

**EFFECTO DE LA TERAPIA HORMONAL EN MUJERES PREMENOPAUSICAS CON CANCER
DE SENO LOCALMENTE AVANZADO SOBRE LOS RECEPTORES HORMONALES, c-erbB-2,
Ki 67 y p53**

PRESENTADO POR:

SANDRA ESPERANZA DIAZ CASAS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN CIRUGÍA DE MAMA Y TUMORES DE
TEJIDOS BLANDOS**

DIRECTORES:

DR. RAMIRO SANCHEZ
Cirujano Grupo de Seno

DR. OSWALDO SANCHEZ
Oncólogo Grupo de Seno

DR GERMAN BARBOSA
Patologo I.N.C.

DRA CLEMENCIA DE CASTRO
Biologa I.N.C.

DRA TULIA DE MURCIA
Biologa I.N.C.

CODIRECTOR:
DR RAUL MURILLO
EPIDEMIOLOGO I.N.C.

Santa Fe de Bogotá, Noviembre 28 del 2000

TABLA DE CONTENIDO

1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
2 MARCO TEORICO	2
3 OBJETIVOS	9
4 VARIABLES:	10
5 HIPOTESIS:	13
6 DISEÑO METODOLOGICO	14
7 PLAN DE TABULACION Y ANALISIS	18
8 ANALISIS DE IMPLICACIONES ETICAS	19
9 ANALISIS DE FACTIBILIDAD	20
10 CRONOGRAMA	21
11 GLOSARIO	22
12 .ANEXOS	23
13 REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFIA	33

1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer de seno es una de las principales causas de morbimortalidad de las mujeres en Colombia; anualmente se atienden en el Instituto Nacional de Cancerología 600 casos nuevos de este tipo de tumor, siendo hasta la última estadística la tercera causa de muerte en las mujeres vistas en el Instituto, precedido por el cáncer gástrico y el cáncer de cervix (1).

En el Instituto el 80% de las mujeres que llegan por primera vez se encuentran en estados avanzados III y IV, y este grupo de tumores tiene un comportamiento clínico más agresivo, asociándose a menor sobrevida libre de enfermedad y menor sobrevida global.

Gracias a los avances de la biología molecular es posible detectar ciertas proteínas, alteradas tanto en su estructura como en su funcionamiento; producto de la expresión de oncogénes, genes supresores de tumor, antígenos y proteínas implicadas en la apoptosis, que permiten conocer más a fondo el comportamiento biológico, potencial de invasión, proliferación y respuesta a diversas terapias (quimioterapia y/o hormonoterapia) de la célula tumoral. (2).

En la literatura mundial existen trabajos de investigación donde se estudia la efectividad de los marcadores tumorales como receptores de estrógenos y progesterona, c-erbB-2, p53, Ki 67, Bcl2, Bax, catepsina D, fracción de fase S, etc, como indicadores pronóstico de sobrevida global y sobrevida libre de enfermedad (3,4,5).

Entre estos marcadores existen algunos cuya presencia se ha asociado con resistencia o sensibilidad a agentes quimioterápicos y hormonas. Se conoce también que algunos de estos marcadores cambian en su porcentaje de expresión después de los tratamientos neoadyuvantes (6,7,8,9,10,11,12,13,14).

Hacia un futuro se espera que la biología molecular ayude a revolucionar la terapia sistémica en pacientes con cáncer de seno, para enfocar de manera individual cada tratamiento ya sea quimioterapia u hormonoterapia.

Este trabajo de investigación es una extensión del protocolo titulado " ESTUDIO UNICENTRICO-ABIERTO PARA EVALUAR EL EFECTO DE LA TERAPIA HORMONAL NEOADYUVANTE EN MUJERES PREMENOPAUSICAS CON CANCER DE SENO"; que se está realizando en el Instituto Nacional de Cancerología en conjunto con el laboratorio ASTRAZENECA. El presente protocolo busca determinar cual es la respuesta biológica a la hormonoterapia por medio de los marcadores tumorales: c-erbB-2, p53, Ki 67, receptores de estrógeno y progesterona analizados por método de inmunohistoquímica, o si existe alguna modificación de los mismos con la terapia propuesta

Es el único trabajo en el mundo con cáncer de seno avanzado en mujeres premenopáusicas con tratamiento hormonal completo, por lo tanto los resultados son novedosos; además de ser un estudio con registros bien controlados que permitirán acudir a esta información cuando se quiera ampliar el análisis.

El estudio se realizará en las 30 pacientes del protocolo "madre" y al igual que en este, se contará con el apoyo multidisciplinario de varias áreas del instituto (biología molecular, patología, oncología, seno).

2 MARCO TEORICO

El tratamiento del cáncer de seno ha sufrido cambios sustanciales en las últimas tres décadas. El patrón de diseminación metastásica propuesto por Halsted fue sustituido por los principios alternativos de Fisher, los cuales consideran el cáncer de mama operable una enfermedad sistémica, debido a la presencia de micrometástasis en un gran número de casos al momento del diagnóstico (4).

Los avances en relación al mecanismo de la enfermedad como en determinados métodos diagnósticos y terapéuticos, son enormes con aumento sustancial en el número de diagnósticos tempranos así como en el control locoregional de la enfermedad (3,20). El conocimiento que se ha adquirido de la enfermedad ha permitido enfocar mejor el manejo de esta patología.

Actualmente el principal objetivo de las terapias neoadyuvantes es el tratamiento de las micrometástasis, mejorar el grado de operabilidad y medir quimiosensibilidad in vivo; sin embargo no todas las pacientes se beneficiarán con esta modalidad de tratamiento; por lo tanto, la selección de grupos de mayor riesgo para recidiva es fundamental para la decisión terapéutica; por lo que se hace necesario identificar variables pronósticas que pueden ser usadas para:

- Clasificar las pacientes en grupos de alto y bajo riesgo tanto para sobrevida libre de enfermedad como para sobrevida global.
- Predecir la respuesta a la quimioterapia
- Predecir la respuesta a la hormonoterapia (4,5)

Existen marcadores pronósticos bien establecidos desde el punto de vista clínico e histopatológico como son: la edad, estadiaje, compromiso ganglionar, tamaño tumoral, grado histológico, y marcadores en fase de investigación, como son: marcadores de proliferación, genes supresores tumorales, marcadores de invasión, de angiogénesis, de respuesta al tratamiento hormonal y a la quimioterapia (3,4,5,15).

2.1.MARCADORES ESTABLECIDOS:

2.1.1. FACTORES CLINICOS:

2.1.1.1. Edad: las pacientes menores de 35 años, tienen un pobre pronóstico en relación a mujeres mayores. Tumores en mujeres jóvenes son mal diferenciados, con mayor compromiso ganglionar, necrosis, mayor invasión linfática y vascular; lo que los hace ser más agresivos localmente y a distancia (3,4).

2.1.1.2. Estadificación: es basada en la clasificación del American Joint Committee on Cancer (AJCC). La AJCC se basa en el TNM, en el cual el T se refiere al tumor, el N a los ganglios y el M a las metástasis (4). Es así como la sobrevida se relaciona directamente con el estado inicial del cáncer. Tabla 1.

ESTADO	SOBREVIDA A 5 AÑOS
I	95%
II – A	80%
II – B	63%
III – A	50%
III – B	45%
IV	15%

Tabla 1 (4).

2.1.2. FACTORES HISTOPATOLOGICOS:

2.1.2.1. Compromiso de los ganglios axilares: el número de ganglios axilares (4,15,16). comprometidos es el factor pronóstico más importante en los casos de carcinoma invasivo. La sobrevida, recurrencia y falla en el tratamiento se correlacionan con el número de ganglios positivos Tabla 2.

NUMERO DE GANGLIOS POSTIVOS	PORCENTAJE DE SOBREVIDA A 5 AÑOS
Ninguno	82,8%
Uno positivo	80,1%
Dos positivos	70,0%
Tres positivos	64,6%
Cuatro positivos	54,1%
Más de trece positivos	28,4%

Tabla 2 (3).

En ausencia de terapia sistémica adyuvante, la recurrencia a 10 años para pacientes sin compromiso ganglionar en el espécimen quirúrgico es del 24% y 76% para pacientes con ganglios positivos. La extensión extracapsular se ve solamente en las macrometástasis e influye como factor de mal pronóstico en pacientes con más de tres ganglios comprometidos (15,16).

