



**INMUNOFENOTIPOS DE CÁNCER DE MAMA EN  
PACIENTES JÓVENES (40 AÑOS O MENORES):  
ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA  
DE LA VÍA IGF1R, PTEN/Akt/mTOR.**

**María Planelles Asensio**

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA  
2015**



**INMUNOFENOTIPOS DE CÁNCER DE MAMA EN PACIENTES  
JÓVENES (40 AÑOS O MENORES):  
ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA  
VÍA IGF1R, PTEN/Akt/mTOR.**

**2015**

**Directores:**

Dra. Gloria Peiró Cabrera

Dr. F. Ignacio Aranda López

**Tesis doctoral presentada por:**

María Planelles Asensio



## DEDICATORIA

A **Charo**, mi madre, por ser la persona que más admiro y por haberme dado siempre toda la fuerza, la ayuda, el apoyo, los mejores consejos y todo el cariño.

A **Ximi**, por querer estar y seguir creciendo a mi lado. Tú eres el pilar de mi vida.

A **Ana**, por compartir conmigo cada instante de la última etapa de este trabajo.

Sin vosotros **tres** no habría sido capaz de terminarlo.



## AGRADECIMIENTOS

- A **Gloria Peiró** por su dedicación e interés en que este trabajo saliera adelante.
- A **Nacho Aranda** por su constante estímulo y confianza.
- A **Pepe Sánchez** por su desinteresada colaboración en el análisis de datos.
- A **Antonio Palazón** por su valiosa ayuda y consejos metodológicos.
- A **Encarna Adrover** y **Jose Ponce** por facilitarme el acceso a los seguimientos de las pacientes.
- A los compañeros del Hospital General Universitario de Alicante (**Cristina, María, Javier, Artemio, Paqui, Antonio, Ana y Miguel**) y muy especialmente, a **Concha Córdoba** por su ayuda cuando la he necesitado.
- A los compañeros del Hospital Virgen de los Lirios de Alcoy (**Quico, Araceli, José Luis, Amparo Oltra, Amparo Iraola y Anna**) por vuestra buena disposición y generosidad.
- Al personal técnico que ha colaborado en la realización de parte de este trabajo (**Maria Dolores, Cristina, Patri, Fany, Carmina, Carmen, Amparo y Amanda**).
- A **Pepe**, mi padre; a **Pepe**, mi hermano; a **Pepe y Maruja**, mis “abus” y a todos los familiares y amigos que en algún momento supieron darme ánimos para poder continuar.
- A **Lydia** y **Santiago** por ofrecerme vuestra amistad y vuestro apoyo en esta etapa final del trabajo con tantos cambios. Formáis un equipo admirable.
- A las pacientes que fueron seleccionadas para este estudio. Ellas son las verdaderas protagonistas de esta Tesis Doctoral.



# ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	13
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>19</b>
<b>1.1. Epidemiología del cáncer de mama. ....</b>	<b>19</b>
<b>1.2. Cáncer de mama en mujeres jóvenes. ....</b>	<b>20</b>
<b>1.3. Factores clínico-patológicos del cáncer de mama. ....</b>	<b>21</b>
<b>1.4. Clasificación molecular del cáncer de mama. ....</b>	<b>22</b>
1.4.1. Fenotipos moleculares. ....	24
1.4.2. Inmunofenotipos de cáncer de mama en pacientes jóvenes. ....	27
1.4.3. Vías moleculares en cáncer de mama. ....	27
<b>1.5. Justificación.....</b>	<b>41</b>
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>45</b>
<b>2.1. HIPÓTESIS .....</b>	<b>45</b>
<b>2.2. OBJETIVOS .....</b>	<b>45</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
<b>3.1. Diseño del estudio.....</b>	<b>49</b>
<b>3.2. Sujetos. ....</b>	<b>49</b>
3.2.1. Criterios de inclusión. ....	49
3.2.2. Criterios de exclusión.....	49
3.2.3. Número de sujetos.....	49
3.2.4. Criterios de selección.....	50

3.2.5. Muestras tumorales.....	50
<b>3. 3. Variables.....</b>	<b>50</b>
<b>3.4. Recogida de variables.....</b>	<b>54</b>
<b>3.5. Análisis.....</b>	<b>57</b>
3.5.1. Análisis descriptivo.....	57
3.5.2. Análisis inferencial (bivariante basal).....	58
3.5.3. Análisis inferencial (bivariante longitudinal).....	59
<b>3.6. Análisis multivariante.....</b>	<b>60</b>
<b>3.7. Cuestiones generales.....</b>	<b>61</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>65</b>
<b>4.1. Estudio descriptivo de variables clínicas, morfológicas (tipo histológico y grado).....</b>	<b>65</b>
<b>4.2. Estudio descriptivo de las variables morfológicas en pacientes sin neoadyuvancia.....</b>	<b>67</b>
<b>4.3. Estudio descriptivo de las variables inmunohistoquímicas.....</b>	<b>69</b>
4.3.1. Estudio descriptivo de las variables inmunohistoquímicas (I) en toda la serie de pacientes. .....	69
4.3.2. Estudio descriptivo de las variables inmunohistoquímicas (II) en pacientes sin neoadyuvancia.....	70
4.3.3. Estudio descriptivo de las variables inmunohistoquímicas (III) (PTEN, IGF1R, pAkt y p- mTOR) en pacientes sin neoadyuvancia.....	71
<b>4.4. Estudio de asociación entre inmunofenotipos y variables clínicas y morfológicas (grado y tipo histológico) en todas las pacientes de la serie.....</b>	<b>73</b>
<b>4.5. Estudio de asociación entre inmunofenotipos y variables morfológicas en pacientes sin neoadyuvancia.....</b>	<b>75</b>

4.6. Estudio de asociación entre inmunofenotipos y variables inmunohistoquímicas en pacientes sin neoadyuvancia. ....	77
<b>4.7. Estudio de supervivencia.....</b>	<b>84</b>
4.7.1. Análisis univariante.....	84
4.7.2. Cálculo de las razones de riesgo (HR) de variables clínicas, morfológicas e inmunohistoquímicas. Regresión de Cox (Recidiva). ....	117
4.7.3. Cálculo de las razones de riesgo (HR) de variables clínicas, morfológicas e inmunohistoquímicas. Regresión de Cox (Mortalidad).....	121
4.7.4. Análisis multivariante.....	125
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>133</b>
<b>5.1 Variables clínicas y morfológicas.....</b>	<b>135</b>
<b>5.2 Variables inmunohistoquímicas.....</b>	<b>136</b>
<b>5.3 Inmunofenotipos y variables clínicas y morfológicas.....</b>	<b>137</b>
<b>5.4 Inmunofenotipos y variables inmunohistoquímicas.....</b>	<b>139</b>
<b>5.5 Pronóstico. Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE)/riesgo de recidiva y variables clínicas, morfológicas e inmunohistoquímicas.....</b>	<b>142</b>
<b>5.6 Pronóstico. Supervivencia Global (SG)/riesgo de mortalidad y variables clínicas, morfológicas e inmunohistoquímicas.....</b>	<b>146</b>
<b>5.7 Limitaciones y fortalezas.....</b>	<b>147</b>
<b>5.8 Implicaciones para la práctica clínica.....</b>	<b>149</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>153</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>156</b>



## ABREVIATURAS

- **QTA:** Quimioterapia Adyuvante
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud
- **CDI, NOS:** Carcinoma Ductal Infiltrante, no específico
- **IHQ:** Inmunohistoquímica
- **RE:** Receptores de Estrógenos
- **RP:** Receptores de Progesterona
- **HER2:** Human Epidermal Growth Factor Receptor
- **RH:** Receptores Hormonales
- **HE:** Hematoxilina-Eosina
- **CK:** Citoqueratina
- **TMX:** Tamoxifeno
- **IA:** Inhibidores de Aromatasa
- **TN:** Triple Negativo
- **EGFR:** Epidermal Growth Factor Receptor
- **IGF1R:** Insulin-like Growth Factor 1 Receptor
- **IGF:** Insulin-like Growth Factor
- **IGF2R:** Insulin-like Growth Factor 2 Receptor
- **IGFBP:** Insulin-like Growth Factor Binding Protein
- **AAS:** Aminoácidos
- **TK:** Tirosinaquinasa

- **KD:** Kilodalton
- **$\alpha$ :** Alfa
- **$\beta$ :** Beta
- **ARN:** Ácido Ribonucleico
- **ARNm:** Ácido Ribonucleico mensajero
- **ADN:** Ácido Desoxirribonucleico
- **Tyr:** Tirosina
- **IRS:** Immunoreactive Score
- **PI3K:** Fosfatidilinositol 3 quinasa
- **PIP3:** Fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato
- **PKB:** Proteína quinasa B
- **mTOR:** mammalian Target of Rapamycin
- **Akt:** serina/treonina quinasa PKB
- **Shc:** Src homology 2 domain-containing
- **RAS:** Ras-mitogen-activated protein kinase
- **MAPK:** Mitogen-activated protein kinase
- **ELK1:** Ets like gene 1
- **VEGFR:** Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
- **RT:** Radioterapia
- **PTEN:** Proteína Fosfatasa con Dominio Homólogo Tensina
- **PBD:** Dominio de unión protein binding
- **PDZ:** Dominio de unión de reconocimiento proteico

- **EMT:** Transición epitelio mesénquima
- **SLE:** Supervivencia libre de enfermedad
- **SG:** Supervivencia global
- **HGUA:** Hospital General Universitario de Alicante
- **HVLA:** Hospital Virgen de los Lirios de Alcoy
- **CGA:** Campo de Gran Aumento
- **CDIS:** Carcinoma in situ
- **TMA:** Tissue microarray
- **PI:** Fosfoinositol
- **AJCC:** American Joint Committee on Cancer
- **GP:** Gloria Peiró
- **MP:** María Planelles







## **1. INTRODUCCIÓN**



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Epidemiología del cáncer de mama.

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente entre las mujeres. En el año 2012 se diagnosticaron más de un millón y medio de casos nuevos en todo el mundo. Desde el año 2008, la incidencia de esta neoplasia ha aumentado en un 20%, mientras que la mortalidad ha disminuido en un 14%. No obstante, sigue siendo la causa más frecuente de muerte por cáncer entre las mujeres (188.000-269.000 muertes al año).<sup>[1]</sup> Sin embargo, el rango de mortalidad en los países occidentales es mucho menor que el de otros tipos tumorales (6-100.000 habitantes).<sup>[2, 3]</sup>

La etiología de esta neoplasia es multifactorial. Se han descrito causas genéticas y ambientales, además de factores reproductivos y hormonales.<sup>[4]</sup> La nuliparidad, una larga historia menstrual, el uso de anticonceptivos, el tratamiento hormonal sustitutivo y una edad tardía del primer parto incrementan el riesgo, mientras que el embarazo y la lactancia materna se consideran que tienen un papel protector.<sup>[5]</sup>

En la actualidad, la incorporación al Sistema de Salud de los Programas de Prevención de Cáncer de Mama en Salud Pública ha permitido detectar la presencia de tumores en estadios precoces y con ello, orientar a las pacientes a que sean tratadas desde una perspectiva multidisciplinar, siguiendo las pautas establecidas en las guías clínicas de consenso. Éstas, en base a los diferentes criterios clínicos y morfológicos del tumor, facilitan la estandarización del diagnóstico y del tratamiento con el objetivo de conseguir una mejor calidad de vida.<sup>[6]</sup>

La mayor parte de los casos de cáncer de mama (70-75%) aparecen en mujeres sin antecedentes familiares, por lo que se consideran esporádicos.<sup>[7]</sup> Sin embargo, entre un 15-20% presentan antecedentes familiares. Se desconoce con qué frecuencia esta agregación familiar se debe al azar, a influencias ambientales, a diferentes estilos de vida, o bien a una susceptibilidad genética. Estos casos son considerados cánceres de mama de tipo familiar.

Por otra parte, existe entre un 5-10% de casos que son atribuidos a genes de alta penetrancia y que muestran patrón de herencia autosómico dominante. Menos de la

mitad son debidos a mutaciones germinales de los genes *BRCA1* y *BRCA2*.<sup>[8]</sup> Sólo una minoría se deben a mutaciones en genes de alto riesgo muy poco frecuentes como *ATM* (Ataxia-Telangiectasia), *TP53* (síndrome de Li-Fraumeni) y *PTEN* (síndrome de Cowden). Los tumores de mama que se desarrollan en el contexto de estos síndromes se consideran hereditarios y, característicamente, suelen diagnosticarse en edades muy tempranas, tienen alto riesgo de bilateralidad y están asociados a una fuerte agregación familiar.

## **1.2. Cáncer de mama en mujeres jóvenes.**

Un 7% de los casos de cáncer de mama se diagnostican en mujeres antes de los 40 años.<sup>[9]</sup> Es el tumor que con mayor frecuencia aparece entre adolescentes y adultos jóvenes (15-35 años).<sup>[10, 11]</sup>

A partir de los 50 años el riesgo es más elevado, en hasta 6,5 veces, hallándose el pico de mayor incidencia alrededor de los 60 años. Los resultados de diferentes estudios son contradictorios, ya que para unos la edad ha de considerarse en sí misma un factor de mal pronóstico, mientras que otros no la consideran un factor independiente.<sup>[12-14]</sup>

Sin embargo, existen múltiples evidencias de que los tumores de las pacientes de menor edad tienen un perfil biológico diferente respecto a los tumores de las pacientes de mayor edad.<sup>[15]</sup> En general, se considera que los casos a edades tempranas muestran una serie de características clínicas e histopatológicas más agresivas.<sup>[17-19]</sup> Los tumores de estas pacientes suelen tener un tamaño mayor y alto grado de malignidad y las pacientes muestran peor pronóstico, con un elevado porcentaje de recidiva local y menor supervivencia global, si se compara con las características clínicas y morfológicas de los tumores grupos de pacientes mayores.<sup>[16-19]</sup>

Recientemente se han publicado algunos estudios que analizan la expresión génica de los tumores en el grupo de pacientes jóvenes,<sup>[20]</sup> identificándose hasta 63 genes que específicamente aparecen alterados, a través de los cuales se pueden estudiar las vías moleculares que se ven afectas, siendo alteraciones oncogénicas específicas y distintas de las que promueven la tumorigénesis en pacientes con mayor edad.

El tratamiento habitual en estadios iniciales del cáncer de mama en estas pacientes jóvenes suele ser la cirugía conservadora seguida de quimioterapia sistémica adyuvante (QTA) o la neoadyuvancia. En general, las pautas de tratamiento son distintas a las que se emplean en pacientes mayores.<sup>[21]</sup>

Se ha sugerido que con la mastectomía el riesgo de recidiva local es menor que con cirugía conservadora. En caso de cirugía conservadora, es recomendable que el seguimiento a largo plazo sea prolongado, ya que incluso tras la QTA, existe un riesgo de recidiva local al año del diagnóstico del 1% que se mantienen durante los 15 años siguientes.<sup>[22]</sup>

Además de todo lo expuesto, en las últimas décadas la incidencia entre mujeres jóvenes parece seguir en aumento, debido probablemente a cambios relacionados con el estilo de vida.<sup>[16]</sup>

### **1.3. Factores clínico-patológicos del cáncer de mama.**

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea. Su pronóstico está asociado a diferentes factores morfológicos clásicos como el tamaño tumoral, el grado histológico,<sup>[23]</sup> el estado de los ganglios axilares, la invasión vascular, la presencia de necrosis y la distancia a los márgenes de resección. Algunos de estos factores están incluidos en el sistema de estadificación TNM,<sup>[24]</sup> el cual permite agrupar a las pacientes, según el nivel de progresión tumoral que se relaciona con la probabilidad de recidiva y, por tanto, con el pronóstico. Además, contribuye a la toma de decisiones en cuanto al tratamiento más adecuado.

Desde un punto de vista histológico, las neoplasias infiltrantes de mama se han venido clasificando atendiendo a criterios bien establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en diferentes grupos según sean de origen epitelial, mesenquimal, mixto, linfoide o metastásico. Existe un amplio espectro de fenotipos morfológicos y subtipos específicos, cada uno de ellos con sus particularidades de presentación clínica y pronóstica. El carcinoma ductal infiltrante no específico (CDI, NOS) es el tipo histológico más frecuente, supone el 75% de todos los tipos tumorales.<sup>[25]</sup>



Por otra parte, se ha confirmado la existencia de una correlación entre algunos de los tipos histológicos tumorales descritos por la OMS (tubular, mucinoso, micropapilar, neuroendocrino o medular)<sup>[35]</sup> con algunos de los *subtipos moleculares*, bien dentro del grupo de bajo riesgo, o bien en el de alto riesgo. Cabe decir que este concepto ya se venía sugiriendo años antes de la *era molecular* por algunos investigadores, que apuntaban que el estudio histopatológico convencional de los tumores con Hematoxilina-Eosina (HE) bastaba para poder clasificar los tumores morfológicamente y que, además, esta clasificación morfológica era ya, en sí misma, un factor pronóstico.<sup>[36, 37]</sup>

En cualquier caso, cada alteración molecular puede tener un impacto clínico diferente dependiendo del microambiente tisular en el que se desarrolle cada tumor, de la presencia de otras alteraciones en las vías moleculares intracelulares que se produzcan concomitantemente y de los tratamientos recibidos. Además, la heterogeneidad genética del cáncer de mama y el origen celular de cada *subtipo* tumoral hacen necesario un análisis independiente en cada caso, para comprobar cuál de las vías moleculares intracelulares está alterada en los diferentes *subtipos intrínsecos*.<sup>[20, 38]</sup>

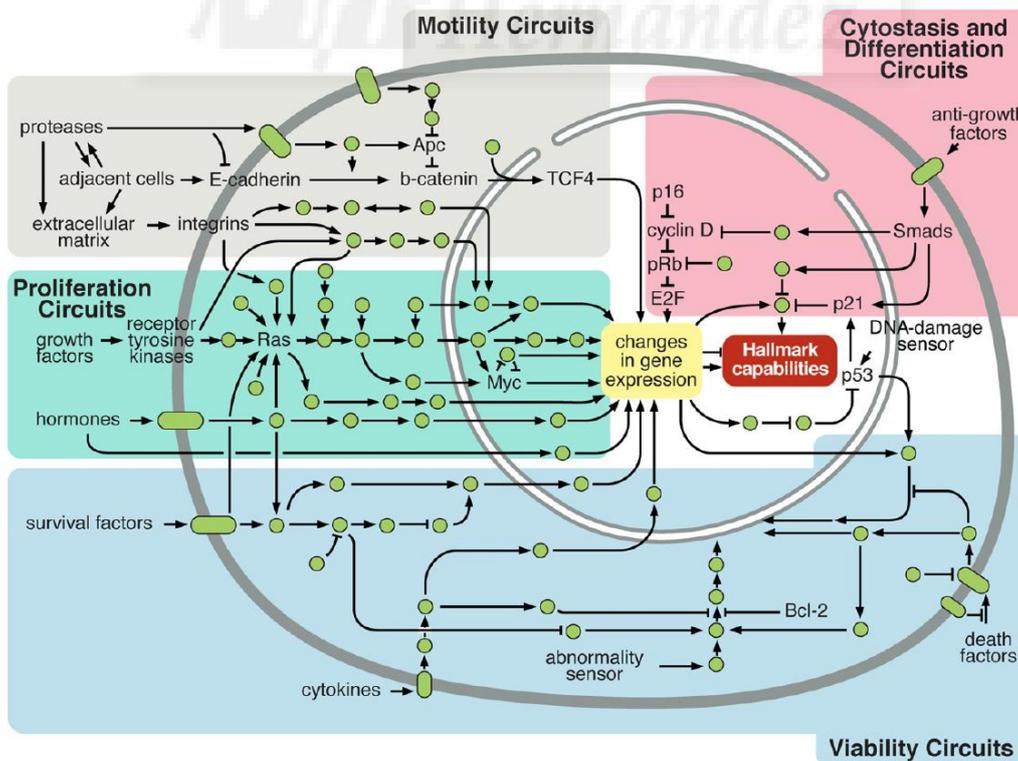


Figura 2. Intracellular Signaling Networks Regulate the Operations of the Cancer Cell. Hanahan, D; Weinberg, RA. Cell, 2011.

### 1.4.1. Fenotipos moleculares.

**Luminal A:** Este grupo constituye entre el 50-60% de casos. Se caracteriza por la expresión de genes dependientes de RE y otros asociados como *GATA binding protein 3*, *X-box binding protein 1*, *trefoil factor 3*, *hepatocyte nuclear factor 3 alfa*, *estrogen-regulated LIV* y *ciclina D1*, así como queratinas de bajo peso molecular (CK7, CK8, CK18). Estas últimas se expresan en el epitelio luminal de los ductos mamarios. Además, este subtipo muestra una baja expresión de genes relacionados con la proliferación celular.<sup>[29, 30]</sup>

El estudio de expresión de p53 se ha propuesto para identificar, dentro del subtipo Luminal, un grupo de peor pronóstico. Actualmente, este marcador aporta información adicional, ya que no en todos los casos en los que está mutado *PT53* habrá sobreexpresión. Además, no todas las mutaciones tienen las mismas implicaciones clínicas.<sup>[39]</sup>

Como estos tumores expresan RE, responden bien al tratamiento con tamoxifeno (TMX) y/o a inhibidores de la aromatasa (IA), pero la respuesta es peor con la QTA. A pesar de ello, es el subtipo asociado a un mejor pronóstico entre las pacientes.

**Luminal B-like/HER2 negativo:** Si el tumor expresa RE ( $\geq 1\%$ ), no expresa HER2 y expresa al menos una de las siguientes características: Ki67 alto ( $\geq 14\%$ ), RP (negativo o  $\leq 20\%$ ) o alto riesgo de recurrencia, basado en los estudios de expresión multigénica (si estuvieran disponibles). Este subtipo representa entre el 10-20% de todos los casos y muestra expresión moderada de genes del epitelio luminal de los ductos mamarios. Aunque expresan RE, también tienen una alta expresión de genes relacionados con la actividad proliferativa como *CCNB1*, *MKI67* y *MYBL2*.<sup>[40, 41]</sup>

**Luminal B-like/HER2 positivo:** Si el tumor expresa RE y HER2 está sobreexpresado o amplificado, independientemente de la expresión de RP y de la actividad proliferativa. Este subgrupo muestra peor pronóstico. Se corresponde al subtipo Luminal B de alto riesgo, según exprese mayor o menor actividad proliferativa y debido a la expresión de HER2.<sup>[42]</sup>

**HER2:** Entre el 15-20% de los carcinomas de mama se incluyen en este subtipo. Se caracteriza por expresar genes que se encuentran en el cromosoma 17q22.24,

incluyendo el oncogén *ERBB2* y un conjunto de genes como *GRB7*, *TOPO2A*, *GATA4*, relacionados con genes de angiogénesis y de proteólisis.

La sobreexpresión y/o amplificación de *HER2* era hasta hace unos años un factor de mal pronóstico.<sup>[43]</sup> Desde la introducción de tratamiento diana específico antiHER2 (Trastuzumab®) ha habido un aumento significativo en la tasa de remisión de la enfermedad y ha mejorado mucho el pronóstico de las pacientes.<sup>[44]</sup>

**Triple Negativo:** Este subtipo es el menos frecuente, aproximadamente 10-15%. Se caracteriza por la expresión de genes asociados con las células mioepiteliales (*p63*, *S100*, *EGFR*, *CAV1*) con expresión de proteínas específicas (*p63*, proteína *S100*, *EGFR* y caveolina-1, respectivamente) y/o de las células basales del epitelio mamario (*CK5/6*, *CK14*, *CK17*). Ambos tipos celulares están dispuestos en íntimo contacto en el tejido mamario normal, tanto de los lobulillos como de los conductos.

El subgrupo **Basal-like** está constituido casi en su mayoría (75%) por tumores triple negativos (TN) (RH/HER2 negativos). En la práctica clínica se equipara el término **Basal-like** al de **TN**; pero no son términos sinónimos<sup>[45]</sup> puesto que, si bien el 70-80% de los tumores Basal-like son TN, existe una discordancia de expresión de marcadores IHQ de al menos un 30% en los dos grupos.<sup>[46]</sup> Así pues, una definición basada en la ausencia de expresión de RH y HER2 no basta, dado que aumenta la posibilidad de errores de clasificación. Por este motivo, actualmente se recomienda utilizar un panel de cinco anticuerpos que incluya RE, RP, HER2, EGFR y CK5/6 para su clasificación, con una especificidad del 100% y una sensibilidad del 76%. Como consecuencia, este subgrupo de tumores ha pasado a denominarse recientemente subtipo *quíntuple negativo*.<sup>[47, 48]</sup>

Por otra parte, los casos de cáncer de mama que se desarrollan en pacientes con mutaciones germinales de *BRCA1* suelen ser del subtipo TN/Basal-like<sup>[49]</sup> y no existen en la actualidad tratamientos diana ni QTA específica para ellos. No suelen expresar genes relacionados con RH ni HER2, pero existen estudios que demuestran que entre un 15-54% de estos casos expresa al menos uno de estos marcadores.<sup>[50]</sup>

Recientemente se ha profundizado en la caracterización de este subtipo y se sugiere que la estratificación molecular de las pacientes con tumores TN, basado en el perfil de expresión génica Basal-like versus No Basal-like.<sup>[51]</sup>

Masuda et al., han propuesto subclasificar a las pacientes con tumores TN y que reciben tratamiento neoadyuvante en 7 grupos, los cuales pueden ayudar a predecir el

grado de respuesta patológica completa, lo que permitiría profundizar en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas para cada paciente.<sup>[52]</sup>

**Tejido mamario normal:** El subtipo **Normal-Breast** forma parte de la clasificación de subtipos moleculares junto al tejido mamario normal. Expresa genes característicos del tejido adiposo y tienen un pronóstico intermedio entre el subtipo Luminal y el Basal-like. Han sido poco estudiados, pero actualmente existe controversia de la existencia de este grupo como subtipo tumoral. Se considera que este subgrupo es el resultado de la existencia de un artefacto técnico en los estudios de expresión con microarrays.<sup>[53]</sup>

Se ha descrito el subtipo **Claudin-low** en tumores de mama de ratones y en estudios con líneas celulares de cáncer de mama.<sup>[53-55]</sup> Son tumores que no expresan RH ni HER2, muestran signos de diferenciación metaplásica y/o tienen un patrón de crecimiento de tipo medular-like. También se asocian con mal pronóstico. Los resultados preliminares señalan que tienen una respuesta intermedia en los protocolos convencionales de tratamiento con QTA, y que ésta se encuentra entre la observada en los tumores de subtipo Luminal y los TN/Basal-like.

Durante esta última década han ido surgiendo numerosas plataformas génicas, las cuales mediante técnicas moleculares clasifican cada tumor según los genes que exprese, en “alto” o “bajo” riesgo y los correlaciona con el pronóstico, con la capacidad metastásica y con el índice de sensibilidad a determinados tratamientos de QTA. Entre ellos destacan OncotypeDX, Mammaprint y PAM50. Actualmente, algunos centros las ofrecen sólo a las pacientes que cumplan determinados criterios clínico-morfológicos.<sup>[56]</sup> Su objetivo último es servir de ayuda, como una herramienta más, en la toma de decisiones terapéuticas.<sup>[57]</sup> Sin embargo, en la mayoría de los hospitales su uso se encuentra limitado, ya que estas técnicas tienen un coste más elevado que las convencionales.

Se han validado paralelamente herramientas de IHQ, más accesibles económica y metodológicamente. Su finalidad es ser una técnica complementaria al diagnóstico de rutina. Mediante el uso de anticuerpos comerciales se puede reproducir la clasificación molecular con un reducido panel, aunque todavía con ciertas limitaciones.<sup>[58, 59]</sup>

Los biomarcadores más relevantes son: RE, RP, HER2 (panel básico de inmunohistoquímica junto al diagnóstico histopatológico), Ki67, queratinas luminales o de alto peso molecular, p63 y EGFR.<sup>[48, 60-62]</sup>

#### **1.4.2. Inmunofenotipos de cáncer de mama en pacientes jóvenes.**

En la literatura científica existe mucha menos información respecto a la prevalencia de inmunofenotipos de cáncer de mama en pacientes jóvenes que respecto a los inmunofenotipos de cáncer de mama en todos los grupos de edad.<sup>[11, 13, 18, 63-65]</sup> Tradicionalmente, este tipo de neoplasia a edades tempranas se ha asociado con altas tasas de recidiva y con una menor supervivencia,<sup>[14]</sup> por lo que sería esperable encontrar tumores con fenotipos agresivos. Sin embargo, los resultados de las series publicadas son contradictorios. Por una parte, se ha descrito una mayor proporción de tumores de fenotipo Luminal B y una menor prevalencia del subtipo Luminal A.<sup>[18, 66]</sup> Otros estudios concluyen que el subtipo más frecuente es el TN/Basal-like.<sup>[61, 67]</sup> Por tanto, se hacen necesarios más estudios que incluyan series con mayor número de pacientes, los cuales ayudarían a clarificar estos resultados.

Además, es imprescindible el análisis de vías moleculares y de biomarcadores asociados al control de las vías más relevantes implicadas en el cáncer de mama. De esta forma se podrán determinar alteraciones que expliquen la heterogeneidad tumoral y el pronóstico tan variable entre las pacientes más jóvenes.<sup>[20]</sup>

#### **1.4.3. Vías moleculares en cáncer de mama.**

Durante esta última década el número de investigaciones relacionadas con identificación, definición y comprensión de novedosas vías moleculares intracelulares y de su papel, tanto en los mecanismos fisiológicos como en los mecanismos de transformación neoplásica, ha aumentado exponencialmente.<sup>[68, 69]</sup> De la importancia de conocer las alteraciones a nivel molecular subyace la necesidad de identificar biomarcadores que ayuden a seleccionar dianas moleculares implicadas en la tumorigénesis.<sup>[20]</sup>

En los últimos años, se ha avanzado exponencialmente en el diseño de tratamientos farmacológicos dirigidos a inhibir y/o bloquear estas dianas y, a su vez,

las rutas intracelulares implicadas en la carcinogénesis. En relación con estos avances, el cáncer de mama a nivel molecular resulta, a la vez que heterogéneo, un reto ante las múltiples alteraciones genéticas que pueden producirse en las diferentes vías intracelulares. Sin embargo, continúa sin existir una clara respuesta a la pregunta de por qué algunas pacientes con el mismo diagnóstico histopatológico y características moleculares, que lo clasifican dentro de un determinado subgrupo molecular, presentan diferente evolución clínica.

Smid et al., concluyeron que los cinco subtipos moleculares tienen capacidades de metastatizar en diferentes órganos y que comparten características biológicas y vías moleculares con los tejidos donde metastatizan.<sup>[70]</sup> Es por ello que, en la actualidad, se está haciendo necesario redefinir las características moleculares de los cinco subgrupos inicialmente descritos. Además, se ha sugerido que la heterogeneidad podría ser debida, al menos en parte, a las múltiples interacciones con el microambiente tumoral y/o alteraciones simultáneas con otros genes.<sup>[71]</sup>

#### **1.4.3. a. Insulin-like Growth Factor 1 Receptor (IGF1R).**

La vía de señalización controlada por IGF1R juega un papel importante en el crecimiento y diferenciación celular, particularmente en el crecimiento y desarrollo de la glándula mamaria normal. Interviene además en diferentes procesos metabólicos.

IGF1R es un receptor transmembrana que forma parte del sistema insulin-like growth factor (IGF) junto con el receptor Insulin-like Growth Factor 2 Receptor (IGF2R). El resto de componentes del sistema lo constituyen ligandos IGF (IGF1-2) y proteínas de unión (binding proteins (IGFBP1-6)). Todos ellos interaccionan entre sí formando una imbricada red de señales intracelulares, la cual tiene repercusión en otras vías biológicas de señalización.<sup>[72]</sup>

Los ligandos IGF1 e IGF2 son péptidos mitogénicos conocidos como somatomedinas, son homólogos entre sí en el 62% de sus secuencias de aminoácidos (aas) y, en menor porcentaje, homólogos también con la insulina. Tienen efecto autocrino, endocrino y paracrino en la formación y crecimiento de la glándula mamaria.<sup>[73]</sup>

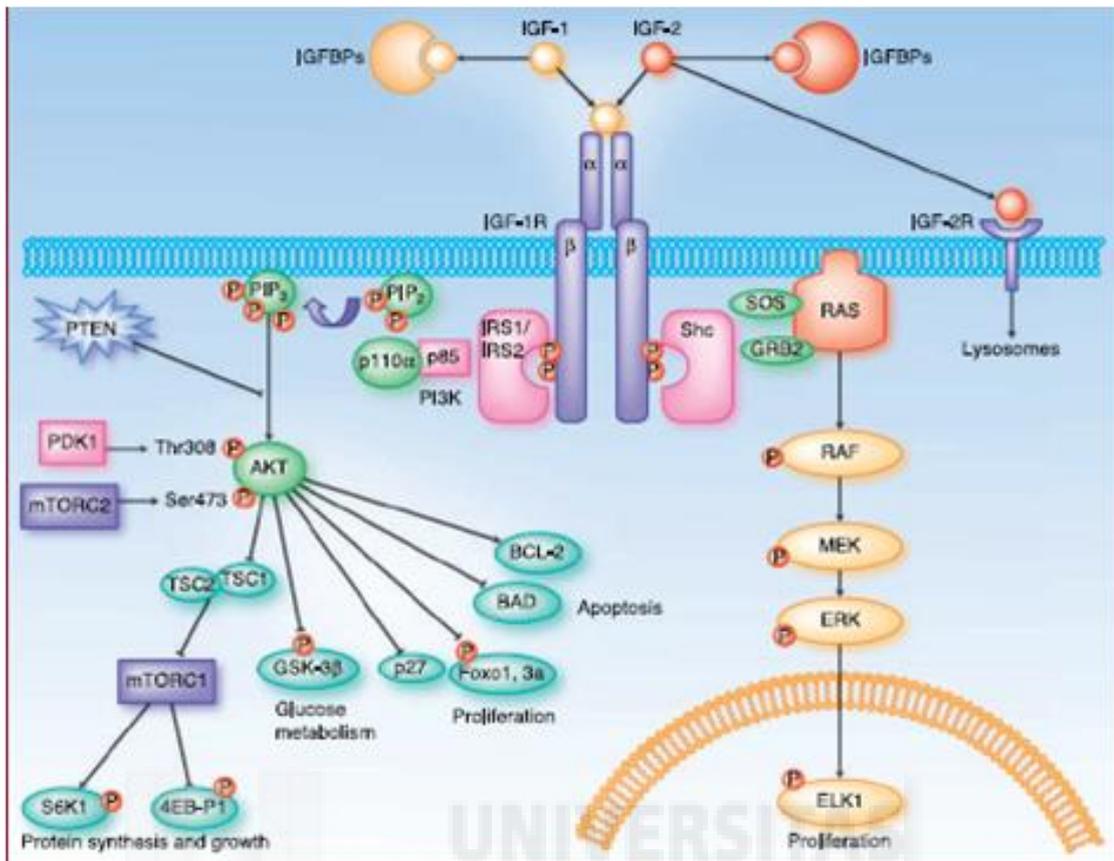


Figura 3. Key components of the IGF-1R pathway. Zha, J. Clin Cancer Res, 2010.

El gen que codifica IGF1R está localizado en el cromosoma 15q26.1. IGF1R es un receptor proteico transmembrana heterotetramérico glicosilado que forma parte de la familia de los receptores con actividad tirosina quinasa (TK). Está constituido por dos subunidades alfa ( $\alpha$ ) y dos subunidades beta ( $\beta$ ). Las cadenas  $\alpha$  se localizan extracelularmente, mientras que las subunidades  $\beta$  son dominios transmembrana e intracelulares.<sup>[72]</sup> Ambas se sintetizan a partir de un precursor único de ARN mensajero (ARNm). La región intracelular de la subunidad  $\beta$  tiene un lugar de unión para la fosforilación de sustratos en el residuo 950 de tirosina, un lugar de unión al ATP en el residuo 1003 de lisina, un dominio TK con tres tirosinas críticas (posición 1131, 1135 y 1136), y algunas tirosinas en el dominio C terminal (posiciones 1250, 1251 y 1316).

