

**Tesis Doctoral
Universidad de Cantabria**



**Determinación de biomarcadores
pronósticos en papilomas
intraductales mamarios**

Lucia García-Berbel Molina

**Directores:
Javier Gómez Román
Javier Freire Salinas**

Santander, Mayo de 2017

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA



FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

**DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES PRONÓSTICOS
EN PAPILOMAS INTRADUCTALES MAMARIOS**

AUTOR

LUCÍA GARCÍA-BERBEL MOLINA

DIRECTORES

Dr. JOSÉ JAVIER GÓMEZ ROMÁN

Dr. Fco. JAVIER FREIRE SALINAS

Santander, Mayo 2.017

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA



Memoria presentada por **D^a Lucía García-Berbel Molina** para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de Cantabria.

(Firma del doctorando)

El presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección en el Laboratorio de Patología Molecular del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla y autorizo su presentación ante el Tribunal que lo ha de juzgar.

Santander, 05 de mayo de 2017

(Firma del Director de la Tesis Doctoral)

José Javier Gómez Román

Fco. Javier Freire Salinas

*A mis padres
A los abuelos
A Luis y mis tres soles*

Y una vez llegado al final de tan arduo camino, lleno de dificultades y obstáculos, es el momento de agradecer inmensamente a todas aquellas personas e instituciones que me han ayudado en la realización de esta tesis doctoral.

Primero y antes que nada, dar gracias a Dios, por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi apoyo y mi estímulo.

Mi especial y sincero agradecimiento al Dr. Javier Gómez Román por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección. Al Dr. Freire Salinas, mi “segundo Maestro” por haber confiado en mi trabajo y capacidad, a pesar de las dificultades. Por haberme transmitido la ilusión e inquietud científica y haberme formado como investigadora. Este trabajo es gracias a ellos.

Al Profesor D. Rafael Comino Delgado, con quién tuve la suerte de formarme como Ginecóloga. Me supo transmitir su gran legado científico y humano plasmado en valores como la honestidad, el sacrificio, amor al trabajo... Gracias Maestro! Y a su esposa Sol, con ella se cumple el tópico “detrás de un gran hombre siempre hay una gran mujer”, doy fe.

A la Dra. Ángela Hens del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Puerto Real, por su dedicación y disponibilidad. Recuerdo las largas

horas que pasaba, en mis salientes de guardia, revisando muestras y haciendo cuantificaciones, contando con su ayuda y supervisión.

A la Unidad de Patología mamaria del Hospital Universitario Puerta del Mar de Cádiz. Gracias a la Dra. Pilar Moreno, Dr. Alejandro Utor y Dr. Isabelo Borrego por contagiarme vuestro entusiasmo por la Senología y vuestra filosofía y humanidad en el trato con las pacientes.

A nuestra familia de Jerez, de Vicente-Indurain han sido testigos y apoyo en este largo camino.

Agradezco a los Departamentos de Anatomía Patológica de los Hospitales Marqués de Valdecillas y Hospital Universitario de Puerto Real por el uso de las instalaciones y sus recursos.

A Oncomatryx, por la cesión de anticuerpos y el tiempo dedicado.

A la Dra. Ana Belén Enguita, patóloga en el Hospital Universitario 12 de Octubre, por su amabilidad en la cesión de las muestras clínicas.

A mis padres, Antonio y Carmen, a quien les debo lo que soy y haber llegado hasta aquí, por todo lo que me habéis transmitido, por vuestro ejemplo de esfuerzo y trabajo bien hecho... GRACIAS!

A mis hermanos Coco, Nono, Pili y mis sobrinos Pablo, Pilar y Álvaro

A Luis, mi gran apoyo. La ayuda que me has brindado ha sido sumamente importante, estuviste a mi lado inclusive en los momentos y situaciones más tormentosas, siempre ayudándome. Gracias por tu cariño, lo hemos conseguido!

A mis tres hijos, Lucía, Luis y Carmen, sois mi orgullo y mi gran motivación, me habéis impulsado cada día para superarme y ofrecer siempre de mí lo mejor. Ha sido un gran trabajo en equipo.

ÍNDICE

Índice

Índice	101
Introducción	17
1.- Riesgo.....	18
Agregación familiar y predisposición genética	19
Factores hormonales	20
Estilo de vida y factores dietéticos	21
Enfermedades benignas de la mama	22
Factores ambientales.....	22
2. Breve recuerdo clínico	23
Nódulo mamario palpable	23
Nódulo mamario no palpable	24
Microcalcificaciones.....	24
Telorreas	25
Alteraciones del complejo areola pezón.....	25
Alteraciones cutáneas.....	26
Dolor mamario	26
3. Subtipos histológicos del cáncer de mama	30
Carcinoma " <i>In situ</i> "	32
Carcinoma invasivo o infiltrante	33
Lesiones tumorales benignas.....	35
Lesiones papilares benignas de mama: Papiloma Intraductal	36
4. Biología Molecular del cáncer	39

Determinación de biomarcadores pronósticos en papilomas intraductales mamarios

Transición epitelio-mesénquima	41
5. Colágeno XI alfa I	43
6. Virus del Papiloma Humano	45
<i>Hipótesis y objetivos</i>.....	51
<i>Material y métodos</i>	55
Pacientes y muestras	55
Estudios Inmunohistoquímicos	56
Análisis del Virus del Papiloma Humano (VPH)	57
Extracción de DNA	58
Análisis de VPH	59
Análisis estadístico.....	66
<i>Resultados</i>	69
Pacientes.....	69
Expresión del COL11A1	71
Expresión de receptores hormonales: Estrógeno y Progesterona.....	75
Estrógenos	76
Progesterona.....	79
Estudio de la presencia del Virus del Papiloma Humano.....	81
<i>Discusión</i>.....	87
Población de estudio.....	87
Colágeno XI alfa 1	88

Receptores hormonales	92
VPH	93
Cambio en la actitud terapéutica.....	94
<i>Conclusiones</i>	99
<i>Bibliografía</i>	103

INTRODUCCIÓN

Introducción

El cáncer de mama es la neoplasia más común diagnosticada entre las mujeres, representando casi una de cada tres nuevas detecciones. Además, el cáncer de mama es la segunda causa de muerte por cáncer entre las mujeres tras las neoplasias pulmonares^{1,2} (figura 1).

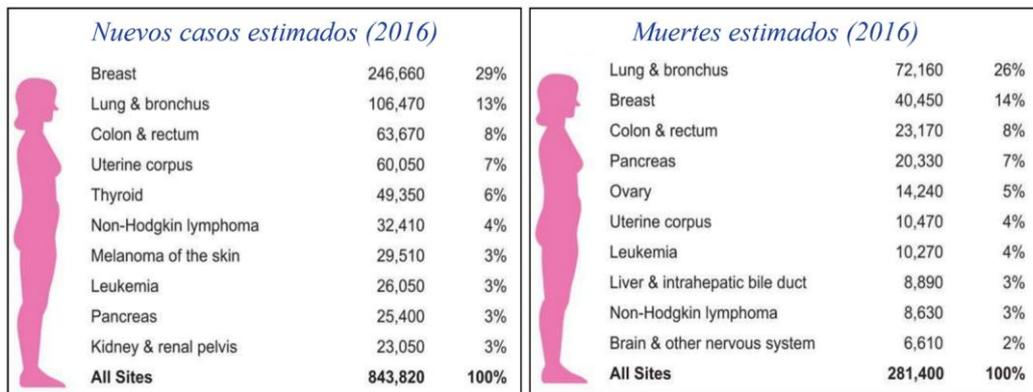


Figura 1: Estadística estimada de cáncer en 2016
(Adaptada de Jemal et al²)

En España, los tumores mamarios suponen la neoplasia más frecuente y la primera causa de muerte por cáncer en mujeres, representando el 34% de los casos nuevos de cáncer en España³. Con una incidencia estandarizada

Determinación de biomarcadores pronósticos en papilomas intraductales mamarios

estimada de 93,6 casos por 100.000 mujeres/año, ocupa una posición intermedia entre los países de Europa occidental y los del este. Estos datos ponen de manifiesto que el cáncer de mama representa un problema de salud pública de primera magnitud en España. El hecho de ser una neoplasia curable en estadios precoces hace que sea imprescindible la colaboración de distintos especialistas para ofrecer a las pacientes el mejor tratamiento posible dentro de la actual evidencia científica, y que se dediquen los mayores esfuerzos a la investigación de la mejora del manejo diagnóstico y terapéutico del mismo. Desde los años 90 la mortalidad por cáncer de mama está descendiendo debido al diagnóstico precoz por programas de cribado y a los avances terapéuticos. En España esta tendencia decreciente se observa a partir de 1993, con un descenso de un 2,4 % anual. La supervivencia global en Europa a los 5 años es cercana al 79%, inferior a la observada en EEUU (90%), y ha aumentado en los últimos años. En España, se sitúa en un 85%, significativamente más alta que la media europea. Las tendencias se cruzan ya que la incidencia aumenta pero disminuye la mortalidad⁴.

1.- Riesgo

El riesgo de padecer un cáncer de mama aumenta con la edad, siendo el riesgo estimado de padecerlo a lo largo de la vida para una mujer caucásica de un 13,1%; la probabilidad de fallecer de un cáncer de mama es del 3,4%⁵. En los últimos años ha habido un auge en la práctica de mamografías de cribado con el fin de conseguir un diagnóstico precoz^{3,6,7}, lo cual ha supuesto que, si bien la mortalidad por cáncer de mama en Occidente presenta una tendencia a

la disminución, el número total de diagnósticos ha aumentado a favor de estadios mucho más tempranos y curables a largo plazo, al menos en el grupo de mujeres de 40 a 59 años. Los factores de riesgo para padecer cáncer de mama se exponen a continuación:

Agregación familiar y predisposición genética

Globalmente, existe un riesgo 1,5-3 veces superior al de la población normal para aquellas pacientes con un familiar de primer grado (hermana o madre) afecto por un cáncer de mama⁵. La historia familiar es un factor de riesgo heterogéneo que depende del número de familiares afectados, del número de familiares no afectados, de la edad al diagnóstico en los familiares y del grado de parentesco. Incluso en ausencia de una predisposición hereditaria conocida al cáncer de mama, las pacientes con historia familiar positiva tienen un cierto incremento del riesgo, debido bien a factores genéticos aún no definidos, a factores ambientales, o a una combinación de ambos.

La predisposición hereditaria ha de sospecharse sobre todo cuando una mujer padece cáncer de mama a edades tempranas (por debajo de 45 años) y tiene historia familiar positiva para cáncer de mama y/u ovario. En el año 1994 se clonaron los genes de susceptibilidad genética al cáncer de mama y ovario *BRCA1*, localizado en el gen 17q21, y *BRCA2* en el cromosoma 13q13. Las mutaciones de dichos genes se transmiten de forma autosómica dominante y se asocian a un riesgo de hasta un 85% de desarrollo de cáncer de mama a lo largo de la vida, sobre todo a edades tempranas. Asimismo, también la

Determinación de biomarcadores pronósticos en papilomas intraductales mamarios

posibilidad de padecer cáncer de ovario aumenta si estas mutaciones están presentes, especialmente en *BRCA*^{8,9}.

Las pacientes con los síndromes de Li-Fraumeni, Cowden, Muir-Torre o la enfermedad ataxia-telangiectasia, tienen también un aumento de la susceptibilidad al cáncer de mama; este aumento está relacionado con un deterioro en la capacidad de reparación del DNA a nivel de todos los tejidos, no tratándose por tanto de síndromes específicos de cáncer de mama.

Factores hormonales

Los estudios epidemiológicos a gran escala sugieren que a mayor tiempo de exposición a estrógenos, mayor riesgo de cáncer de mama. Una menarquia temprana, una menopausia tardía, la nuliparidad y/o una edad tardía al primer embarazo se relacionan con un aumento en la incidencia^{5,10}. La intensidad de la exposición juega un papel importante: en mujeres posmenopáusicas, cuyos estrógenos provienen fundamentalmente de la aromatización en tejidos periféricos de los andrógenos suprarrenales, la obesidad se asocia a un incremento del riesgo (la aromatización de andrógenos se produce sobre todo en el tejido graso). También el uso de terapia hormonal sustitutiva aumenta el riesgo. Estas dos últimas situaciones están vinculadas a un aumento de la cantidad de estrógenos circulantes¹¹. La incidencia de cáncer de mama se incrementa con la edad. Dicho incremento persiste tras la menopausia, pero a una velocidad 6 veces menor. Esto sugiere la importancia de la función ovárica en cuanto a síntesis de estrógenos en el riesgo de cáncer de mama¹².

Estilo de vida y factores dietéticos

Los estudios sobre el cáncer de mama y las poblaciones inmigrantes de EE.UU. (en las que se observa un cambio de incidencia a la del país al que emigran con el paso del tiempo) hicieron sospechar una relación entre esta neoplasia con factores dietéticos^{13,14}. Si bien el consumo de grasa *per capita* se ha relacionado con incidencia y mortalidad por cáncer de mama, el mayor estudio al respecto, que combina los datos de diversas cohortes prospectivas sumando más de 350.000 mujeres, no descubrió una diferencia significativa entre las mujeres censadas como grandes consumidoras de grasa y aquellas que apenas tomaban¹⁵. La práctica de ejercicio físico regular parece proteger del cáncer de mama en mujeres premenopáusicas debido a dos razones: a la pérdida de grasa periférica y al aumento de ciclos anovulatorios; ambos factores conducen a una menor exposición a estrógenos¹⁶. Un gran metaanálisis que estudió la relación del consumo de alcohol con la incidencia de cáncer de mama, halló que el riesgo relativo para las pacientes que consumían hasta 3 unidades de bebida alcohólica al día era de 1'4 veces superior (dependiendo de la dosis) respecto a las mujeres abstemias¹⁷. Falta evidencia suficiente para afirmar que el consumo de fibras o de vitaminas confiera protección, pero parece que una dieta con alto contenido en frutas y en vegetales puede disminuir el riesgo.

Enfermedades benignas de la mama

Las enfermedades benignas de la mama se dividen en no proliferativas y proliferativas. Las primeras no están asociadas a incremento de incidencia de cáncer de mama, mientras que las segundas sí. Si en una biopsia de enfermedad proliferativa no observamos atipias histológicas, el riesgo de cáncer está aumentado 1,5- 2, mientras que si lo que observamos en una hiperplasia con atipia, el riesgo relativo es de 5. Para hacerse una idea de lo que estos datos representan, el riesgo a 15 años de presentar cáncer de mama para una mujer con una biopsia de hiperplasia con atipia e historia familiar positiva es del 20%^{18,19}.

Factores ambientales

Se acepta que la exposición a radiaciones ionizantes incrementa el riesgo de cáncer de mama, con un período de latencia de hasta 40 años. Al respecto es muy ilustrativo el estudio de Gervais-Fagnou *et al*²⁰ en el que en una cohorte de 427 mujeres que habían recibido irradiación supradiafragmática como tratamiento de enfermedad de Hodgkin en el pasado mostraban un riesgo relativo de 10,6 para cáncer de mama respecto al esperado para mujeres de su edad sin irradiación previa. A pesar de lo dicho en los párrafos precedentes, hasta un 50% de las mujeres no tienen en su historia clínica ningún factor de riesgo identificable más allá del aumento de la edad y el género femenino. Puesto que el 99% de los casos de cáncer de mama tienen lugar en la mujer, el factor "género femenino" no se considera un factor de riesgo.

2. Breve recuerdo clínico

En la patología mamaria existen una serie de signos clínicos que ponen de manifiesto la posibilidad de estar ante una neoplasia de mama:

Nódulo mamario palpable

Los nódulos y masas en la mama son detectables en el 90% de los pacientes con cáncer de mama, y constituyen el signo más frecuente en la historia clínica y en la exploración física. La masa típica del cáncer de mama suele ser solitaria, unilateral, sólida, dura, irregular, fija y no dolorosa.

Ante la aparición de un nódulo palpable en la mama el facultativo responsable está obligado a realizar un estudio diagnóstico para descartar su posible naturaleza maligna. La historia clínica y la exploración son imprescindibles, debiéndose anotar las características del nódulo en cuanto a localización, movilidad, tamaño y bordes.

En función de la edad, el procedimiento diagnóstico será diferente. En pacientes menores de 30-35 años, la ecografía proporciona mejores resultados que la mamografía y nos distinguirá entre nódulo sólido y quístico. El nódulo quístico puro presenta una pared fina, libre de ecos en su interior y con refuerzo acústico posterior. La actitud será control ecográfico o bien punción-aspiración de aguja fina (PAAF) para estudio citológico. En el nódulo quístico atípico, la PAAF es obligada y si ésta es sospechosa se completará con biopsia de aguja gruesa (BAG). En el nódulo sólido, si sus características son de benignidad y ésta se confirma con la realización de BAG, se ofertará seguimiento o extirpación quirúrgica dependiendo del tamaño y de los deseos

Determinación de biomarcadores pronósticos en papilomas intraductales mamarios

de la paciente. En caso de sospecha de malignidad se impone el estudio de imagen, seguido de BAG. En los nódulos sólidos se desaconseja la PAAF porque en caso de carcinoma no será posible determinar el carácter infiltrante.

En pacientes mayores de 35 años, el procedimiento diagnóstico es la mamografía bilateral combinada con ecografía. Ante un nódulo aparentemente benigno (BIRADS 2-3), se aconseja estudio de imagen y BAG para su filiación histológica. En una masa densa se realizará mamografía y ecografía. Ante un nódulo maligno (BIRADS 4-5) siempre se realizará BAG.

Nódulo mamario no palpable

Es aquella lesión que se detecta en estudio de imagen y que no es objetivable clínicamente. Actualmente el 30 % de los cánceres de mama se diagnostican radiológicamente. Siendo su pronóstico generalmente mejor, ya que se suelen diagnosticar en estadios más tempranos. Las principales lesiones no palpables son: Nódulos pequeños profundos, imágenes estrelladas, irregulares y con prolongaciones, alteraciones del parénquima, asimetrías mamarias, lesiones mixtas y sobre todo las microcalcificaciones.

Microcalcificaciones

Guardan una estrecha relación con las lesiones *in situ*. Se actuará en función de las características radiológicas BIRADS, realizándose una biopsia por esterotaxia ya que no es aconsejable la biopsia mediante tumorectomía. El diagnóstico histológico debe ser realizado antes de la operación quirúrgica, ya que compromete la realización, en caso de malignidad, de cirugía

conservadora de mama con márgenes quirúrgicos libres y la biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC).

Telorreas

Se define como la secreción procedente del conducto mamario que aparece por el pezón de forma espontánea. Las secreciones espontáneas por el pezón a través de un conducto mamario son el segundo signo más frecuente del cáncer de mama. Tal secreción telar se produce en aproximadamente el 3% de las mujeres con cáncer de mama, pero el 90% de los casos de drenaje por el pezón traducen patología benigna. En general, secreciones lechosas, purulentas o grumosas no suelen corresponder a patología tumoral, pero las descargas serosas, serosanguinolentas, hemorrágicas o acuosas han de ser investigadas, además es la secreción que más alarma a la mujer. Su asociación con el cáncer de mama es poco frecuente, aunque su aparición conjuntamente con una masa obliga a la realización de una biopsia. Cuando es espontánea, unilateral y uniorificial su principal causa es el papiloma intraductal.

Alteraciones del complejo areola pezón

Toda alteración o cambio en la piel del pezón o de la areola debe ser investigada para descartar enfermedad de Paget. La presencia de eritema, cambios en la pigmentación de la piel, descamación o alteración del epitelio que no llegan a cicatrizar, deben ser estudiadas mediante mamografías, ecografías y biopsia escisional.

Determinación de biomarcadores pronósticos en papilomas intraductales mamarios

Se considera un pezón invertido aquel que está sumido por completo dentro de la mama y las maniobras manuales no permiten su despliegue

La etiología del pezón invertido o retraído se debe (en orden de frecuencia) a ectasias, abscesos y cáncer. La inversión, retracción o distorsión por problemas malignos de mama, es persistente, asimétrica, y puede involucrar a la areola y traccionar en diferentes direcciones del pezón.

Alteraciones cutáneas

La retracción de la piel, piel de naranja, eritema cutáneo son trastornos que indican un estado avanzado de un proceso maligno de la mama. Las ulceraciones cutáneas, el sangrado, los nódulos subcutáneos satélites, indican la presencia de un cáncer de mama localmente avanzado

Dolor mamario

Es la primera causa de consulta de la mujer al médico. No se relaciona con la presencia de cáncer. La mastodinia o dolor cíclico mamario está relacionado con el ciclo menstrual. Suele deberse a edema y congestión mamaria por influencias hormonales. Se inicia en la segunda fase del ciclo menstrual y normalmente cesa con la menstruación. La mastalgia o dolor acíclico suele estar asociado a patología traumática, alteraciones vasculares, cancerofobia o al uso de sujetadores mal adaptados.

