 2005; 64:43-52.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS). Quality assurance for immunocytochemistry; Approved guideline. Approved guideline. CLSI document MM4-A (1-56238-396-5)- CLSI, 940 west Valley Road, Suite 1400. Wayne, PA 19087-1898 USA 1999.
- Dako Technical Report TR10-52.
- Pertschuk LP, Feldman JG, Kim Y-D, Braithwaite L, Schneider F, Braverman AS, et al. Estrogen receptor immunocytochemistry in paraffin embedded tissues with ER1D5 predicts breast cancer endocrine response more accurately than H222Spy in frozen sections or cytosol- based ligand-binding assays. *Cancer* 1996; 77:2514-9.
- Barnes DM, Harris WH, Smith P, Millis RR, Rubens RD. Immunohistochemical determination of oestrogen receptor: comparison of different methods of assessment of staining and correlation with clinical outcome of breast cancer patients. *Br J Cancer* 1996; 74:1445-51.
- Alabraba EB, Taniere P, Reynolds GM, Stewart PM, Wigmore SJ, Bramhall SR. Expression and functional consequences of oestrogen and progesterone receptors in human insulinomas. *Endocr Relat Cancer* 2007; 14:1081-8.

Explicación de los símbolos

REF	Referencia	 2°C - 8°C	Limitación de temperatura		Fecha de caducidad
	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>		Contiene suficiente para <n> ensayos		Fabricante
IVD	Consulte las instrucciones de uso	 LOT	Código de lote		



FLEX
Monoclonal Mouse
Anti-Human
Progesterone Receptor
 Clone PgR 636
Ready-to-Use
 (Dako Autostainer/Autostainer Plus)

N.º de catálogo IS068

Uso previsto

Para uso diagnóstico in vitro.

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Progesterone Receptor, Clone PgR 636, Ready-to-Use, (Dako Autostainer/Autostainer Plus), está destinado para su uso en inmunohistoquímica junto con EnVision FLEX+, el kit de visualización High pH en instrumentos Autostainer/Autostainer Plus para detectar de forma semicuantitativa el receptor de la progesterona humana en carcinoma de mama humano en parafina y fijado con formol. Este anticuerpo marca las células positivas para receptor de progesterona y permite evaluar el estado de los receptores de la progesterona en los carcinomas mamarios humanos.

La interpretación de los resultados de cualquier tinción, o su ausencia, debe complementarse mediante estudios morfológicos con controles adecuados y debe evaluarla un anatomopatólogo cualificado en el contexto de la historia clínica del paciente y de otras pruebas diagnósticas.

Sinónimo del antígeno

PR

Resumen y explicación

El papel de los receptores hormonales de esteroides en el cáncer de mama es bien conocido (1,2). La ausencia de receptores de estrógeno (ER) y receptores de progesterona (PR) pronostica una recurrencia precoz y una escasa supervivencia de pacientes con cáncer de mama (3-6). Asimismo, la presencia de ER y PR en tumores pronostica la posibilidad de beneficiarse con tamoxifeno y otros tratamientos endocrinos. La medición de ER y PR puede determinarse semicuantitativamente utilizando IHC, o cuantitativamente utilizando DCC o EIA. La correlación entre las evaluaciones semicuantitativa y cuantitativa de PR osciló entre el 73 y el 91%, según el laboratorio y el anticuerpo utilizado (7-9).

Consulte el documento de Dako *General Instructions for Immunohistochemical Staining* (Instrucciones generales para la tinción inmunohistoquímica) o las instrucciones del sistema de detección de los procedimientos de IHC para: 1) Principio del procedimiento, 2) Material necesario, pero no suministrado, 3) Almacenamiento, 4) Preparación de las muestras, 5) Procedimiento de tinción, 6) Control de calidad, 7) Solución de problemas, 8) Interpretación de la tinción, 9) Limitaciones generales.

Reactivo suministrado

El anticuerpo monoclonal de ratón listo para su uso se suministra en forma líquida en una solución tampón que contiene proteína estabilizante y 0,015 mol/l de NaN₃.

