

VNIVERSIDAD D SALAMANCA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

“ANALISIS DE LA SUPERVIVENCIA DE LAS MUJERES CON CANCER DE MAMA PRECOZ DIAGNOSTICADAS EN EL COMPLEJO HOSPITALARIO DE ORENSE. ¿LA DETERMINACION INMUNOHISTOQUIMICA DE KI-67, BCL-2 Y p53 EN EL TEJIDO TUMORAL APORTA INFORMACION PRONOSTICA EN ESTAS PACIENTES?”.

JESÚS GARCÍA GÓMEZ

DIRECTORES:

PROF. DR. D. JUAN JESÚS CRUZ HERNÁNDEZ
DR. D. JESÚS GARCÍA MATA

2012

PROF. DR. D. JUAN JESUS CRUZ HERNANDEZ. CATEDRATICO DE
MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.

DR. D. JESUS GARCIA MATA, DOCTOR EN MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA.

CERTIFICAN

Que el presente trabajo titulado “ Análisis de la supervivencia de las mujeres con cáncer de mama precoz diagnosticadas en el Complejo Hospitalario de Orense. ¿ La determinación inmunohistoquímica de Ki-67, bcl-2 y p53 en el tejido tumoral aporta información pronóstica en estas pacientes?”, realizado por D. Jesús García Gómez bajo su dirección en el departamento de Medicina, reúne, a su juicio , todos los requisitos exigidos para ser presentado ante el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, firman la presente en Salamanca a 7 de Junio de 2012.

D. JUAN JESUS CRUZ HERNANDEZ
CATEDRATICO DE MEDICINA

D. JESUS GARCIA MATA
DOCTOR EN MEDICINA

A Susana

A Leyre, Vega y Antía

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar en estas primeras líneas, mi agradecimiento al Profesor Juan Jesús Cruz Hernández, Catedrático de Medicina de la Universidad de Salamanca, y al doctor Jesús García Mata por haber dirigido este proyecto de tesis doctoral.

Al Profesor Juan Jesús Cruz Hernández, Catedrático de Medicina de la Universidad de Salamanca, le debo el haberme iniciado en el camino de la Oncología Médica. Quiero participarle mi más sincera admiración y agradecimiento.

Deseo plasmar en este trabajo un recuerdo y un agradecimiento para Alvaro y Matilde, sin su amistad, apoyo y ayuda, mi período de residente de Oncología Médica, hubiese resultado menos agradable y fructífero.

Quiero recordar y agradecer al doctor M. Rubén Rodríguez, al doctor Jesús García Mata, la doctora Eva Pérez, la doctora Elisa Cuevas y a los demás compañeros del Complejo Hospitalario Universitario de Orense su colaboración para la realización de este trabajo.

Agradezco a la doctora M^a Jesús García y a doña M^a Teresa Alves, su colaboración en el análisis estadístico de este trabajo.

No quiero dejar de recordar, a Carolina, a Jesús y a Carlos, mis padres y hermano. Gracias a su esfuerzo, comprensión y ayuda incondicional, pude cumplir el objetivo de estudiar Medicina.

A Leyre, Vega y Antía, mis hijas, les quiero agradecer su alegría y estímulo constante para obtener lo mejor de mí en lo personal y en lo profesional.

Para finalizar, quiero dedicar este trabajo a Susana, mi mujer, porque sin ella, ni el inicio ni la finalización de este proyecto hubiese sido posible.

INDICE

Listado de Abreviaturas	IV
Tablas	VI
Figuras	VII
1.- Introducción.	Pag. 1
2.- Epidemiología del cáncer de mama.	Pag. 4
3.- Histopatología	Pag. 10
3.1.- Carcinoma ductal infiltrante	Pag. 11
3.2.- Carcinoma lobulillar	Pag. 12
3.3.- Carcinoma tubular	Pag. 13
3.4.- Carcinoma mucinoso	Pag. 14
3.5.- Carcinoma medular	Pag. 15
3.6.- Carcinoma invasor tipo cribiforme	Pag. 15
3.7.- Carcinoma invasor tipo papilar	Pag. 16
4.- Clasificación por etapas del cáncer de mama.	Pag. 17
5.- Factores pronósticos.	Pag. 23
5.1.- Introducción	Pag. 24
5.2.- Factores dependientes del paciente	Pag. 27
5.2.1.- Edad	Pag. 27
5.2.2.- Factores Raciales	Pag. 29
5.3.- Factores dependientes del tumor	Pag. 29
5.3.1.- Tamaño del tumor (T)	Pag. 29
5.3.2.- Afectación de ganglios linfáticos (N)	Pag. 31
5.3.3.- Grado histológico	Pag. 32
5.3.4.- Tipo histológico	Pag. 34
5.3.5.- Índice mitótico	Pag. 35

INDICE

8.1.1.- Datos demográficos	Pag. 88
8.1.2.- Datos relativos al tumor	Pag. 89
8.1.3.- Datos relativos a biomarcadores	Pag. 91
8.1.4.- Datos relativos al tratamiento realizado	Pag. 93
8.1.5.- Datos relativos al seguimiento	Pag. 97
8.2.- Estudio de la asociación de las co-variables	Pag. 99
8.3.- Análisis del tiempo a la progresión. Análisis Univariante	Pag. 111
8.4.- Análisis del tiempo a la progresión. Regresión de Cox	Pag. 128
8.5.- Análisis de la supervivencia causa específica. Análisis Univariante	Pag. 132
8.6.- Análisis de la supervivencia causa específica. Regresión de Cox.	Pag. 147
9.- Discusión.	Pag. 151
10.- Conclusiones.	Pag. 168
11.- Bibliografía	Pag. 171

Listado de Abreviaturas

AC, Doxorubicina, ciclofosfamida.

ADN, Acido Desoxirribonucleico.

ARN, Acido Ribonucleico.

ASCO, American Society of Clinical Oncology.

Bod, Burden of disease.

CALGB, Cancer and Leukemia Group B.

CMF, Ciclofosfamida, metotrexate, 5-fluorouracilo.

EBCTCG, Early Breast Cancer Trialist Cooperative Group.

EGFR, Receptor del factor de crecimiento epidérmico.

ELISA, Enzima-inmuno-ensayo.

ER, Receptor de estrógeno.

ERD, Reguladores negativos del receptor de estrógeno.

ESMO, European Society of Medical Oncology.

FAC, 5-fluorouracilo, doxorubicina, ciclofosfamida.

FEC, 5-fluorouracilo, epirubicina, ciclofosfamida.

FISH, Hibridación in situ fluorescente.

GEICAM, Grupo Español para la Investigación en Cáncer de Mama.

HER-2, Receptor-2 del factor de crecimiento epidérmico humano.

IHQ, inmunohistoquímica.

ILV, Invasión linfática y vascular.

JAK, Protein-kinasa Janus.

MAP, Protein-kinasa activada por mitógeno.

Mdm2, Mouse double minute-2.

NOS, Not Otherwise Specified.

NPI, Índice pronóstico de Nottingham.

NSABP, National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project.

NST, No Special Type.

PCR, Reacción en cadena de la polimerasa.

PI3K, Fosfoinositol 3 kinasa.

PLC γ , Fosfolipasa C.

PR, Receptor de progesterona.

RAS, Rat sarcoma viral oncogene homolog.

SEER, Surveillance, Epidemiology and End Results Program.

SERMS, Moduladores selectivos del receptor de estrógeno.

TGF- α , Factor de crecimiento transformante alfa.

uPA/PAI1, Activador tisular del plasminógeno tipo uroquinasa/ inhibidor tipo 1 del activador.

Tablas

Tabla 1. Categoría T y Ki-67.	Pag 99.
Tabla 2. Categoría T y p53	Pag 99.
Tabla 3. Categoría T y bcl-2	Pag 100.
Tabla 4. Categoría N y Ki-67	Pag 100.
Tabla 5. Categoría N y p53	Pag 101.
Tabla 6. Categoría N y bcl-2	Pag 102.
Tabla 7. Grado histológico y Ki-67	Pag 102.
Tabla 8. Grado histológico y p53	Pag 103.
Tabla 9. Grado histológico y bcl-2	Pag 104.
Tabla 10. Receptores de estrógenos y Ki-67	Pag 104.
Tabla 11. Receptores de estrógenos y p53	Pag 105.
Tabla 12. Receptores de estrógenos y bcl-2	Pag 105.
Tabla 13. Receptores de progesterona y Ki-67	Pag 106.
Tabla 14. Receptores de progesterona y p53	Pag 106.
Tabla 15. Receptores de progesterona y bcl-2	Pag 107.
Tabla 16. Estado de expresión de Her-2 y Ki-67	Pag 107.
Tabla 17. Estado de expresión de Her-2 y p53	Pag 108.
Tabla 18. Estado d expresión de Her-2 y bcl-2	Pag 108.
Tabla 19. Expresión de Ki-67 y p53	Pag. 109.
Tabla 20. Expresión de Ki-67 y bcl-2	Pag. 109.
Tabla 21. Expresión de p53 y bcl-2	Pag 110.
Tabla 22. Relación de la edad y los biomarcadores	Pag. 110.
Tabla 23. Tiempo a la progresión. Regresión de Cox.	Pag 129.
Tabla 24. Supervivencia causa específica. Regresión de Cox.	Pag 149.

Figuras

Figura 1. Edad al diagnóstico.	Pag 88.
Figura 2. Tipos Histológicos.	Pag 89.
Figura 3. Categoría T	Pag 90.
Figura 4. Categoría N	Pag 91.
Figura 5. Tratamiento quirúrgico	Pag. 93.
Figura 6. Tratamiento quimioterápico recibido	Pag. 94.
Figura 7. Intensidad de dosis relativa	Pag 95
Figura 8. Tratamiento hormonal	Pag 96.
Figura 9. Lugar de recaída	Pag 97.
Figura 10. Estado vital al cierre	Pag 98.
Figura 11. Tiempo a la progresión	Pag 111.
Figura 12. Tiempo a la progresión y edad	Pag 112.
Figura 13. Tiempo a la progresión y categoría T	Pag 114.
Figura 14. Tiempo a la progresión y categoría N	Pag 115.
Figura 15. Tiempo a la progresión y categoría N	Pag 116.
Figura 16. Tiempo a la progresión y grado histológico	Pag 118.
Figura 17. Tiempo a la progresión y receptores de estrógeno	Pag 119.
Figura 18. Tiempo a la progresión y receptores de progesterona	Pag 120.
Figura 19. Tiempo a la progresión y estado de expresión de Her-2	Pag 121.
Figura 20. Tiempo a la progresión y Ki-67	Pag 122.
Figura 21. Tiempo a la progresión y p53	Pag 124.
Figura 22. Tiempo a la progresión y bcl-2	Pag 126.
Figura 23. Supervivencia causa específica	Pag 132.

INDICE

Figura 24. Supervivencia causa específica y edad	Pag 133.
Figura 25. Supervivencia causa específica y categoría T	Pag 134.
Figura 26. Supervivencia causa específica y categoría N	Pag 135.
Figura 27. Supervivencia causa específica y grado histológico	Pag 137.
Figura 28. Supervivencia causa específica y receptores de estrógenos	Pag 138.
Figura 29. Supervivencia causa específica y receptores de progesterona	Pag 139.
Figura 30. Supervivencia causa específica y estado de expresión de Her-2	Pag 140.
Figura 31. Supervivencia causa específica y Ki-67	Pag 141.
Figura 32. Supervivencia causa específica y p53	Pag 143.
Figura 33. Supervivencia causa específica y bcl-2	Pag 145.

INTRODUCCION

1.- Introducción.

El cáncer de mama es el segundo tumor más incidente en el mundo con 1,38 millones de casos (cifras del año 2008), y es el tumor más frecuente en la mujer. Supone el 23% de los tumores de reciente diagnóstico. (Ferlay J, Shin HR et al. 2010)

El cáncer de mama agrupa a diferentes enfermedades con comportamientos clínicos y respuestas a los tratamientos administrados variables. Se puede decir que como norma general el diagnóstico en etapas precoces de la enfermedad neoplásica nos permite realizar el tratamiento con una intención curativa. (Ries et al. 2007)

Tanto el proceso diagnóstico como terapéutico del cáncer reclama la intervención de un equipo de diferentes especialistas en diversas áreas de la medicina. (Martin et al. 2009)

El conocimiento de las cifras del cáncer en cuanto a incidencia, mortalidad, prevalencia, supervivencia constituyen el primer paso para evaluar los medios de diagnóstico y tratamientos realizados además de permitir la posterior implantación de medidas de mejora.

Hemos asistido en el último cuarto del siglo XX a una progresiva mejoría de la supervivencia de las mujeres con cáncer de mama gracias, entre otros factores, al aumento de terapias disponibles cada vez más eficaces. (EBCTCG 2012)

Paralelamente a este desarrollo de los medios de tratamiento, el mejor conocimiento de los efectos secundarios a medio y largo plazo de los

INTRODUCCION

tratamientos adyuvantes utilizados, nos llevan a buscar formas mejores de cuantificar el riesgo de recaída y muerte por cáncer de mama en nuestras enfermas y así seleccionar aquellas que más se beneficiarán de las terapias administradas, evitando someter a tratamiento a aquellas pacientes que no lo necesiten (Pinder et al. 1995).

Las cualidades que los marcadores de pronóstico en cáncer de mama deben tener incluyen: consistencia y validez para definir pacientes de alto riesgo de recaída o muerte, sencillez en su determinación, reproducibilidad en los resultados obtenidos y accesibilidad para nuestra práctica clínica habitual. (NIH consensus conference 1991)

EPIDEMIOLOGIA

2.- Epidemiología.

El cáncer constituye uno de los mayores problemas de salud en los países desarrollados ya que es una de las enfermedades más prevalentes.

En el año 2000 se confirmaron por la Organización Mundial de la Salud, 10 millones de nuevos casos de cáncer en todo el mundo, la mortalidad se cifró en 6 millones de casos y 22 millones de casos prevalentes. Los cánceres más incidentes fueron el de pulmón con 1,2 millones de casos, el de mama con 1,05 millones de casos y el colorrectal con 945.000 nuevos casos. (Parkin 2001)

En lo que concierne al cáncer de mama, es el segundo tumor más frecuente en el mundo como queda reseñado. Es con mucha ventaja, el tumor maligno más frecuente en la mujer y de forma global es la quinta causa de muerte por cáncer. Es el tumor más prevalente en el mundo hoy en día. Las tasas de incidencia más alta se sitúan en los países desarrollados (Países Bajos, Estados Unidos etc) que contrasta con las bajas tasas de incidencia observadas en países africanos y asiáticos en general. La incidencia del cáncer de mama aumenta un 1,5% anual (Ferlay J,Shin HR et al. 2010,Parkin 2001). Las cifras del cáncer de mama en Europa, en el año 2008, nos muestran, una incidencia de 332771 casos para la Unión Europea con una tasa estandarizada de 103,7 casos por 100.000 personas. La mortalidad establecida fue de 89797 que constituyen el 23,9% de los casos (Ferlay J, Parkin DM et al. 2010).

En el año 1989 se inició el proyecto Eurocare para medir y explicar las diferencias en la supervivencia de los pacientes diagnosticados de cáncer en los diferentes países europeos. El objetivo del proyecto era mejorar la comparabilidad de las estimaciones de supervivencia a través de la obtención de estándares para la definición de los tumores seleccionados, control de la

calidad de los datos centralizado y uso de técnicas de análisis estandarizadas. La primera comunicación del proyecto Eurocare incluye los pacientes diagnosticados entre 1978 y 1985 en 12 países europeos (incluyendo España).

El estudio Eurocare 3 incluyó los pacientes diagnosticados entre 1990 y 1994, que estuvieron en seguimiento hasta 1999. Se registraron casos de 20 países europeos que cubren un total de 400 millones de habitantes.

La supervivencia a 5 años estimada para las pacientes afectas de cáncer de mama oscila entre el 60-79% (76%) con una mínima diferencia atribuible a la edad de las pacientes al diagnóstico (Coleman et al. 2003).

El estudio Eurocare 4 analizó la evolución de la supervivencia de los pacientes con cáncer diagnosticados entre los años 2000-2002.

La supervivencia global de las mujeres con cáncer de mama en Europa a los 5 años del diagnóstico es de un 79%, mientras que en España se sitúa en el 83% (Verdecchia et al. 2007).

Con respecto a España, la tasa de incidencia estimada ajustada por edad para el año 2006 era de 94 por 100.000, una de las más bajas de la UE y, al igual que en otros países occidentales, ha sufrido un considerable aumento, más marcado entre las décadas del 70 al 90. (Cabanés et al. 2009).

En cuanto a la supervivencia de las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama, en el año 2004 el Grupo Español para la Investigación en Cáncer de Mama (GEICAM) publica el Proyecto el Alamo II. Se trata de una encuesta de evolución de pacientes con cáncer de mama en hospitales del grupo GEICAM que incluye pacientes diagnosticadas entre 1994 y 1997. Se recogieron datos de 23 provincias españolas que representan 12 comunidades autónomas. Las estimaciones sobre la población encuestada (10849 pacientes) indican que

supone el 18% de los casos diagnosticados de cáncer de mama en España (50-60000). La supervivencia global a 5 años comunicada fue del 81% y a 7 años del 78% (GEICAM 2004, Martín et al. 2006).

Recientemente, investigadores de la Universidad de Salamanca han publicado una serie de 816 pacientes con cáncer de mama precoz. La supervivencia global a 5 años fue del 85%. (González del Rio R 2011)

Otra medida que podemos utilizar para calibrar la magnitud del problema de salud pública que supone el cáncer, es la carga de la enfermedad (BoD “burden of disease”). Esta medida tiene en cuenta tanto la morbilidad como la mortalidad achacable a la enfermedad tumoral en relación a la población. Se define como discapacidad ajustada por años de vida (para cuantificar la carga de la enfermedad) al número de años de vida saludable perdidos por la enfermedad que tratamos. En el caso del cáncer de mama para el período de 1997 al 2000, se estimaron unos 76,944 años con discapacidad, lo que supone el 9% de los años de vida con discapacidad asociados al cáncer (Fernández de Larrea-Baz et al. 2009).

Los programas de detección precoz junto con los avances diagnósticos y terapéuticos han contribuido a aumentar la supervivencia de las mujeres con cáncer de mama, que se sitúa por encima del 80% a los cinco años del diagnóstico. (Cabanés et al. 2009)

En España, la mortalidad por cáncer de mama comienza a descender en el año 1992, a un ritmo del 2% anual. Este descenso se observa en todos los grupos de edad. En 1998 teníamos una tasa de mortalidad ajustada de 22,1 por 100.000 habitantes, en 2006 la tasa de mortalidad fue de 18,6 por 100.000 habitantes.

Este patrón de disminución afecta a todas las regiones, aunque el inicio del descenso se produce en diferentes períodos por haber implantado los programas de cribado en diferentes momentos (Cabanés et al. 2009).

En la Comunidad Autónoma de Galicia, el cáncer es la segunda causa de muerte tras las enfermedades cardio-circulatorias. Únicamente es en el segmento etario entre los 35 y los 64 años en el que las enfermedades oncológicas provocan la mayor mortalidad de los gallegos.

La tasa de mortalidad estandarizada por cáncer de mama en 1998 fue de 14 por 100.000 habitantes (López et al. 2002).

La etiología de la mayor parte de los cánceres de mama es desconocida, sin embargo se describen numerosos factores de riesgo para el desarrollo de este tumor.

La menarquia precoz, la menopausia tardía, la nuliparidad, la edad del primer embarazo por encima de los 40 años, no amamantar a los hijos lactantes, el tener familiares de primer o segundo grado afectadas, son factores de riesgo reconocidos para sufrir un cáncer de mama.

El consumo de estrógenos exógenos, bien como anticoncepción hormonal o bien como terapia hormonal sustitutiva en menopaúsicas, incrementa también el riesgo de padecer un cáncer de mama. (Veronesi et al. 2005)

Otros factores investigados incluyen: la edad avanzada, el sedentarismo, el consumo de alcohol, el consumo en exceso de grasa, el menor consumo de folatos, la exposición a plaguicidas organoclorados, el tabaco y los campos electromagnéticos de muy baja frecuencia. (Ellis et al 2003, Pollán et al. 2008)

La irradiación de la pared torácica, el antecedente de enfermedades proliferativas benignas de la mama y mutaciones en los genes BRCA 1 y BRCA 2, son también factores de riesgo reconocidos para padecer cáncer de mama. Las mujeres con alteraciones en alguno de estos genes de susceptibilidad tienen una probabilidad entre 60% y 80% de desarrollar cáncer de mama a lo largo de su vida. Sin embargo estos dos genes sólo explican una pequeña proporción de los casos familiares (Pollán et al. 2008, Cabanes et al. 2009).

HISTOPATOLOGIA

3.- Histopatología.

El término carcinoma infiltrante de mama agrupa diversas lesiones que se diferencian en muchos aspectos, tanto en su presentación clínica como en su apariencia radiológica, características histológicas y potencial biológico.

Debido a las características de este trabajo de investigación, no se hará una extensa descripción de todos los tipos histológicos y aspectos patológicos relacionados con los mismos. Nos centraremos exclusivamente en los más frecuentemente observados y comunicados en la literatura. (The World Health Organization 1982, Ellis et al. 2003, Schnitt et al. 2004, Ries et al. 2007)

3.1.- Carcinoma ductal infiltrante.

Es el tipo histológico más frecuente. Aunque la distribución histológica de los diferentes tipos de tumores infiltrantes varia entre las diferentes series publicadas. Hasta en un 28% de los casos según las series pueden detectarse formas tumorales mixtas.

La anatomía macroscópica describe tumores de apariencia escirra, duros. Al corte presentan una superficie blanquecina, grisácea y en la mayor parte de los casos los bordes son irregulares e imprecisos.

Microscópicamente, son tumores con una mezcla de partes claramente invasoras y en crecimiento con diferentes momentos de división mitótica, junto a zonas de estroma desmoplásico y amplias áreas de carcinoma ductal in situ, no invasor. Las células tumorales pueden adoptar diferentes disposiciones desde la organización glandular, hasta la formación de nidos ó cordones de células tumorales de diferentes tamaños y con áreas de necrosis entre los mismos.

Como norma general los tumores ductales infiltrantes confiere un peor pronóstico vital a las pacientes, ahora bien la determinación de otros factores que mencionaremos con posterioridad nos permitirán dentro de estos carcinomas diferenciar aún más subgrupos pronósticos.

El carcinoma ductal infiltrante, también puede denominarse carcinoma ductal tipo NOS (not otherwise specified), carcinoma tipo NST (no special type) ó carcinoma infiltrante. (The World Health Organization 1982, Ellis et al. 2003, Schnitt et al. 2004, Ries et al. 2007)

3.2.- Carcinoma lobulillar.

El carcinoma lobulillar infiltrante constituye la segunda estirpe neoplásica en frecuencia en las pacientes afectas de cáncer de mama. Su frecuencia estimada oscila entre el 5-10%. Son tumores multifocales de forma ipsilateral y tienen tendencia a la afectación de ambas mamas. Al igual que definimos previamente para el carcinoma ductal suelen coexistir dentro de la misma lesión tumoral focos de carcinoma lobulillar in situ.

La apariencia macroscópica de los tumores lobulillares infiltrantes, es consistente, blanca o grisácea, indistinguible de los tumores ductales. Otras veces la forma de presentación es la de una zona de consistencia elástica sin una masa o nódulo evidente, llegándose al diagnóstico tras el estudio microscópico.

Microscópicamente, el carcinoma lobulillar infiltrante presenta características citológicas y patrones de infiltración estromal particulares. La forma clásica se caracteriza por células pequeñas, uniformes, que invaden el estroma por un único punto pero formando hileras. Estas células frecuentemente rodean los ductos mamarios remedando una imagen de diana.

El núcleo de las células neoplásicas suele ser pequeño, de tamaño uniforme y a menudo excéntrico en el citoplasma. Las figuras de mitosis son raras. En el citoplasma de las células tumorales pueden existir formaciones luminales que le darían la apariencia de células en anillo de sello.

Una característica muy frecuente de los carcinomas lobulillares, tanto infiltrantes como "in situ", es la pérdida de la cohesión intercelular, este rasgo fenotípico podría relacionarse con el rasgo característico de este tipo histológico tumoral de pérdida de expresión de la E-Cadherina (moléculas de adhesión) que supone una diferencia genotípica con respecto a los tumores ductales.

Existen diferentes variantes de carcinomas lobulillares si nos basamos en su disposición tisular, por mencionarlos serían: sólidos, alveolares, tubulolobulares, trabeculares, variante pleomórfica.

Hay algunos aspectos clínicos de los tumores lobulillares infiltrantes que merecen consideración. En diferentes series se ha documentado que los tumores ductales infiltrantes diseminan más frecuentemente a pulmón, hígado y cerebro. En contraposición los tumores lobulillares diseminan con más frecuencia al hueso, genitales internos, leptomeninges, superficie peritoneal, tracto gastrointestinal y área retroperitoneal. (The World Health Organization 1982, Ellis et al. 2003, Schnitt et al. 2004, Ries et al. 2007, Yoder et al. 2007)

3.3.- Carcinoma tubular.

Es una estirpe tumoral con pronóstico más favorable. Se asocia a un escaso potencial de metastatización. Presenta una incidencia que puede oscilar entre el 7-27%, según los trabajos consultados.

Suelen ser tumores pequeños, de consistencia firme, espiculados que macroscópicamente pueden ser indistinguibles de los carcinomas ductales infiltrantes.

Al microscopio, los carcinomas tubulares, se caracterizan por una proliferación bien definida de glándulas ó túbulos, formadas por una única capa de células epiteliales y sin componente de células mioepiteliales. Las células tumorales presentan núcleos excéntricos, hacia la luz tubular, con escasas alteraciones nucleares. El estroma presenta figuras desmoplásicas y elastosis. El carcinoma tubular se asocia frecuentemente con formas "in situ" de carcinoma ductal de bajo grado. (The World Health Organization 1982, Ellis et al.2003, Schnitt et al. 2004, Goldstein et al. 2004)

3.4.- Carcinoma mucinoso.

Es otra de las estirpes histológicas de pronóstico más favorable, también puede denominarse carcinoma coloide. Supone menos de un 2% de los carcinomas de mama.

Macroscópicamente se caracteriza por ser una lesión circunscrita, de consistencia gelatinosa. Existen, no obstante, tumores con grados variables de fibrosis en su estroma cuya consecuencia directa es una consistencia más firme.

El análisis microscópico demuestra la presencia de células pequeñas agrupadas formando nidos o estructuras papilares en una matriz extracelular con presencia de mucina. Esta apariencia debe presentarse en al menos el 90% del tumor para ser considerado como un tumor mucinoso. (The World Health Organization 1982, Ellis et al.2003, Schnitt et al. 2004, Ries et al. 2007)

3.5.- Carcinoma medular.

El carcinoma medular representa menos del 5-7% de todos los tumores infiltrantes de la mama.

Son tumores circunscritos, de consistencia blanda, de coloración marronácea. Puede presentar áreas de necrosis, hemorragia o degeneración quística. Estos hallazgos tienen más probabilidad de presentarse cuanto mayor es el diámetro del tumor.

Al microscopio se describe un tumor circunscrito con un patrón de crecimiento sincitial, alteraciones nucleares, ausencia de diferenciación glandular y un infiltrado linfoplasmocitario. Característicamente las células tienen escasa diferenciación (The World Health Organization 1982, Ellis et al.2003, Schnitt et al.2004, Ries et al.2007).

3.6.- Carcinoma invasor tipo cribiforme.

Se trata de un carcinoma bien diferenciado que comparte algunas características morfológicas con los carcinoma tubulares y también un pronóstico más favorable. Su frecuencia de presentación oscila entre el 0,8 y el 3% de los casos, no obstante entre el 5 y el 6% de los cánceres de mama muestran al menos parcialmente un componente de carcinoma cribiforme (formas mixtas).

Se demuestra en el análisis microscópico de estos tumores la presencia de un patrón fenestrado de invasión del estroma. Se asocia hasta en el 20% de los casos al carcinoma tubular, dando lugar a formas mixtas. (Ellis et al.2003, Ries et al. 2007, Schnitt et al. 2004)

3.7.- Carcinoma invasor tipo papilar.

Son tumores escasamente incidentes. Menos del 1-2% de los carcinomas infiltrantes de la mama.

La lesión tumoral es circunscrita, presenta papilas y formaciones sólidas focales de células tumorales. Característicamente se distingue una proliferación de células epiteliales con disposición arborescente, centradas por un eje fibrovascular. Los núcleos de las células tumorales presentan un grado intermedio de atipia, y el grado histológico suele ser moderadamente diferenciado. Es frecuente encontrar calcificaciones en las células tumores y también es habitual su asociación con el carcinoma ductal "in situ". (Ellis et al. 2003, Ueng et al. 2009)

3.8.- Otros tipos histológicos de presentación infrecuente incluyen los siguientes: Carcinoma invasor tipo micropapilar, carcinoma metaplásico, carcinoma invasor con diferenciación endocrina, carcinoma adenoide quístico, carcinoma invasor tipo apocrino, carcinoma secretor. (The World Health Organization 1982, Ellis et al.2003, Schnitt et al. 2004)

**CLASIFICACION POR ETAPAS
DEL CANCER DE MAMA**

4.- Clasificación por etapas del cáncer de mama. (Hermanek et al. 1997)

Hemos seguido esta versión de la clasificación TNM debido a que la mayor parte de las pacientes de nuestra muestra se clasificaron siguiendo los criterios expuestos en ella. La actualización de la clasificación TNM tuvo lugar en 2002-2003. (Greene et al. 2002)

La siguiente clasificación sólo se aplica a los carcinomas. Debe existir confirmación histológica de la enfermedad. En el caso de que existan tumores múltiples simultáneos en una mama, se debe utilizar el tumor con la mayor categoría T. Los tumores de mama bilaterales y simultáneos deben clasificarse de forma independiente, para permitir la clasificación de los casos por tipo histológico.

En lo que respecta a los ganglios linfáticos regionales, se distinguen:

a.- Axilares (homolaterales): ganglios interpectoriales (Rotter) y ganglios de la vena axilar y sus tributarias que pueden dividirse en los siguientes niveles:

a.1.- Nivel I (axilares inferiores): ganglios por fuera del borde externo del músculo pectoral menor.

a.2.- Nivel II (axilares medios): ganglios localizados entre los bordes interno y externo del músculo pectoral menor y los ganglios interpectoriales (Rotter).

a.3.- Nivel III (axilares superiores): ganglios por dentro del borde interno del músculo pectoral menor, incluidos los ganglios denominados subclaviculares, infraclaviculares o apicales.

Los ganglios linfáticos intramamarios se clasifican como ganglios axilares.

b.- Mamaros internos (homolaterales): ganglios localizados en los espacios intercostales a lo largo del borde del esternón en la fascia endotorácica.

Cualquier metástasis en ganglios linfáticos diferentes a estos se clasifican como metástasis a distancia (M1), incluidos los ganglios supraclaviculares, cervicales o mamaros internos contralaterales.

4.1 Clasificación clínica TN.

4.1.1.- Clasificación T. Tumor primario.

Tx: No se puede evaluar el tumor primario.

T0: No existen signos de tumor primario.

Tis: Carcinoma in situ: carcinoma intraductal, o carcinoma lobular in situ, o enfermedad de Paget del pezón sin tumor.

La enfermedad de Paget asociada a un tumor se clasifica en función del tamaño del tumor.

T1: Tumor de diámetro máximo menor o igual a 2 cm.

T1mic Microinvasión de 0,1 cm o menos de dimensión máxima.

La microinvasión es la extensión de las células cancerosas más allá de la membrana basal en los tejidos adyacentes, sin que ningún foco tenga más de 0,1 cm de dimensión máxima. Cuando hay múltiples focos de microinvasión, para clasificarla sólo se utiliza la medida del foco de mayor tamaño. (No se suman las dimensiones de todos los focos individuales) La presencia de múltiples focos de microinvasión se debe anotar, al igual que cuando están presentes con carcinomas invasivos múltiples de mayor tamaño.

T1a: Diámetro máximo mayor de 0,1 cm, pero menor o igual a 0,5 cm.

T1b: Diámetro máximo mayor a 0,5 cm pero menor o igual 1 cm.

T1c: Diámetro máximo mayor de 1 cm pero menor o igual a 2 cm.

T2: Tumor de diámetro máximo mayor de 2 cm, pero menor o igual a 5 cm.

T3: Tumor de diámetro máximo mayor de 5 cm.

T4: Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a la pared del tórax o a la piel.

La pared torácica incluye las costillas, los músculos intercostales y el músculo serrato mayor, pero no los músculos pectorales.

T4a: Extensión a la pared torácica.

T4b: Edema (incluida piel de naranja), o ulceración de la piel de la mama, o presencia de nódulos cutáneos satélites confinados a la misma mama.

T4c: 4a y 4b conjuntamente.

T4d: carcinoma inflamatorio.

El carcinoma inflamatorio de mama se caracteriza por una induración de la piel con un borde erisipeloides, generalmente sin ninguna masa palpable subyacente. Si la biopsia de piel es negativa y no existe un cáncer primario localizado medible, al realizar la clasificación anatomopatológica de un carcinoma inflamatorio clínico (T4d), la categoría T correspondiente es pTx.

La presencia de pequeñas depresiones de la piel, la retracción del pezón u otros cambios cutáneos, excepto los descritos en las categorías T4b y 4d, pueden aparecer en las categorías T1, T2 y T3 sin que se afecte la clasificación.

4.1.2.- Clasificación N. Ganglios linfáticos.

Nx: No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales.

N0: No se demuestran metástasis ganglionares regionales.

N1: Metástasis en ganglios axilares homolaterales móviles.

N2: Metástasis en ganglios axilares homolaterales fijados a otro ganglio u otra estructura.

N3: Metástasis en ganglios mamarios internos homolaterales.

4.2. Clasificación anatomopatológica pTN

4.2.1.- Clasificación pT. Tumor primario.

La clasificación anatomopatológica requiere la exploración del carcinoma primario sin tumor macroscópico en los márgenes de resección. Un caso puede ser clasificado como pT si sólo existe un tumor microscópico en el margen. Las categorías pT se corresponden con las categorías T. En la clasificación pT, el tamaño del tumor es una medida del componente invasivo.

4.2.2.- Clasificación pN. Ganglios linfáticos regionales.

La clasificación anatomopatológica requiere la resección y la exploración de al menos los ganglios linfáticos axilares (nivel I). La resección incluirá habitualmente 6 o más ganglios linfáticos.

pNx: No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales (no extirpados para su estudio o extirpados previamente).

pN0: No existen metástasis en los ganglios linfáticos regionales.

pN1: Metástasis en los ganglios axilares homolaterales móviles:

pN1a.- Sólo micrometástasis (ninguna mayor de 0,2 cm).

pN1b.- Metástasis en ganglios linfáticos alguna mayor de 0,2 cm.

pN1bi.- Metástasis en uno a tres ganglios, alguno mayor de 0,2 cm y todos menores de 2 cm de diámetro.

pN1bii.- Metástasis en cuatro o más ganglios, alguno de ellos mayor de 0,2 cm y todos menores de 2 cm de diámetro máximo.

CLASIFICACION

pN1biii.- Extensión del tumor que sobrepasa la cápsula de una metástasis ganglionar menor de 2 cm de diámetro máximo.

pN1biv.- Metástasis en un ganglio de diámetro máximo mayor o igual a 2 cm.

pN2.- Metástasis en ganglios axilares homolaterales fijados entre sí o a otras estructuras.

pN3.- Metástasis en ganglios mamaros internos homolaterales.

FACTORES PRONOSTICOS

5.- Factores pronósticos.

5.1.- Introducción.

Como se ha señalado previamente, dos hechos han contribuido a aumentar el interés en el estudio de factores pronósticos en cáncer de mama. Por un lado el número creciente de opciones terapéuticas para tratar a las mujeres con tumores localizados. Conviene señalar que la investigación clínica nos ha provisto de fármacos citostáticos y combinaciones cada vez más eficaces que han demostrado aumentar la supervivencia en las pacientes con cáncer de mama localizado. Recientemente el grupo EBCTCG ha publicado una actualización con mayor seguimiento de los metaanálisis que analizaban el valor de la quimioterapia adyuvante en mujeres con cáncer de mama precoz. Se confirma con un seguimiento de casi 20 años que los esquemas quimioterápicos clásicos frente a ningún tratamiento produjeron una reducción absoluta del riesgo de mortalidad por cáncer de mama del 6,2% a 10 años. El uso de antraciclinas frente a esquemas sin antraciclinas redujo de forma absoluta el riesgo de mortalidad por cáncer de mama un 2,8%. (Early Breast Cancer Trialist Collaborative Group 2012)

Por otro lado, los programas de detección precoz que han incrementado el número de mujeres diagnosticadas de tumores incipientes, de pequeño tamaño con una baja tasa de mortalidad. En estas situaciones la administración de terapias citotóxicas no aportarían beneficio en supervivencia y por el contrario existe la posibilidad de efectos secundarios potencialmente graves. (Martín et al. 2009)

Es importante contar con información pronóstica certera para seleccionar el tratamiento óptimo para cada paciente. De esta forma evitaremos el infra o

sobret ratamiento de las pacientes con los efectos indeseables de cada una de estas prácticas. (Pinder et al. 1995)

Entendemos por factores pronósticos en cáncer de mama, aquellas características o factores disponibles en el momento del diagnóstico o tras la cirugía que, en ausencia de la terapia adyuvante, se asocian con recurrencia de la enfermedad, mortalidad, o algún otro resultado clínico. (Burstein et al. 2008)

Factores predictivos son medidas asociadas con el grado de respuesta a una terapia específica. Por ejemplo, la demostración de receptores hormonales en las células tumorales predice la respuesta a la terapia hormonal. Cualquier factor tiene el potencial de ser a la vez pronóstico y predictivo. (Burstein et al. 2008)

Tanto los factores pronósticos como los predictivos se dividen en tres categorías:

- Factores dependientes de los pacientes. Características de los pacientes que son independientes de la enfermedad (como la edad).
- Factores dependientes del tumor. Características de la enfermedad tumoral (como el tamaño del tumor y el tipo histológico).
- Biomarcadores. Son parámetros medibles en los tejidos, células o fluidos, (como el estado de receptores hormonales, estado de los receptores de progesterona, medidas de renovación celular) que puede ser evaluado o medido objetivamente y es indicador de un proceso biológico normal o patológico o bien una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica específica (Oldenhuis et al. 2008, Martín et al 2009).

En 1998 Altman y Lyman publican una revisión sobre el porqué y cómo deben realizarse los estudios de factores pronósticos en cáncer de mama que podemos resumir de la siguiente forma, “cada investigación realizada puede ayudar a comprender mejor la enfermedad y ayudar en el proceso de decisión terapéutica. El conocimiento de las variables pronósticas principales en cáncer de mama puede ayudar en el diseño de ensayos clínicos, clarificar diferencias entre diferentes estudios y asistir en la individualización de la terapia de las pacientes” (Altman et al. 1998).

Utilizamos el término “clasificador” para hacer referencia a cualquier factor que permita la categorización pronóstica de los tumores a partir de uno o más indicadores biológicos. Si existen dos categorías, como buen pronóstico y mal pronóstico, el clasificador es de tipo binario. El término “índice” hace referencia a un factor predictivo o de pronóstico que ofrece un valor de orden y continuidad a partir de uno o más indicadores biológicos, es decir, nos permite realizar un ordenamiento del riesgo. A menudo por motivos de diseño de un ensayo clínico, o de tratamiento y seguimiento de los pacientes, se añaden valores de corte para convertir un índice de pronóstico en un clasificador de pronóstico.

Los índices o clasificadores predictivos o de pronóstico pueden basarse en factores únicos o múltiples (Simon 2009).

Un factor pronóstico de utilidad en la práctica habitual debe tener valor predictivo significativo, independiente y validado en estudios rigurosos. Debe ser reproducible, accesible, interpretable con facilidad y en consecuencia debe tener implicaciones terapéuticas (NIH consensus conference 1991).

En el año 2000 promovida por el “College of American Pathologists” se desarrolló una conferencia de consenso que evaluó los diferentes factores pronósticos y predictivos en cáncer de mama conocidos hasta ese momento. El grupo de expertos convocado integraba clínicos, patólogos y estadísticos. Tanto los factores pronósticos como los predictivos se estratificaron en diferentes categorías en virtud de la robustez de la evidencia que los avalaba. La categoría de evidencia 1 se otorgó al tamaño tumoral, el estado ganglionar, el grado histológico, el tipo histológico tumoral, el recuento de figuras de mitosis y el estado de expresión de receptores hormonales. La categoría de evidencia 2 incluyó el estado de expresión de Her-2, la expresión de marcadores de proliferación, la presencia de invasión vascular y linfática y el estado de expresión de p53.

Factores como el análisis de la ploidía del ADN, la densidad de microvasos, el estado de expresión de EGFR, TGF- α , Bcl-2 se incluyeron en la categoría de evidencia 3. (Fitzgibbons et al. 2000)

5.2. Factores pronósticos dependientes del paciente.

5.2.1.- Edad.

La edad al diagnóstico ha demostrado su valor como factor pronóstico en mujeres con cáncer de mama. Las pacientes más jóvenes, menores de 35 años, tienen peor pronóstico vital que las pacientes mayores de 35 años. Como norma general los tumores que presentan estas pacientes jóvenes tienden a ser de mayor tamaño, de más alto grado histológico, con escasa o nula expresión de receptores hormonales. (Burstein et al. 2008, Guerra et al. 2003, Cluze 2009)

En 2004, un grupo de investigadores del M.D. Anderson Cancer Center comunicaron los resultados de un trabajo retrospectivo que incluyó 452 pacientes menores de 35 años tratadas en este centro. El estadio tumoral en el momento diagnóstico era II-IIIa en el 64% de las mujeres. La supervivencia libre de recaída a 5 años fue del 48% (IC 95% 41-54). La supervivencia global a 5 años fue del 77% (IC 95% 72-83) (Gonzalez-Angulo et al. 2005).

Se ha sugerido que el cáncer de mama en algunas mujeres jóvenes es biológicamente distinto al que se desarrolla en pacientes de mayor edad. La identificación de los genes BRCA-1 y BRCA-2 implicados en ciertas formas de cáncer de mama familiar, que inciden más frecuentemente en mujeres jóvenes, pueden ayudar a explicar la variabilidad biológica de la enfermedad y el diferente comportamiento clínico en relación a la edad (Narod et al. 2004, Foulkes et al. 2004, Foulkes et al. 2007), aunque , como hemos señalado previamente, en un porcentaje pequeño de mujeres.

Kroman y colaboradores, analizaron la supervivencia de forma retrospectiva de 10356 mujeres premenopáusicas, menores de 50 años con cáncer de mama. Tomando como referencia la supervivencia de las mujeres de entre 45 y 49 años, las mujeres con edades inferiores a 40 años y particularmente menores a 35 años tenían un incremento significativo del riesgo de muerte (Kroman et al. 2000).