En general, en la enfermedad avanzada, los síntomas se deberán al deterioro orgánico en el que las metástasis asienten, así como a las manifestaciones de cualquier cáncer avanzado (caquexia, astenia, deterioro del

estado general progresivo), muchas de las cuales son difíciles de desligar de aquellas producidas por los tratamientos oncológicos administrados. El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, que crece a velocidades distintas en pacientes diferentes y con frecuencia es una enfermedad sistémica en el momento del diagnóstico inicial (debido a la presencia de micrometástasis diseminadas en otros tejidos, que ocurrirán con mayor o menor probabilidad en función de unos factores que se discutirán más adelante y que hoy por hoy son los pilares de la justificación del tratamiento adyuvante). Hay una serie de evidencias que apoyan esta aseveración:

a) Tiempo de duplicación tumoral del cáncer de mama: un tumor de mama de 1 cm contiene aproximadamente 10^9 células y ha realizado 30 de los 40 ciclos de replicación que tendrán lugar antes de que el paciente fallezca. El tiempo de duplicación de la lesión en el cáncer de mama varía de 25-200 días en las lesiones pequeñas y precoces, pero en la enfermedad avanzada el tiempo de duplicación puede ser superior a los 500 días. Por eso, un tumor de 1 cm. puede llevar en la mama de 2 a 17 años de evolución antes de ser diagnosticado. En este tiempo el fenotipo de las células tumorales no es estático, sino que va ganando agresividad en términos de potencial metastásico, inhibición de apoptosis en respuesta a citotóxicos y potencial angiogénico.

b) El pronóstico está influido por marcadores bioquímicos: la presencia de ciertos marcadores moleculares en lesiones aparentemente localizadas y completamente resecaadas se relaciona con rápidas recaídas a distancia por existencia de enfermedad que está oculta al momento del diagnóstico.

Determinación de biomarcadores pronósticos en papilomas intraductales mamarios

c) Las medidas de tratamiento local tienen un efecto limitado en la supervivencia: la supervivencia mediana de pacientes no tratadas es de 2,5 años. Las pacientes tratadas sólo con tratamientos locales (cirugía con o sin radioterapia local) tienen una expectativa de vida mejor que las pacientes que no han recibido ningún tipo de tratamiento, pero continúan muriendo a ritmos considerablemente mayores que controles sanas de la misma edad hasta 20 años después del tratamiento. Cualquiera que sea la causa de muerte, el 75-85% de las pacientes con historia de cáncer de mama presenta evidencia de tumor en la autopsia.

d) La exéresis del tumor primario no altera sustancialmente el riesgo de las metástasis: las metástasis a distancia están presentes en los 2/3 de las pacientes con cáncer de mama en el momento del diagnóstico; las diferentes modalidades de tratamiento local (mastectomía radical, mastectomía radical modificada, mastectomía simple; administración o no de radioterapia) apenas modifican la supervivencia. Las pacientes con metástasis en los ganglios linfáticos axilares tienen una alta tasa de recidiva con metástasis a distancia a pesar de haberse realizado resección completa del tumor.

El tamaño tumoral, definido como el diámetro mayor del tumor primario infiltrante, es un factor pronóstico reconocido en cáncer de mama. La relación entre tamaño tumoral y supervivencia se ha analizado en varios estudios, de los que destaca el estudio epidemiológico del Dr. Fisher, en el que se analizaban más de con 24.000 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama, y en el que se demostraba una supervivencia a los 5 años que osciló entre un 91% para pacientes con tumores menores de 2 cm hasta un 63 % con tumores

mayores de 5 cm²¹. A pesar de que sabemos que el tamaño tumoral se correlaciona con la afectación axilar, son factores pronósticos independientes. En la práctica clínica, especialmente en el subgrupo de pacientes sin afectación axilar linfática, el tamaño tumoral es un factor pronóstico utilizado de manera rutinaria para la toma de decisiones terapéuticas.

e) Los ganglios regionales afectados son predictores de enfermedad sistémica, y no barreras para la diseminación tumoral: la exéresis de los ganglios linfáticos axilares en la cirugía no altera la tasa de recurrencias, el desarrollo de metástasis a distancia o las tasas de supervivencia. La afectación axilar linfática es el factor pronóstico independiente más potente en cáncer de mama. Se sabe que existe una relación directa entre el número de ganglios afectados por la enfermedad y la supervivencia. Hasta el 50% de todas las pacientes con cuatro o más ganglios linfáticos axilares afectados tendrán evidencia de enfermedad metastásica clínica antes de que transcurran 18 meses. Desde el análisis de estos datos no podemos llegar al punto de ofrecer a una paciente en concreto información exacta sobre cuál va a ser el curso natural de su enfermedad. El amplio espectro clínico cuyos puntos extremos son el cáncer lobulillar *in situ* y el cáncer metastásico con invasión visceral no define más que la heterogeneidad de la enfermedad que nos ocupa. No sólo será importante saber en qué punto se encuentra la paciente en cada momento, sino tener en cuenta una serie de factores pronósticos, cuya presencia o ausencia nos indica cuál va a ser el curso de la enfermedad con altas probabilidades, y predictivos, cuya presencia o ausencia nos indica a qué tratamientos va a responder o no la enfermedad de una paciente en concreto.

Tales factores asociarán dicho espectro clínico a una supervivencia más o menos prolongada.

3. Subtipos histológicos del cáncer de mama

Las glándulas dentro de las mamas se clasifican como glándulas tubuloalveolares compuestas y consisten en 15 a 20 lóbulos que se irradian desde el pezón y se separan entre sí por tejidos adiposos y conectivo colágeno. Cada lóbulo es drenado por su conducto galactóforo propio que llega directamente al pezón, y antes de llegar al pezón cada uno se dilata para formar un seno lactífero y a continuación se estrecha antes de desembocar en el pezón. El epitelio escamoso queratinizado de la piel supraadyacente se hunde en los orificios del pezón y después se transforman en un epitelio cúbico de doble capa que tapiza los conductos. Los conductos y lobulillos están tapizados por dos tipos de células. Las mioepiteliales contráctiles con miofilamentos que se disponen como una malla sobre la membrana basal y las células epiteliales luminales que se superponen a las células mioepiteliales. Se postula que una célula madre comprometida en el conducto terminal puede dar lugar a las células tanto luminales como mioepiteliales. También existen dos tipos de estroma mamario. El estroma interlobulillar, que corresponde a un tejido conjuntivo fibroso denso mezclado con tejido adiposo. Y el estroma intralobulillar que rodea a los acinos de los lobulillos y está constituido por células similares a los fibroblastos con respuesta hormonal. Ambos estromas se ven salpicados por linfocitos dispersos. (Figura 2 y 3).

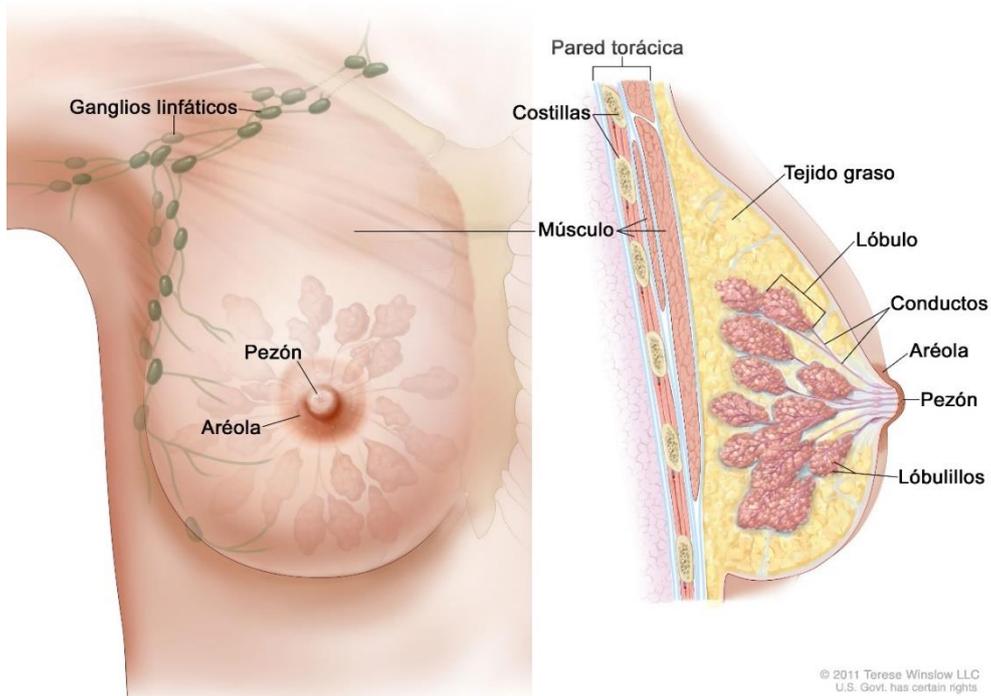


Figura 2: Estructura anatómica de la mama

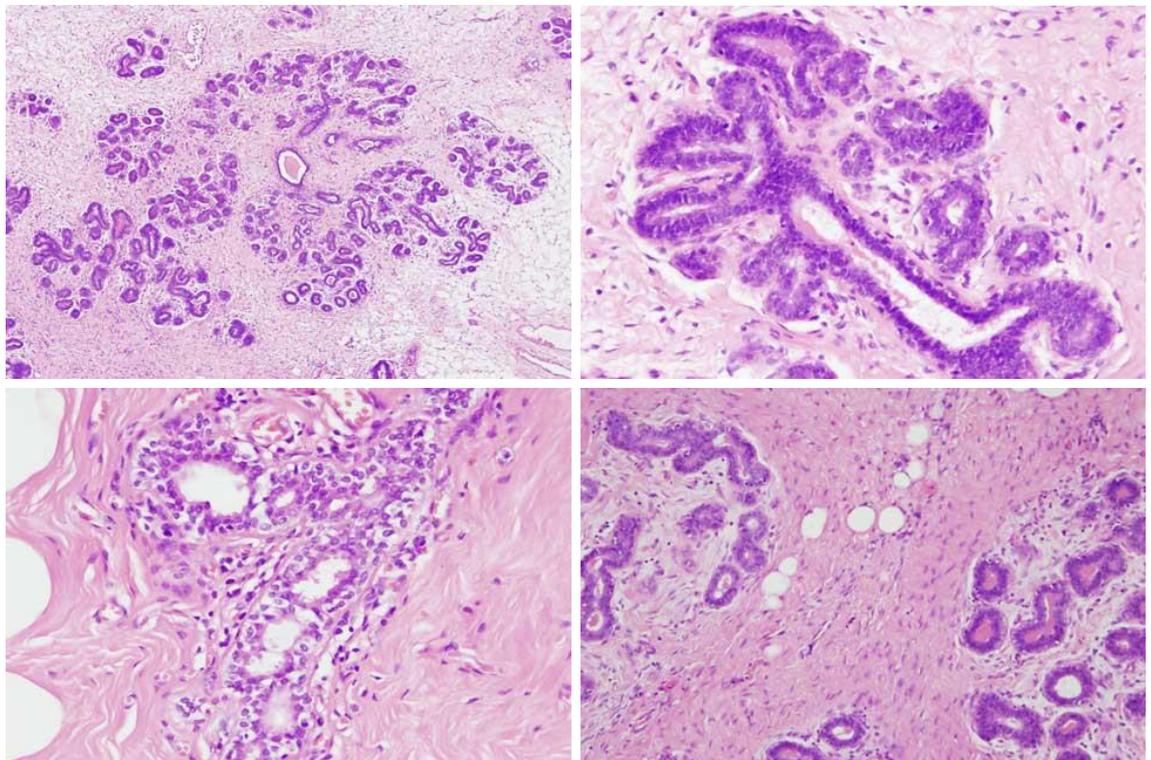


Figura 3: Histología normal de la mama

Determinación de biomarcadores pronósticos en papilomas intraductales mamarios

En la mama se agrupan tejidos de diferentes estirpes que pueden dar lugar a diferentes tipos de tumores: sarcomas, basaliomas, linfomas... sin embargo sólo trataremos los tumores que provienen propiamente de los tejidos glandulares mamarios (tumores epiteliales). A grandes rasgos, la clasificación histológica más común del cáncer de mama es la siguiente²²:

Carcinoma "*In situ*"

Son un grupo heterogéneo de lesiones que tienen un potencial maligno diverso, con múltiples opciones de tratamiento.

En 1932 Broders acuñó el término de carcinoma *in situ*, como la lesión constituida por células malignas que no atraviesan la membrana basal, pero no fue hasta 1990 en que Tavassoli diferenció la hiperplasia ductal atípica del carcinoma ductal *in situ*, considerando que éste último debe tener un diámetro asociado mayor a 2 mm.

Como consecuencia de la generalización de las mamografías de chequeo, la prevalencia ha aumentado considerablemente. Antes las lesiones preinvasivas representaban del 1-5 % de todos los cánceres de mama. Su diagnóstico era clínico, una masa palpable, eczema de pezón enfermedad de Paget o un derrame hemático.

Según su clasificación histológica pueden denominarse:

- **Carcinoma ductal *in situ* (CDIS)** o carcinoma intraductal si es dentro de un ducto. Suele ser una lesión no palpable, en más del 90% es clínicamente oculto. En la mayoría de los casos se presenta como microcalcificaciones en la mamografía. El estudio genético

apunta que el CDIs en un grupo heterogéneo, con subtipos moleculares al igual que el carcinoma invasor, cada uno de ellos con un pronóstico diferente.

- **Carcinoma lobulillar *in situ* (CLIS)** si es dentro de un lobulillo. Hace años, el carcinoma lobulillar *in situ* se consideraba una lesión premaligna, sin embargo, en la actualidad se entiende como un marcador que identifica a mujeres con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama invasivo. El término más adecuado es el de neoplasia lobular.

La incidencia del carcinoma ductal *in situ* ha aumentado en los últimos años. Con frecuencia este tipo de tumor es multicéntrico (varias lesiones en la misma mama) y bilateral (afectación de ambas mamas). En la actualidad se desconoce qué tumores *in situ* y qué porcentaje pasan a ser tumores invasivos. El tiempo en que esto ocurre puede ser tan largo como 6 a 10 años.

Carcinoma invasivo o infiltrante

Se llama así a la proliferación celular maligna que traspasa la frontera natural anatómica del ducto o el lobulillo, invadiendo el tejido circundante.

Fundamentalmente existen dos tipos de cáncer de mama invasivo:

- **Carcinomas ductales:** En la clasificación de la OMS de 2102, el carcinoma ductal infiltrante queda englobado en un grupo denominado carcinoma infiltrante de tipo no especificado, definido como un conjunto heterogéneo de tumores en los que no se cumplen todos los criterios para incluirlos en una misma variedad. El

Determinación de biomarcadores pronósticos en papilomas intraductales mamarios

carcinoma infiltrante de mama NST (*Non Special Type*) se conoce como carcinoma ductal infiltrante siendo el grupo más frecuente de cáncer infiltrante de mama. No es una entidad bien definida. Es el tipo histológico más frecuente y se caracteriza por una proliferación celular que en mayor o menor proporción forma túbulos rodeados por una sola hilera celular con distintos grados de atipia. Estos túbulos están desprovistos de membrana basal y de la capa de células mioepiteliales que se disponen entre las células epiteliales y la membrana basal en los conductos mamarios normales. En ocasiones se asocia a carcinoma intraductal. Puede asociarse también a otras variantes histológicas. El marcador inmunohistoquímico para E-cadherina se expresa en la práctica totalidad de los carcinomas ductales mientras que sólo un 15 % de carcinomas lobulillares lo expresan

- **Carcinomas lobulillares:** Es el segundo tipo histológico en frecuencia y en muchas ocasiones es multicéntrico y bilateral. Su incidencia es mucho menor, del 10%. Se caracteriza por una proliferación de células pequeñas, con núcleo redondo que se disponen en fila india y rodeando de forma concéntrica a los conductos mamarios conservados. Se asocia frecuentemente a carcinoma lobulillar in situ. .

Otros tipos de cáncer de mama menos frecuentes son el tubular, cribiforme, mucinoso, carcinoma con hallazgos medulares, carcinoma con diferenciación apocrina, carcinoma de células en anillo de sello, carcinoma

micropapilar infiltrante, carcinoma metaplásico, carcinoma con hallazgos neuroendocrino, secretor, papilar infiltrante, de células acinares, adenoide quístico, mucoepidermoide, polimorfo, oncocítico, rico en lípidos, de células claras rico en glucógeno, sebáceo, tumores de tipo glándula salival/ anejo cutáneo.

Lesiones tumorales benignas

A lo largo de los años se han usado una multitud de términos como *displasia mamaria*, *enfermedad fibroquística*... para designar a la enfermedad benigna de la mama. Sin embargo, toda esta terminología se refiere a la era precedente a la mamografía. En la actualidad, se utiliza como nomenclatura la clasificación acuñada por Dupont y Paget^{23,24} para lesiones benignas, (tabla 1), de manera que las lesiones que parecen no estar asociadas con incremento del riesgo de cáncer de mama se denominan no proliferativas y las otras categorías con una asociación de riesgo de cáncer de mama subsecuente son definidas como lesiones proliferativas. Estos autores demostraron la importancia de clasificar y especificar precisamente las proliferaciones epiteliales en aquellas sin atipias con un riesgo mínimo o ligero de carcinoma y con atipias con un mayor aumento del riesgo de carcinoma. En el original estudio de 1985, se realizó una revisión de más de 10.500 biopsias de mama benignas consecutivas por enfermedades benignas de 3.300 mujeres que fueron seguidas por un periodo medio de 17 años. La prevalencia de estos grupos en la población estudiada, los investigadores encontraron que la entidad más frecuente era la enfermedad no proliferativa (en más del 68% de las

Determinación de biomarcadores pronósticos en papilomas intraductales mamarios

biopsias). Las lesiones proliferativas sin atipias fueron la segunda entidad más común (el 26% de las biopsias). Las lesiones que mostraron tener mayor riesgo de carcinoma, las hiperplasias atípicas, fueron las menos frecuentes (sólo el 4% de las biopsias). Por lo tanto la mayoría de las mujeres sometidas a biopsia mamaria por enfermedad benigna presentan lesiones que no se asocian con un aumento significativo del riesgo del carcinoma de mama. Sin embargo en un pequeño porcentaje de casos, se encuentran lesiones que se asocian con un aumento del riesgo y precisamente es en estas pacientes en las que debe realizarse un estrecho seguimiento a largo plazo.

Tabla 1: Clasificación Dupont y Paget con riesgo relativo para cada grupo²³.

Cambios no proliferativos: 70% de casos. (RR= 1)
- adenosis
- quiste y metaplasia apocrina
- ectasia ductal
- hiperplasia epitelial leve del tipo "usual"
Enfermedad proliferativa sin atipias: 26% de casos. (RR=1,5-2)
- Hiperplasia moderada o florida del tipo "usual"
- Papiloma
- Adenosis esclerosante
Enfermedad proliferativa con atipias: 4% de casos. (RR= 4-5)
- Hiperplasia ductal atípica
- Hiperplasia lobulillar atípica

Lesiones papilares benignas de mama: Papiloma Intraductal

Los papilomas son proliferaciones exofíticas de las células epiteliales de los conductos galactóforos sobre un eje fibro-vascular. La forma de presentación es variada: papiloma solitario, papiloma quístico, papilomatosis,

papilomatosis juvenil. Las lesiones papilares son más comunes entre mujeres de 30-50 años. Cuando se encuentran cerca del pezón, suelen presentar secreción mamaria anormal. Sin embargo, estas lesiones también pueden ser detectadas accidentalmente en estudios de imagen o en la biopsia realizada por otra indicación²⁵.

Como regla general, hay que tener en cuenta que ante una telorrea serohemática o sanguinolenta en mujeres premenopáusicas, el papiloma intraductal, y en mujeres postmenopáusicas el cáncer de mama, serán la primera causa²⁶.

A la hora de enfrentarse a una biopsia pequeña, los patólogos no suelen tener grandes problemas en reconocer la arquitectura papilar de la lesión. Sin embargo, su posterior categorización como benigno, atípico o maligno plantea más dificultades. Estas dificultades se ven aún más acusadas en los casos de citologías (punción-aspiración con aguja fina o citologías exfoliativas en secreciones telares²⁷.

El Papiloma intraductal solitario representa el 1.5% de la patología mamaria. Se trata de una formación papilar pediculada que crece en el interior de un conducto galactóforo principal. Inicialmente se manifiesta como una telorragia uniorificial. Posteriormente en su crecimiento puede producir una obstrucción del conducto con ectasia y dilatación del mismo, y fibrosis a su alrededor, originando una tumoración palpable de 2-3 cm.

Histológicamente, los papilomas intraductales se definen como lesiones arborescentes centradas por un eje fibrovascular y revestidas por una capa de células mioepiteliales sobre las que se encuentra otra proliferación de células

Determinación de biomarcadores pronósticos en papilomas intraductales mamarios

epiteliales (figura 4). Se han descrito casos inusuales de células atípicas o de carcinoma ductal *in situ* dentro de papilomas solitarios, pero por lo general estos no se relacionan con cáncer²⁸. En un metaanálisis de 34 estudios publicado en 2013 por Wen y Cheng²⁹, incluyeron a 2.236 lesiones papilares benignas, observando en un 15.7% de ellas la presencia de células malignas en el análisis histopatológico tras la resección quirúrgica.