Clon: PgR 636 (10) Isotipo: IgG1, kappa

Inmunógeno

Recombinante de forma A de longitud total, fijado en formol, de receptor de progesterona humana (10)

Especificidad

Se ha demostrado que el anti-PR, PgR 636 reacciona con las formas PR-A y PR-B por transferencia de Western de extractos de células completas, reaccionando tanto con el PR libre como ligado a hormonas (10). El epítipo ha sido mapeado al dominio aminoterminal compartido por PR-A y PR-B.

Precauciones

1. Para uso en diagnóstico in vitro.
2. Para usuarios profesionales.
3. Este producto contiene azida sódica (NaN₃), un compuesto químico altamente tóxico en su forma pura. A las concentraciones en las que está presente en el producto, aunque no se clasifican como peligrosas, la azida sódica puede reaccionar con las cañerías de plomo y cobre, lo que formará acumulaciones de azidas metálicas muy explosivas. Tras desechar el producto, abra el grifo y deje que salga abundante agua para despejar las cañerías de cualquier acumulación de azidas.
4. Como con cualquier producto derivado de fuentes biológicas, deben utilizarse los procedimientos de manipulación apropiados.
5. Utilice el equipo de protección personal adecuado para evitar el contacto con los ojos y la piel.
6. La solución no utilizada debe desecharse de acuerdo con las normativas locales, nacionales y de la UE.

Almacenamiento

Almacenar a una temperatura de 2-8 °C. No debe utilizarse después de la fecha de caducidad que aparece impresa en el vial. Si los reactivos se almacenan en condiciones diferentes a las especificadas, el usuario debe comprobarlas. No existen signos evidentes que indiquen inestabilidad en este producto. Por lo tanto, los controles positivo y negativo deberán realizarse de manera simultánea con las muestras del paciente. Si observa tinciones inesperadas que no puedan atribuirse a las variaciones en los procedimientos de laboratorio y se sospecha que existe un problema con el anticuerpo, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Dako.