Soerjomataram y colaboradores comunicaron que en ausencia de tratamiento adyuvante las pacientes menores de 35 años tienen 2,2 veces más riesgo de muerte, las pacientes entre 35 y 39 años 1,4 veces más riesgo de muerte al compararlas con las mujeres de edades comprendidas entre 45 y 49 años. En

este mismo trabajo se comunica que las pacientes ancianas presentan una mayor tasa de mortalidad (Soerjomataram et al. 2008).

Otros autores han publicado resultados que confirman que las mujeres jóvenes, menores de 35 años y las ancianas de 85 o más años son los segmentos etarios con supervivencias relativas más bajas (Ries et al. 2007).

Las pacientes con edades superiores a 70 años presentan algunas características diferenciales que podrían afectar negativamente su supervivencia. Presentan una incidencia mayor de enfermedades asociadas, incidencia mayor de limitación del esfuerzo diagnóstico y terapéutico del cáncer de mama, se incrementa el número de estadios desconocidos y se limitan las terapias radicales (Yancik et al. 2001, Bouchardy et al. 2003).

5.2.2.- Factores raciales.

Aunque no es aplicable en nuestro medio, se ha comunicado que existen diferencias en la supervivencia de las mujeres con cáncer de mama en función de la raza. Las mujeres afro-americanas tienen mayor incidencia de tumores de mama con histologías más agresivas, mayor incidencia de tumores avanzados al diagnóstico, menor frecuencia de tumores con expresión de receptores hormonales, mayor frecuencia de tumores con alto grado histológico, y presentan peores cifras de supervivencia (Morris et al. 2007, Field et al. 2005).

5.3.- Factores dependientes del tumor.

5.3.1.- Estadio tumoral al diagnóstico. Tamaño del tumor. (T)

La extensión local tumoral y la afectación ganglionar regional constituyen los factores pronósticos con niveles de evidencia más robustos en cáncer de mama.

FACTORES PRONOSTICOS

Sabemos desde hace más de 40 años gracias a los estudios promovidos por el grupo “National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project” (NSABP) que el tamaño tumoral se relaciona de forma lineal e inversa con la supervivencia de las mujeres con cáncer de mama.

Sobre unas 2000 pacientes analizadas, se comunicaron unas tasas de recurrencia a 60 meses del 21% en las pacientes con cáncer de mama y sin afectación ganglionar axilar, y del 66% en las mujeres con ganglios axilares afectados. En términos de supervivencia global se confirman las mismas tendencias la probabilidad de supervivencia a 5 años en pacientes sin ganglios era del 76% (85% para pacientes con tumores menores de 2 cm, 70-80% para pacientes con tumores mayores de 2 cm) y descendía hasta el 46% en mujeres con ganglios axilares afectados (Fisher et al. 1969).

Tomando los datos de la encuesta Eurocare 2, Sant y colaboradores, realizaron una regresión logística múltiple para estudiar la influencia del estadio al diagnóstico en la supervivencia relativa a 5 años en 4478 pacientes con cáncer de mama entre los años 1990 a 1992. La supervivencia global relativa a 5 años fue del 79%. Las pacientes con tumores pequeños y sin metástasis ganglionares T1N0 tuvieron una supervivencia relativa a 5 años del 98%, 87% para las pacientes con tumores T2-T3 N0, 76% para pacientes con tumores con ganglios axilares afectados, 55% para pacientes con tumores T4 y con estado ganglionar axilar desconocido (Sant et al. 2003).

Carter y colaboradores. analizan 24470 casos de pacientes con cáncer de mama sometidas a resección del tumor primario y linfadenectomía axilar homolateral. Se aislaron y estudiaron al menos 8 ganglios linfáticos. La supervivencia a 5 años era menor en las pacientes con tumores mayores

(mayor diámetro) y en aquellas con ganglios linfáticos metastatizados por la neoplasia al compararlas con las pacientes con tumores de menor tamaño y sin afectación ganglionar axilar respectivamente. Se demuestra una relación lineal entre el tamaño tumoral y la presencia de metástasis ganglionares axilares (Carter et al. 1989).

Para la cuantificación del tamaño, se recomienda la medida del tumor en 2 dimensiones al menos. Se utilizará la mayor medida del componente infiltrante para determinar el tamaño tumoral patológico (pT) (Fitzgibbons et al. 2000).

5.3.2.- Estadio tumoral al diagnóstico. Afectación de ganglios linfáticos. (N)

La presencia de afectación tumoral en los ganglios linfáticos axilares es el factor pronóstico más importante en las mujeres con cáncer de mama, y existen resultados que avalan la relación lineal inversa entre el número de ganglios axilares afectados por la neoplasia y la supervivencia por cáncer de mama (Fisher et al. 1983).

El grupo NSABP sobre 620 pacientes incluidas en el estudio B-04 confirma que tanto el tamaño tumoral, el número de ganglios axilares metastatizados por la neoplasia (0, 1-3, 4-9, ó más de 10) y la infiltración tumoral del pezón fueron factores pronósticos de supervivencia global a 15 años (Fisher et al. 1993).

Análisis posteriores han confirmado el valor pronóstico de la afectación axilar en términos de supervivencia cáncer específica (Carter et al. 1989, Chen et al. 2007, Michaelson et al. 2009).

Diversos autores han evaluado el valor pronóstico del número de ganglios linfáticos axilares metastatizados por el tumor. Tai y colaboradores confirman

en su trabajo que en el grupo de pacientes con afectación de 1 a tres ganglios axilares, aquellas pacientes con tres ganglios afectados tuvieron peor supervivencia causa específica que las pacientes con 1 ó 2 ganglios afectados (Tai et al. 2010). En una línea similar, Fisher y colaboradores y Sivridis y colaboradores no pudieron demostrar diferencias de pronóstico en las pacientes con más de 4 ganglios afectados al dividirlos en grupos de 4 a 7 ganglios o más de 7 ganglios (Fisher et al. 1997, Sivridis et al. 2006)

En los últimos 10 años el desarrollo y perfeccionamiento de la biopsia selectiva del ganglio centinela como método de estadificación de la axila en mujeres con cáncer de mama nos ha enfrentado a la valoración clínica y pronóstica de la presencia de micrometástasis ganglionares. El ganglio centinela es por definición, aquel que tiene mayor probabilidad de ser metastatizado por la neoplasia que se disemina regionalmente. En la práctica habitual el ganglio centinela puede ser analizado con metodologías diferentes, secciones múltiples, técnicas inmunohistoquímicas y técnicas de diagnóstico molecular. Aunque detectadas frecuentemente la relevancia clínica de las micrometástasis del ganglio centinela debe aclararse. La presencia de células tumorales aisladas tiene la misma consideración que el ganglio negativo o no metastatizado por la neoplasia (Sahin et al. 2009).

5.3.3.- Grado histológico.

El grado histológico nos proporciona información pronóstica en muchos tumores y también en cáncer de mama. Las primeras publicaciones sobre la sistematización y clasificación del grado histológico en mujeres con cáncer de mama, data de 1925 con Greenough y de 1928 con Patey y Scarff. En 1957 Bloom y Richardson publican su método de gradación histológica. Analizaron

1409 casos y correlacionaron sus resultados con la supervivencia a 5, 10 y 15 años (Bloom et al. 1957).

Tenemos 2 métodos principales para determinar el grado histológico

El primero, descrito por Bloom y Richardson, se basa en la descripción de las características del núcleo y su combinación con ciertas cualidades citoplasmáticas de las células tumorales (características nucleares, citológicas y arquitecturales). El segundo método, desarrollado más recientemente por Elston y Ellis, (Elston et al. 1991) nos ofrece criterios más objetivos y definiciones de las características tumorales más estrictas con lo que se gana en reproducibilidad. El sistema de gradación de Nottingham, como también es conocido el sistema de gradación de Elston y Ellis, es una modificación del sistema anterior de Scarff-Bloom y Richardson en el que el patólogo toma en consideración las siguientes características celulares del tumor.

1) Formación de túbulos. Los tumores cuyas células formen estructuras tubulares alrededor de un foramen central más de un 75% se puntúa con 1. Entre 10 y 75% de las células forman estructuras tubulares se puntúa con 2. Si menos del 10% de las células tumorales forman estas estructuras se puntúa con 3.

2) Tamaño y pleomorfismo nuclear. El aumento de tamaño del núcleo celular ó bien la alteración morfológica del mismo, etiquetada como leve, moderada ó severa se puntúa con 1, 2 y 3 respectivamente.

3) Recuento de figuras de mitosis. Se realiza el recuento de células en mitosis por cada campo de gran aumento en microscopía óptica. Se incluyen exclusivamente en el recuento los núcleos celulares que muestren figuras

propias de metafase, anafase o telofase. Situaciones como células apoptóticas o hiperchromasia nuclear no se consideraran para el recuento mitótico.

El grado histológico resulta de la suma de estas tres cualidades de las células. Los tumores bien diferenciados (grado 1) son aquellos que puntúan 3,4 ó 5 puntos, los moderadamente diferenciados (grado 2) puntúan 6 o 7 y los pobremente diferenciados (grado 3) son aquellos cuya puntuación es 8 ó 9. (Elston et al. 1991)

El grado histológico medido de esta forma es un factor pronóstico en pacientes con cáncer de mama. Las pacientes con carcinoma de grado 1 tienen una supervivencia del 85% a 10 años comparada con el 45% de supervivencia para las pacientes con tumores de grado 3 (Pinder et al. 1995).

El grado histológico nos ayuda a estratificar el riesgo de las pacientes en una misma etapa definida por pT y pN, con la única excepción del carcinoma medular (por definición es un tumor pobremente diferenciado), se debe emitir gradación histológica de todos los tumores infiltrantes de la mama. Se recomienda el uso de la clasificación de Nottingham. El grado puede ser evaluado tanto en muestras quirúrgicas como de biopsias con aguja siempre y cuando se aporte tejido suficiente (Fitzgibbons et al. 2000).

El alto grado histológico confiere peor pronóstico vital a las pacientes y es independiente del tamaño tumoral y del estado ganglionar axilar (Rakha et al. 2008, Kollias et al. 1997).

5.3.4.- Tipo histológico.

Como normal general la histología tubular, cribiforme y mucinosa otorgan mejor pronóstico vital que la histología lobulillar o ductal que son las más frecuentes.

La supervivencia se ha relacionado con los diferentes tipos histológicos del cáncer de mama según se detalla a continuación (Olier Gárate et al. 2009).

1.- Supervivencia global a 10 años superior al 80%:

Carcinoma tubular puro, carcinoma cribiforme, carcinoma mucinoso, carcinoma tubulolobulillar, carcinoma adenoide-quístico.

2.- Supervivencia global a 10 años entre el 60-80% de los casos:

Carcinoma tubular mixto, carcinoma lobulillar clásico

3.- Supervivencia global a 10 años entre el 50-60% de los casos:

Carcinoma medular, carcinoma lobulillar variante.

4.- Supervivencia global a 10 años inferior al 50%:

Carcinoma ductal infiltrante, carcinoma lobulillar pleomórfico, carcinoma micropapilar infiltrante.

5.3.5.- Recuento de figuras de mitosis. Índice mitótico.

Forma parte de la clasificación combinada de Nottingham como acabamos de definir al exponer el grado histológico. El recuento se hará en 10 campos de gran aumento consecutivos, en la parte tumoral más proliferativa (Fitzgibbons et al. 2000).

Dentro del sistema de gradación de Nottingham la medida del índice mitótico ha mostrado mayor valor pronóstico que la medida del grado nuclear (Frkovic-Grazio et al. 2002 , Meyer et al. 2005) .

Louwman y colaboradores realizaron un estudio retrospectivo en 468 mujeres con cáncer de mama sin afectación ganglionar al diagnóstico para evaluar el valor pronóstico de la determinación del índice de actividad mitótica. Con un seguimiento de más de 20 años, los autores concluyeron que existía diferencia en términos de supervivencia en función del índice de actividad

mitótica registrado en el tumor. El índice de actividad mitótica pronóstica supervivencia a largo plazo y puede ayudar a elegir pacientes que deberían recibir tratamiento adyuvante tras el tratamiento locorregional (Louwman et al. 2006).

5.3.6.- Invasión linfática y vascular.

La invasión linfática y vascular (ILV) describe la invasión por parte de células tumorales de los vasos linfáticos y capilares o ambos en el área peritumoral. La ILV peritumoral tiene un significado pronóstico y se correlaciona con el riesgo de recaída y la supervivencia en mujeres con cáncer de mama (Rosen et al. 1989).

La ILV se comunica en aproximadamente el 15% de los carcinomas ductales infiltrantes y en casi el 10% de los tumores sin afectación ganglionar (Hoda et al 2006).

Una de las dificultades más importantes a la hora de determinar la ILV peritumoral es la generada por la retracción tisular. Esta puede ser obviada mediante un procesado óptimo de las muestras. Se recomienda la visualización clara de células tumorales rodeadas de un anillo de células endoteliales para establecer el diagnóstico de ILV. La tinción inmunohistoquímica con marcadores endoteliales (CD31) puede ayudar a confirmar ILV (Martín et al. 2009).

Los criterios diagnósticos de la ILV (Lester et al 2009) incluyen:

- La ILV debe diagnosticarse fuera del seno del carcinoma infiltrante. El área donde más frecuentemente se encuentra ILV incluye 0,1 cm del margen del carcinoma.

- Los émbolos tumorales no se adaptan exactamente al contorno del espacio

linfo-vascular en que se encuentran. Por contra, el carcinoma infiltrante con artefacto de retracción que simula ILV reproducirá exactamente el contorno del espacio linfo-vascular.

- Los núcleos de las células endoteliales deben observarse en la línea que limita el espacio vascular. Los linfáticos se encuentran en la proximidad de los vasos sanguíneos (Lester et al. 2009).

En los pacientes sin afectación ganglionar axilar, ILV es un predictor de mal pronóstico, se asocia a recurrencia precoz y metástasis a distancia (Mirza et al. 2002).

5.4.- Biomarcadores.

Como habíamos definido previamente, un biomarcador, es un parámetro que se mide en los tejidos, células o fluidos, y que puede ser evaluado objetivamente. Es indicador de un proceso biológico normal o patológico, o bien de una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica específica.

Podemos distinguir así, entre biomarcadores pronósticos y predictivos. Los biomarcadores pronósticos son aquellos que nos dan información sobre una consecuencia global (recaída, muerte, supervivencia...) del cáncer en ausencia de tratamiento. Un biomarcador predictivo nos da información sobre el efecto de una intervención terapéutica en un paciente (Oldenhuis et al. 2008).

5.4.1.- Estado de expresión de receptores hormonales.

Las hormonas esteroideas, en particular los estrógenos y la progesterona, tienen un papel importante en el desarrollo y crecimiento de la glándula mamaria. Los estrógenos y la progesterona se reconocen como factores de crecimiento en un porcentaje elevado de cánceres de mama (Badve et al. 2009).

Actualmente conocemos dos isoformas del receptor de estrógeno. El receptor de estrógeno α , es un receptor nuclear, diana terapéutica de los moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERMS) y de los reguladores negativos del receptor de estrógeno (ERD). El descubrimiento de la isoforma B del receptor de estrógeno ha llevado a revisar el conocimiento anterior sobre el receptor nuclear de estrógenos. (Rosa et al. 2008)

Al igual que la isoforma α , la isoforma B es un factor de transcripción nuclear inducido por ligando que modula la expresión de genes diana. Las 2 isoformas tienen un dominio de fijación de hormonas con una homología del 50%. Por contra, el dominio de activación hormono-independiente muestra una pérdida de homología en la secuencia lo que sugeriría que ambas realizarían funciones distintas en la célula. La afinidad de la isoforma B por el ligando (estrógeno) es similar a la de su homóloga. Pero unida a un antiestrógeno, la isoforma b, puede activar la transcripción génica a través de una vía no clásica de activación, a través de la fijación de la proteína 1 activadora de factor de transcripción. Se ha postulado que esta vía no clásica se implicaría en la progresión del cáncer de mama y en el desarrollo de resistencia a terapia antiestrogénica (Rosa et al. 2008).

El estado de expresión de los receptores de estrógenos y progesterona ha sido ampliamente estudiado como factor pronóstico y predictivo de respuesta al tratamiento hormonal en cáncer de mama.

El cáncer de mama es un tumor hormonodependiente, sobre todo en la mujer postmenopáusica, ya que la incidencia de tumores con expresión de receptores hormonales es alta y mayor entre estas mujeres que en las

premenopausicas. Los tumores de bajo grado o bien diferenciados suelen expresar receptores hormonales, mientras que en los de alto grado estos receptores son, por lo general, negativos (Simpson et al. 2005).

Este hecho se relaciona con la supervivencia, pues se ha comprobado que esta es mayor, de forma global y tras recurrencia tumoral, en el grupo de mujeres con receptores estrogénicos positivos (Anderson et al. 2001).

En el protocolo NSABP B-06 que comparaba en términos de supervivencia diversos tratamientos locales (mastectomía radical frente a tumorectomía frente a tumorectomía más radioterapia) se comunican resultados de supervivencia en función del estado de expresión de receptores hormonales en el tumor. La supervivencia libre de enfermedad a 5 años fue del 66% para el grupo con ausencia de expresión de receptores de estrógeno y del 74% para el grupo con expresión de receptores de estrógenos. La supervivencia global a 5 años fue del 82% y del 92% respectivamente. A pesar de que la diferencia alcanzó la significación estadística, para los investigadores la relevancia clínica (pronóstica) es escasa (Fisher et al. 1988).

La expresión de receptores de estrógenos representa un excelente factor predictivo de respuesta al tratamiento. Su presencia permite discriminar aquellas pacientes que se pueden beneficiar del tratamiento hormonal, del mismo modo que la negatividad de uno de ellos (progesterona o estrógenos), se asocia a una probabilidad reducida de respuesta a la hormonoterapia (Schnitt et al. 2006).

El grupo cooperativo EBCTCG (Early Breast Cancer Trialist's Collaborative Group) realizó una revisión sistemática y posterior metaanálisis para analizar la eficacia en términos de recurrencias y mortalidad a 5 años de la terapia

hormonal frente a placebo. Analizaron los datos relativos a 37000 mujeres y las conclusiones principales del trabajo fueron:

- Las mujeres con tumores que no expresaban receptores estrogénicos no se benefician del tratamiento hormonal.
- Se comunica un descenso del 47% del riesgo de sufrir cáncer de mama contralateral.
- En mujeres con receptores de estrógenos positivos, se produjeron un 47% de recurrencias o muertes en el grupo tratado con placebo frente al 26% en el grupo tratado con Tamoxifeno.
- La reducción absoluta del riesgo de recurrencia y muerte en mujeres con ganglios negativos fue del 5,6%.
- La reducción absoluta del riesgo de recurrencia y muerte en mujeres con ganglios positivos fue del 10,9%.

Los datos de este metaanálisis han sido actualizados posteriormente, en dos ocasiones, confirmándose con un seguimiento de 15 años los datos comunicados inicialmente (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group 1998, Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group 2005, Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group 2012).

Fisher y cols comunicaron en 2004, los resultados a largo plazo, más de 10 años de seguimiento de dos ensayo clínicos del grupo NSABP. En el protocolo B-14 se comparaba en términos de supervivencia la utilización de Tamoxifeno frente a placebo en el tratamiento adyuvante de mujeres con cáncer de mama, ganglios negativos y receptores hormonales positivos. Se incluyeron 2892 pacientes. Con un seguimiento de 15 años, la supervivencia libre de enfermedad fue del 65% para el grupo que recibió placebo frente al

78% para el grupo que recibió Tamoxifeno ($p < 0,05$). La supervivencia global fue del 65% y del 71% respectivamente. El beneficio tanto en supervivencia libre de enfermedad como en supervivencia global fue independiente del estado de otros factores como la edad, estado climatérico, y cantidad de receptor de estrógenos. En el protocolo B-20, se incluyeron 2363 pacientes con cáncer de mama localizado con características similares al anterior. Se comparaba en términos de supervivencia la administración de Tamoxifeno frente a quimioterapia (tipo CMF x 6 ciclos) y Tamoxifeno. Con un seguimiento de 12 años, la supervivencia libre de enfermedad fue del 79% para el grupo que recibió Tamoxifeno y del 89% para el grupo que recibió quimioterapia y tamoxifeno ($p < 0,05$). La supervivencia global fue del 83% frente al 87% respectivamente ($p=0,06$) (Fisher et al. 2004).

Con respecto a la expresión de los receptores de progesterona, se postula que el gen del receptor de progesterona está regulado por la actividad de los estrógenos y de su receptor. Así la expresión del receptor de progesterona se considera que indica el funcionamiento de la vía del receptor de estrógenos y ayudaría a predecir la respuesta a la terapia hormonal de forma más certera.

El receptor de progesterona puede ser detectado en casos en los que no se detecta expresión de receptores de estrógenos, este hallazgo se considera anómalo y se piensa que puede ser debido a un falso negativo en la determinación del receptor estrogénico, bien por la presencia de una nivel muy bajo de receptores de estrógenos o por la presencia de una variante del receptor de estrógenos no reconocida por el anticuerpo utilizado pero capaz de

estimular la expresión del receptor de progesterona (Schnitt et al. 2006, Payne et al. 2008, Sherman et al. 2007).

Dunnwald y cols llevaron a cabo un trabajo de investigación retrospectivo sobre 155175 mujeres con cáncer de mama. Su objetivo era evaluar la modificación en el riesgo de muerte causa específica según el estado de expresión de receptores de estrógeno y progesterona en diferentes grupos de pacientes (estratificados por características demográficas y clínicas). Se utilizaron 11 registros documentales del "Surveillance, Epidemiology, and End Results program" (SEER). Se incluyeron mujeres diagnosticadas entre 1990 a 2001, con cáncer de mama infiltrante. Se analizaron según el modelo de riesgos proporcionales de Cox las relaciones entre la mortalidad por cáncer de mama y las diversas co-variables consideradas. Tomada como referencia la expresión de receptores de estrógenos (ER+) y de progesterona (PR+), se observaron aumentos del riesgo de muerte en todos los estratos etarios, de 1,2 a 1,5 veces más riesgo para ER+/PR-, de 1,5 a 2,1 veces más en tumores ER-/PR+ y de 2,1 a 2,5 veces más en tumores ER-/PR-. Las diferencias mayores se encontraron al estratificar por grado histológico. Las mujeres con tumores de bajo grado y ER-/PR- tenían de 2,6 a 3,1 veces más riesgo de muerte que las mujeres con tumores ER+/PR+. En el caso de mujeres con tumores de alto grado y ER-/PR- tenían de 2,1 a 2,3 veces más riesgo de muerte que las mujeres con tumores de alto grado y ER+/PR+ (Dunnwald et al. 2007).

5.4.2.- Estado de expresión de Her-2.

El gen receptor-2 del factor de crecimiento epidérmico humano (Her-2) se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 (17q). El gen Her-2 es un proto-oncogén que codifica una glicoproteína transmembrana de 185 kD,

denominada p185 Her-2 con actividad tirosina-kinasa. Forma parte de una familia compuesta por cuatro receptores del factor de crecimiento estrechamente relacionados, que se denominan Her-1, Her-2, Her-3 y Her-4.

Los receptores Her tienen tres dominios. Un dominio extracelular de unión al ligando, un dominio transmembrana y un dominio tirosina-kinasa intracelular. Estos receptores están implicados en la comunicación, interacción celular ó bien célula-estroma. (Mendelsohn et al. 2003)

Una señal extracelular (ligando), da lugar a una respuesta celular en forma de transcripción génica, a través de una serie de señales intermedias que afectan a las vías de RAS/MAP kinasas, PI3K/Akt, JAK kinasa, PLC- γ , que finalmente conducen a proliferación celular o supervivencia o motilidad o adhesión celular.

La activación del receptor requiere la presencia de una ligando, un receptor y un proceso de dimerización del receptor. La formación de dímeros puede ser con receptores similares (homodimerización) o bien con diferentes receptores dentro de su misma familia (heterodimerización). La dimerización conduce a la fosforilación de los residuos tirosina del dominio intracelular del receptor y la transmisión de la señal a través de un proceso enzimático (Mendelsohn et al. 2003).

Se ha demostrado que aproximadamente entre el 20–30% de las pacientes con cáncer de mama son HER2–positivo, y que la concordancia entre la amplificación del gen y la sobreexpresión del receptor en el cáncer de mama es elevada, aproximadamente del 92%. Se ha confirmado además que la presencia de sobreexpresión proteica en ausencia de amplificación génica es

excepcional (3%) (Houston et al. 1999, Gullick et al. 1991, Pauletti et al. 1996).

La determinación de la amplificación génica mediante hibridación in situ fluorescente (FISH) es más sensible que la determinación inmunohistoquímica (IHQ) de la proteína Her-2. La amplificación determinada mediante FISH es una técnica más robusta en la predicción pronóstica que la sobreexpresión determinada mediante inmunohistoquímica (Pauletti et al. 2000).

Otros investigadores han corroborado que existe una gran concordancia y una buena correlación entre la determinación del estado de amplificación de Her-2 determinado por FISH y el estado de expresión de la proteína Her-2 medido por inmunohistoquímica (IHQ), superior al 90% en esta serie (Jacobs et al. 1999).

Di Giovanna y cols analizaron 807 pacientes con cáncer de mama. Estudiaron si existe una relación entre la supervivencia y la sobreexpresión de EGFR, Her-2 y Her-2 fosforilado. El 38% de la pacientes sobreexpresaban Her-2 y de estas 1/3 sobreexpresaban además EGFR. Se demostró correlación entre Her-2 fosforilado y Her-2, aunque la correlación de el receptor fosforilado fue más consistente con EGFR. La expresión de Her-2 fosforilado se correlacionó con pacientes jóvenes, tumores de mayor tamaño, alto grado histológico, ausencia de expresión de receptores hormonales, altos índices de proliferación y de apoptosis (Di Giovanna et al. 2005).

Otros autores han comparado la determinación de la amplificación génica o la sobreexpresión proteica mediante técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los métodos de determinación habitual FISH e inmunohistoquímica respectivamente. Sobre una cohorte de 466 pacientes con

cáncer de mama, se demostró una concordancia del 97,3% entre la determinación inmunohistoquímica y la basada en PCR (Lehmann-Che et al. 2011).

Estudios retrospectivos, han sugerido que los tumores que sobreexpresan Her-2 puede ser menos sensibles al tratamiento con tamoxifeno. Esta resistencia se ha explicado por la existencia de vías de señalización cruzadas entre el receptor de estrógenos y Her-2 y a la presencia de bajos niveles de expresión del receptor de estrógenos cuando Her-2 está sobreexpresado o amplificado. La sobreexpresión de Her-2 se asoció con una menor supervivencia libre de enfermedad en el análisis multivariante (Ponzzone et al. 2006).

Respecto al valor pronóstico de Her-2 en mujeres con cáncer de mama localizado, Hartmann y cols publicaron en 1999 un estudio que correlacionaba el estado de expresión de Her-2 con la supervivencia en una cohorte de pacientes con cáncer de mama y ganglios axilares positivos. Analizaron 354 pacientes con cáncer de mama y afectación axilar que habían recibido tratamiento adyuvante sistémico estandarizado. La determinación del estado de expresión de Her-2 se realizó mediante inmunohistoquímica. Se demostró expresión moderada o intensa en el 22% de las mujeres de la muestra. La mediana de supervivencia libre de enfermedad fue de 2,9 años para los mujeres con expresión intensa de Her-2 comparada con los 7,1 años para el resto de las pacientes ($p=0,01$). La mediana de supervivencia global fue de 5 años para las pacientes con expresión intensa de Her-2 frente a los 12 años para el resto de las pacientes ($p=0,03$). Se confirmó la existencia de correlación

entre el grado de afectación ganglionar, alto grado nuclear y ausencia de expresión del receptor de estrógenos y la probabilidad de tinción intensa de Her-2. En el análisis multivariante, la sobreexpresión de Her-2 no fue factor pronóstico independiente de supervivencia libre de progresión, ni de supervivencia global (Hartmann et al. 1994).

Otra serie retrospectiva con aproximadamente 2000 pacientes, fue comunicada por Ménard y colaboradores. En mujeres con cáncer de mama localizado las mujeres con ganglios positivos, las que sobreexpresaron Her-2 tuvieron peor pronóstico vital que las pacientes cuyos tumores no sobreexpresaron Her-2 ($p < 0,05$). Esta diferencia en supervivencia no se mantuvo en las mujeres con cáncer de mama y ganglios negativos (Ménard et al. 2002).

En mujeres con cáncer de mama y sin afectación ganglionar axilar, algunos autores han demostrado que la amplificación de Her-2 confiere peor pronóstico vital a las pacientes y una mayor probabilidad de recurrencia. El grupo de Press y colaboradores demostraron que la sobreexpresión de Her-2 determinada mediante inmunohistoquímica es un indicador pronóstico independiente de recurrencia (Press et al. 1993).

Andrulis y colaboradores analizaron 580 pacientes con cáncer de mama y ganglios axilares negativos. Se determinó que el 20% de la muestra tenía amplificado el gen Her-2. Estas pacientes tenían un riesgo de recurrencia 2 veces mayor que las mujeres cuyos tumores no tenían amplificado el gen ($p < 0,01$) (Andrulis et al. 1998).

Ross y colaboradores analizaron los resultados de 47 estudios realizados en más de 15,000 pacientes con cáncer de mama. Encontraron que el estado

Her-2 es un factor pronóstico independiente en el 60% de estos estudios y en el 67% de los pacientes (Ross et al. 1998).

Posteriormente, en el año 2003, se añaden más estudios y actualizan el análisis. Incluyen 81 estudios que agruparon 27161 pacientes. Se demuestra que la amplificación del gen Her-2 o la sobreexpresión de la proteína Her-2 son factores pronósticos, tanto en el análisis univariante como en el multivariante, en 73 estudios (90% de los trabajos incluidos) con 25166 pacientes. 13 estudios (16%) confirman en el análisis univariante la relación que existe entre la sobreexpresión de Her-2 o la amplificación y la supervivencia, pero no se mantiene el poder predictor en el análisis multivariante. En 8 estudios (10%) no se encuentra correlación entre el estado de expresión de Her-2 y la supervivencia.

Los autores concluyen que la sobreexpresión de Her-2 es un factor pronóstico negativo en cáncer de mama. Se ha correlacionado con tumores de alto grado, con la presencia de un extenso componente in situ asociado, con tumores aneuploides, con tumores con alta tasa de proliferación, con tumores con ausencia de expresión de receptores de estrógenos, con tumores con p53 mutado (Ross et al. 2003).

Análisis poblacionales y estudios retrospectivos han evaluado el valor predictivo de la determinación de Her-2 en mujeres con cáncer de mama. Se ha confirmado que la quimioterapia adyuvante basada en antraciclinas produjo más beneficio en pacientes con tumores que sobreexpresaban Her-2 que en las pacientes cuyos tumores fueron Her-2 negativo. Aproximadamente la mitad de las pacientes que sobreexpresan Her-2 expresan también receptores de

estrógenos. Se ha comunicado que los niveles de expresión de receptores hormonales en estas pacientes son inferiores a los niveles expresados en las pacientes con Her-2 negativo. Esta es una de las peculiaridades invocadas para explicar la relativa resistencia de los tumores Her-2 positivo y RE positivo al tamoxifeno (Burstein et al. 2005).

La sobreexpresión de Her-2 constituye un factor predictivo de respuesta al tratamiento con trastuzumab (anticuerpo humanizado dirigido contra el receptor de factor de crecimiento epidérmico tipo 2). Baselga y colaboradores demostraron que la administración semanal de trastuzumab a mujeres con cáncer de mama metastásico previamente tratado produjo un 11,6% de respuestas con 37% de pacientes con enfermedad estable (Baselga et al. 1999).

Otros autores demostraron que la combinación de trastuzumab con quimioterapia convencional en mujeres con cáncer de mama metastásico con sobreexpresión de Her-2 mejoraba la actividad antitumoral, la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global frente a quimioterapia convencional (Slamon et al. 2001).

Avalados por los resultados en enfermedad metastásica, se desarrollaron diferentes estudios de adyuvancia, y en mujeres con cáncer de mama no metastásico, con sobreexpresión de Her-2 la combinación de trastuzumab y quimioterapia redujo el riesgo de recaída en un 50% y aumentó la supervivencia global frente a quimioterapia (Piccart-Gebhart et al. 2005, Romond et al. 2005) .

5.4.3.- Expresión de uPA/PAI1 (activador tisular del plasminógeno tipo

uroquinasa/ inhibidor tipo 1 del activador).

Ambas proteínas son serin-proteasas y tienen un papel fundamental en la secuencia proteolítica de modelado y degradación de la matriz extracelular. La unión de uPA con su receptor promueve la conversión del plasminógeno en plasmina. La plasmina es otra serina proteasa de amplio espectro que desintegra varios componentes del tejido conectivo. En el caso de los tumores, es capaz de desintegrar el estroma que rodea las células tumorales. La unidad formada de uPA y su receptor es regulada por PAI 1 que contribuye a la internalización del complejo dentro de la célula para su proteólisis. Se ha confirmado que el correcto funcionamiento del sistema compuesto por uPA, su receptor (uPAR) y PAI 1 es necesario para una proteólisis eficiente de la matriz extracelular, el desarrollo de la angiogénesis, para facilitar adhesión celular, facilitar migración celular y en el caso de los tumores facilitar la invasión tisular y la metastatización. En los tumores sólidos, incluido el cáncer de mama podemos determinar la presencia de uPA, uPAR y PAI 1 en las células tumorales y en las células sanas peritumorales. La determinación de uPA/PAI 1 se realiza en tejido fresco mediante técnica de enzima-inmuno-ensayo (ELISA) (Harbeck et al. 2004).

Estudios retrospectivos demostraron que la determinación de niveles de uPA/PAI 1 tiene valor pronóstico en mujeres con cáncer de mama localizado.

Un análisis combinado que incluyó 8377 pacientes con cáncer de mama localizado confirmó el valor pronóstico de la determinación de uPA/PAI 1. Posteriormente se diseñaron diversos estudios en los que en situación de adyuvancia se administraba quimioterapia a las pacientes en función de la

expresión medida de uPA/PAI 1 (Look et al. 2002).

Los investigadores del ensayo “Chemo N0 trial “ incluyeron mujeres con cáncer de mama sin afectación axilar y tumores entre 1 y 5 cm de diámetro. Se determinó la expresión en las muestras tumorales de uPA/PAI 1. Las mujeres con bajos niveles de expresión no recibieron quimioterapia adyuvante, mientras que las mujeres en los que el nivel de expresión de las proteínas fue alto se distribuyeron de forma aleatoria a recibir tratamiento con 6 ciclos de poliquimioterapia tipo CMF o bien a observación. Con un seguimiento de 10 años, el informe final, confirma el valor pronóstico de uPA/PAI 1 en mujeres con cáncer de mama localizado y la consistencia de esta determinación en la toma de decisiones sobre la administración de quimioterapia según la expresión de este marcador. La supervivencia a 10 años de las pacientes con niveles bajos de uPA/PAI 1 fue de 88,9% frente a 77,5% de las pacientes con niveles altos de uPA/PAI 1 (Jänicke et al. 2001, Harbeck et al. 2009) .

Con un diseño similar, el estudio NNBC3 reclutó 4149 pacientes con cáncer de mama y ganglios axilares negativos. Se incluyeron pacientes con tumores cuyo diámetro midiera entre 0,5 cm y 5 cm. Las pacientes cuyos tumores expresaban bajos niveles de uPA (< 3 ng/mg de proteínas totales)/PAI 1 (< 14 ng/mg de proteínas totales) no recibieron quimioterapia adyuvante, mientras que las pacientes con tumores que expresaron niveles altos de uPA/PAI 1 fueron distribuidas aleatoriamente a recibir 6 ciclos de FEC (ciclofosfamida, epirrubicina, 5-fluorouracilo) o bien 3 ciclos de FEC seguidos de 3 ciclos de docetaxel. El estudio está aún en fase de seguimiento y no se han comunicado resultados de eficacia. La comunicación preliminar confirmó la reproducibilidad

y sencillez del método de determinación de uPA/PAI 1 en las muestras de biopsia obtenidas para el diagnóstico (Kantelhardt et al. 2011).

5.4.4.- Otros biomarcadores pronósticos.

En este apartado analizaremos los datos publicados en la literatura que avalan la determinación de Ki-67, bcl-2 y p53 en muestras de cáncer de mama y su valor pronóstico.

5.4.4.1.- Estado de expresión del antígeno Ki-67 (índice Ki-67).

Ki-67 es una proteína nuclear que se asocia con la proliferación celular. Fue descrita por investigadores de la Universidad de Kiel en torno al año 1980. El gen que codifica esta proteína se encuentra en el brazo largo del cromosoma 10 (10q25). Está organizado en 15 exones y 14 intrones. Se han identificado 2 isoformas de la proteína Ki-67 resultado de diferentes procesos de “splicing” del ARN (Urruticoechea et al. 2005).

Ki-67 es una proteína no histona altamente sensible al tratamiento con proteasas que se expresa en todas las fases del ciclo celular, excepto G0 (Gerdes et al. 1991)

Varios grupos de investigadores han demostrado que la distribución topográfica en la célula de la proteína Ki-67 es ciclo-dependiente. En la fase G1, Ki-67 se localiza fundamentalmente en la región perinucleolar. En fases más tardías del ciclo celular se distribuye por el núcleo celular, predominantemente localizado en la matriz nuclear. En la fase de mitosis, Ki-67 se localiza en todos los cromosomas y aparece en la estructura reticular que rodea los cromosomas en metafase. La expresión del antígeno desciende rápidamente durante la anafase y la telofase.

FACTORES PRONOSTICOS

A diferencia de otras proteínas asociadas al ciclo celular, Ki-67 no se detecta en procesos de reparación del ADN (Schlüter et al. 1993).

Se ha demostrado que esta regulación espacial y temporal de Ki-67 durante el ciclo celular se asocia con procesos de fosforilación específicos de la mitosis. La fosforilación de Ki-67 podría ser suprimida por la activación de los puntos de control del ciclo celular "check-points". Evidencias "in vitro" han confirmado que el complejo ciclina B/cdc2 son necesarias para fosforilar la proteína Ki-67. La actividad de Ki-67 se ha relacionado con 2 eventos cruciales del ciclo celular como son la ruptura y reorganización posterior del núcleo celular durante la mitosis (Scholzen et al. 2000, Endl et al. 2000) .

La vida media de la proteína es de 60-90 minutos. Las diferencias en la expresión durante el ciclo no parecen deberse a un acúmulo de proteína no degradada, sino que reflejan la síntesis proteica ("proteína de novo") (Urruticoechea et al. 2005).

El anticuerpo anti Ki-67 fue introducido en la clínica por Gerdes y colaboradores. En los ensayos iniciales se precisaba tejido fresco no parafinado para detectar expresión de Ki-67 debido a la menor posibilidad de tinción causada por la fijación de las muestras.

Posteriormente Cattoreti y colaboradores desarrollaron MIB-1 que es un anticuerpo monoclonal equivalente al anti-Ki-67 con la particularidad que puede aplicarse a muestras parafinadas (Gerdes et al. 1983, Gerdes et al. 1987, Cattoretti et al. 1992) .

Desde entonces varios anticuerpos como MIB-1, MIB-2, MIB-3, Ki-S5 y SP-6 se han testado en muestras parafinadas tras la recuperación antigénica.

Se ha determinado que los epítomos de los anticuerpos MIB-1, MIB-3 y anti

Ki-67 se localizan en una misma franja de 20 aminoácidos dentro de la proteína Ki-67. Esta secuencia aminoacídica es una parte ampliamente conservada de la proteína. Se demostró que MIB-1 reconoce epítomos diferentes a los que son reconocidos por el anticuerpo anti-Ki-67 original (Kubbutat et al. 1994).

En general los sistemas de medida se basan en el porcentaje de células tumorales teñidas con el anticuerpo. El patólogo examina la sección teñida con un microscopio óptico y una lente estandar de 40 aumentos, utilizando una cuadrícula de 10 x 10 y la puntuación Ki-67 se define por el % de células tumorales teñidas frente al número de células tumorales totales. Esto supone el recuento de al menos 1000 células tumorales con tinción nuclear en 10 campos de gran aumento (Yerushalmi et al. 2010).

Los trabajos iniciales en cáncer de mama nos confirmaron que el número medio de células teñidas con el anticuerpo anti Ki-67 fue del 3% en el caso de las lesiones benignas de la mama (0,01-10%). En el caso de los carcinoma de mama, el número medio de células teñidas fue del 9% en los tumores de grado 1 (0,5-35%), 15% en el caso de los de grado 2 (1-58%) y del 26% (3-60%) en el caso de los tumores de grado 3. Las diferencias de las medias observadas fueron estadísticamente significativas $p < 0,001$ (Gerdes et al. 1986).

El sistema de gradación histológica de Nottingham combina grado nuclear, formación de túbulos y tasa mitótica. Ambos, índice Ki-67 e índice mitótico son marcadores de proliferación celular. La medida del contaje de mitosis puede modificarse por factores preanalíticos como la fijación; esta eventualidad puede superarse mediante la fijación óptima de la muestra.

Diversos estudios han mostrado buena correlación entre el grado histológico y el marcador de proliferación (Marrelli et al. 2006, Neri et al. 2007, Jalava et al. 2006, Spyrtos et al. 2002).

La determinación de la expresión de Ki-67 en las células tumorales (índice Ki-67) podría considerarse una alternativa a la determinación del índice mitótico del sistema de gradación de Nottingham para la evaluación de la fracción proliferante del tumor (Trihia et al. 2003, Sasano et al. 2010).

El valor pronóstico de la expresión de Ki-67 en las células del cáncer de mama en términos de supervivencia libre de recaída y de supervivencia global ha sido acreditado en múltiples estudios y al menos 3 revisiones sistemáticas y metaanálisis posterior.

En el año 2005, Colozza y colaboradores publican una revisión sistemática de la literatura a través de la base de datos Medline bajo las siguientes condiciones de búsqueda “ BC proliferative prognostic markers” , “ BC proliferative predictive markers” y cada uno de los siguientes items “ thymidine labeling index, S phase fraction/flow cytometry, Ki 67, Thymidine kinase, cyclins E, cyclin D, cyclin inhibitors p27 and p21, and topoisomerase IIa. Se seleccionaron los trabajos escritos en inglés en revistas con doble revisión publicados hasta Junio de 2004 que incluyeran al menos 100 pacientes evaluables y en los cuales el valor pronóstico y el valor predictivo de cada marcador fuese analizado mediante análisis multivariante. Con respecto a Ki-67 y su estado de expresión (índice Ki-67) se identificaron 15 estudios, que incluyeron un total de 5137 pacientes. La determinación de Ki-67 en todos los estudios se realizó mediante inmunohistoquímica en muestra parafinada. Todos los estudios realizaron análisis multivariante y en todos ellos el índice Ki-67

mantuvo su valor pronóstico independiente. Los problemas observados en este análisis hacen referencia a la diversidad de anticuerpos utilizados para determinar el índice Ki-67, a la ausencia de punto de corte establecido como óptimo para definir un índice de proliferación alto, la ausencia de un número de células necesarias en el recuento para determinar el índice de proliferación y en definitiva la ausencia de un método estandarizado y reconocido internacionalmente para la exposición antigénica, el procedimiento de tinción y el procedimiento de puntuación en el análisis (Colozza et al. 2005).