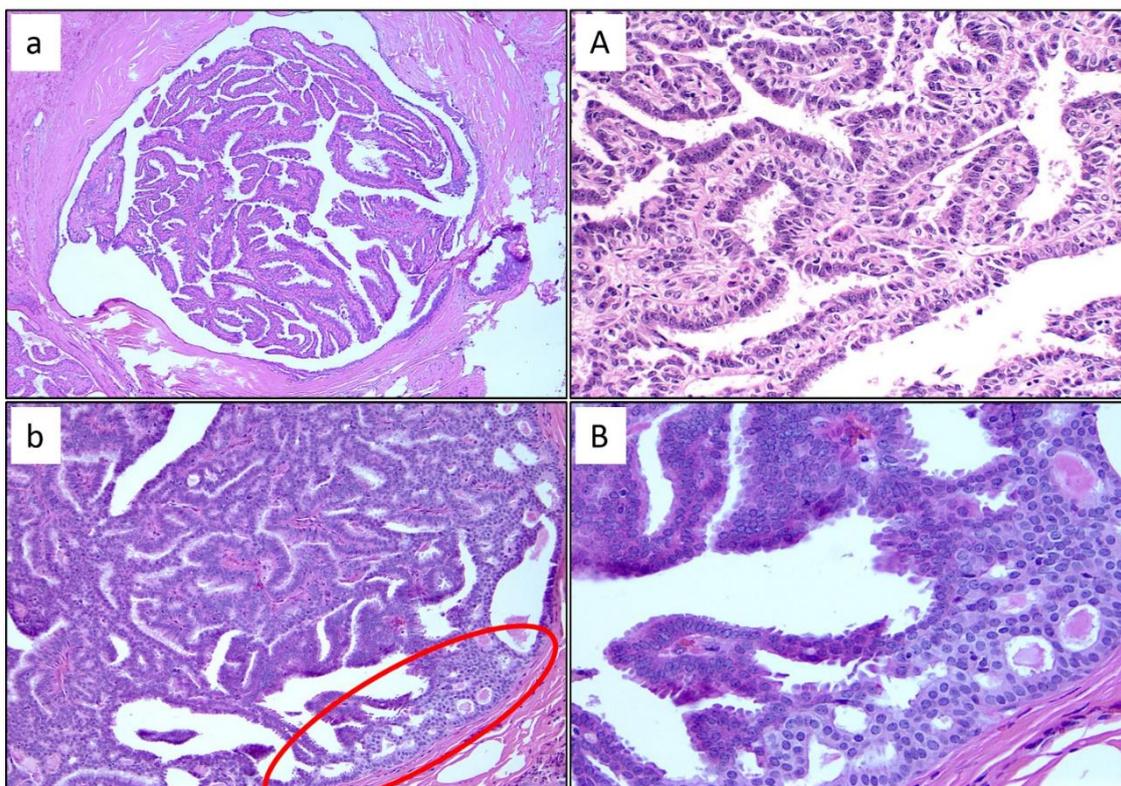


Figura 4: Histología general de un papiloma intraductal:
a) Papiloma intraductal b) papiloma con hiperplasia ductal atípica. H&E Aumentos originales 50X (a,b), 300x (A,B)

Aunque el papiloma intraductal *per se* está considerado como una lesión benigna, la asociación entre esta lesión y la recurrencia maligna es bastante alta, llegando al 33% de los casos como muestran algunas series³⁰⁻³². Este hecho genera un gran debate científico centrado en el modo de actuación clínica de esta patología, ya que, mientras que hay grupos que abogan por una

escisión quirúrgica radical^{33,34}, otros equipos sugieren únicamente un seguimiento clínico en todos los casos^{30,35,36}.

Se requiere por tanto un diagnóstico de precisión que permita seleccionar casos susceptibles de un comportamiento maligno³⁷⁻³⁹, no solo por el beneficio de la paciente, quien se ahorraría intervenciones innecesarias, sino también por su impacto económico⁴⁰ en el sistema sanitario.

4. Biología Molecular del cáncer

El cáncer es un proceso evolutivo. Para que una célula cualquiera pueda dar lugar a un tumor ha de sufrir ciertos cambios progresivos. Estas alteraciones necesarias para la carcinogénesis se recogen en el artículo publicado por Hanahan y Weinberg *The Hallmarks of Cancer next generation*⁴¹, en el que se definen las seis alteraciones claves necesarias para que las células normales progresen hasta un tumor maligno, además de 4 situaciones que han de darse en el entorno tumoral. Estos cambios implican autosuficiencia en el crecimiento, insensibilidad a factores inhibidores del crecimiento, evasión de la apoptosis, capacidad de replicación ilimitada, capacidad angiogénica y capacidad de invasión y metástasis (Figura 5).

Determinación de biomarcadores pronósticos en papilomas intraductales mamarios

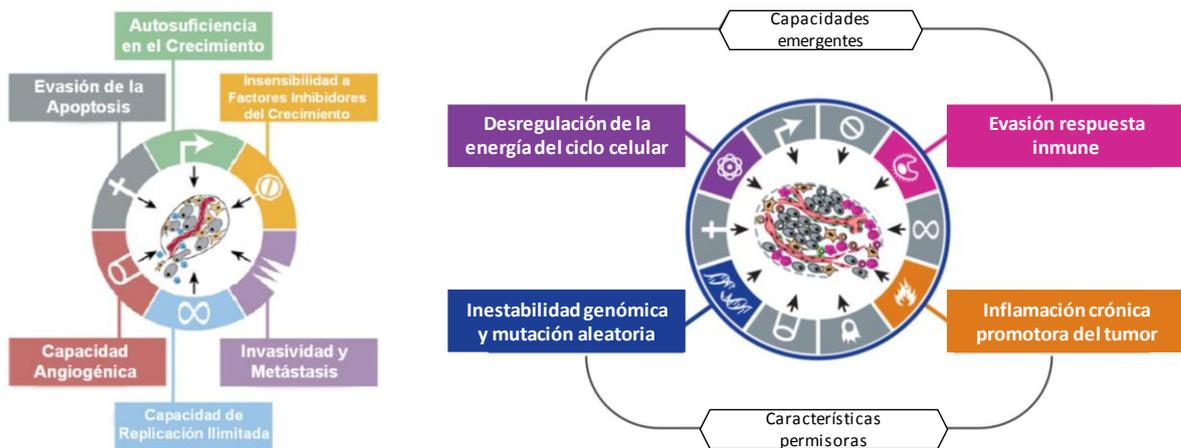


Figura 5. Capacidades necesarias para la carcinogénesis.

Capacidades que una célula debería adquirir para poder progresar hacia un tumor maligno. Adaptada de Hanahan y Weinberg, 2.011⁴¹.

Dentro de todas estas capacidades, es de sobra conocido que el proceso invasión y metástasis es el que provoca más del 80% de muertes por causa tumoral⁴². Además, cada vez más, se van conociendo los mecanismos por los cuales se provoca esta migración y se conoce también que la metástasis puede darse en estadios muy tempranos del desarrollo neoplásico^{43,44}. De ahí que los estadios iniciales de un proceso neoplásico (preneoplasia) sean un periodo clave para la evolución del tumor, y por tanto un ambiente en el que se puede centrar la búsqueda de marcadores de detección precoz y estrategias de tratamiento.

En este sentido, la desdiferenciación de las células hacia un fenotipo más mesenquimal juega un papel crucial en el proceso de la invasión y metástasis, en un proceso conocido como Transición Epitelio-Mesénquima⁴⁵.

Transición epitelio-mesénquima

Las células epiteliales y mesenquimales difieren en sus características fenotípicas y funcionales. Las primeras constituyen capas de células contiguas con funciones especializadas de membrana a modo de polarización apicobasal, una orientación organizada del citoesqueleto y la presencia de una membrana basal, sin posibilidad alguna de migración. El mantenimiento de la morfología epitelial es necesario para realizar sus funciones. Las células mesenquimales, sin embargo, carecen de dichas propiedades por lo que su adhesión a las vecinas es menos fuerte, permitiéndolas una mayor capacidad migratoria en base a que el tejido mesenquimal juega un papel de soporte con una organización menos definida.

La activación de un proceso biológico conocido como **programa de transición de epitelio a mesénquima** produce un cambio fenotípico de la célula epitelial basado en alteraciones de adhesión intercelular, de la interacción de la célula con el entorno, una reorganización del citoesqueleto y una degradación de la membrana basal y de la matriz extracelular. El proceso se completa cuando la célula adquiere la capacidad migratoria, una vez degradada la membrana basal, alcanzando el mesénquima desde el epitelio (figura 6).



Figura 6. Proceso de transición epitelio-mesénquima.

Resulta característico el cambio fenotípico y la capacidad migratoria que adquiere la célula para su ejecución.

Determinación de biomarcadores pronósticos en papilomas intraductales mamarios

Estos fenómenos de transición han sido descritos en procesos fisiológicos como el desarrollo embrionario y la regeneración o fibrosis tisular⁴⁶ siendo el epitelio el proveedor de fibroblastos y los fibroblastos productores de matriz extracelular; pero también durante la progresión y metastatización tumoral a través de este mismo fenómeno migratorio después de una reprogramación de células epiteliales.

La regulación de este fenómeno se produce mediante la coordinación de procesos moleculares que cooperan en su iniciación y finalización como factores de transcripción, expresión de proteínas de superficie y del citoesqueleto, enzimas que degradan la matriz extracelular y cambios en la expresión del ARNm. Su actividad promoverá modificaciones celulares en un doble sentido: Por un lado, la represión o pérdida de sustancias reguladoras de los complejos de adhesión celular como la E-cadherina y, por otro, modificaciones de filamentos de actina del citoesqueleto que se traducirá en una desconexión celular del epitelio con un cambio de fenotipo y la propiedad de migración⁴⁷.

Cuando se produce un descontrol en la regulación de esta transición bidireccional las células adquieren un fenotipo maligno y una capacidad infiltrativa por sus propiedades migratorias, manifestada por la degradación de la membrana basal, que explicaría por qué las células del frente invasivo del tumor primario expresarían marcadores mesenquimales en lugar de epiteliales como la vimentina, la fibronectina, el Twist o el colágeno tipo I^{48,49}.

La relación entre la matriz extracelular y el fenómeno de Transición Epitelio-Mesénquima ha sido ampliamente descrita. Existe una

retroalimentación entre las células tumorales y el estroma que las rodea, de manera que se dan múltiples señales para acomodar el estroma al nuevo estado del tumor conforme las células epiteliales se desdiferencian⁵⁰⁻⁵².

El colágeno es el principal componente de la matriz extracelular y el equilibrio entre su síntesis y degradación se lleva a cabo a través de fibroblastos, que juegan un papel crítico en la homeostasis de dicha matriz. La matriz extracelular juega un papel activo en numerosos procesos biológicos como la morfogénesis celular, la proliferación, la migración, la diferenciación, la apoptosis y la propia carcinogénesis^{53,54}.

Diferentes teorías apuntan a una relación entre los fibroblastos y las células malignas durante el proceso de diseminación tumoral. Su papel en la génesis del cáncer vendría mediado por la síntesis y depósito de colágeno para la remodelación de la matriz extracelular⁵⁵ por cuanto que una disminución de fibroblastos asociados al cáncer parece reducir la capacidad invasiva de las células tumorales⁵⁶. Este concepto apoyaría su papel en la transición de epitelio a mesénquima pues se sabe que el TGF- β , como inductor primario de dicha transición, promueve la activación de este tipo de células estromales⁵⁷.

Sin embargo, en la progresión tumoral se produciría el fenómeno contrario por el cual una degradación intensa de colágeno permitiría una migración a distancia de las células epiteliales⁵⁸.

5. Colágeno XI alfa I

El colágeno XI alfa 1, representa un componente escaso dentro de la matriz extracelular. Su papel principal es esencial en el conjunto del colágeno

Determinación de biomarcadores pronósticos en papilomas intraductales mamarios

ya que, junto con el colágeno IX, regula el diámetro las fibrillas del colágeno II para estabilizar el crecimiento durante el desarrollo del tejido cartilaginoso embrionario⁵⁹.

Alteraciones en el Colágeno XI α 1, se han asociado a síndromes como el de Stickler⁶⁰ o el de Marshall⁶¹, y a otras enfermedades del tejido cartilagosos como la fibrocondrogénesis⁶². La primera descripción de este colágeno en la bibliografía sobre oncología se realizó en 1992 en una línea de rhabdomiosarcoma⁶³ aunque posteriormente se ha estudiado en otros muchos tumores como el cáncer de pulmón⁶⁴, mama⁶⁵, páncreas⁶⁶, gástrico⁶⁷ o colorrectal^{68,69}, donde se ha demostrado que se sobrepresa respecto al epitelio normal o lesiones benigna. Este marcador, además se ha emparejado a fenómenos de transición epitelio mesénquima y a los diversos genes que la controlan⁷⁰.

La expresión del gen para el colágeno XI α 1 se asocia a un fenotipo celular del estroma similar a los fibroblastos pero se desconoce el origen y naturaleza real de estas células. No obstante, se piensa que las células estromales asociadas al cáncer resultarían de la reacción desmoplásica que acompaña a todo cáncer infiltrativo y derivarían de diferentes tipos de progenitores mesenquimales⁷¹. La confirmación de este concepto apoyaría la relación entre fibrosis del estroma tumoral y el riesgo de migración y metástasis. En esta misma línea, el inmunomarcaje para el colágeno XI α 1 ha sido propuesto como un indicador de agresividad y progresión del tumor al haberse encontrado una asociación significativa entre éste y diferentes factores de mala evolución en el cáncer de colon como la afectación ganglionar y las

metástasis a distancia^{72,73}. Esta condición sugiere su mediación en la proliferación, invasión y migración de células malignas.

En consecuencia, estas células “pseudofibroblásticas” o Fibroblastos asociados a cáncer (CAFs) serían responsables de una mayor densidad de fibras de colágeno $\text{Xl}\alpha 1$ que participarían en la remodelación de la matriz extracelular a nivel del tumor primario y, quizás, en el proceso de invasión e infiltración.

6. Virus del Papiloma Humano

Los papilomavirus constituyen un grupo de virus pequeños (Figura 7) de ADN de aproximadamente 8000 pares de bases y de un tamaño de unos 55 nm, que inducen tumores epiteliales escamosos (verrugas y papilomas).

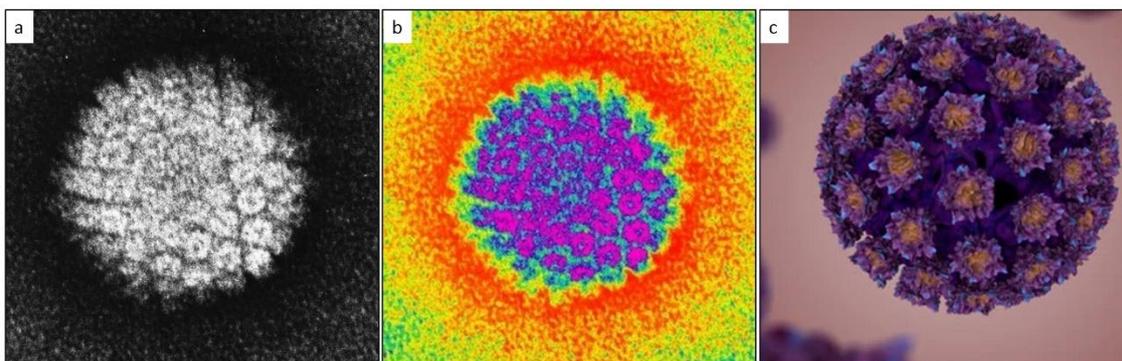


Figura 7: Imagen del virus del papiloma humano.

a) Imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido, b) Esquemática coloreada del virus obtenido por la electronografía, c) modelo de reconstrucción tridimensional del virus.

El primero que se describió fue el papilomavirus del conejo común. Posteriormente, se aislaron y caracterizaron papilomavirus en otras especies de vertebrados, incluido el hombre⁷⁴. Han sido identificados y aislados más de 120 tipos diferentes de papilomavirus humanos (VPH), cada uno de los cuales generalmente expresan un tropismo característico. Algunos tipos son

Determinación de biomarcadores pronósticos en papilomas intraductales mamarios

cutaneotrópicos (VPHs 1, 4, 5, 8, 41, 48, 60, 63 y 65) y se aíslan frecuentemente en verrugas cutáneas y plantares, en lesiones cutáneas en los pacientes con epidermodisplasia verruciforme, en lesiones cutáneas en pacientes inmunodeprimidos tras un trasplante y en algunos tumores epiteliales. Otro grupo de VPHs son mucosotrópicos (VPHs 6, 11, 13, 44, 55, 16, 31, 33, 35, 52, 58, 67, 18, 39, 45, 59, 68, 70, 26, 51, 69, 30, 53, 56, 66, 32, 42, 34, 64, 73, 54) y se identifican en lesiones benignas y malignas del tracto anogenital en ambos sexos. Ocasionalmente, estos tipos virales se aíslan en tejidos y lesiones de la cavidad oral, orofaringe, laringe y esófago^{75,76}.

La expresión clínica más conocida de la infección viral la constituyen los condilomas acuminados o verrugas genitales, asociados en aproximadamente un 90% a infecciones por los VPHs 6 y 11. Las lesiones neoplásicas cervicales, vulvares, vaginales, de pene y de ano están ocasionalmente asociadas a los VPHs “benignos” o de “bajo riesgo” como el VPH 6 y el VPH 11, pero más frecuentemente a los VPHs típicamente carcinogénicos o de “alto riesgo” oncogénico como los VPHs 16, 18, 45 y 31. Más de 35 tipos de VPH se han aislado en lesiones neoplásicas del tracto anogenital⁷⁷.

Los estudios epidemiológicos y clínicos que han incorporado técnicas de biología molecular de alta sensibilidad en muestras biológicas adecuadas detectan VPHs oncogénicos o de alto riesgo en prácticamente el 100% de los cánceres cervicales. Formalmente, ha llegado a cuestionarse la existencia de cánceres cervicales no asociados al VPH. Igualmente, el ADN viral se detecta en la mayoría (70-90%) de las lesiones precursoras o lesiones intraepiteliales de alto grado y, en una menor proporción (20-50%), en las lesiones de bajo

grado. Las lesiones de alto grado incluyen a las llamadas neoplasias cervicales intraepiteliales o CIN II (displasia moderada) y CIN III (displasia grave y carcinoma in situ). Las lesiones de bajo grado incluyen los cambios citológicos o histológicos característicos de la infección por VPH y la CIN I o displasia leve. Estas últimas lesiones contienen en su mayor parte virus de bajo riesgo, razón por la que raramente van a progresar⁷⁸⁻⁸⁰.

Por otro lado, aunque el virus del papiloma humano se ha relacionado muy estrechamente con varios tipos de cáncer como los descritos (cérvix, anogenital, cavidad oral...) la relación del HPV con el cáncer de mama está aún en debate. Algunos estudios sugieren una presencia bastante elevada de este virus (más del 20%) en lesiones malignas de mama, mientras que su aparición en lesiones benignas es muy reducida o nula⁸¹⁻⁸³. Además, diversos trabajos demuestran la presencia de los genotipos víricos de alto riesgo (16,18 y 33) en una pequeña proporción de carcinomas infiltrantes de mama^{84,85}. El estudio de este virus en lesiones benignas de mama aún no se ha desarrollado, por lo que planteamos la posibilidad de que la presencia de este virus en los papilomas intraductales pueda ser un marcador de su potencial maligno.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis y objetivos

A partir de los datos expuestos en la introducción, nos planteamos la siguiente hipótesis:

A pesar del pensamiento generalizado acerca del comportamiento benigno de los papilomas intraductales, los datos en la bibliografía parecen apoyar que existen dos subtipos distintos, aquellos asociados a un riesgo de recidiva maligna y aquellos que se comportan como lesiones benignas sin riesgo de recidiva sin conocerse factores que puedan predecir dicho comportamiento.

Existe asimismo un confucionismo en la literatura acerca del posible papel etiológico del Virus del Papiloma humano en la génesis del papiloma intraductal sin que existan series con datos contrastados

Determinación de biomarcadores pronósticos en papilomas intraductales mamarios

Y para validar dicha hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Reclutamiento y selección de una población de pacientes diagnosticados de papilomas intraductales con suficiente entidad estadística y seguimiento adecuado.
2. Realización de estudio inmunohistoquímico de expresión proteica sobre tejido fijado en formol e incluido en parafina y correlación con recidivas malignas de:
3. Receptores de Estrógeno y Progesterona en células neoplásicas.
4. COL11A1 en fibroblastos de estroma peritumoral.
5. Realización de estudio molecular para la detección de presencia y genotipo del Virus del Papiloma Humano en la misma población.
6. Revisión de la historia de las pacientes y estudios estadísticos uni y multivariantes tomando como punto final la existencia o no de recidiva tumoral y el grado de malignidad de la misma.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material y métodos

Pacientes y muestras

Con el fin de evaluar los objetivos anteriormente expuestos nos planteamos realizar el estudio en una población mínima de 50 pacientes. Al ser el papiloma intraductal de mama una patología poco habitual se realizó un estudio multicéntrico, contando con muestras del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla en Santander (44), del Hospital Universitario de Puerto Real (7) y del Hospital 12 de Octubre en Madrid (11). Se seleccionaron en total 62 muestras previamente diagnosticadas de papiloma intraductal de mama. La búsqueda se realizó en las bases de datos de los correspondientes servicios de Anatomía Patológica para muestras diagnosticadas con anterioridad al año 2007, de manera que pudiéramos tener al menos 5 años de seguimiento de los pacientes. De cada paciente se revisó su historia clínica y se recopilaron datos de edad, diagnóstico, localización y tratamiento recibido. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) de Cantabria.