Existen modelos experimentales que demuestran que algunas de las funciones son dominio-receptor-dependiente: síntesis de ADN (dependiente del dominio TK), apoptosis y metástasis (dependientes de dominios TK y dominio C terminal), migración/invasión (dependiente de dominio TK a través de tirosina 1250/1251) y mediación de radioresistencia (Tyr1251).<sup>[74]</sup>

La unión del ligando a la subunidad  $\alpha$  induce un cambio conformacional en las subunidades del receptor, dando como resultado la autofosforilación y la activación del dominio TK intracitoplasmático,<sup>[75]</sup> y como consecuencia, la activación de diferentes vías de señalización intracelulares. IGF1R fosforilado recluta y activa proteínas adaptadoras de señalización IRS-1, IRS-2 y Shc.

IRS-1 fosforilado se une a la subunidad reguladora del fosfatidil-inositol 3'quinasa (PI3K), estimulando su actividad a través de la cual se verán aumentados los niveles de fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato (PIP3) en la membrana citoplasmática. Esta situación servirá para reclutar a la proteína quinasa B (PKB/Akt) en la membrana celular, donde podrá ser fosforilada y activada por PDK1 y por el complejo enzimático mammalian target of rapamycin (mTOR).

La activación de Akt tiene efecto antiapoptótico a través de la inhibición de la fosforilación de factores pro-apoptóticos.<sup>[76]</sup>

Por otra parte, la activación de Shc estimula la activación de la vía de Ras-mitogen-activated protein kinasa (RAS/MAPK) y la trasducción de señales mitogénicas a través de la activación nuclear de ELK1, produciéndose por esta vía la activación de la proliferación celular.

La alteración de este sistema está relacionada con alteraciones metabólicas, déficits de crecimiento y desarrollo de neoplasias. IGF1R se ha encontrado significativamente sobreexpresado y activo en células neoplásicas de diferentes tipos de tumores de mama, colon, páncreas, riñón, pulmón y melanoma.<sup>[72, 77]</sup>

Estudios epidemiológicos y clínico-patológicos recientes apoyan el papel de IGF1R como factor clave en el desarrollo y progresión tumoral.<sup>[78]</sup> Su sobreexpresión se requiere para que ocurra la transformación neoplásica, siendo paso obligado para poder adquirir un determinado fenotipo tumoral,<sup>[79]</sup> lo cual parece tener consecuencias funcionales, en particular en la capacidad de bloquear la apoptosis.<sup>[77]</sup>

En pacientes con cáncer de mama se han detectado niveles elevados de expresión de IGF1R en un 30-80% de casos,<sup>[80]</sup> aunque su valor pronóstico es todavía controvertido.<sup>[81-85]</sup> Un alto porcentaje de tumores de tipo Luminal A expresan IGF1R, seguido por tumores de tipo Luminal B y HER2. Con menor frecuencia se expresa en tumores de tipo TN/Basal-like. Como consecuencia, algunos autores han establecido la relación entre la coexpresión de los RH y de IGF1R.<sup>[82, 86-89]</sup> Partiendo de la base de que

los IGFs ejercen efectos mitogénicos potentes sobre los RH, se sugiere que éstos también potencian el crecimiento en las células neoplásicas<sup>[90]</sup> y, por tanto, se produce un efecto “cross-talk” entre el sistema IGF y los RH. Este efecto también puede ocurrir en células neoplásicas que expresen EGFR, HER2 y VEGFR.<sup>[87]</sup> Sin embargo, otros estudios no han demostrado correlación entre la expresión de IGF1R con el “status” de RE, pero sí entre la expresión de IGF1R y los tumores de pacientes con mal pronóstico.<sup>[83]</sup>

Por otra parte, el tratamiento antiestrogénico tiene también efecto sobre el sistema IGF. Debido a este “cross-talk”, puede explicarse que el TMX produzca una reducción de la intensidad de la señal IGF1R-dependiente como parte de sus mecanismos de acción.<sup>[91]</sup> El papel que ejerce el sistema IGF en la resistencia al tratamiento endocrino ha sido objeto de varios estudios, pero los resultados son contrapuestos.<sup>[87, 92-94]</sup> A pesar de ello, algunos autores consideran que el estudio de expresión de este receptor aporta información pronóstica, especialmente en pacientes con tumores de mama RH positivos. Recientemente, se ha sugerido que IGF1R puede tener alguna implicación en el desarrollo de un subgrupo de pacientes con tumores de mama del subtipo TN/Basal-like.<sup>[95, 96]</sup> Pero, sin duda, uno de los aspectos más importantes del estudio de IGF1R es que se ha convertido en una diana clave para estudiar estrategias terapéuticas dirigidas, utilizando anticuerpos anti-IGF1R, bien de forma aislada, bien incluido en protocolos de tratamientos de QTA convencional y RT.<sup>[97, 98]</sup>

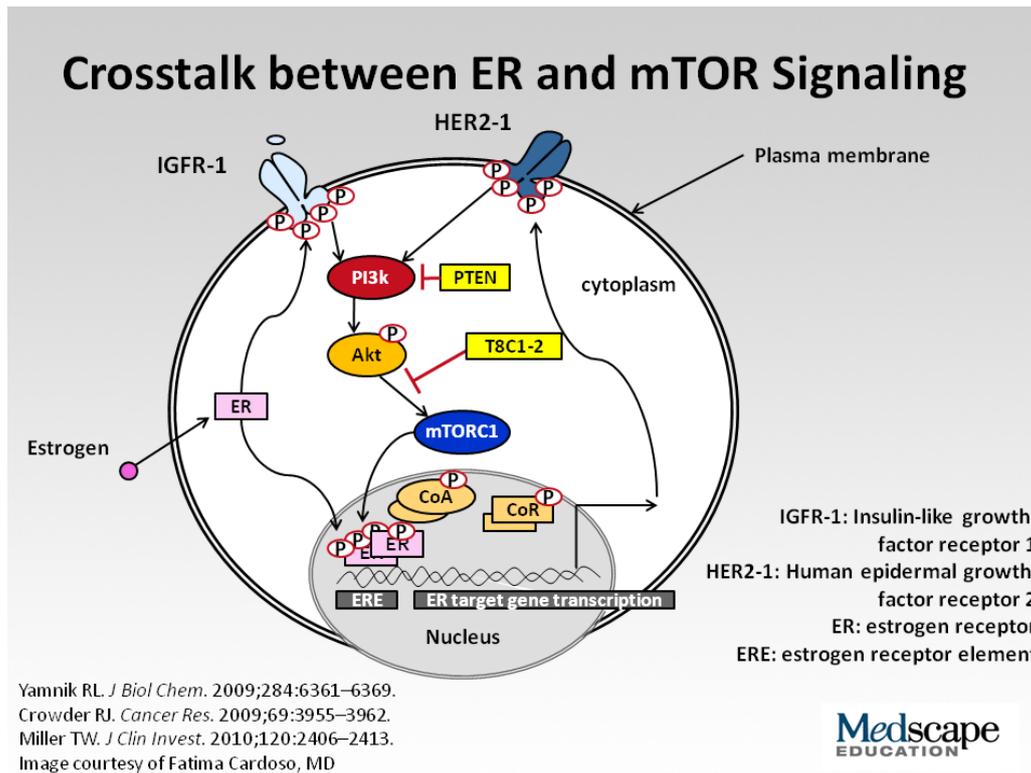


Figura 4. Crosstalk between ER and mTOR Signaling. Medscape education.

Por otra parte, algunas líneas de investigación recientes sugieren que el incremento de expresión de IGF1R en el citoplasma del epitelio ductal benigno y de la glándula mamaria se correlaciona con el aumento del riesgo de desarrollar cáncer de mama.<sup>[99]</sup>

Por último, otros autores han demostrado que niveles altos de expresión de ARNm *IGF1R* se relacionan con un alto potencial metastásico,<sup>[100]</sup> resistencia a tratamiento RT y a alta probabilidad de recidiva local.<sup>[101, 102]</sup> Llegados a este punto, es importante señalar que en la literatura científica actual no existen apenas datos publicados sobre el papel de IGF1R entre los diferentes inmunofenotipos y tampoco acerca de su valor pronóstico en pacientes jóvenes con cáncer de mama.

### 1.4.2. b. Proteína fosfatasa con dominio homólogo tensina (PTEN).

PTEN es una proteína codificada en humanos por el gen *PTEN*, localizado en el cromosoma 10q22-23. Es el segundo gen supresor tumoral más mutado tras *TP53* en humanos. Las mutaciones pueden producirse en todos los dominios de *PTEN*, lo que supone que cada región será clave en cada uno de los posibles procesos tumorales en los que esté implicada.

Durante el desarrollo tumoral las mutaciones, deleciones y/o metilaciones del promotor de *PTEN* provocan la inactivación de su actividad enzimática, lo que se traduce en una ausencia de expresión proteica. Consecuentemente, se produce una acumulación de PIP3, esto simula el efecto de la activación de PI3K y la activación de sus efectores, PDK1, Akt/PKB y Rac1/cdc42 con los que está relacionado. La consecuencia es bidireccional, por una parte se produce un aumento de la actividad proliferativa en la célula tumoral y, por otra parte, la inhibición de la apoptosis.<sup>[103]</sup>

PTEN ejerce la función supresora tumoral a través de su acción fosfatasa, la cual está formada por 403 aa y cinco dominios funcionales: un dominio de unión (PBD), que se corresponde con el dominio de unión de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PI-4,5-P2), un dominio fosfatasa, un dominio fosfolípido de unión a C2 (que permite inhibir la migración celular), una cola carboxi-terminal y un dominio de unión de reconocimiento proteico (PDZ).

La regulación del ciclo celular y de los mecanismos de transición epitelio-mesénquima (EMT) son otras de las funciones que desempeña PTEN dentro del metabolismo celular. También tiene capacidad para inhibir el crecimiento de las células ejerciendo un efecto antagonista al de las proteínas con actividad TK. Se ha descrito también su acción como regulador negativo de la vía de PI3K/Akt, inhibiendo la apoptosis y promoviendo la supervivencia celular.<sup>[103]</sup>

Las mutaciones germinales de *PTEN* son las responsables del síndrome de Cowden y de otros síndromes hereditarios poco frecuentes, agrupados dentro de los llamados *PTEN hamartoma tumor syndromes* (PHTS). Los casos hereditarios de cáncer de mama asociados al síndrome de Cowden (25-50%) suelen aparecer en mujeres jóvenes y, frecuentemente, son bilaterales. En ellos pueden identificarse mutaciones germinales hasta en el 80-85% de los casos. De éstas, dos terceras partes se encuentran en los

exones 5, 7 y 8 del gen. Un 40% ocurren en el exón 5 que codifica para el dominio fosfatasa. Sin embargo, muchas de ellas conservan la función catalítica del gen de forma parcial o completa, lo que sugiere que deben existir mecanismos alternativos de inactivación de PTEN.<sup>[103, 104]</sup> Sin embargo, en todos estos casos existe una pérdida de expresión de la proteína.

La inactivación de *PTEN* también se ha identificado en tumores esporádicos, además de en cáncer de mama, en glioblastoma, tumores de endometrio, próstata y pulmón.<sup>[105, 106]</sup> Pueden detectarse mutaciones de *PTEN* hasta en un 5% de cánceres de mama esporádico. Es poco frecuente encontrar polimorfismos de los exones 3 y 7, pero puede existir pérdida de heterocigosidad hasta en un 40%. La pérdida de expresión de PTEN se ha descrito en un 15-50% de los casos de cáncer<sup>[103]</sup><sup>[101]</sup> y, ocasionalmente, se ha asociado a mal pronóstico en pacientes con tumores esporádicos y hereditarios.<sup>[107]</sup>

Algunos autores han podido demostrar la asociación entre la pérdida de expresión de PTEN y/o su inactivación y el subtipo Basal-like, así como su valor en el pronóstico de las pacientes.<sup>[108, 109]</sup>

Por otra parte, en estudios recientes se ha demostrado un papel esencial de PTEN en los mecanismos de resistencia a Trastuzumab® en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo. La inactivación de *PTEN* por diferentes mecanismos, como su falta de expresión, tienen lugar en el 30-50% de estos casos.<sup>[110-112]</sup>

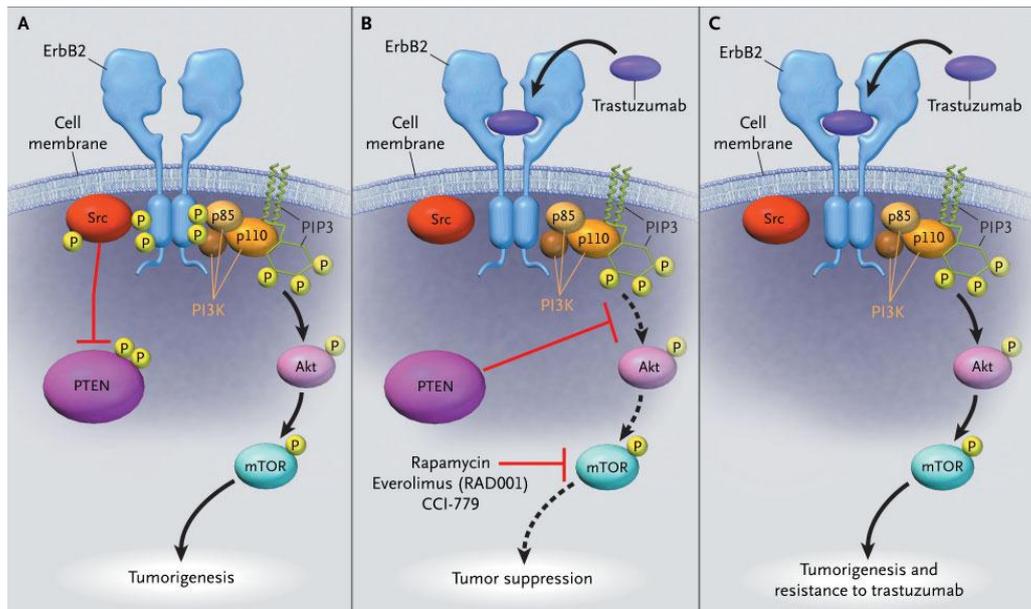


Figura 5. Resistance to Trastuzumab due to PTEN deficiency. Pandolfi, P. N Engl J Med 2004. <sup>[113]</sup>

#### 1.4.2. c. Vía de señalización de PI3K/Akt/mTOR.

Esta vía molecular intracelular tiene un papel clave en la regulación de la supervivencia celular, proliferación, migración, apoptosis, metabolismo y angiogénesis. <sup>[114, 115]</sup>

La familia de proteínas PI3K se divide en tres clases principales, éstas están constituidas por una molécula de fosfatidil-inositol (PI), componente de las membranas lipídicas de las células eucariotas, y por las fosfoquinasas (PIKs) que fosforilan entre otros, el PI. <sup>[116]</sup> Todas ellas tienen una subunidad reguladora p85 y una subunidad catalítica p110. Los genes *PIK3CA*, *PIK3CB* y *PIK3CD* codifican las isoformas homólogas p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  y p110 $\delta$ , respectivamente. <sup>[117]</sup> Las mutaciones descritas en *PIK3CA* (3q26.3) son las alteraciones genéticas que ocurren con más frecuencia en esta vía.

En condiciones fisiológicas, una vez que PI3K fosforila PI-4, 5-P2 y genera el segundo mensajero 3, 4, 5-PI3P, se desencadena una cascada efectora en la célula mediada por la unión a proteínas específicas, con al menos dos tipos diferentes de dominios de unión lípido-proteína, llamados FYVE y homólogo de plekstrina (PH). Los dominios PH son proteínas globulares de 100 aa que se encuentran en muchas otras

proteínas, incluyendo la proteína serina/treonina quinasa 1 dependiente de PI3P (PDK1) y Akt (Proteína quinasa B (PKB)). Además, la subunidad catalítica p110 $\alpha$ , puede estar regulada por los receptores TK, de unión a factores de crecimiento y, también, por los receptores asociados a proteínas G.

Las mutaciones activantes de *PIK3CA* en diversos “hot spots” se producen con más frecuencia en las posiciones E542K, E545K y H1047R. Éstas constituyen más del 80% del total de mutaciones descritas en *PIK3CA* en cáncer de mama. Los resultados de estudios *in vitro* y con cristalografía por rayos X sugieren que las mutaciones en E542K y E545K (exón 9) anulan las interacciones moleculares, mientras que las mutaciones en el exón 20 (dominio H1047R) producen una activación constitutiva del gen.<sup>[103]</sup>

En estudios con ratones transgénicos, la inactivación genética o farmacológica de la expresión de *PIK3CA* (H1047R) da como resultado la desaparición de tumores mamarios. Sin embargo, algunos de ellos recidivan y pueden hacerse resistentes a la inhibición de PI3K por la vía de c-myc.<sup>[118]</sup>

En otros estudios se ha podido demostrar que las mutaciones en el exón 20 de *PIK3CA* son relativamente frecuentes, pudiendo ocurrir hasta en el 23-33% de tumores de subtipo HER2,<sup>[119]</sup> y entre el 28-47% en tumores de subtipo Luminal A. No obstante, también han identificado mutaciones activantes en los exones que codifican la subunidad reguladora p85 $\alpha$  de *PIK3CA*.<sup>[120]</sup>

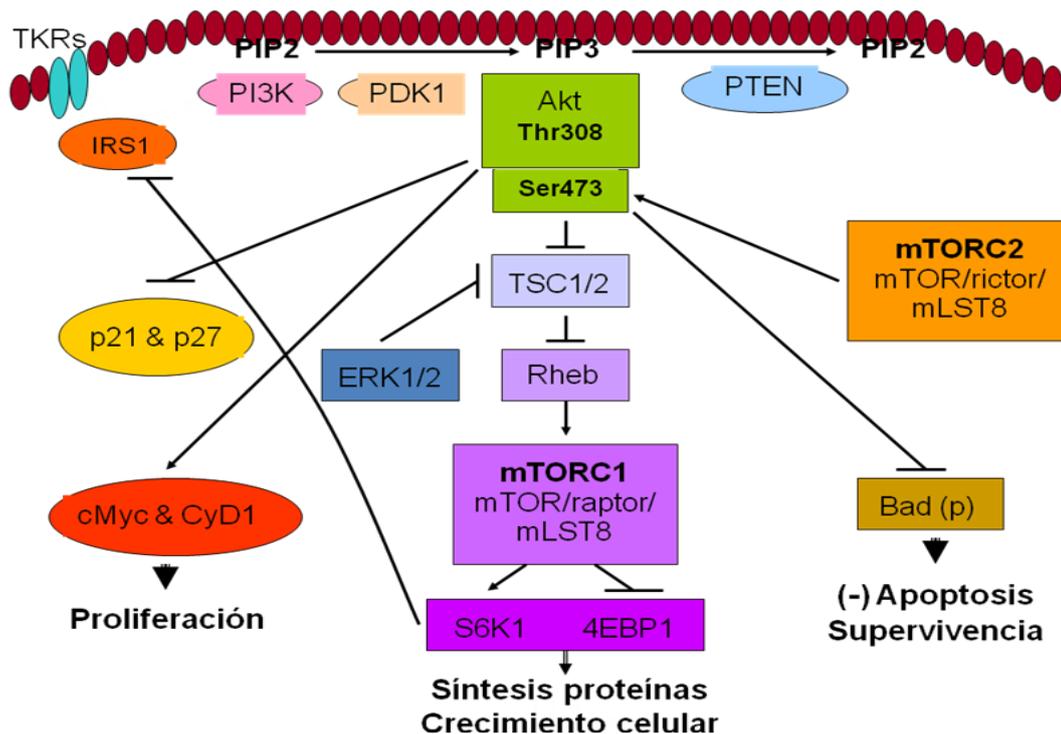


Figura 6. Vía PI3K/PTEN/Akt/mTOR.

Además de su actividad para favorecer el crecimiento y supervivencia celular, la vía PI3K interactúa con los RE de forma directa e indirecta,<sup>[121]</sup> ya que ésta puede ser activada por los RE. Además, la activación de la vía PI3K puede dar lugar a resistencia antiestrogénica, como ha sido demostrado en diversos modelos experimentales,<sup>[122, 123]</sup> la cual puede revertirse tras la inhibición de la vía PI3K. Por ello, determinados estudios sugieren que la combinación de antiestrógenos y de inhibidores de la vía PI3K puede ser una estrategia clínicamente más efectiva que el empleo de tratamiento antiestrogénico único.<sup>[124, 125]</sup>

Se ha demostrado que las mutaciones activantes de *PIK3CA* provocan resistencia a tratamientos anti-HER2 como Trastuzumab®, debido a la activación adicional en esta ruta, independientemente de los dímeros HER2/HER3. También se ha descrito que los tumores HER2 positivos son sensibles a los inhibidores de PI3K y de mTOR, tanto antes como después de adquirir resistencia a tratamientos con Trastuzumab® y/o Lapatinib® (inhibidor dual de HER1/HER2). Esto sugiere que las células tumorales resistentes son PI3K dependientes y que, las pacientes con tumores resistentes a tratamientos dirigidos se podrían beneficiar de los inhibidores de PI3K.<sup>[126]</sup>

**Akt** es una serina/treonina quinasa (PKB) de 57 KiloDaltons (KD). Es el homólogo celular de la oncoproteína viral v-Akt. Interviene en la regulación de las proteínas que participan en la proliferación celular, metabolismo, supervivencia, invasión, migración, apoptosis celular y en los mecanismos de reparación del ADN.

El genoma de los mamíferos contiene tres genes *AKT* que codifican las isoformas Akt1 (PKB $\alpha$ ), Akt2 (PKB $\beta$ ) y Akt3 (PKB $\gamma$ ), las cuales comparten más del 80% de la secuencia de aas. La localización cromosómica de cada gen *AKT* en humanos se ha identificado con técnicas de FISH en los cromosomas 14q32 (*AKT1*), 19q13.1-13.2 (*AKT2*) y en 1q44 (*AKT3*). Cada uno codifica una proteína que contiene un dominio PH, el extremo N-terminal, un dominio quinasa central y un dominio regulador C-terminal. Todos ellos están expresados en diferentes proporciones en tejido pulmonar, renal y cerebro y su sobreexpresión puede detectarse en los tumores de mama, colon y ovario.<sup>[127]</sup>

Para poder realizar las funciones celulares atribuidas a Akt, ésta se ha de unir a PIP3. De la interacción de éste con su dominio PH a través de PDK, tendrá lugar la fosforilación de la posición Thr308, con la consiguiente activación parcial de Akt. Posteriormente, la fosforilación de la posición Ser473 por PDK2 (mTORC2) generará la activación completa de Akt. Una vez activada Akt, ésta es capaz de fosforilar múltiples proteínas (Bad, IKK $\alpha$ , Forkhead (FOXO) family, GSK-3, GLUT4, P21/Waf1, P27/Kip1, mTOR, TSC2) que activarán mecanismos celulares con el objetivo de obtener un resultado neto en el incremento de apoptosis, proliferación, crecimiento, metabolismo y supervivencia celular.<sup>[128]</sup>

Cualquier alteración en los diferentes niveles de esta ruta conlleva a la transformación neoplásica de las células.<sup>[129, 130]</sup> Se han descrito mutaciones activantes y amplificación de *AKT1* y *AKT2* que producen una hiperactivación de Akt, detectada en hasta el 3,8% de tumores de mama de tipo Luminal.<sup>[131]</sup>

Recientemente, en algunos modelos preclínicos y en ensayos clínicos, se han empleado fármacos que actúan como inhibidores competitivos de las tres isoformas de Akt. Éstos se unen al dominio PH e impiden el cambio conformacional de la molécula, impidiendo así su activación.<sup>[132]</sup>

**mTOR** (mammalian Target of Rapamycin) es una serina/treonina quinasa de 289 KD. Está codificada por el gen *FRAP1*, localizado en el cromosoma 1. Pertenece a la

familia de proteínas TOR que tienen funciones pleiotrópicas, participa en la regulación del inicio de la transcripción de ARN mensajero (ARNm) y en la traducción a proteínas en respuesta a concentraciones intracelulares de aas y de otros nutrientes esenciales. Interviene también en la organización del citoesqueleto de actina, en el transporte de sustancias a la membrana plasmática a través del citosol, en la degradación de proteínas y en la biogénesis del ribosoma. Regula rutas de señalización esenciales para la célula y está implicada en la activación de estímulos de crecimiento y de progresión del ciclo celular.

Existen dos complejos que contienen mTOR. Por una parte, el complejo sensible a rapamicina (complejo mTORC1) que interacciona con la proteína Raptor (regulatory-associated protein of mTOR) y fosforila los efectores de mTOR, como la quinasa S6K1 y el factor de iniciación eucariótico de unión a proteína 1 (4EBP1). El segundo complejo no es sensible a rapamicina (complejo mTORC2), pero se caracteriza por su interacción con Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR) y controlar el citoesqueleto de actina y la unión a Akt.

La proteína mTOR controla la traducción de determinados ARNm que se transforman, en respuesta a señales inductoras de crecimiento, en proteínas esenciales para la progresión del ciclo celular. Esta activación provoca la fosforilación y activación de la proteína p70S6K y del factor 4EBP1. La proteína p70S6K se une a la membrana mitocondrial y fosforila la proteína pro-apoptótica BAD inactivándola, consiguiéndose así un aumento en la supervivencia celular.

La inhibición de mTOR provoca un incremento a nivel de ARNm y de la cantidad de proteína ciclina D1 y una disminución de la eliminación del inhibidor de TK dependiente de la ciclina p27, con lo que se disminuye el avance de la fase G1 en el ciclo celular.<sup>[[133, 134]</sup>

La activación de mTOR en cáncer de mama se ha descrito asociada a tumores de fenotipo agresivo.<sup>[135]</sup> Recientemente, se ha sugerido que mTOR es un efector potente en el tratamiento con Lapatinib®.<sup>[136]</sup> También se ha establecido la relación existente entre la resistencia al tratamiento antiestrogénico en tumores de mama RE positivos y la activación de mTOR. Por otra parte, se sabe que el inhibidor de mTOR, Everolimus® (Rapamicina), en combinación con IA mejora la supervivencia libre de enfermedad

(SLE) en pacientes en estadios avanzados que previamente han sido tratadas con IA esteroides.<sup>[137]</sup>

La Rapamicina, y también sus análogos (rapálogos), compuestos por la proteína FK506 (FKBP12), se unen a mTOR e inhiben la actividad quinasa de mTORC1 pero no la de mTORC2. La inhibición de mTORC1 provoca un feedback negativo en todos los receptores que pueden activar la vía PI3K (IGF1R, IRS-1 y HER3) lo que sugiere que la inhibición directa de la vía puede ser muy efectiva.

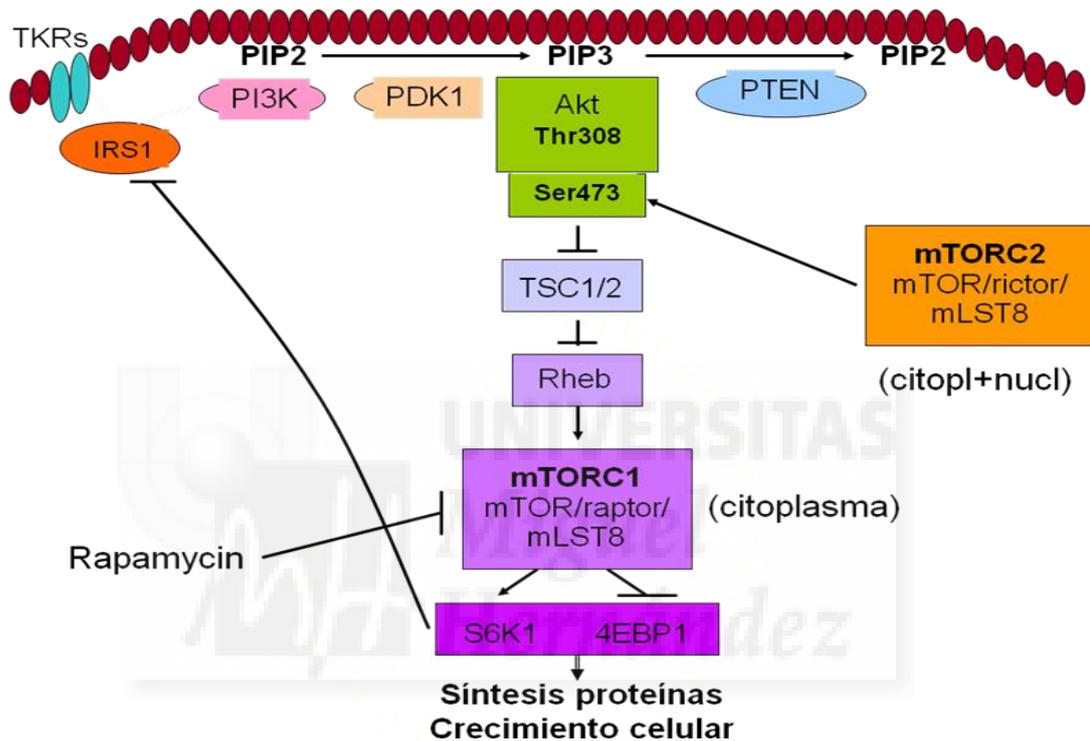


Figura 7. Vía PI3K/PTEN/Akt/mTOR y acción de Rapamicina.

Hasta la fecha, existen algunos estudios que han analizado el estado de mTOR y el efecto de estos tratamientos en mujeres postmenopáusicas con cáncer de mama. Sin embargo, existen pocos trabajos en la literatura que analicen el estado de mTOR en el subgrupo de mujeres jóvenes.<sup>[138, 139]</sup>

Con todo lo anteriormente comentado, se pone de manifiesto la relevancia de identificar el estado de IGF1R, PTEN y de la vía molecular PI3K/Akt/mTOR en la patogénesis, crecimiento y progresión tumoral, así como el papel importante que juega esta ruta intracelular como diana terapéutica potencial.<sup>[140]</sup>

## 1.5. Justificación

En la actualidad existen un escaso número de estudios publicados respecto a los subtipos de cáncer de mama en pacientes jóvenes.

Asimismo, se desconoce la relevancia de las alteraciones moleculares en IGF1R, PTEN y de algunos biomarcadores asociados a la vía de señalización de PI3K/Akt/mTOR entre los distintos inmunofenotipos. Esta ruta intracelular ha suscitado mucho interés en los últimos años como potencial diana terapéutica. Por ello, es de gran relevancia estudiar las alteraciones en los biomarcadores implicados en esta vía intracelular. De esta forma, se podrá determinar su papel en los diferentes subtipos de cáncer de mama entre las pacientes más jóvenes.

En este trabajo se pretende, mediante técnicas de inmunohistoquímica y utilizando biomarcadores de rutina validados, clasificar por inmunofenotipos una serie de tumores de mama diagnosticados en pacientes jóvenes. Además, se identificarán las alteraciones en la expresión inmunohistoquímica de biomarcadores asociados a la vía de IGF1R, PTEN/Akt/mTOR.

Por tanto, el interés principal del presente estudio está dirigido a identificar marcadores pronósticos y/o predictivos, con el fin de complementar las herramientas diagnósticas ya existentes en Patología. De este modo, podría facilitarse el estudio de nuevas opciones terapéuticas en algunas pacientes jóvenes, las cuales tienen en la actualidad escasas alternativas de tratamiento adyuvante y/o neoadyuvante.





## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1. HIPÓTESIS**

Puesto que las pacientes jóvenes con cáncer de mama tienen mal pronóstico sería esperable encontrar en nuestro trabajo las características clínico-patológicas que lo expliquen, es decir, tumores de fenotipo agresivo.

Por otra parte, también sería esperable que esta agresividad estuviera relacionada con la alteración de alguno de los componentes de la vía PTEN, IGF1R/Akt/mTOR, lo que confirmaría la asociación entre esta vía intracelular con la aparición de cáncer de mama en el subgrupo de pacientes jóvenes.

### **2.2. OBJETIVOS**

Los objetivos de nuestro trabajo son los siguientes:

1. Determinar los inmunofenotipos y su distribución en pacientes de 40 años o menores diagnosticadas de carcinoma infiltrante de mama.
2. Analizar la asociación de los inmunofenotipos con las variables clínicas y morfológicas de toda la serie de pacientes incluidas en el estudio.
3. Analizar la asociación de los inmunofenotipos con las variables morfológicas en las pacientes sin tratamiento neoadyuvante.
4. Analizar la asociación de los inmunofenotipos con los componentes de la vía PTEN, IGF1R/pAkt/mTOR mediante técnicas de inmunohistoquímica en las pacientes sin tratamiento neoadyuvante.
5. Analizar el valor pronóstico de las variables clínicas, morfológicas e inmunohistoquímicas (PTEN, IGF1R/pAkt/mTOR) en relación con la variable de respuesta supervivencia libre de enfermedad (SLE) en las pacientes sin tratamiento neoadyuvante.
6. Analizar el valor pronóstico de las variables clínicas, morfológicas e inmunohistoquímicas (PTEN, IGF1R/pAkt/mTOR) en relación con la variable de respuesta supervivencia global (SG) en las pacientes sin tratamiento neoadyuvante.





### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1. Diseño del estudio.**

Estudio observacional de cohortes retrospectivo en pacientes diagnosticadas y tratadas de carcinoma infiltrante de mama.

#### **3.2. Sujetos.**

##### **3.2.1. Criterios de inclusión.**

Para analizar el objetivo general se incluirán las pacientes de 40 años o menores con diagnóstico de carcinoma infiltrante de mama a las que se les haya realizado tratamiento quirúrgico (mastectomía o tumorectomía), con o sin linfadenectomía axilar, con o sin estudio de ganglio centinela, hayan o no recibido quimioterapia neoadyuvante.

##### **3.2.2. Criterios de exclusión.**

- Pacientes con diagnóstico de carcinoma infiltrante de mama que tengan más de 40 años.
- Para el estudio de los objetivos 3, 4, 5 y 6 se excluirán las pacientes que hayan recibido quimioterapia neoadyuvante.
- Material histológico insuficiente o inadecuado para realizar los estudios de inmunohistoquímica (diámetro microscópico del tumor menor de 5 mm).

##### **3.2.3. Número de sujetos.**

Un total de 250 pacientes:

- 224 pacientes de hasta 40 años de edad con diagnóstico de carcinoma infiltrante de mama que han sido diagnosticadas y tratadas, con seguimiento clínico en el Hospital General Universitario de Alicante (HGUA). De éstas, 71 pacientes fueron tratadas con neoadyuvancia.

- 26 pacientes del Hospital Virgen de los Lirios de Alcoy (Alicante) (HVLA) todas ellas sin tratamiento neoadyuvante.

- Del número total de pacientes de la muestra (n=250) se seleccionaron para el análisis inferencial las pacientes sin neoadyuvancia (n=179), calculándose la potencia de la muestra para contrastar una razón de riesgos (HR) distinta de 1. Para ello se asume un HR esperado de 2,7, un porcentaje de censura del 80%, una proporción de expuestos del 50% y un nivel de significación del 5%. Con estos parámetros se ha calculado una potencia de 84,41%.

### **3.2.4. Criterios de selección.**

Las pacientes fueron seleccionadas de forma no consecutiva de la base de datos de los servicios de Patología del HGUA y del HVLA. Éstas incluyen pacientes que han sido biopsiadas e intervenidas quirúrgicamente y cuyas piezas quirúrgicas han sido estudiadas y diagnosticadas en el servicio de Patología tanto del HGUA, como del HVLA. Se incluyeron pacientes que cumplían criterios de inclusión desde el año 1989 hasta el año 2010.

### **3.2.5. Muestras tumorales.**

Se han obtenido 2 punch de tejido, procedente de los bloques de tejido tumoral parafinado, para construcción de tissue microarray (TMA). El material ha sido proporcionado por el Biobanco del Hospital General Universitario de Alicante (colecciones C\_001 CARCINOMA DE MAMA INFILTRANTE (HISTÓRICA) y C\_008 CARCINOMA DE MAMA INFILTRANTE) y por el Banco de Tumores del Hospital de Alcoy.

## **3. 3. Variables.**

### **Variables explicativas**

#### **Clínicas:**

- Edad (años).
- Antecedentes familiares: sí o no.
- Tipo de intervención quirúrgica: Tumorectomía o mastectomía.

- Quimioterapia previa a la cirugía: sí o no.
- Localización: Mama derecha o izquierda.
- Lateralidad: Unilateral o Bilateral.
- Metástasis: sí o no.