El mismo grupo en 2007 actualiza la revisión sistemática incluyendo estudios que evaluaron la relación entre la expresión de Ki-67/Mib-1 y el pronóstico en cáncer de mama precoz publicados hasta el año 2006.

Se identificaron 68 estudios entre los años 1989 al 2006, se consideraron incluibles para el metaanálisis 46 de ellos. Se utilizaron diferentes anticuerpos para la determinación del índice Ki-67. Se definieron diferentes puntos de corte para la consideración de alto índice Ki-67 (3,5-34%). En algunos casos el valor fue la media o mediana de un conjunto previo de determinaciones del índice, en otros casos fue un valor arbitrario establecido por los autores.

El presente metaanálisis confirma que la expresión “alta” de ki-67 en pacientes con cáncer de mama precoz confiere un peor pronóstico en términos de supervivencia global y libre de enfermedad, razón de riesgo de 1,95 (IC 95% 1,7-2,24) y 1,93 (IC 95% 1,74-2,14) respectivamente.

El valor pronóstico independiente se mantuvo tanto en mujeres con metástasis ganglionares axilares como en aquellas que no las presentaban (de Azambuja et al. 2007).

Stuart-Harris y cols realizan una revisión sistemática de la literatura con el criterio de búsqueda, factores de proliferación y su relación con la supervivencia en cáncer de mama precoz y posterior metaanálisis de los datos publicados. Identifican 85 estudios que incluyen 32825 pacientes con cáncer de mama precoz en las que se había realizado determinación de algún factor de proliferación celular.

Con respecto a ki-67, se identifican un total de 43 publicaciones que incluían 15790 pacientes. En términos de supervivencia global, 24 estudios realizaron análisis multivariante. La sobreexpresión de Ki-67 resultó en peor supervivencia en 11 de 24 estudios. La estimación global de la razón de riesgo fue de 1.73 (1.37-2.17). Hubo evidencia significativa de heterogeneidad y sesgo de publicación. Tras la inclusión de estudios “perdidos” la razón de riesgo fue de 1.42 (1.14-1.77). En cuanto a la supervivencia libre de enfermedad, 22 estudios realizaron análisis multivariante de factores pronósticos. Los tumores con un índice Ki-67 alto tuvieron peor supervivencia libre de enfermedad en 15 de 22 estudios. La razón de riesgo estimada fue de 1,84 (IC 95% 1,62-2,1) (Stuart-Harris et al. 2008).

Investigaciones más recientes han corroborado el valor pronóstico negativo de la sobreexpresión de Ki-67 en términos de supervivencia cáncer específica y supervivencia libre de metástasis. Es conveniente señalar que índices Ki-67 altos (>15% en este estudio) fueron discriminantes de supervivencia en pacientes con tumores con grado histológico moderadamente diferenciado (Aleskandarany et al. 2010).

Viale y cols comunican los resultados de un trabajo diseñado para evaluar el valor pronóstico de la expresión del antígeno Ki-67 medida por

inmunohistoquímica en pacientes con cáncer de mama precoz que recibieron tratamiento sistémico adyuvante.

Se analizaron 758 pacientes incluidas en el estudio IBSG VIII y 1166 pacientes de las pacientes incluidas en el estudio IBSG IX.

Los resultados del estudio indican que la expresión de Ki-67 no predice que pacientes se benefician de añadir quimioterapia al tratamiento hormonal. No obstante, la sobreexpresión de Ki-67 se asoció con una peor supervivencia libre de progresión en todos los grupos de tratamiento. La asociación entre supervivencia libre de progresión y el tipo de tratamiento es independiente del valor de Ki-67.

En este estudio la determinación de Ki-67 fue factor pronóstico pero no predictivo. La limitación de este análisis es que incluye exclusivamente pacientes con ganglios negativos y los resultados en él encontrados pueden ser diferentes en otras poblaciones de pacientes (Viale et al. 2008).

El análisis de factores pronósticos de las pacientes incluidas en el estudio BCIRG 001 indican que la sobreexpresión de Ki-67 > 30% podría ser predictor de beneficio para el tratamiento con taxanos (Dumontet et al. 2010).

Los estudios comunicados de Ki-67 utilizan diferentes medios de cuantificación de la expresión de Ki-67, lo que hace difícil la comparación de los resultados.

Un análisis certero y útil de Ki-67 dependerá de la robustez, reproducibilidad y métodos de puntuación válidos confirmados en grandes estudios. Los datos de los estudios sugieren que niveles de expresión superiores a 10-14% definen un grupo de pacientes de alto riesgo en términos de pronóstico. El consenso de Sant Gallen 2009 ha recomendado el uso de marcadores de proliferación como Ki-67 para seleccionar el tratamiento óptimo en cáncer de mama precoz

(Spyratos et al.2002, Marrelli et al.2006, Cheang et al.2009, Yerushalmi et al. 2010).

5.4.4.2. Estado de expresión de la proteína bcl-2.

En 1972 Kerr y cols describieron que las células muertas de forma programada, con independencia del tejido ó ambiente celular en el que se desarrollan, siguen un patrón reproducible al cual denominaron apoptosis.

En la década de 1980 Horvitz y cols identificaron genes específicos de muerte ("cell death genes" ced) que controlaban la muerte celular programada en el nematodo *C. elegans*. La identificación de los genes en el nematodo permitió la rápida identificación de sus homólogos en mamíferos. (Cory S et al 2003)

Las investigaciones realizadas en la década de 1990 permitieron la identificación de diferentes familias de proteínas que controlan la muerte celular en mamíferos: receptores extracelulares, ligandos, caspasas, citocromo C, Apaf-1, proteínas de la familia bcl-2. (Mirkes 2002)

Se han identificado 2 circuitos principales de apoptosis, el mediado por receptor (o vía extrínseca) y la vía mitocondrial (o vía intrínseca). (Patel et al. 2009)

La vía mitocondrial de la apoptosis puede ser activada por una amplia serie de estímulos. La activación supone la liberación del citocromo C desde la mitocondria al citoplasma. El citocromo C entonces facilita la activación de la caspasa 9 y de la caspasa 3. La activación de estas caspasas resulta en la ruptura de una amplia variedad de proteínas celulares que permiten la desmantelación ordenada de la célula afectada (Mirkes 2002, Adams JM et al

2007, Patel et al. 2009).

El ciclo vital de los tejidos es un balance entre la proliferación celular y la muerte celular. La apoptosis es el mecanismo más importante de muerte celular y su inhibición puede aumentar la supervivencia celular y facilitar el desarrollo de una neoplasia (Hockenbery et al. 1990).

El gen *bcl-2* se localiza en el brazo largo del cromosoma 18. La traslocación 14;18 constituye la traslocación más frecuente en neoplasias linfoides. Se puede encontrar en el 85% de los linfomas foliculares y en el 20% de los linfomas difusos de células B. La consecuencia molecular de la traslocación, es el movimiento del gen *bcl-2* y su colocación en la misma orientación transcripcional que el gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas. La proteína codificada por el gen *bcl-2* tiene homología con la proteína codificada por *Ced-9* del nematodo *C. elegans*. Se localiza en la membrana interna mitocondrial, el retículo endoplásmico, la membrana nuclear y el citoplasma. (Korsmeyer 1999)

La proteína *bcl-2* bloquea la apoptosis. Dentro de la familia de *bcl-2* existen proteínas con funciones opuestas, unas proapoptóticas y otras inhibitorias de la apoptosis. Dentro de las primeras tenemos a *Bax*, *bad*, *bak*, *bcl-xs*. Las segundas incluyen además de *bcl-2*, *bcl-xl*, *mcl-1*, *a1*. Los genes de esta familia son los reguladores centrales de esta vía de muerte celular. (Adams et al. 2007)

Todas estas proteínas exhiben dominios de homología con *bcl-2* (BH) en 4 regiones denominadas BH1, BH2, BH3, BH4 que controlan la dimerización de las proteínas y su función.

FACTORES PRONOSTICOS

Bax es una proteína de 21k-Da que exhibe 3 dominios de homología con bcl-2, BH1-3. Bax puede formar dímeros, con otras proteínas Bax (homodimerización) o con bcl-2 (heterodimerización).

La sobreexpresión de Bax en las células, activa la muerte celular apoptótica. Cuando bcl-2 se sobreexpresa, se heterodimeriza con bax y la apoptosis se reprime. La relación Bax-bcl-2 determina la susceptibilidad celular a la apoptosis. (Korsmeyer 1999, Cory et al. 2003)

Proteínas antiapoptóticas de la familia de bcl-2 incluyen BCL-XL, MCL-1, A1. Se han identificado como proapoptóticas además de Bax, Bcl-XS, BAK.

Se han confirmado que los dominios de homología con bcl-2 (BH1-BH3) participan en la formación de los dímeros de las diversas proteínas así como el regulación de la apoptosis. BH1 y BH2 se han demostrado implicados en la dimerización con Bax mientras BH3 es esencial para la función de las proteínas proapoptóticas. (Korsmeyer 1999, Cory et al. 2003)

Se han descrito una serie de proteínas proapoptóticas cuya característica fundamental es la de poseer un único dominio BH, BH3. Pertenecen a estas BIK, BID, BAD, BIM, HRK, BLK. (Korsmeyer 1999)

La activación de Bax produce disfunción mitocondrial y apoptosis. Bax induce la muerte celular activada por caspasas, sabemos además que aunque los inhibidores de las caspasas pueden bloquear la muerte celular mediada por la vía extrínseca, no bloquean la muerte inducida por Bax. Bax se sitúa tanto en el citosol como en la membrana mitocondrial. En la traslocación de Bax a la mitocondria se producen estímulos fisiológicos de muerte celular. Bax-bcl-2 se consideran puntos de control del proceso de apoptosis por encima de caspasas y disfunción mitocondrial (Korsmeyer 1999).

FACTORES PRONOSTICOS

Las proteínas de la familia bcl-2 se sitúan en la membrana externa de la mitocondria formando homo ó heterodímero. Las formas dimerizadas constituyen canales iónicos en la membrana mitocondrial. Las proteínas inhibidoras de apoptosis actúan uniéndose directamente a APAF-1 o inhibiendo la salida del citocromo C y otros contenidos mitocondriales, es decir forman canales que permiten la homeostasis electroquímica de la mitocondria.

Las proteínas proapoptóticas interfieren en la formación de los canales, alteran el potencial de membrana mitocondrial que permite la salida al citosol de proteínas del espacio intermembranas mitocondrial que pueden activar caspasas (Wyllie et al.1999).

Estudios en líneas celulares de cáncer de mama nos han mostrado que la exposición de las células a estrógenos inducen un aumento de expresión de la proteína bcl-2, lo que demuestra que los estrógenos y su receptor tienen un papel regulador de la vía de apoptosis. Los estrógenos además pueden promover la resistencia a quimioterapia de células de cáncer de mama estrógeno dependiente a través de un mecanismo de regulación de la expresión de bcl-2 (Wang et al. 1995, Teixeira et al. 1995).

La transcripción de bcl-2 puede ser regulada de forma negativa por p53, este hecho contribuiría a facilitar el proceso apoptótico (Miyashita et al. 1994).

La proteína p53 nativa inhibe la función de bcl-2 por activación de la expresión de bax. La presencia de p53 mutada puede asociarse con la pérdida de bcl-2 y un sinergismo que aumentaría la proliferación celular (Rolland et al. 2007).

El valor pronóstico de bcl-2 en mujeres con cáncer de mama, ha sido investigado intensamente. Diversos autores han confirmado la asociación

directa entre el estado de expresión de receptores hormonales (RE y RP) y la expresión de bcl-2. También se confirmó en múltiples trabajos la asociación inversa entre la expresión de bcl-2, la expresión de p53, la expresión de Ki-67 y el grado histológico (Hellemans et al. 1995, Charpin et al. 1998).

Gasparini y cols analizaron la expresión de bcl-2 en pacientes con cáncer de mama y ganglios axilares positivos tratadas con quimioterapia u hormonoterapia. Incluyeron en su estudio 180 mujeres. La ausencia de expresión de bcl-2 se asoció con una peor supervivencia libre de progresión en la cohorte de mujeres tratadas con Tamoxifeno. En la cohorte de mujeres tratadas con quimioterapia, la ausencia de expresión de bcl-2 se relacionó con peor supervivencia global pero no con peor supervivencia libre de progresión (Gasparini et al. 1995).

En una población similar, pacientes con ganglios positivos, Zhang y colaboradores sobre una cohorte de 228 mujeres encuentran que bcl-2 fue factor pronóstico independiente para supervivencia global (Zhang et al. 1997)

Investigadores británicos y canadienses han estudiado el valor de bcl-2 como factor pronóstico de supervivencia global o de supervivencia libre de progresión en mujeres con cáncer de mama. Incluyeron 930 pacientes, en las que estudiaron 13 biomarcadores, receptores hormonales, marcadores de proliferación, reguladores de ciclo celular y de apoptosis, Her-2 y citoqueratinas. Ocho marcadores (ER, PR, bcl-2, ciclina E, p53, Mib-1, citoqueratina 5/6 y Her-2 mostraron una asociación significativa con la supervivencia a 10 años en el análisis univariante. En el análisis multivariante que incluyó estos 8 biomarcadores y el índice pronóstico de Nottingham (NPI),

únicamente el NPI, ER y bcl-2 obtuvieron la significación estadística. Como demostraron otros autores hubo una fuerte asociación entre algunos de los biomarcadores y tamaño y grado tumoral de las muestras. El aumento del grado tumoral se correlacionó de forma inversa con la expresión de ER, PR y bcl-2. Se correlacionó de forma positiva con MIB-1, mdm-2, ciclina E y p53.

Cuatro marcadores se asociaron con el aumento de tamaño tumoral y fueron: Mib-1, mdm-2, ciclina E y p53. Los tumores más pequeños se asociaron con expresión de ER, bcl-2, PR y Ck 8/18. De los 13 marcadores, exclusivamente mdm-2 y her-2 se asociaron significativamente con estado ganglionar positivo. No se demostró asociación entre la expresión de bcl-2 y ER (Callagy et al 2006).

Este mismo grupo realiza un meta-análisis que estudia la asociación entre la expresión de bcl-2 y supervivencia libre de progresión y supervivencia global en cáncer de mama.

Se identificaron trabajos publicados entre 1994 y 2006 e indexados en la base de datos "PubMed". Se incluyeron estudios que investigaran el papel de la expresión de bcl-2 en términos pronósticos en cáncer de mama y con un tamaño muestral superior a 100 casos. Se analizaron 17 estudios que agrupaban 5892 pacientes.

Los "kits" de determinación de bcl-2 fueron de Dako (clone 124), Novacastra o Dakopatts. La tinción citoplasmática fue evaluada mediante un sistema dicotómico de puntuación en todos los estudios con un punto de corte para diferenciar la positividad entre 10 y 40% de células teñidas.

Ocho estudios investigaron supervivencia libre de progresión no ajustada por otras variables. Sobre 2285 casos el riesgo relativo fue de 0,85-3,03 con una

estimación del efecto global mediante el modelo de efecto aleatorio de 1,66 (1,25-2,22). El efecto de Bcl-2 en supervivencia libre de progresión ajustada por otros factores pronósticos se comunicó en 11 estudios y el efecto global estimado fue de 1,58 (1,24-1,94). La supervivencia global se investigó sin ajuste por otras variables en 8 estudios 3910 casos. Los riesgos estimados en los estudios fueron 0,99-4,31, la estimación global fue de 1,64 (1,36-2,0). La supervivencia global ajustada por otras variables se evaluó en 9 estudios, 3624 pacientes y la estimación global fue de 1,37 (1,19-1,58).

El metaanálisis confirma de forma consistente el valor pronóstico de la expresión de bcl-2 medida por inmunohistoquímica en cáncer de mama y muestra que este efecto es independiente del estado ganglionar, tamaño tumoral y grado tumoral así como de otras variables biológicas analizadas en el estudio multivariante (Callagy et al.2008).

Recientemente y confirmando estos resultados, se ha publicado un análisis sobre 11212 mujeres con cáncer de mama precoz. Se analizaron además de los factores pronósticos histológicos, la expresión de receptores hormonales, her-2 y bcl-2.

La sobreexpresión de bcl-2 se confirmó como factor pronóstico independiente de supervivencia global, con una razón de riesgo de 0,76 (IC 95 0,66-0,88). El valor de bcl-2 se mantiene a lo largo del tiempo y no se modificó por el tratamiento adyuvante recibido por las pacientes (Dawson et al. 2010).

5.4.4.3.- Estado de expresión de la proteína p53.

La fosfoproteína p53, producto del gen TP53, se identificó en la década de 1970. Es una proteína reguladora del ciclo celular y desempeña un papel clave en la respuesta celular a diversas condiciones de estrés.

FACTORES PRONOSTICOS

Tras el estímulo de estrés, la proteína p53 se activa y detiene la progresión del ciclo celular para facilitar la reparación de los daños en el DNA o si los daños son severos e irreparables inducir la apoptosis de la célula. La función de p53, y otras proteínas de su misma familia p63 y p73, permite mantener la estabilidad genómica e impide el acúmulo de mutaciones en células progenitoras.

La proteína p53 es un factor de transcripción que regula la expresión de una multitud de genes implicados en el ciclo celular, la reparación del DNA, el metabolismo celular y la apoptosis. (Wesierska-Gadek et al. 2009)

En condiciones fisiológicas, la concentración de p53 es baja y se regula de forma negativa por la acción de mdm2 (mouse double minute-2 o hdm2 en humanos). La proteína mdm2 inactiva a p53 a través de dos mecanismos. De una parte reprime su actividad transcripcional uniéndose al dominio de transactivación de p53, por otra reduce la concentración celular de la proteína facilitando su degradación en el proteasoma. (Oren 2003)

La proteína p53 se localiza en el núcleo durante la fase G1, en el citoplasma durante G2 y S.

La proteína p53 nativa se une a elementos específicos de respuesta (p53RE) situados en sus genes diana. Normalmente los genes dependientes de p53 contienen dos p53RE.

El hecho de que la transactivación selectiva del promotor por parte de p53 tenga diferentes efectos en la célula y que no todas las dianas transcripcionales respondan de la misma manera significa que existen niveles adicionales de regulación de la función de p53 (Wesierska-Gadek et al. 2009).

El gen TP53 tiene 20 kilobases de longitud, posee 11 exones y se localiza en el

brazo corto del cromosoma 17 (17p). La proteína p53, tiene 393 aminoácidos con un peso molecular de 53 kDa. Se reconocen 3 regiones ó dominios, la región amino-terminal tiene un papel primordial en la activación de la transcripción. La región o dominio central implicada en fijación de la proteína al DNA. El extremo carboxi-terminal contiene lugares específicos de reconocimiento del daño al DNA y lugares específicos implicados en la oligomerización de la proteína. p53 actúa de forma más eficiente cuando se dispone en tetrámeros (Phillips et al. 1999).

Las mutaciones en el gen p53 se han descrito en la mayoría de los cánceres humanos, con una prevalencia entre 5-50% en función del tipo tumoral. Estas mutaciones dan como resultado la pérdida de las funciones de la proteína p53. La mayoría de las mutaciones son mutaciones erróneas (“missense”), que producen proteínas mutadas. Estas proteínas se acumulan en el núcleo de las células tumorales y pueden ser detectadas mediante inmunohistoquímica.

En p53 se han descrito también mutaciones del tipo de pequeñas inserciones de bases o deleciones que producirán proteínas truncadas que no se detectarían por inmunohistoquímica (Olivier et al. 2011, Lim et al. 2009).

Se han descrito 9 isoformas de p53 resultado de diversos procesos de “splicing” del RNAm procedentes de los diferentes exones del gen TP53.

La determinación de p53 mediante inmunotinción en secciones tumorales debe ser interpretada con cautela ya que los anticuerpos utilizados en la determinación puede detectar algunas de las isoformas de p53 pero no las identifican específicamente.

Las diferentes isoformas de p53 tiene diferentes localizaciones celulares, por

ello la inmunohistoquímica puede dar diferentes patrones de tinción para p53 en las mismas muestras tumorales (Bourdon et al. 2007).

La inmunohistoquímica, no es un buen marcador para evaluar el estado del gen p53 debido a que produce una tasa significativa de falsos positivos (frecuentemente por determinación de proteína nativa) y de falsos negativos (por la existencia de mutaciones génicas que darían lugar a proteínas truncadas que no se teñirían en la inmunohistoquímica).

Los estudios que han utilizado la secuencia génica para evaluar el estado del gen p53, han obtenido los resultados más consistentes, al menos en cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello y leucemias. La acumulación nuclear de p53 ó la expresión de p53 mutante se asocia con altos índices de proliferación, recurrencias y muertes precoces; en general sería un marcador de peor pronóstico. Aunque en algunos estudios la sobreexpresión de p53 fue factor de buen pronóstico, en mujeres con cáncer de mama operable y ganglios negativos, la consistencia del valor pronóstico de p53 es débil (Olivier et al. 2011, Ziyaie et al. 2000).

Kucera y cols evaluaron si las mutaciones de TP 53, especialmente aquellas que afectan en el dominio L2/L3, añaden información pronóstica en el caso de tumores con ganglios positivos y receptores hormonales positivos. Se analizaron 205 muestras procedentes de otras tantas pacientes. Para la determinación de mutaciones del gen p53, se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa y secuenciación directa del gen. Se comunica la presencia de mutación en p53 en el 20% de las muestras analizadas. De las muestras mutadas, el 38% tenía la mutación en los dominios L2 y L3, el resto de los casos la mutación ocurrió fuera de estos dominios. La mutación de p53

alcanzó la significación estadística para predecir supervivencia libre de progresión en el análisis multivariante, no así en la predicción de la supervivencia global. El análisis de localización de la mutación no demostró diferencias entre las mutaciones ocurridas en L2-L3 y las ocurridas fuera de estos dominios (Kucera et al. 1999).

Otros investigadores analizaron el impacto pronóstico de p53 y su relación con los factores pronósticos clásicos en mujeres con cáncer de mama sin metástasis ganglionares axilares. Se incluyeron 356 mujeres en el estudio. Con un seguimiento mediano de 99 meses, p53 y Her-2 se asociaron significativamente con tumores de alto grado, tumores de gran tamaño, aneuploidía, ausencia de expresión de receptores hormonales, mujeres jóvenes, aumento de la expresión de topoisomerasa II α y aumento de la expresión de Ki-67. La correlación entre p53 y c-erbB2 fue no significativa. El análisis multivariante confirma que los factores de proliferación, expresión de topoisomerasa II α y Ki-67, conservan su valor pronóstico independiente en términos de supervivencia, no sucede lo mismo con p53 y c-erbB2 (Rudolph et al. 1999).

La mayoría de los investigadores han comunicado una peor supervivencia global y peor supervivencia libre de enfermedad en mujeres con cáncer de mama que presentaba mutaciones somáticas del gen p53. Sin embargo, se han comunicado razones de riesgo muy diferentes entre los estudios. El grupo de Pharoah y cols realiza una revisión sistemática y posterior metaanálisis para evaluar la asociación entre la mutación somática del gen p53 y el pronóstico de las pacientes con cáncer de mama. Se identificaron 16 estudios. Se utilizaron diferentes técnicas moleculares para identificar las

mutaciones del gen p53. Once estudios que incluyeron 2319 pacientes evaluaron la supervivencia global de las pacientes. La razón de riesgo fue 2 (IC 95% 1,7-2,5) para las pacientes con p53 mutada frente a las que no presentaba mutación. En el subgrupo de mujeres sin metástasis axilares (736 pacientes), la razón de riesgo fue de 1,7 (IC95% 1,2-2,3) y de 2,6 (IC 95% 1,7-3,9) para las mujeres con ganglios positivos (550 pacientes) y p53 mutado.

La supervivencia libre de progresión fue el objetivo principal en 5 estudios que incluyeron 790 pacientes. La razón de riesgo fue de 1,5 (IC 95% 1,1-1,9). En dos estudios realizados en mujeres con cáncer de mama y sin metástasis ganglionares axilares mostró una razón de riesgo de 1,7 (IC 95% 1,2-2,4).

Varios estudios compararon el valor predictivo de la determinación de la mutación de p53 frente a la determinación de la expresión de la proteína p53. La mayor parte de los estudios analizados mostraron que la determinación de la mutación de p53 tiene mayor valor pronóstico que la determinación de la proteína p53.

Este metaanálisis confirma que las mutaciones somáticas de p53 en pacientes con cáncer de mama confieren un peor pronóstico en términos de supervivencia global y libre de enfermedad y que este efecto es independiente de otros factores (Pharoah et al. 1999).

Bonnefoi et al han confirmado también que la expresión de p53 determinado mediante técnicas moleculares tuvo valor pronóstico en términos de supervivencia global (peor supervivencia), pero no tuvo valor predictivo de beneficio con el uso de taxanos frente a antraciclinas (Bonnefoi et al. 2011).

Como hemos indicado, la técnica inmunohistoquímica tiene menos precisión para evaluar el estado del gen p53, no obstante este hecho no ha sido óbice

para el desarrollo de un importante número de investigaciones clínicas que han tratado de correlacionar la expresión proteica de p53 medida por inmunohistoquímica y la supervivencia de las mujeres con cáncer de mama.

Lockwood y colaboradores evaluaron mediante inmunohistoquímica muestras tumorales de mujeres con cáncer de mama y realizaron las siguientes determinaciones: estado de expresión del receptor de estrógenos, expresión de la proteína p53, expresión de Ki-67. Incluyeron en su análisis 200 pacientes con cáncer de mama y un seguimiento entre 4 y 7 años. En el análisis multivariante, la determinación inmunohistoquímica de p53 no mantuvo el valor pronóstico independiente para supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global (Lockwood et al. 1999).

Resultados diferentes han sido comunicados por otros investigadores. El trabajo realizado por Yamashita demuestra en 506 pacientes con cáncer de mama no metastásico que la sobreexpresión de p53 se asoció con el tamaño tumoral, el grado histológico, la ausencia de expresión de receptores de estrógenos, la sobreexpresión de Her-2 y de Ki-67.

En el análisis univariante la sobreexpresión de p53 se asoció con una reducción de la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global. El análisis multivariante confirmó el valor pronóstico independiente con respecto a la supervivencia global del tamaño tumoral, el número de ganglios metastatizados por la neoplasia en la axila, la sobreexpresión de Her-2 y la sobreexpresión de p53 (Yamashita et al. 2004). Resultados similares a los expuestos han sido publicados por otros grupos (Tsutsui et al. 2003).

Recientemente se han comunicado los resultados de un análisis sobre factores pronósticos en cáncer de mama precoz en pacientes incluidas en el

estudio 9344 del grupo cooperativo CALGB (“Cancer and Leukemia Group B”). Se estudio el papel pronóstico de la determinación inmunohistoquímica de la proteína p53 en las muestras patológicas de 1887 mujeres de las 3121 incluidas en el ensayo clínico.

Se utilizaron dos anticuerpos para la determinación, que fueron DO7 y p1801. El porcentaje de expresión de p53 en la población analizada fue de 27% y 23% respectivamente, la concordancia entre los anticuerpos fue del 92%.

El análisis confirma que la determinación inmunohistoquímica de la expresión de p53 en cáncer de mama con ganglios positivos se asoció con un peor pronóstico en términos de supervivencia global y libre de progresión, pero no fue un predictor de beneficio a la escalada de dosis de doxorrubicina o a la adición de paclitaxel al tratamiento (Lara et al. 2011).

5.4.5.- Recomendaciones actuales sobre la determinación de factores pronósticos.

Diferentes sociedades científicas y conferencias de consenso han analizado y actualizado el conocimiento sobre factores con valor pronóstico en pacientes con cáncer de mama.

La Sociedad Americana de Oncología, ASCO, recomienda añadir al informe patológico, el estado de expresión de los receptores de estrógenos, de los receptores de progesterona y el estado de expresión de Her-2. Estos deben medirse en el tumor primario y en caso de indicarse, en cualquier lesión metastásica.

En lo que concierne a la determinación de marcadores de proliferación, no se recomienda su estudio rutinario mediante citometría de flujo. Como factores

pronósticos, la determinación de Ki-67, ciclina D, ciclina E, p27, p21, topoisomerasa II α no se recomienda de forma rutinaria.

Sobre la determinación de p53, los datos analizados no se consideraron suficientes para recomendar su uso clínico rutinario en cáncer de mama.

La determinación del activador tisular del plasminógeno (tipo urokinasa) y del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (uPA/PAI 1), se puede utilizar como factor pronóstico en mujeres con cáncer de mama y ganglios negativos. Debe medirse mediante ELISA en 300 mg de tejido fresco o congelado. La determinación mediante inmunohistoquímica pierde certeza pronóstica.

No se recomienda tampoco el uso clínico habitual de la determinación de catepsina D (Harris et al. 2007).

La Sociedad Europea de Oncología Médica, ESMO, recomienda aportar información sobre el estado de expresión de receptores de estrógeno y de progesterona, estado de expresión del receptor de Her-2, número y tamaño de los tumores extirpados, número de ganglios axilares aislados, el número de ganglios metastatizados por la neoplasia y la extensión de las metástasis dentro de los ganglios, evaluación de los márgenes de resección, presencia de invasión vascular ó linfática, marcadores de proliferación como Ki-67 (Aebi et al. 2010).

Los participantes en la conferencia de consenso de St Gallen 2011 recomendaron la determinación de la expresión de receptores de estrógenos, progesterona, receptor de Her-2 así como la expresión de Ki-67 para definir subtipos biológicos (Goldhirsch et al. 2011).

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

6. Hipótesis y Objetivos.

6.1.- Hipótesis.

En los últimos años existe un interés creciente en el desarrollo de biomarcadores en cáncer de mama. Este interés viene motivado por dos hechos fundamentales. De un lado los programas de detección precoz de la enfermedad nos han permitido identificar mujeres con tumores con mejor pronóstico desde un punto de vista de los factores clásicos. De otro lado el aumento de las terapias disponibles para aplicar a nuestras pacientes y el mejor conocimiento de los efectos a medio y largo plazo de los tratamientos adyuvantes utilizados.

Las cualidades de los biomarcadores pronósticos deben incluir: consistencia y validez para definir pacientes de alto riesgo de recaída o muerte que se beneficiaran de recibir un tratamiento adyuvante. Su determinación ha de ser sencilla, reproducible y asequible en nuestra práctica habitual.

La determinación de la expresión proteica de diferentes biomarcadores mediante inmunohistoquímica cumple con la mayor parte de estos requisitos. Conocemos que las células tumorales presentan una serie de características fenotípicas que condicionan comportamientos biológicos diferentes y pueden traducirse en diferentes supervivencias en nuestras pacientes.

En este trabajo de investigación se pretende analizar si las diferencias de expresión de tres proteínas; Ki-67 (marcador de proliferación), Bcl-2 (regulador de la apoptosis) y p53 (regulador del ciclo celular) analizadas mediante inmunohistoquímica en las muestras patológicas de mujeres con cáncer de mama localizado se relacionan con diferentes tiempos a la progresión de la enfermedad o diferentes tiempos de supervivencia global causa específica.

Analizaremos además la relevancia de los factores pronósticos clásicos en nuestra muestra.

6.2.- Objetivos.

1.- Analizar la expresión de Ki-67, Bcl-2 y p53 en las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama localizado y tratadas en el Complejo Hospitalario Universitario de Orense entre 1997 y 2004.

2.- Estudiar la asociación entre la expresión de estos biomarcadores con factores pronósticos clásicos (edad, tamaño tumoral, estado ganglionar, grado histológico, expresión de receptores de estrógeno y progesterona, estado de expresión de Her-2) de las pacientes incluidas en nuestro estudio.

3.- Analizar el tiempo a la progresión y la supervivencia causa específica (cáncer de mama) de las pacientes de nuestra muestra.

4.- Analizar la asociación de los diferentes factores pronósticos considerados (edad, tamaño tumoral, estado ganglionar, grado histológico, expresión de receptores de estrógeno y progesterona, estado de expresión de Her-2) con el tiempo a la progresión y la supervivencia causa específica (análisis univariante).

5.- Analizar la asociación de los biomarcadores Ki-67, bcl-2 y p53 con el tiempo a la progresión y la supervivencia causa específica (análisis univariante).

6.- Determinar el valor pronóstico de los biomarcadores y los factores clásicos

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

(edad, tamaño tumoral, estado ganglionar, grado histológico, expresión de receptores de estrógeno y progesterona, estado de expresión de Her-2) en términos de tiempo a la progresión y supervivencia causa específica en nuestra muestra, mediante análisis multivariante. Obtener un marcador de riesgo (“risk score”) con los datos de nuestra muestra.

MATERIAL Y METODOS

7.- Material y Métodos.

7.1.- Pacientes

Se han seleccionado las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama en el Complejo Hospitalario Universitario de Orense entre el 1 de Enero de 1997 y el 31 de Diciembre de 2004. El seguimiento de las pacientes de este estudio finalizó el día 31 de Diciembre de 2009.

Para su inclusión en este estudio se han exigido los siguientes criterios.

7.1.1.- Criterios de inclusión.

- Pacientes con diagnóstico anatomopatológico de cáncer de mama.
- Pacientes sin metástasis al diagnóstico.
- Pacientes en las que se hayan registrado y consten en historia clínica datos relativos a: edad, clasificación por etapas TNM (tamaño tumoral y estado ganglionar) del cáncer de mama, grado histológico, estado de expresión de receptores hormonales, estado de expresión de Her-2.
- Pacientes que presentan datos completos para su seguimiento, fecha de diagnóstico, fecha y causa de muerte (en caso de haberse producido), fecha y lugar de recaída (en caso de haberse producido).

7.1.2. Criterios de exclusión

- Pacientes varones.
- Pacientes con cáncer de mama metastásico al diagnóstico.
- Pacientes con carcinoma in situ de mama.
- Pacientes con patología tumoral previa a excepción de carcinoma in situ de cérvix y carcinoma basocelular.
- Pacientes que no cumplieran los criterios de inclusión.

7.1.3.- Datos registrados.

De las mujeres incluidas en este estudio se recogieron los siguientes datos.

A.- Demográficos.

- 1.- Número de Historia Clínica
- 2.- Fecha de nacimiento
- 3.- Edad al diagnóstico
- 4.- Fecha de diagnóstico histológico

B.- Datos del Tumor.

- 1.- Mama afectada.
- 2.- Uni ó bilateralidad del tumor.
- 3.- Tamaño tumoral
- 4.- Afectación ganglionar regional.
- 5.- Tipo histológico.
- 6.- Grado tumoral.
- 7.- Estado de expresión receptores de estrógeno.
- 8.- Estado de expresión receptores de progesterona.
- 9.- Estado de expresión de Her-2.
- 10.- Estado de expresión de Ki-67.
- 11.- Estado de expresión Bcl-2
- 12.- Estado de expresión p53.

C.- Datos relacionados con el tratamiento.

- 1.- Tipo de cirugía realizada.
- 2.- Disección axilar ó estudio de ganglio centinela.
- 3.- Radioterapia adyuvante ó no.
- 4.- Quimioterapia adyuvante ó no. En caso afirmativo fármacos administrados

5.- Tratamiento hormonal adyuvante ó no. En caso afirmativo fármacos administrados.

D.- Datos de seguimiento.

1.- Estado vital.

2.- Causa de muerte.

3.- Fecha de último contacto. Coincide con la fecha de la muerte o el último contacto viva.

4.- Existencia de recidiva.

5.- En caso de recidiva ,localización de la misma (locorregional, mama contralateral, visceral, ganglionar, ósea).

6.- Fecha de la recaída.

7.2.- Técnicas inmunohistoquímicas (IHQ) realizadas.

La determinación inmunohistoquímica de biomarcadores tiene como ventajas principales la facilidad de su aplicación, el bajo coste y la reproducibilidad de los resultados (Idikio et al.2009).

Las técnicas IHQ se realizaron en el servicio de Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario Universitario de Orense (CHUO).

Las muestras histológicas destinadas al análisis inmunohistoquímico se procesaron según el protocolo que se describe a continuación.

Se realizó la fijación de las mismas en una disolución tamponada de formaldehído al 10% (v/v) durante un tiempo mínimo de 24 horas.

Posteriormente, se tallaron las piezas en fragmentos de 3 mm de grosor y se sometieron a un procedimiento estandarizado de deshidratación en alcoholes de concentración creciente (70°, 96°, 100°), el proceso finaliza con inmersión de los fragmentos en xilol. A continuación las muestras tisulares se introdujeron

en un baño de parafina líquida a 60 °C, posteriormente se dejaron secar hasta su completa solidificación.

- Cortes histológicos.

La selección de los bloques para la realización del marcaje inmunohistoquímico, se realizó a partir de cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina. Los especímenes incluidos en los bloques de parafina se cortaron con un microtomo en secciones seriadas de 3 µm de grosor. Una vez cortados, los cortes se estiraron en agua caliente y se depositaron en portaobjetos.

- Detección inmunohistoquímica de los antígenos.

Primeramente se procedió al desparafinado de los cortes histológicos. Para ello fueron introducidos en dos baños sucesivos de xilol. Se rehidrataron a continuación mediante la inmersión en disoluciones de alcohol etílico de graduación decreciente, 100°, 96° y 70°.

Posteriormente, los cortes se lavaron con agua destilada y se incubaron en presencia de tampón citrato 10mM (pH 6.0) en microondas durante 15 minutos, con la finalidad de desenmascarar los epítomos reconocidos por el anticuerpo primario. A continuación se dejaron enfriar y se lavaron con agua destilada.

La actividad de las enzimas peróxidasas endógenas se inhibió incubando los cortes en una solución de bloqueo comercial (Peroxidasa Block, DAKO EnVision™ + *System Peroxidase* DAB, DAKO Cytomation, USA) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente y para eliminar el marcaje inespecífico se incubaron con suero bovino durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente los cortes se lavaron en agua destilada y en tampón fosfato salino (PBS), previamente a proceder al marcaje inmunohistoquímico.

- Marcaje inmunohistoquímico

Los anticuerpos primarios y secundarios empleados fueron los siguientes:

Anticuerpos primarios.

Monoclonal de ratón anti-Receptor de Estrógenos alfa, clon SP1 . DAKO.

Monoclonal de ratón anti-Receptor de Progesterona, clon PgR 636. DAKO.

C-erb-B2 Oncoprotein. Herceptest. DAKO

Monoclonal de ratón anti Ki-67 humano, clon MIB-1. DAKO.

Monoclonal de ratón anti-bcl-2 oncoproteína, clon 124.DAKO.

Monoclonal de ratón anti-p53, clon DO-7. DAKO

Anticuerpo secundario.

Policlonal de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado con peroxidasa,

listo para usar (Labelled polymer, HRP, anti-mouse, DAKO EnVision™

+System Peroxidase DAB, DAKO Cytomation, USA)

- Evaluación del inmunomarcaje

La valoración de la expresión de los receptores de estrógenos y progesterona se realizó mediante una escala que valora la proporción de células teñidas y la intensidad de la misma. Una puntuación superior a 2 que correspondería según estos criterios con al menos entre 1-10% de células débilmente teñidas, definió la positividad de la expresión de receptores de estrógenos (Harvey et al. 1999).

En las muestras pertenecientes al año 1997 la determinación se realizó fuera de nuestro hospital, en Laboratorios Balagué de Barcelona (España), mediante la técnica de unión al ligando expresándose los resultados en femtomoles de proteína del receptor estrogénico por miligramo de proteína del citosol (fmol/mg). Se definió como positividad ≥ 10 femtomoles/mg.

La valoración de la expresión de Her-2 se interpretó como intensamente positiva (puntuación de 3+), si se confirmaba la tinción completa e intensa en la membrana en más del 10% de células tumorales (Slamon et al. 2001).

La valoración de la expresión de Ki-67 se basa en el porcentaje de células tumorales teñidas en el núcleo por el anticuerpo. Se consideró que la expresión de Ki-67 era baja, si el 10 % o menos de las células en la muestra analizada se encontraban teñidas. En el caso de que la tinción se presentase en más del 10% de las células se calificaba la expresión como alta (Marrelli et al. 2006, Spyrtos et al. 2002).

Con respecto a la tinción con bcl-2, está es citoplasmática y se consideró el caso negativo si el 10% o menos de las células se encontraban teñidas, en caso contrario se etiquetó el caso de positivo (Kymionis et al. 2001).

En lo que concierne a p53, la tinción es nuclear y se aplicó el mismo criterio que el explicado para bcl-2 (Thor et al.1998).

7.3.- Análisis estadístico.

El estudio estadístico se realizó con la colaboración de la Unidad de Apoyo a la Investigación del Complejo Hospitalario Universitario de Ourense (CHUO).

Para el análisis estadístico se han utilizado los programas SPSS 15.0 (SPSS. Inc., Chicago, IL, EEUU) y R v 2.1.4. (R-project, www.R-project.org, library (survival))

Para la estimación de la potencia estadística de nuestro estudio se utilizó el programa Epidat 3.1.

7.3.1.- Análisis de los datos.

a) Datos demográficos.

La edad se ha considerado en el momento del diagnóstico.

b) Datos del tumor.

Se han considerado todos los tipos tumorales diagnosticados.

La clasificación por etapas TN se basa en la versión cuarta de la clasificación TNM (Hermanek et al.1997).

Además de la clasificación referida, los valores de la variable ganglios linfáticos se agruparon del siguiente modo: N0 (ganglios negativos), N+ 1-3 (de uno a 3 ganglios positivos), N+ 4-7 (de 4 a 7 ganglios axilares metastizados por el tumor) y N+ >7 (más de 7 ganglios positivos) (Fisher et al 1983, Fisher et al. 1997, Sivridis et al. 2006).

El grado Histológico se clasificó mediante el sistema de Nottingham (Elston et al 1991, Pinder et al.1995).

Los datos referentes a la inmunohistoquímica ya se han explicado en el apartado anterior.

c) Datos del tratamiento y seguimiento.

El tratamiento recibido por las pacientes se indicó en base a las recomendaciones de práctica habitual en los servicios de Cirugía General (Unidad de Mama), Oncología Radioterápica y Oncología Médica del Complejo Hospitalario Universitario de Orense.

Se calculó el tiempo a la progresión desde la fecha de la cirugía hasta la fecha de la aparición de una recidiva.

La supervivencia causa específica se calculó desde la fecha de la intervención hasta la fecha de la muerte por cáncer de mama.

Se considera que la muerte se debe al cáncer de mama, en mujeres con enfermedad progresiva previamente diagnosticada.

Todos los cálculos se hicieron en días y se transformaron en meses para facilitar la comprensión y la comparabilidad.

Los lugares de recaída se agruparon para su análisis en recaída locorregional (recaídas locales, ganglionares regionales ó cáncer de mama contralateral), visceral (afectación de cualquier otro órgano)

El análisis exploratorio inicial incluye un estudio descriptivo de la población de mujeres con cáncer de mama localizado. Las variables cualitativas se describieron con frecuencias relativas, y las cuantitativas con medidas de tendencia central (media) y de dispersión (desviación típica).