Determinación de biomarcadores pronósticos en papilomas intraductales mamarios

Se visualizaron nuevamente todas las muestras de los diferentes casos con dos objetivos principales, en primer lugar confirmar el diagnóstico previo (ya que se basaba en diagnósticos de diferentes patólogos) y en segundo lugar elegir un bloque en el que tuviéramos una población representativa de la lesión.

1. Para cada una de las muestras se realizó el siguiente protocolo:
2. Inmunotinción para la expresión de COL11A1
3. Inmunotinción para la expresión de estrógenos y progesterona
4. Extracción de DNA
5. Análisis del Virus del Papiloma Humano

Estudios Inmunohistoquímicos

Para la detección de la presencia de estrógenos y progesterona se realizaron cortes de 3 μm a partir de los bloques seleccionados y se colocaron sobre portaobjetos IHC Flex™ (DAKO, Glostrup, Denmark). Los cortes se desparafinaron y se pretrataron simultáneamente en el buffer Envision Flex™ Target Retrieval Solution Low pH (DAKO) metiéndolos durante 20 min en el PT-LINK (DAKO) a 95°C.

Una vez desparafinados e hidratados, los portas se colocaron sobre rejillas especiales y se realizó la inmunotinción de manera automática con el Autostainer-Link 48 (DAKO). A continuación, las muestras fueron incubadas con anticuerpos primarios monoclonales dirigidos contra estrógeno (ER, clon 1D5, DAKO) y progesterona (PR, clon PGR 636, DAKO). La visualización se realizó utilizando anticuerpos con biotina y estreptavidina conjugada con

peroxidasa (HRP Envision™ Ratón, Dako). Como sustrato para el revelado se empleó diaminobencidina (DAB, Dako). Ambos marcadores se cuantificaron en base al porcentaje de células tumorales que mostraban tinción nuclear positiva y las muestras se consideraron como positivas si la tinción nuclear estaba presente en al menos un 10% de las células, de acuerdo con las directrices de la OMS.

La determinación del COL11A1 se realizó mediante la técnica inmunohistoquímica, utilizando un anticuerpo monoclonal anti proCOL11A1 (clon 1E8.33, Oncomatrix, Bilbao, ESPAÑA). Para la visualización se utilizó el sistema automatizado Benchmark Ultra (Roche-Ventana, Oro Valley, Arizona, EE.UU.). Para la recuperación antigénica se utilizó tampón Ultra CC2 durante 16 minutos a 98° C. El anticuerpo se diluyó a 25 ug/ml y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Para la visualización se empleó el Optiview Kit (Roche-Ventana) según el protocolo del fabricante. Las muestras se consideraron positivas cuando al menos un fibroblasto asociado al tumor presentaba inmunotinción clara, tal como se describe en la bibliografía⁶⁵ sobre el tema.

Análisis del Virus del Papiloma Humano (VPH)

Este análisis consto de dos partes diferenciadas, por un lado se extrajo el DNA de las muestras de tejido y por otro lado se realizó el protocolo propiamente dicho de análisis de la presencia del VPH

Extracción de DNA

La Extracción del DNA se llevó a cabo con el kit comercial con QIAamp®

DNA mini kit de QIAGEN según el siguiente protocolo:

1. Corte de cada bloque de parafina 5 secciones de 5 micras de grosor e introducción en un tubo Eppendorf de 2 ml previamente identificado.
2. Anadir 1200 μ L de xilol y mezclar en vórtex hasta completa disolución. Centrifugar a máxima potencia y temperatura ambiente durante 5 minutos. Eliminar el xilol con cuidado de no arrastrar el precipitado.
3. Añadir 1200 μ L de etanol absoluto sobre el pellet y mezclar en vórtex. Centrifugar a máxima potencia y temperatura ambiente durante 5 minutos. Descartar el etanol con cuidado de no arrastrar el pellet.
4. Repetir el paso 3.
5. Incubar a 37 °C durante 10-15 minutos para eliminar los restos de etanol.
6. Añadir 180 μ L de buffer ATL y 20 μ L de Proteinasa K. Mezclar por agitación durante 15 segundos. Incubar a 56 °C en agitación durante 80 minutos hasta lisis completa de los tejidos.
7. Dar un pulso de centrifuga. Añadir 200 μ L de buffer AL y mezclar por agitación durante 15 segundos. Incubar a 70 °C durante 10 minutos.
8. Dar un pulso de centrifuga. Añadir 200 μ L de etanol absoluto y mezclar por agitación. Filtrar la mezcla obtenida a través de una

- columna (QIAamp mini spin). Centrifugar a 8000 r.p.m. durante 1 minuto.
9. Pasar la columna a un tubo limpio y desechar el tubo con el eluido.
Añadir sobre la columna 500 µL de buffer AW1
 10. Añadir 500 µL de buffer AW2. Centrifugar a máxima potencia durante 3 minutos. Descartar el líquido precipitado. Volver a centrifugar 1 minuto.
 11. Colocar la columna sobre un nuevo tubo Eppendorf con tapa debidamente rotulado. Añadir 100 µL de buffer AE. Incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugar a 8000 r.p.m. durante 1 minuto.
 12. Añadir 50µL de buffer AE sobre la columna. Incubar 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugar en las mismas condiciones que en el paso 14.
 13. Medir la concentración del DNA obtenido mediante el espectrofotómetro NanoDrop 2000.

Análisis de VPH

El kit utilizado para este estudio CLART HPV2 (Genómica, Madrid) está basado en la amplificación de fragmentos específicos del genoma vírico y su posterior hibridación con sondas específicas para cada tipo de VPH (figura 8). Este kit es capaz de detectar infecciones y coinfecciones de hasta 35 genotipos en un único tubo, lo que conlleva un amplio número de ventajas:

Determinación de biomarcadores pronósticos en papilomas intraductales mamarios

- Su alta sensibilidad permite la detección de cantidades mínimas de ADN vírico.
- La elevada especificidad, al utilizar una secuencia correspondiente a una región altamente conservada dentro del genoma vírico y sondas de captura específicas para cada tipo de VPH.
- Facilidad de estandarizar en un laboratorio hospitalario.
- Rapidez, se obtienen los resultados de los análisis en 8 h.

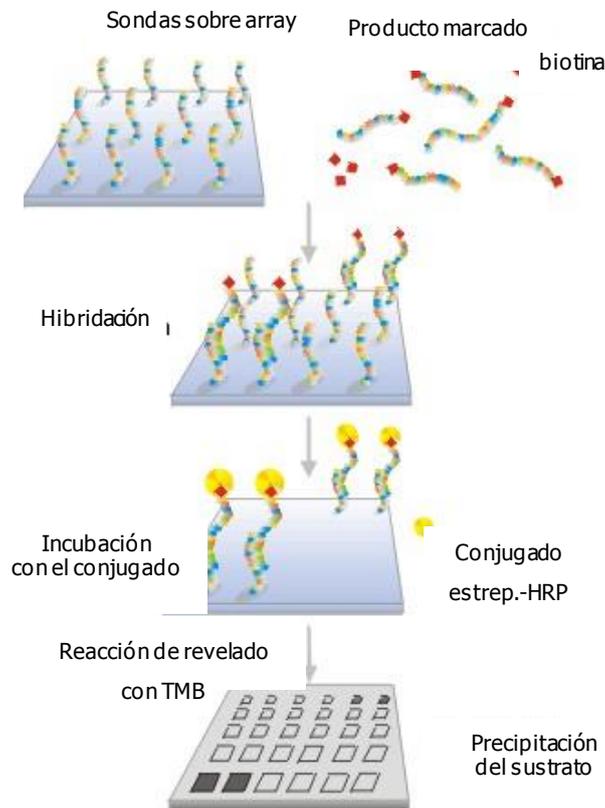


Figura 8: Esquema del método de visualización.

Las sondas, inmovilizadas sobre la superficie, capturan sus productos amplificados complementarios marcados con biotina. A través de la biotina, se une el conjugado, en este caso estreptavidina-HRP (peroxidasa de rábano, HorseRadish Peroxidase). El sustrato *o*-dianisidina por la acción de la HRP, produce un precipitado sobre la zona en la que se produce la hibridación.

El kit utilizado para esta sección del trabajo detecta la presencia de los 35 virus de VPH (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 85 y 89) en distintos tipos de muestras humanas (frotis, suspensiones celulares y tejido fijado en formol e incluido en parafina).

Para la realización de esta técnica se siguió el protocolo descrito a continuación

Reacción de amplificación

1. Añadir 5 µl del ADN extraído de las muestras a los tubos de reacción y resuspender varias veces con la micropipeta. Dejar los tubos en el hielo. Añadir 1,5 µl de Cloruro de Magnesio 25mM en los tubos de amplificación.
2. Programar en el termociclador los siguientes ciclos de temperaturas, para tubos de reacción de 0,2 ml:

1 ciclo	95°C 5 min
40 ciclos	94°C 30 seg 55°C 60 seg 72°C 90 seg
1 ciclo	72°C 8 min
20°C continuo hasta la recogida de tubos (opcional)	

3. Visualización del producto amplificado en CLART-Strip
4. Asegurarse, de que antes de comenzar la hibridación el termomixer de placas ha estado a 65°C al menos 1 hora.
5. Atemperar la SH (solución de hibridación) a temperatura ambiente.

Determinación de biomarcadores pronósticos en papilomas intraductales mamarios

6. Preparar la solución de lavado antes de cada ensayo, no reutilizar soluciones o restos preparadas con anterioridad.
7. Usar una punta con filtro diferente para cada pocillo y cambiarla cada vez que se añada un reactivo.
8. Asegurarse de que la bomba aspira adecuadamente y no deja restos en el fondo del pocillo.
9. Aspirar completamente las diferentes soluciones dentro de los pocillos sin tocar el array.

Revelado.

1. Desnaturalización: utilizar el termociclador para desnaturalizar los productos de PCR. Para este paso, colocar los tubos amplificados en el termociclador e incubar a 95°C durante 10 minutos. Sacar los tubos de la incubación a 95°C y colocarlos inmediatamente en un recipiente con hielo.
2. Preparación de la Solución TL diluida:
3. Por cada tira de microarrays (8 pocillos en total), preparar 10 mL de solución de lavado diluida, añadiendo 1 ml de Solución TL a 9 ml de agua destilada.
4. Prelavado de los CS: antes de empezar el ensayo es necesario lavar los tubos AT añadiendo 200 µL de Solución TL diluida a cada pocillo del CS, resuspender de 10 a 15 veces con la pipeta multicanal, teniendo en cuenta que no se debe tocar la superficie del array. Desechar la Solución TL diluida con pipeta o preferiblemente con

bomba de vacío. El array debe quedar sin restos de solución, aunque nunca debe permanecer seco durante mucho tiempo. Añadir la siguiente solución inmediatamente.

5. Hibridación: Antes de usar la Solución SH (Solución de Hibridación), ésta debe estar a temperatura ambiente. Una vez desnaturalizados los productos de PCR, añadir 100 μ L de solución SH (evitar que se forme espuma) a cada pocillo de los CS. Añadir 5 μ L de producto de PCR desnaturalizado a cada pocillo de los CS, resuspender varias veces para que se mezcle con la solución de hibridación. Incubar la tira cubierta con la tapa de plástico transparente en el termomixer de placa tapado durante 1 hora a 65° C, agitando a 550 r.p.m. Tras esta incubación, sacar la placa y desechar la Solución SH con pipeta o bomba de vacío.
6. Doble Lavado: usar puntas diferentes para cada pocillo en ambos lavados. Añadir 200 μ L de Solución TL diluida a cada pocillo del CS, resuspender de 10 a 15 veces con la pipeta multicanal. Desechar la Solución TL diluida con pipeta o preferiblemente con bomba de vacío multicanal. Repetir la operación.
7. Bloqueo y conjugado: 15 minutos antes de concluir la hibridación, se debe preparar la solución CJ (Conjugado) diluida y mantener en hielo. Se recomienda centrifugar la solución CJ durante 10 segundos antes de usarla. A continuación, preparar la solución CJ diluida. Por cada CS, se añade 1 ml de solución DC y 7.5 μ L de Solución CJ. Se debe dar un vórtex a la solución una vez diluida para homogenizar.

Determinación de biomarcadores pronósticos en papilomas intraductales mamarios

8. Desechar la Solución TL (Tampón de lavado) diluida sin dejar seco el array y añadir a cada pocillo del CS 100 μ l de Solución CJ diluida. Incubar durante 15 minutos exactos en el termomixer de placa a 30° C, agitando a 550 r.p.m. Tras esta incubación, sacar la placa y desechar la solución rápidamente con pipeta o bomba de vacío multicanal. (Dejar programado el termomixer de placa a 25° C y en movimiento para su utilización posterior en el paso 8. Podemos quitar la tapa para que baje antes la temperatura).
9. Triple Lavado: añadir inmediatamente 200 μ L de Solución TL diluida a cada pocillo del CS, resuspender de 10 a 15 veces con la pipeta multicanal y desechar la solución con la pipeta o vacío sin dejar seco el array. Repetir la operación dos veces más. Es muy importante que no queden restos de Solución CJ ya que ésta reaccionaría con la Solución RE (Revelado) dando lugar a una señal inespecífica.
10. Revelado con Solución RE: quitar la solución TL diluida sin dejar seco el array, añadir 100 μ L de solución RE a cada pocillo del CS e incubar 10 minutos a 25° C en el termomixer de placa sin agitación.
11. Desechar la Solución RE completamente con pipeta o vacío. El array debe quedar seco
12. CAR (*Clinical Arrays Reader*): Se coloca un adaptador especial sobre la bandeja del CAR y a continuación se colocará la placa en el CAR para tomar las imágenes de todos los pocillos para posteriormente ser analizadas automáticamente.

LECTURA DE RESULTADOS

El procesamiento de los datos obtenidos a partir de cada uno de los análisis, se realiza de forma automática. El equipo de lectura y análisis presentará un informe en el que se indican los resultados.

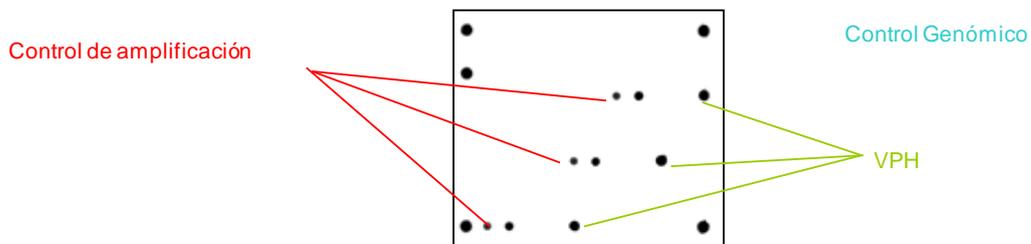
Uno de los inconvenientes de la detección por amplificación genómica son los falsos negativos debido, bien a una calidad inadecuada del ADN de la muestra (por toma de cantidad insuficiente de muestra, por degradación del DNA), o bien a la presencia de inhibidores de la ADN polimerasa en las muestras analizadas. Con el kit seleccionado se han eliminan estos falsos negativos gracias a la introducción de controles internos en el mismo tubo de reacción donde se analiza la muestra.

Cada tubo contiene los siguientes oligos:

- Un par de oligonucleótidos que amplifican un fragmento de un gen control humano. Éste es el control de extracción de ADN genómico o control del ADN del paciente.
- Un par de oligonucleótidos que amplifican un plásmido modificado incluido en el tubo de amplificación y que se usa como control de amplificación de la reacción de PCR.
- Oligonucleótidos específicos de cada genotipo de VPH.

Determinación de biomarcadores pronósticos en papilomas intraductales mamarios

Teniendo en cuenta estas observaciones, solo se podrán interpretar aquellas muestras que presentan positividad para cada uno de los controles, ya que indicarían que la reacción de amplificación se ha realizado correctamente. Podríamos por tanto considerar este ejemplo como un resultado positivo



Análisis estadístico

Para gestionar todos los parámetros clínicos e histopatológicos se generó una tabla utilizando el programa Microsoft Excel 2003.

El estudio estadístico ha sido llevado a cabo utilizando los paquetes estadísticos SPSS versión 20 y GraphPad Prism versión 5.01.

El análisis de la expresión diferencial de las distintas inmunotinciones, se ha realizado mediante un test de regresión lineal simple. En todos los casos se consideró una $p < 0,05$ como significativa.

El análisis de supervivencia asociado a las distintas variables se llevó a cabo mediante curvas de Kaplan-Meier y regresión de Cox.

RESULTADOS

Resultados

A continuación se describirán los principales resultados obtenidos en este trabajo, así como el análisis estadístico derivado de éstos.

Pacientes

Se reclutó una población final de 62 pacientes, diagnosticados de papiloma (solitario) intraductal de mama, derivados de los Servicios de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (44 muestras), del Hospital Universitario de Puerto Real (7 muestras) y del Hospital 12 de Octubre (11 muestras). De todas las muestras se obtuvo un seguimiento mínimo de 84 meses, con una última revisión clínica en diciembre de 2014.

A excepción de uno, todos los pacientes eran mujeres. La edad media de la población fue de 54,3 años y su distribución de edad se presenta en la

Determinación de biomarcadores pronósticos en papilomas intraductales mamarios

figura 1, siendo el rango predominante el de mayores de 55 años (29 casos), seguido del de 40 a 55 años (23 casos) y por último el de menores de 40 años (10 casos) (figura 9).

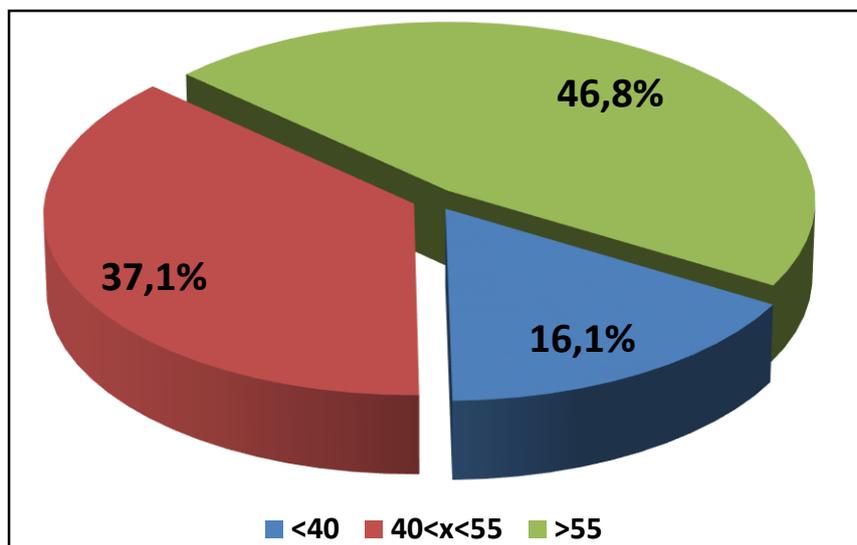


Figura 9: Distribución de la población por rangos de edad.

La distribución por localización de la lesión presentó una ligera desviación hacia un debut en mama izquierda (54,83%, 34 pacientes) respecto a la localización en la mama derecha (45,17%, 28 casos) sin que hubiese una diferencia significativa.

El tratamiento más utilizado fue la resección dirigida, seguido por una eliminación mediante mamotomo. Un 20% de las pacientes no fueron intervenidas quirúrgicamente y simplemente se pautó un seguimiento más continuo.

De los 62 casos estudiados 11 presentaron recurrencia en forma de carcinoma infiltrante con un tiempo medio de recaída de 42 meses. Otros siete casos presentaron recidiva como lesión proliferativa no maligna (papiloma, hiperplasia columnar...), en estos casos el tiempo medio hasta el debut de

recurrencia fue de 92 meses. Los 44 casos restantes no presentaron recurrencia durante el tiempo mínimo de seguimiento (84 meses). En adelante, para realizar las comparaciones se han separado los pacientes en dos grupos, aquellos con recidiva maligna (11 casos) y el resto casos con recaída benigna o sin recurrencia de ningún tipo (51 casos).

Expresión del COL11A1

Con el fin de determinar si la presencia de COL11A1 se asociaba con un fenotipo maligno en las lesiones papilares de mama nos planteamos realizar un estudio inicial de la expresión de dicho marcador en lesiones papilares malignas. Para ello, se realizó un inmunomarcaje a cinco carcinomas papilares encapsulados. En todos los casos se apreció una expresión abundante de COL11A1 (figura 10), confirmando lo que ha sido descrito en la bibliografía científica para otros tumores infiltrantes mamarios.