2.1.2.1. Tamaño Tumoral: en pacientes con axila positiva el tamaño tumoral es el segundo factor pronóstico más importante, mientras en pacientes con axila negativa es el más importante. Existe correlación directa entre el tamaño tumoral y la probabilidad de compromiso ganglionar, tal es así que en los carcinomas invasivos menores de 0,5 cm el compromiso ganglionar es de alrededor del 10%, mientras que tumores mayores de 5 cm llegan a tener ganglios axilares comprometidos hasta en un 55% y los mayores de 10 cm hasta en un 80% (4,16). En pacientes con axila negativa la sobrevida se relaciona con el tamaño tumoral, es así como pacientes con tumores menores de 1 cm tienen una sobrevida a 5 años mayor del 96% (3,15) Tabla 3.

TAMAÑO DEL TUMOR (CM)	PORCENTAJE SOBREVIDA A 10 AÑOS
< 2 cm	82 %
2 – 5 cm	65 %
> 5cm	44%

Tabla 3 (3).

2.1.2.3. Grado Histológico: es un importante factor pronóstico que no es utilizado como parámetro de estadificación (16).

En 1950, Bloom, revisó la literatura y propuso el método que engloba los siguientes tres factores:

- Grado de formación de túbulos.
- Pleomorfismo nuclear
- Actividad mitótica

En el año 1957, Bloom y Richardson modificaron el método dándole a cada uno de los tres items anteriores un puntaje de acuerdo a lo siguiente:

- Tùbulos : 1 ----- > 75% del tumor tiene tùbulos.
2 ----- 10 – 75 % del tumor tiene tùbulos
3 ----- < 10 % del tumor con tùbulos

- Mitosis : para un objetivo de 40 X con un diàmetro de 0,44mm. Se evalúa el número de mitosis por 10 campos.
1 ---- 0 – 5
2 ---- 5 - 10
3 ----- > de 11

- Pleomorfismo nuclear :

1 ---- Núcleo pequeño y uniforme
2 ---- Moderada variabilidad en el tamaño y forma del núcleo
3 ---- Marcado aumento del tamaño e irregularidad del núcleo

Así, un tumor con puntaje de 3 o 5 corresponde a un grado histológico I, un tumor con puntaje 6 o 7 corresponde a un grado histológico II y un score de 8 o 9 a un grado histológico III.

En resumen el grado histológico se clasifica así:

- Grado I ----- Tumor bien diferenciado
- Grado II----- Tumor moderadamente diferenciado
- Grado III ----- Tumor mal diferenciado

El estudio NSABP(21) mostró que pacientes con tumores bien diferenciados tienen tasas de supervivencia del 93% a 5 años , comparados con 79% en pacientes con tumores indiferenciados.

2.1.2.4 Tipo Histológico : el tumor más frecuente dentro de los carcinomas de seno es el ductal infiltrante (80%). Ciertos tipos de tumores de menor incidencia tales como el lobulillar (10%), y otros menos frecuentes como el tubular, mucinoso, medular, papilar (6-10%) los cuales se asocian con menor compromiso axilar y son de relativo buen pronóstico. Tal es así, que la supervivencia a 10 años para mujeres con carcinoma medular es de aproximadamente el 65% comparado con el 46% para el carcinoma ductal infiltrante (16).

2.1.2.5. Angiogénesis: es normalmente observada durante la reproducción, desarrollo y curación de las heridas. Involucra remodelación de la matriz extracelular, migración y proliferación de las células endoteliales, formación de capilares y anastomosis. La angiogénesis también es necesaria para el crecimiento tumoral; cualquier diseminación del tumor resulta de interacción entre las células tumorales y el nuevo desarrollo de canales vasculares que proveen una ruta para la diseminación de dichas células a la circulación. Numerosos factores muestran in vitro e in vivo la capacidad de angiogénesis de un tumor, tales como el factor de crecimiento vascular endotelial, el factor de crecimiento endotelial derivado de las plaquetas, el factor de crecimiento epidérmico, el factor de necrosis tumoral, prostaglandinas, etc. El incremento de los vasos intratumorales se asocia a crecimiento y metástasis en los cánceres humanos. (15,16)

2.1.2.6. Invasión linfática: se localiza entre los espacios linfáticos e interlobulares del estroma. Predice mayor recurrencia en pacientes con carcinoma de seno, especialmente en los tumores mayores de 1 cm de diámetro (16).

2.2. MARCADORES PRONOSTICOS BAJO INVESTIGACION:

Son nuevos marcadores biológicos moleculares que para ser ideales deben tener las siguientes características (15):

- Expresar un fenómeno biológico relacionado al crecimiento, invasión y metástasis tumoral..
- Su medición debe ser técnicamente fácil, reproducible y sensible
- En análisis univariado debe tener alto valor predictivo significativo de la pregunta en cuestión.
- En análisis multivariado debe ser independiente de otros indicadores clinicopatológicos.
- Debe identificar un subgrupo distinto de pacientes con cáncer de seno que puedan presentar recurrencia o morir como consecuencia de la enfermedad o al contrario ser un factor de buen pronóstico.
- Debe proveer estudios prospectivos que se puedan aplicar a grupos seleccionados de pacientes y comparar nuevas terapias con los métodos convencionales existentes.
- Estos hallazgos deben ser reproducidos en múltiples estudios realizados por diferentes centros médicos y en distintos pacientes.

Entre estos nuevos marcadores pronósticos tenemos:

2.2.1. Marcadores de Proliferación:

2.2.1.1. Ki 67: es un anticuerpo monoclonal desarrollado por Gerdes y colegas en Alemania en 1983, que es específico para un antígeno nuclear expresado sólo en las fases proliferativas del ciclo celular (G1, S, M y G2). Se mide por métodos de inmunohistoquímica. Está presente en las células normales del timo y algunas de la médula ósea y el tracto gastrointestinal. En mujeres con cáncer de seno se relaciona directamente con el tamaño tumoral, compromiso ganglionar, grado histológico, e invasión vascular; y se relaciona en forma inversa con los receptores hormonales (4,22,23). Además, niveles elevados de Ki 67 en estas mismas pacientes se asocia con un mayor índice de recurrencia y disminución de la sobrevida libre de enfermedad (24,25,26,27,28). Existen estudios donde los niveles de Ki 67 disminuyen después de tratamiento hormonal en mujeres con receptores hormonales negativos (17,29).

2.2.1.2. Índice de Timidina marcada: es otra forma de medir el grado de proliferación de las células tumorales a través de un isótopo radioactivo. Indica el porcentaje de células dentro del tumor que están sintetizando DNA. Se relaciona con tumores que son más agresivos, con mayor capacidad metastásica regional y a distancia.(5). No se ha adoptado en la práctica clínica ya que es un método dispendioso.

2.2.1.3. Fracción de fase S y ploidia : se refiere a la fracción de células tumorales que sintetizan DNA. Puede ser estimada por varios métodos como citometría de flujo y por determinación de antígenos nucleares, asociados a la proliferación a través de técnicas de inmunohistoquímica. La fase S elevada se observa en tumores de mayor tamaño, mal diferenciados, con receptores hormonales negativos y en pacientes jóvenes. Además de asociarse con menor sobrevida libre de enfermedad y menor sobrevida global (4,15,16,25,30).

2.2.2. Oncogénes:

2.2.2.1. c-erbB-2: los protooncogenes de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico o genes erbB constituyen un blanco habitual de alteraciones durante la carcinogénesis, constatándose con frecuencia amplificaciones, rearreglos, mutaciones

puntuales y deleciones. El oncogén codifica una forma alterada y truncada de un receptor de membrana de factores de crecimiento con actividad intrínseca de tirosina kinasa, que puede llevar a cabo autofosforilaciones que encienden señales intracelulares de proliferación. De esta forma, el receptor codificado por el oncogén permanece activado transmitiendo señales proliferativas erróneas al núcleo celular, aún en ausencia del factor de crecimiento del microambiente tisular. Este gen se amplifica en el 20 -40% de los carcinomas de mama invasivos y su sobreexpresión se acompaña de mal pronóstico, con menor supervivencia global y menor supervivencia libre de enfermedad, aún en pacientes con ganglios negativos (2,18,26,27,31,34).

La amplificación o sobreexpresión del c-erbB-2 tiene importantes implicaciones clínicas, como factor predictor de resistencia a la terapia endócrina, resistencia a regímenes de quimioterapia adyuvante sin doxorubicina, sensibilidad a esquemas con antraciclinas, sensibilidad o resistencia a los taxanos y respuesta al anticuerpo monoclonal contra la proteína HER-2 (Trastuzumab) en el 20% de las mujeres con cáncer de seno metastásico (5,6,7,8,9,10,11).

2.2.2.2. Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico: el receptor es una tirosina-kinasa que se liga el factor de crecimiento. Muchos esteroides y hormonas peptídicas, aparecen involucradas en la diferenciación y proliferación de las células del seno normal. El factor de crecimiento epidérmico es una cadena polipeptídica que contiene 53 aminoácidos; también se conoce que actúa como mitógeno en los cultivos celulares de cáncer de seno humano. Pacientes con cáncer de seno y niveles elevados del factor de crecimiento epidérmico se asocian a receptores hormonales negativos al igual que con menor supervivencia global y menor intervalo libre de enfermedad. (4,5).