Preparación de las muestras incluido material necesario, pero no suministrado	<p>Cortes de parafina: el anticuerpo se puede utilizar para marcar cortes de tejido en parafina y fijados en formol. Las muestras de tejido deben cortarse en secciones de aproximadamente 4 µm.</p> <p>Pretratamiento: se requiere el pretratamiento de cortes de tejidos en parafina y fijados en formol. Se obtienen resultados óptimos al pretratar los tejidos mediante HIER con EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) diluido (n.º de catálogo K8012/K8004). El desparafinado, rehidratación y recuperación del epítipo se puede realizar en Dako PT Link (n.º de catálogo PT100/PT101/PT200). Para más detalles, consulte la Guía del usuario de PT Link. Para PT Link se deben aplicar los siguientes parámetros: temperatura de precalentamiento: 65 °C; temperatura y tiempo de recuperación del epítipo: 97 °C para 20 (±1) minutos; enfriar a 65 °C. Extraiga a la gradilla de portaobjetos del tanque PT e introduzca los portaobjetos inmediatamente en un bote o tanque (p. ej., PT Link Rinse Station, n.º de catálogo PT109) que contenga EnVision FLEX Wash Buffer (20x), diluido y a temperatura ambiente (n.º de catálogo K8007). Deje los portaobjetos en Wash Buffer durante 1-5 minutos.</p> <p>Los cortes de tejidos no deben secarse durante el proceso de pretratamiento ni durante el posterior procedimiento de tinción inmunohistoquímica. Para una mejor adherencia de los cortes de tejidos a los portaobjetos de vidrio, se recomienda el uso de FLEX IHC Microscope Slides (n.º de catálogo K8020). Después de la tinción, se deben deshidratar, enjuagar y montar los cortes usando un medio de montaje permanente.</p>
Procedimiento de tinción incluido material necesario, pero no suministrado	<p>El sistema de visualización recomendado es EnVision FLEX+, Mouse, High pH (n.º de catálogo K8012). Los pasos de tinción y los tiempos de incubación han sido preprogramados en el software de los instrumentos Dako Autostainer/Autostainer Plus usando los siguientes protocolos:</p> <p>Plantilla del protocolo: FLEXRTU2 (volumen de dispensación 200 µl) o FLEXRTU3 (volumen de dispensación 300 µl)</p> <p>Autoprograma: PR (sin contratinción) o Autoprograma: PRH (con contratinción)</p> <p>El paso auxiliar debe configurarse a "tampón de enjuague" en sesiones de tinción con ≤10 portaobjetos. En el caso de sesiones de tinción con >10 portaobjetos, el paso auxiliar debe configurarse a "ninguno". De esta manera se aseguran tiempos de lavado semejantes.</p> <p>Todos los pasos de incubación deben realizarse a temperatura ambiente. Consulte el Manual del usuario para más detalles sobre el instrumento correspondiente. Si todavía no están disponibles los protocolos en el instrumento Dako Autostainer utilizado, comuníquese con el servicio técnico de Dako.</p> <p>Se recomienda la contratinción en hematoxilina usando EnVision FLEX Hematoxylin (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (n.º de catálogo K8018). Se recomienda un medio de montaje no acuoso y permanente.</p> <p>Los controles positivo y negativo deberán realizarse de manera simultánea empleando el mismo protocolo que para las muestras del paciente. El tejido de control positivo debe incluir células epiteliales columnares, células epiteliales escamosas basales y células estromales, y las células/estructuras deben exhibir patrones de reacción como se describe para este tejido en "Características de resultados" en todas las muestras positivas. El reactivo de control negativo recomendado es FLEX Negative Control, Mouse (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (n.º de catálogo IS750).</p>
Interpretación de la tinción	<p>El patrón de tinción celular es nuclear. Si se observa marcado citoplasmático debe considerarse como no específico. Un resultado positivo se define como tinción nuclear en ≥1% de células tumorales sea cual sea la intensidad de la tinción. Una medida que se adecua a la recomendación de ASCO/CAP, que establece la obtención de un punto de referencia ≥1% de células tumorales positivas para poder realizar una evaluación positiva (11).</p>
Limitaciones específicas del producto	<ol style="list-style-type: none"> 1. Es posible que la degradación del antígeno en los tejidos provocase con el tiempo resultados falsos negativos. Las muestras deben teñirse dentro de los 2 meses siguientes al montaje de los tejidos en los portaobjetos, cuando se almacenan a temperatura ambiente (12). 2. Los linfocitos y las células estromales pueden exhibir una tinción positiva con el anticuerpo FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human PR clone PgR 636 y no debe interpretarse o considerarse que se trata de tinción de células tumorales PR. 3. Para obtener resultados óptimos y reproducibles, la proteína PR requiere recuperación diana cuando los tejidos se fijan de manera estándar (formol tamponado neutro) y se incluyen en parafina. 4. El empleo de Dako Anti-PR, Clone PgR 636 en tejidos con fijadores diferentes al formol no ha sido validado.
Características de resultados	<p>Precisión: se recogieron para ser analizados cortes en serie de cada uno de los doce bloques diferentes de carcinoma de mama, en parafina y fijados en formol que representaban un intervalo dinámico de expresión de PR. Los análisis se realizaron de la siguiente forma:</p> <p>Precisión intraanálisis: siguiendo el protocolo estándar para EnVision FLEX+, High pH, se tiñeron tres secciones de cada bloque de tejido con Anti-PR, Clone PgR 636. Simultáneamente se tiñó una sección de cada bloque con un reactivo de control negativo.</p> <p>Precisión interanálisis: el procedimiento anterior se repitió en cinco días no consecutivos; en cada una de las cinco ocasiones se tiñó una sección de cada bloque de tejido. Simultáneamente se tiñó una sección de cada bloque de tejido con un reactivo de control negativo.</p> <p>Precisión interinstrumento: durante la tinción de un total de tres secciones de cada bloque de tejido, el procedimiento descrito se realizó en tres instrumentos Autostainer diferentes por parte de tres operadores diferentes. Simultáneamente se tiñó un portaobjetos de cada bloque de tejido con un reactivo de control negativo.</p> <p>Los experimentos de precisión con Anti-PR, Clone PgR 636 arrojaron resultados consistentes con las pruebas intraensayo, interensayo e interinstrumento. Se mantuvieron las mismas condiciones de análisis durante todo el estudio, y entre un análisis y otro se conservaron los reactivos a una temperatura de entre 2 y 8 °C.</p> <p>Tejidos normales: la Tabla 1 contiene un resumen de la inmunoreactividad de Anti-PR, Clone PgR 636 en el panel recomendado para tejidos normales. Todos los tejidos se fijaron con formol y se incluyeron en parafina, y se tiñeron con Anti-PR, Clone PgR 636, según las instrucciones del prospecto. Se observó tinción citoplasmática con Anti-PR, Clone PgR 636 en diferentes elementos de tejido que incluyen el epitelio, el estroma, las células intersticiales y las células inflamatorias. Aunque se observó tinción citoplasmática, no se consideró un signo para diagnóstico de acuerdo con el uso previsto de este anticuerpo.</p>