Determinación de biomarcadores pronósticos en papilomas intraductales mamarios

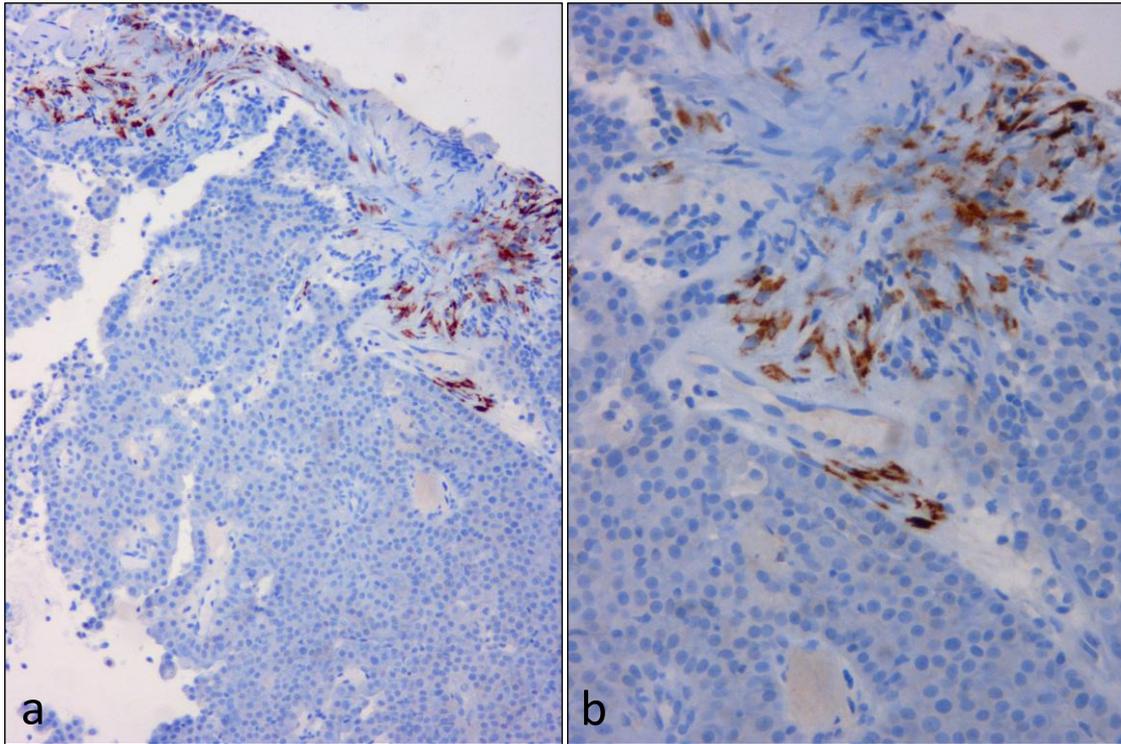


Figura 10: Inmunotinción para COL11A1 en un carcinoma papilar encapsulado.
Magnificación a) 150X b) 300X. Contrastado con Hematoxilina

Una vez determinada la expresión del COL11A1 en casos con fenotipo maligno nos planteamos la posibilidad de que la presencia de este marcador en patología papilar benigna pudiese ser un factor pronóstico de malignidad.

Para ello se realizó la inmunotinción en las 62 muestras. Un 56% de los casos fueron negativos para el inmunomarcaje, siendo el 44% restante positivo (Figura 11a). De entre los positivos, 10 de las muestras presentaron recidiva maligna subsiguiente (37%) mientras que las 17 restantes fueron del grupo con recidiva benigna o sin recidiva (Figura 11b).

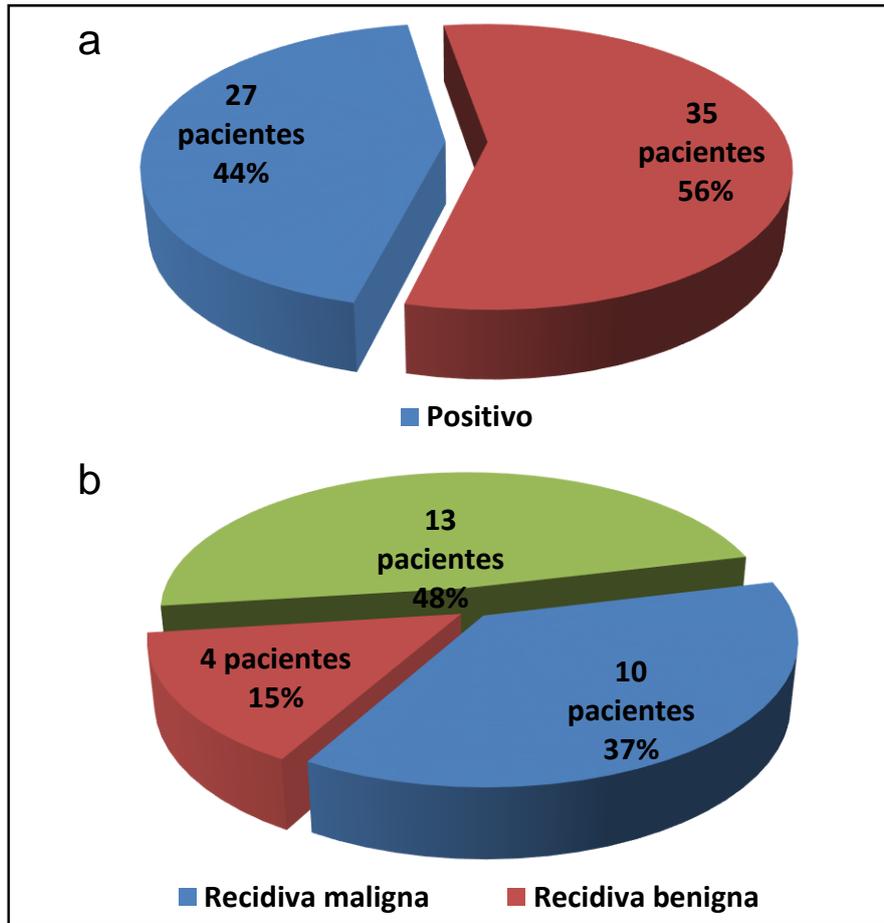


Figura 11: Distribución de la inmunotinción para COL11A1.
 a) distribución general de la muestra según su inmunotinción. b) Distribución de los casos positivos según su tipo de recidiva.

En todos los casos positivos se observó una clara inmunotinción en fibroblastos asociados a tumor sitios en los tallos fibrovasculares centrales de los papilomas (figura 12).

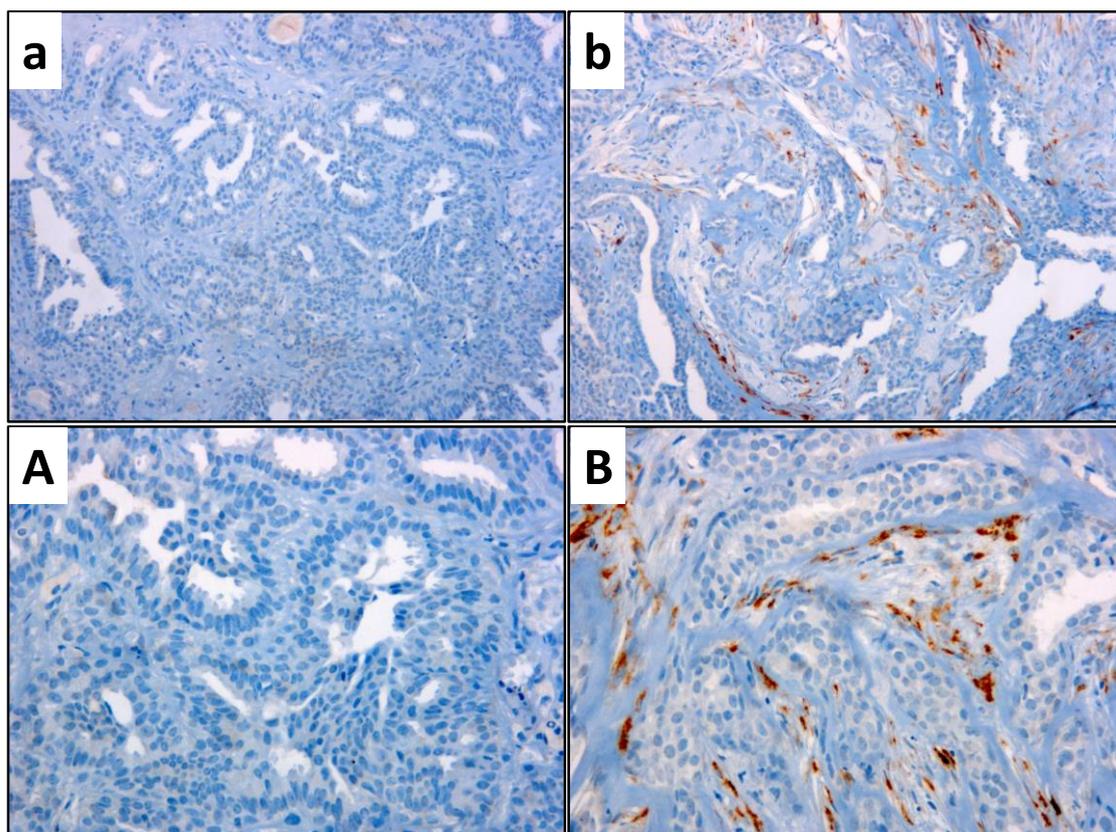


Figura 12: Expresión de COL11A1 en papilomas intraductales de mama.
Inmunotinción para-COL11A1 en: a) Papiloma intraductal de comportamiento Benigno y, b) Papiloma intraductal con recurrencia maligna. Muestras contrastadas con hematoxilina. (a y b aumento de imagen x200, A y B magnificación x400).

El 91 % de los papilomas que presentaron una recidiva maligna subsiguiente fueron positivos para la expresión del COL11A1 medido por inmunohistoquímica, mientras que sólo el 33% del grupo de lesiones de comportamiento benigno presento positividad. Estos datos arrojan un diferencia altamente significativa ($p < 0.0001$), que demuestra que la expresión de dicho marcador se asocia con una recidiva maligna presentando una sensibilidad del 91% y una especificidad del 67%.

Más aún, el análisis de las curvas de supervivencia (figura 13) mediante regresión de COX predice un riesgo de recurrencia altamente significativo ($p < 0,001$) al comparar los casos positivos y negativos, con un Riesgo Relativo

14,154 (IC 3,8-41,4) veces superior de presentar una recurrencia maligna si la biopsia presenta expresión de COL11A1.

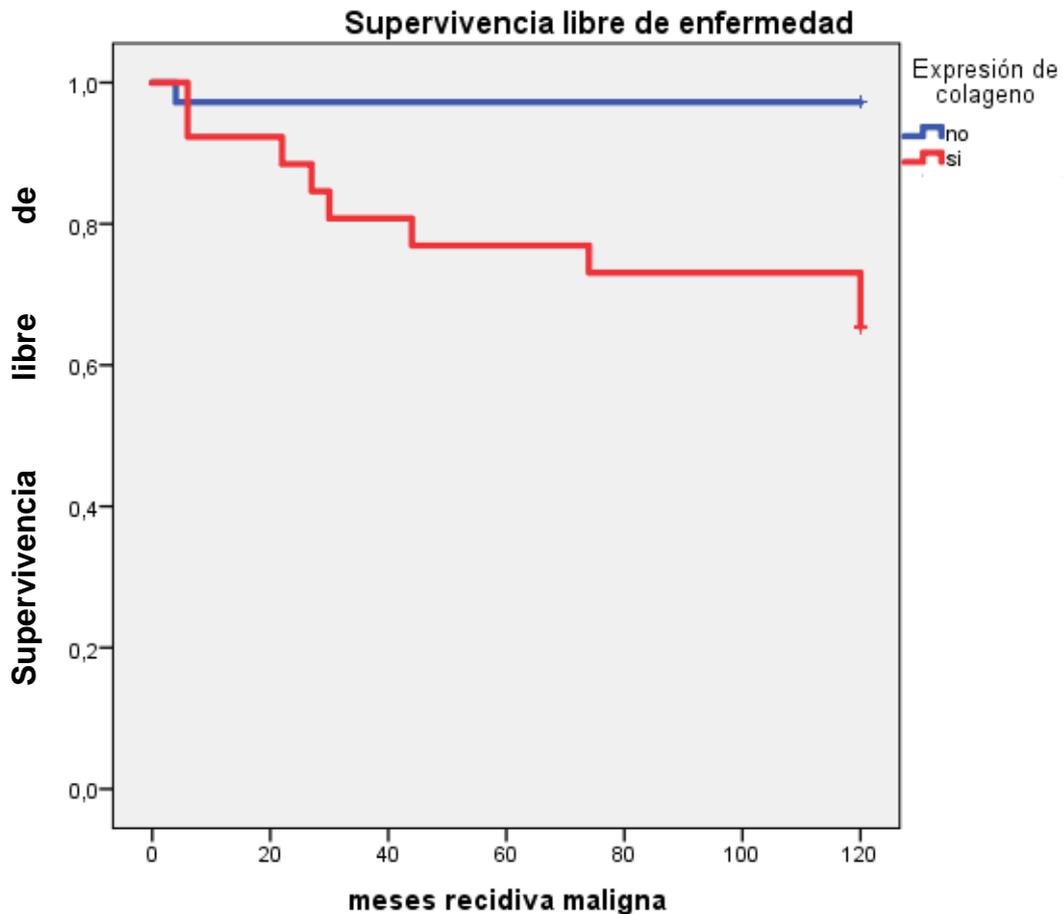


Figura 13. Análisis de supervivencia libre de recaída mediante curvas Kaplan-Meier censado por expresión inmunohistoquímica de COL11A1, $p < 0,001$.

Expresión de receptores hormonales: Estrógeno y Progesterona

Debido a que el cáncer de mama es en su mayoría hormonodependiente quisimos ver si la expresión de los receptores hormonales en las lesiones papilares mamarias podría vincularse con su pronóstico. A continuación procederemos a detallar los hallazgos más representativos sobre este tema.

Estrógenos

Del total de casos recogidos, 10 muestras no pudieron ser evaluadas, bien por falta de material para la realización de la técnica o por problemas en su cuantificación.

Para realizar el análisis de los datos obtenidos del estudio de expresión del receptor estrogénico nos basamos en la práctica clínica diaria y utilizamos tanto el porcentaje de células teñidas como la intensidad de marcaje. Con el producto de ambos ítems obtuvimos un *Histoscore*⁸⁶ que fue el valor que utilizamos para los cálculos estadísticos. Sólo tres muestras fueron consideradas negativas, al no llegar al 10% de las células teñidas. Por rangos de *Histoscore*, 13 casos presentaron un valor menor de 100 (25%), 12 muestras estuvieron entre 100 y 200 (23%) y el resto obtuvo un valor de *Histoscore* por encima de 200 (52%, figura 14).

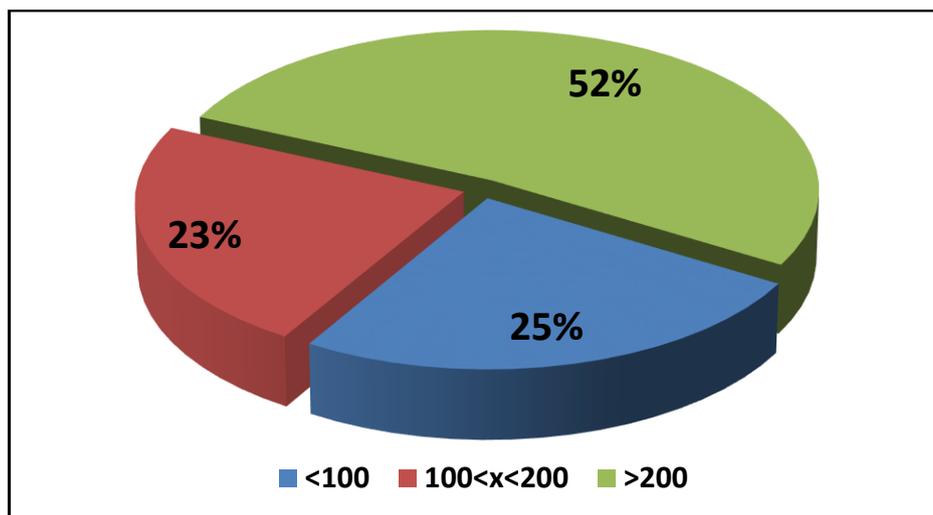


Figura 14: Distribución de la inmunotinción para el receptor de estrógenos. Se presenta la distribución por valores de *Histoscore*.

En las muestras positivas se observó un marcaje inmunohistoquímico nuclear difuso con intensidad dependiente de cada muestra (figura 15).

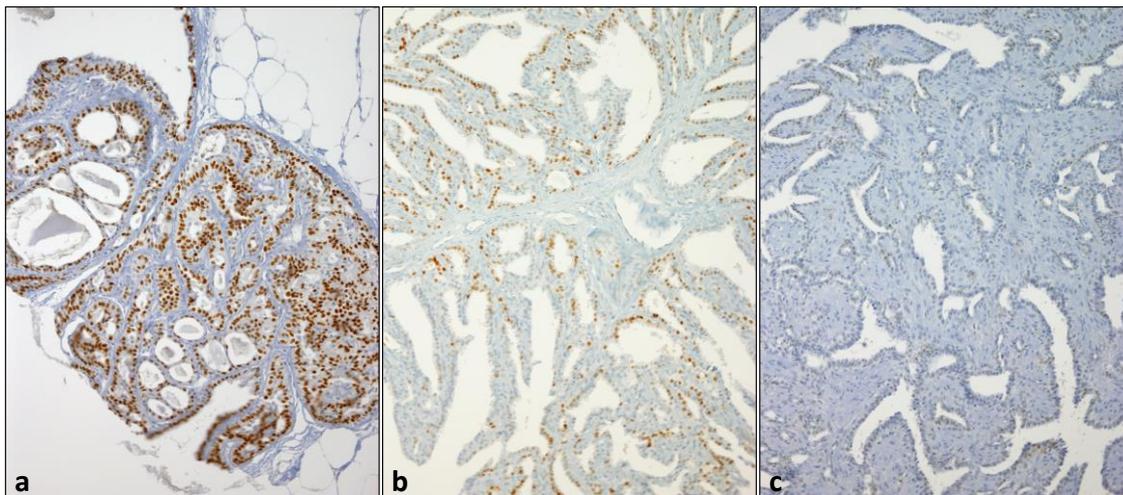


Figura 15: Expresión de receptor de estrógenos en papilomas intraductales de mama. Se observan las diferentes intensidades observadas para las distintas muestras a) Intensidad alta, b) Intensidad media, y c) intensidad baja. Muestras contrastadas con hematoxilina. Aumento de imagen x200

Cuando se realizó un estudio de la variable con una clasificación dicotómica (positividad/negatividad) no se observó diferencia alguna entre los grupos con recidiva maligna y aquellos con benigna o sin recaída. Sin embargo, un análisis más detallado con regresión logística univariante, demostró una tendencia muy significativa ($p=0,079$) cuando se asocia el valor puntual de *Histoscore* con la recidiva en forma de carcinoma maligno. Debido al bajo número muestral (52 casos) si este mismo análisis se realiza utilizando la herramienta de *Bootstrap* para 1000 casos (esta herramienta genera una población virtual muy grande eligiendo aleatoriamente una a una de entre las muestras de la población en estudio) esta tendencia se convierte en un valor altamente significativo ($p=0,002$, Tabla 2).

Determinación de biomarcadores pronósticos en papilomas intraductales mamarios

Tabla 2: Estadísticos de regresión univariante para el receptor de estrógenos Vs recidiva maligna.

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-,013	,109		-,116	,908
	histoscore para estrogénos	,001	,001	,251	1,797	,079

a. Dependent Variable: recidiva_malig

Bootstrap for Coefficients

Model		B	Bootstrap ^a				
			Bias	Std. Error	Sig. (2-tailed)	95% Confidence Interval	
						Lower	Upper
1	(Constant)	-,013	,002	,071	,865	-,130	,149
	histoscore para estrogénos	,001	-1,940E-005	,000	,049	2,126E-005	,002

*Se observa el estadístico general y la corrección con Bootstrap.

Una vez establecida esta asociación se determinó su efecto en la supervivencia libre de enfermedad. Para ello se realizó un análisis mediante curvas de Kaplan-Meier poniendo como punto de corte un *Histoscore* mayor de 200 (derivado de la presencia de la asociación descrita en el anterior párrafo, figura 16). De nuevo, debido al bajo número de muestras no se observó una diferencia significativa, pero si existe una tendencia clara con una $p=0,09$, de hecho, la presencia de un *Histoscore* mayor de 200 presenta un Riesgo Relativo mediante el test de Cox de 3,604.