#### **Morfológicas:**

- Microscópicas:
  - Tamaño tumoral (mm).
  - Tipo histológico: Ductal (*NOS*), y otros (lobulillar, medular, sarcomatoide, metaplásico), según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS).
  - Grado histológico combinado (clasificación de Nottingham):
    - Grado I: formación de túbulos >75%, pleomorfismo nuclear leve y número de mitosis menor a 6 en 10 campos de 400x (campo de gran aumento (CGA)).
    - Grado II: formación de túbulos entre 25-75%, pleomorfismo nuclear moderado y entre 6 y 10 mitosis en 10 CGA.
    - Grado III: formación de túbulos <25%, pleomorfismo nuclear alto y más de 10 mitosis en 10 CGA.
  - Presencia o ausencia de invasión linfática.
  - Presencia o ausencia de necrosis tumoral.
  - Presencia o ausencia de componente de carcinoma in situ (CDIS).
  - Estado ganglionar: Presencia o ausencia de infiltración tumoral en ganglios axilares (por punción, ganglio centinela y/o vaciamiento axilar).

#### **Inmunohistoquímicas:**

Mediante técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) se valorará la expresión de diferentes marcadores en el tumor: RE, RP, HER2, Ki67, PTEN, IGF1R, pAKT, p-mTOR.

**Receptores de Estrógenos (RE):** tinción nuclear. Valoración en porcentaje e intensidad. Se considera positivo si la tinción es igual o mayor al 1%.

**Receptores de Progesterona (RP):** tinción nuclear. Valoración en porcentaje e intensidad. Se considera positivo si la tinción es igual o mayor al 20%.

**HER2:** tinción de membrana.

Se valora como NEGATIVO:

- Ausencia de tinción o tinción fina e incompleta en <10% de las membranas de las células neoplásicas.
- Intensidad 1+ (débil) en  $\geq 10\%$  de tinción de membrana fina e incompleta.
- Intensidad 2+ (moderada) de membrana fina y completa, en los que se realiza técnicas de hibridación in situ con fluorescencia (FISH) (si  $\geq 10\%/2+$ ) y el tumor no está amplificado.

Se valora POSITIVO si la tinción de membrana es igual o mayor de 10% de intensidad 3+ (intensa) o casos con 2+ de tinción de membrana fina y/o <10% con tinción de membrana gruesa y completa amplificados, confirmados con técnicas de FISH.

**Ki67:** tinción nuclear. Se valora como índice de actividad proliferativa bajo menor de 14% y un índice de actividad proliferativa alto, igual o mayor de 14%.

**CK5/6:** tinción citoplasmática. Se considera como positiva una expresión mayor o igual al 1%.

**EGFR:** tinción de membrana.

Se valora como NEGATIVO:

- Ausencia de tinción o tinción fina e incompleta en <10% de la membrana de las células neoplásicas.
- Intensidad 1+ (débil) en  $\geq 10\%$  de tinción de membrana fina e incompleta de la membrana de las células neoplásicas.
- Intensidad 2+ (moderada) de membrana fina y completa de la membrana de las células neoplásicas.

Se valora POSITIVO si la tinción de membrana es igual o mayor de 10% de intensidad 3+ (intensa) o casos con 2+ de tinción de membrana completa y fina.

**PTEN:** tinción membrana, nuclear y/o citoplasmática. Se valora su expresión de forma semicuantitativa (porcentaje e intensidad) (score 0-300) usando H score que se obtiene multiplicando el porcentaje de células positivas (PP) por la intensidad de tinción, medida éste con un score de intensidad (SI (1, 2, 3)).

PTEN es un gen supresor tumoral, hemos considerado pérdida de expresión inmunohistoquímica de PTEN en este trabajo, un valor  $\leq 60$  y expresión de PTEN conservada una expresión  $>60$  (valor del percentil 25, en nuestra serie), por ser el valor más próximo a los puntos de corte utilizados en la literatura.

**IGF1R:** tinción de membrana. Se valora su expresión de forma semicuantitativa (porcentaje e intensidad) (score 0-300) usando H score que se obtiene multiplicando el porcentaje de células positivas (PP) por la intensidad de tinción, medida éste con un score de intensidad (SI (1, 2, 3)).

IGF1R es un oncogén, hemos considerado la sobreexpresión inmunohistoquímica de IGF1R para este trabajo, en el valor  $\geq 240$  (valor del percentil 75, en nuestra serie), por ser el valor más próximo a los puntos de corte más utilizados en la literatura.

**pAKT:** tinción citoplasmática. Se ha valorado su expresión de forma semicuantitativa (porcentaje e intensidad) (score 0-300) usando H score que se obtiene multiplicando el porcentaje de células positivas (PP) por la intensidad de tinción, medida éste con un score de intensidad (SI (1, 2, 3)).

En el presente trabajo hemos considerado pAKT activado (fosforilado), el valor  $\geq 100$  (valor del percentil 75, en nuestra serie), por ser el valor más próximo a los puntos de corte más utilizados en la literatura.

**p-mTOR:** tinción citoplasmática. Valoración en porcentaje e intensidad de forma semicuantitativa (score 0-300) (porcentaje e intensidad) utilizando H score que se obtiene multiplicando el porcentaje de células positivas (PP) por la intensidad de tinción, medida éste con un score de intensidad (SI (1, 2, 3)).

En el presente trabajo hemos considerado p-mTOR activado (fosforilado) el valor de  $\geq 120$ , (valor del percentil 75, en nuestra serie), por ser el valor más próximo a los puntos de corte más utilizados en la literatura.

### **Inmunofenotipos (Criterios St. Gallen (2013))<sup>[28]</sup>**

1. **Luminal A-like:** Si el tumor expresa RE ( $\geq 1\%$ ), RP ( $\geq 20\%$ ) y Ki67 ( $< 14\%$ ) y no expresa HER2.
2. **Luminal B-like/HER2 negativo:** Si el tumor expresa RE ( $\geq 1\%$ ), RP ( $< 20\%$ ) o negativo, Ki67 ( $\geq 14\%$ ) y no expresa HER2.

3. **Luminal B-like/HER2 positivo:** Si el tumor expresa RH y expresa HER2, independientemente de la actividad proliferativa.
4. **HER2 No luminal:** Si el tumor expresa HER2 y no expresa RH, independientemente de la actividad proliferativa.
5. **Triple Negativo (TN)/Basal-like:** Si el tumor no expresa RH ni HER2, independientemente de la actividad proliferativa y/o expresa CK5/6 y/o expresa EGFR.

#### **Variables de respuesta**

- Supervivencia libre de enfermedad (SLE): tiempo transcurrido en meses desde el momento del inicio del tratamiento quirúrgico y la aparición de recidiva (tanto local como a distancia).
- Supervivencia global (SG): tiempo transcurrido en meses desde el momento del inicio del tratamiento quirúrgico y la fecha del último control clínico o del exitus de la paciente.
- El seguimiento clínico es de mínimo dos años.

#### **3.4. Recogida de variables.**

Para la recogida de las variables se ha elaborado una base de datos a partir de la base de datos general del servicio de Anatomía Patológica del HGUA, donde se reflejan todas las variables:

- Las variables clínicas edad, tipo de intervención quirúrgica, antecedentes familiares, localización y lateralidad se han obtenido del informe anatomopatológico de la pieza de resección quirúrgica.
- Las variables clínicas estadio, tratamiento neoadyuvante y metástasis se han obtenido del informe clínico de seguimiento oncológico de cada paciente.
- Las variables morfológicas microscópicas: tamaño tumoral, tipo histológico, grado diferenciación, necrosis, invasión linfática, componente intraductal asociado (CDIS) y estado ganglionar se han obtenido tras la observación de un corte y tinción con Hematoxilina-Eosina del bloque de parafina. En él ha sido incluido un corte representativo del tumor y ha sido valorado por al menos dos

observadores de forma independiente. En el caso del estado ganglionar se ha valorado, bien la punción con aguja fina (PAAF) del ganglio o los ganglios sospechosos, o bien la biopsia de ganglio centinela y/o el estudio histopatológico del vaciamiento axilar.

El estudio de las variables inmunohistoquímicas RE, RP, HER2, Ki67, CK5/6 y EGFR se ha realizado en la pieza de resección quirúrgica tras haberla fijado en formaldehído al 10% y haber incluido en parafina secciones representativas del tumor. Tras seleccionar el bloque más adecuado con tumor se construyeron matrices de tejido (TMA). En cada matriz se incluyeron dos cilindros de 1 mm de diámetro tras haber seleccionado el área tumoral en el bloque más representativo de cada tumor. Se han incluido entre 20 y 25 casos en cada bloque. Se utilizó un “arrayer” de tejidos manual (Beecher Instruments Tissue Arrayer). Posteriormente, las técnicas IHQ se realizaron sobre cortes de 4 micras de los TMA construidos de manera automatizada, con el equipo Techmate-500 y con sistema de visualización de alta sensibilidad Envision® (Dako).

- En las pacientes con tratamiento neoadyuvante, el estudio se hizo en la biopsia diagnóstica (BAG (Biopsia con aguja gruesa)).
- Se han utilizado los siguientes anticuerpos:

Anticuerpo	Clon	Vendedor	Dilución
RE $\alpha$	clon 1D5	Dako	1:50
RP	Clon PgR 636	Dako	1:50
HER-2	cerbB2	HercepTest	Kit comercial
Ki67	MIB-1	Dako	1:100
CK5/6	Clon D5/16B4	Dako	1:100
EGFR	Clon E30	Dako	Kit comercial

El estudio de las variables inmunohistoquímicas PTEN, IGF1R/pAkt/p-mTOR se ha realizado en los tumores de pacientes de 40 años o menores sin tratamiento neoadyuvante, construyendo TMA y utilizando el sistema de visualización de alta sensibilidad Envision® (Dako).

Anticuerpo	Clon	Vendedor	Dilución
p-Akt (Ser473)	Clon 14-5	Dako	1:10
Alpha-IGF1R	Clon 24-31	Neomarkers	1:400
PTEN	Clon 6H2.1	Dako	1:100
p-mTOR (Ser2448)	Clon 49F9	Cell Signaling	1:50

La valoración de los resultados de inmunohistoquímica se realizó en el microscopio óptico por dos observadores (GP y MP) de forma independiente.

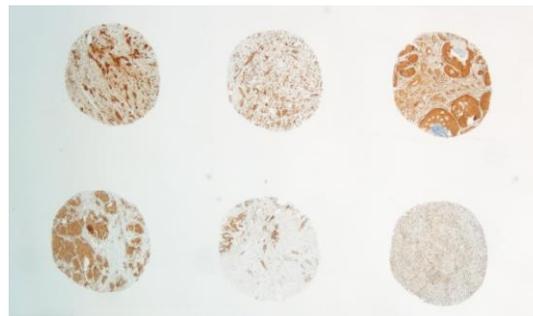


Figura 8. TMA y tinción inmunohistoquímica de IGF1R

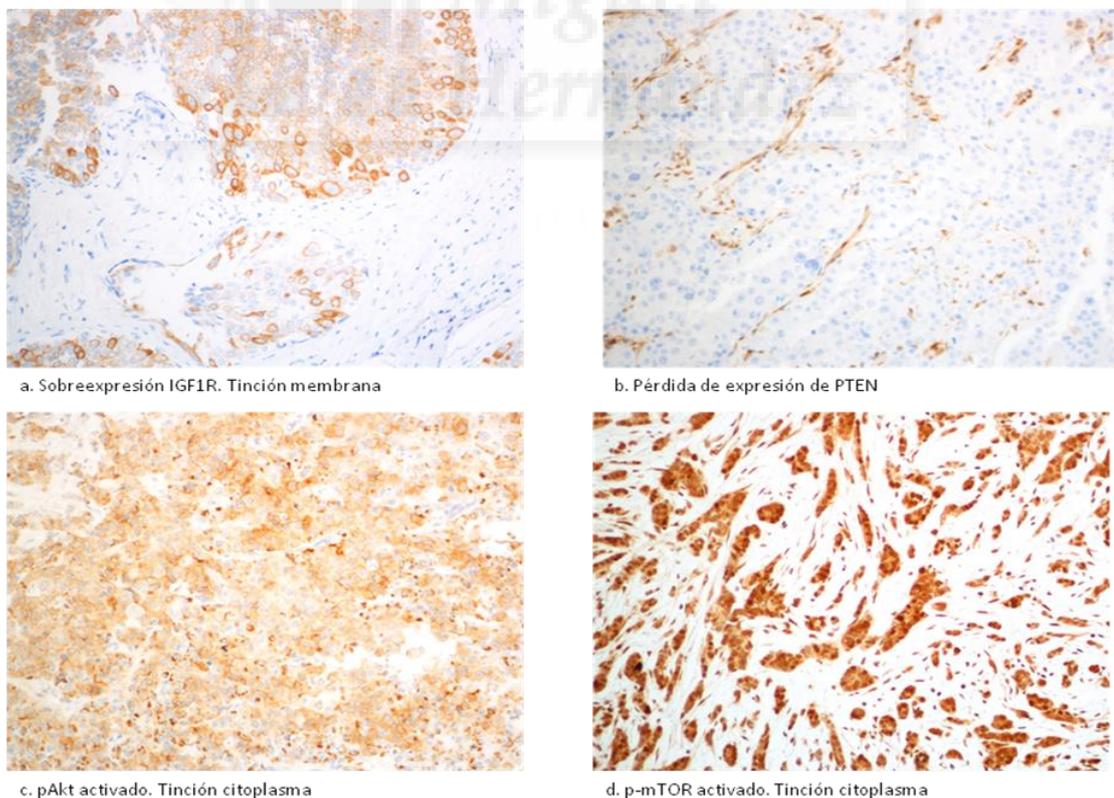


Figura 9. Valoración inmunohistoquímica biomarcadores vía IGF1R, PTEN/pAkt/mTOR.

### **3.5. Análisis.**

#### **3.5.1. Análisis descriptivo.**

Se ha realizado un análisis descriptivo de las variables cuantitativas explicativas clínicas (edad) y morfológicas (tamaño tumoral). Para ello, se ha demostrado mediante el test Z de Kolmogorov-Smirnov que las variables siguen una distribución no paramétrica. Posteriormente, para ambas variables, se ha obtenido la mediana y el rango intercuartílico (percentiles 25-75).

La variable edad se estudió en todas las pacientes incluidas en el estudio (n=250).

La variable tamaño tumoral se estudió en todas las piezas quirúrgicas cuyas pacientes no habían recibido tratamiento neoadyuvante (n=179).

Por otra parte, la variable tamaño tumoral se categorizó en tres grupos (T1 (tumor de diámetro máximo 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)), según los criterios de la clasificación clínica TNM y también se categorizó en dos grupos T1 y T2+T3.

En todas las pacientes incluidas en el estudio se ha realizado el análisis de las variables cualitativas explicativas clínicas: antecedentes familiares, tipo de intervención quirúrgica, localización, lateralidad y quimioterapia previa, utilizando la frecuencia absoluta y los porcentajes de cada uno de los valores de las variables.

También se han analizado las variables cualitativas explicativas morfológicas microscópicas: tipo histológico, grado diferenciación, invasión linfática, necrosis, carcinoma in situ, estado ganglionar axilar y estadio en aquellas pacientes que no han recibido tratamiento neoadyuvante, estudiando la frecuencia absoluta y el porcentaje de cada uno de los valores de las variables.

El análisis descriptivo de las variables inmunohistoquímicas se ha realizado en los tumores de las pacientes que no han recibido tratamiento neoadyuvante, obteniéndose la frecuencia absoluta y los porcentajes para cada una de las variables RE, RP, HER2, Ki67, CK5/6 y EGFR.

En el análisis descriptivo de las variables inmunohistoquímicas PTEN, IGF1R, pAkt y p-mTOR se observó que todas ellas seguían una distribución no paramétrica, por lo que se obtuvo la mediana y el percentil 25-75 de cada una de ellas.

También se ha definido la variable inmunofenotipo, aplicando para cada caso los criterios de St. Gallen<sup>[28]</sup> y se ha obtenido la frecuencia absoluta y los porcentajes de cada uno de los valores de esta variable.

### **3.5.2. Análisis inferencial (bivariante basal).**

#### **3.5.2.1. Analizar la asociación entre Inmunofenotipos y variables clínicas en todas las pacientes de nuestra serie.**

Se ha correlacionado la variable explicativa inmunofenotipo con las variables explicativas clínicas: tipo de intervención quirúrgica, localización, lateralidad, quimioterapia previa y antecedentes familiares mediante la prueba de Chi cuadrado de Pearson.

El estudio de la correlación entre la variable edad, respecto a la variable explicativa inmunofenotipo, se ha realizado mediante la prueba Kruskal-Wallis.

#### **3.5.2.2. Analizar la asociación entre Inmunofenotipos y variables morfológicas de las pacientes sin neoadyuvancia.**

Se ha correlacionado la variable explicativa inmunofenotipo en las pacientes que no han recibido quimioterapia previa (n=179) con las variables explicativas morfológicas microscópicas: tipo histológico, grado diferenciación, invasión linfática, necrosis, carcinoma in situ, estado ganglionar y estadio.

El estudio de la asociación entre la variable tamaño tumoral, respecto a la variable explicativa inmunofenotipo se ha realizado mediante la prueba Kruskal-Wallis.

### **3.5.2.3. Analizar la asociación entre Inmunofenotipos y variables Inmunohistoquímicas PTEN, IGF1R, pAkt y p-mTOR en las pacientes sin neoadyuvancia.**

Primeramente, para poder realizar el estudio de asociación de las variables inmunohistoquímicas PTEN, IGF1R, pAKT y p-mTOR con el resto de variables clínicas y morfológicas se han definido los cuatro cuartiles de los valores de cada una de ellas y los puntos de corte de sobreexpresión (en el caso de IGF1R $\geq$ 240, pAkt $\geq$ 100, p-mTOR $\geq$ 120 y de pérdida de expresión (PTEN $\leq$ 60), atendiendo a la proximidad de los valores más utilizados en la literatura para cada una de las variables. Posteriormente, mediante tablas de Chi cuadrado se ha estudiado la asociación entre los inmunofenotipos y estas variables inmunohistoquímicas.

### **3.5.3. Análisis inferencial (bivariante longitudinal).**

#### **3.5.3.1. Analizar el valor pronóstico de las variables Clínicas, Morfológicas e Inmunohistoquímicas (IGF1R, PTEN, pAkt y p-mTOR) en relación con la Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE) entre las pacientes sin neoadyuvancia.**

Se ha realizado un análisis univariante de la supervivencia estudiando la asociación entre cada una de las variables clínicas (edad, antecedentes familiares, tipo de intervención quirúrgica, lateralidad y localización), morfológicas (tamaño tumoral, tipo histológico, grado diferenciación, invasión linfática, necrosis, carcinoma in situ, estado ganglionar y estadio) e inmunohistoquímicas (IGF1R, PTEN, pAkt y p-mTOR) con la variable de respuesta SLE, mediante las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (test log-rank).

### **3.5.3.2. Analizar el valor pronóstico de las variables clínicas, morfológicas e inmunohistoquímicas (IGF1R, PTEN, pAkt y p-mTOR) en relación con la variable de respuesta Supervivencia Global (SG) entre los pacientes sin neoadyuvancia.**

Se ha realizado un análisis univariante de la supervivencia global estudiando la asociación entre cada una de las variables clínicas (edad, antecedentes familiares, tipo de intervención quirúrgica, lateralidad y localización), morfológicas (tamaño tumoral, tipo histológico, grado diferenciación, invasión linfática, necrosis, carcinoma in situ, estado ganglionar y estadio) e inmunohistoquímicas (IGF1R, PTEN, pAkt y p-mTOR) con la variable de respuesta SG, mediante las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (test log-rank).

### **3.5.3.3. Cálculo de las razones de riesgo (HR) crudas obtenidas mediante modelos de regresión de Cox (p-valor obtenido a través del Score test).**

Se calcularon las razones de riesgo crudas (HR) a través de modelo de regresión de Cox utilizando como variable dependiente el tiempo hasta el evento (muerte o recidiva) y como variable independiente el factor de estudio. La bondad de ajuste de este modelo se determinó mediante el score (log-rank) test.

## **3.6. Análisis multivariante.**

Se construyó un modelo de regresión de Cox para determinar qué variables se asociaban a la mortalidad, calculando los HR ajustados. Con el número de pacientes de la muestra (n=179), seleccionamos un número máximo de variables explicativas en el modelo (una por cada 10 fallecimientos, lo que produjo tres variables en el modelo).<sup>[141]</sup> Se incluyó la variable clínica metástasis (sí o no) para tener otra variable clínica en este análisis. Para ello se comprobaron todas las posibles combinaciones que contenían un máximo de tres variables (2.952), calculando el estadístico C en cada una de ellas. La combinación con el valor más elevado fue la seleccionada. La bondad de

ajuste del modelo se obtuvo mediante el score test. Este modelo fue transformado en sistema de puntos mediante la metodología de Framingham.<sup>[142]</sup> Se determinaron grupos de riesgo basados en cambios mayores del 15% en la probabilidad de muerte. Finalmente se representaron las curvas de supervivencia mediante la técnica de Kaplan-Meier y se compararon los cuatro grupos utilizando log-rank test. Este mismo proceso fue repetido para el análisis del seguimiento (SLE), salvo que se emplearon 5 variables en el modelo y el número total de combinaciones fue de 83.682.

### **3.7. Cuestiones generales.**

Todos los análisis fueron realizados con  $\alpha=5\%$  y de cada parámetro relevante se calculó su intervalo de confianza (IC).

El análisis de todos los datos se ha realizado utilizando los programas estadísticos IBM SPSS Statistics versiones 19 y 20.







## **4. RESULTADOS**



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Estudio descriptivo de variables clínicas, morfológicas (tipo histológico y grado).

Tabla 1. Características descriptivas de las variables clínicas, morfológicas (tipo y grado) de toda la serie de pacientes (n=250).

	%	(n)	Mediana (P25-P75)
<b>Edad (años)</b>	100	(250)	36 (32-39)
<b>Quimioterapia previa a la cirugía</b>			
Sí	28,4	(71)	
No	71,6	(179)	
<b>Localización</b>			
Derecha	48	(120)	
Izquierda	52	(130)	
<b>Lateralidad</b>			
Unilateral	86	(215)	
Bilateral	14	(35)	
<b>Antecedentes familiares</b>			
Sí	16,8	(42)	
No	83,2	(208)	
<b>Intervención quirúrgica</b>			
Mastectomía	59,2	(148)	
Tumorectomía	40,8	(102)	
<b>Tipo histológico</b>			
CDI, NOS	94	(235)	
Otros	6	(15)	
<b>Grado</b>			
I	6,8	(17)	
II	30,4	(76)	
III	62,8	(157)	

La Tabla 1 muestra que el 71,6% de las pacientes de nuestro estudio no recibieron neoadyuvancia.

La afectación fue unilateral en el 86% de los casos.

El tipo de intervención quirúrgica más frecuente fue la mastectomía (59,2%). El tipo histológico diagnosticado con más frecuencia es el CDI, NOS (94% de los casos).

El grado III (alto grado de malignidad) fue el más frecuente (62,8%) en toda la serie de pacientes estudiadas.



## 4.2. Estudio descriptivo de las variables morfológicas en pacientes sin neoadyuvancia.

Tabla 2. Características descriptivas de las variables morfológicas en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).

	%	(n)	Mediana (P25-P75)
<b>Tamaño tumoral (mm)</b>		(179)	20 (15-26)
<b>Tamaño</b>			
T1	50,3	(90)	
T2	45,8	(82)	
T3	3,9	(7)	
<b>Tamaño</b>			
T1	89	(49,7)	
T2+3	90	(50,3)	
<b>Tipo</b>			
CDI NOS	93,9	(168)	
Otros	6,1	(11)	
<b>Grado</b>			
I	6,1	(11)	
II	27,4	(49)	
III	66,5	(119)	
<b>Invasión Linfática</b>			
Sí	46,4	(83)	
No	53,6	(96)	
<b>Necrosis</b>			
Sí	43,6	(78)	
No	56,4	(101)	
<b>Carcinoma In Situ</b>			
Sí	55,3	(99)	
No	44,7	(80)	
<b>Estado ganglionar</b>			
Positivo	43	(77)	
Negativo	57	(102)	
<b>Estadio</b>			
I	38,5	(69)	
II	40,8	(73)	
III	18,4	(33)	
IV	2,2	(4)	
<b>Estadio</b>			
(I+II)	79,3	(142)	
(III+IV)	20,7	(37)	

En la Tabla 2 observamos que el 93,9% de los tumores de las pacientes de nuestra serie que no recibieron tratamiento neoadyuvante eran de Tipo histológico CDI, NOS.

El 66,5% de casos mostraron alto grado de malignidad y el 55,3% tenían asociado componente de CDIS.

El 40,8% de las pacientes se clasificaron en Estadio II, siendo los Estadios iniciales (I+II) los más frecuentes (79,3%).



### 4.3. Estudio descriptivo de las variables inmunohistoquímicas.

#### 4.3.1. Estudio descriptivo de las variables inmunohistoquímicas (I) en toda la serie de pacientes.

Tabla 3. Distribución por inmunofenotipos (Criterios de St Gallen)<sup>[28]</sup> en toda la serie de pacientes (n=250).

	Luminal A	Lum B/HER2-	LumB/HER2+	HER2 No Lum.	TN/Basal
%	27,2	31,6	13,2	8,4	19,6
(n)	(68)	(79)	(33)	(21)	(49)

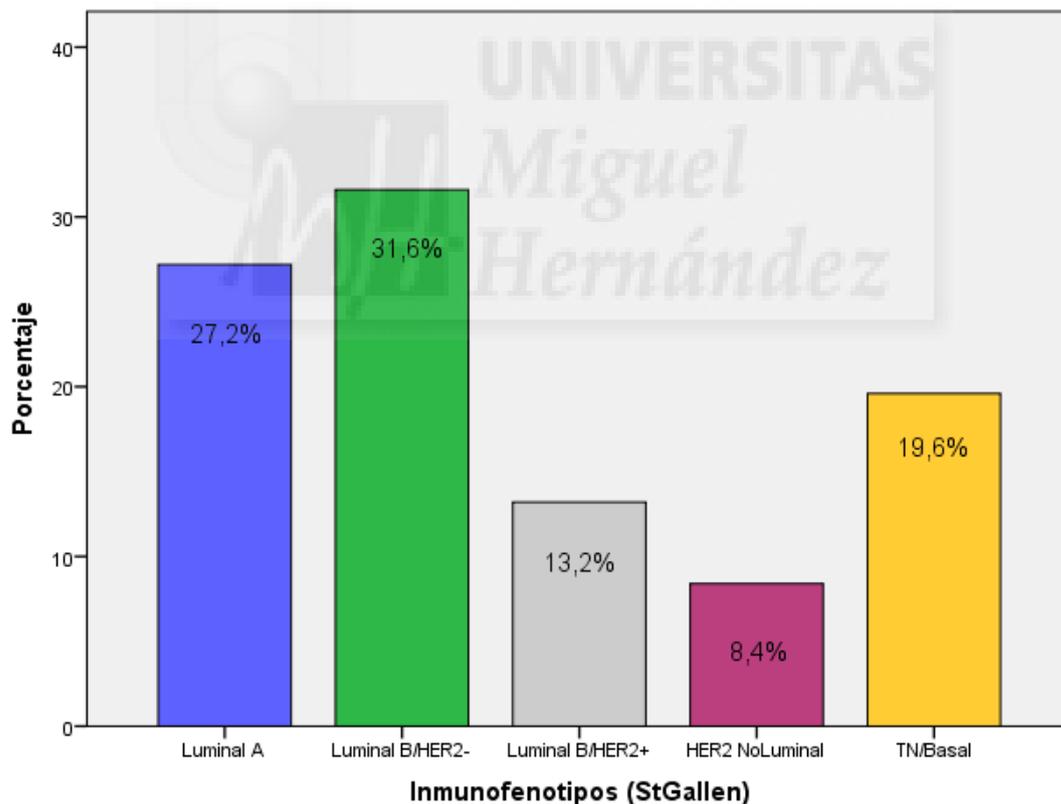


Figura 10. Distribución de inmunofenotipos de todas las pacientes de nuestra serie (n=250).

#### 4.3.2. Estudio descriptivo de las variables inmunohistoquímicas (II) en pacientes sin neoadyuvancia.

Tabla 4. Características descriptivas de las variables inmunohistoquímicas (II) en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).

	%	(n)	Mediana (P25-P75)
<b>RE</b>			
≥1%	65,9	(118)	
<1%	34,1	(61)	
<b>RP</b>			
≥20%	52,0	(93)	
<20%	48,0	(86)	
<b>HER2</b>			
Positivo	20,7	(37)	
Negativo	79,3	(142)	
<b>Ki67</b>			
≥14%	62,6	(112)	
<14%	37,4	(67)	
<b>CK5/6</b>			
≥1%	16,8	(30)	
<1%	31,3	(56)	
<b>EGFR</b>			
≥1%	8,9	(16)	
<1%	43,0	(77)	
<b>PTEN</b>			120 (60-190)
<b>IGF1R</b>			120 (15-240)
<b>pAkt</b>			40 (0-100)
<b>p-mTOR</b>			60 (0-120)

Los resultados de la Tabla 3 muestran que más de la mitad de los tumores expresan RE y RP (65,9% y 52%, respectivamente) y son HER2-(79,3%). La actividad proliferativa (Ki67) es  $\geq 14\%$  (alta) en el 62,6% de los casos y sólo un 8,9% de los tumores son positivos para EGFR. Un 16,8% son positivos para CK5/6. La mediana de expresión de PTEN es de 120 (60-190) y de IGF1R 120 (15-240). pAkt y p-mTOR muestran medianas de expresión menores: 40 (rango 0-100) y 60 (rango 0-120), respectivamente.

### 4.3.3. Estudio descriptivo de las variables inmunohistoquímicas (III) (PTEN, IGF1R, pAkt y p-mTOR) en pacientes sin neoadyuvancia.

Tabla 5. Distribución de cuartiles de las variables inmunohistoquímicas PTEN, IGF1R, pAkt y p-mTOR en los tumores de pacientes sin neoadyuvancia (n=179).

	%	(n)
<b>(Q1)</b>		
PTEN (0-60)	27,4	(49)
IGF1R (0-20)	25,1	(45)
pAkt (0)	27,9	(50)
p-mTOR (0)	27,4	(49)
<b>(Q2)</b>		
PTEN (70-100)	20,1	(36)
IGF1R (25-120)	27,9	(50)
pAkt (1-30)	21,2	(38)
p-mTOR (1-60)	24,0	(43)
<b>(Q3)</b>		
PTEN (120-190)	27,9	(50)
IGF1R (140-225)	20,7	(37)
pAkt (40-100)	26,2	(47)
p-mTOR (70-120)	24,0	(43)
<b>(Q4)</b>		
PTEN (200-300)	24,6	(44)
IGF1R (240-300)	26,3	(47)
pAkt (120-300)	24,6	(44)
p-mTOR (140-300)	24,0	(43)

En la Tabla 5, las variables inmunohistoquímicas PTEN, IGF1R, pAKT y p-mTOR se agruparon en cuatro cuartiles para estudiar la distribución de sus valores.

**Tabla 6. Puntos de corte para cada variable de la vía PTEN, IGF1R/pAkt/p-mTOR en los tumores de pacientes sin neoadyuvancia (n=179).**

	<b>%</b>	<b>(n)</b>
<b>PTEN_P25</b>		
Pérdida expresión	21,8	(39)
No pérdida	78,2	(140)
<b>IGF1R_P75</b>		
No sobreexpresión	73,7	(132)
Sobreexpresión	26,3	(47)
<b>pAkt_P75</b>		
No activado	74,3	(133)
Activado	25,7	(46)
<b>p-mTOR_P75</b>		
No activado	70,9	(127)
Activado	29,1	(52)

Para el objetivo del presente trabajo de tesis, se escogieron los percentiles como puntos de corte para definir la pérdida/ no sobreexpresión/ no activación versus no pérdida/sobreexpresión/activación, siendo para PTEN el Percentil 25 (P25) y para IGF1R, pAkt y p-mTOR el Percentil 75 (P75), como observamos en la Tabla 6. Estos puntos de corte son también los puntos de corte que más se intentan aproximar a los publicados en la literatura.

**4.4. Estudio de asociación entre inmunofenotipos y variables clínicas y morfológicas (grado y tipo histológico) en todas las pacientes de la serie.**

**Tabla 7. Estudio de asociación entre inmunofenotipos y variables clínicas y morfológicas (grado y tipo) en todas las pacientes de la serie (n=250).**

	Luminal A (n=68)	LumB/HER2- (n=79)	LumB/HER2+ (n=33)	HER2 No Lum (n=21)	TN/Basal (n=49)	<i>p</i>
	Mediana (P25-P75)	Mediana (P25-75)	Mediana (P25-P75)	Mediana (P25-P75)	Mediana (P25-P75)	
<b>Edad (años)</b>	37 (33-39)	36 (31-39)	36 (33-39)	36 (32-39)	36 (32-38)	0,453
	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	
<b>Quimio prev.</b>						
Sí	35,3 (24)	26,6 (21)	36,4 (12)	23,8 (5)	18,4 (9)	0,250
No	64,7 (44)	73,4 (58)	63,6 (21)	76,2 (16)	81,6 (40)	
<b>Localización</b>						
Derecha	51,5 (35)	43 (34)	42,4 (14)	52,4 (11)	53,1 (26)	0,702
Izquierda	48,5 (33)	57 (45)	57,6 (19)	47,6 (10)	46,9 (23)	
<b>Lateralidad</b>						
Unilateral	79,4 (54)	86,1 (68)	90,9 (30)	95,2 (20)	87,8 (43)	0,317
Bilateral	20,6 (14)	13,9 (11)	9,1 (3)	4,8 (1)	12,2 (6)	
<b>Ant famil.</b>						
Sí	16,2 (11)	19 (15)	15,2 (5)	9,5 (2)	18,4 (9)	0,872
No	83,8 (57)	81 (64)	84,8 (28)	90,5 (19)	81,6 (40)	
<b>Cirugía</b>						
Mastect.	55,9 (38)	58,2 (46)	66,7 (22)	85,7 (18)	49 (24)	0,053
Tumorect.	44,1 (30)	41,8 (33)	33,3 (11)	14,3 (3)	51 (25)	
<b>Tipo</b>						
CDI, NOS	94,1 (64)	93,7 (74)	97 (32)	100 (21)	89,8 (44)	0,492
Otros	5,9 (4)	6,3 (5)	3 (1)	0 (0)	10,2 (5)	
<b>Grado</b>						
I	17,6 (12)	5,1 (4)	0 (0)	0 (0)	2 (1)	<0,001
II	44,1 (30)	40,5 (32)	21,2 (7)	4,8 (1)	12,2 (6)	
III	38,2 (26)	54,4 (43)	78,8 (26)	95,2 (20)	85,7 (42)	

En la Tabla 7 podemos observar que el estudio de las variables clínicas y morfológicas (grado y tipo) de toda la serie de pacientes, respecto a la distribución por inmunofenotipos: edad, quimioterapia previa, tipo de intervención quirúrgica, localización, lateralidad, antecedentes familiares y tipo histológico no ha mostrado diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, el grado de diferenciación III, mostró un mayor porcentaje en tumores del subtipo HER2 No luminal y TN/Basal, encontrándose diferencias significativas entre los tumores con Grado I y II en los diferentes subtipos ( $p < 0,001$ ).



#### 4.5. Estudio de asociación entre inmunofenotipos y variables morfológicas en pacientes sin neoadyuvancia.

Tabla 8. Estudio de asociación entre inmunofenotipos y variables morfológicas en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).