2.2.3. Genes supresores tumorales:

2.2.3.1. p53 : la proteína p53 es un gen supresor tumoral localizado en el brazo corto del cromosoma 17 el cual se comporta como un freno para la división de las células , aunque de una manera indirecta. La p53 bloquea la progresión del ciclo celular para permitir la reparación de los daños del genoma; si las alteraciones son irreparables la célula ingresa en el proceso de muerte celular programada. La p53 es denominada “el guardián del genoma”, puesto que evita la persistencia de células con alteraciones genéticas severas. Las células neoplásicas que perdieron la función normal de la p53 admiten daños importantes al genoma. (2).

Se encuentra en el 26% de las pacientes con cáncer de seno invasivo. Más del 90% de la p53 mutada puede ser determinada por métodos de inmunohistoquímica y su presencia se relaciona con alta tasa de proliferación, recurrencia temprana y disminución de la supervivencia en pacientes con cáncer de seno; además se asocia con alto grado nuclear, fase S larga, aneuploidia, pero es independiente del tamaño tumoral, estado ganglionar y el grado histológico. (16,31,33,34,35,36,37). También es considerado como un factor de riesgo para seleccionar pacientes con ganglios negativos que se benefician de quimioterapia adyuvante (7,12,13,14).

2.2.3.2. nm 23 : gen identificado por Stteg en las líneas celulares del melanoma murino metastásico. Se relaciona con el estado de los ganglios linfáticos, el grado histológico y la capacidad metastásica del tumor. Se requieren más estudios para conocer más la significancia biológica y pronóstica del nm 23 (5,15).

2.2.4. **Marcadores de Invasión:**

2.2.4.1. **Catepsina D:** Es una proteasa lisosomal producida por las células tumorales considerada como un marcador de invasión. En las células normales es secretada como un precursor de 52 kilodaltons que promueve el crecimiento y la actividad proteolítica extracelular. Es determinada por pruebas de inmunohistoquímica. La sobreexpresión de esta enzima se encuentra en un tercio de las pacientes con cáncer de seno y está asociada con comportamiento tumoral agresivo, mayor probabilidad de enfermedad metastásica y disminución de la supervivencia libre de enfermedad. En pacientes con ganglios negativos es un factor pronóstico independiente (4,16).

2.2.5.2. **Inhibidor del activador del plasminogeno y activador del uroplasminogeno:** Son enzimas proteolíticas, que pueden determinarse por pruebas de inmunohistoquímica y al igual que la catepsina D se asocian a tumores con mayor potencial de invasión y metástasis; por lo tanto a menor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global. El nivel de uroplásmínogeno es un factor independiente del tamaño tumoral, compromiso ganglionar y estado de los receptores hormonales (27).

2.2.6. **Marcadores de respuesta al tratamiento hormonal:** La determinación de los receptores de estrógeno y progesterona son una práctica actual en el manejo de las pacientes con cáncer de seno. Aproximadamente el 55 - 60% de las mujeres con cáncer de seno y receptores positivos, responden a la terapia hormonal ya sea ablativa y aditiva, comparada con el 8% de las mujeres con receptores negativos (3,4).

Se sabe también que mujeres con receptores de estrógeno y progesterona positivos tienen un 77% de respuesta al tratamiento hormonal, cuando los receptores de estrógeno son positivos y los de progesterona negativos la respuesta es del 27%, y viceversa la respuesta es del 45%. Pacientes con receptores hormonales positivos tienen mayor supervivencia libre de enfermedad en comparación a las pacientes con receptores negativos (3, 6,10,15,17,19,28). Los receptores hormonales de estrógeno y progesterona se pueden determinar en forma cualitativa y semicuantitativa en cortes de tejido tumoral y en forma cuantitativa en el citosol de las células. Entre los métodos utilizados se encuentran:

Método radioanalítico por fijación de proteínas.

Métodos inmunológicos que no usan isotópos radioactivos.

Ensayos por biología molecular (4,16)

Existen otros marcadores que evalúan la respuesta al tratamiento hormonal que son al PS1 y el PS2 que se encuentran en fase de investigación inicial (5).

2.2.8. **Marcadores de respuesta a la quimioterapia:** Está claramente establecida la función de los receptores de estrógeno y progesterona como predictores de la respuesta al tamoxifen (3,4). De manera similar se han estudiado marcadores moleculares para pronosticar la respuesta a la quimioterapia. Entre ellos:

2.2.8.1. **c-erbB-2:** Existen múltiples estudios en los que pacientes con sobreexpresión de esta proteína, no se benefician del tratamiento con CMF (ciclofosfamida, metotrexato y 5-fluoracilo), en cambio se observaba una respuesta a la quimioterapia en mujeres con HER 2 positivo y tratamientos a base de antraciclinas (5,8). Pacientes con sobreexpresión de la proteína y receptores hormonales positivos no se benefician del tratamiento con tamoxifen. Al igual que las pacientes con cáncer de seno metastásico y HER 2 positivo no responden al tratamiento con paclitaxel (5,6,7,8,9,10,11).

Los progresos en biología molecular están alcanzando aplicación terapéutica en diferentes frentes, un ejemplo es la dirección del tratamiento contra el receptor de tirosina-kinasa de la proteína HER-2. El trastuzumab (Herceptin) es un anticuerpo monoclonal humanizado que se fija a la proteína HER-2 con gran afinidad, y que da por resultados la detención del crecimiento de las células cancerosas que expresan esta proteína (5,6,20). Los resultados preliminares del estudio fase III donde se combina el trastuzumab con quimioterapia (Adriamicina – Ciclofosfamida o Paclitaxel) muestra un porcentaje de respuesta del 33,8%, con una duración de 6 meses y aumento notable de los efectos secundarios hasta en un 82% (38).

2.2.8.2. p53: La apoptosis es una forma de suicidio celular y es el mecanismo predominante por el cual los quimioterápicos matan a las células tumorales. Las antraciclinas inducen apoptosis por medio de la proteína p53 y los tumores con p53 positiva son más resistentes a la doxorubicina. Los taxanos son inhibidores microtubulares que inducen muerte celular de manera independiente a la proteína p53. Las pacientes cuyos tumores sobreexpresaban la proteína p53 (tenían mutado el gen p53), tuvieron una tasa de respuesta mejor al paclitaxel que las pacientes negativas a la proteína p53 (5,7,12,13,14).

2.2.8.3. Bcl-2: Es otra molécula importante para el control de la apoptosis. La expresión de esta proteína se acompaña de receptores positivos, baja tasa de proliferación celular y buen pronóstico. Existen estudios donde pacientes con Bcl-2 positiva tienen buena respuesta al tratamiento con quimioterapia y tamoxifen (5,6,37).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta a la hormonoterapia completa en pacientes premenopáusicas con cáncer de seno en estadios IIB, IIIA y IIIB, utilizando los marcadores biológicos Ki 67, c-erbB-2, p53 y receptores hormonales.

3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 3.2.1. Describir los parámetros histopatológicos del grupo de pacientes en biopsia y pieza quirúrgica : Grado histológico, compromiso ganglionar, invasión linfovascular y bordes de sección.
- 3.2.2. Medir los marcadores tumorales moleculares: Ki 67, p 53, c-erbB-2 y receptores hormonales del grupo de pacientes del estudio en biopsia y pieza quirúrgica.
- 3.2.3. Establecer la relación de los marcadores tumorales con la sobrevida libre de enfermedad y la sobrevida global de las pacientes.
- 3.2.4. Determinar que pacientes se pueden beneficiar del tratamiento hormonal neoadyuvante de acuerdo a los marcadores tumorales.
- 3.2.6. Relacionar la presencia de los marcadores tumorales con la respuesta clínica al tratamiento hormonal neoadyuvante.