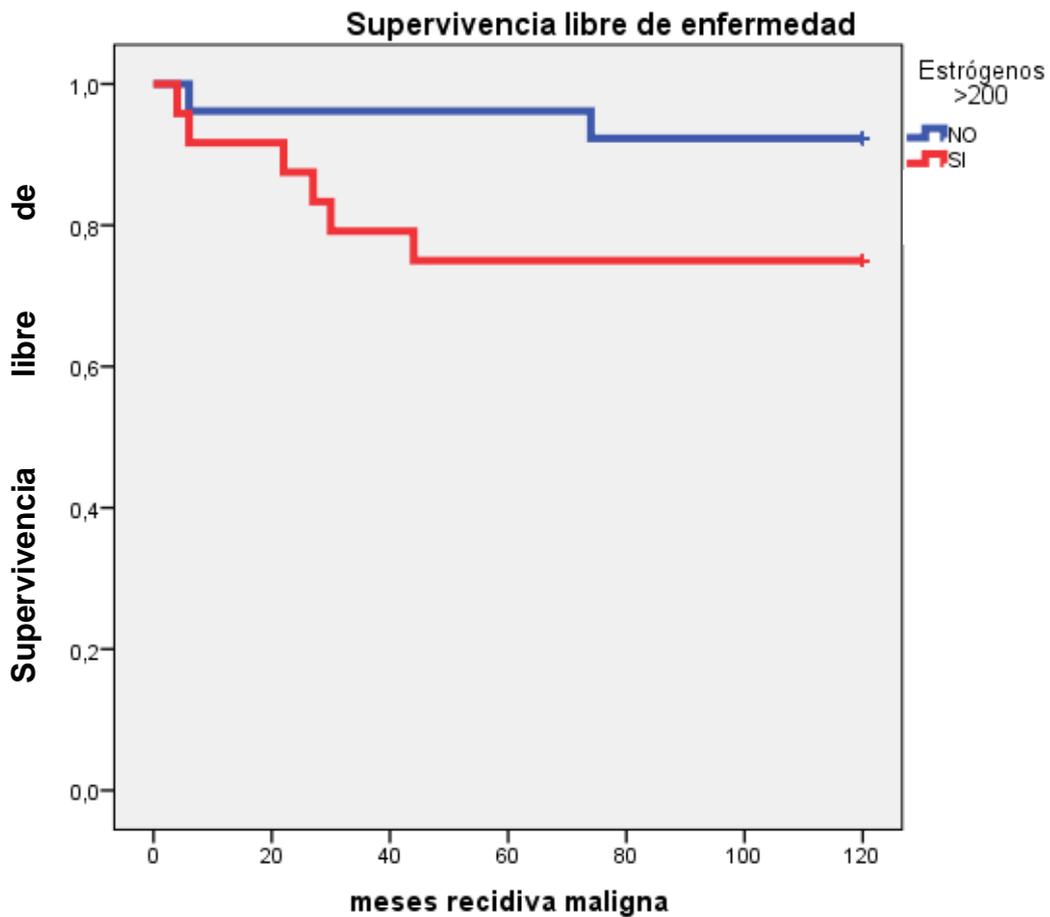


Figura 16: Análisis de supervivencia libre de recaída mediante curvas Kaplan-Meier censado por expresión inmunohistoquímica del receptor de estrógenos, $p=0,09$.

Progesterona

Al igual que en el análisis para receptores de estrógenos, por diversos motivos no pudimos optar al análisis de la serie completa, en total 51 muestras pudieron ser estudiadas para la inmunohistoquímica anti receptores de progesterona.

Un 7,8% (4 de 51) de las muestras resultaron negativas, mientras que el resto de casos presentó tinción positiva. Agrupándolas por el *Histoscore* 17 muestras presentaron un valor menor de 100, 15 tuvieron entre 100 y 200

Determinación de biomarcadores pronósticos en papilomas intraductales mamarios

puntos de *Histoscore*, mientras que las 19 restantes presentaron inmunotinción por encima de 200 (figura 17).

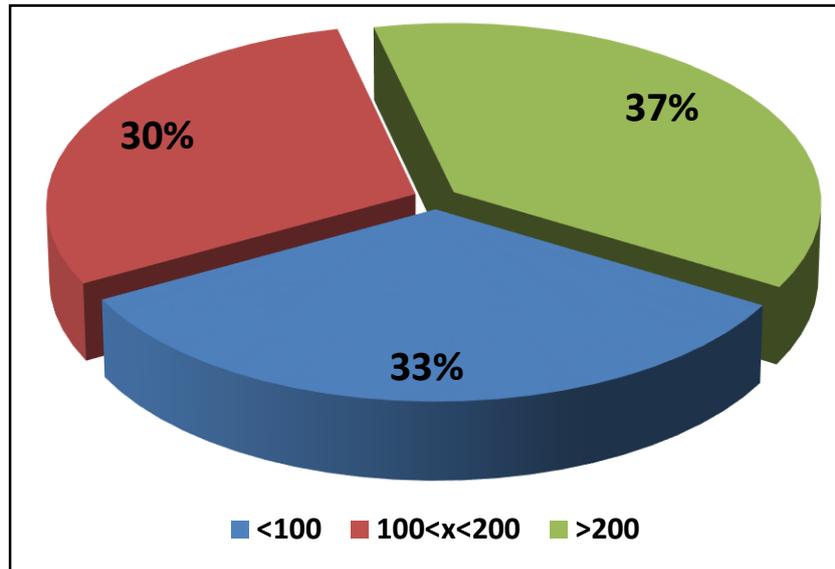


Figura 17: Distribución de la inmunotinción para progesterona. Se presenta la distribución por valores de *Histoscore*.

En la figura 18 se presenta imágenes representativas de los distintos grados de intensidad encontrados en las muestras positivas para la inmunotinción contra progesterona.

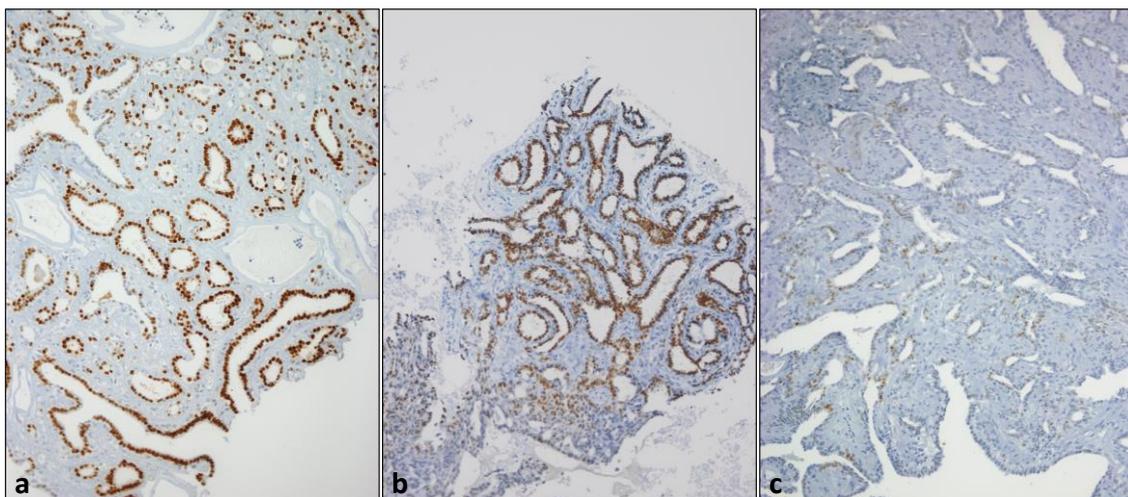


Figura 18: Expresión de receptores de progesterona en papilomas intraductales de mama.

Se observan las diferentes intensidades observadas para las distintas muestras a) Intensidad alta, b) Intensidad media, y c) intensidad baja. Muestras contrastadas con hematoxilina. Aumento de imagen x200

A diferencia de lo observado para la inmunopositividad del receptor estrogénico, la expresión de receptores de progesterona no se asoció de ninguna manera con la recidiva en forma de carcinoma maligno. Quisimos ver si esta expresión tenía algún efecto en el devenir de la recurrencia, por lo que realizamos los estudios estadísticos, pero esta vez cambiando los grupos, introduciendo en el grupo de control sólo los casos que no presentaron ninguna recidiva y el otro grupo, cualquier paciente con recurrencia benigna o maligna. Este estudio tampoco resultó en diferencias significativas, por lo que, concluimos que la expresión de receptores de progesterona no está vinculado a la recidiva en papilomas intraductales mamarios.

Estudio de la presencia del Virus del Papiloma Humano

Dada la morfología de las lesiones papilares, y sabiendo por la bibliografía científica que el Virus del Papiloma Humano se puede encontrar en tumores mamarios, decidimos comprobar si la infección por esta familia de virus podría ser la causante de las lesiones papilares o si su presencia se podría vincular a un peor pronóstico de la enfermedad.

Del total de casos seleccionados 44 resultaron negativos, 12 no pudieron valorarse (debido a problemas intrínsecos de la técnica) y sólo 6 resultaron positivos (figura 19).

Determinación de biomarcadores pronósticos en papilomas intraductales mamarios

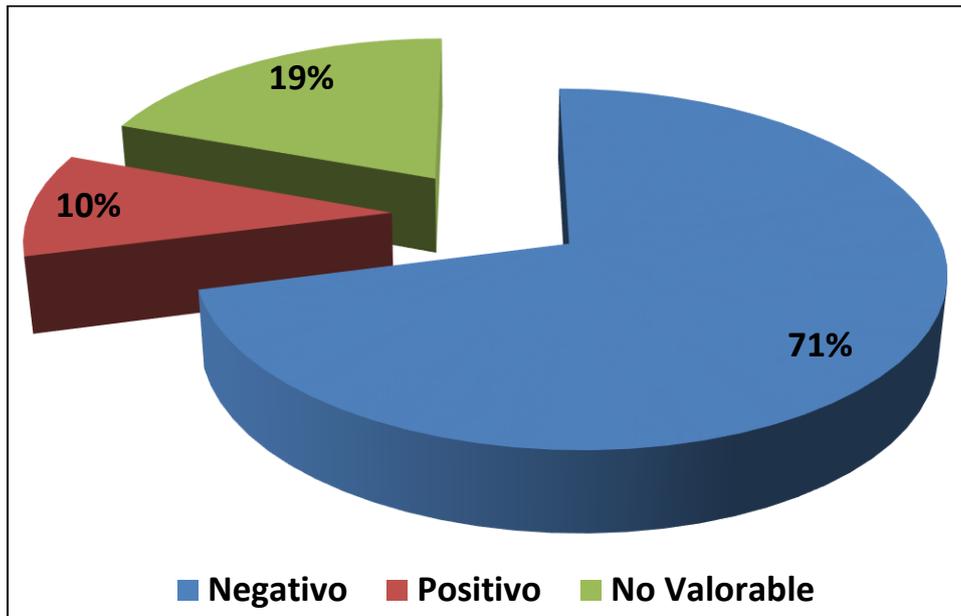


Figura 19: Distribución de la presencia de Virus del Papiloma Humano en papilomas intraductales mamarios.

Los 6 casos positivos resultaron infectados para los genotipos 58 (2 casos), 53, 43, 18 y 6 (figura 20). Sólo uno de los casos con recidiva maligna presentó positividad (tipo 43), mientras que del resto de muestras positivas ninguna presentó recidiva subsiguiente.

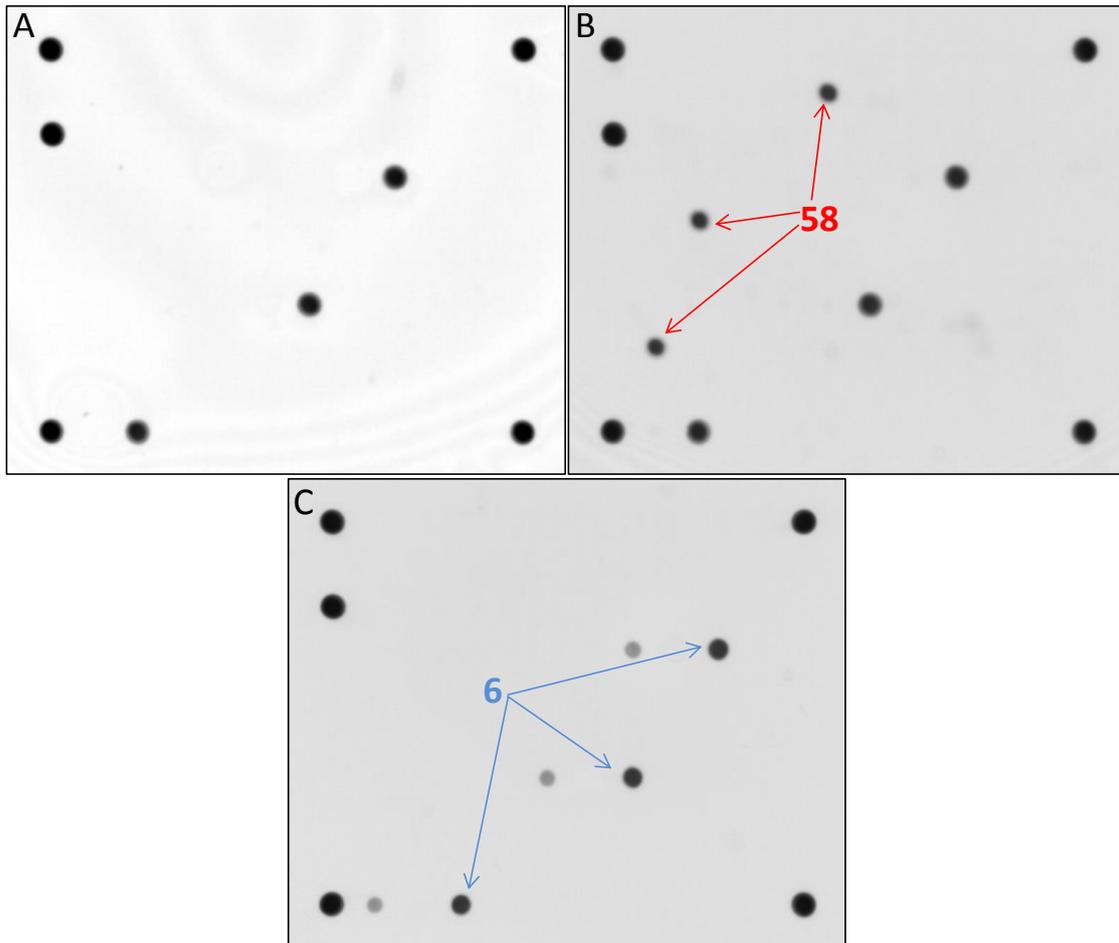


Figura 20. Se muestran ejemplos representativos de positividad para distintos genotipos del VPH
a) resultado negativo, b) infección con el genotipo 58, y c) infección con el genotipo 6. Resultados obtenidos con la plataforma CLART® HPV2 kit (Genómica)

El análisis estadístico de los datos, como cabía esperar, no aportó ningún resultado significativo, por lo que parece que la presencia o ausencia del virus no está vinculado a su potencial maligno.

Análisis multivariante

Con la idea de conseguir un modelo estadístico que prediga con una mayor sensibilidad la recidiva de los papilomas intraductales, se planteó un

Determinación de biomarcadores pronósticos en papilomas intraductales mamarios

análisis multivariante con las dos variables significativas en los análisis univariantes: COL11A1 e histoscore de estrógenos.

Los datos obtenidos (tabla 3), aunque no llegan a generar una significación estadística (por el tamaño muestral), presentan una tendencia a generar un grupo de especial riesgo. Se observa como la positividad para COL11A1 junto con una expresión alta de estrógenos predice un menor tiempo de recidiva (61 meses) siendo esta maligna en un mayor porcentaje de los casos (42.86%)

Tabla 3: Supervivencia libre de progresión y porcentaje de recidiva maligna por grupos de expresión de colágeno y estrógenos

		Supervivencia libre de progresión (meses)	
		Estrógenos	
		>200	<200
Colágeno	<i>Postivo</i>	61	95
	<i>Negativo</i>	100	108

		Porcentaje de recidiva maligna	
		Estrógenos	
		>200	<200
Colágeno	<i>Postivo</i>	42,86	25,00
	<i>Negativo</i>	7,14	6,25

En el anexo 1 se presenta todos los datos de supervivencia en relación a la expresión de COL11A1 y estrógenos para cada una de las muestras.

DISCUSIÓN

Discusión

Los datos generados en el presente trabajo sugieren que existen dos poblaciones diferenciadas de papilomas intraductales que deben de ser reconocidas en su diagnóstico. Por un lado la presencia del COL11A1 en el tejido conjuntivo junto a la expresión de receptores de estrógenos puede predecir un fenotipo maligno en estas lesiones. Por otro lado, parece no existir relación entre la infección por el virus del VPH y la aparición de la enfermedad.

En las siguientes líneas pasaremos a discutir brevemente los resultados obtenidos con la bibliografía existente sobre el tema.

Población de estudio

Este trabajo presenta una serie de 62 casos de papiloma intraductal. Debido al pequeño porcentaje de aparición (menos de un 3%) de la lesión, esta

Determinación de biomarcadores pronósticos en papilomas intraductales mamarios

población se encuentra entre las mayores hasta ahora publicadas en la literatura.

En cuanto al rango de edad de 23-81 años con una media de 54,3, nuestra serie se asemeja bastante a otros trabajos publicados con anterioridad siendo la media al diagnóstico de 51,8 (24-84) años en la serie del Dr. Brogi⁸⁷ y 5,4 (25-85) años en el estudio del Dr. Berger⁸⁸.

En cuanto a la localización de la lesión, aunque se desvía un poco hacia la aparición en la mama izquierda (54,8%), no existe una diferencia significativa para este resultado, como cabía esperar según la bibliografía sobre el tema^{87,89}.

En cuanto a la actitud terapéutica adoptada por el facultativo, la mayoría de las pacientes se trataron mediante una resección de la lesión con los conductos galactóforos como se recomienda en múltiples publicaciones⁹⁰⁻⁹³ y sólo un 20% de las pacientes tuvieron un seguimiento no invasivo.

Colágeno XI alfa 1

Las lesiones papilares (papiloma intraductal, papilomatosis, papiloma atípico y carcinoma papilar intraductal) son clínicamente controvertidas y suelen generar problemas en diagnóstico y manejo clínico⁹⁴. Debido a la similitud histopatológica que presentan, el diagnóstico preciso de estas lesiones sólo por morfología puede ser complejo, por lo que el patólogo requiere el uso de técnicas auxiliares. El principal indicador de malignidad de una lesión papilar es la ausencia de células mioepiteliales³¹ que rodean el eje vascular y que puede revelarse por inmunohistoquímica para proteínas como p63, actina de

músculo liso (SMM-HC) o calponina³⁹. Otros biomarcadores descritos que se han utilizado como indicadores para un diagnóstico diferencial son los receptores de estrógenos o las citoqueratinas CK5/6³⁹ y CK8⁹⁵, sin embargo no existe un consenso claro sobre su sensibilidad y precisión en la rutina médica diaria^{31,39,40,94,95}.

Dentro de las lesiones papilares mamarias, el papiloma intraductal es el que presenta el mayor reto diagnóstico, ya que tal y como se ha publicado en diversos estudios, puede presentar tasas de infradiagnóstico del 12 al 19%^{94,96} cuando el diagnóstico se presenta en biopsias de aguja gruesa debido, principalmente, a que la muestra es pequeña y a que puedan aparecer características histopatológicas comunes a otras lesiones papilares. Es por ello que se requiere un sistema fiable para clasificar los papilomas intraductales según su potencial maligno.

Marcadores como el CD44⁹⁷ o la ciclina D1⁹⁸ han sido propuestos como genes diferencialmente expresados entre las distintas lesiones papilares malignas y benignas, pero no existe una correlación con la recidiva maligna de los papilomas intraductales. También se han propuesto en algunos estudios alteraciones genéticas que son capaces de predecir una mayor susceptibilidad para la recidiva maligna en los papilomas intraductales, como puede ser la pérdida de heterocigosidad (LOH) en el cromosoma 16⁹⁹. Sin embargo, debido a problemas intrínsecos a la propia técnica, la ausencia de LOH no implica un diagnóstico benigno.

El papel de la matriz extracelular en la progresión tumoral es cada vez más claro; Existen multitud de evidencias científicas recientes que avalan que

Determinación de biomarcadores pronósticos en papilomas intraductales mamarios

la desregulación de sus diversos componentes desempeña un papel esencial en la generación y mantenimiento del microambiente tumoral^{100,101}. Por ejemplo, una matriz extracelular anormal promueve un comportamiento aberrante en las células del estroma, incluyendo los fibroblastos, las células inmunitarias y las células endoteliales que ayudan a formar el microambiente tumoral, contribuyendo así a la formación y perpetuación de la lesión neoplásica^{102,103}.

Uno de los componentes más importantes de la matriz extracelular, y además, la proteína más abundante en el cuerpo, es el colágeno. Dentro de los diversos tipos de colágenos presentes en el cuerpo, el colágeno XI alfa 1 (aun siendo un colágeno fibrilar menor encontrado principalmente en el cartílago) juega un papel fundamental en muchos aspectos de la transformación neoplásica como se ha demostrado en diversos estudios científicos¹⁰⁴.

El COL11A1 se ha encontrado altamente sobreexpresado en tumores avanzados respecto estadios neoplásicos precoces. Un meta-análisis de diversos estudios generados por análisis de expresión, mediante microarrays, en múltiples neoplasias demostró que la sobreexpresión de este gen está presente en la firma génica común a múltiples tumores entre los que se incluyen ovario, colon, mama o pulmón¹⁰⁵. Este meta-análisis presenta una firma génica asociada principalmente a una reacción desmoplásica estromal comúnmente producida por los fibroblastos asociados a cáncer (CAF), y se da principalmente en tumores que ya han invadido los tejidos circundantes o que presentaban metástasis a distancia.

Estudios llevados a cabo por nuestro grupo de investigación demostraron que el COL11A1 es un marcador excepcional para demostrar la invasividad tumoral en cáncer de mama⁶⁵. Por ello se planteó la posibilidad de que este marcador fuera también decisivo en la caracterización de la población de papilomas intraductales con fenotipo maligno.

El presente trabajo aporta un punto de partida en la clasificación de ambos fenotipos de papilomas intraductales. La expresión de COL11A1 en los fibroblastos del tallo fibrovascular central de los papilomas intraductales puede predecir una recidiva maligna futura con una sensibilidad por encima del 90%. Aunque la especificidad derivada de nuestro estudio no es especialmente brillante (65%), puede ser explicada principalmente por tipo de tratamiento quirúrgico que se da a los papilomas intraductales en España, ya que la extirpación completa de la lesión previene en un alto grado la recurrencia secundaria^{91,94}.