Tabla 1: Resumen de la reactividad del Anti-PR, Clon PgR 636 en tejido normal

Tipo de tejido (n.º analizado)	Elementos tisulares positivos	Tipo de tejido (n.º analizado)	Elementos tisulares positivos
Suprarrenal (3)	1/3 células en la zona glomerular (50%), nuclear	Nervio, periférico (3)	0/3
	1/3 células en la zona glomerular (50%), nuclear	Ovario (3)	3/3 células estromales (50-70%), nuclear
Médula ósea (3)	0/3	Páncreas (3)	2/3 islotes pancreáticos de Langerhans (50-90%), nuclear
Mamario (3)	2/3 células epiteliales glandulares (50-90%), nuclear	Paratiroides (3)	3/3 células epiteliales glandulares (1-10%), nuclear
Cerebelo (3)	0/3	Hipófisis (3)	3/3 células glandulares pituitarias (1-40%), nuclear
Cerebro (3)	1/3 células meníngeas (100%), nuclear	Próstata (3)	3/3 células estromales (30-80%), nuclear
Cuello uterino (3)	3/3 células epiteliales (50-90%), nuclear	Glándula salivar (3)	3/3 células epiteliales glandulares (<1%-60%), nuclear
	3/3 estroma, incluidas células inflamatorias (50%), nuclear	Piel (3)	0/3
Colon (3)	1/3 células linfoides/inflamatorias (10%), nuclear	Intestino delgado (3)	3/3 células estromales e inflamatorias (30-50%), nuclear
	1/3 células linfoides/inflamatorias (10%), nuclear	Bazo (3)	0/3
Esófago (3)	1/3 células estromales (50%), nuclear	Estómago (3)	1/3 células intersticiales (20%), nuclear
Riñón (3)	3/3 células intersticiales (1-5%), nuclear	Testículo (3)	3/3 células intersticiales (5-80%), nuclear
Hígado (3)	0/3	Timo (3)	0/3
Pulmón (3)	2/3 células intersticiales (1-10%), nuclear	Tiroides (3)	0/3
	2/3 células inflamatorias (1-10%), nuclear	Amígdala (3)	0/3
Células mesoteliales (2)	0/2	Útero (2)	2/2 células epiteliales glandulares (100%), nuclear
Músculo, cardíaco (3)	3/3 miocitos (30%), perinuclear		2/2 células estromales del miometrio (100%), nuclear
Músculo, esquelético (3)	0/3		

Comparación del método: el análisis de Monoclonal Mouse Anti-Human PR, Clon PgR 636 se realizó con EnVision FLEX+ de acuerdo con las pautas de ASCO/CAP (punto de referencia $\geq 1\%$) (11). Se realizó un análisis Anti-PR (Clon 1294) utilizando el kit Dako ER/PR pharmDx y se puntuó siguiendo las pautas de Allred descritas en el prospecto. La tabla 2 contiene los datos obtenidos en la comparación de métodos. Utilizando las respectivas pautas de puntuación, Monoclonal Mouse Anti-Human PR, Clon PgR 636 concordaba con los anticuerpos de PR del kit Dako ER/PR pharmDx, que mostraban valores concordantes generales, positivos y negativos del 94,5%, 95,8% y 93,1%, respectivamente. La Tabla 3 muestra la comparación de ambos ensayos cuando se puntúa utilizando las pautas de ASCO/CAP.