	Luminal A (n=44)	LumB/HER2- (n=58)	LumB/HER2+ (n=21)	HER2 No Lum (n=16)	TN/Basal (n=40)	p
	Mediana (P25-P75)	Mediana (P25-75)	Mediana (P25-P75)	Mediana (P25-P75)	Mediana (P25-P75)	
<b>Tamaño (mm)</b>	17 (12-20)	20,50 (12-30)	23 (17-28)	24 (16-29)	19,50 (15-28)	<b>0,004</b>
	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	
<b>Tamaño</b>						
T1	65,9 (29)	50 (29)	33,3 (7)	31,2 (5)	50 (20)	0,145
T2	31,8 (14)	46,6 (27)	66,7 (14)	62,5 (10)	42,5 (17)	
T3	2,3 (1)	3,4 (2)	0 (0)	6,2 (1)	7,5 (3)	
<b>Tamaño</b>						
T1	65,9 (29)	50 (29)	33,3 (7)	31,2 (5)	47,5 (19)	0,058
T2+T3	34,1 (15)	50 (29)	66,6 (14)	68,8 (11)	52,5 (21)	
<b>Tipo</b>						
CDI, NOS	93,2 (41)	94,8 (55)	100 (21)	100 (16)	35 (87,5)	0,253
Otros	6,8 (3)	5,2 (3)	0 (0)	0 (0)	5 (12,5)	
<b>Grado</b>						
I	20,5 (9)	3,4 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<b>&lt;0,001</b>
II	45,5 (20)	34,5 (20)	23,8 (5)	0 (0)	10 (4)	
III	34,1 (15)	62,1 (36)	76,2 (16)	100 (16)	90 (36)	
<b>Necrosis</b>						
Sí	25 (11)	39,7 (23)	57,1 (12)	56,2 (9)	57,5 (23)	<b>0,015</b>
No	75 (33)	60,3 (35)	42,9 (9)	43,8 (7)	42,5 (17)	
<b>Inv. linfática</b>						
Sí	43,2 (19)	46,6 (27)	61,9 (13)	68,8 (11)	32,5 (13)	0,074
No	56,8 (25)	53,4 (31)	38,1 (8)	31,2 (5)	67,5 (27)	
<b>Ca. In Situ</b>						
Sí	54,5 (24)	67,2 (39)	47,6 (10)	68,8 (11)	37,5 (15)	<b>0,038</b>
No	45,5 (20)	32,8 (19)	52,4 (11)	31,2 (5)	62,5 (25)	
<b>Estado gangl.</b>						
Sí	36,4 (16)	43,1 (25)	42,9 (9)	75 (12)	37,5 (15)	0,093
No	63,6 (28)	56,9 (33)	57,1 (12)	25 (4)	62,5 (25)	
<b>Estadio</b>						
I	50 (22)	41,4 (24)	23,8 (5)	12,5 (2)	40 (16)	0,149
II	34,1 (15)	31 (18)	52,4 (11)	68,8 (11)	45 (18)	
III	13,6 (6)	22,4 (13)	23,8 (5)	18,8 (3)	15 (6)	
IV	2,3 (1)	5,2 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
<b>Estadio</b>						
I+II	84,1 (37)	72,4 (42)	76,2 (16)	81,2 (13)	85 (34)	0,517
III+IV	15,9 (7)	27,6 (16)	23,8 (5)	18,8 (3)	15 (6)	

Respecto a los resultados expuestos en la Tabla 8, los tumores HER2-No Luminal y Luminal B-like/HER2+ presentaron medianas de tamaño tumoral superiores a las medianas de los subtipos Luminal A, Luminal B-like/HER2- y TN/Basal ( $p=0,004$ ).

En el grado de diferenciación, encontramos diferencias entre los inmunofenotipos, siendo el grado histológico III el más frecuente en el subtipo HER2 No Luminal (100%), seguido del TN/Basal (90%), . Luminal B-like/HER2+ (76,2%) y Luminal B-like/HER2- (62,1%), y en el 34,1% en los Luminales A ( $p<0,001$ ).

En cuanto a la presencia de necrosis tumoral, los subtipos Luminal A y Luminal B-like HER2- son los que menos frecuentemente la muestran, en un 75% y 60,3% de los casos, respectivamente ( $p=0,015$ ).

La presencia de CDIS asociado se observó más frecuentemente en los tumores con inmunofenotipo HER2 No Luminal (68,8%), seguido de los Luminales B-like/HER2- (67,2%) y Luminal A (54,5%), y, menos frecuente en los de los subtipos Luminal B-like/HER2+ (47,6%) y Triple Negativo (37,5%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,038$ ).

El estudio de asociación de los inmunofenotipos con las restantes variables morfológicas (invasión linfática, tipo histológico, estado ganglionar y estadio), no ha demostrado resultados estadísticamente significativos.

#### 4.6. Estudio de asociación entre inmunofenotipos y variables inmunohistoquímicas en pacientes sin neoadyuvancia.

**Tabla 9. Estudio de asociación entre inmunofenotipos y variables IHQ en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).**

	Lum A (n=44)	LumB/HER2- (n=58)	LumB/HER2+ (n=21)	HER2 No Lum (n=16)	TN/Basal (n=40)	<i>p</i>
	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	
<b>IGF1R</b>						
No sobreexpresado	72,7 (32)	65,5 (38)	57,1 (12)	75 (12)	95 (38)	<b>0,006</b>
Sobreexpresado	27,3 (12)	34,5 (20)	42,9 (9)	25 (4)	5 (2)	
<b>PTEN</b>						
Pérdida expresión	11,4 (5)	19 (11)	23,8 (5)	0 (0)	45 (18)	<b>&lt;0,001</b>
Expr. conservada	88,6 (39)	81 (47)	76,2 (16)	100 (16)	55 (22)	
<b>pAkt</b>						
No activado	72,7 (32)	86,2 (50)	66,7 (14)	68,8 (11)	65 (26)	0,132
Activado	27,3 (12)	13,8 (8)	33,3 (7)	31,2 (5)	35 (14)	
<b>p-mTOR</b>						
No activado	68,2 (30)	70,7 (41)	85,7 (18)	56,2 (9)	72,5 (29)	0,391
Activado	31,8 (14)	29,3 (17)	14,3 (3)	43,8 (7)	27,5 (11)	

En la Tabla 9 observamos que los tumores con inmunofenotipo Luminal B-like/HER2+ sobreexpresan con más frecuencia IGF1R (42,9%). Sin embargo, los tumores con inmunofenotipo TN/Basal son los que menos lo sobreexpresan (95%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,006$ ).

Se observa una pérdida de expresión de PTEN en el 45% de los tumores con inmunofenotipo TN/Basal y una expresión conservada de PTEN en los demás subgrupos, entre el 55-100% ( $p<0,001$ ).

Sin embargo, la activación de pAkt y de p-mTOR no ha mostrado diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes inmunofenotipos.

**Tabla 10. Estudio de correlación entre variable inmunohistoquímica IGF1R, PTEN, pAkt y p-mTOR y variables clínicas en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).**

	IGF1R		PTEN		pAkt		p-mTOR	
	No sobreexpr. (n=132)	Sobreexpr. (n=47)	Pérdida expr. (n=39)	No pérdida (n=140)	No activado (n=133)	Activado (n=46)	No activado (n=127)	Activado (n=52)
	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)
<b>Edad</b>								
≤35	50,8(67)	34(16)	59 (23)	42,9 (60)	42,1 (56)	58,7 (27)	52,8 (67)	30,8 (16)
>35	49,2(65)	66(31)	41 (16)	57,1 (80)	57,9 (77)	41,3 (19)	47,2 (60)	69,2 (36)
	<b>p=0,048</b>		<i>p=0,074</i>		<i>p=0,052</i>		<b>p=0,007</b>	
<b>Localización</b>								
Derecha	47 (62)	53,2 (25)	51,3 (20)	47,9 (67)	43,6 (58)	63 (29)	50,4 (64)	44,2 (23)
Izquierda	53 (70)	46,8 (22)	48,7 (19)	52,1 (73)	56,4 (75)	37 (17)	49,6 (63)	55,8 (29)
	<i>p=0,454</i>		<i>p=0,705</i>		<b>p=0,023</b>		<i>p=0,454</i>	
<b>Lateralidad</b>								
Unilateral	86,4 (114)	89,4(42)	89,7 (35)	86,4 (121)	87,2 (116)	87 (40)	85 (108)	92,3 (48)
Bilateral	13,6 (18)	10,6 (5)	10,3 (4)	13,6 (19)	12,8 (17)	13 (6)	15 (19)	7,7 (4)
	<i>p=0,598</i>		<i>p=0,584</i>		<i>p=0,964</i>		<i>p=0,187</i>	
<b>Ant. Familiares</b>								
Sí	18,2 (24)	8,5 (4)	23,1 (9)	13,6 (19)	16,7 (22)	13 (6)	17,3 (22)	11,5 (6)
No	81,8 (108)	91,5(43)	76,9 (30)	86,4 (121)	83,5 (111)	87 (40)	82,7 (105)	88,5 (46)
	<i>p=0,117</i>		<i>p=0,148</i>		<i>p=0,573</i>		<i>p=0,333</i>	
<b>Cirugía</b>								
Mastect.	58,3 (77)	48,9(23)	56,4 (22)	55,7 (78)	61,7 (82)	39,1 (18)	49,6 (63)	71,2 (37)
Tumorect.	41,7 (55)	51,1(24)	43,6 (17)	44,3 (62)	38,3 (51)	60,9 (28)	50,4 (64)	28,8 (15)
	<i>p=0,265</i>		<i>p=0,938</i>		<b>p=0,008</b>		<b>p=0,008</b>	

En la Tabla 10 observamos que los tumores de las pacientes >35 años mostraron sobreexpresión de IGF1R con mayor frecuencia (66%) comparada con la de los tumores en pacientes de menor edad (34%) ( $p=0,048$ ). De manera similar, las pacientes >35 años tenían tumores que más frecuentemente p-mTOR estaba activado (69,2%), a diferencia de las pacientes menores de 35 años en sólo un 30,8% ( $p=0,007$ ).

Por otra parte, a las pacientes que por razones clínico-patológicas se les realizó mastectomía, tenían tumores con mayor frecuencia pAkt no activado y a las que se les realizó tumorectomía tenían pAkt activado (61,7% y 60,9%), siendo estas diferencias significativas ( $p=0,008$ ). También se observó que el 56,4% de los tumores con pAkt no activado la localización fue en la mama izquierda mientras que el 63% con pAkt activado fue en la mama derecha ( $p=0,023$ ). Por el contrario, a las pacientes con tumores con p-mTOR activado se les realizó con más frecuencia una mastectomía 71,2% que en las que no estaba activado que se les realizó tumorectomía 50,4% ( $p=0,008$ ).

**Tabla 11. Estudio de asociación entre variable inmunohistoquímica IGF1R, PTEN, pAkt, mTOR y variables morfológicas en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).**

	IGF1R		PTEN		pAkt		p-mTOR	
	No sobreexpr. (n=132)	Sobreexpr. (n=47)	Pérdida expr. (n=39)	No pérdida (n=140)	No activado (n=133)	Activado (n=46)	No activado (n=127)	Activado (n=52)
	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)
<b>Tamaño</b>								
T1	51,5(58)	46,8 (22)	46,2 (18)	51,4 (72)	48,9 (65)	54,3 (25)	48,8 (62)	53,8 (28)
T2	43,2(57)	53,2 (25)	48,7 (19)	45 (63)	47,4 (63)	41,3 (19)	46,5 (59)	44,2 (23)
T3	5,3(7)	0 (0)	5,1 (2)	3,6 (5)	3,8 (5)	4,3 (2)	4,7 (6)	1,9 (1)
	<i>p=0,182</i>		<i>p=0,799</i>		<i>p=0,776</i>		<i>p=0,617</i>	
<b>Tamaño</b>								
T1	50,8 (67)	46,8 (22)	46,2 (18)	50,7 (71)	48,1 (64)	54,3 (25)	48,8 (62)	51,9 (27)
T2+3	49,2 (65)	53,2 (25)	53,8 (21)	49,3 (69)	51,9 (69)	45,7 (21)	51,2 (65)	48,1 (25)
	<i>p=0,642</i>		<i>p=0,614</i>		<i>p=0,467</i>		<i>p=0,706</i>	
<b>Tipo</b>								
CDI NOS	92,4 (122)	97,9 (46)	87,2 (34)	95,7 (134)	94 (125)	93,5 (43)	94,5 (120)	92,3 (48)
Otros	7,6 (10)	2,1 (1)	12,8 (5)	4,3 (6)	6 (8)	6,5 (3)	5,5 (7)	7,7 (4)
	<i>p=0,182</i>		<b><i>p=0,050</i></b>		<i>p=0,902</i>		<i>p=0,581</i>	
<b>Grado</b>								
I	6,8 (9)	4,3 (2)	5,1 (2)	6,4 (9)	6,8 (9)	4,3 (2)	5,5 (7)	7,7 (4)
II	27,3 (36)	27,7 (13)	12,8 (5)	31,4 (44)	27,1 (36)	28,3 (13)	26 (33)	30,8 (16)
III	65,9 (87)	68,1 (32)	82,1 (32)	62,1 (87)	66,2 (88)	67,4 (31)	68,5 (87)	61,5 (32)
	<i>p=0,820</i>		<i>p=0,056</i>		<i>p=0,839</i>		<i>p=0,649</i>	
<b>Necrosis</b>								
Sí	37,9 (50)	59,6 (28)	41 (16)	44,3 (62)	40,6 (54)	52,2 (24)	47,2 (60)	34,6 (18)
No	62,1 (82)	40,4 (19)	59 (23)	55,7 (78)	59,4 (79)	47,8 (22)	52,8 (67)	65,4 (34)
	<b><i>p=0,010</i></b>		<i>p=0,717</i>		<i>p=0,172</i>		<i>p=0,122</i>	
<b>Inv. linfática</b>								
Sí	43,2 (57)	55,3 (26)	43,6 (17)	47,1 (66)	46,6 (62)	45,7 (21)	49,6 (63)	38,5 (20)
No	56,8 (75)	44,7 (21)	56,4 (22)	52,9 (74)	53,4 (71)	54,3 (25)	50,4 (64)	61,5 (32)
	<i>p=0,152</i>		<i>p=0,694</i>		<i>p=0,910</i>		<i>p=0,175</i>	
<b>Carcinoma In Situ</b>								
Sí	49,2 (65)	72,3 (34)	51,3 (20)	56,4 (79)	54,9 (73)	56,5 (23)	52 (66)	63,5 (33)
No	50,8 (67)	27,7 (13)	48,7 (19)	43,6 (61)	45,1 (60)	43,5 (20)	48 (61)	36,5 (19)
	<b><i>p=0,006</i></b>		<i>p=0,568</i>		<i>p=0,848</i>		<i>p=0,160</i>	
<b>Estado ganglionar</b>								
Positivo	43,2 (57)	42,6 (20)	38,5 (15)	44,3 (62)	47,4 (63)	30,4 (14)	43,3 (55)	42,3 (22)
Negativo	56,8 (75)	57,4 (27)	61,5 (24)	55,7 (78)	52,6 (70)	69,6 (32)	56,7 (72)	57,7 (30)
	<i>p=0,949</i>		<i>p=0,516</i>		<b><i>p=0,046</i></b>		<i>p=0,902</i>	
<b>Estadio</b>								
I	38,6 (51)	38,3 (18)	35,9 (14)	39,3 (55)	35,3 (47)	47,8 (22)	37 (47)	42,3 (22)
II	42,4 (56)	36,2 (17)	43,6 (17)	40 (56)	41,4 (55)	39,1 (18)	37,8 (48)	48,1 (25)
III	16,7 (22)	23,4 (11)	20,5 (8)	17,9 (25)	21,1 (28)	10,9 (5)	22,8 (29)	7,7 (4)
IV	2,3 (3)	2,1 (1)	0 (0)	2,9 (4)	2,3 (3)	2,2 (1)	2,4 (3)	1,9 (1)
	<i>p=0,755</i>		<i>p=0,701</i>		<i>p=0,341</i>		<i>p=0,119</i>	
<b>Estadio</b>								
I+II	81,1 (107)	74,5 (35)	79,5 (31)	79,3 (111)	76,7 (102)	87 (40)	74,8 (95)	90,4 (47)
III+IV	18,6 (25)	25,5 (12)	20,5 (8)	20,7 (29)	23,3 (31)	13 (6)	25,2 (32)	9,6 (5)
	<i>p=0,338</i>		<i>p=0,978</i>		<i>p=0,138</i>		<b><i>p=0,019</i></b>	

En la Tabla 11 podemos observar que la mayoría de los tumores de Tipo histológico CDI, NOS (95,7%) tienen expresión conservada de PTEN, a diferencia de los otros tipos histológicos (12,5%) que sí presentan pérdida de expresión de PTEN, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,050$ ).

Respecto a los niveles de expresión de IGF1R, observamos una correlación significativa entre la sobreexpresión con la presencia de necrosis (59,6%) ( $p=0,010$ ) y de carcinoma in situ asociado (72,3%;  $p=0,006$ ).

En el 69,6% de pacientes cuyos tumores tenían p-Akt activado se observó que el estado ganglionar axilar fue negativo ( $p=0,046$ ) y hubo una tendencia con el diagnóstico de la enfermedad en estadios más precoces (87%;  $p=0,138$ ).

Por último, hubo un predominio de tumores con p-mTOR activado (90,4%) que se encontraban en Estadios iniciales en el momento del diagnóstico ( $p=0,019$ ), mientras que observamos sólo una tendencia con la ausencia de necrosis (65.4%;  $p=0,122$ ), invasión linfovascular (61.5%;  $p=0,175$ ) y la presencia de CDIS (63.5%;  $p=0,160$ ).



**Tabla 12. Estudio de asociación entre las variable inmunohistoquímicas (IGF1R, PTEN, pAkt y p-mTOR) en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).**

	IGF1R		PTEN		pAkt	
	No sobreexpr. (n=132)	Sobreexpr. (n=47)	Pérdida expr. (n=39)	No pérdida (n=140)	No activado (n=133)	Activado (n=46)
<b>PTEN</b>						
Pérdida expr.	25,8 (34)	10,6 (5)				
No pérdida	74,2 (98)	89,4 (42)				
	<b>p=0,031</b>					
<b>pAkt</b>						
No activado	81,1 (107)	55,3 (26)	84,6 (33)	71,4 (100)		
Activado	18,9 (25)	44,7 (21)	15,4 (6)	28,6 (40)		
	<b>p=0,001</b>			<i>p=0,096</i>		
<b>p-mTOR</b>						
No activado (n=127)	68,9 (91)	76,6 (36)	76,9 (30)	69,3 (97)	69,9 (93)	73,9 (34)
Activado (n=52)	31,1 (41)	23,4 (11)	23,1 (9)	30,7 (43)	30,1 (40)	26,1 (12)
	p=0,321			p=0,353		p=0,608

En la Tabla 12 hemos reflejado cómo los diferentes componentes de esta vía molecular muestran diferentes grados de expresión, cuando se combinan entre sí, según en qué punto esté alterada la misma.

En la presente serie detectamos sobreexpresión de IGF1R en el 26,3% de los tumores, pérdida de PTEN en 21,8% y activación de pAKT y de p-mTOR en el 25,7% y 29,1%, respectivamente (ver Tabla 6). Además, vemos que dentro del grupo de tumores con sobreexpresión de IGF1R, el 10,6% presentan, además, pérdida de expresión de PTEN, en el 44,7% tienen pAkt activado y el 23,4% p-mTOR activado.

Por otra parte, dentro de los tumores con pérdida de PTEN, el 15,4% de los casos muestran activación de pAkt y el 23,1% activación de p-mTOR.

El 26,1% de los tumores con pAkt activado, asocian también la activación de p-mTOR, de manera no significativa.

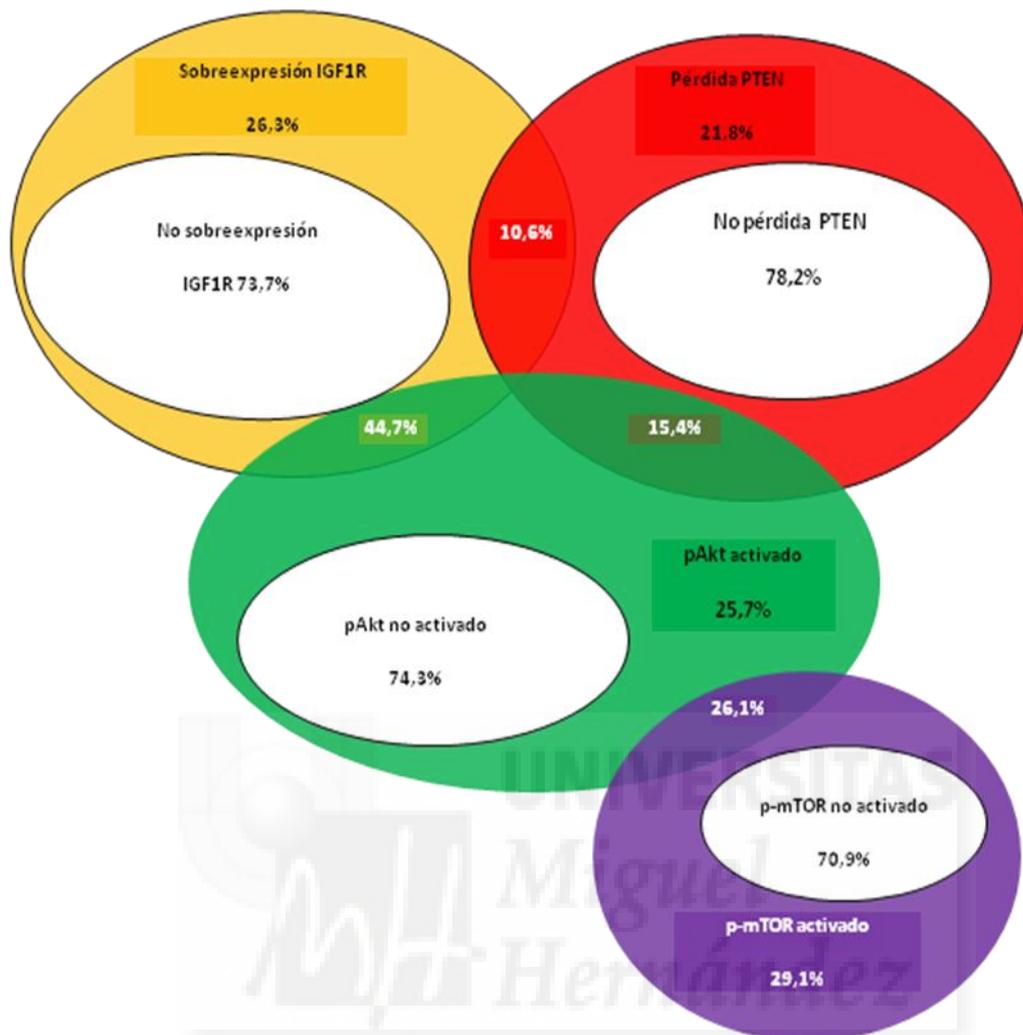


Figura 11. Estudio de asociación entre las variable inmunohistoquímicas (IGF1R, PTEN, pAkt y mTOR) en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).

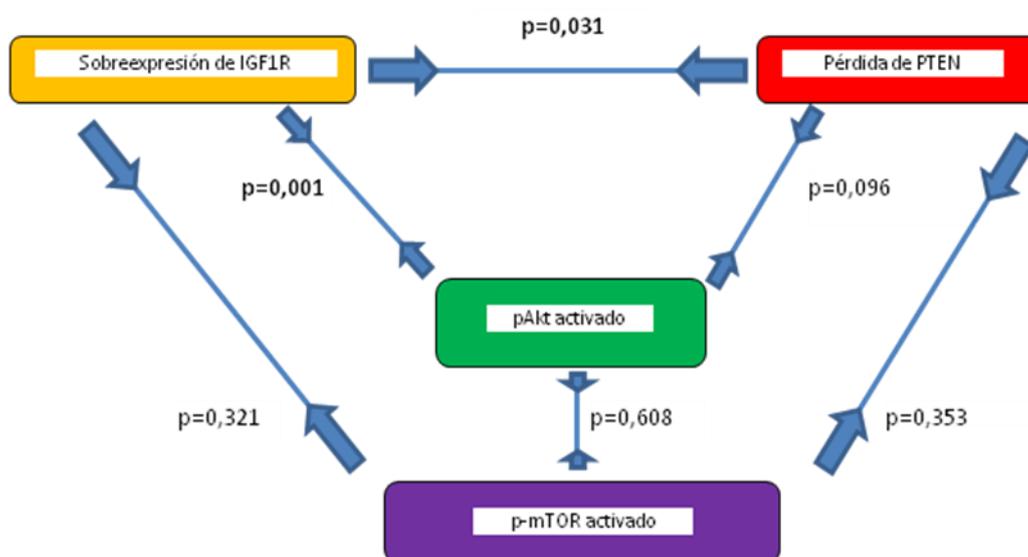


Figura 12. Estudio de asociación entre las variables inmunohistoquímicas (IGF1R, PTEN, pAkt y p-mTOR) en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).



## 4.7. Estudio de supervivencia.

### 4.7.1. Análisis univariante.

#### 4.7.1.1. Supervivencia libre de enfermedad (SLE) y variable clínica (quimioterapia previa) de todas las pacientes de la serie (n=250).

Tabla 13. SLE y variable clínica (quimioterapia previa) en todas las pacientes de la serie (n=250).

	Pacientes (n)	% libre de enfermedad	p
Quimio previa			
Sí	(71)	53,5	<b>&lt;0,001</b>
No	(179)	71,5	

\*Test log rank

En la Tabla 13 observamos que el 71,5% de las pacientes de toda la serie que no recibieron neoadyuvancia no mostraron recaída en el seguimiento, mientras que el 53,5% de las que sí recibieron neoadyuvancia no mostraron recaída, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ).

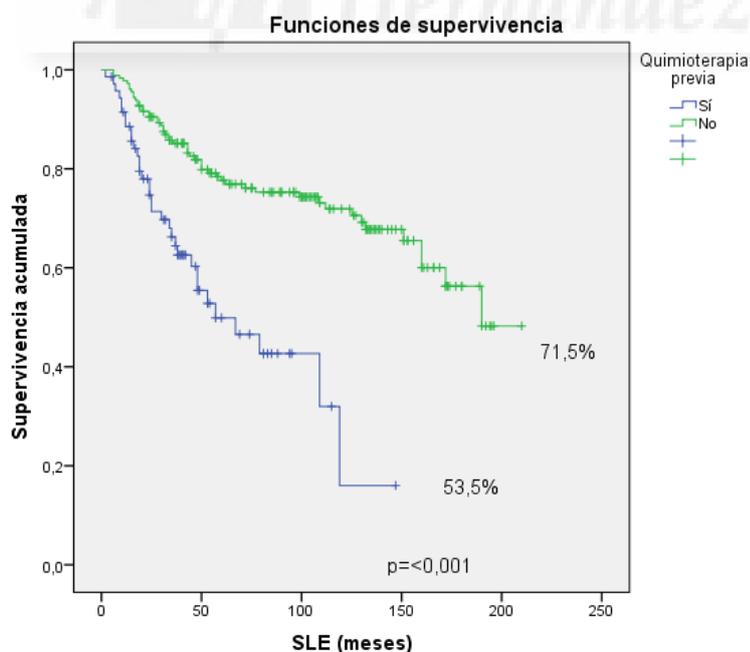


Figura 13. SLE y pacientes con y sin neoadyuvancia (n=250).

**4.7.1.2. Supervivencia libre de enfermedad (SLE) y variables clínicas en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).**

**Tabla 14. SLE y variables clínicas en pacientes con neoadyuvancia (n=179).**

	Pacientes (n)	% libre de enfermedad	p
<b>Edad</b>			
≤35	(83)	72,3	0,995
>35	(96)	70,8	
<b>Localización</b>			
Derecha	(87)	77	0,139
Izquierda	(92)	66,3	
<b>Lateralidad</b>			
Unilateral	(156)	73,1	0,511
Bilateral	(23)	60,9	
<b>Ant. Familiares</b>			
Sí	(28)	78,6	0,506
No	(151)	70,2	
<b>Cirugía</b>			
Mastect.	(100)	63	<b>0,002</b>
Tumorect.	(79)	82,3	

\*Test log rank

Los resultados de la Tabla 14 muestran diferencias estadísticamente significativas entre las pacientes a las que se les realizó tumorectomía y no presentaron recidiva (82,3%) y aquellas pacientes a las que se les realizó mastectomía y no presentaron recaída en el seguimiento (63%) (p=0,002).

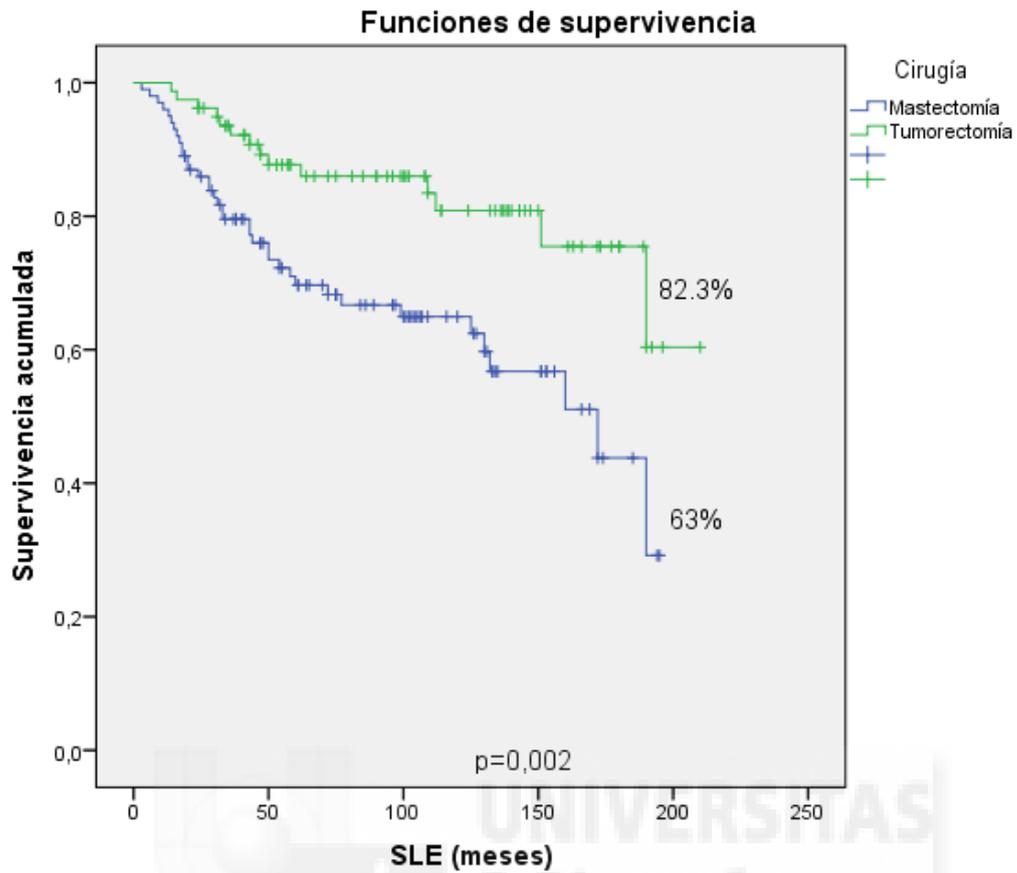


Figura 14. SLE y tipo de cirugía en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).

**4.7.1.3. Supervivencia libre de enfermedad (SLE) y variables morfológicas e inmunohistoquímicas de pacientes sin neoadyuvancia (n=179).**

**Tabla 15. SLE y variables morfológicas e inmunohistoquímicas en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).**

	Pacientes (n)	% libre de enfermedad	<i>p</i>
<b>Tamaño</b>			<b>0,025</b>
T1	(90)	81,1	
T2	(82)	62,2	
T3	(7)	57,1	
<b>Tamaño</b>			<b>0,003</b>
T1	(89)	82	
T2+T3	(90)	61,1	
<b>Tipo</b>			0,415
CDI	(168)	70,8	
Otros	(11)	81,8	
<b>Grado</b>			0,644
I	(11)	72,7	
II	(49)	75,5	
III	(119)	69,7	
<b>Grado</b>			0,451
I+II	(60)	75	
III	(119)	69,7	
<b>Grado</b>			0,535
I	(11)	72,7	
II+III	(168)	71,4	
<b>Necrosis</b>			0,074
Sí	(78)	62,8	
No	(101)	78,2	
<b>Inv.linfática</b>			<b>&lt;0,000</b>
Sí	(83)	53	
No	(96)	87,5	
<b>Carcinoma in situ</b>			0,218
Sí	(99)	75,8	
No	(80)	66,2	
<b>Estado ganglionar</b>			<b>&lt;0,000</b>
Positivo	(77)	57,1	
Negativo	(102)	82,4	

<b>Estadio</b>			<b>&lt;0,000</b>
I	(69)	79,7	
II	(73)	74	
III	(33)	57,6	
IV	(4)	0	
<b>Estadio</b>			<b>0,001</b>
I+II	(142)	76,8	
III+IV	(37)	51,4	
<b>IGF1R</b>			0,744
<240	(132)	73,5	
≥240	(47)	66	
<b>PTEN</b>			0,641
≤60	(39)	76,9	
>60	(140)	70	
<b>pAkt</b>			0,530
<100	(133)	71,4	
≥100	(46)	71,7	
<b>p-mTOR</b>			0,832
<120	(127)	70,9	
≥120	(52)	73,1	
<b>Inmunofenotipos</b>			0,738
Luminal A	(44)	72,7	
LumB/HER2-	(58)	70,7	
LumB/HER2+	(21)	57,1	
HER2 No Lum	(16)	75	
TN/Basal	(40)	77,5	
<b>Inmunofenotipos</b>			0,500
Luminales	(123)	69,1	
HER2 No Lum	(16)	75	
TN/Basal	(40)	77,5	

\*Test log rank

En la Tabla 15 observamos que las pacientes cuyos tumores presentaban menor tamaño ( $p=0,025$ ), sin signos de invasión linfática ( $p<0,000$ ) ni afectación de ganglios axilares ( $p<0,000$ ) y se diagnosticaron en Estadios iniciales ( $p=0,001$ ), presentaron menor porcentaje de recidiva durante el seguimiento que aquellas que presentaron mayor tamaño tumoral, signos de invasión linfática y afectación de ganglios axilares y se diagnosticaron en Estadios avanzados, mostrando diferencias estadísticamente significativas.

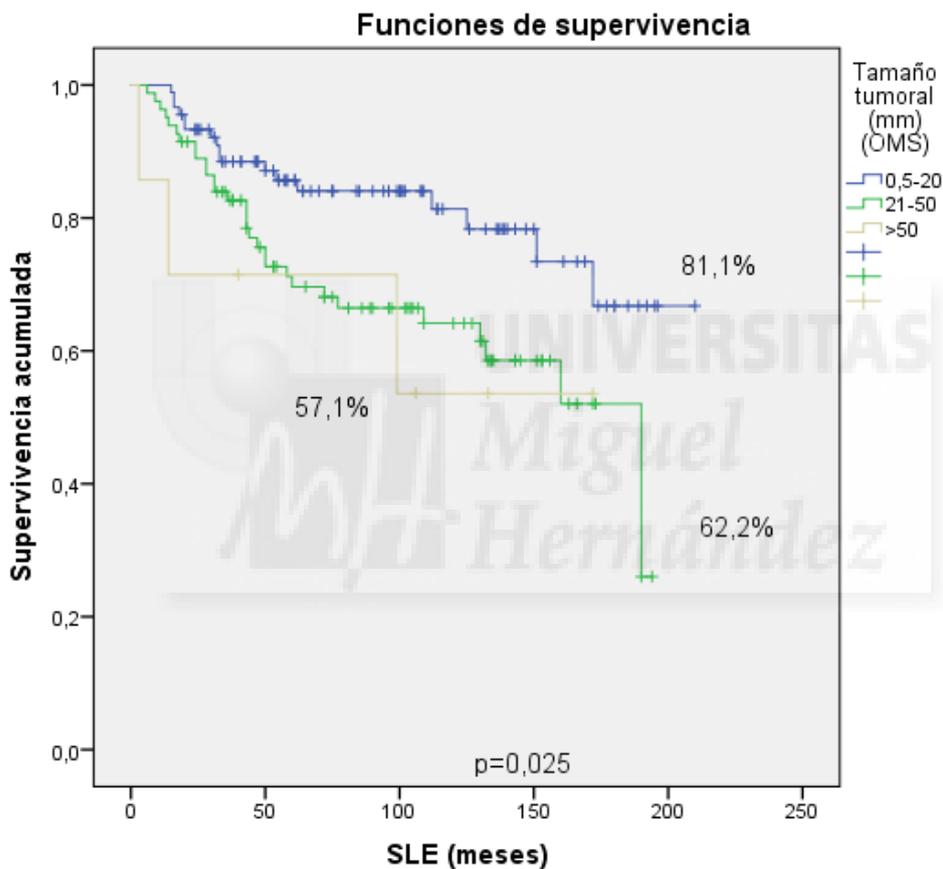


Figura 15. SLE y Tamaño tumoral (mm) en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).