Además, el COL11A1 presenta una serie de ventajas respecto a los marcadores de invasividad utilizados en la rutina diaria. La primera y más importante es que este marcador se cataloga por expresión positivo, a diferencia de los marcadores basados en células mioepiteliales en los que el diagnóstico están relacionados con la inactivación de la expresión de proteínas en las lesiones invasivas. Esta característica es de especial ayuda en lesiones precoces, en los que la mayoría del componente tumoral es benigno¹⁰⁶, lo que genera grandes dificultades en la interpretación de los resultados cuando se busca una pérdida de expresión de un marcador.

Determinación de biomarcadores pronósticos en papilomas intraductales mamarios

Una segunda ventaja se da al trabajar con biopsias pequeñas. El diagnóstico de malignidad basado en la pérdida de expresión de proteínas ligadas a las células mioepiteliales se complica cuando existe poco material epitelial¹⁰⁷, sin embargo, al ser la expresión de COL11A1 en fibroblastos dispersos por el estroma tumoral, incluso en ausencia de lesión infiltrante el inmunomarcaje de la muestra puede predecir el fenotipo maligno.

Por último cabe destacar también, en comparación con otros marcadores como la calponina o la miosina, en los que el diagnóstico se basa en un cambio en la intensidad de la inmunotinción (a veces muy subjetivo)¹⁰⁸, que el COL11A1 presenta una sensibilidad suficiente para discriminar con una cuantificación dicotómica (positiva/negativa) pudiendo considerar como positiva una muestra que presente una única célula teñida.

Receptores hormonales

Desde hace algunas décadas, la presencia de receptores hormonales en el cáncer de mama se liga a un mejor pronóstico¹⁰⁹. Hoy sabemos que aproximadamente el 70% de los casos de cáncer de mama expresan receptores estrogénicos, y que la mitad de estos casos expresan también el receptor de progesterona¹¹⁰. Sin embargo, a diferencia de lo publicado para el cáncer de mama en general, nuestro estudio presenta unos datos que sugieren que (si bien para el receptor de progesterona no se aporta nada nuevo) las pacientes con una mayor expresión del receptor estrogénico presentan una tasa de recidiva mayor.

Son multitud los estudios que demuestran que la presencia de receptores de estrógenos beneficia a la paciente en un mayor tiempo libre de progresión además de una mayor supervivencia media¹¹¹⁻¹¹⁴. Nuestro estudio a diferencia de lo publicado, propone que la presencia de este receptor en las muestras de papilomas intraductales puede provocar una reducción en el tiempo libre de enfermedad. Aunque los datos, debido al bajo número muestral, no son significativos, la evidente tendencia estadística sugiere que las conclusiones son robustas (dato que se confirma con la utilización del bootstrap) incluso teniendo el sesgo del seguimiento debido al tratamiento anteriormente comentado. En este mismo sentido, existen varios trabajos que defienden que la expresión de receptores estrógenicos en los papilomas intraductales manifiesta un grado mayor de malignidad^{115,116}, sin embargo, estas publicaciones están más dirigidas a que dicha expresión puede ser sinónima de un diagnóstico erróneo (papiloma vs carcinoma ductal in situ) más que a la malignidad *per se*.

En nuestro caso se refuerza el significado de dicha inmunotinción al comprobarse que la recidiva es asimismo en forma de lesión papilar en más de un 40% de los casos.

VPH

Aunque existe un total acuerdo científico sobre el papel oncogénico de la infección por VPH en tumores genitales, existe, sin embargo, una gran controversia sobre el papel que juega dicha infección en el desarrollo tumoral de mama.

Determinación de biomarcadores pronósticos en papilomas intraductales mamarios

La bibliografía sobre este tema es extensísima, y dependiendo de los trabajos analizados se puede decir que no existe una relación entre cáncer de mama y VPH¹¹⁷⁻¹²⁰, que pueden existir indicios de la presencia del virus en un porcentaje bajo de los tumores mamarios^{85,121}, o incluso que dicha infección se da en un altísimo porcentaje de los cánceres^{82,122,123}. En lo que sí existe un cierto consenso es en que no se sabe el papel real que juega la infección del virus en la promoción tumoral.

Nuestra población presenta unos niveles de infección viral en las lesiones papilares (en torno al 12%) muy similar a la media europea de infección en lesiones tumorales mamarias (13,4%)¹²⁴. No obstante no se ve una significación estadística en cuanto a su aparición y el fenotipo maligno.

La presencia del VPH en papilomas intraductales de mama ha sido muy poco estudiada en la literatura científica. Tan solo existen unos pocos artículos en los que, al igual que nuestro trabajo, se ve una nula asociación con una mayor malignidad, o incluso simplemente no se encuentra infección vírica en las lesiones^{125,126}.

Parece por tanto, que la única vinculación entre el VPH y los papilomas intraductales es la morfología histológica de las lesiones que causan.

Cambio en la actitud terapéutica

Los datos derivados de este trabajo demuestran que la presencia de COL11A1 en el estroma de los papilomas intraductales, junto con una expresión de receptores de estrógenos por encima de 200 puntos (mediante

Histoscore), puede ser un indicador muy sensible para determinar el fenotipo maligno de la lesión.

Actualmente, como se ha indicado a lo largo del texto, existe una gran controversia en torno a la vía que debe seguirse en el manejo de los papilomas intraductales de mama^{92,94,127-129}. Esta discusión se debe principalmente al hecho de que, aunque el papiloma intraductal de mama está considerado una enfermedad benigna, existe un alto porcentaje de pacientes que desarrollan una recidiva maligna⁸⁹.

Existen equipos médicos que defienden la extirpación quirúrgica de la lesión como único tratamiento eficaz en las lesiones papilares, desde una tumorectomía dirigida para los papilomas intraductales, hasta mastectomías en lesiones más difusas^{130,131}. Esta situación se antoja muy complicada para las pacientes, ya que aunque son informadas de que su lesión es benigna y no entraña riesgo, el tratamiento de rutina es una cirugía muy invasiva.

Otros grupos de trabajo, en contraposición, promueven que, dado su fenotipo benigno, los papilomas intraductales no requieren ningún tratamiento quirúrgico, y abogan simplemente por un seguimiento radiológico continuado^{35,90}.

En torno a este debate surge la idea de clasificar los papilomas intraductales según su grado de malignidad con el fin de determinar un tratamiento específico para cada fenotipo¹³², sin embargo, ¿cuáles son esos factores determinantes?⁴⁰

El COL11A1 juega un papel vital en la respuesta a esta pregunta. La expresión de esta proteína en los papilomas intraductales, unidas a otros

Determinación de biomarcadores pronósticos en papilomas intraductales mamarios

factores pronósticos negativos como el tamaño mayor de 1,5 cm, la localización¹²⁷ o la presencia de microcalcificaciones¹³³ podrían ser de gran ayuda para decidir un tratamiento quirúrgico invasivo en las lesiones de fenotipo maligno. Además, sabiendo que el test del COLL1A1 en los papilomas intraductales mamarios posee un valor predictivo negativo de 0,97 se puede determinar con una alta probabilidad que aquellas muestras que no lo expresen serán de fenotipo benigno.

Aunque los cambios en la terapéutica de estas lesiones deberán realizarse con un mayor número de estudios, sí que es posible pensar en acciones puntuales que modifiquen en menor medida las actitudes terapéuticas o preventivas. En este contexto, apoyándonos en nuestros datos y sabiendo que la mayoría de estas lesiones se dan en mujeres pre y postmenopáusicas¹²⁹, estas pacientes podrían ser susceptibles de recibir quimioterapia adyuvante basada en inhibidores hormonales. Como se ha demostrado en diversos estudios, la inhibición de los receptores hormonales (tamoxifeno y raloxifeno)^{134,135} y los inhibidores de la vía de la aromatasa (exametasano)¹³⁶ pueden reducir la aparición de recaídas contralaterales en cáncer de mama. El principal problema de estas terapias es la elección de las pacientes que puedan responder al tratamiento, por lo que con los datos de este estudio se propone que aquellas pacientes con una alto índice de expresión de receptores y que además tenga COL11A1 positivo, podrían ser un indicadas para el tratamiento por su alta susceptibilidad a la recidiva maligna.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. La expresión de COL11A1 en fibroblastos asociados a carcinoma medida por inmunohistoquímica, en los papilomas intraductales mamarios predice el riesgo de recurrencia, en forma de lesión maligna, con una sensibilidad del 91% y una especificidad del 67%.
2. La expresión de altos niveles de receptores estrogénicos en papilomas intraductales mamarios presenta una tendencia estadística para predecir el riesgo de recidiva en forma de lesión maligna.
3. La expresión de receptores de progesterona no está vinculada a un peor pronóstico en los papilomas intraductales mamarios.
4. No existe relación directa entre la presencia del Virus del Papiloma Humano y la aparición de lesiones intraductales mamarias.
5. La presencia de COL11A1 y receptores de estrógenos en los papilomas intraductales mamarios podría ser clave para la determinación de la actitud terapéutica.
6. Este estudio parece corroborar la hipótesis de partida confirmando la existencia de dos subtipos de papilomas intraductales, aquellos con un comportamiento benigno (sin presencia de COL11A1) y otros con un fenotipo potencialmente maligno con expresión de COL11A1 y altos niveles de receptores de estrógeno.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- 1 DeSantis, C. E. *et al.* Breast cancer statistics, 2015: Convergence of incidence rates between black and white women. *CA Cancer J Clin* **66**, 31-42, doi:10.3322/caac.21320 (2016).
- 2 Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* **66**, 7-30, doi:10.3322/caac.21332 (2016).
- 3 Sanchez, M. J. *et al.* Cancer incidence and mortality in Spain: estimates and projections for the period 1981-2012. *Ann Oncol* **21 Suppl 3**, iii30-36, doi:mdq090 [pii] 10.1093/annonc/mdq090 (2010).
- 4 Galceran, J. *et al.* Cancer incidence in Spain, 2015. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, doi:10.1007/s12094-016-1607-9 (2017).
- 5 DeSantis, C. E. *et al.* Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* **64**, 252-271, doi:10.3322/caac.21235 (2014).

- 6 Massat, N. J. *et al.* Impact of Screening on Breast Cancer Mortality: The UK Program 20 Years On. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **25**, 455-462, doi:10.1158/1055-9965.EPI-15-0803 (2016).
- 7 Seifert, U., Schlanstedt-Jahn, U. & Klug, S. J. Screening for cancer. *Internist* **56**, 1114-1123, doi:10.1007/s00108-015-3738-4 (2015).
- 8 Levy-Lahad, E. & Friedman, E. Cancer risks among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *British journal of cancer* **96**, 11-15, doi:10.1038/sj.bjc.6603535 (2007).
- 9 Mavaddat, N. *et al.* Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. *J Natl Cancer Inst* **105**, 812-822, doi:10.1093/jnci/djt095 (2013).
- 10 Majeed, W. *et al.* Breast cancer: major risk factors and recent developments in treatment. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* **15**, 3353-3358 (2014).
- 11 Chlebowski, R. T., Anderson, G. L., Aragaki, A. K. & Prentice, R. Breast Cancer and Menopausal Hormone Therapy by Race/Ethnicity and Body Mass Index. *J Natl Cancer Inst* **108**, doi:10.1093/jnci/djv327 (2016).
- 12 DeSantis, C., Ma, J., Bryan, L. & Jemal, A. Breast cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* **64**, 52-62, doi:10.3322/caac.21203 (2014).
- 13 Buell, P. Changing incidence of breast cancer in Japanese-American women. *J Natl Cancer Inst* **51**, 1479-1483 (1973).
- 14 McMichael, A. J. & Giles, G. G. Cancer in migrants to Australia: extending the descriptive epidemiological data. *Cancer research* **48**, 751-756 (1988).
- 15 Cao, Y., Hou, L. & Wang, W. Dietary total fat and fatty acids intake, serum fatty acids and risk of breast cancer: A meta-analysis of prospective cohort studies. *International journal of cancer* **138**, 1894-1904, doi:10.1002/ijc.29938 (2016).
- 16 Desnoyers, A., Riesco, E., Fulop, T. & Pavic, M. [Physical activity and cancer: Update and literature review]. *La Revue de medecine interne /*

- fondee ... par la Societe nationale francaise de medecine interne, doi:10.1016/j.revmed.2015.12.021 (2016).
- 17 Chen, J. Y. *et al.* Dose-Dependent Associations between Wine Drinking and Breast Cancer Risk - Meta-Analysis Findings. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* **17**, 1221-1233 (2016).
 - 18 Kaminska, M., Ciszewski, T., Lopacka-Szatan, K., Miotla, P. & Staroslawska, E. Breast cancer risk factors. *Przegląd menopauzalny = Menopause review* **14**, 196-202, doi:10.5114/pm.2015.54346 (2015).
 - 19 Socolov, D., Anghelache, I., Ilea, C., Socolov, R. & Carauleanu, A. Benign breast disease and the risk of breast cancer in the next 15 years. *Revista medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi* **119**, 135-140 (2015).
 - 20 Gervais-Fagnou, D. D., Girouard, C., Laperriere, N., Pintillie, M. & Goss, P. E. Breast cancer in women following supradiaphragmatic irradiation for Hodgkin's disease. *Oncology* **57**, 224-231, doi:12035 (1999).
 - 21 Fisher, B., Slack, N. H. & Bross, I. D. Cancer of the breast: size of neoplasm and prognosis. *Cancer* **24**, 1071-1080 (1969).
 - 22 O'Malley, F., Visscher, D., MacGrogan, G., Tan, P. H. & Ichihara, S. in *WHO classification of tumours of the breast* (eds S. R. Lakhani *et al.*) Ch. WHO classification of tumours of the breast, Table 7.02 99-105 (International Agency of Research on Cancer (IARC), 2012).
 - 23 Dupont, W. D. & Page, D. L. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med* **312**, 146-151, doi:10.1056/NEJM198501173120303 (1985).
 - 24 Page, D. L. & Dupont, W. D. Premalignant conditions and markers of elevated risk in the breast and their management. *The Surgical clinics of North America* **70**, 831-851 (1990).
 - 25 Onstad, M. & Stuckey, A. Benign breast disorders. *Obstetrics and gynecology clinics of North America* **40**, 459-473, doi:10.1016/j.ogc.2013.05.004 (2013).
 - 26 Aznar, Cortadellas & Xercavins. in *Fundamentos de Ginecología* (ed Zapardial I Kazlauskas S, SEGO) 475-481 (2009).

- 27 Fernandez-Cid, C. *et al.* Citología de las secreciones mamarias. Valor en el estudio de lesiones papilares. *Revista de Senología y Patología Mamaria* **26**, 47-51, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.senol.2013.02.004> (2013).
- 28 Pearlman, M. D. & Griffin, J. L. Benign breast disease. *Obstetrics and gynecology* **116**, 747-758, doi:10.1097/AOG.0b013e3181ee9fc7 (2010).
- 29 Wen, X. & Cheng, W. Nonmalignant breast papillary lesions at core-needle biopsy: a meta-analysis of underestimation and influencing factors. *Ann Surg Oncol* **20**, 94-101, doi:10.1245/s10434-012-2590-1 (2013).
- 30 Rosen, E. L., Bentley, R. C., Baker, J. A. & Soo, M. S. Imaging-guided core needle biopsy of papillary lesions of the breast. *AJR Am J Roentgenol* **179**, 1185-1192 (2002).
- 31 Ueng, S. H., Mezzetti, T. & Tavassoli, F. A. Papillary neoplasms of the breast: a review. *Arch Pathol Lab Med* **133**, 893-907, doi:2008-0406-RAR [pii] 10.1043/1543-2165-133.6.893 (2009).
- 32 Valdes, E. K. *et al.* Significance of papillary lesions at percutaneous breast biopsy. *Ann Surg Oncol* **13**, 480-482, doi:10.1245/ASO.2006.08.001 (2006).
- 33 Rizzo, M. *et al.* Surgical follow-up and clinical presentation of 142 breast papillary lesions diagnosed by ultrasound-guided core-needle biopsy. *Ann Surg Oncol* **15**, 1040-1047, doi:10.1245/s10434-007-9780-2 (2008).
- 34 Skandarajah, A. R. *et al.* Benign papilloma on core biopsy requires surgical excision. *Ann Surg Oncol* **15**, 2272-2277, doi:10.1245/s10434-008-9962-6 (2008).
- 35 Agoff, S. N. & Lawton, T. J. Papillary lesions of the breast with and without atypical ductal hyperplasia: can we accurately predict benign behavior from core needle biopsy? *Am J Clin Pathol* **122**, 440-443, doi:10.1309/NAPJ-MB0G-XKJC-6PTH (2004).
- 36 Sohn, V. *et al.* Breast papillomas in the era of percutaneous needle biopsy. *Ann Surg Oncol* **14**, 2979-2984, doi:10.1245/s10434-007-9470-0 (2007).

- 37 Choi, Y. D. *et al.* Clinical and cytologic features of papillary neoplasms of the breast. *Acta Cytol* **50**, 35-40 (2006).
- 38 Gomez-Aracil, V., Mayayo, E., Azua, J. & Arraiza, A. Papillary neoplasms of the breast: clues in fine needle aspiration cytology. *Cytopathology* **13**, 22-30, doi:352 [pii] (2002).
- 39 Mulligan, A. M. & O'Malley, F. P. Papillary lesions of the breast: a review. *Advances in anatomic pathology* **14**, 108-119, doi:10.1097/PAP.0b013e318032508d 00125480-200703000-00004 [pii] (2007).
- 40 Shouhed, D. *et al.* Intraductal papillary lesions of the breast: clinical and pathological correlation. *Am Surg* **78**, 1161-1165 (2012).
- 41 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013 (2011).
- 42 Mehlen, P. & Puisieux, A. Metastasis: a question of life or death. *Nature reviews. Cancer* **6**, 449-458, doi:10.1038/nrc1886 (2006).
- 43 Inns, J. & James, V. Circulating microRNAs for the prediction of metastasis in breast cancer patients diagnosed with early stage disease. *Breast* **24**, 364-369, doi:10.1016/j.breast.2015.04.001 (2015).
- 44 Pantel, K. *et al.* Early metastasis of human solid tumours: expression of cell adhesion molecules. *Ciba Foundation symposium* **189**, 157-170; discussion 170-153, 174-156 (1995).
- 45 Wu, Y., Sarkissyan, M. & Vadgama, J. V. Epithelial-Mesenchymal Transition and Breast Cancer. *Journal of clinical medicine* **5**, doi:10.3390/jcm5020013 (2016).
- 46 Sipos, F. & Muzes, G. Isolated lymphoid follicles in colon: switch points between inflammation and colorectal cancer? *World journal of gastroenterology* **17**, 1666-1673, doi:10.3748/wjg.v17.i13.1666 (2011).
- 47 Avizienyte, E., Brunton, V. G., Fincham, V. J. & Frame, M. C. The SRC-induced mesenchymal state in late-stage colon cancer cells. *Cells, tissues, organs* **179**, 73-80, doi:10.1159/000084511 (2005).
- 48 Brabletz, T. *et al.* Down-regulation of the homeodomain factor Cdx2 in colorectal cancer by collagen type I: an active role for the tumor

- environment in malignant tumor progression. *Cancer research* **64**, 6973-6977, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1132 (2004).
- 49 Kirkland, S. C. Type I collagen inhibits differentiation and promotes a stem cell-like phenotype in human colorectal carcinoma cells. *British journal of cancer* **101**, 320-326, doi:10.1038/sj.bjc.6605143 (2009).
- 50 Li, S. *et al.* MCP-1-induced ERK/GSK-3beta/Snail signaling facilitates the epithelial-mesenchymal transition and promotes the migration of MCF-7 human breast carcinoma cells. *Cellular & molecular immunology*, doi:10.1038/cmi.2015.106 (2016).
- 51 Orlichenko, L. S. & Radisky, D. C. Matrix metalloproteinases stimulate epithelial-mesenchymal transition during tumor development. *Clinical & experimental metastasis* **25**, 593-600, doi:10.1007/s10585-008-9143-9 (2008).
- 52 Sun, B., Zhang, D., Zhao, N. & Zhao, X. Epithelial-to-endothelial transition and cancer stem cells: two cornerstones of vasculogenic mimicry in malignant tumors. *Oncotarget*, doi:10.18632/oncotarget.8461 (2016).
- 53 Boudreau, N. & Bissell, M. J. Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells. *Current opinion in cell biology* **10**, 640-646 (1998).
- 54 Fischer, H. *et al.* COL11A1 in FAP polyps and in sporadic colorectal tumors. *BMC Cancer* **1**, 17 (2001).
- 55 Tlsty, T. D. & Coussens, L. M. Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annual review of pathology* **1**, 119-150, doi:10.1146/annurev.pathol.1.110304.100224 (2006).
- 56 Mertens, J. C. *et al.* Therapeutic effects of deleting cancer-associated fibroblasts in cholangiocarcinoma. *Cancer research* **73**, 897-907, doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2130 (2013).
- 57 Polanska, U. M. & Orimo, A. Carcinoma-associated fibroblasts: non-neoplastic tumour-promoting mesenchymal cells. *Journal of cellular physiology* **228**, 1651-1657, doi:10.1002/jcp.24347 (2013).