4 VARIABLES:

VARIABLE	TIPO	DEFINICION	MEDICION
Edad	Razon	Desde los 18 años, hasta la premenopausia, definiendo este término como la presencia de ciclos menstruales regulares en el último año.	Años
Estado	Ordinal	Clasificación TNM	IIB, IIIA, IIIB
Tipo Histológico	Nominal	Sólo los carcinomas ductales invasivos.	Ductales
Grado Histológico	Ordinal	De acuerdo a la clasificación de Bloom Richardson..	Bien diferenciado, moderadamente diferenciado y mal diferenciado.
Receptores de estrógeno en biopsia	Razón	Porcentaje de células tumorales que tengan receptores en núcleo, en la biopsia, que sean mayores del 20%.	Porcentaje
Receptores de progesterona en biopsia	Razón	Porcentaje de células tumorales que tengan receptores en núcleo en la biopsia que sean mayores del 20%.	Porcentaje
c-erbB-2 en biopsia	Razón	Porcentaje de células tumorales con sobreexpresión del oncogén en la membrana celular y en el citoplasma en la biopsia, contándolos en forma independiente.	Porcentaje
Ki 67 en biopsia	Razón	Porcentaje de células con presencia del antígeno en el núcleo celular en la biopsia.	Porcentaje
P 53 en biopsia	Razón	Porcentaje de células tumorales con presencia del gen mutado en el núcleo celular en la biopsia.	Porcentaje
Respuesta clínica al terminar la terapia hormonal neoadyuvante	Ordinal	La respuesta clínica se mide en todos los pacientes con cáncer sometidos a tratamientos neoadyuvantes (quimioterapia, hormonoterapia, radioterapia), utilizando los siguientes términos. Respuesta completa: desaparición completa de la masa o masas tumorales al examen físico. Respuesta parcial: disminución de más del 50% del tamaño tumoral con relación al tamaño inicial del tumor. Respuesta mínima: disminución de más del 25% pero menos	Respuesta clínica completa Respuesta clínica parcial Respuesta clínica mínima Enfermedad estable Progresión de la enfermedad.

		<p>del 50% del tamaño tumoral.</p> <p>Enfermedad estable: el tamaño tumoral inicial no cambia o aumenta menos del 25%.</p> <p>Progresión de la enfermedad: Aumento del tamaño tumoral en más del 25% con relación al tamaño inicial, o aparición de nuevas lesiones no identificadas previamente.</p> <p>La respuesta clínica se medirá con un tumorímetro, midiendo el tumor en el eje vertical, horizontal y los 2 diagonales. Se suman los 4 resultados, se dividen en 4. Este resultado se multiplica por Pi y divide en 6; dando así el volumen tumoral Este cálculos se realizará la fecha proxima a la cirugía).</p>	
Respuesta patológica	Ordinal	<p>Se evalúa en la pieza quirúrgica por la presencia o no de tumor residual, de la siguiente manera:</p> <p>Respuesta completa: No hay tumor residual ni macro ni microscopico en la pieza quirúrgica.</p> <p>Respuesta parcial: Presencia de tumor residual en la pieza quirúrgica.</p>	<p>Respuesta patológica completa.</p> <p>Respuesta patológica parcial.</p>
Receptores de estrógeno en la pieza quirúrgica	Razón	Porcentaje de células tumorales que tengan receptores en núcleo en la pieza quirúrgica.	Porcentaje
Receptores de progesterona en la pieza quirúrgica	Razón	Porcentaje de células tumorales que tengan receptores en núcleo en la pieza quirúrgica.	Porcentaje
c-erbB-2 en la pieza quirúrgica	Razón	Porcentaje de células tumorales con sobreexpresión del oncogén en la membrana celular y en el citoplasma en la pieza quirúrgica, contándolos en forma independiente.	Porcentaje
Ki 67 en pieza quirúrgica	Razón	Porcentaje de células con presencia del antígeno en el núcleo celular en la pieza quirúrgica.	Porcentaje
p 53 en pieza quirúrgica	Razón	Porcentaje de células tumorales con presencia del gen mutado en el núcleo celular en la pieza quirúrgica.	Porcentaje
Invasión vascular	Ordinal	Presencia de células tumorales en los vasos sanguíneos.	Sí o No
Invasión linfática	Ordinal	Presencia de células tumorales en los vasos linfáticos.	Sí o No
Compromiso ganglionar	Razón	Número de ganglios	Número

		comprometidos por tumor en la pieza quirúrgica.	
Compromiso bordes de sección	Nominal	Si hay tumor en los bordes pintados con tinta china en la pieza quirúrgica.	Sí o No
Sobrevida libre de enfermedad	Razón	Tiempo en meses desde el tratamiento quirúrgico hasta la aparición de recaída o hasta el último control.	Meses
Sobrevida global	Razón	Tiempo en meses desde el diagnóstico de la enfermedad hasta la muerte o hasta el último control.	Meses

5 HIPOTESIS:

Ha:

La presencia de los marcadores tumorales biológicos c-erbB-2, p53 y ki 67 en las células tumorales se ha asociado a mala respuesta a la hormonoterapia en pacientes premenopáusicas con receptores hormonales positivos.

Ho:

La ausencia de los marcadores tumorales biológicos c-erbB-2, p53 y Ki 67 en las células tumorales no se ha asociado con la respuesta a la hormonoterapia en pacientes premenopáusicas con receptores hormonales positivos.

6 DISEÑO METODOLOGICO

6.1 Tipo de estudio:

Es un estudio exploratorio en donde se busca la relación entre la hormonoterapia y el comportamiento de los marcadores tumorales c-erbB-2, p 53, Ki 67 y receptores hormonales de estrógeno y progesterona.

6.2.Población y muestra:

El protocolo es una extensión del protocolo titulado " ESTUDIO UNICENTRICO- ABIERTO PARA EVALUAR EL EFECTO DE LA TERAPIA HORMONAL NEOADYUVANTE EN MUJERES PREMENOPAUSICAS CON CANCER DE SENO", donde se incluyen 30 pacientes que cumplan con los criterios de inclusión.

6.3. Criterios de Inclusión y Exclusión:

6.3.1. Criterios de inclusión

Los que aparecen en el protocolo titulado " Estudio Unicéntrico-Abierto para evaluar el efecto de la terapia hormonal neoadyuvante en pacientes premenopáusicas con cáncer de seno", que son:

- 6.3.1.1 Pacientes voluntarias, debidamente informadas, que acepten participar en el estudio y firmen el consentimiento informado.
- 6.3.1.2. Pacientes premenopáusicas, según la definición con cáncer de seno estadios IIB, IIIA, IIIB, e histología confirmada, con receptores hormonales de estrógeno y/o progesterona positivos mayor del 20%. Examen realizado por inmunohistoquímica.
- 6.3.1.3. Debe realizarse mamografía, ecografía de seno y evaluación clínica antes de la biopsia. La ecografía de seno y la mamografía no deben tener más de 20 días antes del día 0.
- 6.3.1.4. Deben realizarse los exámenes hormonales antes del tratamiento. Se considerarán pacientes aptas para el estudio, las que hayan tenido ciclos menstruales regulares durante el último año.
- 6.3.1.5. Pacientes con BACAF o trucut previo que no presenten equimosis severa.

6.3.2. Criterios de exclusión:

Los que aparecen en el protocolo titulado "Estudio Unicéntrico abierto para evaluar el efecto de la terapia hormonal neoadyuvante en mujeres premenopáusicas con cáncer de seno ", que son los siguientes:

- 6.3.2.1. Pacientes con inconvenientes de seguimiento y cumplimiento de citas, o que por diferentes razones puedan interferir con los resultados del estudio (retardo mental, alcoholismo, confusión o la no voluntad de firmar).
- 6.3.2.2. Antecedente de tratamientos previos con hormonoterapia para cáncer de seno.
- 6.3.2.3. Antecedente de enfermedades malignas sistémicas diferentes al cáncer seno, con excepción de carcinoma de piel tipo basocelular o escamocelular, o ca de cervix que estén debidamente controladas.
- 6.3.2.4. Enfermedades crónicas que tengan una expectativa de vida menor a 3 meses, tales como: Insuficiencia renal severa, falla cardiaca grado III, diabetes complicada, etc.

- 6.3.2.5. Pacientes con pruebas de función hepática alteradas (transaminasas o fosfatasa alcalina tres veces superior al rango establecido por el laboratorio.
- 6.3.2.6. Cualquier anomalía de los datos de laboratorio, que pueda poner en riesgo la vida de la paciente, o pueda alterar o confundir los resultados del estudio.
- 6.3.2.7. Pacientes con historia clínica de enfermedades o situaciones adversas, de tipo personal o familiar, que puedan poner en riesgo la vida de la paciente (antecedente de tromboembolismo o factores predisponentes, valvulopatías, etc), o confundir los resultados finales.
- 6.3.2.8. Pacientes consideradas por el investigador de riesgo en la transmisión de cualquier infección a través de sangre u otros fluidos corporales, incluyendo los agentes del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), hepatitis o enfermedades de transmisión sexual.

6.4. PROCEDIMIENTO:

En el Instituto Nacional de Cancerología, se está llevando a cabo por parte del servicio de Clínica de Seno en conjunto con el laboratorio ASTRAZENECA, un protocolo de investigación titulado "ESTUDIO UNICENTRICO-ABIERTO PARA EVALUAR EL EFECTO DE LA TERAPIA HORMONAL NEOADYUAVANTE EN MUJERES PREMENOPAUSICAS CON CANCER DE SENO".