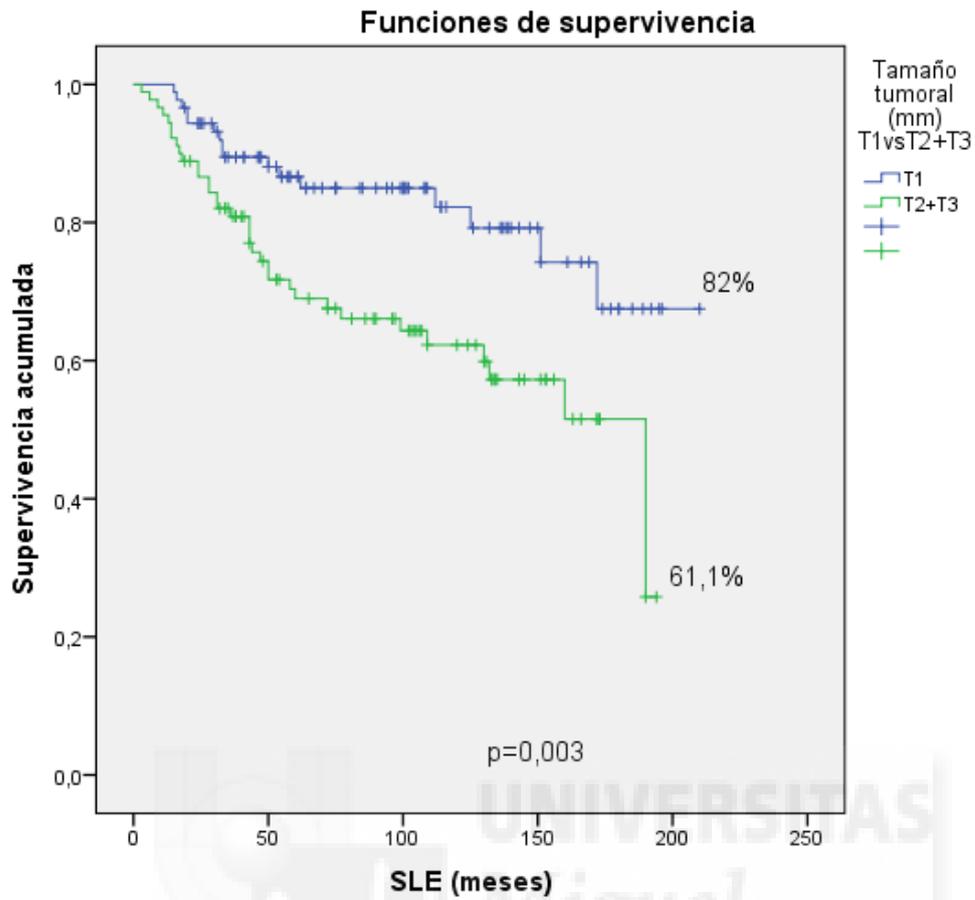


Figura 16. SLE y Tamaño tumoral (mm) T1 vs T2+T3 en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).

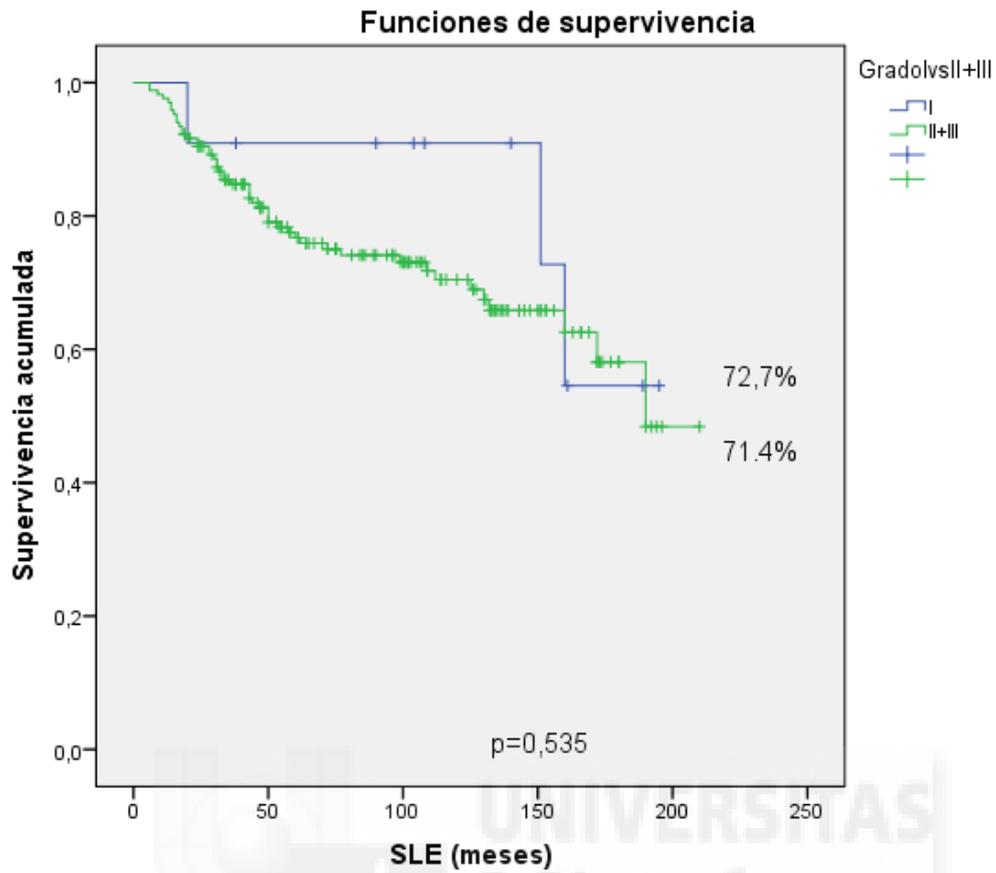


Figura 17. SLE y Grado (I vs II+III) en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).

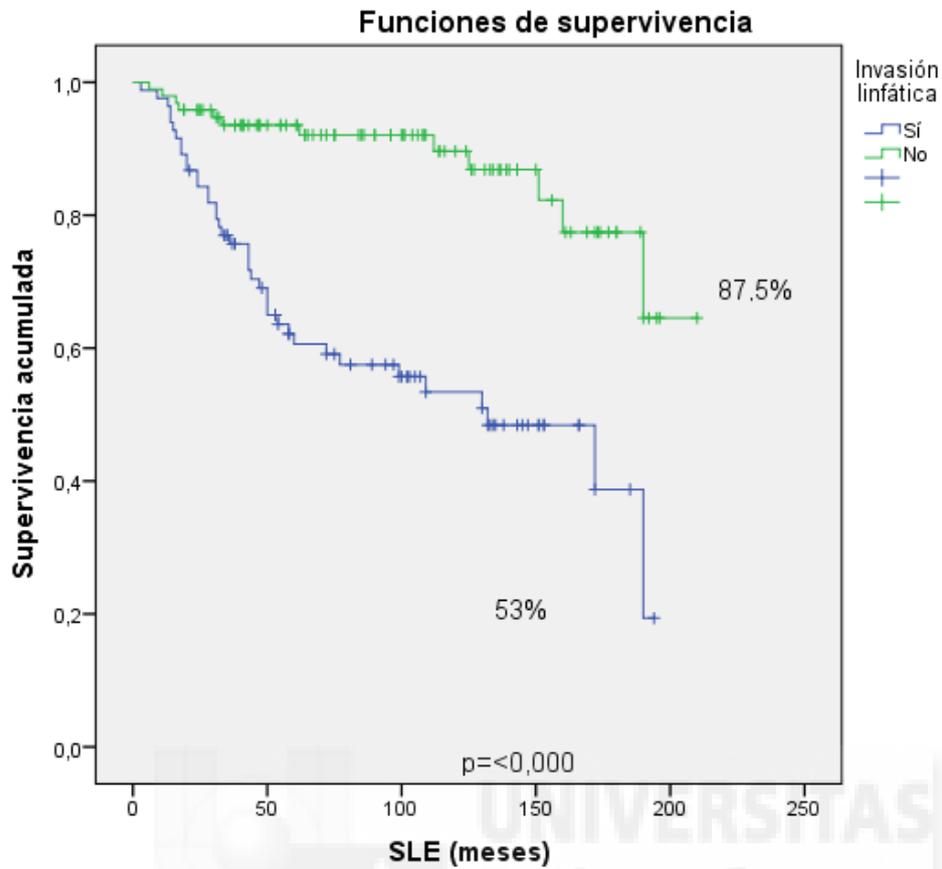


Figura 18. SLE e invasión linfática en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).

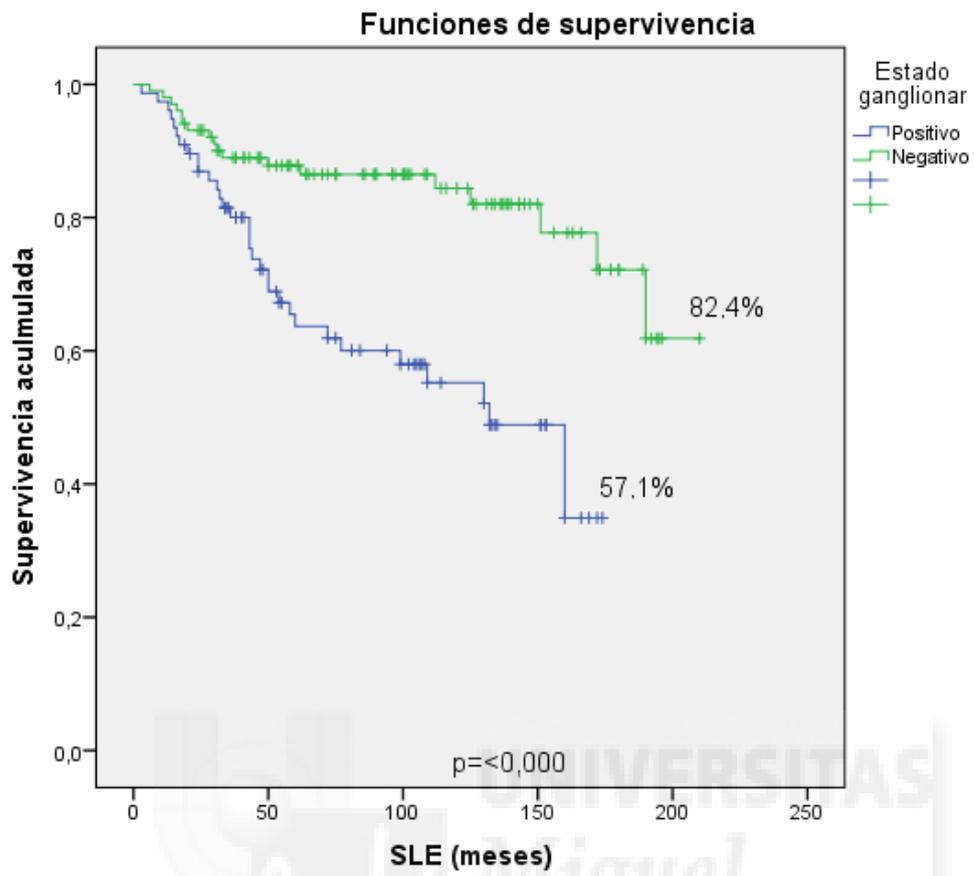


Figura 19. SLE y estado ganglionar en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).

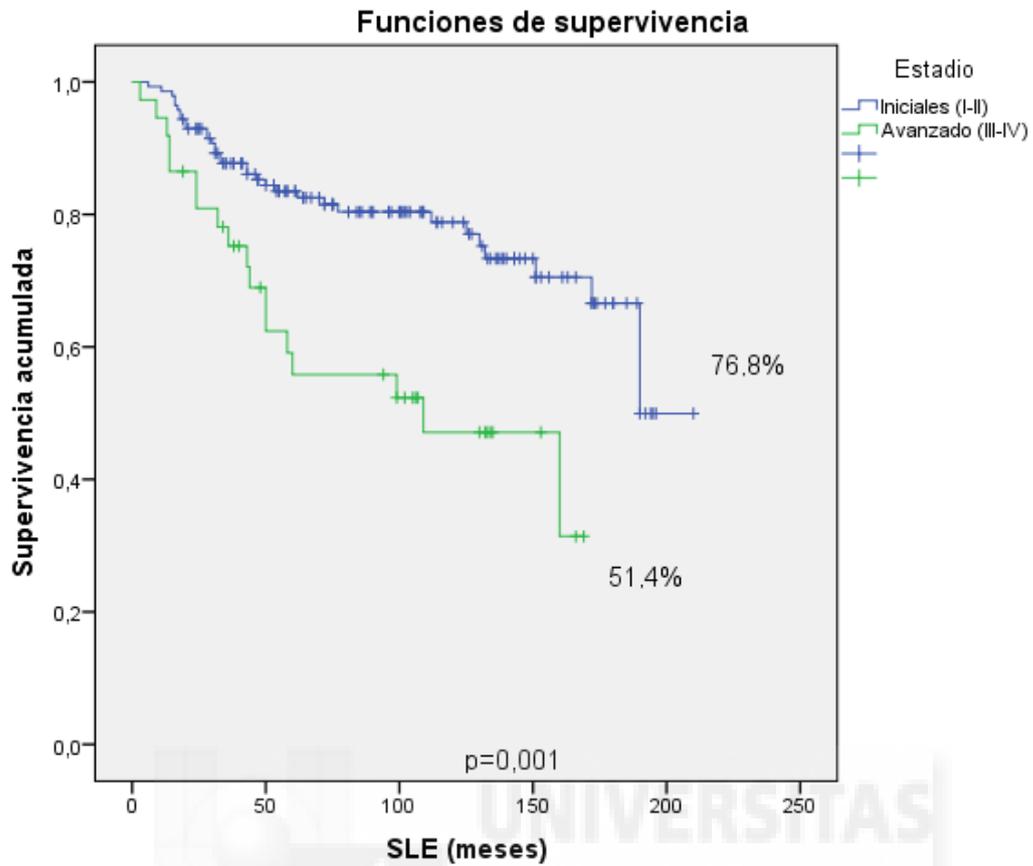


Figura 20. SLE y Estadios (Inicial I-II/Avanzado III-IV) en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).

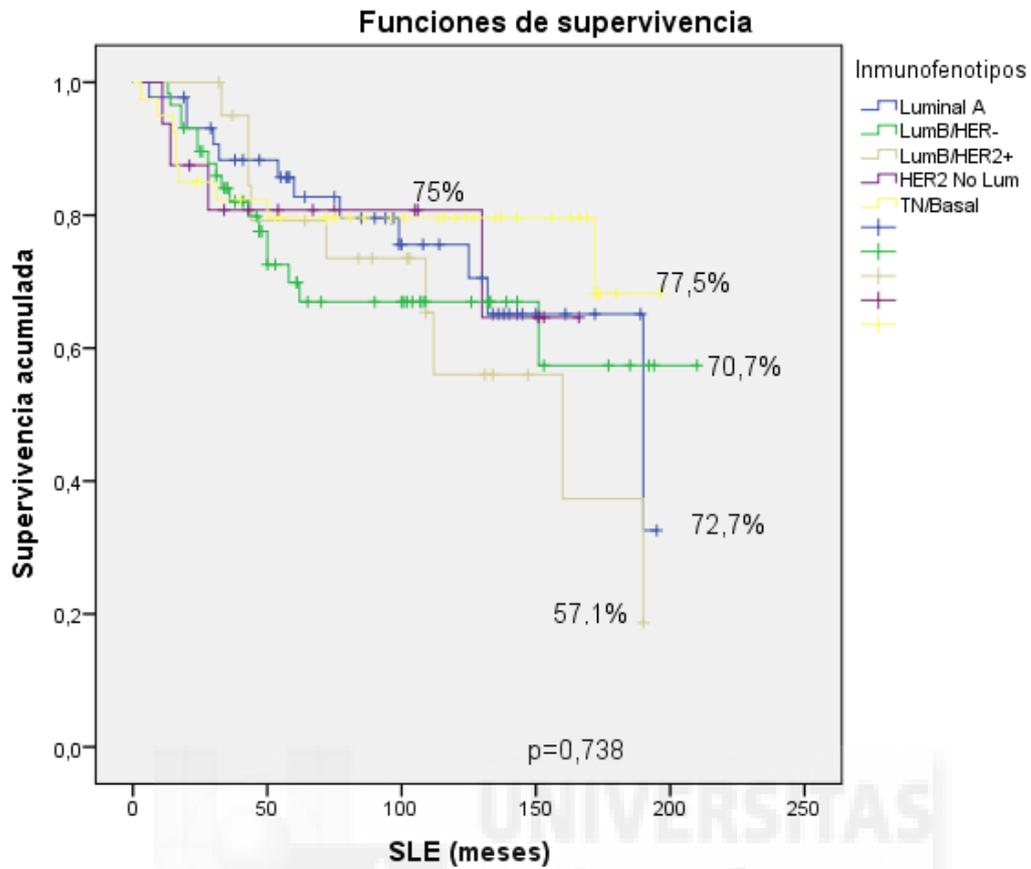


Figura 21. SLE e Immunofenotipos en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).

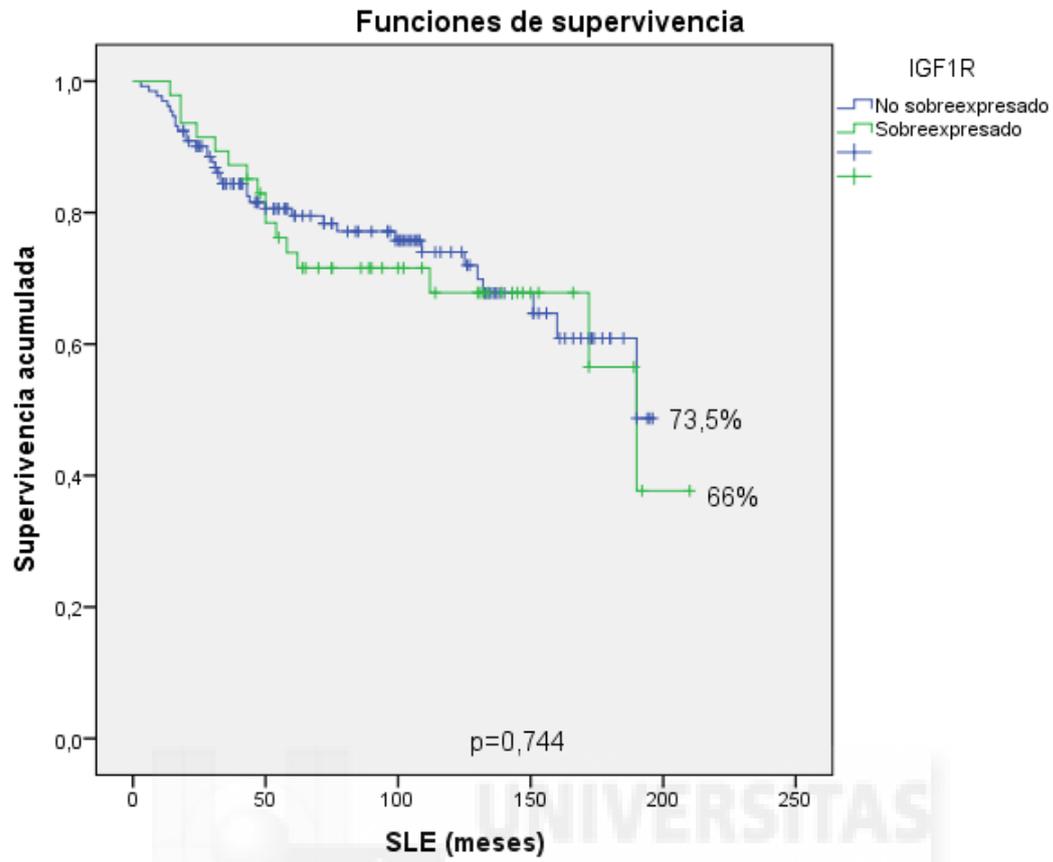


Figura 22. SLE y expresión de IGF1R en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).

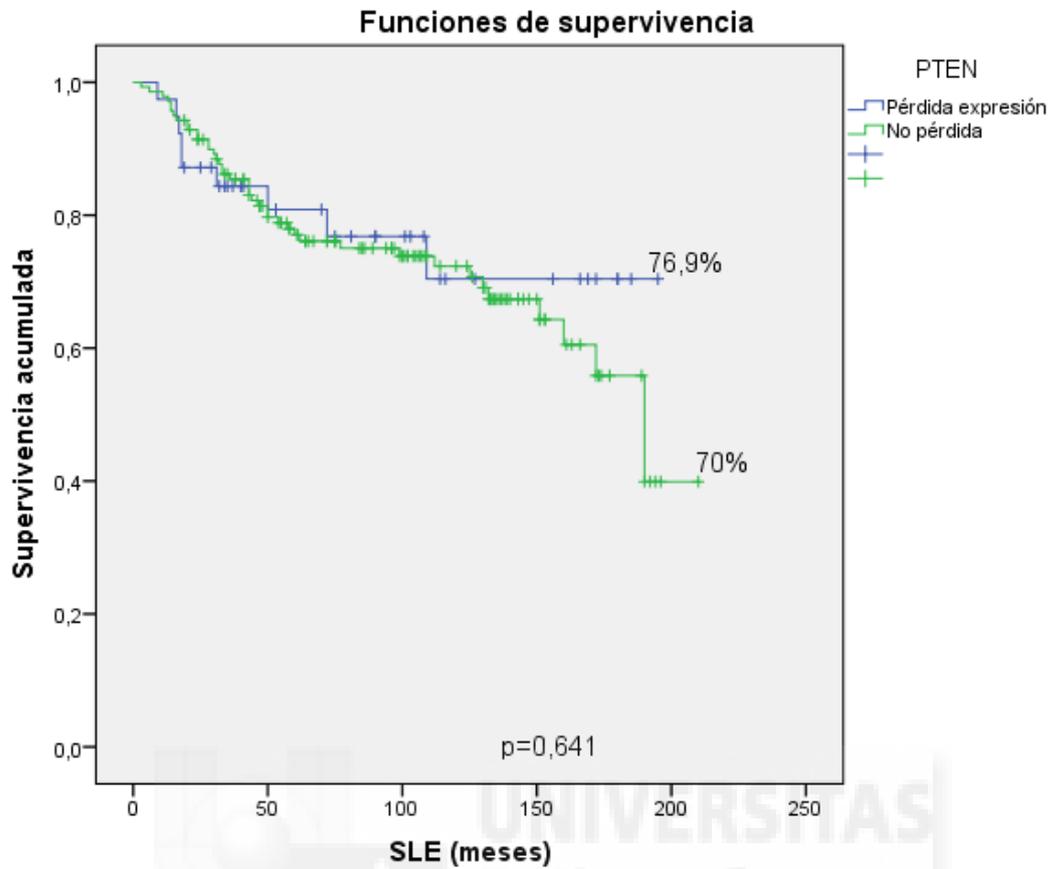


Figura 23. SLE y expresión de PTEN en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).

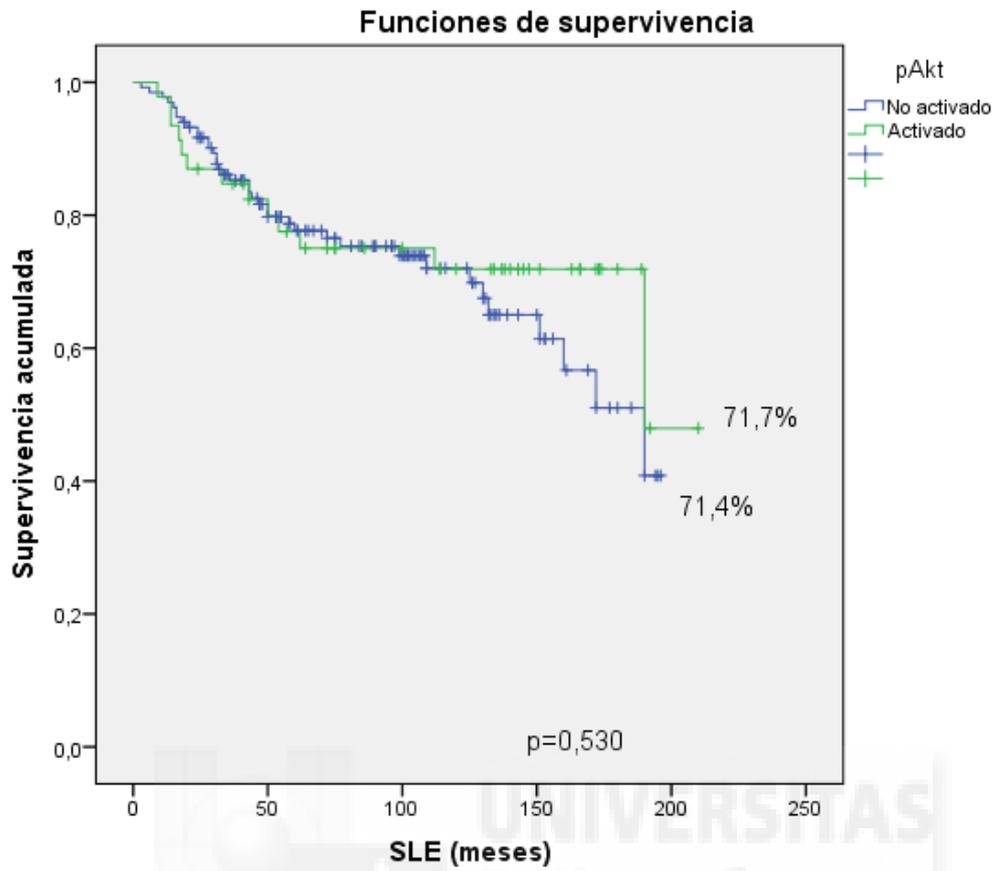


Figura 24. SLE y estado de activación de pAkt en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).

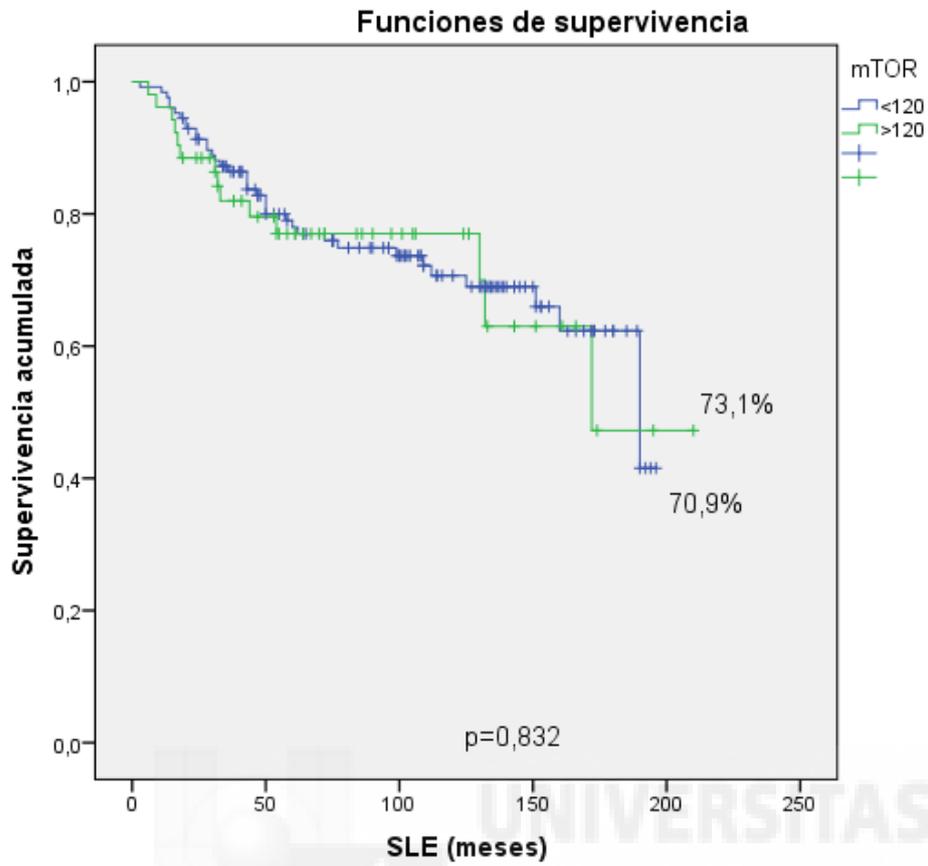


Figura 25. SLE y estado de activación de p-mTOR en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).

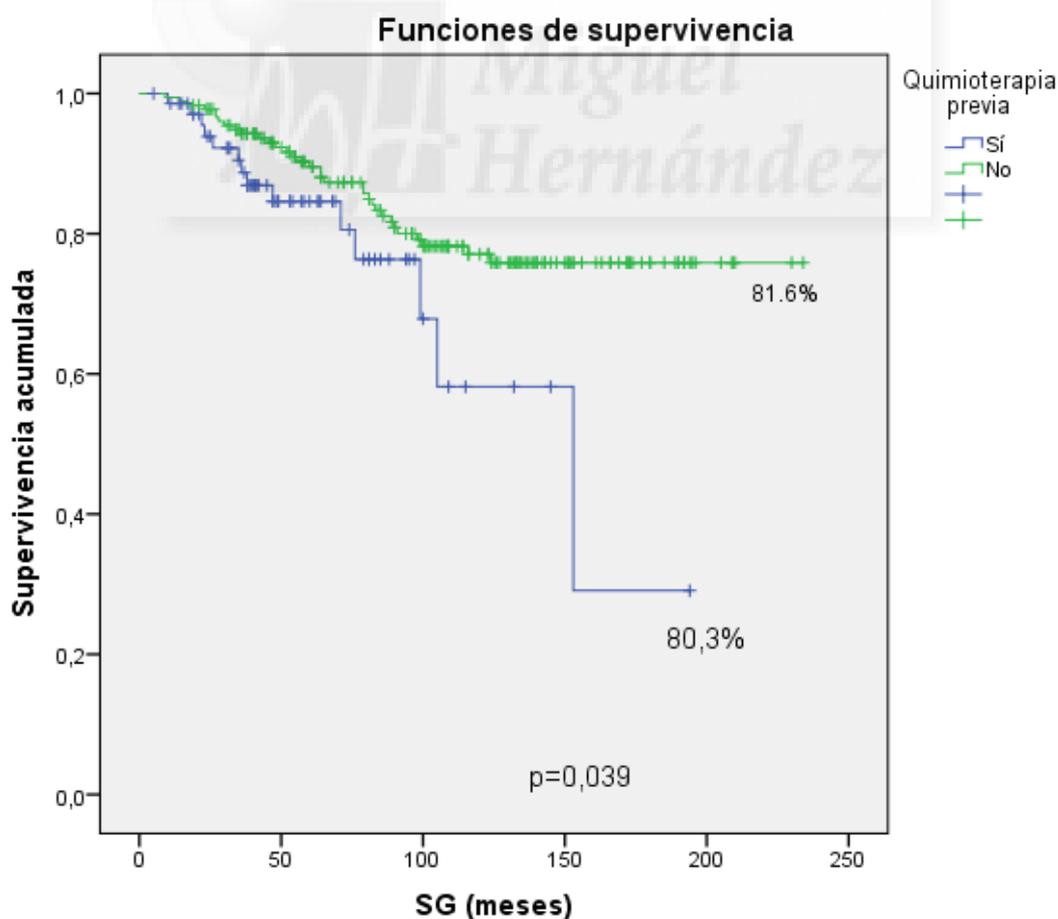
**4.7.1.4. Supervivencia global (SG) y variable clínica (quimioterapia previa) de pacientes de toda la serie (n=250).**

**Tabla 16. SLE y variable clínica (quimioterapia previa) en todas las pacientes de la serie (n=250).**

	Pacientes (n)	% supervivencia	p
<b>Quimio previa</b>			
Sí	(71)	80,3%	<b>0,039</b>
No	(179)	81,6%	

\*Test log rank

En la Tabla 16 observamos que el 81,6% de las pacientes de toda la serie que no recibieron neoadyuvancia sobrevivieron durante el seguimiento, mientras que el 80,3% de las pacientes que sí recibieron neoadyuvancia sobrevivieron, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,039$ ).



**Figura 26. SG y pacientes con y sin neoadyuvancia (n=250).**

**4.7.1.5 Supervivencia global (SG) y variables clínicas de pacientes sin neoadyuvancia (n=179).**

**Tabla 17. SLE y variables morfológicas e inmunohistoquímicas en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).**

	Pacientes (n)	% supervivencia	p
<b>Edad</b>			<i>0,107</i>
≤35	(83)	77,1	
>35	(96)	85,4	
<b>Localización</b>			0,434
Derecha	(87)	83,9	
Izquierda	(92)	79,3	
<b>Lateralidad</b>			0,285
Unilateral	(156)	80,8	
Bilateral	(23)	87	
<b>Ant. Familiares</b>			0,599
Sí	(28)	85,7	
No	(151)	80,8	
<b>Cirugía</b>			<b>0,038</b>
Mastectomía	(100)	76	
Tumorectomía	(79)	88,6	

\*Test log rank

Los resultados de la Tabla 17 muestran diferencias estadísticamente significativas entre las pacientes a las que se les realizó tumorectomía y sobrevivieron durante el seguimiento (88,6%) y aquellas pacientes a las que se les realizó mastectomía y sobrevivieron (76%) ( $p=0,038$ ). Se observa también una tendencia a una mayor supervivencia entre pacientes con más de 35 años (85,4%) ( $p=0,107$ ) que entre aquellas de menor edad.

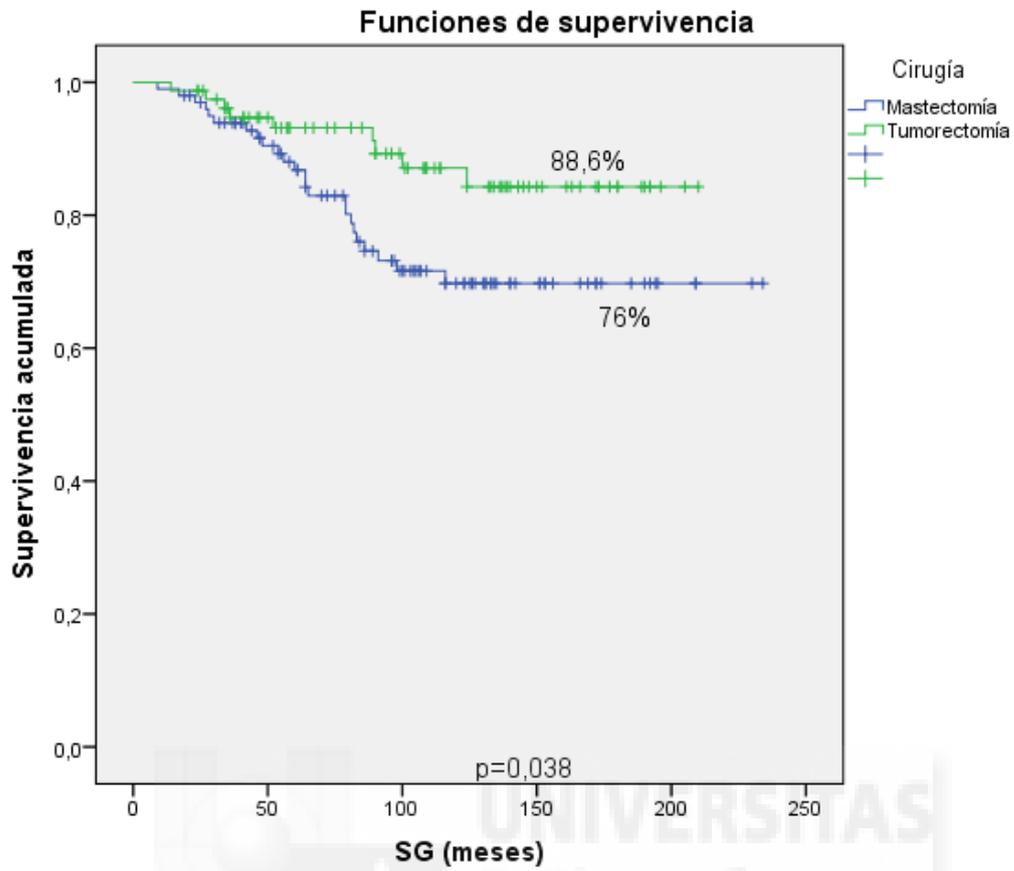


Figura 27. SG y tipo de cirugía en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).