- 58 Friedl, P. & Alexander, S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell* **147**, 992-1009, doi:10.1016/j.cell.2011.11.016 (2011).
- 59 Blaschke, U. K., Eikenberry, E. F., Hulmes, D. J., Galla, H. J. & Bruckner, P. Collagen XI nucleates self-assembly and limits lateral growth of cartilage fibrils. *The Journal of biological chemistry* **275**, 10370-10378 (2000).
- 60 Acke, F. R., Dhooge, I. J., Malfait, F. & De Leenheer, E. M. Hearing impairment in Stickler syndrome: a systematic review. *Orphanet journal of rare diseases* **7**, 84, doi:10.1186/1750-1172-7-84 (2012).
- 61 Khalifa, O. *et al.* A recessive form of Marshall syndrome is caused by a mutation in the COL11A1 gene. *Journal of medical genetics* **49**, 246-248, doi:10.1136/jmedgenet-2012-100783 (2012).
- 62 Tompson, S. W. *et al.* Fibrochondrogenesis results from mutations in the COL11A1 type XI collagen gene. *American journal of human genetics* **87**, 708-712, doi:10.1016/j.ajhg.2010.10.009 (2010).
- 63 Kleman, J. P., Hartmann, D. J., Ramirez, F. & van der Rest, M. The human rhabdomyosarcoma cell line A204 lays down a highly insoluble matrix composed mainly of alpha 1 type-XI and alpha 2 type-V collagen chains. *European journal of biochemistry / FEBS* **210**, 329-335 (1992).
- 64 Chong, I. W. *et al.* Great potential of a panel of multiple hMTH1, SPD, ITGA11 and COL11A1 markers for diagnosis of patients with non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* **16**, 981-988 (2006).
- 65 Freire, J. *et al.* Collagen, type XI, alpha 1: An accurate marker for differential diagnosis of breast carcinoma invasiveness in core needle biopsies. *Pathol Res Pract*, doi:S0344-0338(14)00225-8 [pii] 10.1016/j.prp.2014.07.012 (2014).
- 66 Erkan, M. *et al.* Organ-, inflammation- and cancer specific transcriptional fingerprints of pancreatic and hepatic stellate cells. *Mol Cancer* **9**, 88, doi:10.1186/1476-4598-9-88 1476-4598-9-88 [pii] (2010).

- 67 Zhao, Y. *et al.* A potential role of collagens expression in distinguishing between premalignant and malignant lesions in stomach. *Anat Rec (Hoboken)* **292**, 692-700, doi:10.1002/ar.20874 (2009).
- 68 Bowen, K. B. *et al.* Immunohistochemical localization of collagen type XI alpha1 and alpha2 chains in human colon tissue. *J Histochem Cytochem* **56**, 275-283, doi:jhc.7A7310.2007 [pii] 10.1369/jhc.7A7310.2007 (2008).
- 69 Fischer, H., Stenling, R., Rubio, C. & Lindblom, A. Colorectal carcinogenesis is associated with stromal expression of COL11A1 and COL5A2. *Carcinogenesis* **22**, 875-878 (2001).
- 70 Anastassiou, D. *et al.* Human cancer cells express Slug-based epithelial-mesenchymal transition gene expression signature obtained in vivo. *BMC Cancer* **11**, 529, doi:10.1186/1471-2407-11-529 (2011).
- 71 Galvan, J. A. *et al.* Validation of COL11A1/procollagen 11A1 expression in TGF-beta1-activated immortalised human mesenchymal cells and in stromal cells of human colon adenocarcinoma. *BMC Cancer* **14**, 867, doi:10.1186/1471-2407-14-867 (2014).
- 72 Halsted, K. C. *et al.* Collagen alpha1(XI) in normal and malignant breast tissue. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **21**, 1246-1254, doi:10.1038/modpathol.2008.129 (2008).
- 73 Sok, J. C. *et al.* Collagen type XI alpha1 facilitates head and neck squamous cell cancer growth and invasion. *British journal of cancer* **109**, 3049-3056, doi:10.1038/bjc.2013.624 (2013).
- 74 Baker, T. S. *et al.* Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophysical journal* **60**, 1445-1456, doi:10.1016/S0006-3495(91)82181-6 (1991).
- 75 Burk, R. D. Pernicious papillomavirus infection. *N Engl J Med* **341**, 1687-1688, doi:10.1056/NEJM199911253412209 (1999).
- 76 Zur Hausen, H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* **92**, 690-698 (2000).

- 77 Sanjosé Llongueras, S. & García García , A. M. *Virus del Papiloma Humano y Cáncer: epidemiología y prevención*.
- 78 Comparetto, C. & Borruto, F. Cervical cancer screening: A never-ending developing program. *World journal of clinical cases* **3**, 614-624, doi:10.12998/wjcc.v3.i7.614 (2015).
- 79 Denny, L., Herrero, R., Levin, C. & Kim, J. J. in *Cancer: Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 3)* (eds H. Gelband, P. Jha, R. Sankaranarayanan, & S. Horton) (2015).
- 80 Egawa, N., Egawa, K., Griffin, H. & Doorbar, J. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses* **7**, 3863-3890, doi:10.3390/v7072802 (2015).
- 81 Akil, N. *et al.* Human breast cancer and sexual activities. *British journal of cancer* **98**, 508-509; author reply 510-511, doi:10.1038/sj.bjc.6604103 (2008).
- 82 Akil, N. *et al.* High-risk human papillomavirus infections in breast cancer in Syrian women and their association with Id-1 expression: a tissue microarray study. *British journal of cancer* **99**, 404-407, doi:10.1038/sj.bjc.6604503 (2008).
- 83 Damin, A. P., Karam, R., Zettler, C. G., Caleffi, M. & Alexandre, C. O. Evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinomas. *Breast cancer research and treatment* **84**, 131-137, doi:10.1023/B:BREA.0000018411.89667.0d (2004).
- 84 de Villiers, E. M., Sandstrom, R. E., zur Hausen, H. & Buck, C. E. Presence of papillomavirus sequences in condylomatous lesions of the mamillae and in invasive carcinoma of the breast. *Breast cancer research : BCR* **7**, R1-11, doi:10.1186/bcr940 (2005).
- 85 Kroupis, C., Markou, A., Vourlidis, N., Dionyssiou-Asteriou, A. & Lianidou, E. S. Presence of high-risk human papillomavirus sequences in breast cancer tissues and association with histopathological characteristics. *Clinical biochemistry* **39**, 727-731, doi:10.1016/j.clinbiochem.2006.03.005 (2006).

- 86 Stenger, M. *Calculating H-Score*, <<http://www.ascopost.com/issues/april-10-2015/calculating-h-score/>> (2015).
- 87 Pareja, F. *et al.* Breast intraductal papillomas without atypia in radiologic-pathologic concordant core-needle biopsies: Rate of upgrade to carcinoma at excision. *Cancer* **122**, 2819-2827, doi:10.1002/cncr.30118 (2016).
- 88 Tatarian, T. *et al.* Intraductal Papilloma with Benign Pathology on Breast Core Biopsy: To Excise or Not? *Ann Surg Oncol* **23**, 2501-2507, doi:10.1245/s10434-016-5182-7 (2016).
- 89 Ibarra, J. A. Papillary lesions of the breast. *Breast J* **12**, 237-251, doi:TBJ248 [pii] 10.1111/j.1075-122X.2006.00248.x (2006).
- 90 Ahmadiyeh, N., Stoleru, M. A., Raza, S., Lester, S. C. & Golshan, M. Management of intraductal papillomas of the breast: an analysis of 129 cases and their outcome. *Ann Surg Oncol* **16**, 2264-2269, doi:10.1245/s10434-009-0534-1 (2009).
- 91 Al Sarakbi, W., Worku, D., Escobar, P. F. & Mokbel, K. Breast papillomas: current management with a focus on a new diagnostic and therapeutic modality. *International seminars in surgical oncology : ISSO* **3**, 1, doi:10.1186/1477-7800-3-1 (2006).
- 92 Bennett, L. E., Ghate, S. V., Bentley, R. & Baker, J. A. Is surgical excision of core biopsy proven benign papillomas of the breast necessary? *Acad Radiol* **17**, 553-557, doi:10.1016/j.acra.2010.01.001 S1076-6332(10)00002-4 [pii] (2010).
- 93 Bernik, S. F. *et al.* Papillary lesions of the breast diagnosed by core needle biopsy: 71 cases with surgical follow-up. *American journal of surgery* **197**, 473-478, doi:10.1016/j.amjsurg.2008.04.007 (2009).
- 94 Collins, L. C. & Schnitt, S. J. Papillary lesions of the breast: selected diagnostic and management issues. *Histopathology* **52**, 20-29, doi:HIS2898 [pii] 10.1111/j.1365-2559.2007.02898.x (2008).
- 95 Moumen, M. *et al.* The mammary myoepithelial cell. *Int J Dev Biol* **55**, 763-771, doi:113385mm [pii] 10.1387/ijdb.113385mm (2011).

- 96 Rosen. in *Rosen's breast pathology* (ed Rosen PP) 85-136 (Williams & Wilkins, 2009).
- 97 Tse, G. M. *et al.* CD44s is useful in the differentiation of benign and malignant papillary lesions of the breast. *Journal of clinical pathology* **58**, 1185-1188, doi:58/11/1185 [pii] 10.1136/jcp.2005.026906 (2005).
- 98 Saddik, M., Lai, R., Medeiros, L. J., McCourty, A. & Brynes, R. K. Differential expression of cyclin D1 in breast papillary carcinomas and benign papillomas: an immunohistochemical study. *Arch Pathol Lab Med* **123**, 152-156, doi:10.1043/0003-9985(1999)123<0152:DEOCDI>2.0.CO;2 (1999).
- 99 Yoshida, M. *et al.* Loss of heterozygosity on chromosome 16q suggests malignancy in core needle biopsy specimens of intraductal papillary breast lesions. *Virchows Arch* **460**, 497-504, doi:10.1007/s00428-012-1200-8 (2012).
- 100 Barkan, D., Green, J. E. & Chambers, A. F. Extracellular matrix: a gatekeeper in the transition from dormancy to metastatic growth. *European journal of cancer* **46**, 1181-1188, doi:10.1016/j.ejca.2010.02.027 (2010).
- 101 Hynes, R. O. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* **326**, 1216-1219, doi:10.1126/science.1176009 (2009).
- 102 Orimo, A. *et al.* Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* **121**, 335-348, doi:10.1016/j.cell.2005.02.034 (2005).
- 103 Quante, M. *et al.* Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer cell* **19**, 257-272, doi:10.1016/j.ccr.2011.01.020 (2011).
- 104 Raglow, Z. & Thomas, S. M. Tumor matrix protein collagen XIalpha1 in cancer. *Cancer letters* **357**, 448-453, doi:10.1016/j.canlet.2014.12.011 (2015).
- 105 Kim, H., Watkinson, J., Varadan, V. & Anastassiou, D. Multi-cancer computational analysis reveals invasion-associated variant of

- desmoplastic reaction involving INHBA, THBS2 and COL11A1. *BMC Med Genomics* **3**, 51, doi:10.1186/1755-8794-3-51 1755-8794-3-51 [pii] (2010).
- 106 Ellis, I. O., Lee, A. H., Elston, C. W. & Pinder, S. E. Microinvasive carcinoma of the breast: diagnostic criteria and clinical relevance. *Histopathology* **35**, 470-472 (1999).
- 107 Brennan, M. E. *et al.* Ductal carcinoma in situ at core-needle biopsy: meta-analysis of underestimation and predictors of invasive breast cancer. *Radiology* **260**, 119-128, doi:10.1148/radiol.11102368 (2011).
- 108 Yaziji, H., Gown, A. M. & Sneige, N. Detection of stromal invasion in breast cancer: the myoepithelial markers. *Advances in anatomic pathology* **7**, 100-109 (2000).
- 109 Yip, C. H. & Rhodes, A. Estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Future oncology* **10**, 2293-2301, doi:10.2217/fon.14.110 (2014).
- 110 Lee, M., Lee, C. S. & Tan, P. H. Hormone receptor expression in breast cancer: postanalytical issues. *Journal of clinical pathology* **66**, 478-484, doi:10.1136/jclinpath-2012-201148 (2013).
- 111 Honma, N. *et al.* Clinical importance of estrogen receptor-beta evaluation in breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **26**, 3727-3734, doi:10.1200/JCO.2007.14.2968 (2008).
- 112 Mann, S. *et al.* Estrogen receptor beta expression in invasive breast cancer. *Human pathology* **32**, 113-118, doi:10.1053/hupa.2001.21506 (2001).
- 113 Nakopoulou, L. *et al.* The favourable prognostic value of oestrogen receptor beta immunohistochemical expression in breast cancer. *Journal of clinical pathology* **57**, 523-528 (2004).
- 114 Tan, W. *et al.* Estrogen receptor beta as a prognostic factor in breast cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* **7**, 10373-10385, doi:10.18632/oncotarget.7219 (2016).
- 115 Furuya, C. *et al.* Combined evaluation of CK5/6, ER, p63, and MUC3 for distinguishing breast intraductal papilloma from ductal carcinoma in situ.

- Pathology international* **62**, 381-390, doi:10.1111/j.1440-1827.2012.02811.x (2012).
- 116 Tse, G. M. *et al.* Papillary lesions of the breast--accuracy of core biopsy. *Histopathology* **56**, 481-488, doi:10.1111/j.1365-2559.2010.03510.x (2010).
- 117 de Cremoux, P. *et al.* No evidence of human papillomavirus DNA sequences in invasive breast carcinoma. *Breast cancer research and treatment* **109**, 55-58, doi:10.1007/s10549-007-9626-4 (2008).
- 118 Gopalkrishna, V. *et al.* Absence of human papillomavirus DNA in breast cancer as revealed by polymerase chain reaction. *Breast cancer research and treatment* **39**, 197-202 (1996).
- 119 Lindel, K., Forster, A., Altermatt, H. J., Greiner, R. & Gruber, G. Breast cancer and human papillomavirus (HPV) infection: no evidence of a viral etiology in a group of Swiss women. *Breast* **16**, 172-177, doi:10.1016/j.breast.2006.09.001 (2007).
- 120 Silva, R. G., Jr. & da Silva, B. B. No evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinoma. *Breast cancer research and treatment* **125**, 261-264, doi:10.1007/s10549-010-1129-z (2011).
- 121 Mendizabal-Ruiz, A. P. *et al.* Low frequency of human papillomavirus DNA in breast cancer tissue. *Breast cancer research and treatment* **114**, 189-194, doi:10.1007/s10549-008-9989-1 (2009).
- 122 Sandstrom, R. E. Regarding: Koilocytes indicate a role for human papilloma virus in breast cancer. *British journal of cancer* **102**, 786-787; author reply 788, doi:10.1038/sj.bjc.6605549 (2010).
- 123 Widschwendter, A., Brunhuber, T., Wiedemair, A., Mueller-Holzner, E. & Marth, C. Detection of human papillomavirus DNA in breast cancer of patients with cervical cancer history. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **31**, 292-297, doi:10.1016/j.jcv.2004.06.009 (2004).
- 124 Simoes, P. W. *et al.* Prevalence of human papillomavirus in breast cancer: a systematic review. *International journal of gynecological cancer*

- : *official journal of the International Gynecological Cancer Society* **22**, 343-347, doi:10.1097/IGC.0b013e31823c712e (2012).
- 125 Choi, Y. L. *et al.* Detection of human papillomavirus DNA by DNA chip in breast carcinomas of Korean women. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **28**, 327-332, doi:10.1159/000124238 (2007).
- 126 Khammapirad, T. *et al.* Intraductal papilloma of the breast in association with preoncogenic gene of breast cancer. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine* **1**, 161-163, doi:10.1016/S2221-1691(11)60017-8 (2011).
- 127 Kil, W. H., Cho, E. Y., Kim, J. H., Nam, S. J. & Yang, J. H. Is surgical excision necessary in benign papillary lesions initially diagnosed at core biopsy? *Breast* **17**, 258-262, doi:S0960-9776(07)00224-X [pii] 10.1016/j.breast.2007.10.008 (2008).
- 128 Lu, Q., Tan, E. Y., Ho, B., Chen, J. J. & Chan, P. M. Surgical excision of intraductal breast papilloma diagnosed on core biopsy. *ANZ J Surg* **82**, 168-172, doi:10.1111/j.1445-2197.2011.05969.x (2012).
- 129 Putti, T. C., Pinder, S. E., Elston, C. W., Lee, A. H. & Ellis, I. O. Breast pathology practice: most common problems in a consultation service. *Histopathology* **47**, 445-457, doi:HIS2246 [pii] 10.1111/j.1365-2559.2005.02246.x (2005).
- 130 Irfan, K. & Brem, R. F. Surgical and mammographic follow-up of papillary lesions and atypical lobular hyperplasia diagnosed with stereotactic vacuum-assisted biopsy. *Breast J* **8**, 230-233, doi:tbj08408 [pii] (2002).
- 131 Jacobs, T. W., Connolly, J. L. & Schnitt, S. J. Nonmalignant lesions in breast core needle biopsies: to excise or not to excise? *Am J Surg Pathol* **26**, 1095-1110 (2002).
- 132 Carder, P. J., Garvican, J., Haigh, I. & Liston, J. C. Needle core biopsy can reliably distinguish between benign and malignant papillary lesions of the breast. *Histopathology* **46**, 320-327, doi:HIS2082 [pii] 10.1111/j.1365-2559.2005.02082.x (2005).
- 133 Li, X. *et al.* Microcalcification is an important factor in the management of breast intraductal papillomas diagnosed on core biopsy. *Am J Clin Pathol*

- 138**, 789-795, doi:10.1309/AJCPTDQCHIWH4OHM 138/6/789 [pii] (2012).
- 134 Barrett-Connor, E. *et al.* Effects of raloxifene on cardiovascular events and breast cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med* **355**, 125-137, doi:355/2/125 [pii] 10.1056/NEJMoa062462 (2006).
- 135 Vogel, V. G. *et al.* Effects of tamoxifen vs raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes: the NSABP Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 trial. *JAMA* **295**, 2727-2741, doi:295.23.joc60074 [pii] 10.1001/jama.295.23.joc60074 (2006).
- 136 Zhang, Y., Simonsen, K. & Kolesar, J. M. Exemestane for primary prevention of breast cancer in postmenopausal women. *Am J Health Syst Pharm* **69**, 1384-1388, doi:10.2146/ajhp110585 69/16/1384 [pii] (2012).

Determinación de biomarcadores pronósticos en papilomas intraductales mamarios

Anexo 1:

Expresión de COL11X1 y estrógenos y supervivencia libre de progresión

<i>Id Muestra</i>	<i>Exp COL11A1</i>	<i>Histoscore Estrógenos</i>	<i>Meses Recidiva (hasta 120)</i>	<i>Forma recidiva</i>
PV010	neg	10,0	120	Papilomas
PM5	neg	20,0	92	-
PM7	neg	20,0	90	-
PV042	neg	25,0	84	Papilomas
PV028	neg	30,0	108	-
PV020	neg	60,0	120	Otras
PV025	neg	75,0	114	-
PM4	neg	100,0	94	-
PV011	neg	125,0	120	-
PV036	neg	125,0	94	-
PV002	neg	130,0	120	-
PV017	neg	156,3	120	-
PV012	neg	160,0	120	-
PV024	neg	170,0	116	-
PV018	neg	187,5	120	-
PV038	neg	187,5	93	Papilomas
PV026	pos	10,0	114	Papilomas
PV034	pos	25,0	102	-
PV015	pos	35,0	120	papilomas
PV040	pos	62,5	91	-
PV014	pos	80,0	74	Carcinoma
PV027	pos	90,0	109	Otras
PM10	pos	120,0	48	carcinoma
PV033	pos	187,5	104	-
PV001	neg	212,5	120	-
PM2	neg	212,5	95	Papilomas
PV023	neg	225,0	120	-
PV006	neg	255,0	120	-
PV043	neg	255,0	84	-
PM9	neg	255,0	89	-
PV037	neg	270,0	93	-
PM3	neg	270,0	94	-
PV008	neg	285,0	120	-
PV022	neg	285,0	120	-
PV004	neg	300,0	4	Carcinoma
PV005	neg	300,0	120	-
PC005	neg	300,0	115	-
PC006	neg	300,0	112	-

Continúa...

**Determinación de biomarcadores pronósticos
en papilomas intraductales mamarios**

<i>Id Muestra</i>	<i>Exp COL11A1</i>	<i>Histoscore Estrógenos</i>	<i>Meses Recidiva (hasta 120)</i>	<i>Forma recidiva</i>
PV016	pos	200,0	1	Otras
PV031	pos	200,0	107	-
PV035	pos	210,0	44	Carcinoma
PM1	pos	225,0	96	-
PV041	pos	237,5	85	-
PV030	pos	240,0	107	-
PV032	pos	255,0	27	Carcinoma
PC001	pos	255,0	120	-
PV019	pos	270,0	22	Carcinoma
PV039	pos	270,0	91	-
PC002	pos	270,0	6	carcinoma
PV021	pos	285,0	30	Carcinoma
PC004	pos	300,0	116	-
PV013	pos	200,0	6	Carcinoma