La asociación entre las diferentes variables se analizó mediante el test de Chi-cuadrado (X^2) o mediante estudio de correlaciones no paramétricas, según proceda.

Se estimó el tiempo a la progresión y la supervivencia causa específica mediante el método de Kaplan Meier. Se harán constar medias ó medianas según proceda, e intervalos de confianza de las estimaciones.

Los modelos obtenidos se compararon mediante sus respectivas razones entre los logaritmos de verosimilitud (Atkinson 1980).

El cálculo de la precisión, potencia estadística, se realizó asumiendo análisis de supervivencia en dos poblaciones en función del valor de Ki-67 (índice Ki-67 alto frente a índice Ki-67 bajo), p53 (p53 positivo frente a p53 negativo) y Bcl-2 (bcl-2 positivo frente a bcl-2 negativo).

El estudio del valor pronóstico de las diversas co-variables se realizó mediante el modelo de Riesgos Proporcionales descrito por Cox (Cox 1972, Thernau et al. 2000, García Pérez 2005).

MATERIAL Y METODOS

Hemos incluido todas las variables en el modelo, independientemente de su significación en el análisis univariante. Elegimos el método de inclusión manual de las variables en el modelo. Se consideró que los resultados eran significativos siempre que se obtuvieran valores de $p < 0,05$ (Altman et al. 1998, Royston et al. 2009).

RESULTADOS

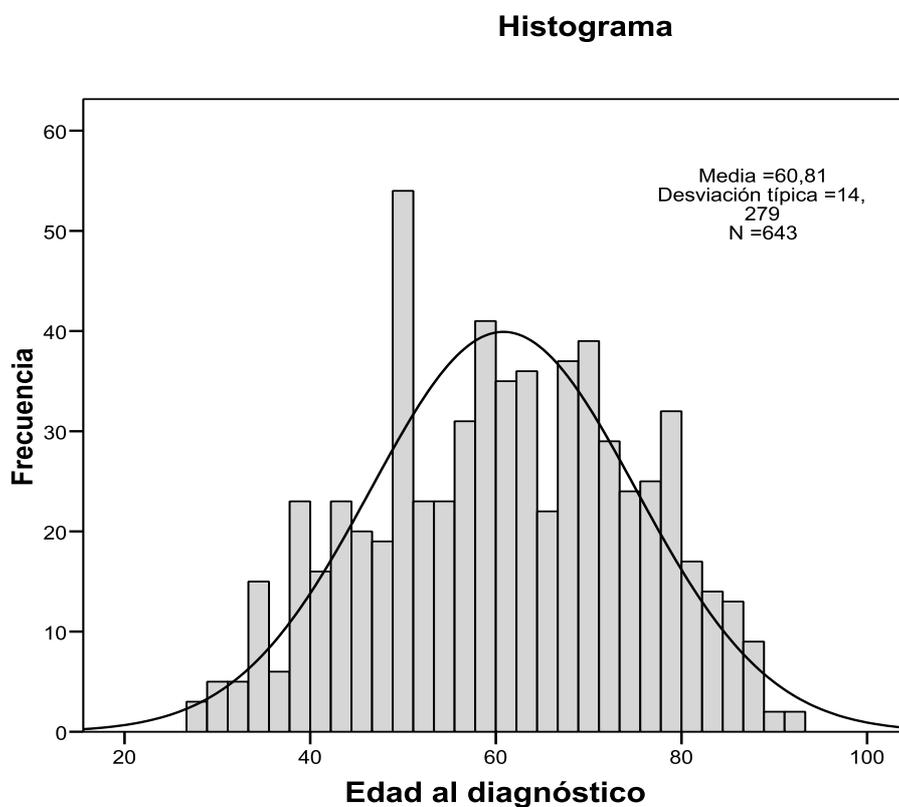
8.- Resultados.

8.1.- Análisis exploratorio. Estadística descriptiva.

Analizados los registros hospitalarios de pacientes con cáncer de mama en el Complejo Hospitalario Universitario de Orense entre el 1 de Enero de 1997 y el 31 de Diciembre de 2004, las pacientes que cumplían los criterios de inclusión y no tenían criterios de exclusión (casos de cáncer de mama en varones, pacientes con cáncer de mama “in situ”, pacientes con cáncer de mama metastásico) fueron 643.

8.1.1.- Datos demográficos

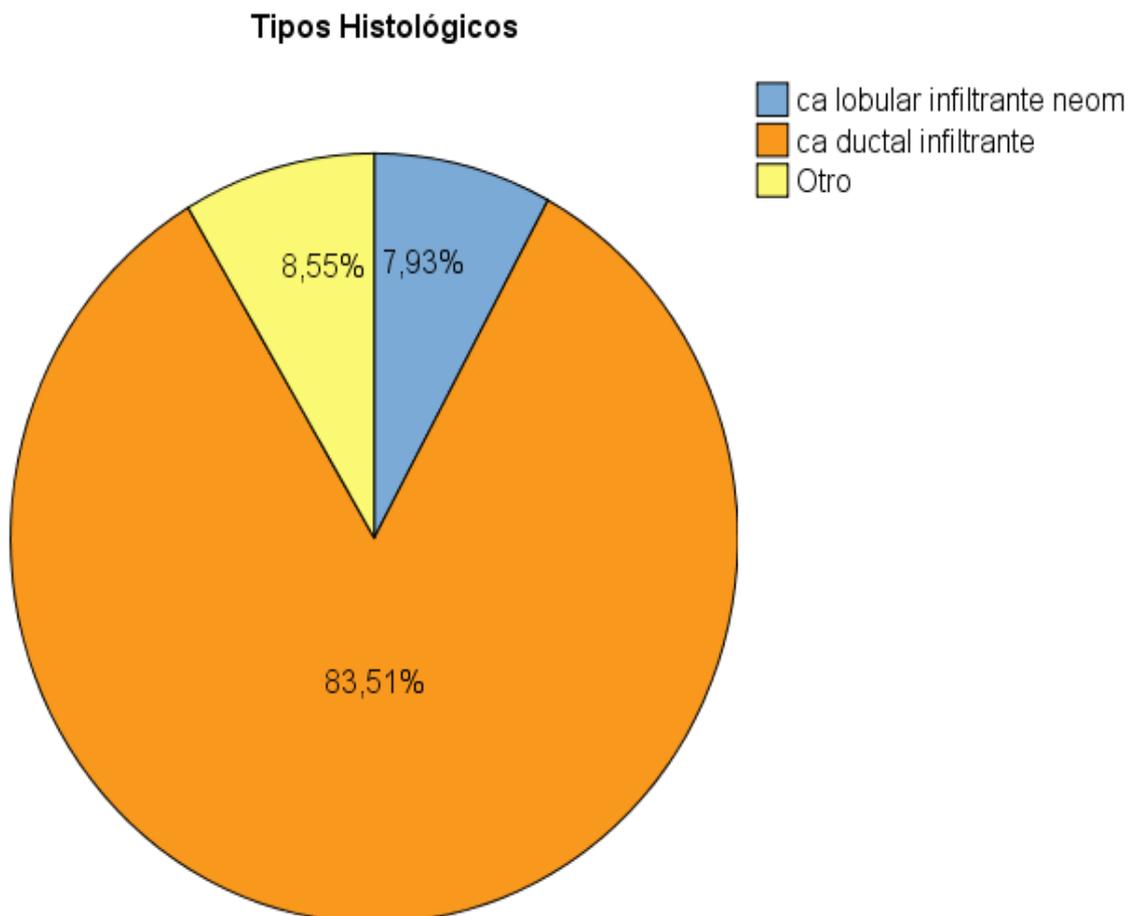
La mediana de edad de las mujeres incluidas fue de 62 años y la desviación típica 14,27. (Figura 1)



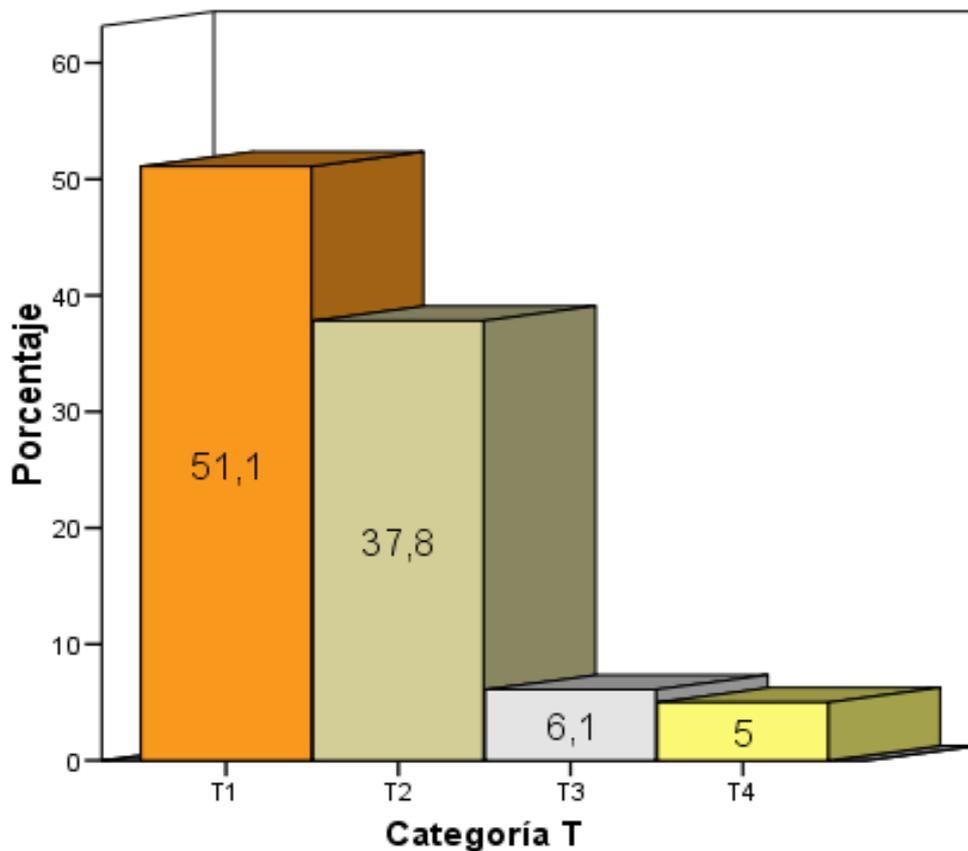
8.1.2.- Datos relativos al tumor.

- La mama izquierda fue la afectada en el 50,1 % de las mujeres de nuestra serie, la mama derecha en el 48,4% y en el 1,6% de los casos la afectación fue bilateral.

- Los tipos histológicos diagnosticados en nuestra serie fueron, 537 carcinoma ductales infiltrantes que suponen el 83,5% de la muestra, 51 carcinomas lobulillares que suponen el 7,9%, 17 carcinomas tubulares que suponen el 2,6% de la muestra, 13 carcinomas medulares, 11 carcinomas mucinosos, 10 carcinomas papilares, 2 carcinomas sin especificar tipo, 1 carcinoma adenoide quístico, 1 carcinoma apocrino. Para su representación, los tipos histológicos cuya frecuencia ha sido inferior al 5% se han representado juntos. (Figura 2)

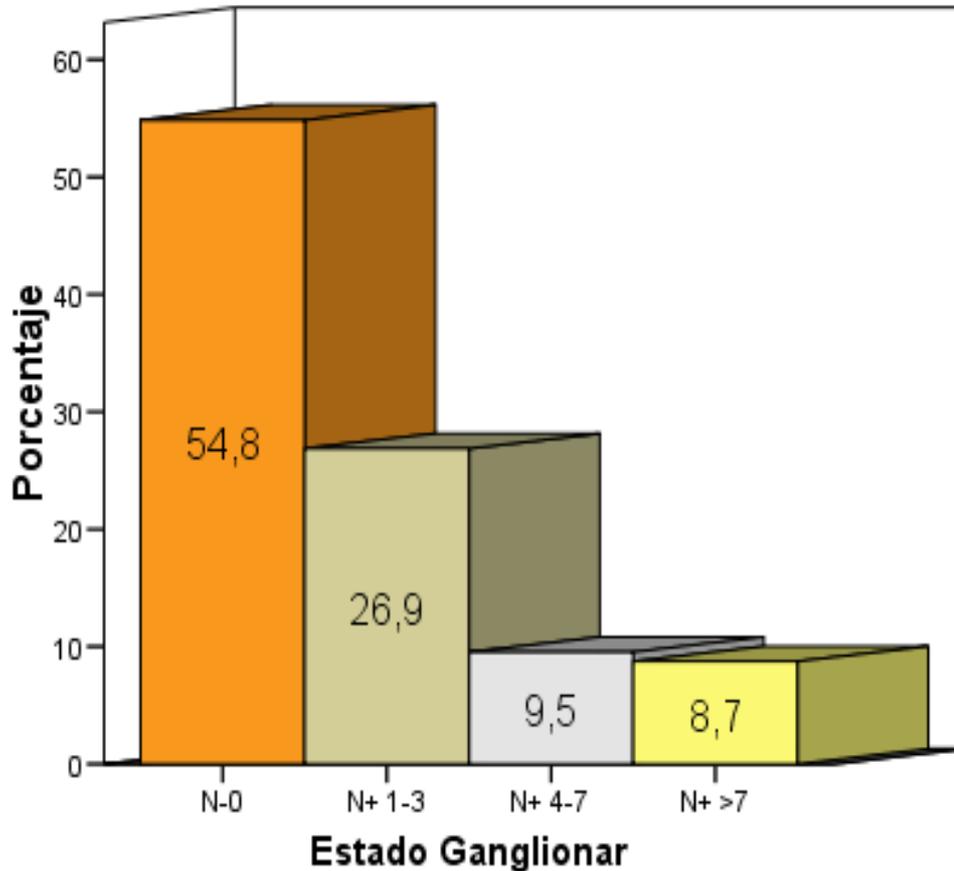


Respecto a la clasificación de nuestras pacientes según el sistema TNM. En la categoría T, el 51,1 % de los casos fueron clasificados como T1, T2 fueron el 37,8% de los casos, T3 el 6,1% de los casos y el 5% de los casos se clasificaron como T4. 3 pacientes (0,5%) no pudieron clasificarse por haberse realizado exclusivamente una biopsia. (Figura 3)



- Con respecto a los ganglios axilares afectados por el tumor. El 54,8% de las mujeres no tenía afectación ganglionar axilar (N0), el 26,9% tuvo de 1 a 3 ganglios axilares afectados por el tumor, el 19,2 % tuvo 4 o más ganglios afectados por el tumor. Dentro de este grupo de 4 o más ganglios, el 9,5% de las mujeres tenían de 4 a 7 ganglios axilares, mientras que el 8,7% tuvo 7 o más ganglios afectados.

En 14 pacientes (2,2%) no se realizó estadificación ganglionar. (Figura 4)



- El grado histológico se informó como bien diferenciado en 200 pacientes (31,1%). Moderadamente diferenciado se consideró en 267 casos (41,5%) y pobremente diferenciado en 171 casos (26,6%). En 5 casos (0,8%) no se informó grado histológico.

8.1.3.- Datos relativos a biomarcadores.

- Se documentó que 510 muestras (79,3%) expresaron receptores de estrógenos y 133 (20,7%) no lo hicieron.

En cuanto a los receptores de progesterona, estos se encontraron expresados en 339 casos (52,7%) y no se expresaron en 304 casos (47,3%).

RESULTADOS

En 86 casos se demostró sobreexpresión de Her-2 (13,4% de la muestra), y en 557 casos (86,6%) no se demostró la sobreexpresión.

La expresión de Ki-67 (índice Ki-67) se informó como baja en 383 casos (59,6%), en 225 casos se documentó expresión alta de Ki-67 (35%). En 35 casos no se determinó la expresión de Ki-67 (5,4%).

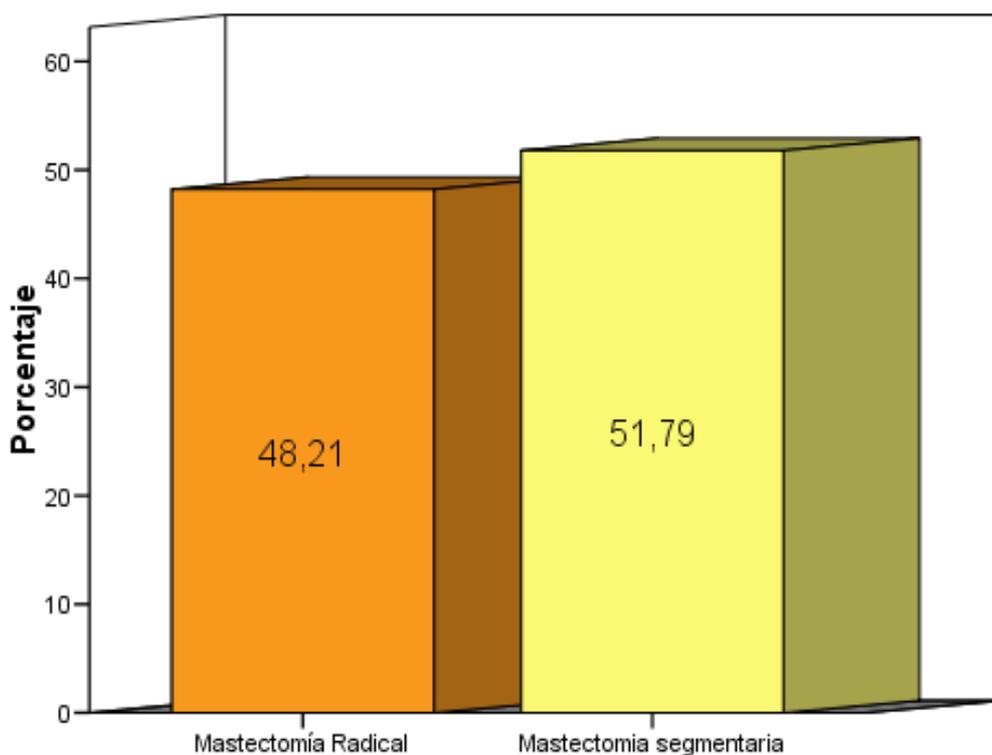
Bcl-2 se consideró positivo en 437 casos que suponen el 68% de la muestra. En 117 casos (18,2%) se consideró negativo, y en 89 casos no se determinó (13,8%).

Con respecto a la determinación de p53, se consideró positiva en 101 casos (15,7%), negativa en 504 casos (78,4%) y no se realizó en 38 casos que suponen el 5,9% de los casos.

8.1.4.- Datos relativos al tratamiento realizado.

De las 643 mujeres incluidas en el estudio, 310 fueron sometidas a mastectomía radical modificada (48,2%) y 333 fueron sometidas a mastectomía segmentaria (51,8%). (Figura 5)

Tratamiento Quirúrgico



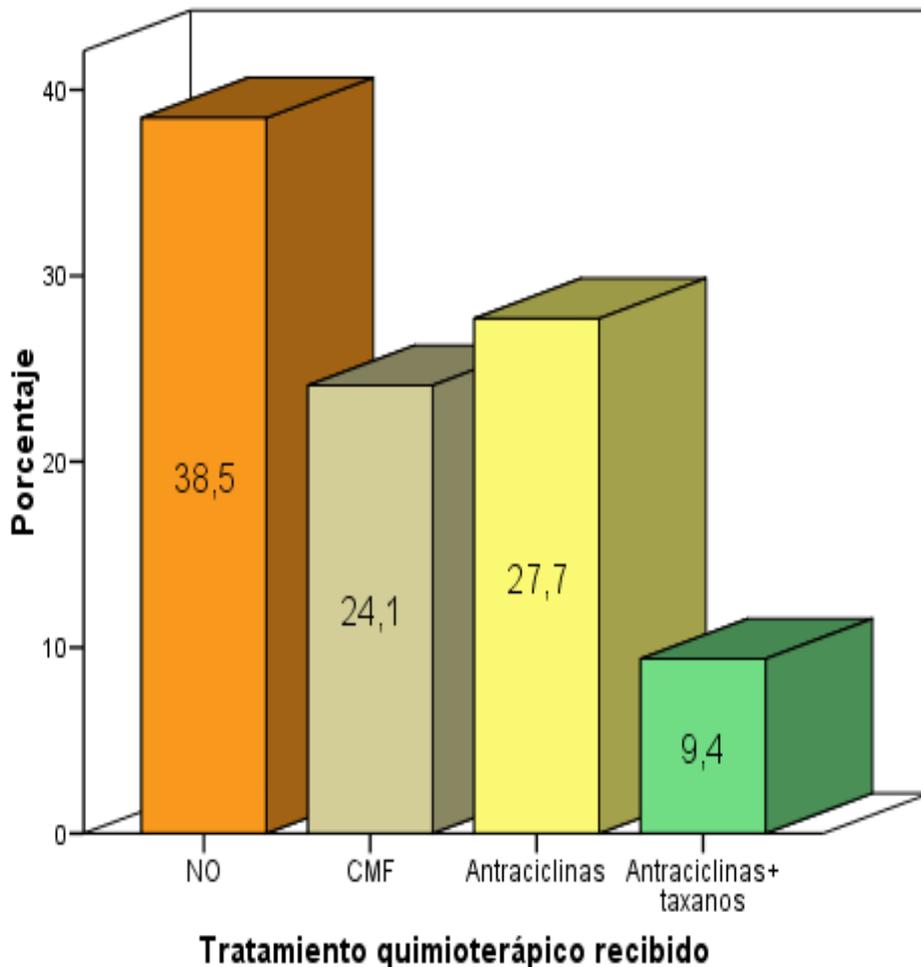
La mayor parte de las pacientes, 581 (90,4%) fueron sometidas a linfadenectomía axilar. En 35 mujeres se realizó biopsia selectiva de ganglio centinela (5,4%) y en 27 casos (4,2%) no se realizó ninguna intervención sobre la axila.

Cuatrocientas veintidós pacientes (65,6%) recibieron radioterapia adyuvante y 221 (34,37%) no recibieron este tratamiento.

RESULTADOS

Con excepción de 4 pacientes (0,6%) en las que no se pudo documentar que hubiesen recibido quimioterapia, 246 pacientes (38,5%) no recibieron quimioterapia adyuvante mientras que 395 (61,4%) si recibieron este tratamiento.

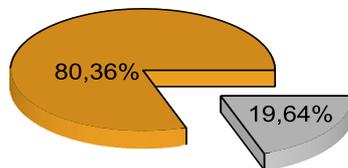
Ciento cincuenta y cuatro mujeres (24%) recibieron tratamiento con ciclofosfamida, metotrexate y 5-fluorouracilo (CMF), 177 mujeres (27,5%) recibieron combinaciones con antraciclinas (AC ó FAC), 60 pacientes (9,3%) recibieron combinaciones de antraciclinas y taxanos y 2 pacientes (0,3%) recibieron otras combinaciones de fármacos. (Figura 6)



Con respecto al cumplimiento del tratamiento quimioterápico, en 77 mujeres (19,64 %) no se alcanzó una intensidad de dosis relativa del 85%, mientras que en 315 (80,36 %) se administró al menos el 85% de la intensidad de dosis relativa prevista. (Figura 7)

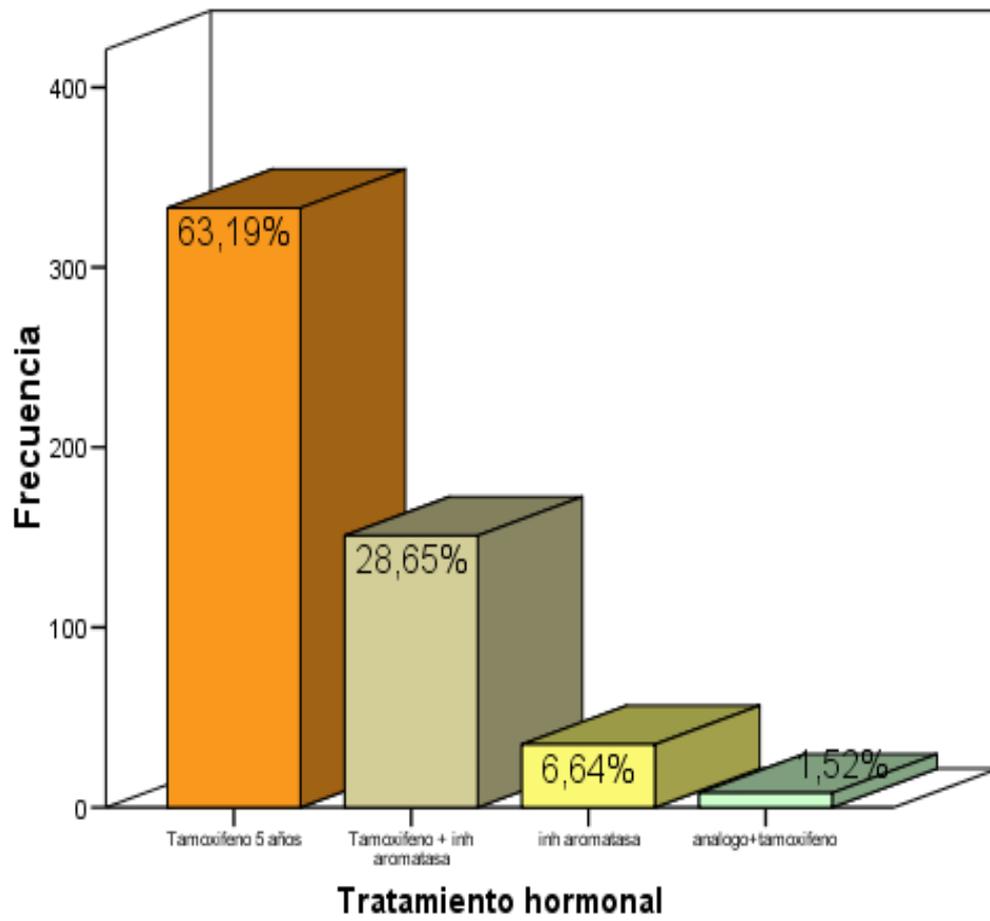
Intensidad de dosis
relativa

- < 85%
- > 85%



Con respecto al tratamiento hormonal adyuvante, este no pudo ser confirmado en 2 pacientes (0,3%).

Ciento catorce mujeres (17,7%) no recibieron tratamiento hormonal alguno. En 333 pacientes (51,8%) se administró tamoxifeno durante 5 años, en 151 pacientes (23,5%) se administraron tamoxifeno y posteriormente un inhibidor de la aromatasa. Treinta y cinco mujeres (5,4%) fueron tratadas exclusivamente con inhibidor de la aromatasa y 8 pacientes fueron tratadas con análogos LH-RH y Tamoxifeno. (Figura 8)

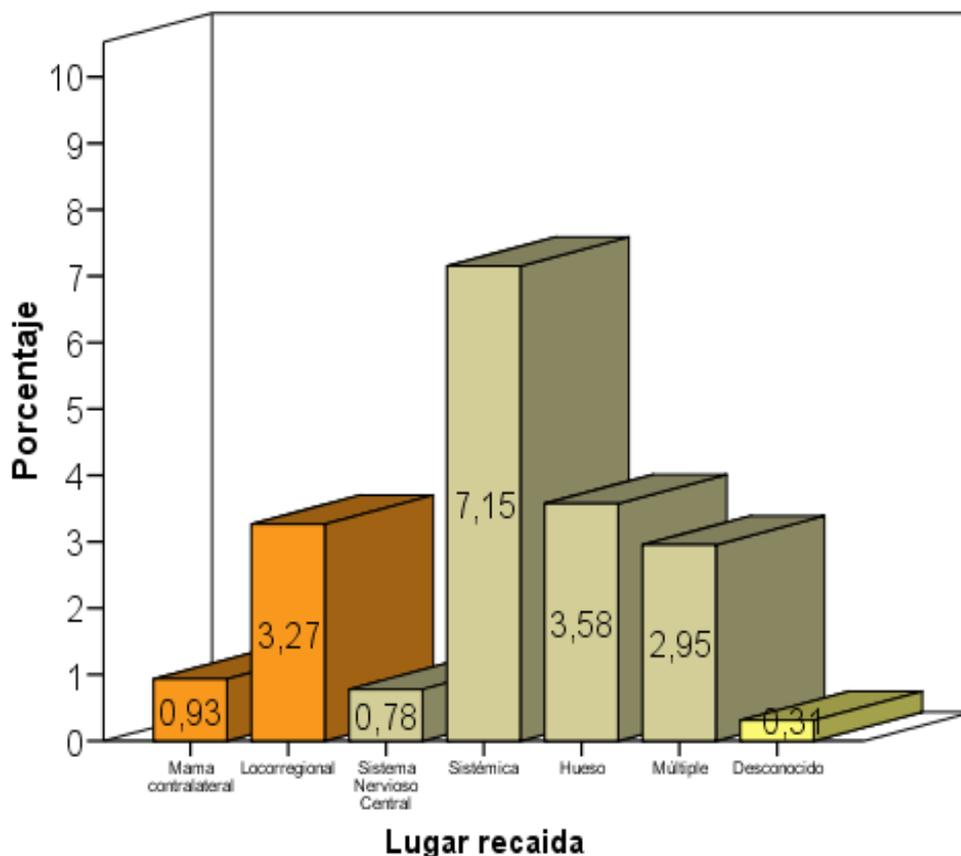


8.1.5.- Datos relativos al seguimiento.

En el momento del cierre del estudio, 31 de Diciembre de 2009, la mediana de seguimiento era de 89 meses (1-158).

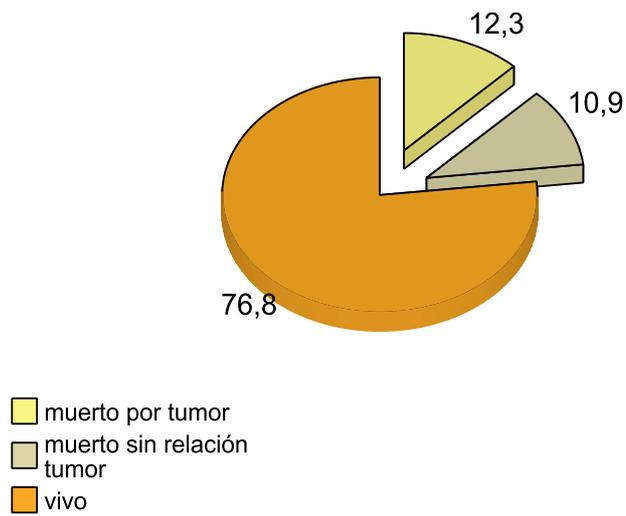
Quinientas veintiuna pacientes (81%) no habían sufrido recaída de la enfermedad, y en 120 pacientes (18,7%) se había documentado recaída. En 2 pacientes (0,3%) no se ha tenido constancia documental de recaída.

De las pacientes que recayeron, 6 pacientes presentaron un cáncer de mama contralateral (0,9%) y 21 recayeron de forma locorregional (3,3%). El resto de las pacientes, 93 (14,46%), sufrió una recidiva sistémica (visceral, sistema nervioso central, ósea). (Figura 9)



Cuatrocientas noventa y cuatro mujeres (76,8%) se encuentran vivas a la finalización del estudio y 149 (23,2%) fallecieron. En 79 casos (12,3%) se documentó que la causa de muerte fue el cáncer de mama y en 70 casos (10,9%) se documentó una causa de muerte diferente al cáncer de mama. (Figura 10)

Estado Vital al cierre del estudio



8.2.- Estudio de la asociación de las co-variables (estudio de independencia).

8.2.1.- Categoría T y Ki-67. (Tabla 1)

			Ki-67		Total
			Bajo	Alto	
T	1	Recuento	221	87	308
		Frecuencia esperada	194,5	113,5	
	2	Recuento	132	99	231
		Frecuencia esperada	145,9	85,1	
3	Recuento	16	21	37	
	Frecuencia esperada	23,4	13,6		
4	Recuento	13	16	29	
	Frecuencia esperada	18,3	10,7		
Total		Recuento	382	223	605

p<0,05

Existe asociación estadísticamente significativa entre la variable tamaño tumoral y el estado de expresión de Ki-67. A la vista de la tabla los valores de T mayores se asocian con una expresión alta de Ki-67.

8.2.2.- Categoría T y p53. (Tabla 2)

			p53		Total
			Negativo	Positivo	
T	1	Recuento	271	36	307
		Frecuencia esperada	256,5	50,5	
	2	Recuento	180	50	230
		Frecuencia esperada	192,2	37,8	
3	Recuento	30	7	37	
	Frecuencia esperada	30,9	6,1		
4	Recuento	22	6	28	
	Frecuencia esperada	23,4	4,6		
Total		Recuento	503	99	602

p<0,05

Existe asociación estadísticamente significativa entre el tamaño tumoral y la expresión de p53. La ausencia de expresión de p53 se asocia con etapas T precoces.

8.2.3.- Categoría T y bcl-2. (Tabla 3)

			Bcl-2		Total
			Negativo	Positivo	
T	1	Recuento	47	231	278
		Frecuencia esperada	58,4	219,6	
	2	Recuento	54	159	213
		Frecuencia esperada	44,8	168,2	
	3	Recuento	7	27	34
		Frecuencia esperada	7,1	26,9	
	4	Recuento	8	19	27
		Frecuencia esperada	5,7	21,3	
Total		Recuento	116	436	552

p = 0,09

No se demuestra asociación entre las co-variables T y expresión de bcl-2.

8.2.4.- Categoría N y Ki-67. (Tabla 4)

			Ki-67		Total	
			Bajo	Alto		
N	0	Recuento	232	98	330	
		Frecuencia esperada	207,9	122,1		
	1-3 ganglios	Recuento	90	66	156	
		Frecuencia esperada	98,3	57,7		
	> 4 ganglios	Recuento	50	58	108	
		Frecuencia esperada	68,0	40,0		
	Desconocido	Recuento	11	3	14	
	Total		Recuento	383	225	608

p<0,05

Existe asociación estadísticamente significativa entre la afectación axilar ganglionar y la expresión de Ki-67.

Un índice Ki-67 alto se asocia con mayor número de ganglios afectados.

8.2.5.- Categoría N y p53. (Tabla 5)

			p53		
			Negativo	Positivo	Total
N	0	Recuento	278	48	326
		Frecuencia esperada	271,6	54,4	
	1-3	Recuento	129	28	157
		Frecuencia esperada	130,8	26,2	
	> 4	Recuento	83	25	108
		Frecuencia esperada	90,0	18,0	
	Desconocido	Recuento	14	0	14
		Frecuencia esperada	11,7	2,3	
	Total	Recuento	504	101	605

p = 0,069

No existe asociación estadísticamente significativa entre el estado de afectación ganglionar y la expresión de p53.

8.2.6.- Categoría N y bcl-2. (Tabla 6)

			Bcl-2		Total
			Negativo	Positivo	
N	0	Recuento	50	246	296
		Frecuencia esperada	62,5	233,5	
	1-3 ganglios	Recuento	37	110	147
		Frecuencia esperada	31,0	116,0	
> 4 ganglios	Recuento	28	69	97	
	Frecuencia esperada	20,5	76,5		
	Desconocido	Recuento	2	12	14
Total		Recuento	117	437	554

p < 0,05

Existe asociación estadísticamente significativa entre el estado de expresión de bcl-2 y la presencia de metástasis ganglionares axilares. Las mujeres con expresión de bcl-2 tuvieron con menos frecuencia metástasis ganglionares axilares.

8.2.7.- Grado histológico y Ki-67. (Tabla 7)

			Ki-67		Total
			Bajo	Alto	
Grado	Bien diferenciado	Recuento	175	20	195
		Frecuencia esperada	122,7	72,3	
	Moderadamente diferenciado	Recuento	171	83	254
		Frecuencia esperada	159,8	94,2	
	Pobrementemente diferenciado	Recuento	36	122	158
		Frecuencia esperada	99,4	58,6	
Total		Recuento	382	225	607

p<0,05

Existe asociación estadísticamente significativa entre el grado histológico y la expresión de Ki-67.

Las pacientes con índice Ki-67 alto tuvieron más frecuentemente tumores pobremente diferenciados.

8.2.8.- Grado histológico y p53. (Tabla 8)

		p53		Total
		Negativo	Positivo	
Grado Bien diferenciado	Recuento	186	6	192
	Frecuencia esperada	159,8	32,2	
Moderadamente diferenciado	Recuento	219	35	254
	Frecuencia esperada	211,5	42,5	
Pobremente diferenciado	Recuento	97	60	157
	Frecuencia esperada	130,7	26,3	
Total		502	101	603

p<0,05

Existe asociación estadísticamente significativa entre el grado histológico y la expresión de p53. La expresión de p53 se asoció con tumores pobremente diferenciados.

8.2.9.- Grado histológico y bcl-2. (Tabla 9)

			Bcl-2		Total
			Negativo	Positivo	
Grado	Bien diferenciado	Recuento	16	154	170
		Frecuencia esperada	35,7	134,3	
	Moderadamente diferenciado	Recuento	40	196	236
		Frecuencia esperada	49,5	186,5	
	Pobremente diferenciado	Recuento	60	87	147
		Frecuencia esperada	30,8	116,2	
Total		Recuento	116	437	553

p < 0,05

Existe asociación estadísticamente significativa entre el grado histológico y la expresión de bcl-2. Los tumores mejor diferenciados se asocian con la expresión de bcl-2, mientras que los tumores pobremente diferenciados se asocian con ausencia de expresión de bcl-2.

8.2.10.- Receptores de Estrógenos y Ki-67. (Tabla 10)

			Ki-67		Total
			Bajo	Alto	
Receptores Estrogénicos	Negativos	Recuento	19	85	104
		Frecuencia esperada	65,5	38,5	
	Positivos	Recuento	364	140	504
		Frecuencia esperada	317,5	186,5	
Total		Recuento	383	225	608

p<0,05

Existe asociación estadísticamente significativa entre la expresión de receptores estrogénicos y la expresión de Ki-67.

La expresión de receptores estrogénicos se asoció con índice Ki-67 bajo.

8.2.11.- Receptores de Estrógenos y p53. (Tabla 11)

			p53		Total
			Negativo	Positivo	
Receptores Estrogénicos	Negativos	Recuento	51	54	105
		Frecuencia esperada	87,5	17,5	
	Positivos	Recuento	453	47	500
		Frecuencia esperada	416,5	83,5	
Total		Recuento	504	101	605

p<0,05

Existe asociación estadísticamente significativa entre la expresión de receptores estrogénicos y la expresión de p53. La expresión de receptores estrogénicos se asoció con ausencia de expresión de p53.

8.2.12.- Receptores de Estrógenos y bcl-2. (Tabla 12)

			Bcl-2		Total
			Negativo	Positivo	
Receptores Estrogénicos	Negativos	Recuento	64	30	94
		Frecuencia esperada	19,9	74,1	
	Positivos	Recuento	53	407	460
		Frecuencia esperada	97,1	362,9	
Total		Recuento	117	437	554

p < 0,05

Existe asociación estadísticamente significativa entre la expresión de receptores de estrógenos y la expresión de bcl-2. La expresión de receptores estrogénicos se asoció con expresión de bcl-2.

8.2.13.- Receptores de Progesterona y Ki-67. (Tabla 13)

			Ki-67		Total
			Bajo	Alto	
Receptores Progesterona	Negativos	Recuento	138	137	275
		Frecuencia esperada	173,2	101,8	
	Positivos	Recuento	245	88	333
		Frecuencia esperada	209,8	123,2	
Total		Recuento	383	225	608

p<0,05

Existe asociación estadísticamente significativa entre la expresión de receptores de progesterona y la expresión de Ki-67.

La expresión de receptores de progesterona se asoció con índice Ki-67 bajo

8.2.14.- Receptores de Progesterona y p53. (Tabla 14)

			p53		Total
			Negativo	Positivo	
Receptores Progesterona	Negativos	Recuento	204	69	273
		Frecuencia esperada	227,4	45,6	
	Positivos	Recuento	300	32	332
		Frecuencia esperada	276,6	55,4	
Total		Recuento	504	101	605

p<0,05

Existe asociación estadísticamente significativa entre la expresión de receptores de progesterona y la expresión de p53. La expresión de receptores de progesterona se asoció con ausencia de expresión de p53.

8.2.15.- Receptores de Progesterona y bcl-2. (Tabla 15)

			Bcl-2		Total
			Negativo	Positivo	
Receptores Progesterona	Negativos	Recuento	87	176	263
		Frecuencia esperada	55,5	207,5	
	Positivos	Recuento	30	261	291
		Frecuencia esperada	61,5	229,5	
Total		Recuento	117	437	554

p < 0,05

Existe asociación estadísticamente significativa entre la expresión de receptores de progesterona y la expresión de bcl-2. La expresión de receptores de progesterona se asoció con expresión de bcl-2.

8.2.16.- Expresión de Her-2 y Ki-67. (Tabla 16)

			Ki-67		Total
			Bajo	Alto	
Her-2	Negativo	Recuento	353	174	527
		Frecuencia esperada	332,0	195,0	
	Positivo	Recuento	30	51	81
		Frecuencia esperada	51,0	30,0	
Total		Recuento	383	225	608

p<0,05

Existe asociación estadísticamente significativa entre la expresión de Her-2 y la expresión de Ki-67. La expresión de Her-2 se asoció con índice Ki-67 alto.

8.2.17.- Expresión de Her-2 y p53. (Tabla 17)

			p53		Total
			Negativo	Positivo	
Her-2	Negativo	Recuento	455	71	526
		Frecuencia esperada	438,2	87,8	
	Positivo	Recuento	49	30	79
		Frecuencia esperada	65,8	13,2	
Total		Recuento	504	101	605

p<0,05

Existe asociación estadísticamente significativa entre la expresión de Her-2 y la expresión de p53. La expresión de Her-2 se asoció con la ausencia de expresión de p53.

8.2.18.- Expresión de Her-2 y bcl-2. (Tabla 18)

			Bcl-2		Total
			Negativo	Positivo	
Her-2	Negativo	Recuento	90	391	481
		Frecuencia esperada	101,6	379,4	
	Positivo	Recuento	27	46	73
		Frecuencia esperada	15,4	57,6	
Total		Recuento	117	437	554

p < 0,05

Existe asociación estadísticamente significativa entre la expresión de Her-2 y la expresión de bcl-2. La expresión de Her-2 se asoció con ausencia de expresión de bcl-2.

8.2.19.- Expresión de Ki-67 y p53. (Tabla 19)

		p53		Total	
		Negativo	Positivo		
Ki-67	Bajo	Recuento	360	18	378
		Frecuencia esperada	314,3	63,7	
	Alto	Recuento	138	83	221
		Frecuencia esperada	183,7	37,3	
Total		Recuento	498	101	599

p < 0,05

Existe asociación estadísticamente significativa entre la expresión de Ki-67 y la expresión de p53. Índice Ki-67 alto se asoció con ausencia de expresión de p53.