**4.7.1.6 Supervivencia global (SG) y variables morfológicas e inmunohistoquímicas de pacientes sin neoadyuvancia (n=179).**

**Tabla 18. SLE y variables morfológicas e inmunohistoquímicas en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).**

	Pacientes (n)	% supervivencia	p
<b>Tamaño</b>			
T1	(90)	86,7	0,273
T2	(82)	76,8	
T3	(7)	71,4	
<b>Tamaño</b>			
T1	(89)	87,6	0,071
T2+T3	(90)	75,6	
<b>Tipo</b>			
CDI	(168)	80,4	0,110
Otros	(11)	100	
<b>Grado</b>			
I	(11)	90,9	0,429
II	(49)	85,7	
III	(119)	79	
<b>Grado</b>			
I+II	(60)	86,7	0,244
III	(119)	79	
<b>Grado</b>			
I	(11)	90,9	0,319
II+III	(168)	81	
<b>Necrosis</b>			
Sí	(78)	71,8	<b>0,021</b>
No	(101)	89,1	
<b>Inv.linfática</b>			
Sí	(83)	68,7	<b>&lt;0,000</b>
No	(96)	92,7	
<b>Carcinoma in situ</b>			
Sí	(99)	87,9	<b>0,032</b>
No	(80)	73,8	
<b>Estado ganglionar</b>			
Positivo	(77)	71,4	<b>0,002</b>
Negativo	(102)	87,2	

<b>Estadio</b>			
I	(69)	87	<b>&lt;0,000</b>
II	(73)	86,3	
III	(33)	69,7	
IV	(4)	0	
<b>Estadio</b>			
I+II	(142)	86,6	<b>0,001</b>
III+IV	(37)	62,2	
<b>IGF1R</b>			
<240	(132)	83,3	0,615
≥240	(47)	76,6	
<b>PTEN</b>			
≤60	(39)	87,2	0,548
>60	(140)	80	
<b>pAkt</b>			
<100	(133)	82	0,925
≥100	(46)	80,4	
<b>p-mTOR</b>			
<120	(127)	81,1	0,779
≥120	(52)	82,7	
<b>Inmunofenotipos</b>			
Luminal A	(44)	86,4	0,467
LumB/HER2-	(58)	75,9	
LumB/HER2+	(21)	81	
HER2 No Lum	(16)	87,5	
TN/Basal	(40)	82,5	
<b>Inmunofenotipos</b>			
Luminales	(123)	80,5	0,840
HER2 No Lum	(16)	87,5	
TN/Basal	(40)	82,5	

\*Test log rank

En la Tabla 18 observamos que las pacientes cuyos tumores mostraron con más frecuencia presencia de necrosis, signos de invasión linfática, ausencia de componente de carcinoma in situ, afectación ganglionar axilar y Estadio avanzado al diagnóstico sobrevivieron menos durante el seguimiento (71,8%, 68,7%, 73,8%, 71,4% y 62,2%, respectivamente), siendo las diferencias estadísticamente significativas con respecto aquellas pacientes que presentaron las características contrarias a las anteriores, las que sobrevivieron más durante el seguimiento (89,1%, 92,7%, 87,9%, 87,2% y 86,6%, respectivamente) ( $p=0,021$ ,  $p<0,000$ ,  $p=0,032$ ,  $p=0,002$  y  $p=0,001$ ).

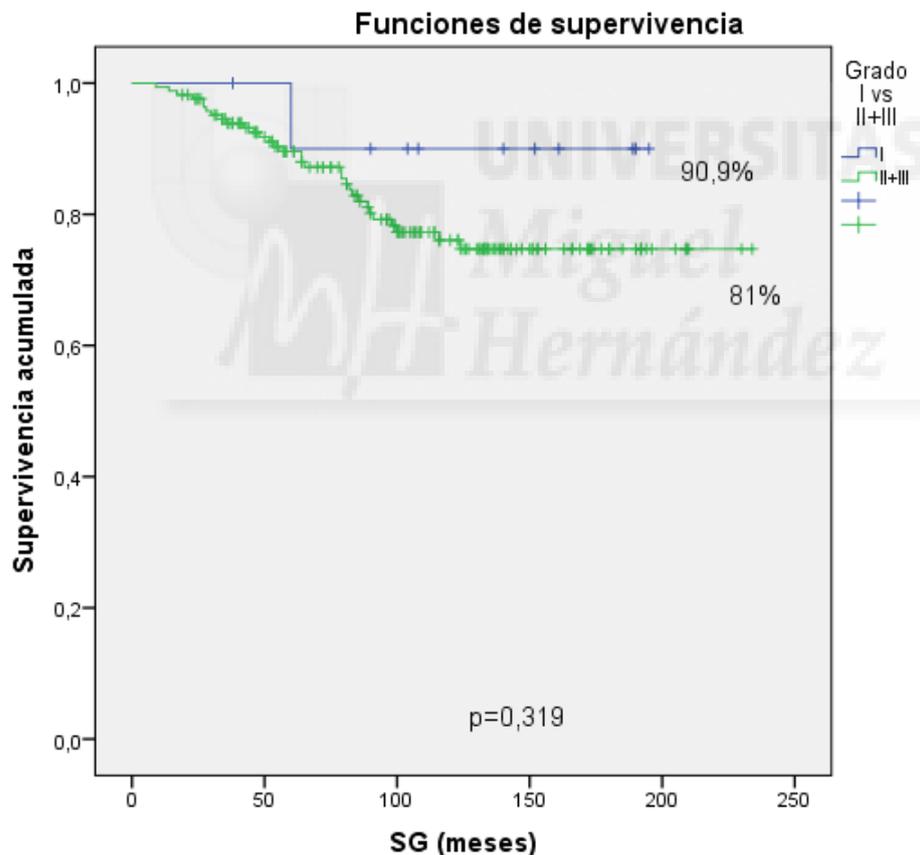


Figura 28. SG y Grado histológico (I vs II+III) en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).

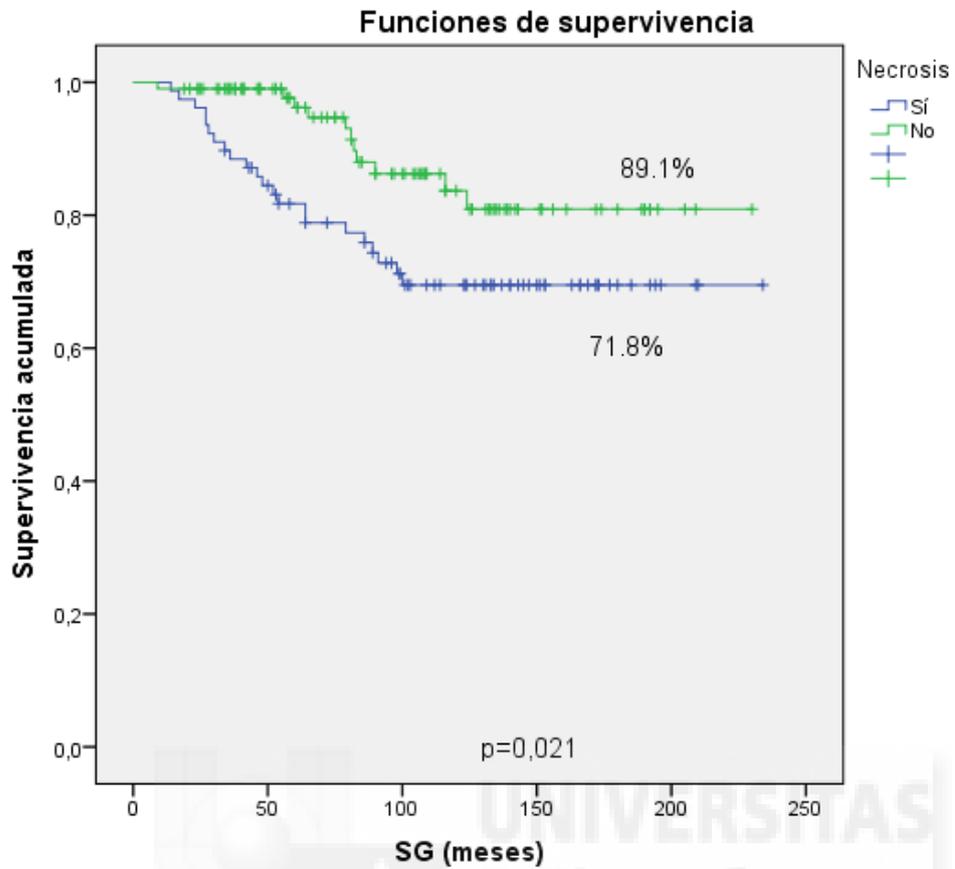


Figura 29. SG y Necrosis en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).

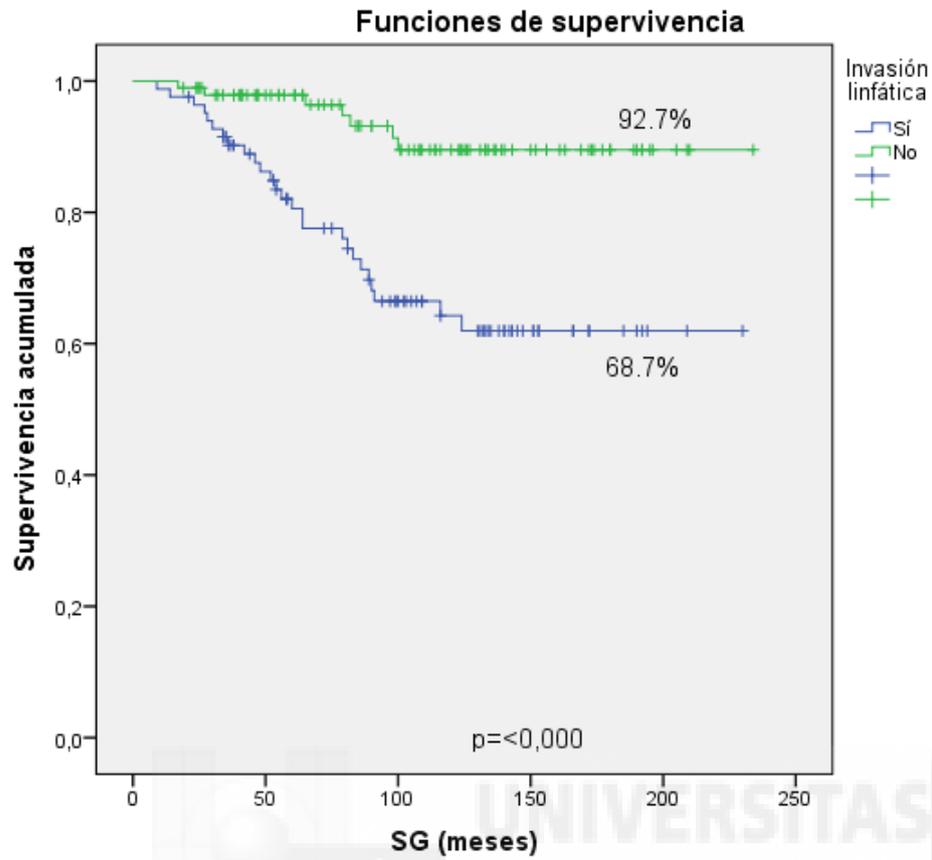


Figura 30. SG e Invasión linfática en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).

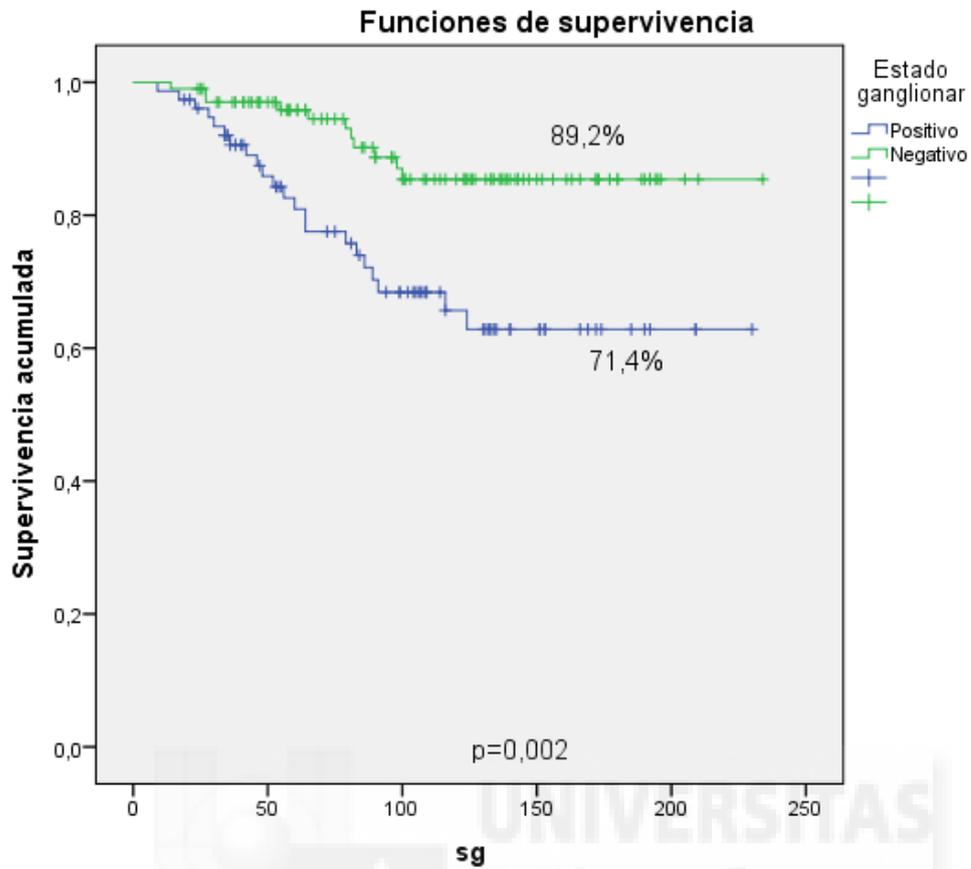


Figura 31. SG y estado ganglionar axilar en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).

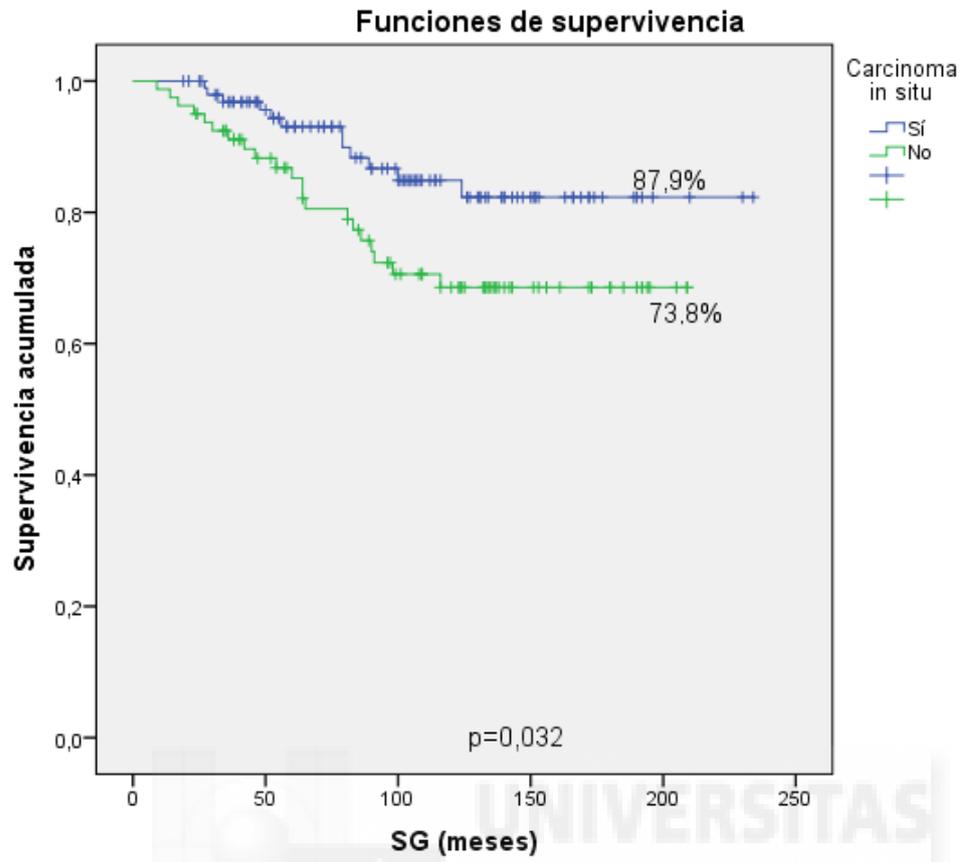


Figura 32. SG y asociación con CDIS en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).

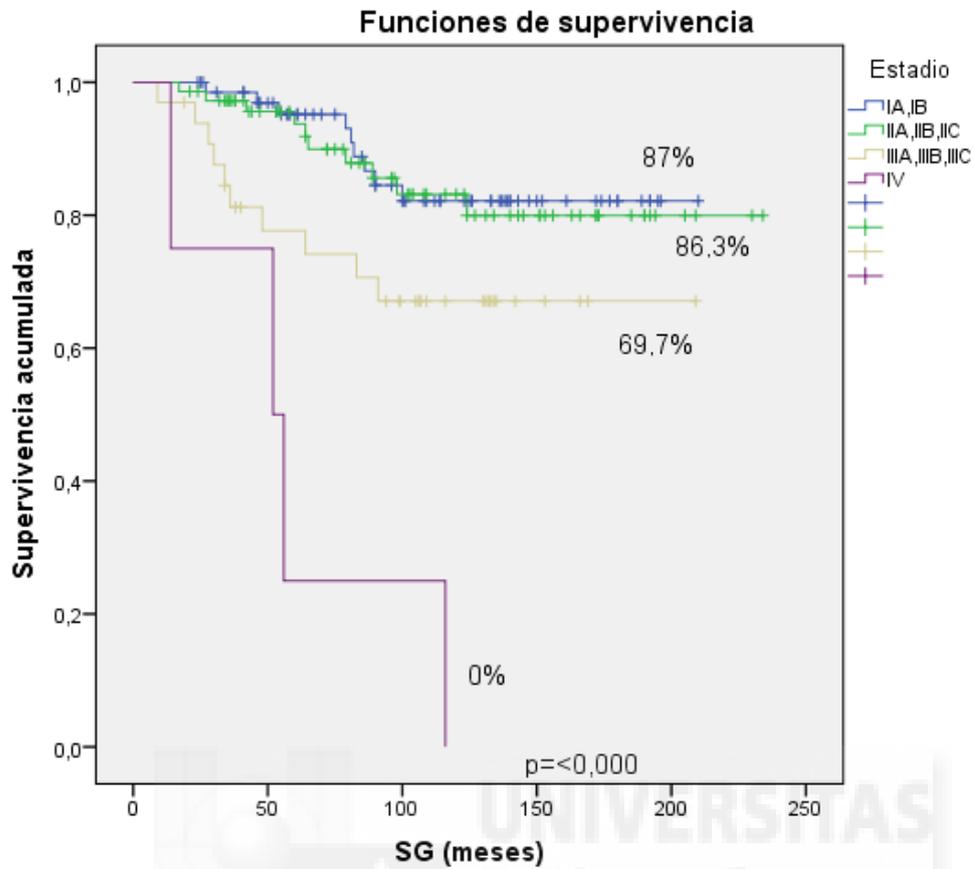


Figura 33. SG y Estadio en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).

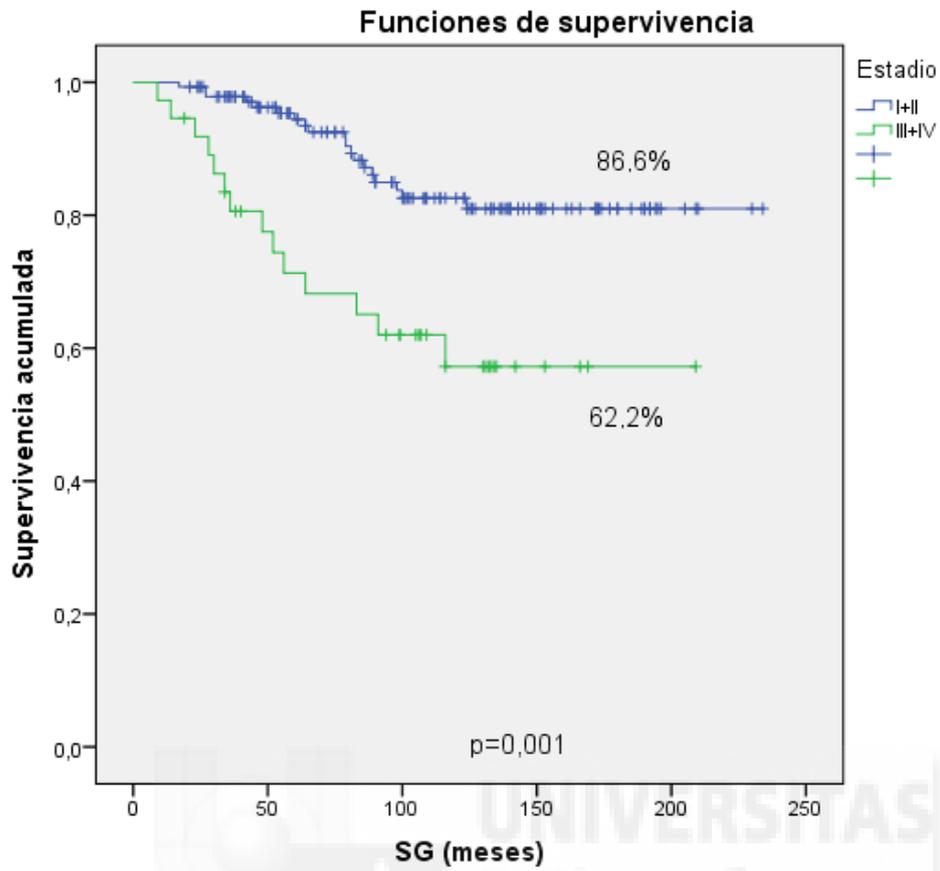


Figura 34. SG y Estadio (I+II/III+IV) en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).

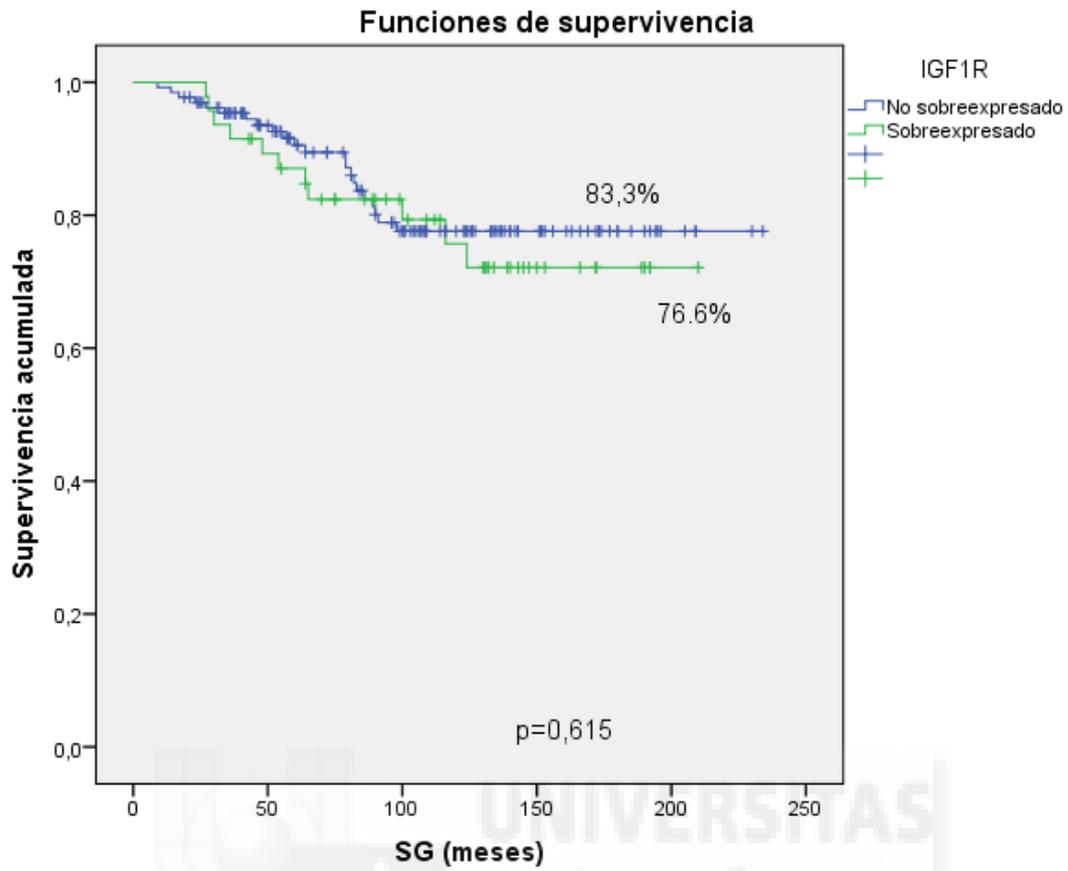


Figura 35. SG y sobreexpresión de IGF1R en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).

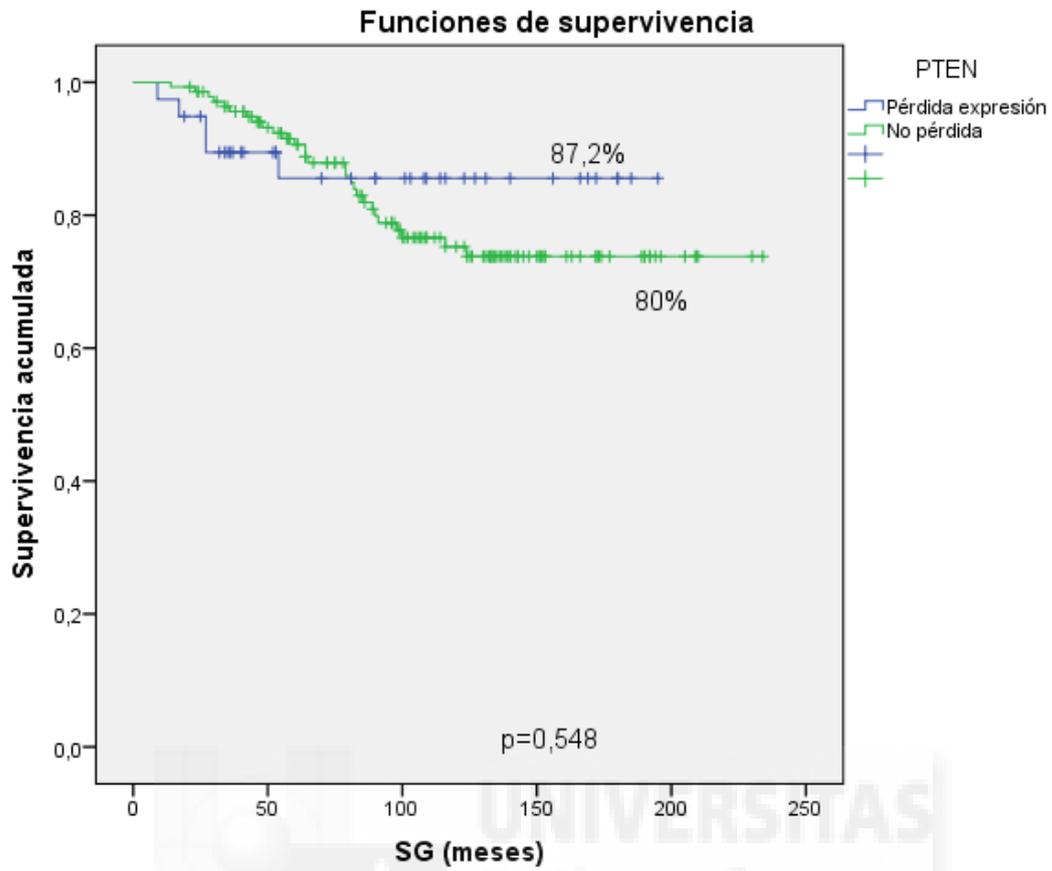


Figura 36. SG y expresión de PTEN en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).

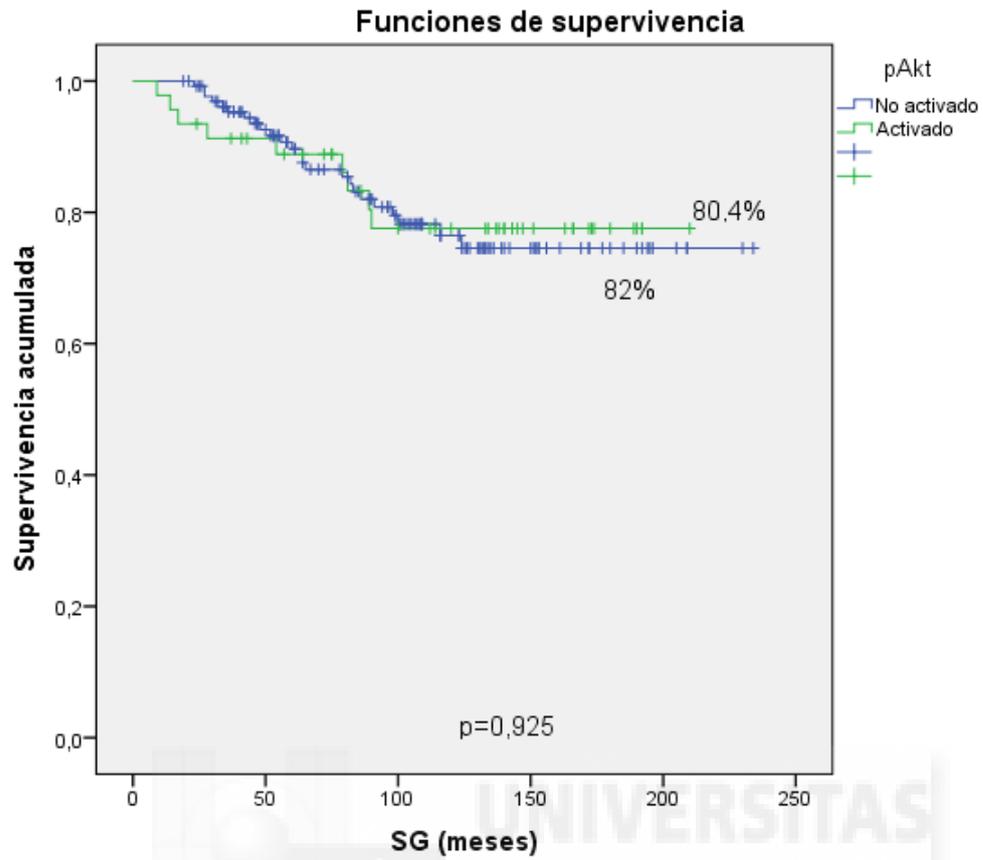


Figura 37. SG y activación de pAkt en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).

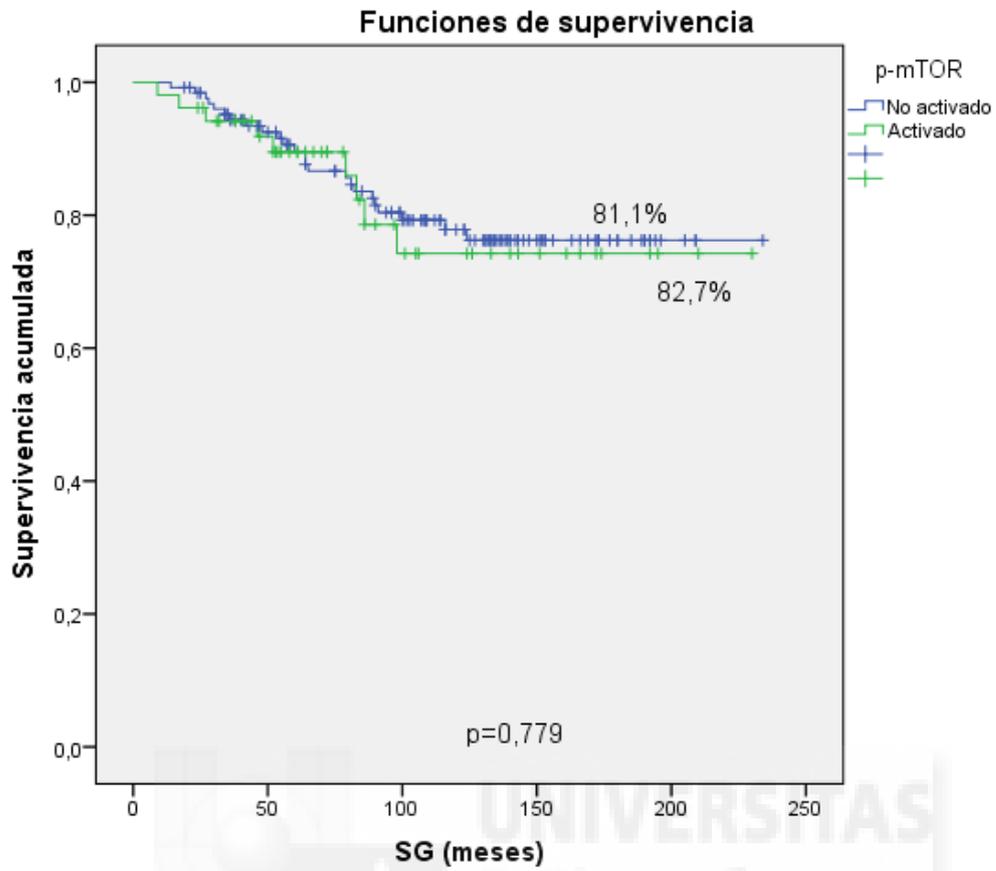


Figura 38. SG y activación de p-mTOR en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).

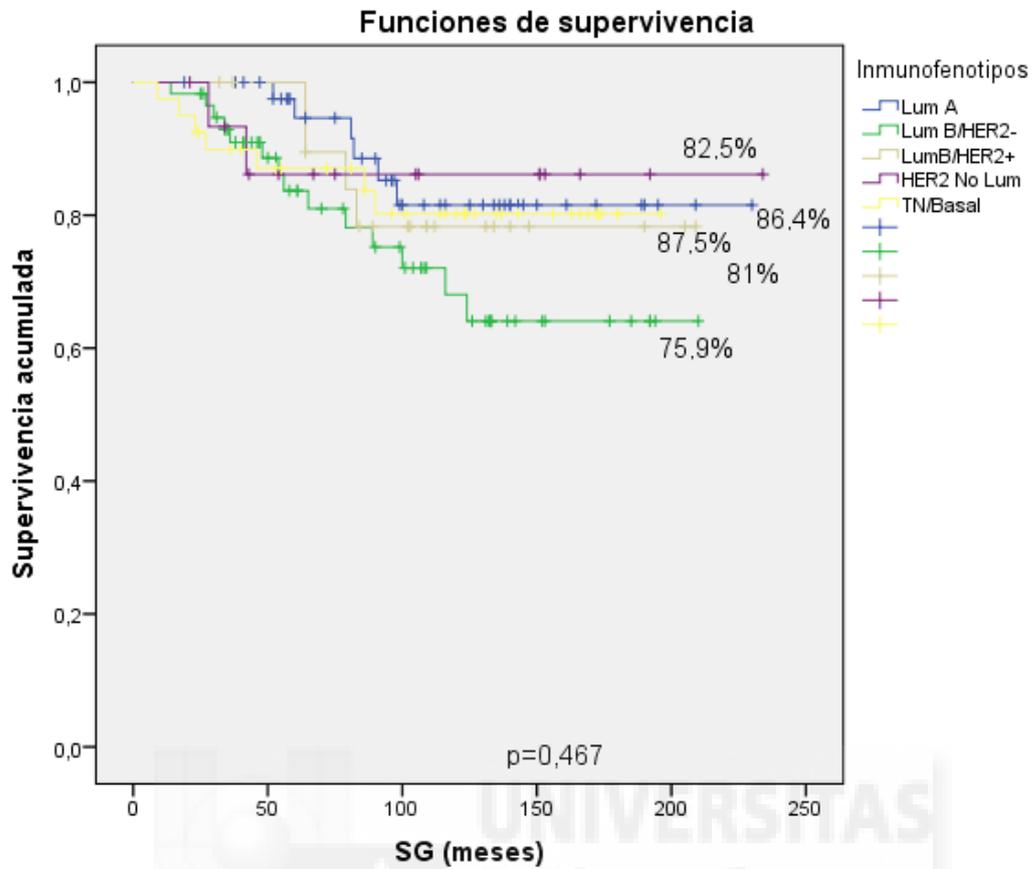


Figura 39. SG y activación de p-mTOR en pacientes sin neoadyuvancia (n=179).