El presente trabajo de investigación es una extensión de dicho protocolo, en el cual a todas las pacientes que cumplan los criterios de inclusión del protocolo y además firmen el consentimiento informado se les realizará:

6.4.1 Toma de biopsia por Trucut con obtención de material adecuado en el servicio de seno por parte del instructor de cirugía de mama y tumores de tejidos blandos.

6.4.2. Procesamiento de la biopsia en el servicio de patología : Inmediatamente llegue la muestra se procesa todo el material por el residente y se dejará en formol bufferado por 24 horas para realizar la inclusión en parafina y los cortes correspondientes.

6.4.3. Selección del bloque de parafina de la biopsia, con los cortes de rutina para hematoxilina-eosina y los cortes necesarios para cada uno de los marcadores.

6.4.4. Inmunohistoquímica de las láminas: Se desparafinan las láminas y rehidratan por pasos de xiloles y alcoholes de 80 al 100%. Con el objeto de desenmascarar los antígenos los tejidos se llevan al autoclave (121 oC) en solución retrieval y se pasan por agua antes de iniciar el proceso. La peroxidasa endógena presente en los tejidos se bloquea con peróxido de hidrógeno al 3% por media hora, se lavan las láminas con agua desionizada y se procede a colocar el anticuerpo respectivo para cada marcador disuelto en buffer Tris HCL (0,05 M pH 7,6 y 15 nM de azida sodio) por una hora, así:

Para receptores de estrógeno es el clon 1D5 DAKO.

Receptores de progesterona clon 1A6 DAKO.

c-erbB-2 es el policlonal contra la parte intracelular del receptor DAKO.

P 53 es el clon D07 DAKO.

Ki 67 es el policlonal contra antígeno nuclear producido en ciclo celular DAKO.

Luego se lavan las láminas con PBS, se aplica el cromógeno 3,3 diaminobencidina por 4 minutos. Se lava repetidas veces con agua desionizada pasando las láminas por sulfato de cobre, hematoxilina, agua amoniacal y se deshidratan los tejidos por pasos sucesivos de xiloles y alcoholes de 80 a 100.

6.4.5. Evaluación de las láminas en el microscopio: Las láminas serán evaluadas en un microscopio de luz, conectado a un analizador de imágenes tipo Auto Cyte, el cual saca porcentajes e histograma de las células tumorales positivas presentes en cada lámina. Posteriormente se verificarán los resultados por visión directa del patólogo (DR BARBOSA).

Se consideran positivas para:

Receptores de estradiol y progesterona: Las células tumorales que presenten el núcleo de color café, por reacción con el clon 1D5 DAKO o 1A6 DAKO respectivamente. Tomando como requisito para ingresar al protocolo que su porcentaje de positividad sea mayor del 20%, en cualquiera de los dos.

C-erbB-2: Todas las células tumorales que sobreexpresen el oncogén, se tiñe su membrana celular o su citoplasma de color café, por reacción con el anticuerpo policlonal intracelular del receptor DAKO. Se medirá aparte el porcentaje de células de la lámina que presenten la membrana celular de color café y aparte el porcentaje del citoplasma teñido de café. Se informarán estos dos resultados en forma independiente.

P-53: Su presencia se muestra en las células tumorales que tengan el núcleo teñido de color café, por reacción con el clon D07 DAKO. Se medirá el porcentaje de células tumorales cuyo núcleo este teñido de café.

Ki 67: La presencia de este antígeno se considera cuando el núcleo de las células tumorales se tiñe de color café, por reacción con el anticuerpo policlonal contra la parte intracelular del receptor DAKO. Se evaluará el porcentaje de células de la lámina que tengan el núcleo teñido de este color.

6.4.6. Tratamiento hormonal establecido en el protocolo madre, que tiene una duración aproximada de 12 semanas.

6.4.7. Una vez la paciente complete los 3 meses del tratamiento hormonal, se llevará a cirugía.

6.4.8. Procesamiento de la pieza quirúrgica en el servicio de patología, para evaluar en el informe el grado de diferenciación, compromiso ganglionar y estado de los bordes de sección : Una vez se realice la exéresis de la pieza quirúrgica, esta se trasladará al servicio de patología, donde inmediatamente se identificará el tumor por parte del residente de patología con apoyo del instructor de cirugía de mama, para realizar el corte correspondiente del tumor por el diámetro mayor de la lesión, con cortes representativos a intervalos de 1 cm cuando hay presencia de tumor residual macroscópico. Cuando no se identifica lesión macroscópica, se mapeará toda el área de fibrosis donde estaba localizado el tumor antes de la neoadyuvancia; y su fijación en formol bufferado durante 24 horas. De todos los bloques donde haya lesión se tomarán los cortes, para realizar los cinco marcadores con muestra representativa de todo el tumor. El procesamiento del resto de la pieza quirúrgica se hará en la forma usual del servicio de patología.

6.4.9. Búsqueda de los bloques de parafina de la pieza quirúrgica que contengan tumor, para los cortes correspondientes.

6.4.10. Inmunohistoquímica a las láminas de la pieza quirúrgica con el método ya descrito.

6.4.11. Evaluación de las láminas en el microscopio con los parámetros ya establecidos.

6.4.12. Tratamiento adyuvante con quimioterapia y/o radioterapia, de acuerdo al protocolo del servicio.

6.4.13. Seguimiento por un período de 5 años, que se cuentan a partir de la fecha de la cirugía, ya que las mayorías de las recurrencias ocurren en los primeros 5 años luego de terminar el tratamiento primario. Este seguimiento se hará según lo establecido en el protocolo de manejo de cáncer de seno del Instituto Nacional de Cancerología, así: historia clínica y examen físico cada 3 a 6 meses por los primeros 3 años, cada 6 a 12 meses por los siguientes 2 años y luego anualmente. Toma de mamografía anual y en las mujeres con cirugía conservadora la primera mamografía se hace a los 6 meses luego de terminar la radioterapia y se continúa anualmente. Sólo se solicitan otros exámenes, tales como radiografía de tórax, gammagrafía ósea o ecografía hepática, si las pacientes presentan sintomatología relacionada con estos sistemas, que hagan sospechar enfermedad metastásica.

Al finalizar los 5 años de seguimiento la paciente sale del estudio.

6.4.14. Recolección y consignación de los datos en la hoja diseñada para tal fin. Anexo 1.

7 PLAN DE ANALISIS

El análisis de los resultados tendrá un componente descriptivo, cumpliendo con los objetivos 3.2.1 y 3.2.2, en el que se utilizarán frecuencias absolutas y relativas; y medidas de tendencia central de acuerdo con el tipo de variables.

El análisis de sobrevida global y sobrevida libre de enfermedad se hará por el método de Kaplan - Meier utilizando log -rank. Para comparar variables. Los resultados serán sometidos a un modelo de Regresión de Cox, calculando inicialmente los OR con IC del 95%.

Se utilizarán pruebas de asociación según el tipo de variable.

8 ANALISIS DE IMPLICACIONES ETICAS

Las consideraciones éticas son las mismas del protocolo base, que son:

8.1. Declaración de Helsinki : El estudio se llevará a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki (1964), revisada en Hong Kong (1989). Anexo 2.

8.2. Comité de ética : El protocolo base tiene la aprobación del comité de ética del Instituto Nacional de Cancerología.

8.3. Consentimiento informado: La paciente firma el consentimiento informado para estudio y análisis de la muestra, con criterios de confidencialidad de tales resultados. Anexo 3.

9 ANALISIS DE FACTIBILIDAD

Este proyecto es extensión de un protocolo en curso, el cual está financiado en su totalidad por el Laboratorio Astra Zéneca, donde la consecución de la muestra es factible, ya que en los estados IIb, IIIA, IIIB, se encuentran la mayoría de las mujeres que ingresan al Instituto con diagnóstico de Cáncer de seno.

En el Instituto Nacional de Cancerología se cuenta con un gran recurso humano que es el apoyo multidisciplinario de varias áreas, como son: patología, oncología, seno y biología; así como con los suministros necesarios para llevar a cabo el protocolo, tales como reactivos, alcoholes, xiloles, anticuerpos específicos, en el servicio de biología molecular.

10 CRONOGRAMA

ACTIVIDAD

MESES DE DURACION

TIPO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Elaboración del proyecto	X											
Revisión del proyecto por epidemiología	X	X										
Presentación del protocolo al comité científico			X									
Recolección de la muestra e inmunohistoquímica a las biopsias.	X	X	X	X	X	X						
Tratamiento hormonal neoadyuvante		X	X	X	X	X	X	X	X			
Inmunohistoquímica a la pieza quirúrgica							X	X	X	X		
Análisis de los datos											X	
Presentación del informe final												X

11 GLOSARIO

c-erbB-2: oncogén que codifica en forma alterada un receptor de membrana de factores de crecimiento con actividad de tirosina kinasa. Amplificado en algunos cánceres como seno y ovario.