8.2.20.- Expresión de Ki-67 y bcl-2. (Tabla 20)

		Bcl-2		Total	
		Negativo	Positivo		
Ki-67	Bajo	Recuento	39	307	346
		Frecuencia esperada	72,6	273,4	
	Alto	Recuento	77	130	207
		Frecuencia esperada	43,4	163,6	
Total		Recuento	116	437	553

p < 0,05

Existe asociación estadísticamente significativa entre la expresión de Ki-67 y el estado de expresión de bcl-2. El índice Ki-67 alto se asoció con ausencia de expresión de bcl-2.

8.2.21.- Expresión de p53 y bcl-2. (Tabla 21)

			Bcl-2		Total
			Negativo	Positivo	
p53	Negativo	Recuento	73	386	459
		Frecuencia esperada	98,0	361,0	
	Positivo	Recuento	44	45	89
		Frecuencia esperada	19,0	70,0	
Total		Recuento	117	431	548

p < 0,05

Existe asociación estadísticamente significativa entre el estado de expresión de p53 y el estado de expresión de bcl-2. La expresión de p53 se asoció con ausencia de expresión de bcl-2.

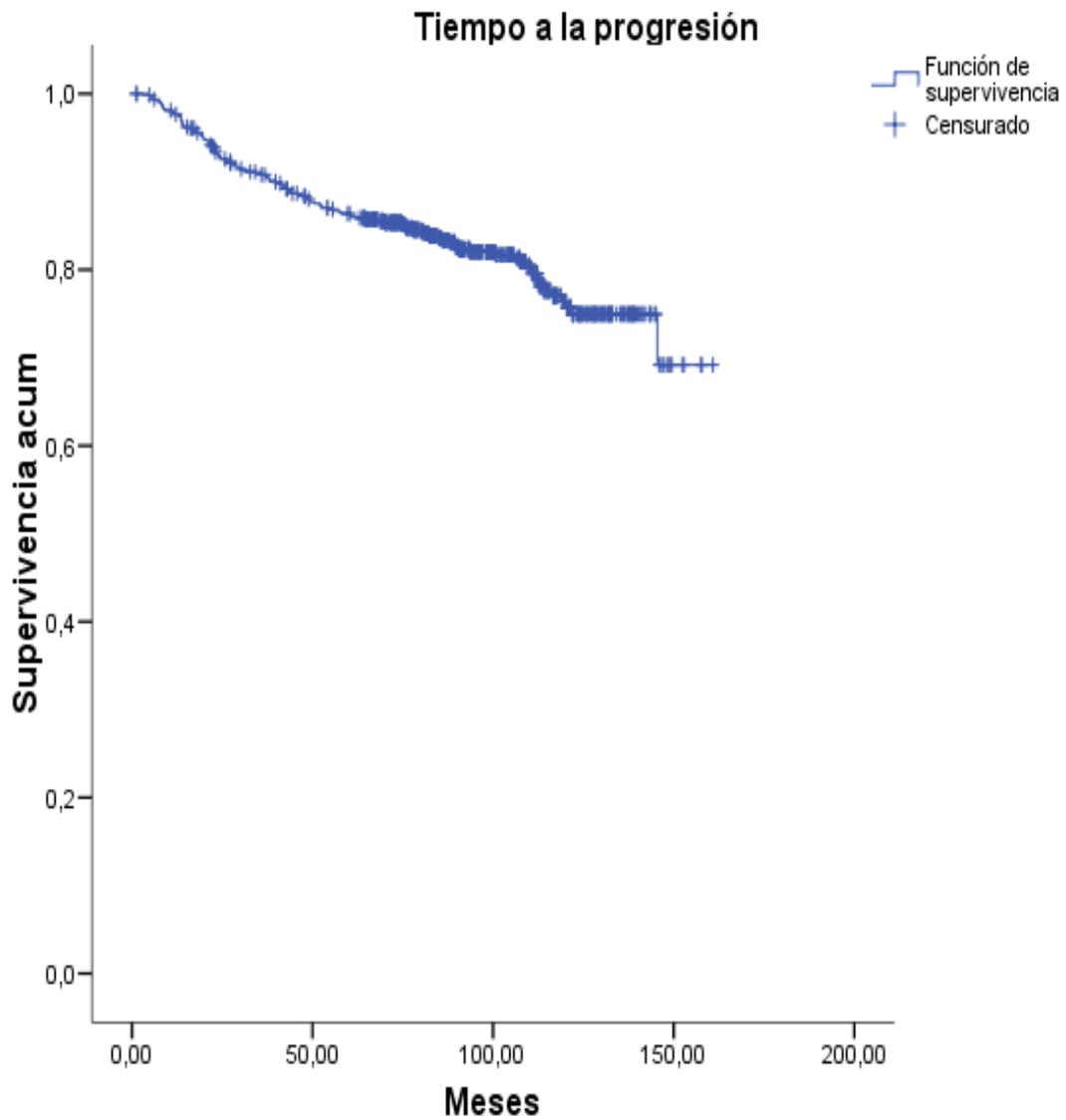
8.2.22.- Relación de la edad y los diversos biomarcadores considerados (Tabla 22)

Rho de Spearman	Edad	Coeficiente de correlación Sig. (bilateral)	Ki-67	bcl-2	p53
			-,114**	,001	-,025
			0,006	,981	,554

La relación de la edad, variable continua, con los biomarcadores se ha estudiado mediante el test de correlación no paramétrica de Spearman. De los biomarcadores considerados, Ki-67 mostró correlación inversa (a menor edad, mayor índice Ki-67) con la edad. No hubo correlación significativa ni con bcl-2 ni con p53.

8.3.- Análisis del tiempo a la progresión. Análisis Univariante.

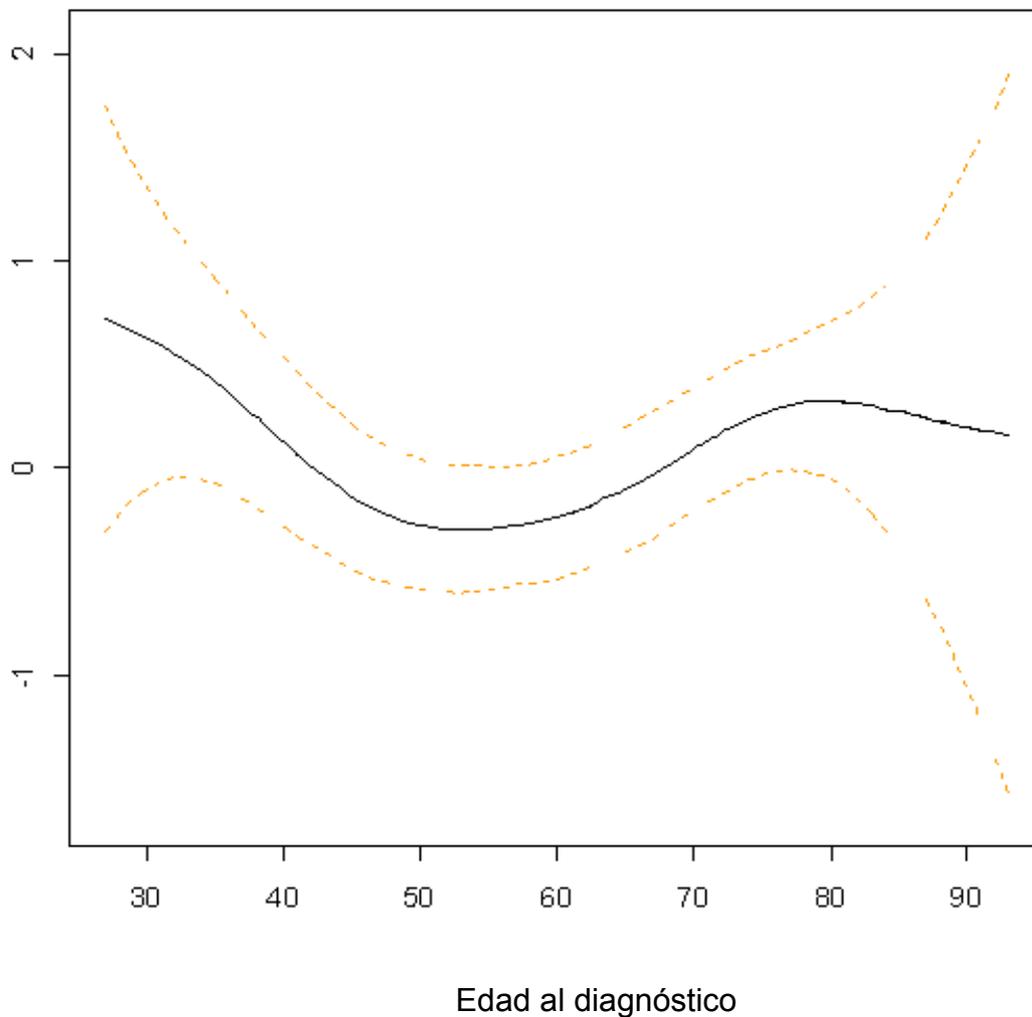
Se han producido 120 eventos (recaídas). La media del tiempo a la progresión es de 134,91 meses (IC 95% 130,56-139,26). (Figura 11)



8.3.1.- Análisis del tiempo a la progresión según la co-variable edad.

Para determinar el efecto de la edad en la supervivencia utilizamos un modelo de regresión de Cox suavizado (regresión a trazos (p-spline)). Una vez obtenido el modelo, y al confirmar el comportamiento no lineal de la variable edad se establecieron grupos etarios (menores de 40 años, 40-60 años, mayores de 60 años) con riesgos de muerte diferentes. (Figura 12)

Tiempo a la progresión



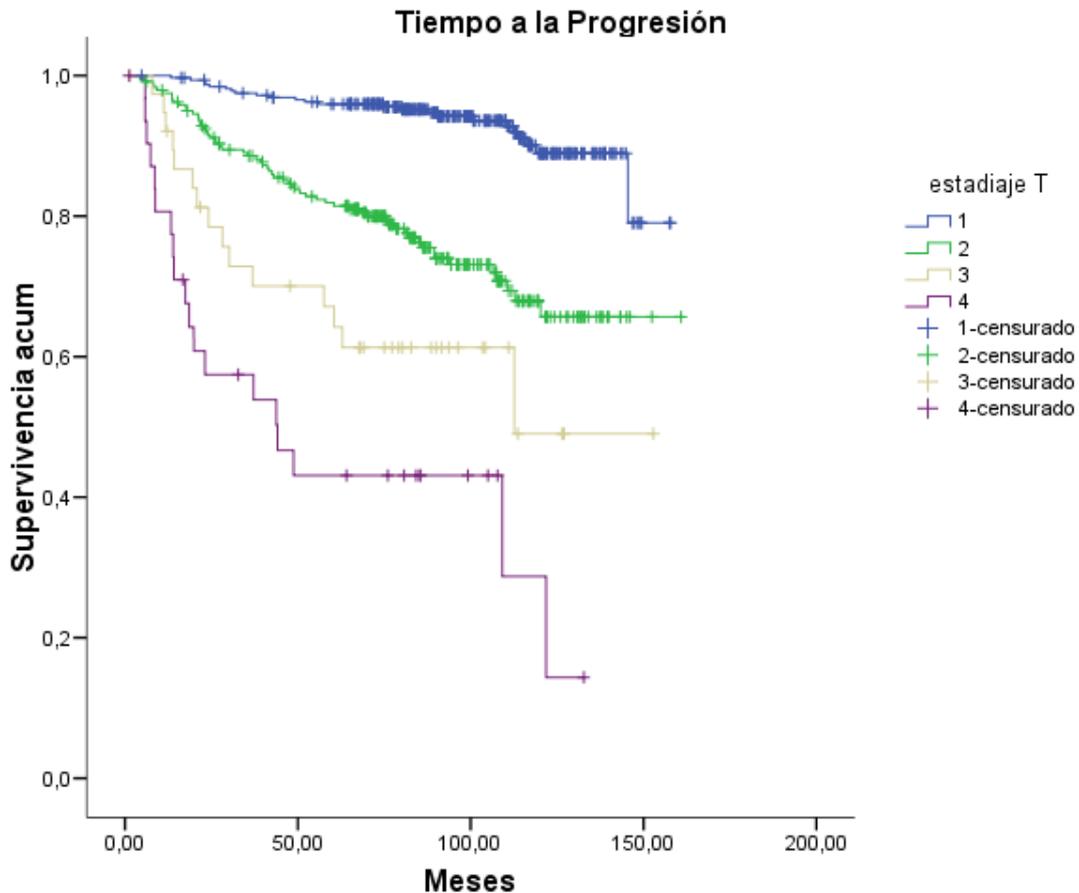
De la representación gráfica anterior se puede deducir:

1. La edad tiene un efecto significativo en el riesgo de recaída.

2. La forma funcional del gráfico indica (a) un menor riesgo de recaída en el grupo de mujeres entre 40 y 60 años, valores por debajo de la línea de no riesgo (cero), (b) encontramos un riesgo elevado de recaída tanto en mujeres mayores (de 60 años) como en las más mujeres más jóvenes

8.3.2.- Análisis del tiempo a la progresión según la co-variable categoría T.

La media de tiempo a la progresión para las mujeres con tumores T1 fue de 147,93 meses (IC 95% 143,88-151,97), para T2 fue de 126,39 (IC 95% 118,96-133,82), para T- 100,05 (IC 95% 79,45-120,66), para las mujeres con tumores T4 63,85 meses (IC 95% 44,91-82,80). (Figura 13)

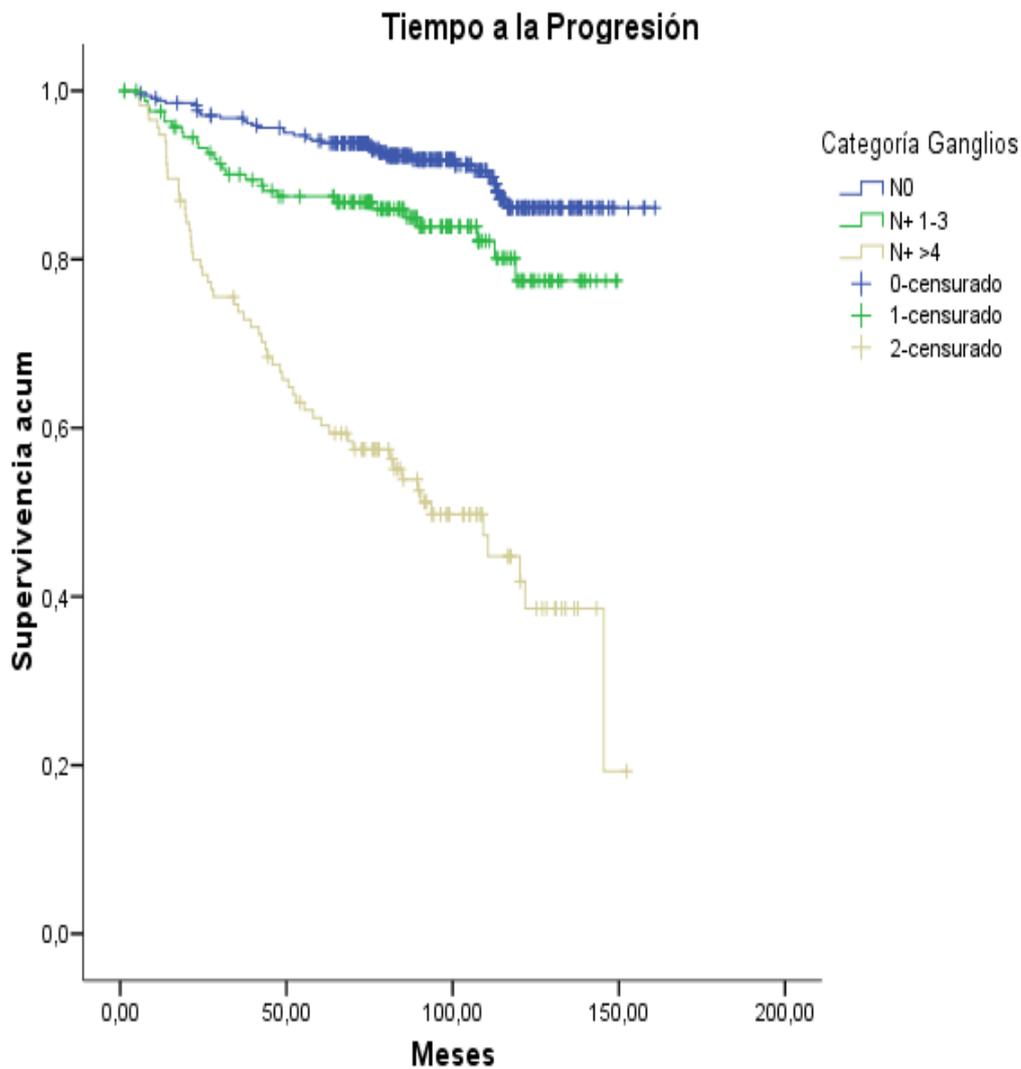


Test Log-Rank (Mantel-Cox), $p < 0,001$.

La razón de riesgo fue de 4,22 (IC 95% 2,62-6,77), 7,89 (4,13-15,08), 16,59 (9,05-30,43) para los tumores T2, T3 y T4 respectivamente al compararlos con los tumores T1.

8.3.3.- Análisis del tiempo a la progresión según la co-variable categoría N.

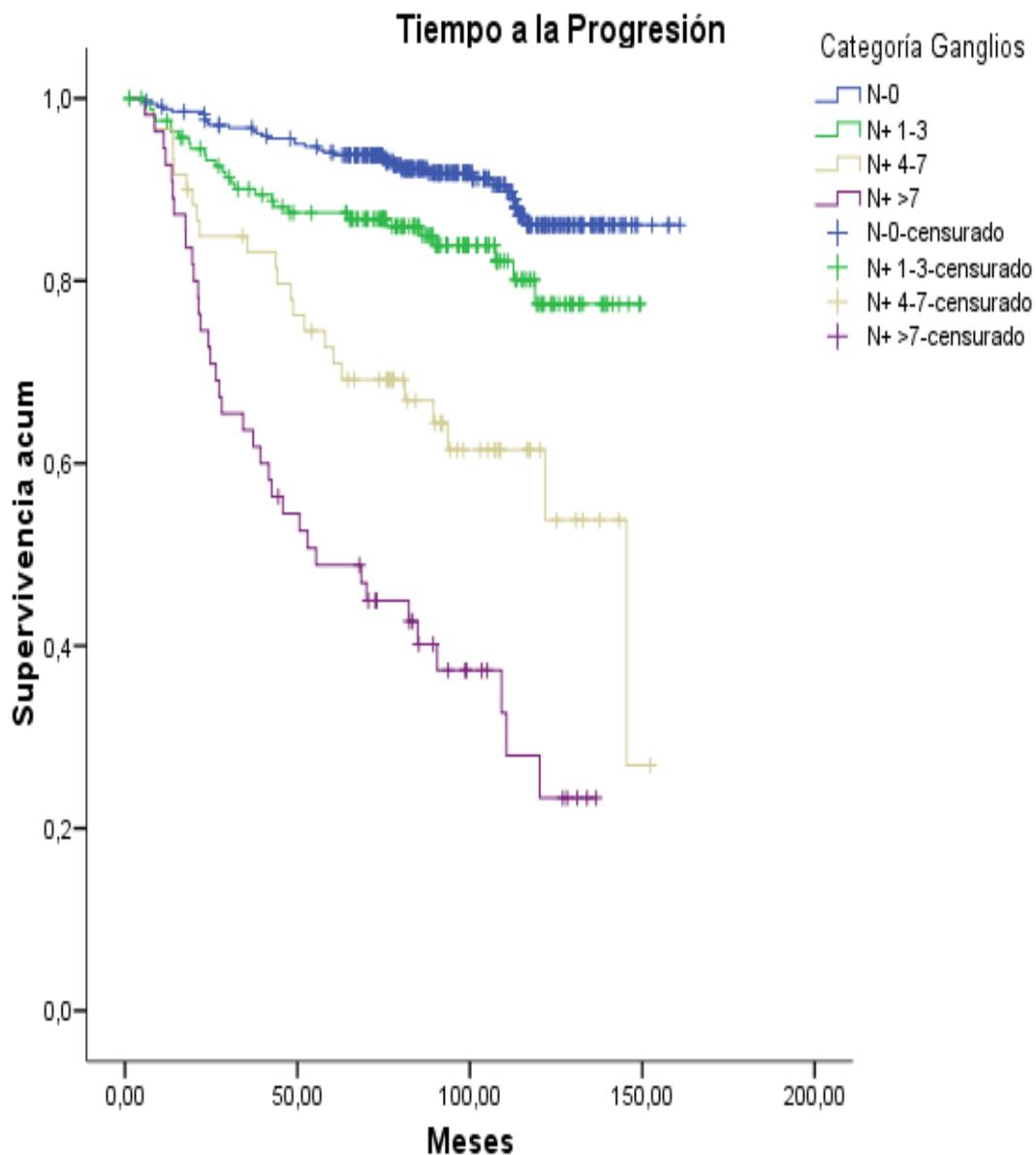
La media del tiempo a la progresión para las mujeres que no tuvieron afectación ganglionar axilar fue de 148,46 meses (IC 95% 144,43-152,49). Para las pacientes con afectación de 1 a 3 ganglios la media fue de 128,99 meses (IC 95% 121,93-136,05), para las mujeres con afectación de 4 o más ganglios la media de tiempo a la progresión fue de 90,40 meses (IC 95% 79,61-101,19), para las mujeres en las que la estadificación quirúrgica no se realizó la media fue de 109,19 meses (IC 95% 94,12-124,25). (Figura 14)



Test Log-Rank (Mantel-Cox), $p < 0,001$

RESULTADOS

Las mujeres con más de 4 ganglios linfáticos metastatizados en la axila, las agrupamos en 4 a 7 ganglios y más de 7 ganglios. La media de tiempo a la progresión para las mujeres con 4 a 7 ganglios afectados fue de 106,52 meses (IC 95% 92,19-120,93), para las mujeres con más de 7 ganglios la media fue de 70,73 meses (IC 95% 57,48-83,98). (Figura 15)

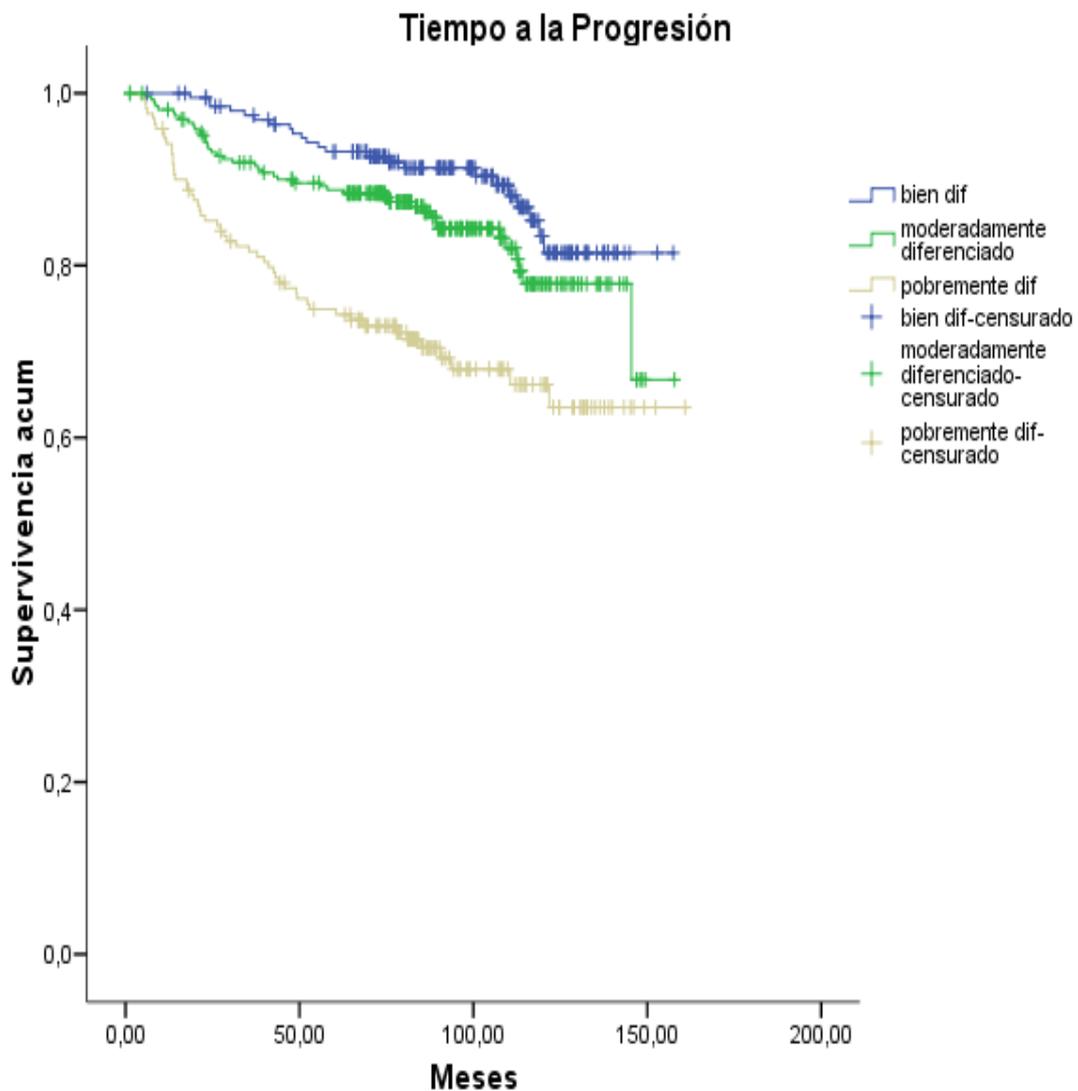


Test Log-Rank (Mantel-Cox), $p < 0,001$

Comparadas con las mujeres con ganglios negativos, aquellas con 1-3 ganglios afectados, tuvieron una razón de riesgo de 1,93 (IC 95% 1,15-3,18). La razón de riesgo para las mujeres con 4-7 ganglios fue 4,79 (IC 95% 2,81-8,17), 10,5 (IC 95% 6,53-16,91) fue la razón de riesgo para las mujeres con más de 7 ganglios afectados. Incluimos esta clasificación ganglionar en el análisis posterior puesto que ajustaba mejor el modelo para tiempo a la progresión que la clasificación TNM de 1997. $R^2=0,065$ frente a $R^2=0,005$

8.3.4.- Análisis del tiempo a la progresión según la co-variable grado histológico.

La media del tiempo a la progresión de las pacientes con tumores bien diferenciados fue de 143,65 meses (IC 95% 138,38-148,92). Los tumores moderadamente diferenciados tuvieron una razón de riesgo de 1,5 (IC 95% 0,93-2,56) frente a los bien diferenciados (la diferencia no alcanzó la significación estadística) y los tumores pobremente diferenciados tuvieron una razón de riesgo de 3,22 (IC 95% 1,97-5,27). (Figura 16)

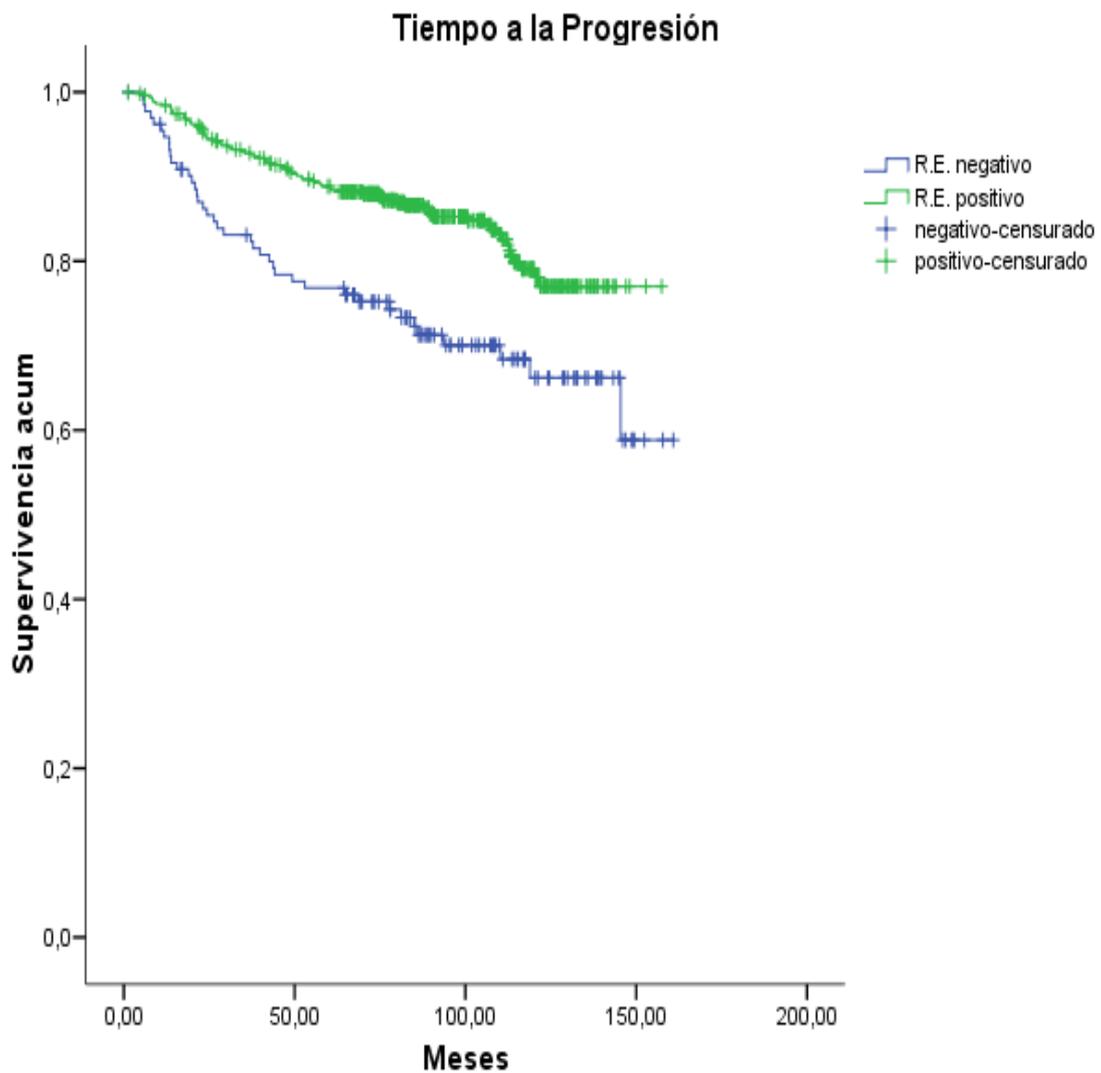


Test Log-Rank (Mantel-Cox), $p < 0,001$

8.3.5.- Análisis del tiempo a la progresión según la co-variable expresión de receptores estrogénicos.

La media de tiempo a la progresión fue de 120,76 meses para las mujeres con tumores sin expresión de receptores de estrógenos (IC 95% 110,34-131,17) y de 136,74 (IC 95% 132,57-140,91) para las mujeres con expresión de receptores de estrógenos. La expresión de receptores de estrógeno redujo el riesgo relativo 2 veces frente a las pacientes que no expresaron receptores.

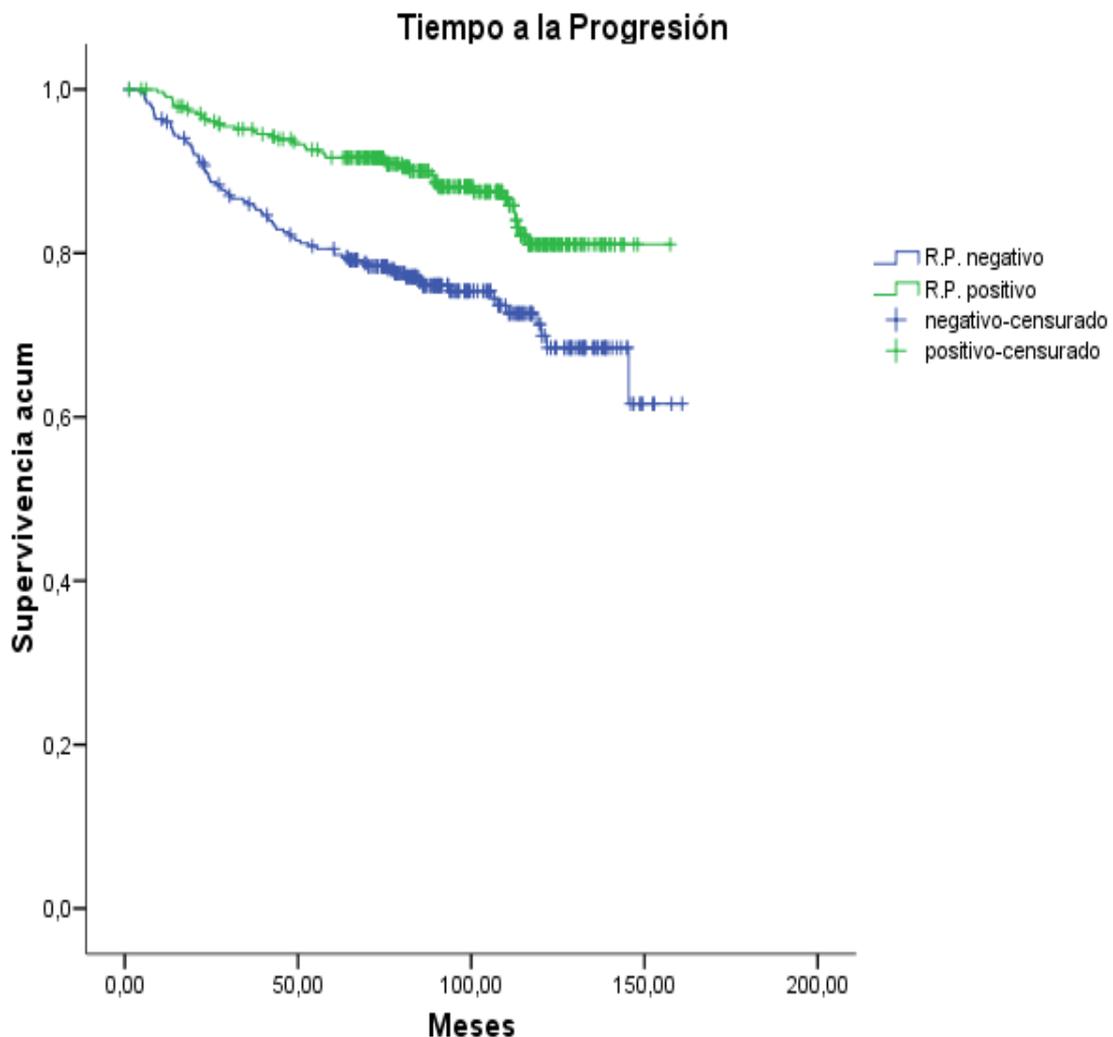
(Figura 17)



Test Log-Rank (Mantel-Cox), $p < 0,001$.

8.3.6.- Análisis del tiempo a la progresión según la co-variable expresión de receptores de progesterona.

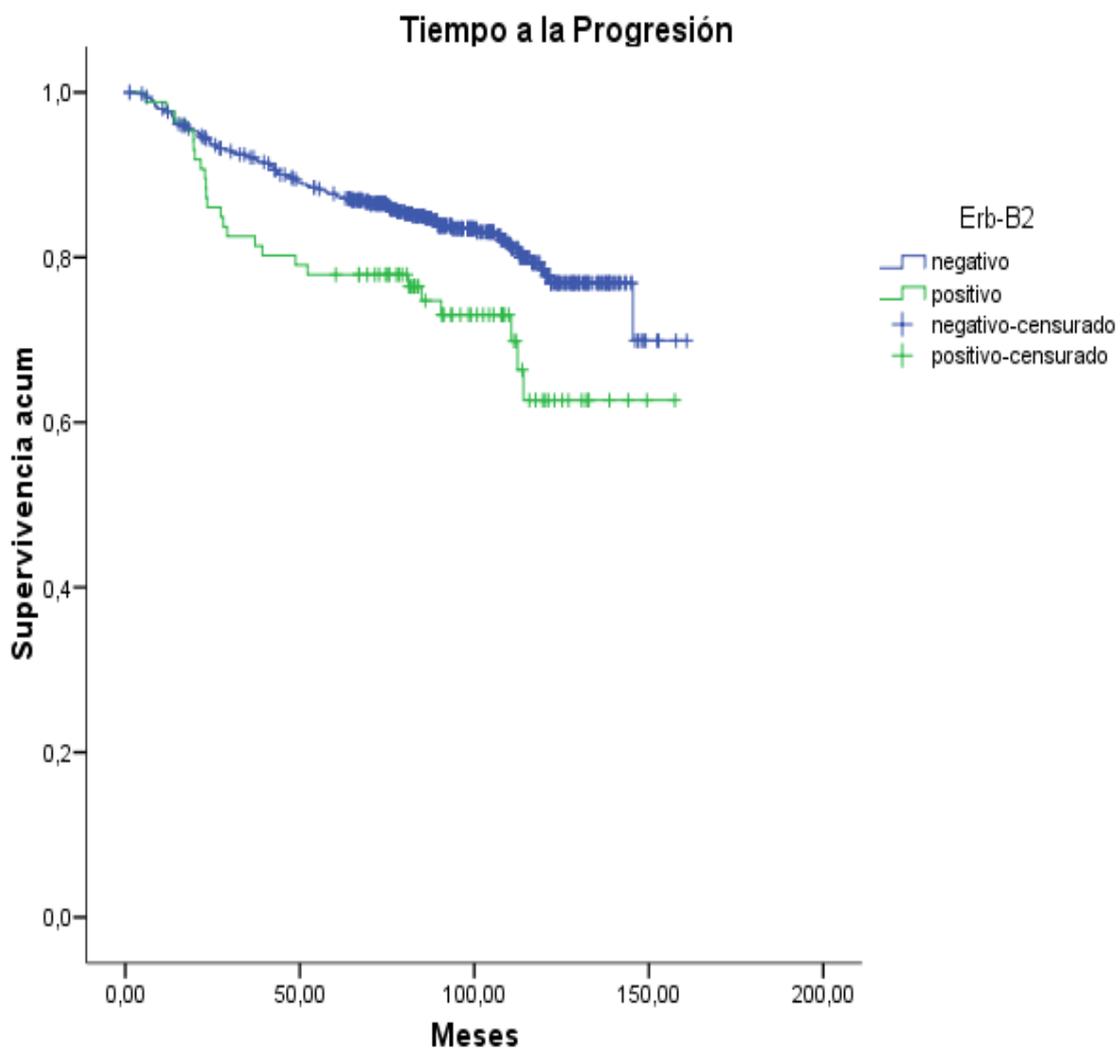
La media de tiempo a la progresión de las pacientes con ausencia de expresión de receptores de progesterona fue de 125,96 meses (IC 95% 119,16-132,76) frente a 141,14 meses de las pacientes con expresión de receptores de progesterona (IC 95% 136,60-145,68). La reducción del riesgo relativo de recaída para las mujeres cuyos tumores expresaron receptores de progesterona fue de 2,17 veces. (Figura 18)



Test Log-Rank (Mantel-Cox), $p < 0,001$

8.3.7.- Análisis del tiempo a la progresión según la co-variable expresión de Her-2.

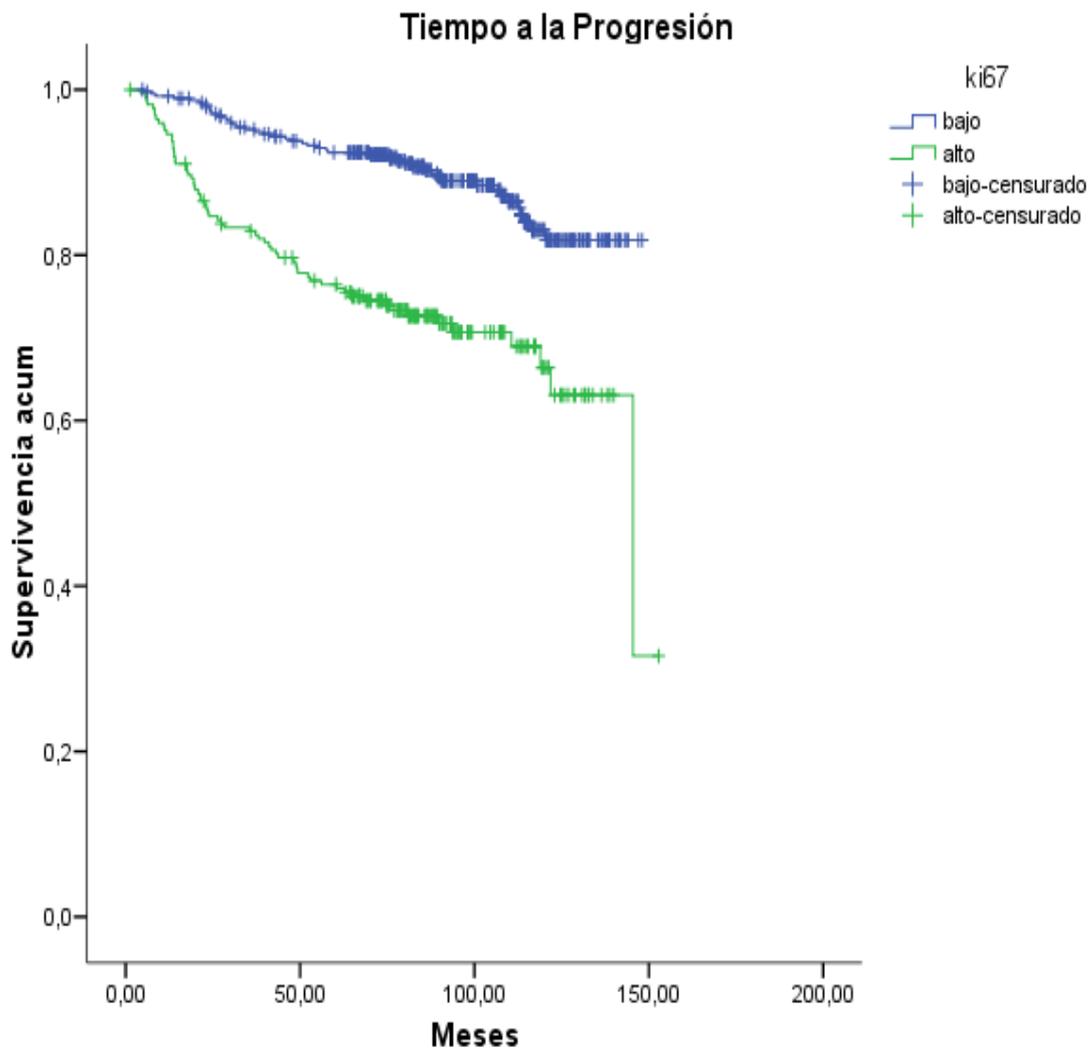
Para las mujeres cuyos tumores no expresaron Her-2, la media de tiempo a la progresión fue de 136, 87 meses (IC 95% 132,25-141,503) frente a los 120,14 (IC 95% 107,85-132,44) meses de media de tiempo a la progresión registrada para las mujeres con tumores Her-2 positivo. La expresión de Her-2 confiere peor pronóstico en términos de recaída, el riesgo es 1,74 (IC 95% 1,12-2,71) veces superior para las pacientes Her-2 (+) frente a las Her-2 (-).(Figura 19)



Test Log-Rank (Mantel-Cox), $p < 0,01$

8.3.8.- Análisis del tiempo a la progresión según la co-variable expresión de Ki-67.