**4.7.2. Cálculo de las razones de riesgo (HR) de variables clínicas, morfológicas e inmunohistoquímicas. Regresión de Cox (Recidiva).**

**Tabla 19. SLE y variables clínicas, morfológicas e inmunohistoquímicas Regresión de Cox (Recidiva).**

Variable	HR	IC (95%)	p
<b>Edad (por 1 año)</b>	1	0,951-1,051	0,987
<b>Edad</b>			0,989
≤35	0,996	0,573-1,731	
>35	1		
<b>QT previa</b>			<b>&lt;0,001</b>
Sí	3,075	1,936-4,884	
No	1		
<b>Localización</b>			0,127
Derecha	0,648	0,369-1,137	
Izquierda	1		
<b>Lateralidad</b>			0,533
Bilateral	0,796	0,387-1,636	
Unilateral	1		
<b>Ant. familiares</b>			0,500
Sí	0,746	0,318-1,750	
No	1		
<b>Cirugía</b>			<b>0,002</b>
Mastectomía	2,622	1,412-4,867	
Tumorectomía	1		
<b>Tamaño</b>			<b>0,024</b>
T3	2,681	0,784-9,162	
T2	2,148	1,188-3,884	
T1	1		
<b>Tamaño</b>			<b>0,003</b>
T2+3	2,382	1,318-4,306	
T1	1		
<b>Tipo</b>			0,392

Otros	1,838	0,446-7,566	
CDI, NOS	1		
<b>Grado</b>			0,713
III	1,511	0,464-4,924	
II	1,263	0,354-4,511	
I	1		
<b>Inv. Linfática</b>			<0,001
Sí	4,713	2,449-9,072	
No	1		
<b>Necrosis</b>			0,086
Sí	1,620	0,929-2,825	
No	1		
<b>CDIS</b>			0,219
Sí	0,709	0,409-1,230	
No	1		
<b>Estado ganglionar</b>			<0,001
Positivo	3,167	1,755-5,714	
Negativo	1		
<b>Estadio</b>			<0,001
IV	14,635	4,677-45,796	
III	2,593	1,226-5,484	
II	1,412	0,707-2,818	
I	1		
<b>Estadio</b>			0,001
(III+IV)	2,624	1,466-4,695	
(I+II)	1		
<b>IGF1R</b>			0,747
≥240	0,907	0,502-1,641	
<240	1		

<b>PTEN</b>			0,606
≤60	0,827	0,402-1,702	
>60	1		
<b>pAkt</b>			0,494
≥100	1,248	0,660-2,358	
<100	1		
<b>p-mTOR</b>			0,848
≥120	0,942	0,509-1,744	
<120	1		
<b>Inmunofenotipos</b>			0,696
TN/Basal	0,774	0,325-1,844	
HER2 No Lum	1,059	0,341-3,289	
LumB/HER2+	1,455	0,612-3,462	
LumB/HER2-	1,250	0,596-2,624	
Lum A	1		

Nota: Edad y QT previa  
n=250.  
Resto de variables  
n=179  
HR, hazard ratio;  
IC, intervalo de  
confianza

En la Tabla 19 observamos que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ) entre las pacientes que fueron tratadas con neoadyuvancia y las que no. En aquellas el riesgo de recidiva tumoral es de 3,075 veces más que el de las que no la recibieron. También se observa que existe 2,622 veces más riesgo de recidiva entre pacientes que se sometieron a una mastectomía que entre las que se realizó tumorectomía. Existe también un riesgo de 1,838 veces más de recidiva ente las paciente cuyos tumores son de tipo CDI, NOS que entre las que tienen tumores de Otros tipos histológicos.

Las pacientes que presentan invasión linfática, necrosis, y afectación de ganglios axilares tienen un riesgo de recidiva mayor ( $< 0,001$ , 0,086 y  $< 0,001$ , respectivamente) que aquellas pacientes que no lo presentan.

En cuanto al tamaño existe un riesgo de más de 2 veces de recidiva cuando éste es mayor de 20 mm y cuando es mayor de 50 mm ( $p = 0,024$  y  $p = 0,003$ ).

A su vez, cuanto mayor es el Estadio en el momento del diagnóstico el riesgo de recidiva es de entre 1,412 veces más (Estadio II), 2,593 (Estadio III) y 14,635 (Estadio IV) ( $p < 0,001$ ). Y de 2,624 veces más en los Estadios avanzados ( $p = 0,001$ ).

#### 4.7.3. Cálculo de las razones de riesgo (HR) de variables clínicas, morfológicas e inmunohistoquímicas. Regresión de Cox (Mortalidad).

Tabla 20. SG y variables clínicas, morfológicas e inmunohistoquímicas Regresión de Cox (Mortalidad).

Variable	HR	IC (95%)	p
Edad (por 1 año)	0,966	0,908-1,028	0,276
<b>Edad</b>			0,685
≤35	1,153	0,578-2,300	
>35	1		
<b>QT previa</b>			<b>0,039</b>
Sí	1,942	1,023-3,685	
No	1		
<b>Localización</b>			0,435
Derecha	0,760	0,381-1,517	
Izquierda	1		
<b>Lateralidad</b>			0,285
Bilateral	1,891	0,577-6,204	
Unilateral	1		
<b>Ant. familiares</b>			0,599
Sí	0,756	0,266-2,151	
No	1		
<b>Cirugía</b>			<b>0,039</b>
Mastectomía	2,200	1,022-4,734	
Tumorectomía	1		
<b>Tamaño</b>			0,273
T3	2,384	0,533-10,664	
T2	1,673	0,812-3,448	
T1	1		
<b>Tamaño</b>			0,072

T2+3	1,923	0,932-3,967	
T1	1		
<b>Tipo</b>			0,110
Otros	22,569	0,065-7805,77	
CDI NOS	1		
<b>Grado</b>			0,430
III	2,885	0,391-21,305	
II	2,040	0,251-16,594	
I	1		
<b>Inv. Linfática</b>			<0,001
Sí	4,504	1,955-10,377	
No	1		
<b>Necrosis</b>			0,021
Sí	2,296	1,112-4,739	
No	1		
<b>CDIS</b>			0,033
Sí	0,470	0,231-0,955	
No	1		
<b>Estado ganglionar</b>			0,002
Positivo	2,998	1,453-6,186	
Negativo	1		
<b>Estadio</b>			<0,001
IV	13,063	3,989-42,777	
III	2,472	1,004-6,086	
II	1,113	0,452-2,740	
I	1		
<b>Estadio</b>			0,001
(III+IV)	3,048	1,528-6,081	

(I+II)	1		
<b>IGF1R</b>			0,615
$\geq 240$	0,831	0,403-1,714	
$< 240$	1		
<b>PTEN</b>			0,549
$\leq 60$	0,748	0,289-1,938	
$> 60$	1		
<b>pAkt</b>			0,925
$\geq 100$	1,038	0,482-2,235	
$< 100$	1		
<b>mTOR</b>			0,779
$\geq 120$	0,896	0,415-1,932	
$< 120$	1		
<b>Inmunofenotipos</b>			0,468
TN/Basal	1,354	0,455-4,030	
HER2 No Lum	1,083	0,218-5,367	
Lum B/HER2+	1,364	0,385-4,835	
Lum B/HER2-	2,229	0,856-5,807	
Lum A	1		

Nota: Edad y QT  
previa n=250.  
Resto de variables  
n=179  
HR, hazard ratio;  
IC, intervalo de  
confianza

En la Tabla 20 observamos que existen diferencias estadísticamente significativas entre las pacientes que recibieron neoadyuvancia y aquellas que no la recibieron ( $p=0,039$ ), ya que en las primeras existe un riesgo de hasta 1,942 veces más de mortalidad que en las pacientes que no la recibieron.

También se observa un riesgo mayor de mortalidad, de hasta 2,200 veces más entre las pacientes a las que se les realizó mastectomía que entre las que les realizó tumorectomía ( $p=0,039$ ).

Por otra parte, las pacientes cuyos tumores con invasión linfática, necrosis y afectación de los ganglios axilares tuvieron más riesgo de mortalidad (4,504; 2,296 y 2,998, respectivamente) ( $p<0,001$ ;  $p=0,021$  y  $p=0,002$ ). Sin embargo, las pacientes cuyos tumores presentaron asociación con carcinoma in situ presentaron 0,470 veces menos riesgo de mortalidad que aquellas que no tenían asociación con carcinoma in situ ( $p=0,033$ ).

Respecto al Estadio existe un riesgo de entre 1,113 y 13,063 veces más de mortalidad cuanto mayor es el mismo ( $p<0,001$ ) y de 3,048 veces más en los Estadios avanzados que en los iniciales ( $p=0,001$ ).

#### 4.7.4. Análisis multivariante.

**Tabla 21: Razones de riesgo ajustadas para SLE (recidiva) (n=179).**

Variable	HR (IC 95%)	<i>p</i>
Mastectomía	1,23 (0,59-2,55)	0,587
CDI, NOS	2,87 (0,68-12,12)	0,151
Invasión linfática	2,08 (0,96-4,51)	0,065
Metástasis	9,31 (4,76-18,21)	<0,001
pAKT (por unidad)	1,00 (1,00-1,01)	0,552

HR, hazard ratio; IC, intervalo de confianza; pAKT, AKT fosforilada.

Bondad de ajuste:  $X^2=115,5$   $p<0,001$ .

Estadístico C: 0,813 (error estándar: 0,044).

En la Tabla 21 observamos que las pacientes cuyos tumores mostraron invasión linfática presentaron un riesgo mayor de recidiva en 2,08 veces más que aquellos tumores que no mostraron invasión linfática ( $p=0,065$ ).

Por otra parte, las pacientes con metástasis tenían aumentado el riesgo de recidiva en 9,31 veces respecto a las que no tenían metástasis ( $p<0,001$ ).

**Tabla 22. Resultados de modelo predictivo para SLE (recidiva) (n=179).**

Metástasis	Puntos
No	0
Sí	6

Histología	Puntos
Otros	0
CDI	2

Invasión linfática	Puntos
No	0
Sí	4

**Riesgo cada 2 años (%)**

Años	Suma de puntos			
	Bajo (<2)	Medio (2)	Alto (3-4)	Muy alto (≥5)
2	0,80-1,35	2,20-2,25	3,60-5,95	9,55-24,10
4	1,75-2,95	4,80-4,85	7,80-12,65	19,95-45,65
6	2,50-4,15	6,70-6,75	10,90-17,40	27,05-57,85
8	2,90-4,85	7,80-7,85	12,60-20,00	30,85-63,55
10	3,35-5,55	8,95-9,00	14,40-20,75	34,65-68,85

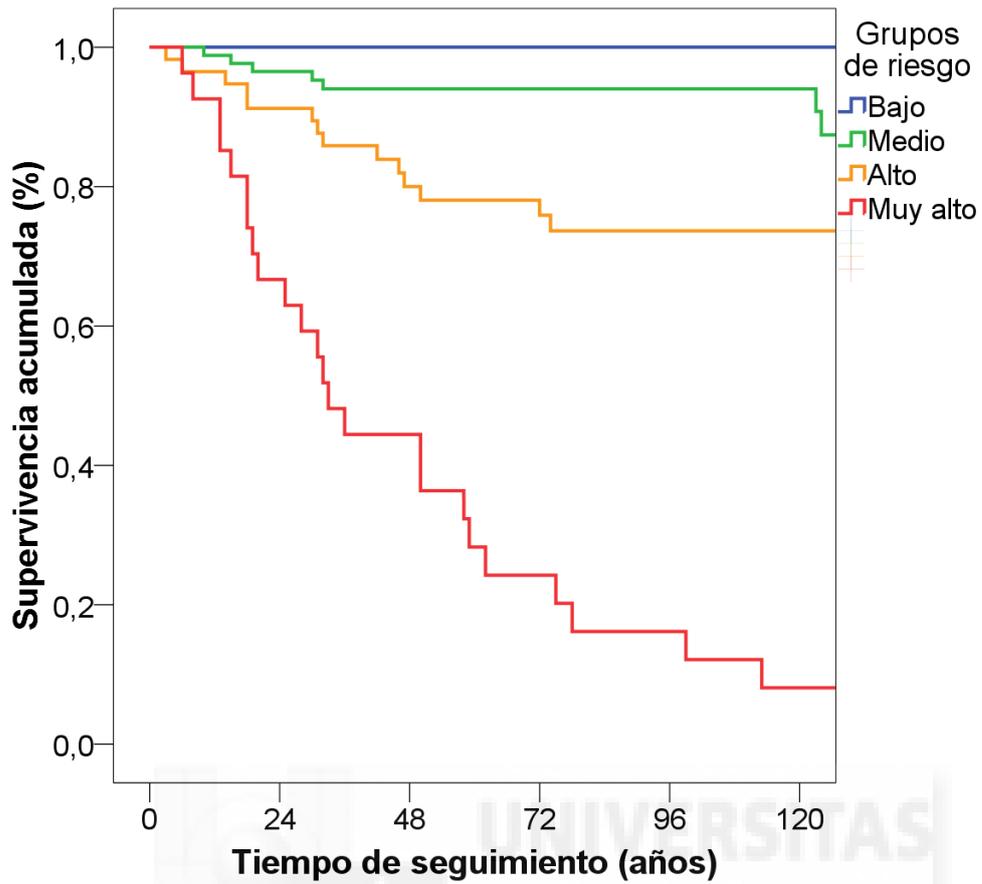


Figura 40. Resultados de modelo predictivo para SLE (recidiva) (análisis multivariante) (n=179).

**Tabla 23: Razones de riesgo ajustadas para supervivencia global (mortalidad) (n=179).**

<b>Variable</b>	<b>HR (IC 95%)</b>	<b>p</b>
Tamaño tumoral (por 1 mm)	1,01 (0,99-1,03)	0,237
Invasión linfática	2,66 (1,07-6,59)	0,034
Metástasis	3,86 (1,85-8,05)	<0,001

HR, hazard ratio; IC, intervalo de confianza.

Bondad de ajuste:  $X^2=40,74$   $p<0,001$ .

Estadístico C: 0,764 (error estándar: 0,052).

En la Tabla 23 observamos que por cada mm que aumenta el tumor, aumenta el riesgo de mortalidad en 1,01 veces. En este caso a pesar de que el p-valor es de 0,237, globalmente sí que es significativo ( $p<0,001$ ).

Por otra parte, las pacientes cuyos tumores que presentan invasión linfática, presentan un riesgo de 2,66 veces más de mortalidad que las pacientes que no lo presentan ( $p=0,034$ ).

En cuanto a los casos que presentan metástasis muestran un riesgo mayor de mortalidad, de hasta 3,86 veces más que aquellos casos que no presentan metástasis ( $p<0,001$ ).

**Tabla 24. Resultados de modelo predictivo para supervivencia global (mortalidad) (análisis multivariante (n=179)).**

Metástasis	Puntos	Tamaño tumoral (mm)	Puntos	Invasión linfática	Puntos
No	0	≤15	0	No	0
Sí	6	16-35	1	Sí	4
		≥36	2		

**Riesgo cada 2 años (%)**

Años	Suma de puntos			
	Bajo (<2)	Medio (2-4)	Alto (5-7)	Muy alto (≥8)
<b>2</b>	0,60-0,80	0,95-1,60	2,00-3,20	4,00-10,00
<b>4</b>	2,40-3,05	3,80-6,10	7,55-11,90	14,75-33,65
<b>6</b>	4,00-5,10	6,35-10,00	12,40-19,20	23,60-49,85
<b>8</b>	6,55-8,25	10,25-16,00	19,70-29,70	35,90-68,05
<b>10</b>	7,80-9,85	12,25-18,90	23,25-34,60	41,50-74,75

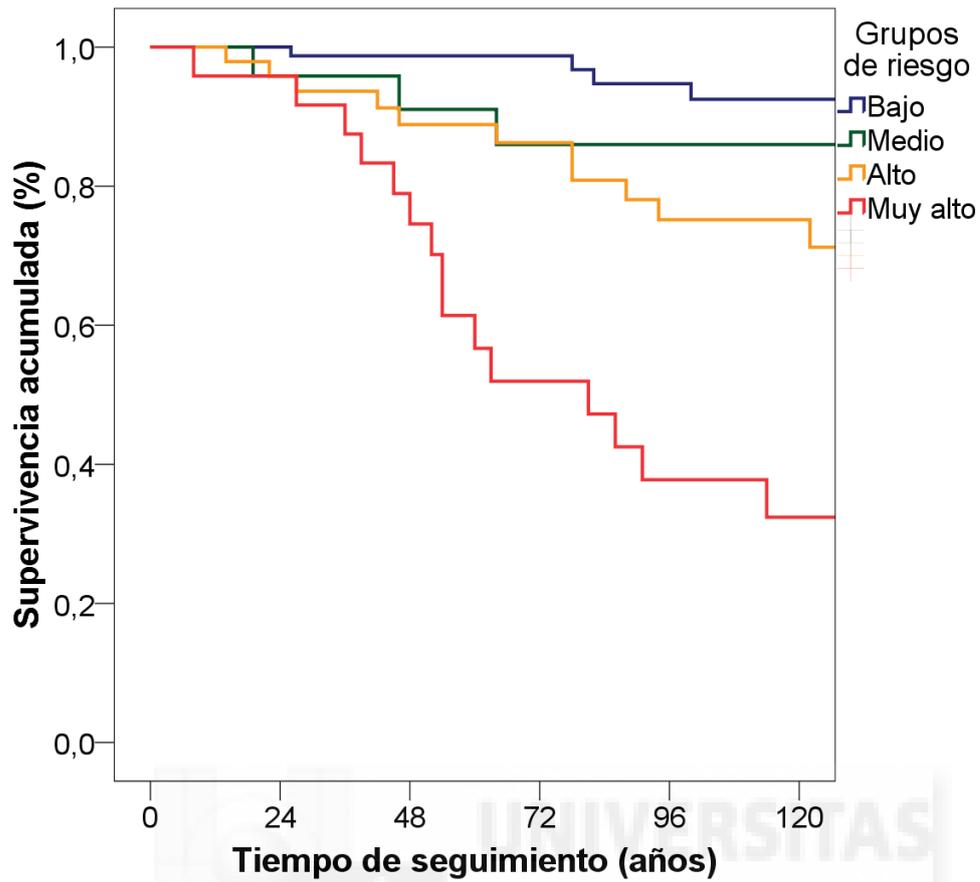


Figura 41. Resultados de modelo predictivo para supervivencia global (mortalidad) (análisis multivariante (n=179)).



## 5. DISCUSIÓN



## 5. DISCUSIÓN

Los casos diagnosticados de cáncer de mama en mujeres jóvenes suelen presentarse como tumores de características clínicas e histopatológicas concretas: mayor tamaño tumoral, menor positividad para RH, alto grado de malignidad, invasión linfática y mayor número de ganglios axilares afectos, respecto a los tumores de las pacientes de mayor edad.<sup>[13, 143, 144]</sup>

Teniendo en cuenta que el cáncer de mama se considera en la actualidad una enfermedad heterogénea constituida por una agrupación de subtipos tumorales con diferente expresión génica (Luminal A, Luminal B, HER2 y TN/Basal-like) que lleva asociada diferentes implicaciones pronósticas y terapéuticas, es el subtipo TN/Basal-like el de mayor incidencia entre las pacientes jóvenes y el que se asocia con un peor pronóstico.<sup>[143]</sup>

Además, se ha demostrado que existe una clara diferenciación biológica en la tumorigénesis del cáncer de mama entre pacientes jóvenes, ya que se ven afectadas vías oncogénicas distintas y a diferentes niveles, respecto a las alteraciones detectadas a nivel molecular en los tumores de pacientes mayores. Estos niveles moleculares son el objetivo de múltiples investigaciones por ser puntos sensibles para el diseño de diferentes dianas terapéuticas.<sup>[13, 20]</sup>

En el presente estudio se han incluido 250 casos de pacientes con 40 años o menores, no consecutivas, con diagnóstico de carcinoma infiltrante de mama, de los cuales un mayor porcentaje (71,6%) no recibieron neoadyuvancia y presentaron tumores de tipo histológico CDI, NOS y grado III.

De entre las pacientes que no recibieron neoadyuvancia (n=179), la mayoría presentaron tumores con tamaño menor de 20 mm, grado III, asociados a componente CDIS, sin afectación de ganglios axilares y que se diagnosticaron en estadios iniciales.

El inmunofenotipo más frecuente de toda la serie fue el Luminal B/HER2-, seguido del Luminal A y del TN/Basal, siendo el HER2 No Luminal y el TN/Basal los subgrupos que mostraron asociación significativa con tumores grado III. El inmunofenotipo HER2 No Luminal se asoció de forma significativa con la presencia de CDIS y la afectación de ganglios axilares.

En cuanto a la asociación de los diferentes inmunofenotipos con los componentes de la vía IGF1R, PTEN, pAkt y p-mTOR encontramos que ésta existe entre los inmunofenotipos Luminal B/HER2- y Luminal B/HER2+ y con la sobreexpresión de IGF1R. A diferencia de otros subtipos, como el TN/Basal en el que se observa una asociación significativa con la pérdida de PTEN.

Es destacable también la asociación significativa que se observa entre las pacientes cuyos tumores que sobreexpresan IGF1R con variables clínicas (>35 años) y con algunas variables morfológicas (tumores sin necrosis, con presencia de CDIS, con pérdida de expresión inmunohistoquímica de PTEN y con presencia de pAkt activado).

Los tumores con pérdida de PTEN se asocian con tumores de tipo CDI y grado III.

Los tumores con presencia de pAkt activado presentan asociación significativa con localización en mama derecha, ausencia de afectación de ganglios axilares y tumorectomía.

Los tumores con p-mTOR activado se asocian de forma significativa con tumores de pacientes > 35 años de edad, a las que se les ha realizado una mastectomía y que se diagnostican en estadios iniciales.

Por otra parte, existe un mayor porcentaje libre de enfermedad que es significativo entre pacientes de toda la serie (n=250), y en pacientes sin neoadyuvancia (n=179), a las que se les ha realizado una tumorectomía, presentan tamaño tumoral menor de 20 mm, sin invasión linfática, sin afectación de ganglios axilares y que se diagnostican en estadios iniciales. Y existe un mayor porcentaje de supervivencia global en pacientes con tumores sin necrosis y con CDIS.

Asimismo, existe un mayor riesgo de recidiva y mortalidad en pacientes que han recibido QT previa y presentan asociado al tumor invasión linfática, necrosis y afectación de ganglios axilares, todos ellos reconocidos factores clásicos de mal pronóstico.

Los factores pronósticos independientes de nuestra serie, en cuanto a la recidiva son la invasión linfática, el tipo histológico y la presencia de metástasis.

En cuanto a la mortalidad, encontramos que son factores pronósticos independientes el tamaño tumoral, la invasión linfática y la presencia de metástasis.

Nuestros resultados muestran, por tanto, que las variables clínico-morfológicas clásicas son las que marcan el pronóstico en el subgrupo de pacientes jóvenes.

También podemos señalar que hemos encontrado asociación entre los diferentes inmunofenotipos y la expresión inmunohistoquímica de algunos de los diferentes componentes de la vía (IGF1R y PTEN), pero no así significación en su valor pronóstico, ni de recidiva ni de mortalidad, entre los diferentes inmunofenotipos.

### **5.1 Variables clínicas y morfológicas.**

Respecto al tratamiento neoadyuvante, se ha de tener en cuenta que la mayoría de pacientes jóvenes serían candidatas,<sup>[27]</sup> aunque existen ensayos clínicos randomizados de grandes grupos de pacientes que comparan la QTA con la neoadyuvancia, demostrando que no existen diferencias en el pronóstico de la enfermedad.<sup>[139]</sup> Sin embargo, estos estudios también apuntan que pacientes con estadios clínicos localmente avanzados a las que se les da tratamiento neoadyuvante, pueden beneficiarse posteriormente de la opción de cirugía conservadora, tanto si la respuesta al tratamiento ha sido parcial o total, si se compara con aquellas pacientes a las que se les da solamente QTA.

Por otro lado, se debe tener presente que la neoadyuvancia suele ofrecer una oportunidad para determinar "in vivo" si el tratamiento está siendo efectivo o no y que puede, en caso de que el resultado sea negativo, abrir paso a otras líneas de tratamiento alternativas, siempre que esté indicado. En definitiva, la principal razón de ofrecer quimioterapia neoadyuvante es el alto riesgo de recidiva local que ocurre en las pacientes jóvenes.<sup>[21, 22, 145]</sup>

Sin embargo, y a pesar de lo expuesto anteriormente, en 148 de los 179 casos de las pacientes de nuestro estudio que no recibieron neoadyuvancia (59,2%) se realizó mastectomía y en 102 casos tumorectomía (40,8%). Esto podría estar relacionado con el tamaño tumoral y con la afectación ganglionar al diagnóstico.

En nuestra serie, el 43% de casos tenían afectación ganglionar axilar en el momento del diagnóstico.

Respecto al tamaño tumoral entre nuestras pacientes, éste fue menor de 20 mm en la mitad de casos (50,3%), seguido de tumores que medían entre 20 y 50 mm. La mediana del tamaño tumoral fue de 20 mm, por lo que sí podemos afirmar que son

tumores de tamaño considerablemente mayor del que se detecta en mujeres de mayor edad.<sup>[15, 16]</sup>

Una explicación al alto porcentaje de pacientes sin neoadyuvancia en nuestro estudio, podría también deberse a que la mayoría de las pacientes son diagnosticadas en Estadio I y II (38,5% y 40,8%, respectivamente), siendo un resultado muy similar al observado por otros autores.<sup>[18]</sup> A pesar de ello, en nuestra serie no hemos podido demostrar que los tumores de este grupo de pacientes jóvenes tengan mayor porcentaje de invasión linfática, afectación ganglionar axilar ni mayor presencia de necrosis tumoral, como ha sido descrito en estudios previos.<sup>[143, 144]</sup>

Por otra parte, el 62,8% de nuestros casos fueron tumores de alto grado de malignidad, lo cual es una característica histopatológica común en la literatura científica relacionada con cáncer de mama en mujeres jóvenes, lo que también se observa entre las pacientes jóvenes que no recibieron neoadyuvancia de nuestro estudio (66,5%).<sup>[13, 18]</sup>

Además, nuestro grupo de pacientes mostró una mayor presencia de CDIS asociado al carcinoma infiltrante (55,3%).

## **5.2 Variables inmunohistoquímicas.**

Aunque estudios previos han demostrado mayor frecuencia de tumores que no expresan RH y sí HER2 en tumores de pacientes jóvenes,<sup>[146]</sup> en nuestros resultados encontramos un mayor porcentaje de expresión de RE, RP y un menor porcentaje de expresión de HER2. Además, hemos podido comprobar que la mayoría de los tumores expresan índices de proliferación altos (Ki67  $\geq$ 14%). Todo ello da como resultado, en la distribución por inmunofenotipos de nuestra serie, un mayor número de pacientes con tumores del subtipo Luminal B-like/HER2- (31,6%). Este resultado ha sido descrito también en algunos estudios recientes,<sup>[18, 66, 143]</sup> lo que difiere de lo tradicionalmente publicado en la literatura científica, en la que se describía el inmunofenotipo TN/Basal como el subgrupo más representativo entre las mujeres jóvenes.<sup>[61, 67]</sup>

Carvalho et al.,<sup>[67]</sup> pudo demostrar que el 26% de los casos de mujeres jóvenes con cáncer de mama presentaron inmunofenotipo Basal-like, definido como un tumor TN asociado a positividad para EGFR y/o CK5/6. En nuestra serie, el 19,6% de casos

correspondía al inmunofenotipo TN. Además, algunos de los tumores de este subtipo mostraron una clara expresión de anticuerpos de tipo Basal-like, EGFR y/o CK5/6, positivos (20% y 27,5%, respectivamente), aunque no se haya podido comprobar en todos los casos.

Respecto al inmunofenotipo Luminal A, encontramos que es el segundo subtipo en frecuencia (27,2%) y que el subtipo Luminal B-like/HER2+ es también más frecuente que el HER2 No Luminal. Estos resultados confirman el cambio que se viene sugiriendo en algunos estudios, respecto a la distribución de inmunofenotipos entre pacientes jóvenes.<sup>[66]</sup>

### **5.3 Inmunofenotipos y variables clínicas y morfológicas.**

La mastectomía fue la intervención quirúrgica realizada con más frecuencia entre las pacientes cuyos tumores fueron categorizados dentro del subtipo HER2 No Luminal, seguidas de pacientes con tumores de subtipo Luminal B-like/HER2+ y de subtipo Luminal B-like/HER2-, predominando también la mastectomía en los demás subtipos.

Aunque se ha descrito que uno de los factores de riesgo más importantes para la recidiva local después de cirugía conservadora es la edad (>35 años),<sup>[147]</sup> en hasta nueve veces más riesgo, ningún estudio ha podido demostrar hasta la fecha que la cirugía conservadora en mujeres jóvenes tenga un impacto negativo en la supervivencia.<sup>[148]</sup> Es más, se ha confirmado que en el caso del subtipo TN, no parece tener un riesgo aumentado de recidiva local a los 5 años y, por tanto, estas pacientes pueden ser candidatas a cirugía conservadora,<sup>[149]</sup> como ocurre con los casos TN/Basal de nuestro estudio, donde se realizó más frecuente la tumorectomía, al igual que sucede entre las pacientes del subtipo Luminal A.

Llama la atención la escasa asociación de las pacientes jóvenes de nuestra serie con los antecedentes familiares, siendo las pacientes con tumores de subtipo Luminal B-like/HER2- las que se asociaron con más frecuencia a éstos (19%), seguido por pacientes con tumores de subtipo TN/Basal (18,4%). Estos resultados son similares a los obtenidos por Keegan et al.<sup>[143]</sup> En su estudio se hace referencia a que el riesgo de desarrollar tumores del subtipo TN/Basal es bajo, a pesar de la tendencia a considerar

la Historia Familiar como el único factor de riesgo asociado a la aparición de tumores TN, y de que ésta se asocie positivamente con todos los subtipos.<sup>[150]</sup>

Respecto a las variables morfológicas analizadas entre las pacientes jóvenes sin neoadyuvancia (n=179), cabe destacar las diferencias estadísticamente significativas respecto al tamaño tumoral entre los diferentes subtipos. Los tumores del subtipo TN/Basal tienen una mediana de tamaño tumoral de 19,50 mm, mientras que en los tumores HER2 No Luminal la mediana es de 24 mm, por lo tanto podríamos afirmar que los tumores de algunos de los subtipos más agresivos, como HER2 No Luminal, tienen mayor tamaño entre pacientes sin neoadyuvancia.

Por otra parte, se observa alto grado de malignidad en el 100% de los casos HER2 No Luminal y en el 90% de los casos TN/Basal. En ninguno de estos dos grupos se encuentran tumores de bajo grado, siendo estos resultados similares a los descritos por otros autores.<sup>[18, 47]</sup>

Otra variable morfológica a destacar es la mayor presencia de CDIS asociado al componente infiltrante en los subtipos Luminales, siendo mayor en el subtipo Luminal B-like/HER2-.<sup>[151]</sup> Existen algunos autores que apoyan la teoría de que el CDIS precede a la aparición del componente infiltrante, aunque no en todos los subtipos de cáncer de mama, por lo que las posibilidades de progresión tumoral difieren entre unos y otros.<sup>[152, 153]</sup> Kluber et al., sugiere que aunque el fenotipo Luminal A es el que con más frecuencia asocia CDIS y carcinoma infiltrante es, sin embargo, el subtipo Luminal B-like/HER2+ el que muestra una progresión tumoral más rápida entre los subtipos Luminales, después del subtipo TN. Por otra parte, Liao et al.,<sup>[154]</sup> propone que el subtipo HER2 es el que presenta un componente de CDIS más extenso junto al componente infiltrante y apoya la hipótesis de que la sobreexpresión de HER2 o la amplificación del gen está implicada en la transición del CDIS a infiltrante.<sup>[154]</sup> Estos resultados no han sido confirmados en el grupo de mujeres jóvenes, tan sólo los descritos por VandenBussche et al.<sup>[151]</sup> Aunque también en nuestra serie observamos que un alto porcentaje de pacientes con tumores de subtipo HER2 No Luminal (68,8%) también presenta asociación con CDIS.

Los tumores de inmunofenotipo HER2 No Luminal y Luminal B-like/HER2+ mostraron una tendencia a mayor invasión linfática y a la positividad ganglionar axilar, lo cual es esperable al ser tumores de fenotipo más agresivo.

Por otra parte, el 85% de las pacientes con tumores de subtipo TN se diagnosticaron en nuestra serie en estadio inicial, mientras en el subtipo Luminal B/HER2-, el 27,6% fue el que con más frecuencia se diagnosticó en estadio avanzado.

#### **5.4 Inmunofenotipos y variables inmunohistoquímicas.**

El análisis de los diferentes componentes de la vía IGF1R, PTEN, pAkt y p-mTOR ha sido realizado utilizando los cuartiles de expresión de cada variable.

IGF1R es un receptor homodimérico tirosin-quinasa activado por IGF1/2, ligandos de unión, cuyo resultado es el bloqueo del crecimiento tumoral y la apoptosis. Este receptor está presente en tumores de mama y en otros tumores. Recientemente, Law et al., ha podido demostrar que IGF1R activado puede estar sobreexpresado en todos los subtipos de cáncer de mama, a pesar del status de RE y/o HER2.<sup>[83]</sup> Pero hasta donde hemos podido comprobar, no existe un sistema de valoración inmunohistoquímica universalmente aceptado respecto a la intensidad y al patrón de expresión de IGF1R.<sup>[155]</sup> La tinción de membrana está siempre presente cuando está sobreexpresado, pero puede haber casos en los que aparezca tinción citoplasmática acompañante, como hemos observado en algunos casos de nuestra serie. La tinción citoplasmática única se considera negativa, no indica sobreexpresión. Para conseguir un índice de valoración hemos utilizado el score IRS (intensidad de la tinción multiplicado por el porcentaje de expresión inmunohistoquímica), como utilizan la mayoría de autores en la literatura.<sup>[112, 155]</sup> Sin embargo, otros interpretan la tinción inmunohistoquímica de IGF1R de manera similar al sistema de valoración descrito para la expresión de HER2 (Hercep Test)<sup>TM</sup>.<sup>[156]</sup>

En nuestro estudio, la variable Inmunohistoquímica IGF1R muestra diferencias de expresión que resultan estadísticamente significativas entre los diferentes subtipos. Observamos un mayor porcentaje de sobreexpresión en los subtipos Luminales, siendo los Luminales B-like/HER2+ los que con mayor frecuencia sobreexpresan IGF1R (42,9%).

Por otra parte, la no sobreexpresión de IGF1R se observa con más frecuencia (95% de casos) en el subtipo TN/Basal. Estos resultados son bastante similares a los obtenidos en algunos estudios previos respecto al subgrupo Luminal,<sup>[82, 156, 157]</sup> en los

que IGF1R está frecuentemente sobreexpresado en los subtipos Luminal A/B y esta sobreexpresión está relacionada también con la expresión de RE.<sup>[156]</sup> Pero los resultados de algunos de estos estudios muestran también una expresión de IGF1R heterogénea en el subgrupo HER2 y disminuida en el subgrupo TN/Basal.

Otros autores han demostrado la mayor expresión de IGF1R en tumores RE negativos,<sup>[86]</sup> y cómo en éstos tumores puede activarse pAkt.<sup>[88]</sup> A este respecto, Esparis-Ogando et al.,<sup>[158]</sup> han descrito recientemente que tras el tratamiento con antagonistas de IGF1R se observa una disminución de la expresión de pAkt y un aumento de los niveles de p27, lo cual puede ser un futuro punto de conexión entre estas dos vías moleculares.