Ki 67: antígeno nuclear presente en cualquier fase del ciclo celular que mide el nivel de proliferación de las células.

Oncogén: gen mutado implicado en la proliferación de células tumorales.

p 53: es un gen supresor tumoral localizado en el brazo corto del cromosoma 17 quien bloquea la progresión del ciclo celular para reparar los daños del genoma. Las células neoplásicas con la proteína p 53 mutada admiten daños importantes al genoma.

Protooncogén: gen normal implicado en proliferación y diferenciación celular

12 .ANEXOS

ANEXO 1.

MODELO DE HOJA PARA LA INCLUSION DE LOS DATOS CLINICOS

NOMBRE PACIENTE: _____

HISTORIA CLINICA: _____ FECHA INGRESO INC: dd__ m__ aa__

ESTADO TNM: _____ FECHA BIOPSIA : dd__ mm__ aa__

RESULTADO DE LA BIOPSIA (PROTOCOLO):

TIPO HISTOLOGICO: _____

GRADO DIFERENCIACION: _____

INMUNOHISTOQUIMICA:

RECEPTORES DE ESTROGENO: _____

RECEPTORES DE PROGESTERONA : _____

C-ERB-2: _____ Ki 67: _____ p53: _____

FECHA INICIACION HORMONOTERAPIA: dd__ mm__ aa__

FECHA TERMINACION HORMONOTERAPIA: dd__ mm__ aa__

RESPUESTA CLINICA:

RESPUESTA COMPLETA: _____ RESPUESTA PARCIAL: _____

RESPUESTA MINIMA: _____ ENFERMEDAD ESTABLE: _____

PROGRESION DE LA ENFERMEDAD: _____

RESPUESTA PATOLOGICA:

RESPUESTA COMPLETA: _____ RESPUESTA PARCIAL: _____

FECHA DE LA CIRUGIA: dd__ mm__ aa__

TIPO PROCEDIMIENTO QUIRURGICO: _____

RESULTADO DE PATOLOGIA (PROTOCOLO) :

TIPO HISTOLOGICO: _____

GRADO DIFERENCIACION: _____

COMPROMISO GANGLIONAR : SI : _____ NO: _____ TOTAL : _____

COMPROMISO DE LOS BORDES DE SECCION: SI: _____ NO: _____

INVASION VASCULAR : SI: _____ NO: _____

INVASION LINFATICA : SI: _____ NO : _____

INMUNOHISTOQUIMICA:

RECEPTORES ESTROGENO: _____

RECEPTORES DE PROGESTERONA _____

C-ERBb-2 : _____ Ki 67: _____ p53 : _____

FECHA ULTIMO CONTROL: dd__ mm__ aa__

FECHA DE RECAIDA : dd__ mm__ aa__ SITIO: _____

FECHA MUERTE: dd:-----mm:-----aa:-----

MUERTE RELACIONADA CON LA ENFERMEDAD: SI: _____ NO: _____

ANEXO 2.

DECLARATION OF HELSINKI

Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human patients.

Adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki, Finland, June 1964, and amended by the 29th World Medical Assembly, Tokyo, Japan, October 1975, and the 35th World Medical Assembly, Venice, Italy, October 1983 and the 41st World Medical Assembly Hong Kong, September 1989.

INTRODUCTION

It is the mission of the physician to safeguard the health of the people. His or her knowledge and conscience are dedicated to the fulfilment of this mission.

The declaration of Geneva of the World Medical Association binds the physician with the words: "The health of my patient will be my first consideration," and the International Code of Medical Ethics declares that "A physician shall act only in the patient's interest when the providing medical care which might have the effect of weakening the physical and mental condition of the patient".

The purpose of biomedical research involving human patients must be to improve diagnostic, therapeutic and prophylactic procedures and the understanding of the etiology and pathogenesis of disease.

In current medical practice most diagnostic, therapeutic or prophylactic procedures involve hazards. This applies especially to biomedical research.

Medical progress is based on research which ultimately rest in part on experimentation involving human patients.

In the field of biomedical research a fundamental distinction must be recognised between medical research in which the aim is essentially diagnostic or therapeutic for a patient, and medical research, the essential object of which is purely scientific and without direct diagnostic or therapeutic value to the person patiented to the research.

Special caution must be exercised in the conduct of research which may affect the environment, and the welfare of animals used for research must be respect .

Because it is essential that the results of laboratory experiments be applied to human beings to further scientific knowledge and the help suffering humanity the World Medical Association has prepared the following recommendations as a guide to every physician in biomedical research involving human patients. Thus should be kept under review in the future. It must be stressed that the standards as drafted are only a guide to physicians all over the world . Physicians are not relieved from criminal, civil and ethical responsibilities under the laws of their own countries.

BASIC PRINCIPLES

1. Biomedical research involving human patients must conform to generally accepted scientific principles and should be based on adequately performed laboratory and animal experimentation and on a thorough knowledge of the scientific literature.
2. The design and performance of the each experimental procedure involving human patients should be clearly formulated in an experimental protocol which should be transmitted for consideration, comment and guidance to a specially appointed committee independent of the investigator and the sponsor provided that this independent committee is in conformity with the laws and regulations of the country in which the research experiment is performed.
3. Biomedical research involving human patients should be conducted only by scientifically qualified persons and under the supervision of a clinical competent medical person. The responsibility for the human patients must always rest on a medically qualified person and never rest on the patient of the research, even though the patient has given his or her consent.
4. Biomedical research involving human patients cannot legitimately be carried out unless the importance of the objective is in proportion to the inherent risk to the patient.
5. Every biomedical research project involving human patients should be preceded by careful assessment of predictable risk in comparison with foreseeable benefits to the patient or to others. Concern for the interests of the patient must always prevail over the interest of science and society.
6. The right of the research patient to safeguard his or her integrity must always be respected. Every precaution should be taken to respect the privacy of the patient and minimize of the trial on the patient's physical and mental integrity and on personality of the patient.
7. Physicians should abstain from engaging in research projects involving human patients unless they are satisfied that the hazards involved are believed to be predictable. Physicians should cease any investigation if the hazards are found to outweigh the potential benefits.
8. In publications of the results of his or her research, the physician is obliged to preserve the accuracy of the results. Reports of experimentation not in accordance with the principles laid down in this declaration should not be accepted for publication.
9. In any research on human beings, each potential patient must be adequately informed of the aims, methods, anticipated benefits and potential hazards of the trial, and the discomfort it may entail. He or she must be informed that he or she has a liberty to abstain from participation in the trial and that he or she is free to withdraw his or her consent to participation at any time. The physician should then obtain the patient's freely-given informed consent preferably in writing.
10. When obtaining informed consent for the research project the physician should be particularly cautious if the patient is in a dependent relationship to him or her or may be under duress to give consent. In that case the informed consent should be obtained by a physician who is not engaged in the investigation and who is completely independent of this official relationship.
11. Whenever the minor child is in fact able to give a consent, the minor's consent must be obtained in addition to the consent of the minor's legal guardian.
12. The research protocol should always contain a statement of the ethical considerations involved and should indicate that the principles enunciated in the present declaration are complied with.

MEDICAL RESEARCH COMBINED WITH PROFESSIONAL CARE
(Clinical Research)

1. In the treatment of the sick person, the physician must be free to use a new diagnostic and therapeutic measure, if in his or her judgement it offers hope of saving life, re-establishing health or alleviating suffering.
2. The potential benefits, hazards and discomfort of a new method should be weighted against the advantages of the best current diagnostic and therapeutic methods.
3. In any medical trials, every patient – including those of the control group, any should be assured of the best proven diagnostic and therapeutic method.
4. The refusal of the patient to participate in a trial must never interfere with the physician – patient relationship.
5. If the physician considers it essential not to obtain informed consent, the specific reasons for this proposal should be stated in the experimental protocol for transmission to the independent committee.
6. The physician can combine medical research with professional care, the objective being the acquisition of new medical knowledge, only to extent that medical research is justified by its potential diagnostic or therapeutic value of the patient.

NON – THERAPEUTIC BIOMEDICAL RESEARCH INVOLVING HUMAN PATIENTS

(Non – clinical biomedical research)

1. In the purely scientific application of medical research carried out on a human being, it is the duty of the physician to remain the protector of the life and health of that person on whom biomedical research is being carried out.
2. The patients should be volunteers – either healthy persons or patients for whom the experimental design is not related to the patient's illness.
3. The investigator or the investigating team should discontinue the research if in his/her or their judgement it may, if continued, be harmful to the individual.
4. In research on man, the interest of science and society should never take precedence over considerations related to the wellbeing of the patient.