La media de tiempo a la progresión de las mujeres con tumores con baja expresión de Ki-67 fue de 134,49 meses (IC 95% 130,80-138,18). En las mujeres con tumores con expresión alta de Ki-67 la media de tiempo a la progresión fue de 113,28 meses (IC 95% 105,12-121,43). La razón de riesgo de recaída para las mujeres con tumores con expresión alta de Ki-67 fue de 2,87 (IC 95% 1,96-4,19). (Figura 20)



Test Log-Rank (Mantel-Cox), $p < 0,001$

RESULTADOS

Con los datos de expresión de Ki-67 y tiempo a la progresión exhibidos por las pacientes de nuestro estudio, asumiendo una proporción de pérdidas del 6%, un p valor de 0,05 para la significación estadística, el tamaño muestral es suficiente para obtener una potencia estadística del 90%. A continuación se muestra la ventana de resultados obtenida con el programa EPIDAT 3.1 para el cálculo de la potencia estadística.

“Tamaños de muestra y potencia para comparación de curvas de supervivencia”

Número de grupos:	2
Razón entre muestras (grupo 2/grupo 1)*:	0,580
Proporción de pérdidas:	6%
Nivel de confianza:	95,0%

Probabilidad de supervivencia

Grupo 1	:	88
Grupo 2	:	71

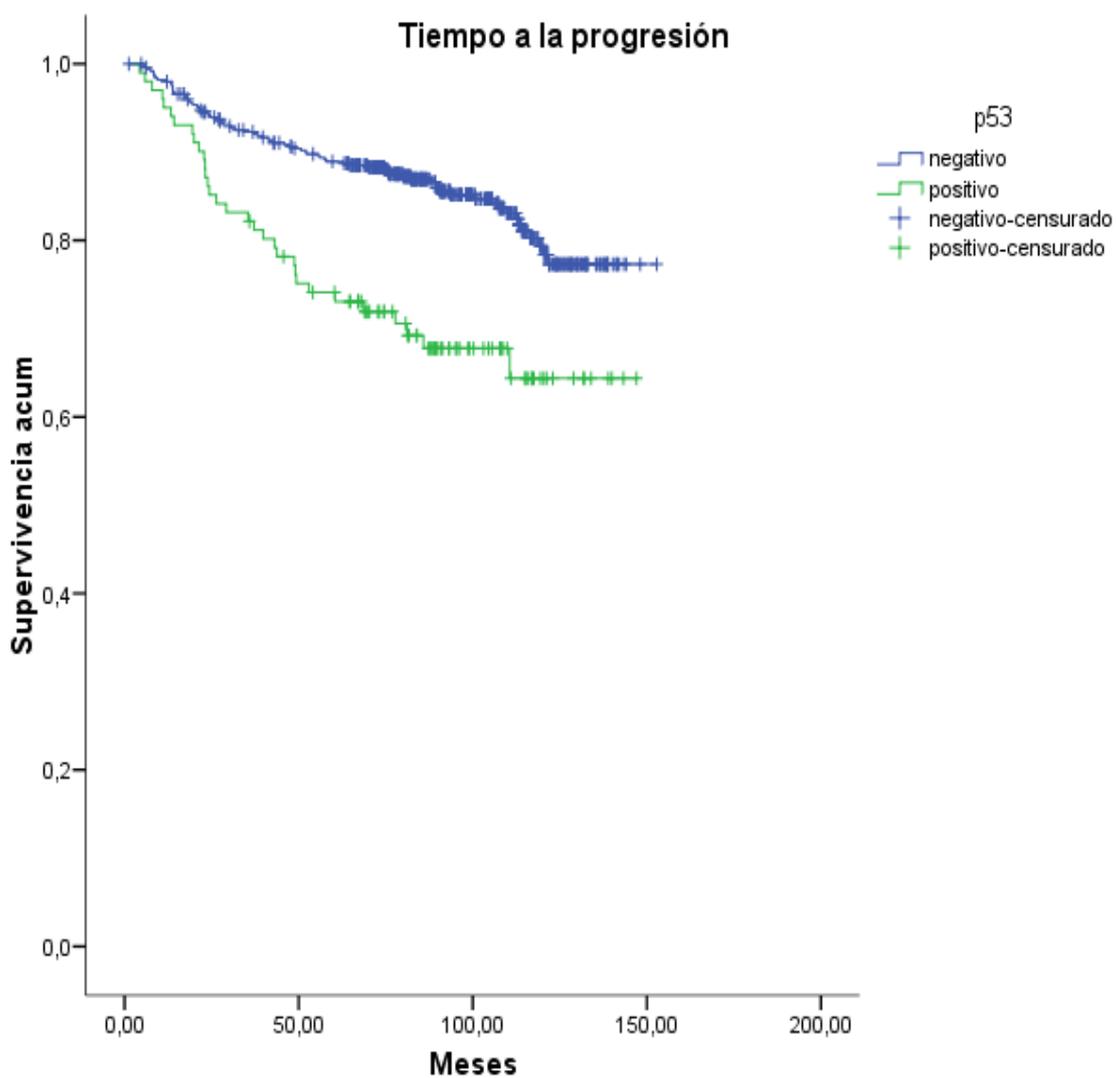
Potencia (%)	Grupo 1**	Grupo 2**
-----	-----	-----
80,0	129	75
90,0	172	100

* grupo 2 -> Ki-67 alto, grupo 1 -> Ki-67 bajo.

** número de individuos en el grupo

8.3.9.- Análisis del tiempo a la progresión según la co-variable expresión de p53.

Las pacientes con tumores que no expresaron p53 tuvieron una media de tiempo a la progresión de 133,21 meses (IC 95% 129,21-137,22) frente a los 110,19 (IC 95% 99,53-120,85) meses de media que se registraron para las mujeres con tumores que expresaron p53. La expresión de p53 (p53+) confiere peor pronóstico. Estas pacientes tienen 2,28 (IC 95% 1,41-3,54) veces más riesgo de recaída que las pacientes con p53 negativo. (Figura 21)



Test Log-Rank (Mantel-Cox), $p < 0,001$

RESULTADOS

Con los datos de expresión de p-53 y tiempo a la progresión exhibidos por las pacientes de nuestro estudio, asumiendo una proporción de pérdidas del 6%, un p valor de 0,05 para la significación estadística el tamaño muestral es suficiente para obtener una potencia estadística del 80%. A continuación se muestra la ventana de resultados obtenida con el programa EPIDAT 3.1 para el cálculo de la potencia estadística.

“Tamaños de muestra y potencia para comparación de curvas de supervivencia”

Número de grupos: 2

Razón entre muestras (grupo 2/grupo 1)*: 0,200

Proporción de pérdidas: 6%

Nivel de confianza: 95,0%

Probabilidad de supervivencia

Grupo 1 : 84,5

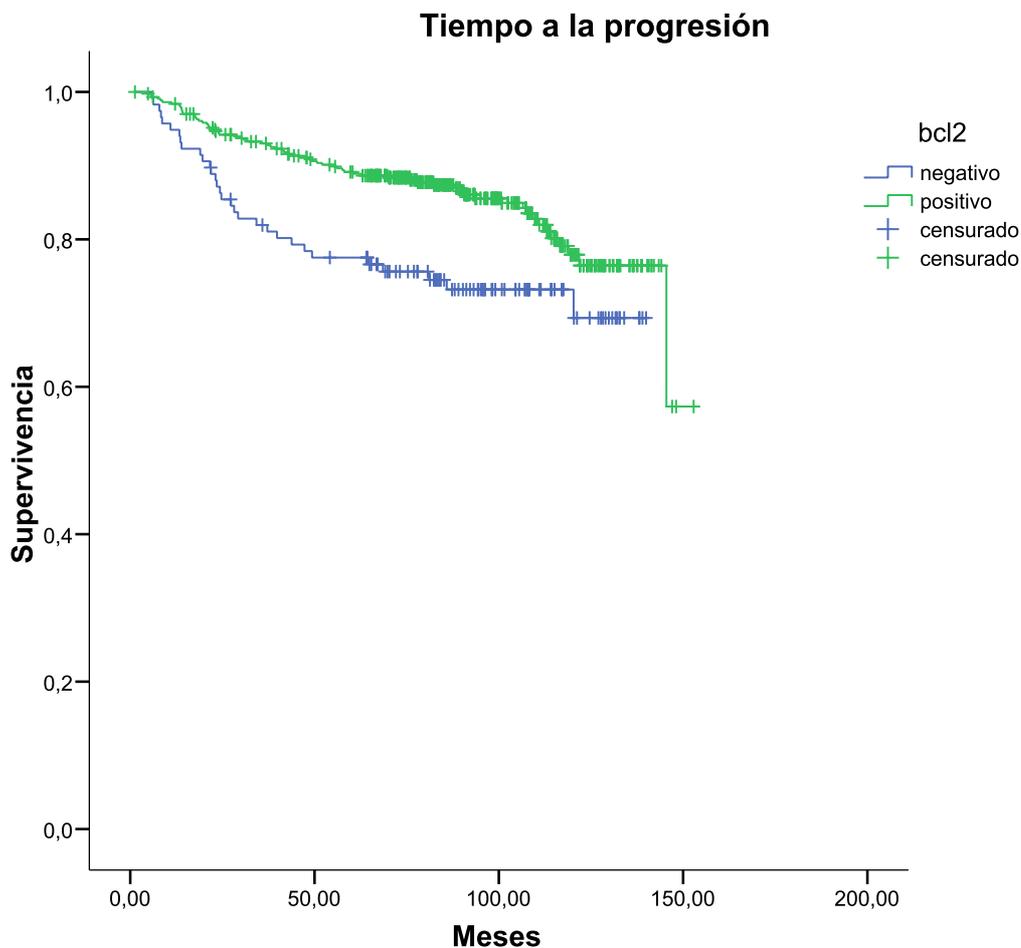
Grupo 2 : 68,3

Potencia (%)	Grupo 1	Grupo 2
-----	-----	-----
80,0	413	83

* Grupo 2 -> p53 positivo, grupo 1 -> p53 negativo.

8.3.10.- Análisis del tiempo a la progresión según la co-variable expresión de bcl-2.

Las pacientes con tumores que no expresaron bcl-2 tuvieron una media de tiempo a la progresión de 110,21 meses (IC 95% 101,12-119,29) frente a los 131,78 (IC 95% 126,89-136,67) meses de media que se registraron para las mujeres con tumores que expresaron bcl-2. La expresión de bcl-2 (bcl-2 +) confiere mejor pronóstico. Estas pacientes tienen 1,85 (IC 95% 1,20-2,85) veces menos riesgo de recaída que las pacientes con bcl-2 negativo. (Figura 22)



Test log-rank (Mantel-Cox), $p < 0,05$.

RESULTADOS

Con los datos registrados sobre bcl-2, asumiendo un p-valor de 0,05 y un 14% de datos perdidos, la potencia estadística obtenida con esta muestra sería del 60%, por ello se desestimó el análisis del valor pronóstico de la expresión de bcl-2 en nuestra muestra de mujeres con cáncer de mama locorregional. A continuación se muestra la ventana de resultados obtenida con el programa EPIDAT 3.1 para el cálculo de la potencia estadística.

“Tamaños de muestra y potencia para comparación de curvas de supervivencia”

Número de grupos: 2

Razón entre muestras (grupo 2/grupo 1)*: 3,720

Proporción de pérdidas: 14%

Nivel de confianza: 95,0%

Probabilidad de supervivencia

Grupo 1 : 73,5

Grupo 2 : 84,6

Potencia (%)	Grupo 1	Grupo 2
60,0	110	409
70,0	138	513

*Grupo 2 -> positivo, grupo 1 -> negativo.

8.4.- Análisis del tiempo a la progresión. Regresión de Cox.

Se introducen todas las variables en el modelo independientemente de su significación en el análisis univariante.

De acuerdo con Royston, no se incluye la co-variable bcl-2 debido al número de casos perdidos y a la pérdida consiguiente de potencia estadística.

Para la inclusión de las variables en el modelo se ha utilizado el método de selección manual. Se ha exigido un p valor de 0,05 para la entrada de las variables en el modelo. La significación se analiza mediante la evaluación de -2 log de la verosimilitud con el estadístico X². Con los coeficientes de las variables significativas se construye el “risk score” para tiempo a la progresión. Se reproduce la sintaxis de la instrucción en el programa estadístico.

COXREG

```
progresionmeses /STATUS=estado_recaida_tp(1)
/CONTRAST (gruposedad)=Indicator(1) /CONTRAST (T)=Indicator(1)
/CONTRAST (ganglios)=Indicator(1) /CONTRAST (grado)=Indicator(1)
/CONTRAST (RE)=Indicator(1) /CONTRAST (RP)=Indicator(1) /CONTRAST
(erb2)=Indicator(1) /CONTRAST (ki67)=Indicator(1) /CONTRAST (p53)
=Indicator(1)
/METHOD=ENTER gruposedad T ganglios grado RE RP erb2 ki67 p53
/PRINT=CI (95) BASELINE
/CRITERIA=PIN (.05) POUT(.10) ITERATE(20) .
```

Pruebas omnibus sobre los coeficientes del modelo

-2 log de la verosimilitud
1307,337

Pruebas omnibus sobre los coeficientes del modelo(a,b)

-2 log de la verosimilitud	Global (puntuación)			Cambio desde el bloque anterior		
	Chi-cuadrado	gl	Sig.	Chi-cuadrado	gl	Sig.
1155,000	225,177	15	,000	152,337	15	,000

a Bloque inicial número 0, función log de la verosimilitud inicial: -2 log de la verosimilitud: 1307,337

b Bloque inicial número 1. Método = Introducir

Variables en la ecuación. (Tabla 23)

	B	ET	Sig.	Exp(B)	95,0% IC para Exp(B)	
	Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior
Edad 40-60 años			,065			
Menores de 40 años	,776	,334	,020	2,172	1,130	4,176
Mayores de 60 años	,276	,227	,225	1,318	,844	2,057
T1			,000			
T2	,960	,279	,001	2,612	1,511	4,518
T3	1,337	,377	,000	3,809	1,818	7,982
T4	2,184	,375	,000	8,879	4,254	18,534
Ganglios negativos			,000			
Ganglios positivos 1-3	,275	,283	,331	1,317	,756	2,293
Ganglios positivos 4-7	,769	,315	,015	2,157	1,164	3,995
Ganglios positivos >7	1,731	,285	,000	5,644	3,228	9,871
Grado bien diferenciado			,532			
Grado moderadamente diferenciado	-,265	,289	,360	,767	,435	1,353
Grado pobremente diferenciado	-,036	,310	,907	,965	,525	1,772
RE positivos	-,271	,283	,337	,762	,438	1,327
RP positivos	-,329	,222	,138	,719	,466	1,112
erb2 positivo	-,174	,269	,518	,840	,496	1,424
Ki67 alto	,567	,260	,029	1,762	1,058	2,934
P53 positivo	,087	,264	,742	1,091	,650	1,831

El modelo de Cox puede representarse mediante la siguiente función:

$$H(t, X_1, \dots, X_n) = H_0(t) e^{(B_1 X_1 + \dots + B_n X_n)}$$

El riesgo H , de recaída en este caso, en un tiempo determinado, se calcula con el riesgo basal que multiplica al número e elevado a un coeficiente. El riesgo basal (H_0) es el que presenta una paciente con valor 0 en todos sus coeficientes. El coeficiente es una función que incluye todas las variables explicativas del modelo. Nuestro modelo final para el tiempo a la progresión incluye las variables menores de 40 años, categoría T2, T3, T4, ganglios axilares afectados de 4 a 7 ó más de 7, expresión alta de Ki-67 (índice Ki-67).

Si sustituimos en la fórmula los (B) correspondientes:

$$H_t = (H_0) \times e^{(0,77(\text{menores 40 años}) + (0,96(\text{en caso de T2})) \text{ ó } (1,33(\text{en caso de T3}))) \text{ ó } (2,18(\text{en caso de T4})) + (0,76(\text{en caso de 4-7 ganglios})) + (1,73(\text{en caso de } > 7 \text{ ganglios})) + (0,56(\text{en caso de índice Ki-67 alto}))}$$

Se aplican los coeficientes siempre que se cumpla la condición entre paréntesis, en caso contrario el coeficiente se multiplica por 0.

Riesgo basal de recaída.

12 meses → 0,011

24 meses → 0,04

36 meses → 0,056

48 meses → 0,072

60 meses → 0,088

72 meses → 0,09

84 meses → 0,11

96 meses → 0,125

108 meses → 0,13

120 meses → 0,172

Ejemplo: Riesgo a 24 meses de paciente de 36 años con T2 N+ (5 ganglios) e índice Ki-67 alto.

$H(24)=0,04 \times e^{(0,96+0,76+0,77+0,56)} = 0,04 \times 9,04=0,36$ Riesgo de 36% de recaída a 24 meses.

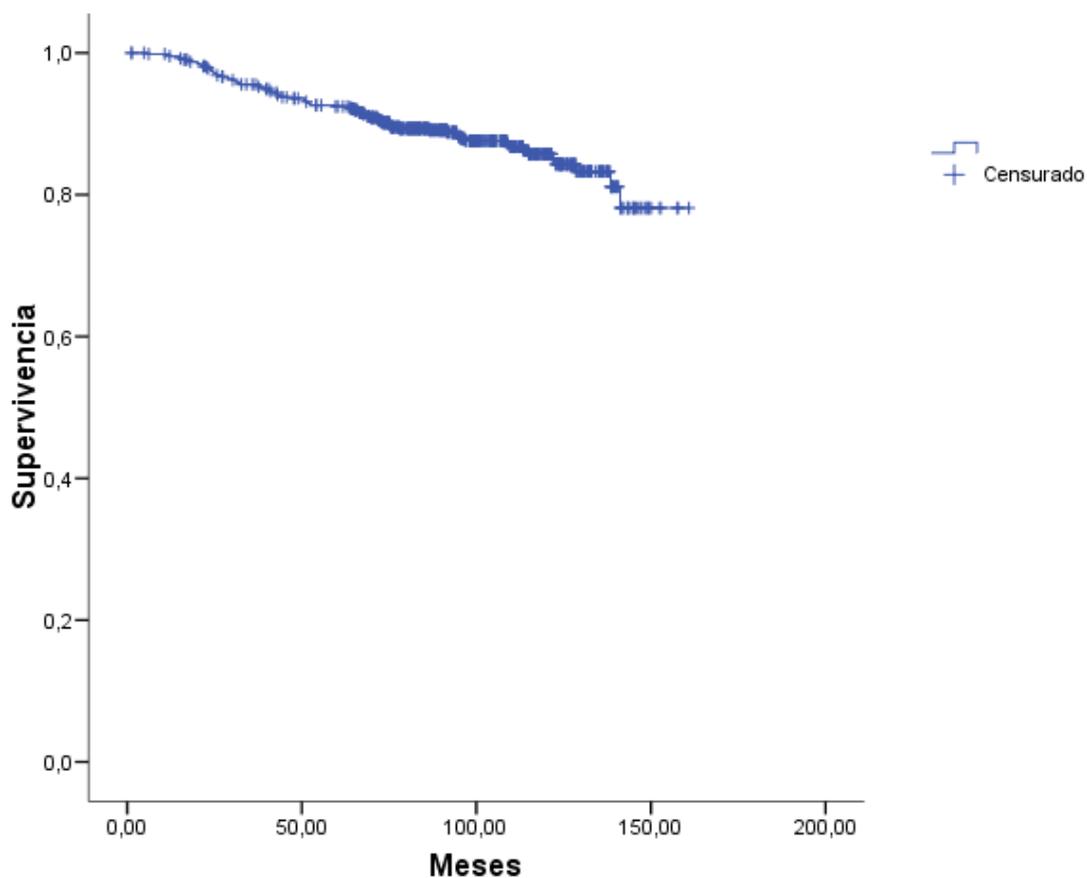
Suponemos el mismo caso pero con Ki-67 bajo, el modelo predice: $H(24)=0,04 \times e^{(0,96+0,76+0,77)} = 0,04 \times 7,28 = 0,2912$. Riesgo de 29,12% de recaída a 24 meses.

8.5.- Análisis de la supervivencia causa específica. Análisis Univariante.

De las 643 pacientes incluidas en el estudio, fallecieron por cáncer de mama 79, lo que supone un 12,3% de los casos.

La supervivencia global a 5 años fue del 92,4%, y del 85,7% a 10 años.

La mediana de supervivencia aún no se ha alcanzado, por esto como medida de tendencia central utilizaremos la media. La supervivencia media es de 144,27 meses (IC 95% 140,73-147,80). (Figura 23)

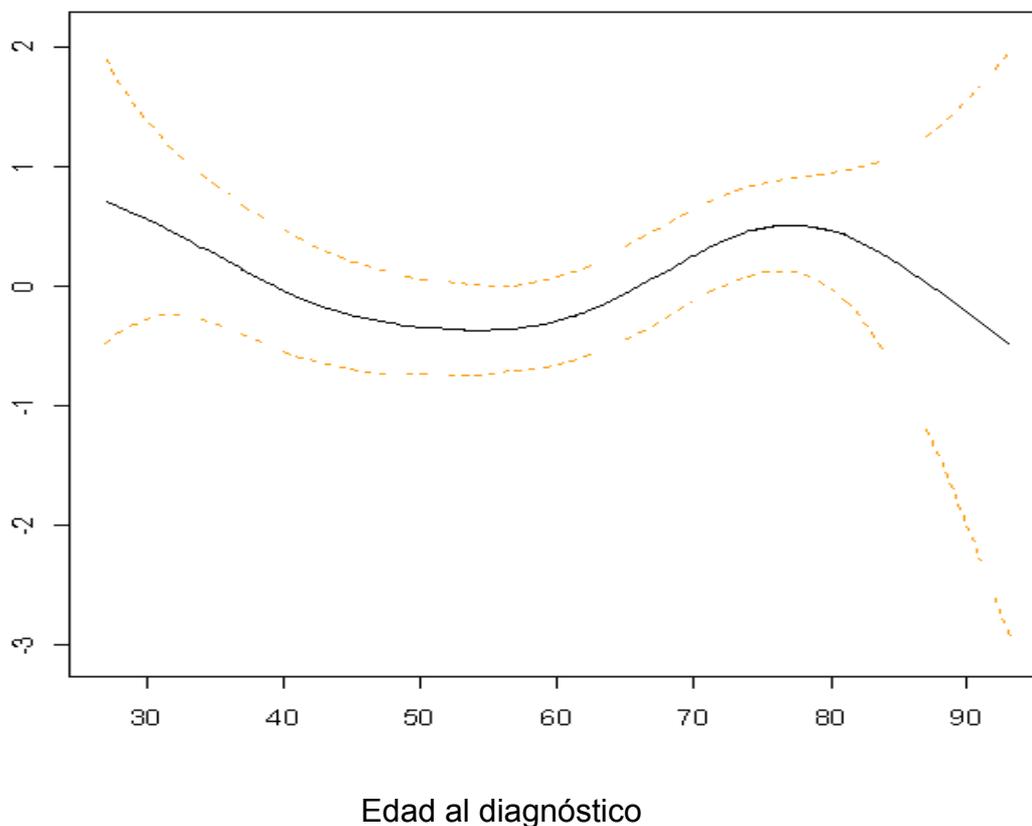


8.5.1.- Análisis de la supervivencia causa específica según la co-variable edad.

La supervivencia media en las mujeres menores de 40 años es de 123,62 meses (IC 95% 112,30-134,94). En las mujeres entre 40 y 60 años la supervivencia media observada fue de 143,54 meses (IC 95% 138,01-149,06). La supervivencia media de las pacientes mayores de 60 años fue de 144,29 meses (IC 95% 139,57-149,01).

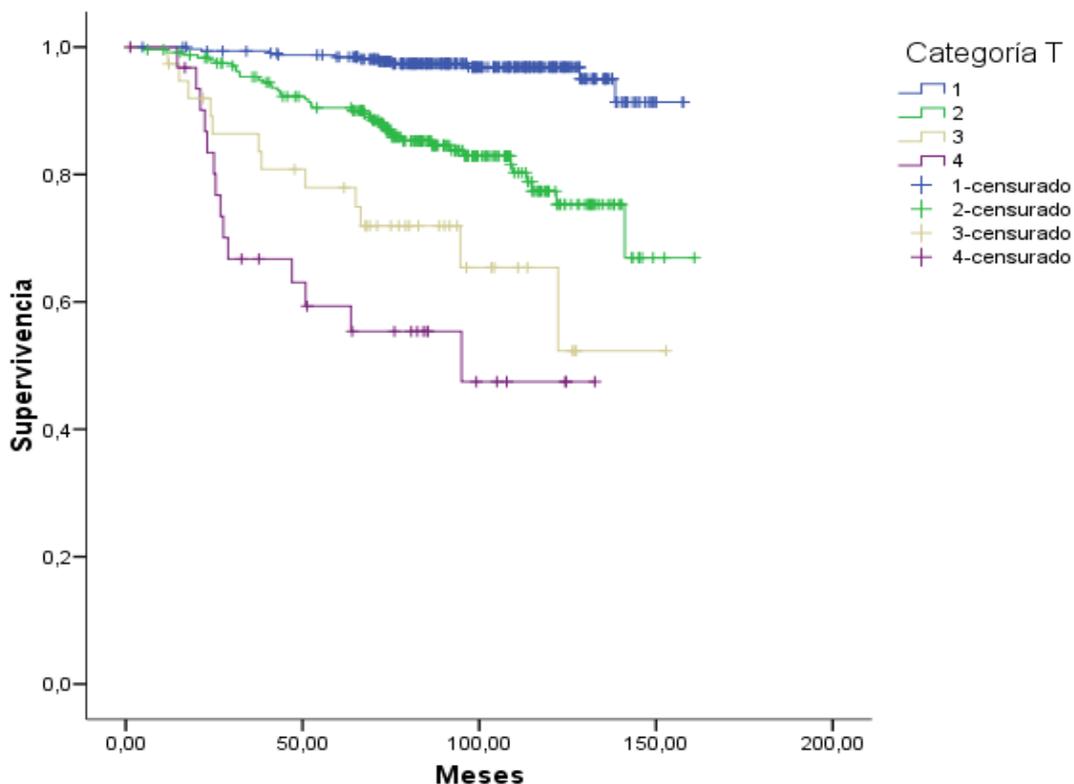
Para determinar el efecto de la edad en la supervivencia realizamos un modelo de regresión Cox suavizado (regresión a trazos (p-spline)) similar al utilizado con el tiempo a la progresión. Se confirmó el comportamiento no lineal de la variable edad se establecieron grupos etarios (menores de 40 años, 40-60 años, mayores de 60 años) con riesgos de muerte diferentes. (Figura 24)

Supervivencia Causa Específica



8.5.2.- Análisis de la supervivencia causa específica según la co-variable categoría T.

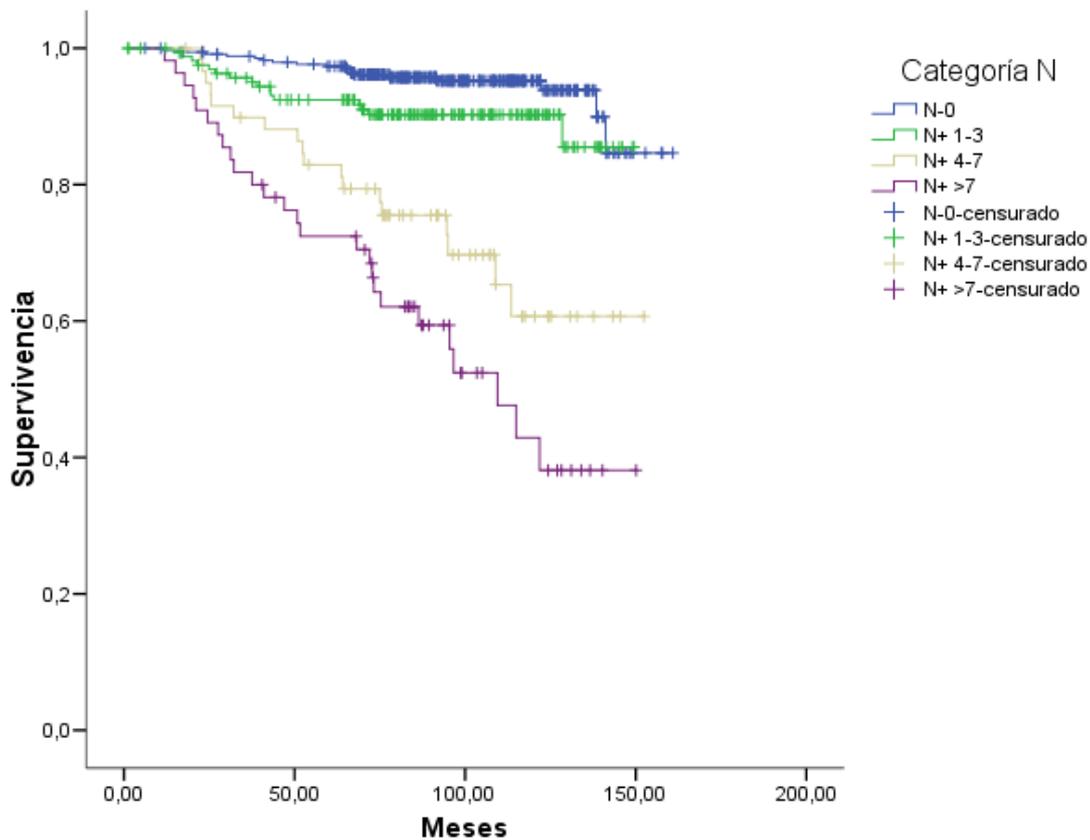
La supervivencia media de las mujeres con tumores T1 fue de 153,45 meses (IC 95% 150,81-156,08). Para aquellas con tumores T2 fue de 137,4 meses (IC 95% 130,68-144,12). En las pacientes con tumores T3 la supervivencia media fue de 112,21 meses (IC 95% 93,67-130,76), en las mujeres con tumores T4 la supervivencia media alcanzada fue de 84,45 meses (IC 95% 65,98-102,92). La diferencia observada alcanzó la significación estadística, $p < 0,001$. La regresión de Cox univariante confirmó que comparadas con las pacientes tumores T1, el exceso de riesgo de las mujeres con tumores T2 fue de 5,9 (IC 95% 3,03-11,49), 13,34 (IC 95% 5,87-30,31) y 24,05 (IC 95% 10,85-53,3) para las pacientes T3 y T4 respectivamente. (Figura 25)



Test log-rank (Mantel-Cox), $p < 0,001$.

8.5.3.- Análisis de la supervivencia causa específica según la co-variable categoría N.

La supervivencia media de las pacientes sin ganglios axilares metastizados fue de 153,24 meses (IC 95% 149,52-156,95). La supervivencia media de las mujeres con ganglios axilares afectados fue de 137,72 meses (IC95% 132,23-143,22); 119,19 meses (IC 95% 106,45-131,94); 98,70 meses 7,2 (IC 95% 84,58-112,83) según tuviesen de 1 a 3 ganglios afectados, 4 a 7 o bien más de 7 ganglios afectados respectivamente. (Figura 26)



Test log-rank (Mantel-Cox), $p < 0,001$

La regresión de Cox indica que respecto a las mujeres sin metástasis ganglionares axilares las pacientes de 1 a 3 ganglios tenían un exceso de riesgo de muerte de 2,052 (IC 95% 1,04 - 4,02). Las pacientes con 4 a 7 ganglios tenían 6,58 veces más riesgo (IC 95% 3,42- 12,65), para las pacientes

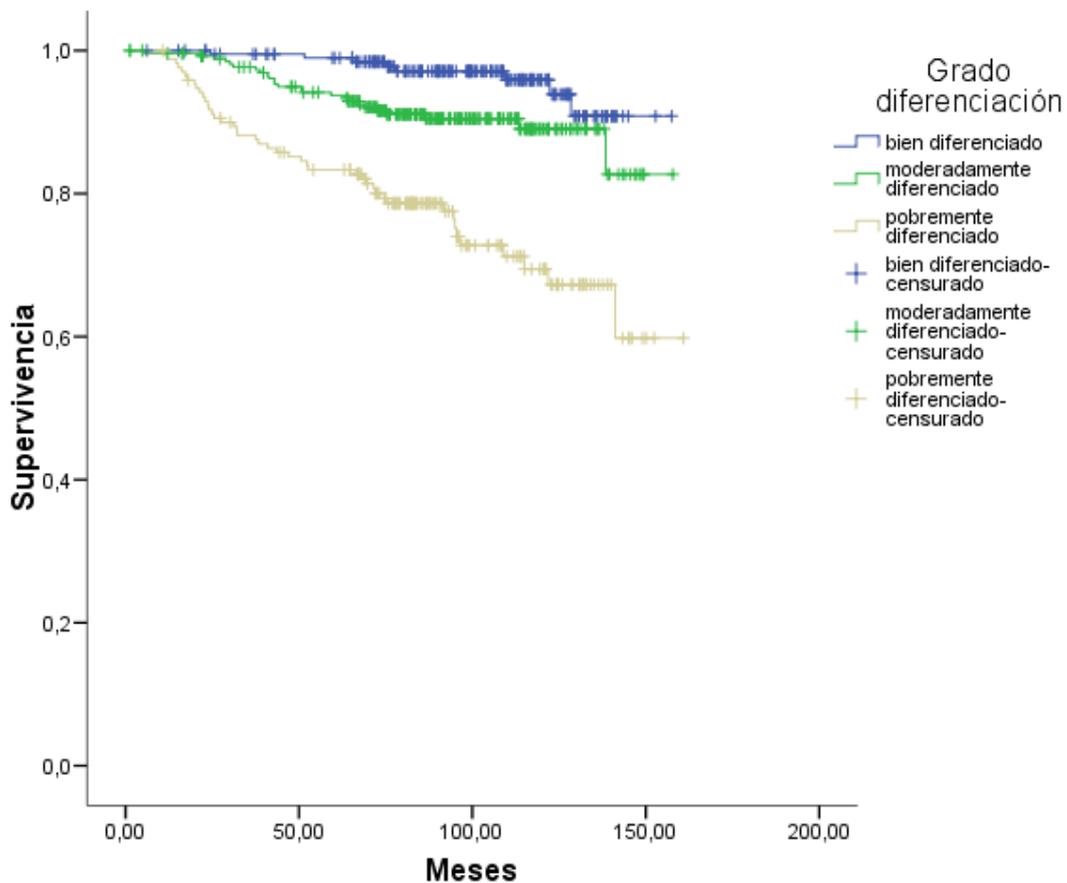
RESULTADOS

con más de 7 ganglios afectados el exceso de riesgo fue de 11,63 (IC 95%
6,37- 21,24)

8.5.4.- Análisis de la supervivencia causa específica según la co-variable grado histológico.

La supervivencia media de las pacientes con tumores bien diferenciados fue de 152,5 meses (IC 95% 149,11-155,89); 145,61 meses (IC 95% 140,84-150,38) para las mujeres con tumores moderadamente diferenciados. La supervivencia media de las pacientes con tumores pobremente diferenciados fue de 126,76 meses (IC 95% 118,10-135,42). La diferencia observada en la supervivencia alcanzó la significación estadística, $p < 0,01$

La regresión de Cox determina que las pacientes con tumores moderadamente diferenciados tuvieron un exceso de riesgo de muerte de 2,58 veces (IC 95% 1,16- 5,78) y de 7,41 veces (IC 95% 3,49- 15,76) para las mujeres con tumores pobremente diferenciados. (Figura 27)

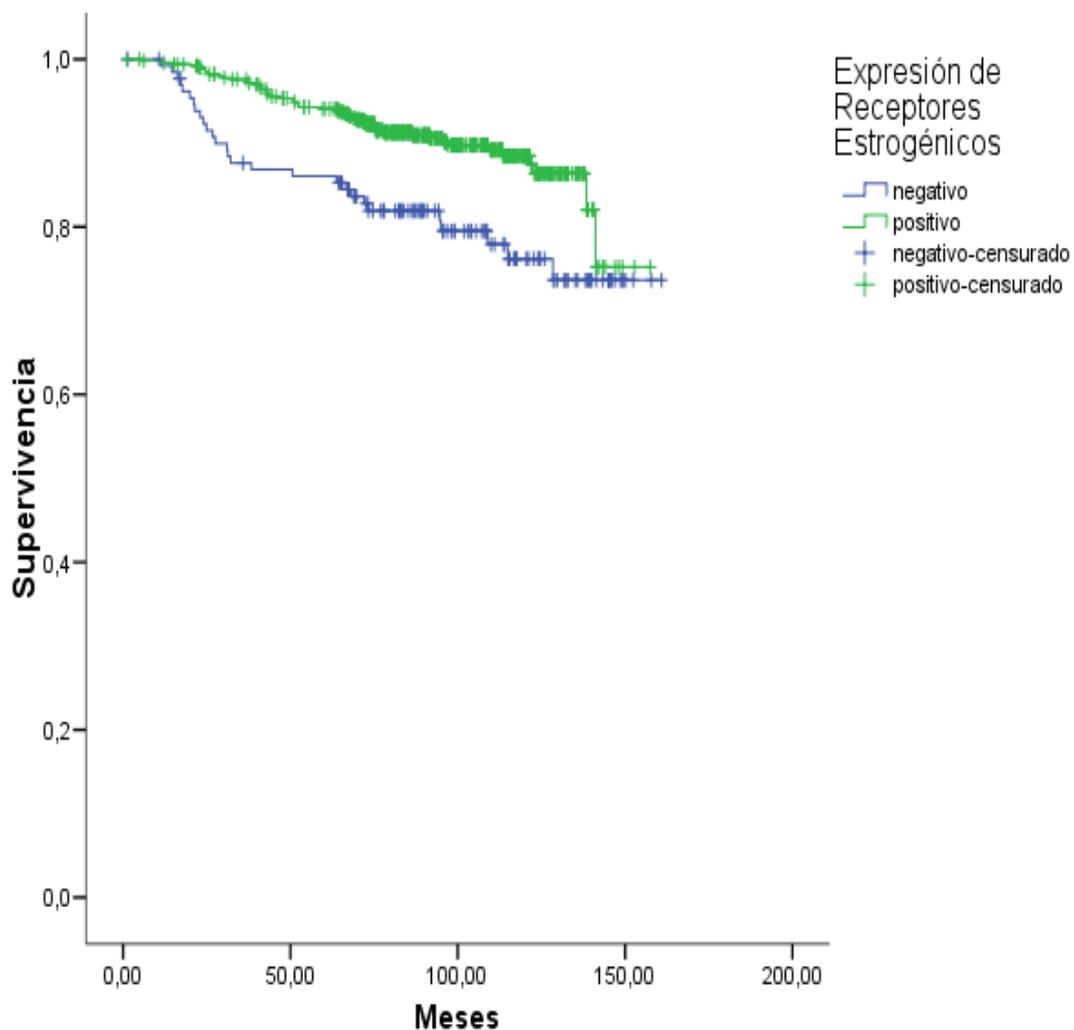


Test log-rank (Mantel-Cox), $p < 0,001$

8.5.5.- Análisis de la supervivencia causa específica según la co-variable expresión de receptores estrogénicos.

Las mujeres con tumores que expresaban receptores de estrógenos tuvieron una media de supervivencia más alta que las mujeres cuyos tumores no expresaban receptores, 143,61 meses (IC 95% 139,59- 147,63) frente a 134,08 meses (IC 95% 125,22-142,95). Esta diferencia alcanzó la significación estadística, $p=0,002$.

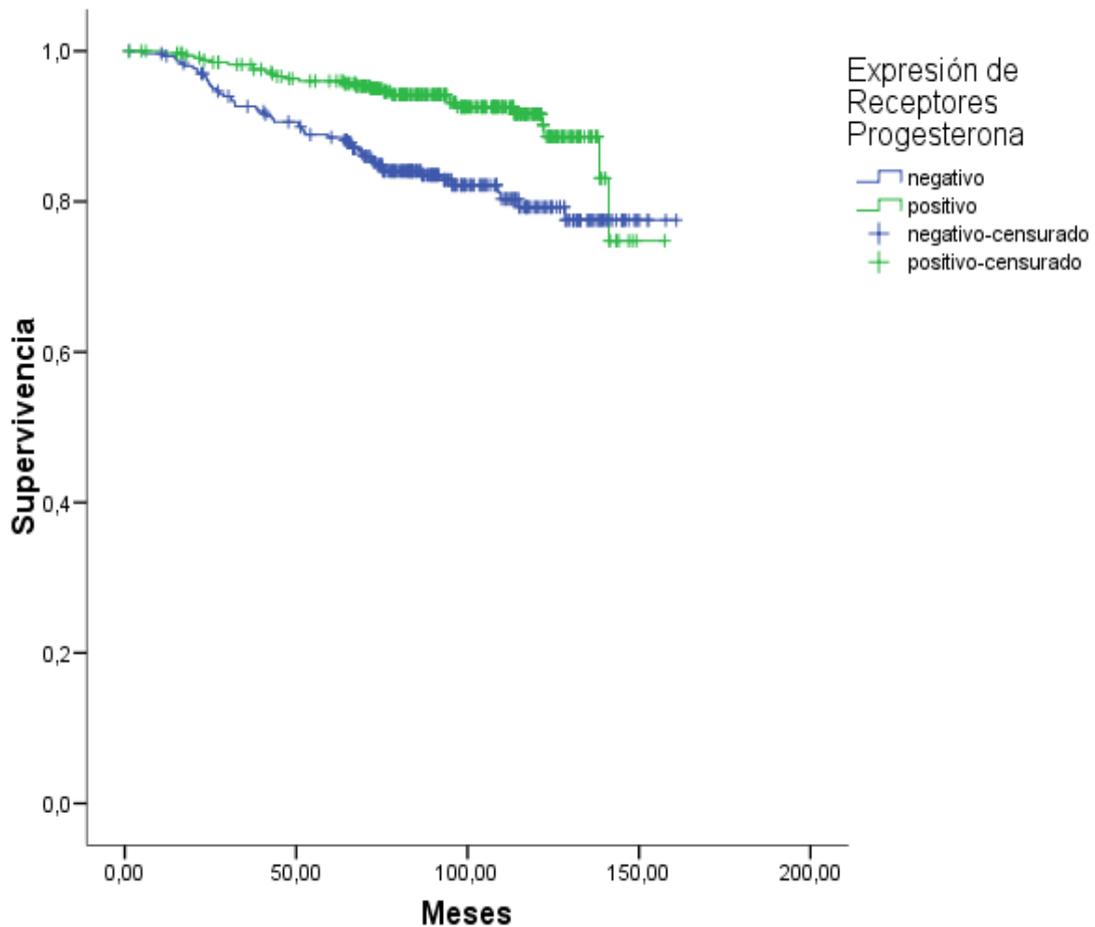
En la regresión de Cox, el exceso de riesgo de las mujeres con tumores que no expresaron receptores de estrógenos fue de 2,04 (IC 95% 1,28- 3,24). (Figura 28)



Test log-rank (Mantel-Cox), $p=0,002$.