Tabla 2: Concordancia entre Anti-PR, Clon PgR 636 (ASCO/CAP) y el componente Anti-PR del kit ER/PR pharmDx (Allred)

		Componente anti-PR del kit ER/PR pharmDx		Total
		Positivos	Negativos	
Monoclonal Mouse Anti-Human PR, Clon PgR 636	Positivos	115	8	123
	Negativos	5	108	113
Total		120	116	236

Tanto por ciento de concordancia de resultados positivos = 95,8% (IC del 95%: 91,1-96,8)

Tanto por ciento de concordancia de resultados negativos = 93,1% (IC del 95%: 90,5-96,7)

Tanto por ciento de concordancia general = 94,5% (IC del 95%: 90,8-96,8)

Tabla 3: Concordancia entre Anti-PR, Clone PgR 636 (ASCO/CAP) y el componente Anti-PR del kit ER/PR pharmDx (ASCO/CAP)

		Componente anti-PR del kit ER/PR pharmDx		Total
		Positivos	Negativos	
Monoclonal Mouse Anti-Human PR, Clone PgR 636	Positivos	115	8	123
	Negativos	1	112	113
	Total	116	120	236

Tanto por ciento de concordancia de resultados positivos = 99,1% (IC del 95%: 93,0-98,0)
Tanto por ciento de concordancia de resultados negativos = 93,3% (IC del 95%: 92,8-98,0)
Tanto por ciento de concordancia general = 96,2% (IC del 95%: 93,0-98,0)

Reproducibilidad interlaboratorio: el análisis de reproducibilidad de Anti-PR, Clone PgR 636 se realizó en tres laboratorios a lo largo de cinco días no consecutivos en 21 muestras únicas de cáncer de mama y se puntuó de acuerdo con las pautas de ASCO/CAP (punto de referencia $\geq 1\%$) para un total de 315 evaluaciones. Las tablas 4, 5 y 6 indican la reproducibilidad del ensayo en todos los centros. Los cálculos de tanto por ciento de concordancia positivo, medio negativo y general avalan los resultados con un nivel alto de reproducibilidad del ensayo de PR (PgR 636) cuando se utilizan para la determinación del estado de PR en un contexto clínico.

Tabla 4: Centro 1 frente a Reproducibilidad interlaboratorio de Anti-PR, Clone PgR 636 en el centro 2

		Centro 1		
		Positivos	Negativos	Total
Centro 2	Positivos	55	0	55
	Negativos	4	46	50
	Total	59	46	105

Tanto por ciento medio de concordancia de resultados positivos = 96,5%
Tanto por ciento medio de concordancia de resultados negativos = 95,8%

Tabla 5: Centro 1 frente a Reproducibilidad interlaboratorio de Anti-PR, Clone PgR 636 en el centro 3

		Centro 1		
		Positivos	Negativos	Total
Centro 3	Positivos	59	1	60
	Negativos	0	45	45
	Total	59	46	105

Tanto por ciento medio de concordancia de resultados positivos = 99,2%
Tanto por ciento medio de concordancia de resultados negativos = 98,9%

Tabla 6: Centro 2 frente a Reproducibilidad interlaboratorio de Anti-PR, Clone PgR 636 en el centro 3

		Centro 2		
		Positivos	Negativos	Total
Centro 3	Positivos	55	5	60
	Negativos	0	45	45
	Total	55	50	105

Tanto por ciento medio de concordancia de resultados positivos = 95,7%
Tanto por ciento medio de concordancia de resultados negativos = 94,7%