ANEXO 3.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

FECHA: ----- / ----- / ----- CIUDAD : ----- HC:-----
Día Mes Año

Sra o Srta : _____

1. INFORMACION GENERAL:

Queremos informarle sobre un nuevo estudio que se está realizando en pacientes voluntarias en el INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA para tratar la enfermedad que padece, y creemos que usted es una candidata para participar en está investigación.

El estudio se trata del uso de 3 medicamentos cuyo efecto principal es realiza un bloqueo hormonal estrógeno, los cuales han demostrado actividad sobre el cáncer de seno, logrando mejorar en algunos casos la sobrevida y el tiempo libre de enfermedad. Recientes estudios sugieren que este tratamiento puede ser efectivo en un grupo de pacientes en las cuales tradicionalmente se han administrado otro tipo de tratamientos como la quimioterapia. De hecho, la quimioterapia es el tratamiento tradicional y aceptado hoy para las pacientes de su edad y condición. Consideramos que el nuevo tratamiento podría representar una alternativa valida en su caso. Sí está de acuerdo en participar en el estudio deberá firmar una hoja de aceptación y recibirá una copia de este documento. Si no desea participar, recibirá el tratamiento convencional con quimioterapia desde el inicio. Usted puede abandonar el estudio libremente en cualquier momento sin menoscabo de la relación médico – paciente, ni de los tratamientos posteriores que necesite.

2. INFORMACION BASICA SOBRE EL ESTUDIO:

Usted debe cumplir con los criterios exigidos en la investigación, y una vez sea aprobada como candidata elegible, recibirá un código de indentificación personal para todos los efectos de su tratamiento posterior. Todos los medicamentos que se le administren en el estudio le serán proporcionados de manera gratuita, lo mismo que los exámenes de laboratorio o pruebas diagnósticas.

Medicamentos:

1. Acetato de Goserelina (Zoladex) 1 ampolla vía subcutánea de 3,6mg los dias 1, 28, 56 y 84.
2. Anastrozol (Arimidex) 1 tableta al día vía oral 1mg desde el día 21 del inicio del tratamiento sin interrupción hasta la cirugía o hasta el día 111.
3. Tamoxifeno (Nolvadex) 1 tableta al día vía oral de 20 mg desde al primer dia por 84 dias, y luego hasta la cirugía o hasta el día 111.

Usted debe asistir puntualmente a todas las visitas programadas y tomar cumplidamente los medicamentos; además se le explicará ampliamente sobre la administración de los mismos. Siempre deberá traer en cada visita los empaques vacios de los medicamentos que haya tomado, para poder suministrale el siguiente ciclo de tratamiento.

Dependiendo de la respuesta clínica que se vaya observando en el transcurso del tratamiento, usted irá a cirugía, quimioterapia o radioterapia, o a la combinación necesaria para ofrecerle la mejor opción para su enfermedad.

En cada visita se le explicará ampliamente los avances logrados y los pasos a seguir. Se resolverán además todas sus dudas. Por favor anótelas y no olvide preguntarlas.

En caso de no responder adecuadamente a la terapia propuesta, se le avisará oportunamente, y se le retirará del estudio, ofreciendo un tratamiento adecuado para su caso.

3. INFORMACION BASICA SOBRE LOS PRODUCTOS:

Zoladex, Arimidex y Nolvadex, son productos y marcas registradas de ASTRAZENECA. Nolvadex, ha sido utilizado por más de 20 años en pacientes con cáncer de seno, Arimidex y Zoladex han sido descubiertos más recientemente y han sido utilizados en los últimos años también en cáncer de seno. Los tres medicamentos han demostrado ampliamente su seguridad, eficacia y buena tolerabilidad.

Con estos medicamentos se busca bloquear la utilización de las hormonas estrógenicas por parte del tumor, produciendo una amenorrea transitoria (menopausia transitoria), e impidiendo la producción de estrógenos en otros sitios del organismo. El tumor normalmente necesita de estas hormonas para sobrevivir y los medicamentos que tomará bloquearán a estas hormonas.

4. INFORMACION SOBRE EFECTOS SECUNDARIOS:

Para poder ingresar al estudio usted ha sido evaluada clínica y paraclínicamente y no encontramos factores de riesgo que le impidan ser aceptada, sin embargo pueden presentarse efectos secundarios asociados a la aplicación y toma de los medicamentos, los cuales ya son conocidos o efectos adversos inesperados únicos en usted. Por tanto es importante que los síntomas que perciba como anormales sean informados a los médicos tratantes. Para el efecto dispondrá de diferentes números telefónicos, un sitio permanente de comunicación y un médico dispuesto a resolver sus dudas las 24 horas del día, todo el tiempo que dure su tratamiento.

Los síntomas más frecuentes son los asociados con la menopausia transitoria:

- Oleadas de calor y enrojecimiento de la cara.
- Suspensión de menstruación

Otros síntomas que pueden presentarse por los medicamentos mismos:

- Edema (hinchazón) de los miembros inferiores
- Dolor en las venas várices (si las tiene).
- Mareos
- Trombosis venosas
- Descargas menstruales no asociadas al ciclo menstrual

Otras alteraciones sólo serán detectadas en los exámenes de laboratorio, por eso será monitorizada de acuerdo a sus necesidades y al criterio médico.

- Alteraciones hepáticas
- Alteraciones de la coagulación
- Alteraciones en el cuadro hemático

5. BENEFICIOS QUE USTED RECIBE AL INGRESAR AL ESTUDIO

La hormonoterapia es un tratamiento efectivo en el cancer de seno y se considerará un pilar fundamental en su manejo. Con este trabajo se abre un nuevo campo de investigación tendiendo la posibilidad de presentar unos resultados clínicos similares con menos efectos colaterales que la quimioterapia convencional y por lo tanto con una mejor tolerabilidad al tratamiento.

Todos los medicamentos del estudio se le darán oportunamente y los exámenes se le practicarán de manera preferencial. Durante el estudio usted tendrá la asesoría necesaria para aclarar sus dudas y la mantendremos informada de los cambios y progreso en su enfermedad. Los efectos adversos que pueda sufrir y estén relacionados directamente con el uso de los medicamentos incluidos en el estudio, serán manejados de acuerdo con lo estipulado en la Declaración de Helsinki (convenio mundial para el trato responsable y ético a todos los pacientes que participen en un estudio clínico).

6. OBLIGACIONES QUE USTED ADQUIERE AL INGRESAR AL ESTUDIO:

- Asistir puntualmente a todas las consultas programadas.
- Tomar los medicamentos de la forma ordenada.
- No tomar otros medicamentos sin consultar a los médicos tratantes.
- Si abandona el tratamiento avisar de inmediato a su médico.
- Informar sobre cualquier cambio en su estado de salud.
- Llenar totalmente las formas escritas que se le suministren.
- Preguntar sobre las dudas acerca de su tratamiento
- Efectuarse en los sitios indicados los exámenes solicitados.
- No olvidar traer los empaques vacíos de los medicamentos en cada visita.

7. CAUSALES DE RETIRO DEL TRATAMIENTO:

- Decisión voluntaria
- Incumplimiento de los puntos acordados en el numeral 6.
- Efectos secundarios adversos severos o intolerables que pongan en peligro la vida de la paciente.
- Progresión de la enfermedad.

8. PACTO DE CONFIDENCIALIDAD:

El presente estudio, se realizará bajo estrictos criterios de investigación, siguiendo principios y parámetros de aceptación médica universal tanto en el campo científico, como de respeto para con el ser humano (Declaración de Helsinki). La compañía farmacéutica ASTRAZENECA, se encuentra comprometida éticamente con los investigadores y las pacientes que conforman este grupo de trabajo. Las conclusiones de estos estudios pueden cambiar los conceptos actuales de

manejo para el cancer de seno, y por lo tanto solicitamos la más absoluta reserva sobre este protocolo.

Usted acepta que los resultados del mismo serán publicados y discutidos en diversas partes del mundo, y es necesario sustentar dichos resultados con pruebas irrefutables, por lo que es indispensable que sus exámenes permanezcan como parte de su historia clínica y no sean retirados.

Los investigadores y patrocinadores se comprometen a mantener la privacidad de las pacientes y NO revelar sus nombres.