8.5.6.- Análisis de la supervivencia causa específica según la co-variable expresión de receptores de progesterona.

Las mujeres con tumores que expresaron receptores de progesterona tuvieron una supervivencia media de 146,05 meses (IC 95% 141,46-150,64) frente a los 138,62 meses (IC 95% 133,16-144,09) que alcanzaron las mujeres con tumores que no expresaban receptores de progesterona. (Figura 29)

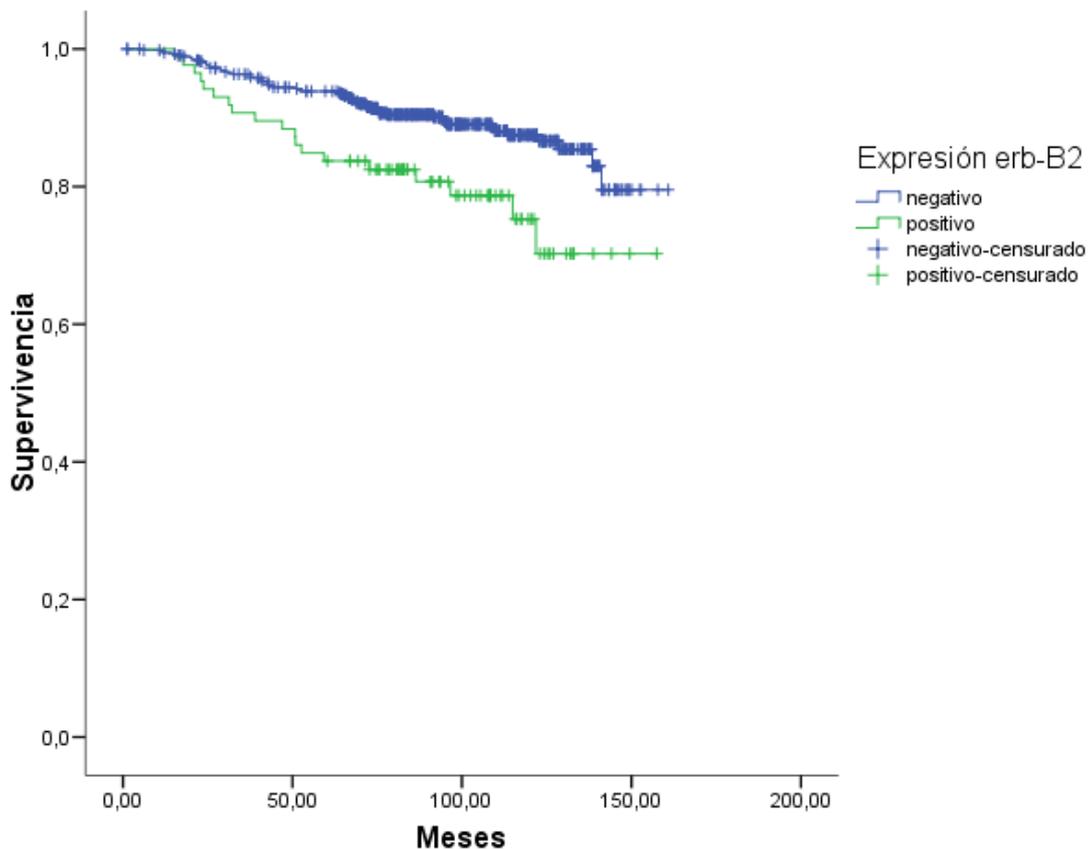


Test log-rank (Mantel-Cox), $p < 0,001$

La regresión de Cox indica un exceso de riesgo de muerte en las mujeres con tumores que no expresaron receptores de progesterona de 2,35 (IC 95% 1,47-3,77)

8.5.7.- Análisis de la supervivencia causa específica según la co-variable expresión de Her-2.

Las pacientes con tumores que no expresaron Her-2 tuvieron una supervivencia media de 146,1 meses (IC 95% 142,44-149,77). Por el contrario las pacientes con tumores que expresaron Her-2 tuvieron una supervivencia de 130,75 meses (IC 95% 120,13-141,38). La diferencia observada alcanzó la significación estadística, $p=0,005$. (Figura 30)



Test log-rank (Mantel-Cox), $p=0,005$.

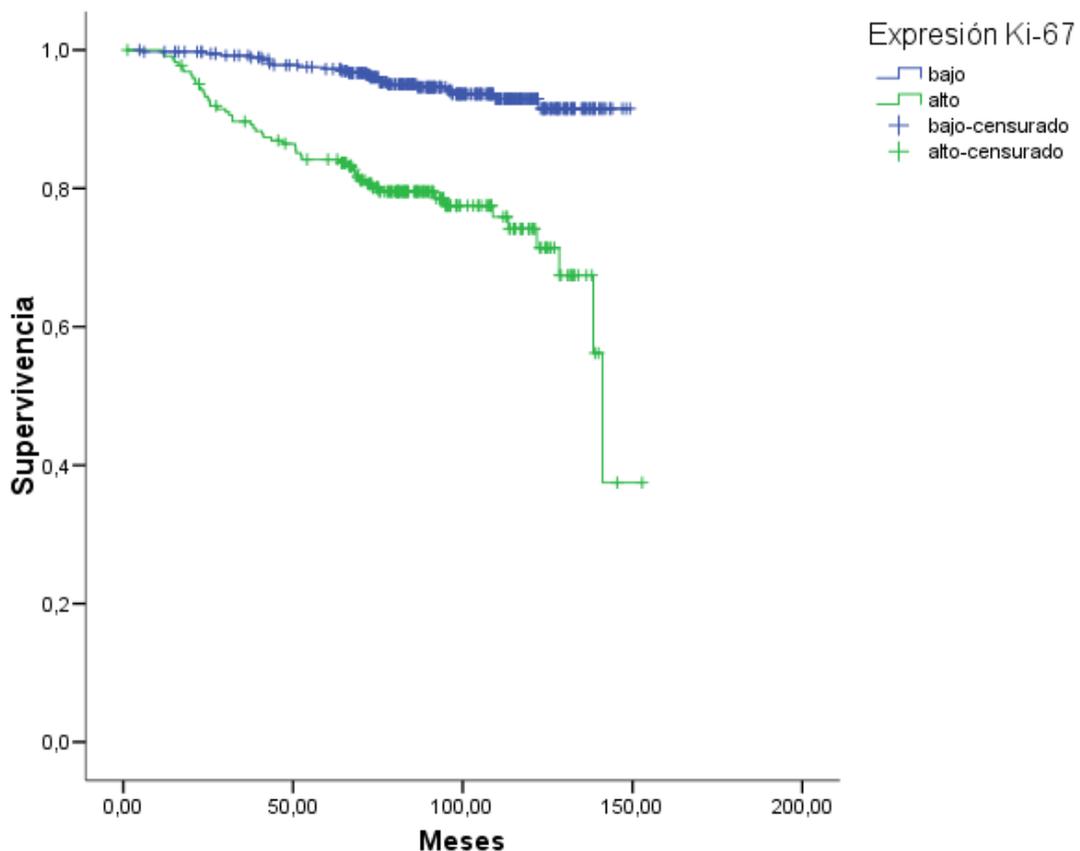
La regresión de Cox indica un exceso de riesgo de 2,06 para las mujeres con sobreexpresión de Her-2 (IC 95% 1,23-3,46).

8.5.8.- Análisis de la supervivencia causa específica según la co-variable expresión de Ki-67.

Las pacientes con tumores con expresión “alta “de Ki-67 tuvieron una supervivencia media de 121,34 meses (IC 95% 113,80-128,88). Las mujeres con tumores con expresión “baja” de Ki-67 tuvieron una supervivencia media de 143 meses, error estándar 1,29 (IC 95% 140,48-145,53)

La diferencia observada, alcanzó la significación estadística, $p < 0,001$.

La regresión de Cox, muestra un exceso de riesgo de 4,69 veces (IC 95% 2,84-7,73) en las mujeres con expresión “alta” de Ki-67. (Figura 31)



Test log-rank (Mantel-Cox), $p < 0,001$

Con los datos de supervivencia causa específica obtenidos en las mujeres, en función de la expresión de Ki-67, con un 6% de pérdidas y un nivel de

RESULTADOS

confianza del 95% con nuestra muestra obtenemos una potencia estadística de 90%. A continuación se muestra la ventana de resultados obtenida con el programa EPIDAT 3.1 para el cálculo de la potencia estadística.

“Tamaños de muestra y potencia para comparación de curvas de supervivencia”

Número de grupos: 2

Razón entre muestras (grupo 2/grupo 1)*: 0,587

Proporción de pérdidas: 6%

Nivel de confianza: 95,0%

Probabilidad de supervivencia

Grupo 1 : 94,3

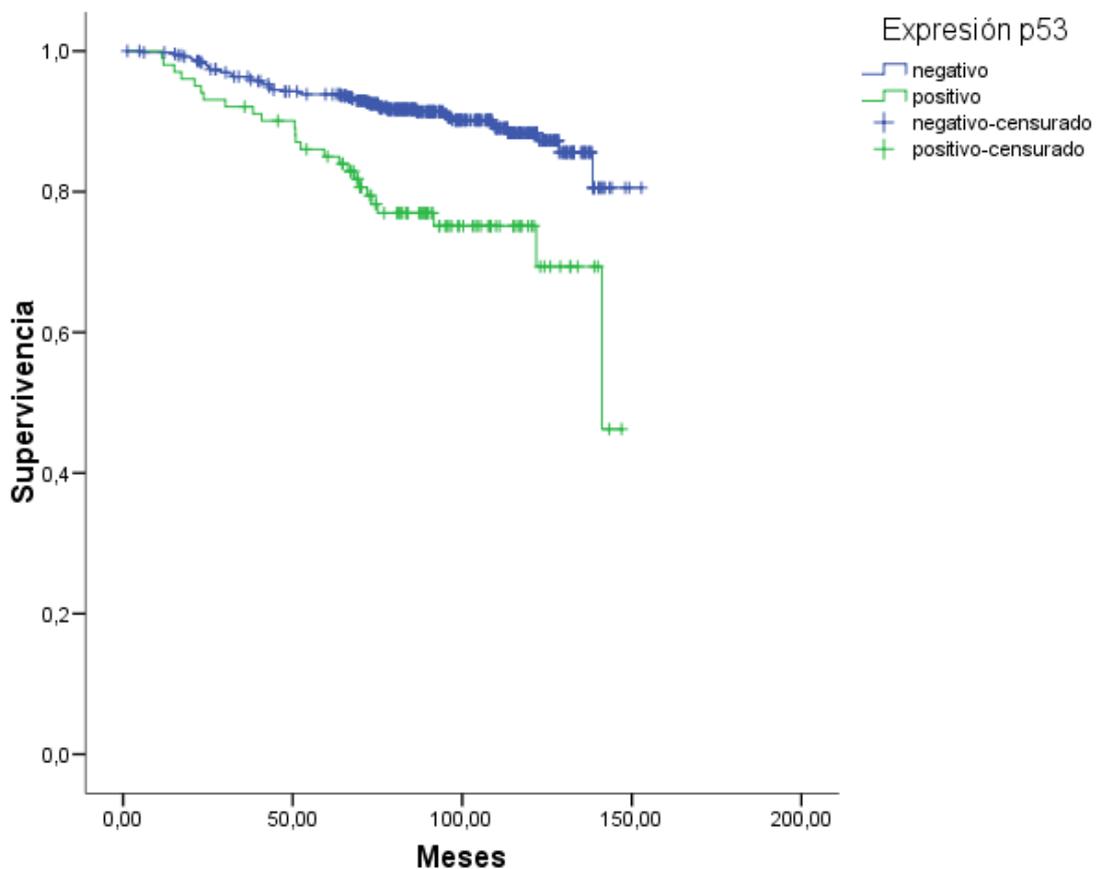
Grupo 2 : 76,9

Potencia (%)	Grupo 1	Grupo 2
80,0	83	49
90,0	111	65

* Grupo 1 -> Índice Ki-67 bajo, grupo 2 -> Índice Ki-67 alto.

8.5.9.- Análisis de la supervivencia causa específica según la co-variable expresión de p53.

Las mujeres con tumores que no expresaron p53 tuvieron una supervivencia media de 140,47 meses (IC 95% 137,06-143,88). La supervivencia media de las mujeres con tumores que expresaron p53 fue de 119,93 meses (IC 95% 110,8-129,06). (Figura 32)



Test log-rank (Mantel-Cox), $p < 0,001$

La regresión de Cox muestra que las pacientes con tumores que expresaban p53 tenían 2,68 veces más riesgo de muerte que las pacientes con tumores que no expresaban p53.

Con los datos de supervivencia obtenidos en las mujeres en función de la expresión de p53, con un 6% de pérdidas y un nivel de confianza del 95% con

nuestra muestra obtenemos una potencia estadística de 80%. A continuación se transcriben los resultados obtenidos con el programa Epidat 3.1.

“Tamaños de muestra y potencia para comparación de curvas de supervivencia”

Número de grupos: 2

Razón entre muestras (grupo 2/grupo 1)*: 0,200

Proporción de pérdidas: 6%

Nivel de confianza: 95,0%

Probabilidad de supervivencia

Grupo 1 : 90,3

Grupo 2 : 75,2

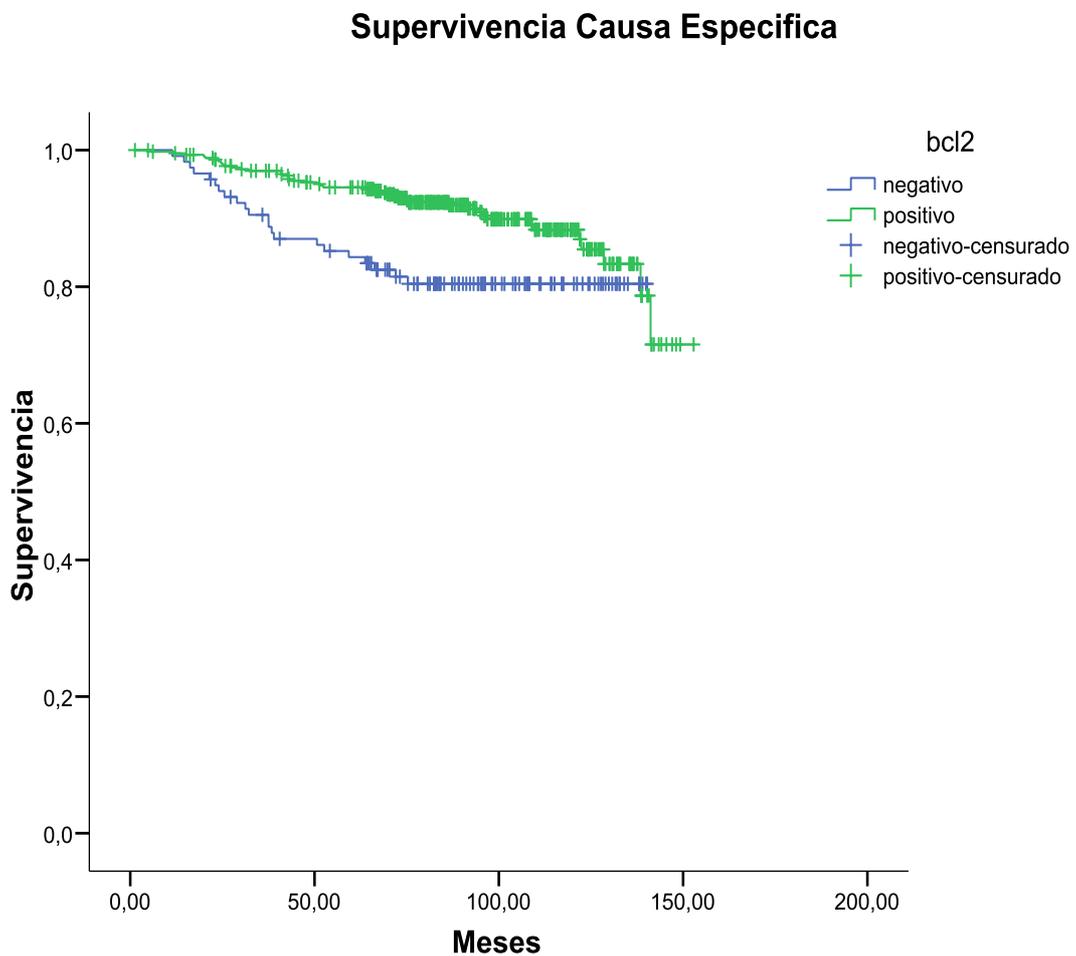
Potencia (%) Grupo 1 Grupo 2

	-----	-----	-----
80,0	389	78	
90,0	521	104	

* Grupo 1 -> p53 negativo, grupo 2 -> p53 positivo,.

8.5.10.- Análisis de la supervivencia causa específica según la co-variable expresión de bcl-2

Las mujeres con tumores que no expresaron bcl-2 tuvieron una supervivencia media de 120,41 meses (IC 95% 112,86-127,97). La supervivencia media de las mujeres con tumores que expresaron bcl-2 fue de 139,41 meses (IC 95% 135,47-143,34). (Figura 33)



Test log-rank (Mantel-Cox), $p < 0,05$

La regresión de Cox indica que las pacientes con tumores que no expresaron bcl-2 tuvieron 2 (IC 95% 1,20-3,38) veces más riesgo de muerte por cáncer de mama que las pacientes que expresaron bcl-2.

Con los datos de supervivencia causa específica obtenidos en estas mujeres con cáncer de mama no metastásico, en función de la expresión de bcl-2, con un p- valor de 0,05 y un 14% de datos perdidos, la potencia estadística obtenida con el tamaño muestral analizado alcanza el 70%. A continuación se muestra la pantalla de resultados obtenido con el programa EPIDAT 3.1.

“Tamaños de muestra y potencia para comparación de curvas de supervivencia”

Número de grupos: 2

Razón entre muestras (grupo 2/grupo 1)*: 3,700

Proporción de pérdidas: 14%

Nivel de confianza: 95,0%

Probabilidad de supervivencia

Grupo 1 : 84,3
Grupo 2 : 94,5

Potencia (%)	Grupo 1	Grupo 2
70,0	98	363
80,0	124	459

* Grupo 1 -> bcl-2 negativo, grupo 2 -> bcl-2 positivo.

8.6.- Análisis de la supervivencia causa específica. Regresión de Cox.

Se introducen todas las variables consideradas en el análisis, excepto el estado de expresión de bcl-2 por los mismos motivos explicados al considerar el tiempo a la progresión. Se utiliza el método de selección de variables manual. Se considera un p valor de 0,05. La significación se analiza mediante la evaluación de $-2 \log$ de la verosimilitud con el estadístico X^2 .

Con los coeficientes de las variables significativas se construye el “risk score” para supervivencia causa específica. Se reproduce la sintaxis de la orden ejecutada por el programa estadístico.

COXREG

```
supervivenciameses /STATUS=SCespecifica(1)
/PATTERN BY gruposedad
/CONTRAST (gruposedad)=Indicator(1) /CONTRAST (T)=Indicator(1)
/CONTRAST (ganglios)=Indicator(1) /CONTRAST (grado)=Indicator(1)
/CONTRAST (RE)=Indicator(1) /CONTRAST (RP)=Indicator(1) /CONTRAST
(erb2 )=Indicator(1) /CONTRAST (ki67)=Indicator(1) /CONTRAST (p53)
=Indicator(1)
/METHOD=ENTER gruposedad T ganglios grado RE RP erb2 ki67 p53
/PRINT=CI (95) BASELINE
/CRITERIA=PIN (.05) POUT(.10) ITERATE(20) .
```

Pruebas omnibus sobre los coeficientes del modelo

-2 log de la verosimilitud
861,391

Pruebas omnibus sobre los coeficientes del modelo(a,b)

-2 log de la verosimilitud	Global (puntuación)			Cambio desde el paso anterior		
	Chi-cuadrado	gl	Sig.	Chi-cuadrado	gl	Sig.
726,475	183,971	15	,000	134,916	15	,000

a Bloque inicial número 0, función log de la verosimilitud inicial: -2 log de la verosimilitud: 861,391

b Bloque inicial número 1. Método = Introducir

Variables en la ecuación. (Tabla 24)

	B	ET	Sig.	Exp(B)	95,0% IC para Exp(B)	
	Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior
Edad 40-60 años (indicador)			,146			
Menores de 40 años	,649	,399	,104	1,913	,876	4,179
Mayores de 60 años	,493	,287	,087	1,637	,932	2,875
T1(indicador)			,001			
T2	,861	,366	,019	2,365	1,154	4,844
T3	1,388	,459	,003	4,006	1,628	9,858
T4	1,865	,467	,000	6,453	2,584	16,117
Ganglios negativos (indicador)			,000			
Ganglios positivos 1-3	,301	,375	,422	1,351	,648	2,816
Ganglios positivos 4-7	,978	,375	,009	2,659	1,275	5,546
Ganglios positivos >7	1,889	,360	,000	6,610	3,266	13,374
Grado bien diferenciado (indicador)			,055			
Grado moderadamente diferenciado	,286	,439	,515	1,332	,563	3,151
Grado Pobrementemente diferenciado	,876	,443	,048	2,401	1,007	5,721
RE positivos	-,053	,325	,870	,948	,501	1,793
RP positivos	-,385	,275	,160	,680	,397	1,165
erb2 positivo	-,072	,308	,814	,930	,509	1,701
ki67 alto	,889	,326	,006	2,432	1,283	4,610
p53 positivo	,028	,304	,928	1,028	,566	1,866

El modelo final incluye las variables, categoría T 2-4, afectación ganglionar axilar > 3, grado histológico pobremente diferenciado, expresión alta de Ki-67.

Función de Cox.

$H(t) = H_0(t) \times e^{(0,861 \text{ (en caso de T2) } \acute{o} \text{ 1,388 (en caso de T3) } \acute{o} \text{ 1,865 (en caso de T4)) + (0,978 \text{ (en caso de ganglios positivos 4-7) } \acute{o} \text{ 1,889 (en caso de ganglios positivos > 7)) + (0,876 \text{ (en caso de grado histol\u00f3gico pobremente diferenciado)) + (0,889 (en caso de \u00cdndice Ki-67 alto))}$

Las condiciones que no se cumplen implican la multiplicaci\u00f3n del coeficiente por 0. En caso de coeficientes 0, el n\u00famero e elevado a 0 es 1, resulta el riesgo basal.

Riesgo basal de muerte por c\u00e1ncer de mama.

12 meses \rightarrow 0,001.

24 meses \rightarrow 0,01

36 meses \rightarrow 0,017

48 meses \rightarrow 0,027

60 meses \rightarrow 0,033

72 meses \rightarrow 0,043

84 meses \rightarrow 0,050

96 meses \rightarrow 0,058

108 meses \rightarrow 0,064

120 meses \rightarrow 0,071

Ejemplo: Predicci\u00f3n de muerte por c\u00e1ncer de mama a 5 a\u00f1os de mujer de 39 a\u00f1os T2, N positivos 1-3, G3, \u00cdndice Ki-67 alto.

$H(60) = 0,033 \times (2,36 + 2,4 + 2,43) = 0,033 \times 7,19 = 0,2372$. 23,74% riesgo de muerte por c\u00e1ncer de mama a 5 a\u00f1os.

Si tomamos el mismo caso pero con Ki-67 bajo, el modelo predice $H(60) = 0,033 \times (2,36 + 2,4) = 0,033 \times 4,76 = 0,1570$. 15,72% riesgo de muerte por c\u00e1ncer de mama a 5 a\u00f1os.

DISCUSSION

9.- Discusión.

En la comunidad autónoma de Galicia, el cáncer es la segunda causa de muerte tras las enfermedades cardio-circulatorias. Únicamente es en el segmento etario de los 35 a los 64 años en el que las enfermedades oncológicas provocan la mayor mortalidad de los gallegos (López et al. 2002).

La mortalidad por cáncer de mama en España comienza a descender en el año 1992 a un ritmo del 2% anual, gracias en parte a los programas de cribado poblacional para mujeres entre 50 y 65 años implementados en todo el territorio nacional durante los años 90.

Estos programas, junto con los avances diagnósticos y terapéuticos se han traducido en un incremento de la supervivencia, que se sitúa por encima del 80% a los cinco años del diagnóstico (Cabanés et al. 2009).

Estos datos de mortalidad son similares y consistentes con los obtenidos en países de nuestro entorno (Coleman et al.2003, Verdecchia et al.2007).

El cáncer de mama es responsable del 9% de años de vida con discapacidad secundarios a patologías oncológicas. Es la primera causa entre las mujeres, con la característica que esta discapacidad se mantiene a lo largo del tiempo (superior a 4 años). Mayoritariamente, la carga de la enfermedad en la población, es decir el problema de salud pública que supone el cáncer de mama, no es secundaria a la mortalidad y si a la morbilidad generada por la enfermedad recidivada y los tratamientos recibidos.

En términos de distribución etaria, es el segmento de las personas con edades comprendidas entre los 40 y los 64 años el que aglutina la mayor cantidad de años ajustados con discapacidad, 56,8% (Fernández de Larrea-Baz et al 2009).

El análisis exploratorio de nuestras pacientes nos muestra una mediana de edad al diagnóstico de 62 años con una desviación típica de 14,27, la distribución etaria en nuestra muestra sigue una distribución normal como puede apreciarse en el histograma realizado. Podemos inferir que nuestras pacientes menores de 45 años suponen un 16% de la muestra y mujeres mayores a 75 años otro 16% del global, Estos datos se acercan a los recogidos en la encuesta poblacional realizada por el grupo español de investigación en Cáncer de Mama (GEICAM), a los datos obtenidos en la serie de la Universidad de Salamanca y a los registrados por el organismo de Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales del Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (SEER).

En el estudio español (estudio de registros hospitalarios), se registraron pacientes con cáncer de mama diagnosticadas entre 1994 y 1997, recogieron datos de 10791 pacientes. La edad media fue de 57 años. El 10,5% eran menores de 40 años (6,3% < 35 años), el 46% tenían entre 40 y 60 años y 43,4% tenían más de 60 años (GEICAM 2004, Martín et al.2006).

En el trabajo de González del Río la mediana de edad fue de 58,9 años, levemente inferior a la mostrada en nuestra serie. (González del Río 2011)

En la serie publicada por Ries se analiza un registro poblacional con 302763 mujeres con cáncer de mama. El 6,48% de las pacientes fueron menores de 40 años, entre 40-60 años el 41,7% de las pacientes, el 51,8% de las mujeres fueron mayores de 60 años (Ries et al.2007).

En nuestra serie no hemos encontrado correlación de la edad con bcl-2 ni p53 a diferencia de lo comunicado por Soerjomataram (Soerjomataram et al. 2008),

la correlación encontrada con el índice Ki-67 sigue la línea de los datos descritos por Cluze (Cluze et al. 2009).

En la misma línea que los datos de la literatura en nuestra serie confirmamos mediante un modelo de regresión suavizada (Thernau et al.2000, García Pérez 2005), que las pacientes más jóvenes, menores de 40 años y las mayores de 60 tienen un peor pronóstico que las mujeres entre 40 y 60 años si consideramos el tiempo a la progresión y la supervivencia causa específica (Kroman et al.2000, Soerjomataram et al.2008, Ries et al.2007, Yancik et al. 2001,Bouchardy et al.2003, Cluze et al. 2009).

En nuestro trabajo, en el 98,4% de los casos la afectación fue unilateral, con una distribución similar en ambas mamas y en el 1,6% de los casos la afectación fue bilateral. En la serie de GEICAM se mantiene la distribución de frecuencias de cáncer de mama unilateral, y el 0,9% fueron tumores bilaterales sincrónicos.

La distribución de tipos histológicos diagnosticados en nuestra serie es superponible a lo publicado en diferentes series, los carcinoma ductales infiltrantes supusieron el 83,5% de la muestra, 7,9% carcinomas lobulillares, 2,6% de las pacientes tuvieron carcinomas tubulares, 13 pacientes con carcinoma medular (2%), 11 carcinomas mucinosos (1,7%), 10 carcinomas papilares(1,5%), 2 carcinomas sin especificar tipo, 1 carcinoma adenoide quístico, 1 carcinoma apocrino (GEICAM 2004, Martín et al.2006, Ries et al. 2007, Carter et al.1989, González del Río 2011).

Respecto a la clasificación de nuestras pacientes según el sistema TNM, hemos seguido la cuarta edición (Hermanek et al.1997). En la categoría T, más de la mitad de las pacientes tuvieron tumores menores a 2 cm, y un 85% de las

pacientes tuvieron tumores menores de 5 cm. Tres pacientes (0,5%) no pudieron clasificarse por haberse realizado exclusivamente una biopsia. En las series de Fisher y colaboradores, Carter y colaboradores la proporción de mujeres con tumores T2 fue mayor que la de pacientes diagnosticadas con tumores T1, esta diferencia podría ser el resultado de los programas de cribado poblacional implantados. Otras series, más recientes, como las ya referenciadas de GEICAM y Ries obtienen datos superponibles a los recogidos en nuestra serie (Ries et al.2007, Fisher et al.1969, GEICAM 2004, Martin et al. 2006, Carter et al.1989, González del Río 2011).

Con respecto a los ganglios axilares afectados por el tumor. El 54,8% de las mujeres incluidas en nuestro estudio no tenía afectación ganglionar axilar (N0), el 26,9% tuvo de 1 a 3 ganglios axilares afectados por el tumor, el 19,2 % tuvo 4 o más ganglios afectados por el tumor. Dentro de este grupo de 4 o más ganglios, el 9,5% de las mujeres tenían de 4 a 7 ganglios axilares, mientras que el 8,7% tuvo 7 o más ganglios afectos.

En 14 pacientes (2,2%) no se realizó estadificación ganglionar. Tomando en conjunto las categorías T y N podemos resaltar el hecho que más de la mitad de las mujeres incluidas en nuestra serie presentaron tumores de pequeño tamaño y sin afectación axilar en la mitad de los casos, en consonancia con lo comunicado en series recientes como la de Rakha y colaboradores (Rakha et al. 2008).

El grado histológico se informó como bien diferenciado en 200 pacientes (31,1%). Moderadamente diferenciado se consideró en 267 casos (41,5%) y pobremente diferenciado en 171 casos (26,6%). En 5 casos (0,8%) no se informó grado histológico.

La expresión de receptores de estrógenos en los tumores de nuestras pacientes fue alta, ya que el 79,3% expresaron receptores de estrógenos.

En cuanto a los receptores de progesterona, estos se encontraron expresados en el 52,7% de la muestra, hallazgos similares a los comunicados por Dunnwald y colaboradores (Dunnwald et al. 2007).

En 86 casos se demostró sobreexpresión de Her-2 (13,4% de la muestra).

La diferencia en las frecuencias comunicadas en el diagnóstico del grado histológico, en la expresión de receptores hormonales y Her-2 con respecto a otras series puede deberse a la variabilidad existente entre observadores a la hora de catalogar el grado histológico o al porcentaje de pacientes con ausencia de determinación de receptores hormonales o a diferencias en la técnica de determinación de los mismos (GEICAM 2004, Martín et al. 2006, Sivridis et al. 2006, Kollias et al. 1997, González del Río 2011).

Con respecto al tratamiento recibido por nuestras pacientes, éste se llevó a cabo según las indicaciones consideradas como mejor estándar de los servicios de Cirugía General (Unidad de Mama), Oncología Radioterápica y Oncología Médica del Complejo Hospitalario Universitario de Orense. De las mujeres incluidas en el estudio el 48,2% fueron sometidas a mastectomía radical modificada y 51,8% fueron sometidas a mastectomía segmentaria. La mayor parte de las pacientes 90,4% fue sometida a linfadenectomía axilar. En 35 mujeres se realizó biopsia selectiva de ganglio centinela (5,4%) y en 27 casos (4,2%) no se realizó ninguna intervención sobre la axila. Esta distribución se debe fundamentalmente a que en estos años la biopsia selectiva del ganglio centinela era una técnica para la que nuestro centro estaba en proceso de acreditación.

Cuatrocientas veintidós pacientes (65,6%) recibieron radioterapia adyuvante de acuerdo al porcentaje de cirugías conservadoras y al número de pacientes con afectación locorregional voluminosa.

Con excepción de 4 pacientes (0,6%) en las que no se pudo documentar que hubiesen recibido quimioterapia, 246 pacientes (38,3%) no recibieron quimioterapia adyuvante mientras que 395 (61,4%) si recibieron este tratamiento. De los tratamientos citostáticos administrados, ciento cincuenta y cuatro mujeres (24%) recibieron tratamiento con ciclofosfamida, metotrexate y 5-fluorouracilo (CMF), 177 mujeres (27,5%) recibieron combinaciones con antraciclinas (AC ó FAC), 60 pacientes (9,3) recibieron combinaciones de antraciclinas y taxanos y 2 pacientes (0,3%) recibieron otras combinaciones de fármacos.

Ciento catorce mujeres (17,7%) no recibieron tratamiento hormonal alguno, mientras que al 51,8% se les indicó tamoxifeno durante 5 años, en el 23,5% se administraron tamoxifeno y posteriormente un inhibidor de la aromatasa, en consonancia con la frecuencia de pacientes con expresión de receptores hormonales. Ninguna de las pacientes registradas recibió tratamiento con Trastuzumab adyuvante puesto que en este período su actividad en secuencias adyuvantes estaba en fase de estudio.

En el momento del cierre del estudio, 31 de Diciembre de 2009, la mediana de seguimiento era de 89 meses (1-158).

La mediana de tiempo a la progresión de nuestra muestra no se ha alcanzado, es por ello que utilizamos la media. La media de tiempo a la progresión es de 134,91 meses (IC 95% 130,56-139,26).

De las pacientes que recayeron, 6 pacientes presentaron un cáncer de mama contralateral (0,9%) y 21 recayeron de forma locorregional (3,3%). El resto de las pacientes, 93 (14,46%), sufrió una recidiva sistémica (visceral, sistema nervioso central, ósea).

Cuatrocientas noventa y cuatro mujeres (76,8%) se encuentran vivas a la finalización del estudio y 149 (23,2%) fallecieron. En 79 casos (12,3%) se documentó que la causa de muerte fue el cáncer de mama y en 70 casos (10,9%) se documentó una causa de muerte diferente al cáncer de mama. La supervivencia causa específica a 5 años fue del 92,4%, y del 85,7% a 10 años. Lo aplicado a las medidas de tendencia central en el tiempo a la progresión es válido para la supervivencia causa específica. La supervivencia media es de 144,27 meses (IC 95% 140,73-147,80). Esta cifra se sitúa un poco por encima de la comunicada en otras series consultadas. Si bien la diferencia podría explicarse por las diferentes características de las pacientes incluidas así como de las características clínicas de los tumores que padecían (GEICAM 2004, Martín et al.2006, Sant et al.2003, González del Río 2011).

El análisis de los factores pronósticos clásicos, de forma univariante, en nuestra serie no es diferente a lo expuesto en la revisión inicial por lo que no se trataran en profundidad, salvo en el caso del valor de los ganglios axilares.

Las pacientes con afectación de 4 a 7 ganglios axilares ó de más de 7 ganglios axilares exhiben diferentes curvas de supervivencia y esta diferencia alcanzó la significación estadística a diferencia de los datos comunicados por Fisher (Fisher et al.1997) y Sivridis (Sivridis et al.2006). Este hecho puede apoyar la hipótesis de que existen diferencias de pronóstico en un grupo hasta

ahora considerado homogéneo como es el de pacientes con afectación ganglionar superior a 4 ganglios.

Como hemos citado previamente, la investigación clínica en biomarcadores en cáncer de mama ha sido prolija en trabajos. La determinación inmunohistoquímica de biomarcadores tiene como ventajas la facilidad de su aplicación, el bajo coste, la reproducibilidad de los resultados, la localización de las proteínas y su distribución en las células tumorales, la capacidad de detección proteica en muestras pequeñas, en fresco o ya fijadas. Por el contrario las limitaciones de la técnica incluyen, una escasa capacidad para cuantificar el contenido de proteínas, diferentes anticuerpos que reaccionan con los mismo antígenos, escasa capacidad para detectar modificaciones en las proteínas diana, ausencia de criterios estandarizados de análisis e interpretación (Idikio et al.2009).

Los estudios comunicados de Ki-67 utilizan diferentes metodologías (en cuanto a procesado de muestras, anticuerpos utilizados y puntos de corte para considerar la expresión alta) que hacen difícil la comparación de resultados y la estandarización de un método de determinación (Yerushalmi et al. 2010).

En cuanto a los diferentes anticuerpos que se pueden utilizar, en nuestro trabajo utilizamos MIB-1 y tomamos como punto de corte, 10% de células teñidas para considerar un alto índice Ki-67 en consonancia con otros autores, (Syratos et al.2002, Marrelli et al.2006) que demostraron que un índice inferior al 10% identifica tumores con un bajo potencial proliferativo.

Recientemente la conferencia de consenso de Sant Gallen ha recomendado la determinación rutinaria del índice Ki-67 para la identificación del subtipo molecular intrínseco del cáncer de mama. El método considerado por los

panelistas fue el descrito por Cheang y colaboradores que utiliza el anticuerpo Ki-67 SP-6 y considera un punto de corte óptimo de 13,25% (14% recomienda el panel de St Gallen). Constituye el primer intento de estandarizar la técnica de determinación de Ki-67 (Cheang et al. 2009, Goldhirsch et al. 2011).

En lo que respecta a la determinación de la expresión de p53, en nuestro trabajo utilizamos el anticuerpo anti-p53 clon DO7, y utilizamos un punto de corte del 10% de células teñidas para considerar la positividad de la expresión según el criterio expuesto por Thor y colaboradores (Thor et al.1998).

La expresión de Bcl-2 fue determinada mediante el anticuerpo monoclonal, anti-bcl-2 , clon 124, DAKO. La inmunotinción es citoplasmática y se consideró el caso positivo si más del 10% de las células se encontraban teñidas (Hellemans et al.1995, Kymionis et al.2001, Callagy et al.2006). No obstante esta definición de caso positivo no es universal, ya que otros autores consideran diferentes puntos de corte (Gasparini et al.1995, Tsutsui et al.2003, Rolland et al.2007).

Con respecto al análisis de la asociación entre las diferentes co-variables, existe asociación estadísticamente significativa entre la variable tamaño tumoral, afectación ganglionar axilar, grado histológico, expresión de receptores hormonales, Her-2 y el estado de expresión de Ki-67.

Los tamaños tumorales mayores, la presencia de ganglios en la axila, el alto grado histológico y la sobreexpresión de Her-2 se asocian con índice Ki-67 alto. Existe asociación inversa entre la expresión de receptores de estrógenos y progesterona y la expresión de Ki-67. Se observa en las tablas de contingencia que valores altos de Ki-67 se asocian con ausencia de expresión de ambos receptores hormonales.

Estos datos son consistentes con los obtenidos y publicados por otros autores (Spyratos et al.2002, Trihia et al.2003, Marrelli et al.2006, Viale et al.2008).

Existe asociación estadísticamente significativa entre el tamaño tumoral, el grado histológico, la expresión de Her-2 y la expresión de p53. La expresión de p53 se asocia a un mayor tamaño tumoral , un alto grado histológico y a sobreexpresión de Her-2 en concordancia con lo expuesto en series como las de Lockwood, Yamashita y Tsutsui.

En lo que respecta a la relación entre p53 y la expresión de receptores hormonales, está fue estadísticamente significativa e inversa, ya que la expresión de p53 se asocia con la ausencia de expresión de receptores hormonales (Lockwood et al.1999, Yamashita et al.2004, Tsutsui et al.2003).

El estado de expresión de p53 en nuestra serie no se asoció con el estado de afectación ganglionar axilar. Estos resultados difieren de los publicados por Rudolph y colaboradores, este grupo en pacientes con ganglios negativos demostró relación de p53 con las mismas variables analizadas por nosotros a excepción de la expresión de Her-2 (Rudolph et al. 1999).

Al igual que Callagy y colaboradores, no hemos encontrado asociación estadísticamente significativa entre el tamaño tumoral y el estado de expresión de bcl-2 (Callagy et al. 2006).

En nuestras pacientes, la expresión de bcl-2 se asoció de forma significativa con tumores sin afectación ganglionar axilar, tumores bien ó moderadamente diferenciados, sin expresión de Her-2 y con un índice Ki-67 bajo, estos hallazgos son similares a los comunicados por observados Callagy y colaboradores y Tsutsui y colaboradores (Callagy et al. 2006, Tsutui et al. 2003). La expresión de bcl-2 se asoció de forma significativa con la presencia

de expresión de receptores estrogénicos y de progesterona. Nuestros datos siguen la línea de lo comunicado por otros grupos (Gasparini et al. 1995, Hellemans et al. 1995, Charpin et al. 1997).

La expresión de p53 se asoció de forma significativa a una pérdida de expresión de bcl-2 en consonancia con la hipótesis confirmada en la serie de Rolland y colaboradores (Rolland et al. 2007).

El análisis del tiempo a la progresión y de la supervivencia causa específica de la población de mujeres con expresión de bcl-2 frente a aquellas con expresión negativa de dicha proteína confirma el mejor pronóstico de las primeras respecto a las segundas. Hallazgos similares a los referidos por Rolland y Callagy, si bien en estas series se utilizaron la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global como objetivos principales (Rolland et al. 2007, Callagy et al. 2006).

Hemos seguido los postulados de Altman y colaboradores y de Royston y colaboradores para el diseño de nuestro trabajo

Siguiendo la aproximación metodológica de Royston, hemos decidido no incluir bcl-2 como co-variable en el análisis multivariante debido al elevado número de casos perdidos (14%) y a la consiguiente pérdida de potencia estadística calculada (60% para el análisis de tiempo a la progresión y 70% para el análisis de supervivencia causa específica), menor en todo caso al 80% habitualmente utilizado (Altman et al. 1998, Royston et al. 2009).

Con respecto al análisis del tiempo a la progresión en nuestra serie, mediante un modelo de Cox confirmamos un comportamiento no lineal de la edad respecto a la progresión, las mujeres por debajo de 40 años y por encima de

60 años tuvieron mayor riesgo de recaída que las pacientes comprendidas entre 40 y 60 años.

Los resultados observados en nuestra serie en términos de tiempo a la progresión según se consideren los factores pronósticos clásicos de forma univariante (tamaño tumoral, grado histológico, expresión de receptores hormonales y expresión de Her-2) son similares a los comunicados por otros autores. Las pacientes con tumores menores de 2 cm, con ausencia de afectación ganglionar axilar, los tumores bien ó moderadamente diferenciados, la expresión de receptores de estrógeno, la expresión de receptores de progesterona y la ausencia de expresión de Her-2 tuvieron mejor tiempo a la progresión (Fisher et al. 1988, Pinder et al. 1995, Kollias et al. 1997, Ross et al. 2003, Martín et al. 2006, Ries et al. 2007, Dunwald et al. 2007, Rakha et al. 2008).

Con respecto al número de ganglios afectados, el tiempo a la progresión medio fue de 90,40 meses (IC 95% 79,61-101,19). Al agrupar a las pacientes en 4 a 7 ganglios y más de 7 ganglios. La media de tiempo a la progresión para las mujeres con 4 a 7 ganglios afectos fue de 106,52 meses (IC 95% 92,19-120,93), para las mujeres con más de 7 ganglios la media fue de 70,73 meses (IC 95% 57,48-83,98). La media de tiempo a la progresión es significativamente diferente en estos dos grupos de pacientes lo que confirma observaciones iniciales del grupo NSABP (Fisher et al. 1983) y contrasta con los datos publicados por Sivridis y Fisher (Fisher et al. 1997, Sivridis et al. 2006).

Los resultados de tiempo a la Progresión según la co-variable expresión de Ki-67 en nuestro trabajo muestran que las mujeres con tumores con baja

expresión de Ki-67 tuvieron una media de tiempo a la progresión de 134,49 meses (IC 95% 130,80-138,18). En las mujeres con tumores con expresión alta de Ki-67 la media de tiempo a la progresión fue de 113,28 meses (IC 95% 105,12-121,43). La razón de riesgo de recaída para las mujeres con tumores con expresión alta de Ki-67 fue de 2,87 (IC 95% 1,96-4,19). A pesar de las diferencias en población incluida, métodos de determinación y puntos de corte utilizados en la valoración de la expresión de Ki-67 los hallazgos están en consonancia a lo comunicado por Colozza, Azambuja y Stuart-Harris en los metaanálisis que publicaron (Colozza et al. 2005, de Azambuja et al. 2007, Stuart-Harris et al. 2008).

Las pacientes con tumores que no expresaron p53 tuvieron una media de tiempo a la progresión mayor que las mujeres con tumores que expresaron p53. La expresión de p53 (p53+) confiere peor pronóstico. Estas pacientes tienen 2,28 (IC 95% 1,41-3,54) veces más riesgo de recaída que las pacientes con p53 negativo, resultado que sigue la línea de lo mostrado por trabajos más clásicos como el metaanálisis de Pharoah o series más recientes como la de Lara y colaboradores (Pharoah et al.1999, Lara et al. 2011).

En el análisis multivariante se introdujeron todas las variables consideradas según los postulados de Royston y Altman ya invocados previamente (Altman et al. 1998, Royston et al. 2009). El modelo de Cox realizado confirma que las mujeres con edades inferiores a 40 años o superiores a 60 años, el tamaño tumoral superior a 2 cm, la afectación ganglionar axilar, y la expresión “alta” de Ki-67 tienen más riesgo de recaída.

Con respecto a la supervivencia causa específica en nuestra serie, de las 643 pacientes incluidas en el estudio, fallecieron por cáncer de mama 79, lo que supone un 12,3% de los casos.

La supervivencia causa específica a 5 años fue del 92,4%, y del 85,7% a 10 años. El análisis univariante de cada una de las covariables consideradas no muestra diferentes comportamientos de los grupos de pacientes en función de dichas covariables en línea con los trabajos publicados. En el caso de la edad, las diferencias entre los grupos considerados alcanzó la significación estadística solamente para las mujeres menores de 40 años.

En lo que respecta a la expresión de Ki-67 las pacientes con tumores con expresión “alta” de Ki-67 tuvieron una supervivencia media de 121,34 meses (IC 95% 113,80-128,88) frente a los 143 meses (IC 95% 140,48-145,53) de las mujeres con tumores con expresión “baja”. La regresión de Cox, muestra un exceso de riesgo de muerte por cáncer de mama 4,69 veces (IC 95% 2,84-7,73) en las mujeres con expresión “alta” de Ki-67. Como ya se ha reseñado previamente a pesar de las diferencias analíticas y metodológicas que pueden existir entre nuestro trabajo y los comunicados en la literatura, los resultados son concordantes con los publicados en los metaanálisis y en trabajos más recientes (Colozza et al.2005, de Azambuja et al.2007, Stuart-Harris et al.2008).

Los datos de supervivencia obtenidos en las mujeres en función de la expresión de p53 confirman que las pacientes con tumores que expresaban p53 tenían 2,68 veces más riesgo de muerte que las pacientes con tumores que no expresaban p53.

En el análisis multivariante, siguiendo los criterios que se utilizaron para el análisis del tiempo a la progresión, se introdujeron todas las variables.

El modelo final incluye las variables, categoría T2-4, afectación ganglionar axilar superior a 3 ganglios, grado histológico pobremente diferenciado y expresión de Ki-67.

El tamaño tumoral, la afectación ganglionar, el grado histológico y la expresión de Ki-67 son variables pronósticas independientes de supervivencia causa específica en nuestra serie.

Para finalizar y a modo de resumen, las características demográficas y epidemiológicas de nuestra serie son similares a otras publicadas en la literatura. Los datos relativos a los resultados de tratamiento, tanto en tiempo a la progresión como en supervivencia causa específica son similares a series publicadas nacionales como de países de nuestro entorno. Cabe reseñar que pueden existir diferencias por el hecho de que nuestra serie sea un registro hospitalario que puede generar sesgo de selección de las pacientes ó que las características demográficas o clínicas de las pacientes no sean del todo homogéneas. En cuanto a la parte más experimental, el análisis de expresión de Ki-67 y p53 arroja resultados dispares con otros trabajos, se ha demostrado de forma univariante y multivariante que una expresión “alta” de Ki-67 otorga peor pronóstico en tiempo a progresión y supervivencia causa específica. Con respecto a p53, su expresión se relacionó con menor tiempo a la progresión y menor supervivencia causa específica en el análisis univariante, no así en el multivariante.

La consistencia de nuestro análisis estriba en que hemos definido una hipótesis de trabajo biológicamente plausible y avalada por la literatura, hemos

seleccionado la muestra en base a criterios definidos tanto de inclusión como de exclusión y la población de pacientes ha sido tratada de forma homogénea según el estado del conocimiento en ese período y se ha determinado una potencia estadística obtenida con nuestra muestra dentro de los márgenes habitualmente recomendados (Altman et al. 1998). No obstante, la limitación de nuestros hallazgos derivan del hecho que se trata de un estudio retrospectivo, y que nuestra muestra se extrae de un registro hospitalario como hemos señalado previamente (Altman et al.1998, Cabanes et al. 2009).

CONCLUSIONES

10.- Conclusiones.

1.- El índice Ki-67 alto se asoció con paciente jóvenes, tumores de mayor tamaño, mayor afectación ganglionar axilar, ausencia de expresión de receptores de estrógenos y progesterona, sobreexpresión de Her-2 y expresión positiva de p53.

2.- La positividad de p53 se asoció con tumores de mayor tamaño, mayor afectación ganglionar axilar, ausencia de expresión de receptores hormonales, sobreexpresión de Her-2 e índice Ki-67 alto.

3.- La positividad de bcl-2 se asoció con tumores de menor tamaño, bien diferenciados, con expresión de receptores de estrógeno y progesterona, ausencia de expresión de Her-2, índice Ki-67 bajo y ausencia de expresión de p53.

4.- En el análisis univariante, la edad, el tamaño tumoral, la afectación ganglionar axilar, el grado histológico, la expresión de receptores de estrógeno, progesterona y Her-2 confirmaron su asociación con el tiempo a la progresión y con la supervivencia causa específica.

5.- En el análisis univariante, el modelo de regresión obtenido con la clasificación ganglionar propuesta (N0, ningún ganglio afectado; N1, afectados de 1-3 ganglios; N1, afectados de 4 a 7; N1, más de 7 ganglios afectados) describe mejor la supervivencia de nuestra serie que la clasificación TNM.

CONCLUSIONES

6.- En el análisis univariante, tanto el tiempo a la progresión como la supervivencia causa específica fue menor en las pacientes con índice Ki-67 alto frente a índice Ki-67 bajo, p53 positivo frente p53 negativo y bcl-2 negativo frente a bcl-2 positivo.

7.- En el análisis multivariante, la edad inferior a 40 años, el tamaño tumoral, la presencia de 4-7 ganglios afectados o más de 7 ganglios afectados y el índice Ki-67 resultaron ser variables pronósticas independientes para el tiempo a la progresión.

8.- El “risk score” para recaída obtenido de nuestra serie es:

$e^{(0,77(\text{menores } 40 \text{ años})) + (0,96 \text{ (en caso de T2)}) + (1,33(\text{en caso de T3})) + (2,18 \text{ (en caso de T4)}) + (0,76 \text{ (en caso de 4-7 ganglios)}) + (1,73 \text{ (en caso de } > 7 \text{ ganglios)}) + (0,56 \text{ (en caso de índice Ki-67 alto)})}$

9.- En el análisis multivariante, el tamaño tumoral, la presencia de 4-7 ganglios afectados o más de 7 ganglios afectados, el grado histológico pobremente diferenciado y el índice Ki-67 resultaron ser variables pronósticas independientes para la supervivencia causa específica.

10.- El “risk score” para mortalidad causa específica obtenido de nuestra serie

es: $e^{(0,861 \text{ (en caso de T2)}) + (1,388 \text{ (en caso de T3)}) + (1,865 \text{ (en caso de T4)}) + (0,978 \text{ (en caso de ganglios positivos 4-7)}) + (1,889 \text{ (en caso de ganglios positivos } > 7 \text{)}) + (0,876 \text{ (en caso de grado histológico pobremente diferenciado)}) + (0,889 \text{ (en caso de índice Ki-67 alto)})}$

BIBLIOGRAFIA

11.- Bibliografia

- Adams, J. M. and S. Cory (2007). "Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential." Curr Opin Immunol **19**(5): 488-496.
- Aebi S, Davidson T, Gruber G, Castiglione M, ESMO Guidelines Working Group (2010). "Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up." Ann Oncol **21** Suppl 5: v9-14.
- Aleskandarany MA, Rakha EA, Macmillan RD, Powe DG, Ellis IO, Green AR (2010). "MIB1/Ki-67 labelling index can classify grade 2 breast cancer into two clinically distinct subgroups." Breast Cancer Res Treat.
- Altman DG, Lyman GH (1998). "Methodological challenges in the evaluation of prognostic factors in breast cancer." Breast Cancer Research and Treatment **52** 289-303
- Anderson WF, Chu KC, Anderson WF, Chu KC, Chatterjee N, Brawley O, Brinton LA (2001). "Tumor variants by hormone receptor expression in white patients with node-negative breast cancer from the surveillance, epidemiology, and end results database." J Clin Oncol **19**(1): 18-27.
- Andrulis IL, Bull SB, Blackstein ME, Sutherland D, Mak C, Sidlofsky S, et al. (1998). "neu/erbB-2 amplification identifies a poor-prognosis group of women with node-negative breast cancer. Toronto Breast Cancer Study Group." J Clin Oncol **16**(4): 1340-1349.
- Atkinson (1980). "A note on the generalized information criterium for choice of a model." Biometrika **67**: 413-418.
- Badve S, Nakshatri H. (2009). "Oestrogen-receptor-positive breast cancer: towards bridging histopathological and molecular classifications." J Clin Pathol **62**(1): 6-12.
- Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, Benz CC, Dantis L, et al. (1999). "Phase II study of weekly intravenous trastuzumab (Herceptin) in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer." Semin Oncol **26**(4 Suppl 12): 78-83.
- Bloom HJ, Richardson WW. (1957). "Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years." Br J Cancer **11**(3): 359-377.
- Bonnefoi H, Piccart M, Bogaerts J, Mauriac L, Fumoleau P, Brain E, et al. (2011). "TP53 status for prediction of sensitivity to taxane versus non-taxane neoadjuvant chemotherapy in breast cancer (EORTC 10994/BIG 1-00): a randomised phase 3 trial." Lancet Oncol **12**(6): 527-539.
- Bouchardy C, Rapiti E., Fioretta G, Laissue P, Neyroud-Caspar I, Schäfer P, et al. (2003). "Undertreatment strongly decreases prognosis of breast

- cancer in elderly women." J Clin Oncol **21**(19): 3580-3587.
- Bourdon JC. (2007). "p53 and its isoforms in cancer". Br J Cancer; 97(3): 277-82
- Burstein HJ. (2005). "The distinctive nature of HER2-positive breast cancers". N Engl J Med; 353(16): 1652-4.
- Burstein HJ, Harris JR, Morrow M. (2008). Malignant tumors of the Breast. Cancer, Principles & Practice of Oncology. DeVita, Lawrence, Rosenberg, DePinho and Weinberg. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 2:1606-1655
- Cabanes Domenech A, Pérez-Gómez B, Aragonés N, Pollán M, López-Abente G. (2009). Situación del cáncer en España 1975-2006. Madrid, Instituto de Salud Carlos III.
- Callagy GM, Pharoah PD, Pinder SE, Hsu FD, Nielsen TO, Ragaz J, et al. (2006). "Bcl-2 is a prognostic marker in breast cancer independently of the Nottingham Prognostic Index." Clin Cancer Res **12**(8): 2468-2475.
- Callagy GM, Webber MJ, Pharoah PD, Caldas C. (2008). "Meta-analysis confirms BCL2 is an independent prognostic marker in breast cancer." BMC **8**: 153.
- Carter CL, Allen C, Henson DE . (1989). "Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases." Cancer **63**(1): 181-187.
- Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, et al. (1992). "Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections." J Pathol **168**(4): 357-363.
- Charpin C, Garcia S, Bouvier C, Devictor B, Andrac L, Lavaut MN et al. (1997). "Automated and quantitative immunocytochemical assays of Bcl-2 protein in breast carcinomas." Br J Cancer **76**(3): 340-346.
- Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. (2009). "Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer." J Natl Cancer Inst **101**(10): 736-750.
- Chen SL, Hoehne FM, Giuliano AE. (2007). "The prognostic significance of micrometastases in breast cancer: a SEER population-based analysis." Ann Surg Oncol **14**(12): 3378-3384.
- Cluze C, Colonna M, Remontet L, Poncet F, Sellier E, Seigneurin A et al. (2009). Analysis of the effect of age on the prognosis of cancer. Breast Cancer Res Treat **117**:121-129.

- Coleman MP, Gatta G, Coleman MP, Gatta G, Verdecchia A, Esteve J, et al. (2003). "EUROCORE-3-summary: cancer survival in Europe at the end of the 20th century." Annals of Oncology **14**(supplement 5): v128-v149.
- Colozza M, Azambuja E, Cardoso F, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart MJ. (2005). "Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now?" Annals of Oncology **16**: 1723-1739.
- Cory, S.,Huang DCS, Adams JM.(2003). "The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis." Oncogene **22**(53): 8590-8607.
- Cox DR (1972). "Regression Models and Life-tables". JSTOR. 34(2): 187-220.
- Dawson SJ, Blows FM, Driver KE, Provenzano E, Le Quesne J, et al. (2010). "BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received." Br J Cancer **103**(5): 668-675.
- de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G Jr, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, et al. (2007). "Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients." Br J Cancer **96**(10): 1504-1513.
- DiGiovanna MP, Stern DF, Edgerton SM, Whalen SG, Moore D, Thor AD. (2005). "Relationship of epidermal growth factor receptor expression to ErbB-2 signaling activity and prognosis in breast cancer patients." J Clin Oncol **23**(6): 1152-1160.
- Dumontet C, Krajewska M, Treilleux I, Mackey JR, Martin M, Rupin M, et al. (2010). "BCIRG 001 molecular analysis: prognostic factors in node-positive breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy." Clin Cancer Res **16**(15): 3988-3997.
- Dunnwald LK, Rossing MA, Li C. I. (2007). "Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients." Breast Cancer Res **9**(1): R6.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) (2005). "Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials." Lancet **365**(9472): 1687-1717.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) (2012). "Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials." Lancet **79**(9814):432-44.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (1998). "Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group." Lancet **351**(9114): 1451-1467.

- Ellis IO, Schnitt SJ, Sastre-Garau W, Bussolati G, Tavassoli FA, Eusebi V et al. (2003). "Invasive breast carcinoma". Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Eds: Tavassoli FA, Devilee P. Lyon, IARC Press. 1-59.
- Elston CW, Ellis IO. (1991). "Pathological prognostic factors in breast cancer.I. The value of histological grade in breast cancer: experience of a large study with long-term follow-up. Histopathology 19(5):403-410.
- Endl E and Gerdes J (2000). "Posttranslational modifications of the KI-67 protein coincide with two major checkpoints during mitosis." J Cell Physiol 182(3): 371-380.
- Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. (2010). "Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008." Eur J Cancer 46(4): 765-781.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. (2010) GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>
- Fernández de Larrea-Baz N, Alvarez-Martín E, Morant-Ginestar C, Genova-Maleras R, Gil A, Pérez Gómez B, et al. (2009). "Burden of disease due to cancer in Spain." BMC Public Health(9).
- Field TS, Buist DS, Doubeni C, Enger S, Fouayzi H, Hart G, et al. (2005). "Disparities and survival among breast cancer patients." J Natl Cancer Inst Monogr(35): 88-95.
- Fisher B, Bauer M, Wickerham DL, Redmond CK, Fisher ER, Cruz AB, et al. (1983). "Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update." Cancer 52(9): 1551-1557.
- Fisher B, Jeong JH, Bryant J, Anderson S, Dignam J, Fisher ER, et al. (2004). "Treatment of lymph-node-negative, oestrogen-receptor-positive breast cancer: long-term findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project randomised clinical trials." Lancet 364(9437): 858-868.
- Fisher B, Redmond C, Fisher ER, Caplan R. (1988). "Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06." J Clin Oncol 6(7): 1076-1087.
- Fisher B, Slack NH, Bross ID. (1969). "Cancer of the breast: size of neoplasm and prognosis." Cancer 24(5): 1071-1080.
- Fisher BJ, Perera FE, Cooke AL, Opeitum A, Venkatesan V, Dar AR, Stitt L. (1997). "Long-term follow-up of axillary node-positive breast cancer

patients receiving adjuvant systemic therapy alone: patterns of recurrence". Int J Radiation Oncology Biol Phys 38: 541-550

Fisher ER, Costantino J, Fisher B, Redmond C. (1993). "Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (Protocol 4). Discriminants for 15-year survival. National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Investigators." Cancer 71(6 Suppl): 2141-2150.

Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred C, Clark GM, et al. (2000). "Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999." Arch Pathol Lab Med 124: 966-978.

Foulkes W. D. (2007). "Clinically relevant biology of hereditary breast cancer." Semin Oncol 34(5): 379-383.

Foulkes WD, Metcalfe K, Sun P, Hanna WM, Lynch HT, Ghadirian P, et al. (2004). "Estrogen receptor status in BRCA1- and BRCA2-related breast cancer: the influence of age, grade, and histological type." Clin Cancer Res 10(6): 2029-2034.

Frkovic-Grazio S, Bracko M (2002). "Long term prognostic value of Nottingham histological grade and its components in early (pT1N0M0) breast carcinoma." J Clin Pathol 5 (2): 88-92.

García Pérez, A. (2005). Métodos Avanzados de Estadística Aplicada: Técnicas Avanzadas. Madrid, UNED.

Gasparini G, Barbareschi M, Doglioni C, Palma PD, Mauri FA, Boracchi P, et al. (1995). "Expression of bcl-2 protein predicts efficacy of adjuvant treatments in operable node-positive breast cancer." Clin Cancer Res 1 (2): 189-198.

GEICAM (Grupo Español de Investigación en Cáncer de Mama) (2004). Proyecto El Alamo II. Encuesta de evolución de pacientes con cáncer de mama en Hospitales del Grupo GEICAM 1994-1997. Madrid, GEICAM.

Gerdes J, Lelle RJ, Pickartz H, Heidenreich W, Schwarting R, Kurtsiefer L, et al (1986). "Growth fractions in breast cancers determined in situ with monoclonal antibody Ki-67". J Clin Pathol 39 (9):977-80

Gerdes J, Li L, et al. (1991). "Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67." Am J Pathol 138(4): 867-873.

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. (1983). "Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation." Int J Cancer 31(1): 13-20.

Gerdes J, Stein H, Pileri S, Rivano MT, Gobbi M, Ralfkiaer E, et al. (1987). "Prognostic relevance of tumour-cell growth fraction in malignant non-

- Hodgkin's lymphomas." Lancet **2**(8556): 448-449.
- Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, et al (1991). "Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67". Am J Pathol **138**(4): 867-73.
- Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ, et al. (2011). "Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011." Ann Oncol **22**(8): 1736-1747.
- Goldstein NS, Kestin LL, Vicini FA. (2004). "Refined morphologic criteria for tubular carcinoma to retain its favorable outcome status in contemporary breast carcinoma patients." Am J Clin Pathol **122**(5): 728-739.
- Gonzalez-Angulo AM, Broglio K, Kau SW, Eralp Y, Erlichman J, Valero V, et al. (2005). "Women age < or = 35 years with primary breast carcinoma: disease features at presentation." Cancer **103**(12): 2466-2472.
- González del Rio R. (2011). "Implicaciones pronósticas en los subtipos moleculares de Cáncer de Mama" Directores: Prof Dr D Juan Jesús Cruz Hernández, Prof Dr D Ignacio Cruz González. Universidad de Salamanca. Departamento de Medicina.
- Greene F, Page DL, Fleming I, Fritz AG, Balch CM, Haller DG et al. (2002). AJCC Cancer Staging Manual. 6ª ed. New York. Springer-Verlag.
- Guerra I, Algorta J, Díaz de Otazu R, Pelayo A, Fariña J. (2003). "Immunohistochemical prognostic index for breast cancer in young women." Mol Pathol **56**(6): 323-327.
- Gullick WJ, Love SB, Wright C, Barnes DM, Gusterson B, Harris AL, et al. (1991). "c-erbB-2 protein overexpression in breast cancer is a risk factor in patients with involved and uninvolved lymph nodes." Br J Cancer **63**(3): 434-438
- Harbeck N, Schmitt M, Meisner C, Friedel C, Untch M, Schmidt M et al (2009). "Final 10-year analysis of prospective multicenter Chemo NO trial for validation of ASCO-recommended biomarkers uPA/PAI 1 for therapy decision making in node-negative breast cancer". J Clin Oncol **27** (suppl) a511.
- Harbeck N, Kates RE, Gauger K, Willems A, Kiechle M, Magdolen V, et al. (2004). "Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-I: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer." Thromb Haemost **91**(3): 450-456.
- Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, et al. (2007).

- "American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer." J Clin Oncol **25**(33): 5287-5312.
- Hartmann LC, Ingle JN, Wold LE, Farr GH, Grill JP, Su JQ, Maihle NJ, et al. (1994). "Prognostic value of c-erbB2 overexpression in axillary lymph node positive breast cancer. Results from a randomized adjuvant treatment protocol." Cancer **74**(11): 2956-2963.
- Harvey, J. M., Clark, G. M., Osborne, C. K., Allred, D. C. (1999). "Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer." J Clin Oncol **17**(5): 1474-1481.
- Hellems P, van Dam PA, Weyler J, van Oosterom AT, Buytaert P, Van Marck E. (1995). "Prognostic value of bcl-2 expression in invasive breast cancer." Br J Cancer **72**(2): 354-360.
- Hermanek P, Hutter RVP, Sobin LH, Wagner G, Wittekind Ch. (1997). Tumores de Mama. Atlas TNM. Guía ilustrada de la clasificación TNM/pTNM de los tumores malignos. Berlin-Heidelberg, Springer-Verlag: 201-213.
- Hockenbery D, Nuñez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. (1990). "Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death." Nature **348**(6299): 334-336.
- Hoda SA, Hoda RS, Merlin S, Shamonki J, Rivera M. (2006). "Issues relating to lymphovascular invasion in breast carcinoma." Adv Anat Pathol **13**(6): 308-315.
- Houston SJ, Plunkett TA, Barnes DM, Smith P, Rubens RD, Miles DW. (1999). "Overexpression of c-erbB2 is an independent marker of resistance to endocrine therapy in advanced breast cancer." Br J Cancer **79**(7-8): 1220-1226.
- Idikio HA. (2009). "Immunohistochemistry in diagnostic surgical pathology: contributions of protein life-cycle, use of evidence-based methods and data normalization on interpretation of immunohistochemical stains." Int J Clin Exp Pathol **3**(2): 169-176.
- Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. (1999). "Comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer." J Clin Oncol **17**(7): 1974-1982.
- Jalava P, Kuopio T, Juntti-Patinen L, Kotkansalo T, Kronqvist P, Collan Y (2006). "Ki67 immunohistochemistry: a valuable marker in prognostication but with a risk of misclassification: proliferation subgroups formed based on Ki67 immunoreactivity and standardized mitotic index". Histopathology **48**(6):674-82.

- Jänicke F, Prechtel A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M, et al. (2001). "Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1." J Natl Cancer Inst **93**(12): 913-920.
- Kantelhardt EJ, Vetter M, Schmidt M, Veyret C, Augustin D, Hanf V, et al. (2011). "Prospective evaluation of prognostic factors uPA/PAI-1 in node-negative breast cancer: phase III NNBC3-Europe trial (AGO, GBG, EORTC-PBG) comparing 6×FEC versus 3×FEC/3×Docetaxel." BMC Cancer **11**: 140.
- Kollias J, Elston CW, Ellis IO, Robertson JF, Blamey RW. (1997). "Early-onset breast cancer--histopathological and prognostic considerations." Br J Cancer **75**(9): 1318-1323.
- Korsmeyer S. J. (1999). "BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death." Cancer Res **59**(7 Suppl): 1693s-1700s.
- Kroman N, Jensen MB, Wohlfart J, Mouridsen HT, Andersen PK, et al. (2000). "Factors influencing the effect of age on prognosis in breast cancer: population based study." BMJ **320**: 474-479.
- Kubbutat MH, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Flad HD, et al. (1994). "Epitope analysis of antibodies recognising the cell proliferation associated nuclear antigen previously defined by the antibody Ki-67 (Ki-67 protein)." J Clin Pathol **47**(6): 524-528.
- Kucera E, Speiser P, Gnant M, Szabo L, Samonigg H, Hausmaninger H, et al. (1999). "Prognostic significance of mutations in the p53 gene, particularly in the zinc-binding domains, in lymph node- and steroid receptor positive breast cancer patients. Austrian Breast Cancer Study Group." Eur J Cancer **35**(3): 398-405.
- Kymionis, G. D., Dimitrakakis, C. E., Konstadoulakis, M. M., Arzimanoglou, I., Leandros, E., Chalkiadakis, G., et al. (2001). "Can expression of apoptosis genes, bcl-2 and bax, predict survival and responsiveness to chemotherapy in node-negative breast cancer patients?" J Surg Res **99**(2): 161-168.
- Lara JF, Thor AD, Dressler LG, Broadwater G, Bleiweiss IJ, Edgerton S, et al. (2011). "p53 Expression in Node Positive Breast Cancer Patients: Results from the Cancer and Leukemia Group B (CALGB) 9344 Trial (159905)." Clin Cancer Res.
- Lehmann-Che J, Amira-Bouhidel F, Lehmann-Che J, Amira-Bouhidel F, Turpin E, Antoine M, Soliman H, Legres L, et al. (2011). "Immunohistochemical and molecular analyses of HER2 status in breast cancers are highly concordant and complementary approaches." Br J Cancer **104**(11):

- 1739-1746.
- Lester SC, Bose S, Chen YY, Connolly JL, de Baca ME, Fitzgibbons PL, et al. (2009). "Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast." Arch Pathol Lab Med **133**(10): 1515-1538.
- Lim L, Vidnovic N, Ellisen LW, Leong CO. (2009). "Mutant p53 mediates survival of breast cancer cells." Br J Cancer **101**(9): 1606-1612.
- Lockwood C. A., Ricciardelli C., et al. (1999). "A simple index using video image analysis to predict disease outcome in primary breast cancer." Int J Cancer **84**(3): 203-208.
- Look MP, van Putten WL, Duffy MJ, Harbeck N, Christensen IJ, Thomssen C, et al. (2002). "Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients." J Natl Cancer Inst **94**(2): 116-128.
- López Garcia ML, López-Pardo Pardo E. (2002). Análisis de Situación. Plan Oncológico de Galicia 2002-2005. Xunta de Galicia: 27.
- Louwman WJ, van Beek MW, Schapers RF, Nolthenius-Puylaert MB, van Diest PJ, Roumen RM, et al. (2006). "Long-term survival of T1 and T2 lymph node-negative breast cancer patients according to Mitotic Activity Index: a population-based study." Int J Cancer **118**(9): 2310-2314.
- Marrelli D, Pinto E, Neri A, Megha T, Giofrè W, Cioppa T, et al. (2006). "Mib-1 proliferation index is an independent predictor of lymph node metastasis in invasive breast cancer: a prospective study on 675 patients." Oncol Rep **15**(2): 425-429.
- Martín M, González Palacios F, Cortés J, de la Haba J, Schneider J. (2009). "Prognostic and predictive factors and genetic analysis of early breast cancer." Clin Transl Oncol **11**(10): 634-642.
- Martín M, Mahillo E, Llombart-Cussac A, Lluch A, Munarriz B, Pastor M, et al. (2006). "The "El Alamo" project (1990-1997): two consecutive hospital based studies of breast cancer outcomes in Spain." Clin Transl Oncol **8**(7): 508-518.
- Ménard S, Balsari A, Casalini P, Tagliabue E, Campiglio M, Bufalino R. (2002). HER-2-positive breast carcinomas as a particular subset with peculiar clinical behaviors. Clin Cancer Res **8**(2): 520-5
- Mendelsohn J, Baselga J. (2003). "Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer." J Clin Oncol **21**(14): 2787-2799.
- Meyer JS, Alvarez C, Milikowski C, Olson N, Russo I, Russo J, et al. (2005).

- "Breast carcinoma malignancy grading by Bloom-Richardson system vs proliferation index: reproducibility of grade and advantages of proliferation index." Mod Pathol **18**(8): 1067-1078.
- Michaelson JS, Chen LL, Silverstein MJ, Mihm MC, Sober AJ, Tanabe KK, et al. (2009). "How cancer at the primary site and in the lymph nodes contributes to the risk of cancer death." Cancer **115**(21): 5095-5107.
- Mirkes PE. (2002). 2001 Warkany lecture: to die or not to die, the role of apoptosis in normal and abnormal mammalian development. Teratology **65**(5): 228-39 .
- Mirza AN, Mirza NQ, Vlastos G, Singletary SE. (2002). "Prognostic factors in node-negative breast cancer: a review of studies with sample size more than 200 and follow-up more than 5 years." Ann Surg **235**(1): 10-26.
- Miyashita T, Harigai M, Hanada M, Reed JC. (1994). "Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene." Cancer Res **54**(12): 3131-3135.
- Morris GJ, Naidu S, Topham AK, Guiles F, Xu Y, McCue P, et al. (2007). "Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients: a single-institution compilation compared with the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results database." Cancer **110**(4): 876-884.
- Narod SA, Foulkes WD. (2004). "BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond". Nat Rev Cancer **4**(9): 665-676.
- Neri A, Marrelli D, Rossi S, De Stefano A, Mariani F, De Marco G, et al (2007). "Breast cancer local recurrence: risk factors and prognostic relevance of early time to recurrence". World J Surg **31**: 36-45
- No authors listed. (1991). "NIH consensus conference. Treatment of early-stage breast cancer." JAMA **265**(3): 391-395.
- No authors listed (1998). "The 1998 St. Gallen's Consensus Conference: an Assessment." J Natl Cancer Inst **90**(21): 1587-1589
- Oldenhuis CNAM, Oosting SF, Gietema JA, de Vries EGE (2008). "Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology." European Journal of Cancer **44**: 946-953.
- Olier Gárate C, Jara Sánchez C, Romero Laorden N, Moreno Elola-Olaso C, Nogales Escoriza RM. (2009). "Epidemiología y factores pronósticos del cáncer de mama." Rev Cancer **23**: 1-9.
- Olivier M, Taniere P. (2011). "Somatic mutations in cancer prognosis and prediction: lessons from TP53 and EGFR genes." Curr Opin Oncol **23**(1):

88-92.

- Oren, M. (2003). "Decision making by p53: life, death and cancer." Cell Death Differ **10**(4): 431-442.
- Parkin DM .(2001). "Global cancer statistics in the year 2000." Lancet Oncol **2** 533-543.
- Patel, M. P., Masood A, Patel PS, Chanan-KhanAA. (2009). "Targeting the Bcl-2." Curr Opin Oncol **21**(6): 516-523.
- Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ. (1996). "Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization." Oncogene **13**(1): 63-72.
- Pauletti G, Dandekar S, Rong H, Ramos L, Peng H, Seshadri R, et al. (2000). "Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry." J Clin Oncol **18**(21): 3651-3664.
- Payne SJL, Bowen RL, Jones JL, Wells CA. (2008). "Predictive markers in breast cancer- the present." Histopathology **52**: 82-90.
- Pharoah PD, Day NE, Caldas C. (1999). "Somatic mutations in the p53 gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis." Br J Cancer **80**(12): 1968-1973.
- Phillips HA. (1999). "The role of the p53 tumour suppressor gene in human breast cancer." Clin Oncol (R Coll Radiol) **11**(3): 148-155.
- Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. (2005). "Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer." N Engl J Med **353**(16): 1659-1672.
- Pinder SE, Ellis IO, Elston CW. (1995). "Prognostic factors in primary breast carcinoma." J Clin Pathol **48**: 981-983.
- Pollán Santamaría M and Pérez Gómez B (2008). Epidemiología del Cáncer de Mama. Cáncer de Mama. Manual Práctico 2008. M. M. Jimenez. Barcelona, Permanyer: 1-17.
- Ponzzone R, Montemurro F, Maggiorotto F, Robba C, Gregori D, Jacomuzzi ME, et al. (2006). "Clinical outcome of adjuvant endocrine treatment according to PR and HER-2 status in early breast cancer." Ann Oncol **17**(11): 1631-1636.
- Press MF, Pike MC, Chazin VR, Hung G, Udove JA, Markowicz M, et al. (1993). "Her-2/neu expression in node-negative breast cancer: direct tissue quantitation by computerized image analysis and association of

overexpression with increased risk of recurrent disease." Cancer Res **53**(20): 4960-4970.

- Rakha E, El-Sayed ME, Lee AHS, Elston CW, Grainge MJ, Hodi Z, et al. (2008), Prognostic significance of Nottingham Histologic Grade in Invasive Breast carcinoma. J Clin Oncol **26**:3153-3158
- Ries LAG, Eisner MP. (2007). Cancer of the female breast. SEER Survival Monograph. Cancer Survival Among Adults: U.S. SEER Program, 1988-2001, Patient and Tumor Characteristics. Bethesda, National Cancer Institute, SEER Program: 101-107.
- Rolland P, Spendlove I, Madjid Z, Rakha EA, Patel P, Ellis IO, et al. (2007). "The p53 positive Bcl-2 negative phenotype is an independent marker of prognosis in breast cancer." Int J Cancer **120**(6): 1311-1317.
- Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Davidson NE, et al. (2005). "Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer." N Engl J Med **353**(16): 1673-1684.
- Rosa FE, Caldeira JR, Felipes J, Bertonha FB, Quevedo FC, Domingues MA, et al. (2008). "Evaluation of estrogen receptor alpha and beta and progesterone receptor expression and correlation with clinicopathologic factors and proliferative marker Ki-67 in breast cancers." Hum Pathol **39**(5): 720-730.
- Rosen PP, Groshen S, Saigo PE, Kinne DW, Hellman S. (1989). "Pathological prognostic factors in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma: a study of 644 patients with median follow-up of 18 years." J Clin Oncol **7**(9): 1239-1251.
- Ross JS, Fletcher JA (1998). "The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy." Stem Cells **16**(6): 413-428.
- Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, et al. (2003). "The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy." Oncologist **8**(4): 307-325.
- Royston P, Moons KG, Altman DG, Vergouwe Y. (2009). "Prognosis and prognostic research: Developing a prognostic model." BMJ **338**: b604.
- Rudolph P, Olsson H, Bonatz G, Ratjen V, Bolte H, Baldetorp B et al. (1999). "Correlation between p53, c-erbB-2, and topoisomerase II alpha expression, DNA ploidy, hormonal receptor status and proliferation in 356 node-negative breast carcinomas: prognostic implications." J Pathol **187**(2): 207-216.
- Sahin AA, Guray M, Hunt KK. (2009). "Identification and biologic significance of micrometastases in axillary lymph nodes in patients with invasive breast

- cancer." Arch Pathol Lab Med **133**: 869-878.
- Sant M, Allemani C, Capocaccia R, Hakulinen T, Aareleid T, Coebergh JW, et al. (2003). "Stage at diagnosis is a key explanation of differences in breast cancer survival across Europe." Int. J. Cancer **106**: 416-423.
- Sasano H. (2010). "Histopathological prognostic factors in early breast carcinoma: an evaluation of cell proliferation in carcinoma cells." Expert Opin Investig Drugs **19**(Suppl.1): S5-S11.
- Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD et al. (1993). "The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins." J Cell Biol **123**(3): 513-522.
- Schnitt SJ, Gudi AJ.(2004). Pathology of invasive breast cancer. Diseases of the breast. Eds: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. Philadelphia, Lippincott Williams&Wilkins. 2: 541-584.
- Schnitt SJ. (2006). "Estrogen receptor testing of breast cancer in current clinical practice: what's the question?" J Clin Oncol **24**(12): 1797-1799.
- Scholzen T, Gerdes J. (2000). "The Ki-67 protein: from the known and the unknown." J Cell Physiol **182**(3): 311-322.
- Sherman M E, Rimm DL, Yang XR, Chatterjee N, Brinton LA, Lissowska J, et al. (2007). "Variation in breast cancer hormone receptor and HER2 levels by etiologic factors: a population-based analysis." Int J Cancer **121**(5): 1079-1085.
- Simon R. (2009). Factores estadísticos en el desarrollo y la validación de biomarcadores oncológicos. Biología Molecular en Cáncer. J. García-Foncillas. Barcelona, Prous Science: 179-195.
- Simpson PT, Reis-Filho JS, Gale T, Lakhani SR. (2005). "Molecular evolution of breast cancer." J Pathol **205**(2): 248-254.
- Sivridis E, Giatromanolaki A, Galazios G, Koukourakis MI. (2006). "Node-related factors and survival in node-positive breast carcinomas." Breast **15**(3): 382-389.
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. (2001). "Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2." N Engl J Med **344**(11): 783-792.
- Soerjomataram I, Louwman MW, Ribot JG, Roukema JA, Coebergh JW. (2008). "An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer." Breast Cancer Res Treat **107**(3): 309-330.

- Spyratos F, Ferrero-Poüs M, Trassard M, Hacène K, Phillips E, Tubiana-Hulin M, et al. (2002). "Correlation between MIB-1 and other proliferation markers: clinical implications of the MIB-1 cutoff value." *Cancer* **94**(8): 2151-2159.
- Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. (2008). "Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients." *Breast* **17**(4): 323-334.
- Tai P, Yu E, Joseph K. (2010). "Prognostic significance of number of positive nodes: a long-term study of one to two nodes versus three nodes in breast cancer patients." *Int J Radiation Oncology Biol Phys* **77**(1): 180-187.
- Teixeira C, Reed JC, Pratt MA. (1995). "Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving Bcl-2 proto-oncogene expression in human breast cancer cells." *Cancer Res* **55**(17): 3902-3907.
- The World Health Organization. (1982). The World Health Organization Histological Typing of Breast Tumors--Second Edition. The World Organization. *Am J Clin Pathol* **78**(6): 806-16.
- Therneau TM, Grambsch PM. (2000). *Modeling Survival Data. Extending the Cox Model*. New York Berlin Heidelberg Springer-Verlag.
- Thor AD, Berry DA, Budman DR, Muss HB, Kute T, Henderson IC et al. (1998). "erbB-2, p53, and Efficacy of Adjuvant Therapy in Lymph Node-Positive Breast Cancer". *J Natl Cancer Inst* **90** (18): 1346-1360.
- Trihia H, Murray S, Price K, Gelber RD, Golouh R, Goldhirsch A. et al. (2003). "Ki-67 expression in breast carcinoma: its association with grading systems, clinical parameters, and other prognostic factors--a surrogate marker?" *Cancer* **97**(5): 1321-1331.
- Tsutsui S, Ohno S, Murakami S, Kataoka A, Kinoshita J, Hachitanda Y. (2003). "Prognostic significance of the coexpression of p53 protein and c-erbB2 in breast cancer." *Am J Surg* **185**(2): 165-167.
- Ueng SH, Mezzetti T, Tavassoli FA. (2009). "Papillary neoplasms of the breast: a review." *Arch Pathol Lab Med* **133**(6): 893-907.
- Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. (2005). "Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer." *J Clin Oncol* **23**(28): 7212-7220.
- Verdecchia A, Francisci S, Brenner H, Gatta G, Micheli A, Mangone L. et al. (2007). "Recent cancer survival in Europe: A 2000-02 period analysis of EURO-CARE-4 data." *Lancet Oncol* **8** 784-796

- Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, Orecchia R, Viale G. (2005). "Breast cancer." Lancet **365**(9472): 1727-1741.
- Viale G, Regan MM, Mastropasqua MG, Maffini F, Maiorano E, Colleoni M, et al. (2008). "Predictive value of tumor Ki-67 expression in two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node-negative breast cancer." J Natl Cancer Inst **100**(3): 207-212.
- Wang TT, Phang JM (1995). "Effects of estrogen on apoptotic pathways in human breast cancer cell line MCF-7." Cancer Res **55**(12): 2487-2489.
- Wesierska-Gadek J, Krystof V. (2009). Inhibidores del ciclo celular. En Biología Molecular en Cáncer. J. García-Foncillas. Barcelona, Prous Science: 591-612.
- Wyllie AH, Bellamy CO, Bubbs VJ, Clarke AR, Corbet S, Curtis L, et al. (1999). "Apoptosis and carcinogenesis." Br J Cancer **80 Suppl 1**: 34-37.
- Yamashita H, Nishio M, Toyama T, Sugiura H, Zhang Z, Kobayashi S, et al. (2004). "Coexistence of HER2 over-expression and p53 protein accumulation is a strong prognostic molecular marker in breast cancer." Breast Cancer Res **6**(1): R24-30.
- Yancik R, Wesley MN, Ries LA, Havlik RJ, Edwards BK, Yates JW. (2001). "Effect of age and comorbidity in postmenopausal breast cancer patients aged 55 years and older." JAMA **285**(7): 885-892.
- Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. (2010). "Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential." Lancet Oncol **11**(2): 174-183.
- Yoder BJ, Wilkinson EJ, Massoll NA. (2007). "Molecular and morphologic distinctions between infiltrating ductal and lobular carcinoma of the breast." Breast J **13**(2): 172-179.
- Zhang GJ, Tsuda H, Adachi I, Fukutomi T, Yamamoto H, Hirohashi S. (1997). "Prognostic indicators for breast cancer patients with one to three regional lymph node metastases, with special reference to alterations in expression levels of bcl-2, p53 and c-erbB-2 proteins." Jpn J Clin Oncol **27**(6): 371-377.
- Ziyaie D, Hupp TR, Thompson AM. (2000). "P53 and breast cancer." Breast **9**(5): 239-246.