9. FIRMA DEL DOCUMENTO:

Yo _____ mayor de edad, identificada con la cc # _____ de _____, y en pleno uso de mis facultades mentales y legales, declaró que he leído en su totalidad el presente documento; que el

Dr.(a): _____ me ha explicado de manera amplia, suficiente y clara, relacionado con el estudio de investigación **PROTOCOLO 1033CO / 0001** titulado " **ESTUDIO UNICENTRICO – ABIERTO PARA EVALUAR EL EFECTO DE LA TERAPIA HOMONAL NEOADYUVANTE EN MUJERES PREMENOPAUSICAS CON CANCER DE SENO**" que se realizará en el INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA, en el cual deseo participar de manera libre, voluntaria y espontánea. Se me ha informado sobre los efectos secundarios y riesgos de esta terapia, los conozco y entiendo, y acepto participar al igual que me comprometo a cumplir con todos los requisitos del protocolo y a ofrecer mi total y absoluta colaboración.

Para constancia se firma en la ciudad de Santafé de Bogotá, el día _____ del mes _____ del año _____ .

FIRMA PACIENTE cc

FIRMA TESTIGO cc

FIRMA MEDICO TRATANTE cc

13 REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFIA

1. INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA. Informe Registro Institucional de Cáncer. 1999 Subdirección de Investigación. Santafé de Bogotá.
2. INTRODUCCIÓN A LA ONCOLOGIA MOLECULAR. Gómez D, Alonso D. Universidad Nacional de Quilmes, Primera edición 1998.
3. CANCER DE MAMA.. Hernández G, Bernardello E, Pinotti A. McGraw-Hill.. 1999.
4. CANCER OF THE BREAST. Donegan W. W.B. Saunders Company, 1997.
5. CLINICAS QUIRURGICAS DE NORTEAMERICA. Tratamiento del cáncer de mama. Mc Graw-Hill. 1999.
6. Hayes D, Yamauchi Hideko, Stearns Vered et.al. Should all breast cancers be tested for c-erbB-2 ? American Society of Clinical Oncology. ASCO 2000.
7. Wood WC. Integración of the risk factors to allow patient selection for adjuvant systemic therapy in lymph node negative breast cancer patients. World J. Surgery, 18 : 39-44 1994.
8. Paik S, Brian J, Park CH, Fisher B et.al. c- erbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node positive, hormone receptor-negative breast cancer. Journal of the National Cancer Institute. Vol 90, Septiembre 1998.
9. Ravaioli A, Bagli L, Zuchini A. Prognosis and prediction of response in breast cancer: The current role of the main biological markers. Cell Prolif. Jun- Agosto (3-4) : 113-126. 1998.
10. Soubeyran I. Quenel N, Mauriac L, et.al. Variation of hormonal receptor, pS2,c-erbB-2 and GST pi contents in breast carcinoma under tamoxifen: a study of 74 cases. British Journal Cancer 73 (6): 735-746, 1996.
11. Wilsher PC, Beaver J, Pinder S. Et.al. Prognostic significance of serum c-erbB-2 protein in breast cancer patients. Breast Cancer Research and Treatment. 40 (3): 251-255.1996.
12. Pieter C, Van de Velde C, Duvai C, Pallud C, p53 protein accumulation and response to adjuvant chemotherapy in premenopausal women with node negative early breast cancer. Journal of Clinical Oncology Vol 16, 2: 470-479, 1998.
13. Elledge R, Gray R, Mansour E. Et.al. Accumulation of the p53 protein as a possible predictor of response to adjuvant combination chemotherapy with cyclophosphamide, methotrexate, fluorouracil, and prednisone for breast cancer. Journal of the National Cancer Institute. Vol 87. 16. Ago 1995.
14. Thor AD, Berry DA, Budman D, Muss H. et. al. ErbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node positive breast cancer. Journal of the National Cancer Institute. Vol 90. 18 Sep 1998
15. Weidner N, Cady B. Prognostic factors in breast cancer. Surgical Oncology Clinics of North America.: Jul 415-462. 1997.
16. PATHOLOGY OF THE BREAST. Tavassoli F. Appleton & Lange. 1999.
17. Bajetta E, Celio L, Effect of short term preoperative tamoxifen on steroid receptor and Ki 67 expression in primary breast cancer : an immunocytochemical study. Ins Journal Oncology 12 (4): 853-858, Ap 1998.

18. Mc Grogan G, Mauriac L, Durand M. Primary chemotherapy in breast invasive carcinoma: predictive value of the immunohistochemical detection of hormonal receptors, p53, c-erbB-2, MiB1 and GSTpi. *British Journal Cancer*. Nov 74 (9) : 1458-1465. 1996.
19. Stierer M, Rosen H, Weber R, Hanak H, et.al. A prospective analysis of immunohistochemically determined hormone receptors and nuclear features as predictors of early recurrence in primary breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 36 : 11-21, 1995.
20. Tood D, Shuster MD, et .al. Multidisciplinary care for patients with breast cancer. *Surgical Clinics of North America*. Vol 80: 505-533 Ap 2000.
21. Fisher ER, Anderson S, Redmond L. Pathology findings from the NSABP Protocol B-06. 10 year pathologic and clinical prognostic discriminants. *Cancer* 8: 2507, 1993.
22. Clahsen PC, Van de Velde CJ, Duval C, et.al. The utility of mitotic index, estrogen receptor and Ki 67 measurements in the creation of novel prognostic indices for node negative breast cancer. *Eur Journal Surgical Oncology*, Ago 25 (4) : 356-363, 1999.
23. Pierga JY, LerayerA, Vielh P. Et.al. Long term prognostic value of growth fraction determination by Ki 67 immunostaining in primary operable breast cancer, *Breast Cancer Research and Treatment*, 37 (1): 57-64, 1996.
24. Brown RW, Allred CD, Clark GM, et.al. Prognostic value of Ki 67 compared S phase in axillary node negative breast cancer. *Clinical Cancer Research and treatment*, Mar 2 (3) : 585-592, 1996.
25. RailoM, Lundin J, Haglund C, et.al. Ki 67, p53, estrogen receptor, ploidy, S phase as prognostic factors in T1 node negative breast cancer. *Acta Oncology*, 36 (4) : 369-374, 1997.
26. Sirventt JJ, Santafé M, Salvado MT, et.al. Hormonal receptors, cell proliferation (Ki67) and c-erbB-2 amplification in breast cancer. Relationship between differentiation degree and axillary lymph node metastases. *Histology - Histopathology* 9 (3): 563-570, 1994.
27. Harbeck N, Dettmar P, Thomssen C, et.al. Risk-group discrimination in node negative breast cancer using invasion and proliferation markers: 6 year median follow-up. *British Journal of Cancer*, 80 (3/4): 419-426, 1999.
28. Honkoop AH, Van Diest PJ, Jong JS, et.al. Prognostic role of clinical, pathological and biological characteristics in patients with locally advanced breast cancer. *British Journal of Cancer*. 77 (4): 621-626. 1998.
29. Dardes RD, Horiguchi J, Jordan VC. A pilot study of the effects of short-term tamoxifen therapy on Ki67 labelling index in woman with primary breast cancer. *Int Journal Oncology*, Jan 16 (1) : 25-30, 2000.
30. Goodson WH, Moore DH, Ljung BM et.al. The functional relationship between in vivo bromodeoxyridine labelling index and Ki 67 proliferation index in human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 49 (2) : 155-164. 1998.
31. Frances P, Malley MB, Gordon D, et.al. The predictive power of semiquantitative immunohistochemical assesment of p53 and c-erbB-2 in lymph node negative breast cancer. *Human Pathology*. Vol 27. Sep 1996.

32. Michael F, Bernstein L, Patricia A, et al. HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: Poor prognosis in node negative breast carcinomas. *Journal of Clinical Oncology* Vol 15 (8): 2894-2904, 1997.
33. Linn SC, Honkoop AH, Hoekman K, et al. p53 and P-glycoprotein are often co-expressed and are associated with poor prognosis in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 74 (1) :63-68, 1996.
34. Tiniakos DG, Robinson KB, Greenwood H, et al. c-erbB-2 and p53 expression in breast cancer fine needle aspirates. *Cytopathology* 7 (3) : 178-186, 1996.
35. Craig D, Gary M, Elledge R, et al. Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node negative breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol 85, 1993.
36. Silvestrini R, Benini E, Daidone M, et al. p53 as an independent prognostic marker in lymph node negative breast cancer patients. *Journal of the National Cancer Institute*. Vol 85, 12, 1993.
37. Coppola D, Catalano E, Santo V. Et al. Significance of p53 and Bcl2 protein expression in human breast ductal carcinoma. *Cancer Control JMCC* 6 (2) 181-187, 1999.
38. Steven Shak. Overview of the Trastuzumab (Herceptin) Anti- HER2 monoclonal antibody clinical program in HER 2 overexpressing metastatic breast cancer. *Seminars in Oncology* Vol 26, N 4 Sup 12 Ag 71- 77, 1999.

Instituto Nacional de Cancerología



INC002716