Por otro lado, los antagonistas de IGF1R han demostrado interactuar con las vías de HER2 y con RE, siendo esta interacción bidireccional y pudiendo ocurrir entre varios miembros de los receptores de la familia HER2.<sup>[159]</sup> Este "cross-talk" entre IGF1R con RE y HER2 sugiere también que IGF1R puede ser una diana de tratamiento específica para los subtipos Luminales y HER2. Algunos estudios "in vitro" apoyan estas presunciones, ya que se ha observado un efecto sinérgico en el receptor IGF1R con tratamiento antiestrógeno.<sup>[160]</sup>

Un hecho bastante demostrado es el papel que juega también IGF1R en los mecanismos de resistencia al tratamiento endocrino. Luego, en las pacientes con tumores de subtipo Luminal a las que se les trataría por protocolo con tratamiento antihormonal, sería importante estudiar la expresión en el tumor de IGF1R, ya que este "status" interferiría en la respuesta al tratamiento.<sup>[87, 91-94]</sup>

Respecto al subtipo HER2, existen evidencias de que la activación de IGF1R puede dar lugar a mecanismos de resistencia contra los tratamientos que están dirigidos a la familia de receptores EGFR, incluyendo HER2/neu.<sup>[112, 161]</sup>

La pérdida completa del status de PTEN se ha encontrado significativamente asociada a la negatividad de la expresión de RE y, más concretamente, al subtipo TN/Basal en diferentes estudios.<sup>[108, 162, 163]</sup> Nuestros resultados son similares a los obtenidos en éstos, ya que el subtipo TN/Basal está asociado con más frecuencia al cuartil 1 correspondiente al de pérdida de expresión del anticuerpo PTEN, por lo que podemos afirmar que los tumores de fenotipo TN/Basal suelen tener una pérdida de

expresión de PTEN, lo que sugiere un papel importante de la alteración de este gen supresor en la patogenia de un subgrupo de tumores con este fenotipo agresivo.

También hemos podido comprobar que no existe un criterio unitario para la valoración de la expresión inmunohistoquímica de PTEN. Algunos autores valoran la intensidad de la expresión citoplasmática de la proteína PTEN de forma semicuantitativa, valorando el porcentaje y multiplicándolo por la intensidad de la tinción citoplasmática,<sup>[108]</sup> considerando pérdida de expresión el valor 0. Sin embargo, en otros estudios esta valoración considera la pérdida de expresión de PTEN cuando la expresión de este marcador es menor de 75 en la valoración<sup>[112]</sup> o menor de 50%,<sup>[110, 111]</sup> por lo que podríamos considerar que el valor del percentil 25 de nuestra serie, es equivalente a la pérdida de expresión de PTEN en nuestro estudio.

Una de las funciones bien conocidas de PTEN es la regulación negativa de la vía PI3K a través de la defosforilación del fosfoinositol (PI) capaz de activar Akt (PI[3–5]P3 a PI[4,5]P2), y además, se admite que la pérdida o baja expresión de PTEN es la responsable de la activación de Akt en los tumores de fenotipo TN/Basal.<sup>[163]</sup> En nuestra serie, el subtipo TN/Basal muestra, efectivamente, una mayor expresión de pAkt (pAkt activado en el 35% de casos). Sin embargo, la activación de pAkt no es tan frecuente en los subtipos HER2 ni en los Luminales.

Por otra parte, la pérdida de expresión de PTEN tiene como consecuencia la activación de otras quinasas, entre ellas, mTOR, la cual promueve en condiciones fisiológicas la progresión del ciclo celular, la proliferación y supervivencia celular y juega un papel muy importante en la resistencia al tratamiento endocrino en tumores de mama que expresan RH. Nuestros resultados muestran una menor expresión de mTOR (p-mTOR no activado) en los subtipos Luminal B/HER2+ (85,7%) y TN/Basal (72,5%) y una mayor expresión (p-mTOR activado) en los subtipos HER2 No Luminal (43,8%), Luminal A (31,8%) y Luminal Blike/HER2- (29,3%). Los subtipos Luminal Blike/HER2+ y TN/Basal son los que muestran menor activación de p-mTOR.

Respecto a la asociación entre las variables morfológicas y la expresión inmunohistoquímica de los diferentes componentes de la vía entre las pacientes que no recibieron neoadyuvancia (n=179), encontramos que los tumores que medían entre 20 y 50 mm tendían a sobreexpresar IGF1R. Sin embargo, no se encontró ninguna

asociación entre el tamaño tumoral y otras variables inmunohistoquímicas de la vía, ni siquiera cuando esta variable se agrupó en dos categorías.

En cuanto al tipo histológico encontramos que sí habían diferencias estadísticamente significativas entre los tumores de tipo CDI, NOS y los otros tipos tumorales, puesto que el 87,2% de los CDI, NOS mostró pérdida de expresión de PTEN, mientras que sólo el 12,8% de los otros tipos tumorales mostraron pérdida de expresión de PTEN.

Es destacable también que el 82,1% de los casos con pérdida de expresión de PTEN fueron tumores de grado III, mientras que sólo el 5,1% de los tumores grado I mostraron pérdida de PTEN.

Respecto a la presencia de necrosis tumoral encontramos que los tumores de las pacientes de nuestra serie mostraron una asociación entre la sobreexpresión IGF1R y presencia de ésta (59,6%) y que existen diferencias significativas entre aquellos tumores que no la presentaron (40,4%). Asimismo, existen diferencias entre aquellos tumores que no sobreexpresan IGF1R y no están asociados a necrosis (62,1%) y entre los que sí se asocian a necrosis (37,9%).

Por otra parte, observamos una tendencia a la significación entre tumores que presentan p-mTOR activado y no muestran necrosis y aquellos que muestran p-mTOR activado y presentan necrosis.

## **5.5 Pronóstico. Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE)/riesgo de recidiva y variables clínicas, morfológicas e inmunohistoquímicas.**

Nuestros resultados muestran que la SLE en las pacientes a las que se les realiza una intervención quirúrgica del tipo tumorectomía es mayor que en aquellas a las que se les realiza mastectomía. Algunos autores consideran que debido a la relativa baja incidencia y prevalencia de cáncer de mama en mujeres jóvenes, es difícil saber si la evidencia de los estudios randomizados y controlados que muestran la misma supervivencia entre pacientes mastectomizadas y a las que se realiza sólo tumorectomía es aplicable a la población joven. En la actualidad no existen suficientes estudios que hayan demostrado que la tumorectomía tiene menor supervivencia que la mastectomía. Por tanto, la cirugía conservadora no está contraindicada en mujeres

jóvenes ( $\leq 40$  años). Sin embargo, estas pacientes deberían ser advertidas de que no existen datos que prueben contundentemente que la tumorectomía tenga una supervivencia equivalente a la mastectomía en su grupo de edad.<sup>[164]</sup>

Otros autores concluyen que en las pacientes jóvenes con cáncer de mama, en estadios iniciales, el control del tumor es más difícil después de la cirugía conservadora que de la mastectomía. Además, afirman que la QTA mejora significativamente el control local del tumor si se aplica junto a la tumorectomía, por lo que la QTA debería ser considerada en la mayoría de pacientes menores de 40 años a las que se les realice una tumorectomía.<sup>[22]</sup>

Por otra parte, el tiempo de seguimiento recomendado en este subgrupo de pacientes debería ser mayor del habitual, ya que se ha demostrado que incluso con tratamiento sistémico, existe un riesgo anual de recidiva del 1% tras 15 años después de haber finalizado el mismo.<sup>[22]</sup>

Las pacientes de nuestro estudio que no recibieron neoadyuvancia mostraron mayor SLE que las que sí la recibieron. Como se comentaba anteriormente, esto puede ser debido a que a las pacientes con estadios avanzados de la enfermedad sean a las que se les haya ofrecido el tratamiento neoadyuvante. Esta opción terapéutica se ofrece con dos objetivos, el primero intentar reducir el tamaño tumoral para posteriormente poder intervenir quirúrgicamente y, el segundo, para comprobar "in vivo" si el tumor responde al tratamiento de quimioterapia.<sup>[21, 145]</sup>

Respecto al tamaño tumoral, las pacientes que presentaban tumores con tamaño igual o menor de 20 mm tenían mejor SLE que las pacientes con mayor tamaño tumoral. El tamaño tumoral es, después del estado axilar, el factor pronóstico clásico y más importante para establecer el pronóstico de las pacientes.<sup>[165]</sup> Ya fue adoptado por la American Joint Committee on Cancer (AJCC) y, aunque fue controvertido al inicio cómo medirlo, se acordó que siempre se debe medir el tamaño microscópico del componente infiltrante.<sup>[166]</sup> Es necesario señalar que el resultado obtenido no es el que cabría esperar en este grupo de pacientes jóvenes, según los resultados encontrados en la literatura científica, puesto que algunos autores confirman que estas pacientes son diagnosticadas cuando el tumor alcanza mayor tamaño y, por tanto, tendrán peor pronóstico.<sup>[13]</sup>

La invasión linfática es también otra variable morfológica que presenta diferencias respecto a la SLE, ya que las pacientes que presentaban signos de invasión linfovascular mostraron menor supervivencia, de acuerdo con los resultados de otros autores.<sup>[167]</sup>

La presencia de necrosis asociada al tumor es un factor de mal pronóstico en nuestra serie, ya que las pacientes en cuyos tumores se identifica tienen peor SLE. En la literatura existen estudios que relacionan la presencia de necrosis asociada a tumores en diferentes órganos sólidos (mama, riñón, pulmón, tracto gastrointestinal) con las supervivencia, siendo factor pronóstico independiente y estando relacionado con la respuesta inmune de cada paciente, tanto a nivel local como a nivel sistémico.<sup>[168]</sup> En los tumores de mama se ha relacionado la presencia de necrosis con recidivas precoces y peor supervivencia.<sup>[169]</sup> Existen también algunos estudios que describen un subtipo histopatológico específico de CDI, el carcinoma necrotizante central, que está asociado al subtipo basal-like y que muestra un comportamiento más agresivo.<sup>[170, 171]</sup>

En nuestros resultados se observó una mejor SLE entre las pacientes que presentaron CDIS asociado, de acuerdo con estudios previos que sugieren que su presencia es un factor de buen pronóstico independiente.<sup>[172]</sup> Sin embargo, otros autores no lo han podido demostrar.<sup>[152]</sup> En relación a estos hallazgos, otros autores sí que han comprobado que la menor extensión del componente in situ asociado al componente infiltrante, se correlaciona con una menor actividad proliferativa y a un menor número de ganglios linfáticos axilares afectados. Por lo que concluyen que los tumores con ambos componentes tuvieron una tendencia de comportamiento menos agresiva. También sugieren que son claras las diferencias biológicas entre los dos grupos y que la carcinogénesis de los carcinomas infiltrantes puros puede favorecer el fenotipo basaloide que está asociado a múltiples defectos en genes supresores tumorales como *P53* y *BRCA1/2*.<sup>[173]</sup>

Respecto al estadio, encontramos que las pacientes en estadios avanzados tienen peor SLE, mientras que las que presentan estadios iniciales tienen mejor SLE. Estos resultados son similares a los encontrados en la literatura científica. Lo cual llama la atención, a pesar del escaso número de pacientes de nuestra serie diagnosticadas en estadio IV.<sup>[9]</sup>

Ninguna de las pacientes cuyos tumores mostraron asociación con alguno de los componentes de la vía IGF1R, PTEN/pAkt/p-mTOR estudiados por IHQ, mostró diferencias significativas en el tiempo libre de enfermedad entre las pacientes estudiadas. Y tampoco se encontraron diferencias en cuanto a la recidiva entre los diferentes inmunofenotipos.

Como demuestran algunos de los estudios que tienen en cuenta el pronóstico de las pacientes jóvenes, el riesgo de recidiva a los 5 años y en la mortalidad está aumentado en pacientes menores de 35 años respecto a las de más de 35 años, a pesar de fueron tumores de pequeño tamaño. Probablemente esto fue debido a que no respondieron al tratamiento.<sup>[21]</sup> Nuestro estudio de cálculo de razones de riesgo respecto a la recidiva no mostró estos riesgos (ni recidiva ni mortalidad) aumentados en cuanto a los subgrupos de edad.

Sin embargo, sí que se observa un riesgo mayor de recidiva entre las pacientes que recibieron neoadyuvancia, se les realizó mastectomía, tenían tumores de mayor tamaño, de grado III, con presencia de invasión linfática, afectación de ganglios axilares y diagnóstico en estadios avanzados. Algunos de estos resultados se encuentran también descritos por otros autores en estudios previos.<sup>[169]</sup>

En el estudio multivariante respecto al seguimiento (recidiva), encontramos que es la invasión linfática, uno de los factores histopatológicos clásicos, el que actúa como factor pronóstico independiente en nuestro estudio, al igual que en otros que estudian el cáncer de mama en mujeres sin que se estratifique por edades, en los que también aparece este factor.<sup>[169]</sup> Los otros dos factores pronósticos independientes de nuestro estudio, la presencia de metástasis y el tipo histológico, también han sido recogidos por otros autores.<sup>[174]</sup>

Por otra parte, no se han encontrado resultados en nuestra serie que demuestren que alguno de los inmunofenotipos y/o de los componentes de la vía molecular estudiada, tengan significado pronóstico respecto a la recidiva, siendo por tanto, y principalmente, algunos de los factores morfológicos clásicos los que determinan el riesgo de recidiva.

## **5.6 Pronóstico. Supervivencia Global (SG)/riesgo de mortalidad y variables clínicas, morfológicas e inmunohistoquímicas.**

En cuanto al análisis de la SG, nuestras pacientes con tumores sin necrosis, sin invasión linfática, con presencia de CDIS y sin afectación de ganglios axilares, vivían más tiempo, de acuerdo con otros resultados encontrados.

Además, se observa una tendencia a la significación respecto a las pacientes que presentaban tumores con un tamaño mayor a 20 mm, comparado con aquellas en las que era menor a 20 mm.

Con los resultados de nuestra serie también hemos podido demostrar que existe un mayor riesgo de mortalidad entre pacientes que han recibido quimioterapia previa, se les ha realizado mastectomía, en el momento del diagnóstico presentaron mayor tamaño tumoral, invasión linfática, afectación de ganglios axilares y se diagnosticaron en estadios avanzados.

El tamaño tumoral, la invasión linfática y la presencia de metástasis tuvieron un valor pronóstico independiente en cuanto a predecir el riesgo de muerte de nuestras pacientes, conforme se ha venido describiendo en la literatura científica.

## 5.7 Limitaciones y fortalezas.

Una vez presentados y discutidos los resultados obtenidos es imprescindible analizar y determinar las principales limitaciones y fortalezas que hemos tenido en la realización de nuestro trabajo.

En primer lugar, cabe decir que la muestra es una serie retrospectiva de casos de pacientes pertenecientes a dos centros hospitalarios y que no en todos ellos se han podido recuperar los cortes representativos del tumor para poder completar el estudio inmunohistoquímico de los tumores de subtipo TN, ya que no todos han podido ser clasificados como TN/Basal, por no haber podido realizar el estudio inmunohistoquímico con CK5/6 y con EGFR. Por ello, la información respecto al porcentaje de tumores de este subtipo es incompleta, aunque tampoco relevante ya que el análisis se hizo englobándolo con los TN.

Por otra parte, hemos observado que en la literatura científica existen diferentes métodos de valoración IHQ de los diferentes componentes de la vía IGF1R, PTEN/pAkt/p-mTOR, ya que no existe consenso al respecto ni un método estándar de valoración, como es el caso de HER2.

También hemos encontrado pocos casos de pacientes jóvenes con antecedentes familiares, debido probablemente a que se trate de una cohorte pequeña.

Por último, es muy probable que las diferentes pautas de QTA hayan podido influir en la evolución de las pacientes y que por ello, no hayamos encontrado diferencias pronósticas entre los inmunofenotipos y tampoco entre éstos y los biomarcadores de la vía estudiada, por lo que se requieren más estudios futuros que tengan en cuenta la pautas de tratamiento utilizadas.

A pesar de ello, hemos podido realizar un estudio estadístico amplio y completo, ya que la potencia estadística del mismo es buena. Tras haber realizado el análisis multivariante, se ha obtenido un sistema de puntos para poder determinar el pronóstico de las pacientes con la mayoría de las variables del estudio univariante que resultaron significativas.



## 5.8 Implicaciones para la práctica clínica.

Nuestros resultados demuestran que algunos de los factores morfológicos clásicos, como la presencia de invasión linfática, el tamaño tumoral y el tipo histológico siguen siendo imprescindibles para determinar el pronóstico de la enfermedad del cáncer de mama, incluso entre las pacientes más jóvenes. Por lo tanto, su valoración en la rutina debería seguir incluyéndose en el estudio básico de las piezas quirúrgicas de mama, formando parte del informe de Patología. Además de que también puedan realizarse estudios moleculares complementarios ulteriores en el tumor que apoyen y confirmen el pronóstico de la enfermedad en cada paciente.

A pesar de que hemos encontrado asociación entre alguno de los inmunofenotipos y la sobreexpresión o pérdida IHQ de alguno de los componentes de la vía IGF1R, PTEN/Akt/p-mTOR estudiada, lo que demuestra la relación de cada tipo tumoral con estos marcadores y con la alteración en las diferentes vías intracelulares, no hemos podido demostrar el valor pronóstico de estos marcadores en el subgrupo de pacientes jóvenes, por lo que sería necesario la realización de futuras investigaciones con un número más elevado de pacientes jóvenes con cáncer de mama para poder confirmar estas mismas asociaciones y, sobre todo, determinar el o los factores pronósticos claves de la vía molecular que sirvieran como posibles dianas terapéuticas.





## **6. CONCLUSIONES**



## 6. CONCLUSIONES

1. El subtipo Luminal B-like/HER2- es el más frecuente en nuestra serie, seguido del subtipo Luminal A, TN/Basal, Luminal B-like/HER2+ y HER2 No Luminal.
2. La mastectomía fue la intervención quirúrgica realizada con más frecuencia entre las pacientes cuyos tumores fueron del subtipo HER2 No Luminal, seguidas del subtipo Luminal B-like/HER2+. Existe escasa asociación con los antecedentes familiares, siendo el subtipo Luminal B-like/HER2- el que se asocia con más frecuencia.
3. Las pacientes con tumores del subtipo TN/Basal son las que tienen tumores de menor tamaño en nuestra serie. El 100% de los tumores de subtipo HER2 No Luminal y el 90% de los TN/Basal son de grado III. Se identifica asociación de CDIS con el componente infiltrante en los subtipos Luminales, siendo mayor en el subtipo Luminal B-like/HER2-.
4. Existe alteración de la expresión IHQ de alguno de los componentes de la vía IGF1R, PTEN/Akt/mTOR entre las pacientes jóvenes. La sobreexpresión de IGF1R en el subtipo Luminal B-like/HER2+ y la pérdida de expresión de PTEN en el subtipo TN/Basal apoya que la alteración de esta vía está relacionada con la patogenia de estos subtipos moleculares, y a su vez, debería considerarse su potencial relevancia como diana terapéutica en un futuro próximo.
5. Las pacientes que no recibieron neoadyuvancia, a las que se les realizó tumorectomía, tenían tumores con tamaño menor a 20 mm, sin invasión linfática y sin necrosis, con CDIS asociado y estadio inicial al diagnóstico, mostraron una mayor SLE. Son factores pronósticos independientes de recidiva el tipo histológico tumoral, la presencia de invasión linfática y de metástasis.
6. Las pacientes que no recibieron neoadyuvancia, a las que se les realizó tumorectomía, sin invasión linfática y sin necrosis, con CDIS asociado y estadio inicial al diagnóstico, mostraron una mayor SG. Son factores pronósticos independientes de SG el tamaño tumoral, la presencia de invasión linfática y de metástasis.





## **7. BIBLIOGRAFÍA**

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013 Apr;49(6):1374-403.
- [2] Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010 Dec 15;127(12):2893-917.
- [3] Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):69-90.
- [4] Stuckey A. Breast cancer: epidemiology and risk factors. *Clin Obstet Gynecol*. 2011 Mar;54(1):96-102.
- [5] Hulka BS, Moorman PG. Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas*. 2008 Sep-Oct;61(1-2):203-13; discussion 13.
- [6] Perry N, Broeders M, de Wolf C, Tornberg S, Holland R, von Karsa L. European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis. Fourth edition--summary document. *Ann Oncol*. 2008 Apr;19(4):614-22.
- [7] Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet*. 2001 Oct 27;358(9291):1389-99.
- [8] Fackenthal JD, Olopade OI. Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. *Nat Rev Cancer*. 2007 Dec;7(12):937-48.
- [9] Sariego J. Breast cancer in the young patient. *Am Surg*. 2010 Dec;76(12):1397-400.
- [10] Bleyer A, Barr R. Cancer in young adults 20 to 39 years of age: overview. *Semin Oncol*. 2009 Jun;36(3):194-206.
- [11] Keegan TH, Press DJ, Tao L, DeRouen MC, Kurian AW, Clarke CA, et al. Impact of breast cancer subtypes on 3-year survival among adolescent and young adult women. *Breast Cancer Res*. 2013;15(5):R95.
- [12] Love RR, Duc NB, Dinh NV, Quy TT, Xin Y, Havighurst TC. Young age as an adverse prognostic factor in premenopausal women with operable breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 2002 Jan;2(4):294-8.

- [13] Anders CK, Fan C, Parker JS, Carey LA, Blackwell KL, Klauber-DeMore N, et al. Breast carcinomas arising at a young age: unique biology or a surrogate for aggressive intrinsic subtypes? *J Clin Oncol*. 2011 Jan 1;29(1):e18-20.
- [14] Kroman N, Jensen MB, Wohlfahrt J, Mouridsen HT, Andersen PK, Melbye M. Factors influencing the effect of age on prognosis in breast cancer: population based study. *Bmj*. 2000 Feb 19;320(7233):474-8.
- [15] Gabriel CA, Domchek SM. Breast cancer in young women. *Breast Cancer Res*. 2010;12(5):212.
- [16] Pollan M. Epidemiology of breast cancer in young women. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Sep;123 Suppl 1:3-6.
- [17] Kheirleseid EH, Boggs JM, Curran C, Glynn RW, Dooley C, Sweeney KJ, et al. Younger age as a prognostic indicator in breast cancer: a cohort study. *BMC Cancer*. 2011;11:383.
- [18] Collins LC, Marotti JD, Gelber S, Cole K, Ruddy K, Kereakoglow S, et al. Pathologic features and molecular phenotype by patient age in a large cohort of young women with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Feb;131(3):1061-6.
- [19] Yildirim E, Dalgic T, Berberoglu U. Prognostic significance of young age in breast cancer. *J Surg Oncol*. 2000 Aug;74(4):267-72.
- [20] Colak D, Nofal A, Albakheet A, Nirmal M, Jeprel H, Eldali A, et al. Age-specific gene expression signatures for breast tumors and cross-species conserved potential cancer progression markers in young women. *PLoS One*. 2013;8(5):e63204.
- [21] Fredholm H, Eaker S, Frisell J, Holmberg L, Fredriksson I, Lindman H. Breast cancer in young women: poor survival despite intensive treatment. *PLoS One*. 2009;4(11):e7695.
- [22] van der Sangen MJ, van de Wiel FM, Poortmans PM, Tjan-Heijnen VC, Nieuwenhuijzen GA, Roumen RM, et al. Are breast conservation and mastectomy equally effective in the treatment of young women with early breast cancer? Long-term results of a population-based cohort of 1,451 patients aged  $\leq$  40 years. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 May;127(1):207-15.
- [23] Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term

follow-up. C. W. Elston & I. O. Ellis. *Histopathology* 1991; 19; 403-410. *Histopathology*. 2002 Sep;41(3A):151-2, discussion 2-3.

[24] Singletary SE, Connolly JL. Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin*. 2006 Jan-Feb;56(1):37-47; quiz 50-1.

[25] Lakhani SR. Keynote Lecture: KN02 UPDATE ON WHO BREAST CLASSIFICATION - 2 YEARS ON. *Pathology*. 2014 Oct;46 Suppl 2:S1.

[26] Harbeck N. Struggling with subtypes: trying to bridge the gap between molecular breast cancer subtypes and clinical management. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Nov;130(2):421-3.

[27] Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ. 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*. 2011 Aug;22(8):1736-47.

[28] Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thurlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*. 2013 Sep;24(9):2206-23.

[29] Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747-52.

[30] Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 11;98(19):10869-74.

[31] Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 8;100(14):8418-23.

[32] Weigelt B, Hu Z, He X, Livasy C, Carey LA, Ewend MG, et al. Molecular portraits and 70-gene prognosis signature are preserved throughout the metastatic process of breast cancer. *Cancer Res*. 2005 Oct 15;65(20):9155-8.

[33] Morris SR, Carey LA. Molecular profiling in breast cancer. *Rev Endocr Metab Disord*. 2007 Sep;8(3):185-98.

- [34] Sorlie T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. *Eur J Cancer*. 2004 Dec;40(18):2667-75.
- [35] Weigelt B, Horlings HM, Kreike B, Hayes MM, Hauptmann M, Wessels LF, et al. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol*. 2008 Oct;216(2):141-50.
- [36] Pedersen L, Holck S, Schiodt T, Zedeler K, Mouridsen HT. Medullary carcinoma of the breast, prognostic importance of characteristic histopathological features evaluated in a multivariate Cox analysis. *Eur J Cancer*. 1994;30A(12):1792-7.
- [37] Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, Kosma VM, Mari S, Alhava E, et al. Histological assessment of the prognostic factors in female breast cancer. *Oncology*. 1992;49(1):1-8.
- [38] Hernandez-Aya LF, Gonzalez-Angulo AM. Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in breast cancer. *The oncologist*. 2011;16(4):404-14.
- [39] Abdel-Fatah TM, Powe DG, Agboola J, Adamowicz-Brice M, Blamey RW, Lopez-Garcia MA, et al. The biological, clinical and prognostic implications of p53 transcriptional pathways in breast cancers. *J Pathol*. 2010 Mar;220(4):419-34.
- [40] Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*. 2011 Feb;5(1):5-23.
- [41] Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron JS, He X, Qaqish BF, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics*. 2006;7:96.
- [42] Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009 May 20;101(10):736-50.
- [43] Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987 Jan 9;235(4785):177-82.
- [44] Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2005 Oct 20;353(16):1659-72.
- [45] Irvin WJ, Jr., Carey LA. What is triple-negative breast cancer? *Eur J Cancer*. 2008 Dec;44(18):2799-805.

- [46] Kreike B, van Kouwenhove M, Horlings H, Weigelt B, Peterse H, Bartelink H, et al. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res.* 2007;9(5):R65.
- [47] Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res.* 2008 Mar 1;14(5):1368-76.
- [48] Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004 Aug 15;10(16):5367-74.
- [49] Bosch A, Eroles P, Zaragoza R, Vina JR, Lluch A. Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer Treat Rev.* 2010 May;36(3):206-15.
- [50] Reis-Filho JS, Tutt AN. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology.* 2008 Jan;52(1):108-18.
- [51] Prat A, Adamo B, Cheang MC, Anders CK, Carey LA, Perou CM. Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *The oncologist.* 2013;18(2):123-33.
- [52] Masuda H, Baggerly KA, Wang Y, Zhang Y, Gonzalez-Angulo AM, Meric-Bernstam F, et al. Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. *Clin Cancer Res.* 2013 Oct 1;19(19):5533-40.
- [53] Weigelt B, Mackay A, A'Hern R, Natrajan R, Tan DS, Dowsett M, et al. Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis. *Lancet Oncol.* 2010 Apr;11(4):339-49.
- [54] Herschkowitz JI, Zhao W, Zhang M, Usary J, Murrow G, Edwards D, et al. Comparative oncogenomics identifies breast tumors enriched in functional tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Feb 21;109(8):2778-83.
- [55] Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010;12(5):R68.

- [56] Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2004 Dec 30;351(27):2817-26.
- [57] Paik S. Is gene array testing to be considered routine now? *Breast*. 2011 Oct;20 Suppl 3:S87-91.
- [58] Kim MJ, Ro JY, Ahn SH, Kim HH, Kim SB, Gong G. Clinicopathologic significance of the basal-like subtype of breast cancer: a comparison with hormone receptor and Her2/neu-overexpressing phenotypes. *Hum Pathol*. 2006 Sep;37(9):1217-26.
- [59] Dawood S, Hu R, Homes MD, Collins LC, Schnitt SJ, Connolly J, et al. Defining breast cancer prognosis based on molecular phenotypes: results from a large cohort study. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Feb;126(1):185-92.
- [60] Irigoyen MA, Garcia FV, Iturriagaitia AC, Beroiz BI, Martinez MS, Grima FG. [Molecular subtypes of breast cancer: prognostic implications and clinical and immunohistochemical characteristics]. *An Sist Sanit Navar*. 2011 May-Aug;34(2):219-33.
- [61] Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*. 2006 Feb;19(2):264-71.
- [62] Burness ML, Grushko TA, Olopade OI. Epidermal growth factor receptor in triple-negative and basal-like breast cancer: promising clinical target or only a marker? *Cancer J*. 2010 Jan-Feb;16(1):23-32.
- [63] Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Jama*. 2006 Jun 7;295(21):2492-502.
- [64] Goksu SS, Tastekin D, Arslan D, Gunduz S, Tatli AM, Unal D, et al. Clinicopathologic features and molecular subtypes of breast cancer in young women (age  $\leq$ 35). *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(16):6665-8.
- [65] McAree B, O'Donnell ME, Spence A, Lioe TF, McManus DT, Spence RA. Breast cancer in women under 40 years of age: a series of 57 cases from Northern Ireland. *Breast*. 2010 Apr;19(2):97-104.
- [66] Bacchi LM, Corpa M, Santos PP, Bacchi CE, Carvalho FM. Estrogen receptor-positive breast carcinomas in younger women are different from those of older

women: a pathological and immunohistochemical study. *Breast*. 2010 Apr;19(2):137-41.

[67] Carvalho FM, Bacchi LM, Santos PP, Bacchi CE. Triple-negative breast carcinomas are a heterogeneous entity that differs between young and old patients. *Clinics (Sao Paulo)*. 2010;65(10):1033-6.

[68] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.

[69] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.

[70] Smid M, Wang Y, Zhang Y, Sieuwerts AM, Yu J, Klijn JG, et al. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res*. 2008 May 1;68(9):3108-14.

[71] Stingl J, Caldas C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nat Rev Cancer*. 2007 Oct;7(10):791-9.

[72] Zhang X, Yee D. Tyrosine kinase signalling in breast cancer: insulin-like growth factors and their receptors in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2000;2(3):170-5.

[73] Yee D, Paik S, Lebovic GS, Marcus RR, Favoni RE, Cullen KJ, et al. Analysis of insulin-like growth factor I gene expression in malignancy: evidence for a paracrine role in human breast cancer. *Mol Endocrinol*. 1989 Mar;3(3):509-17.

[74] Adams TE, Epa VC, Garrett TP, Ward CW. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell Mol Life Sci*. 2000 Jul;57(7):1050-93.

[75] Casa AJ, Dearth RK, Litzenburger BC, Lee AV, Cui X. The type I insulin-like growth factor receptor pathway: a key player in cancer therapeutic resistance. *Front Biosci*. 2008;13:3273-87.

[76] Zha J, Lackner MR. Targeting the insulin-like growth factor receptor-1R pathway for cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 2010 May 1;16(9):2512-7.

[77] Riedemann J, Macaulay VM. IGF1R signalling and its inhibition. *Endocr Relat Cancer*. 2006 Dec;13 Suppl 1:S33-43.

[78] Ouban A, Muraca P, Yeatman T, Coppola D. Expression and distribution of insulin-like growth factor-1 receptor in human carcinomas. *Hum Pathol*. 2003 Aug;34(8):803-8.

[79] Baserga R, Peruzzi F, Reiss K. The IGF-1 receptor in cancer biology. *Int J Cancer*. 2003 Dec 20;107(6):873-7.

- [80] Al Sarakbi W, Chong YM, Williams SL, Sharma AK, Mokbel K. The mRNA expression of IGF-1 and IGF-1R in human breast cancer: association with clinicopathological parameters. *J Carcinog*. 2006;5:16.
- [81] Papa V, Gliozzo B, Clark GM, McGuire WL, Moore D, Fujita-Yamaguchi Y, et al. Insulin-like growth factor-I receptors are overexpressed and predict a low risk in human breast cancer. *Cancer Res*. 1993 Aug 15;53(16):3736-40.
- [82] Peiro G, Adrover E, Sanchez-Tejada L, Lerma E, Planelles M, Sanchez-Paya J, et al. Increased insulin-like growth factor-1 receptor mRNA expression predicts poor survival in immunophenotypes of early breast carcinoma. *Mod Pathol*. 2011 Feb;24(2):201-8.
- [83] Law JH, Habibi G, Hu K, Masoudi H, Wang MY, Stratford AL, et al. Phosphorylated insulin-like growth factor-i/insulin receptor is present in all breast cancer subtypes and is related to poor survival. *Cancer Res*. 2008 Dec 15;68(24):10238-46.
- [84] Schnarr B, Strunz K, Ohsam J, Benner A, Wacker J, Mayer D. Down-regulation of insulin-like growth factor-I receptor and insulin receptor substrate-1 expression in advanced human breast cancer. *Int J Cancer*. 2000 Nov 20;89(6):506-13.
- [85] Creighton CJ, Casa A, Lazard Z, Huang S, Tsimelzon A, Hilsenbeck SG, et al. Insulin-like growth factor-I activates gene transcription programs strongly associated with poor breast cancer prognosis. *J Clin Oncol*. 2008 Sep 1;26(25):4078-85.
- [86] Chong YM, Colston K, Jiang WG, Sharma AK, Mokbel K. The relationship between the insulin-like growth factor-1 system and the oestrogen metabolising enzymes in breast cancer tissue and its adjacent non-cancerous tissue. *Breast Cancer Res Treat*. 2006 Oct;99(3):275-88.
- [87] Gee JM, Robertson JF, Gutteridge E, Ellis IO, Pinder SE, Rubini M, et al. Epidermal growth factor receptor/HER2/insulin-like growth factor receptor signalling and oestrogen receptor activity in clinical breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2005 Jul;12 Suppl 1:S99-S111.
- [88] Ueda S, Tsuda H, Sato K, Takeuchi H, Shigekawa T, Matsubara O, et al. Alternative tyrosine phosphorylation of signaling kinases according to hormone receptor status in breast cancer overexpressing the insulin-like growth factor receptor type 1. *Cancer Sci*. 2006 Jul;97(7):597-604.

- [89] Surmacz E, Bartucci M. Role of estrogen receptor alpha in modulating IGF-I receptor signaling and function in breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2004 Sep;23(3):385-94.
- [90] Lee AV, Jackson JG, Gooch JL, Hilsenbeck SG, Coronado-Heinsohn E, Osborne CK, et al. Enhancement of insulin-like growth factor signaling in human breast cancer: estrogen regulation of insulin receptor substrate-1 expression in vitro and in vivo. *Mol Endocrinol.* 1999 May;13(5):787-96.
- [91] Guvakova MA, Surmacz E. Tamoxifen interferes with the insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) signaling pathway in breast cancer cells. *Cancer Res.* 1997 Jul 1;57(13):2606-10.
- [92] Lam L, Hu X, Aktary Z, Andrews DW, Pasdar M. Tamoxifen and ICI 182,780 increase Bcl-2 levels and inhibit growth of breast carcinoma cells by modulating PI3K/AKT, ERK and IGF-1R pathways independent of ERalpha. *Breast Cancer Res Treat.* 2009 Dec;118(3):605-21.
- [93] Chan TW, Pollak M, Huynh H. Inhibition of insulin-like growth factor signaling pathways in mammary gland by pure antiestrogen ICI 182,780. *Clin Cancer Res.* 2001 Aug;7(8):2545-54.
- [94] Brockdorff BL, Heiberg I, Lykkesfeldt AE. Resistance to different antiestrogens is caused by different multi-factorial changes and is associated with reduced expression of IGF receptor Ialpha. *Endocr Relat Cancer.* 2003 Dec;10(4):579-90.
- [95] Lerma E, Peiro G, Ramon T, Fernandez S, Martinez D, Pons C, et al. Immunohistochemical heterogeneity of breast carcinomas negative for estrogen receptors, progesterone receptors and Her2/neu (basal-like breast carcinomas). *Mod Pathol.* 2007 Nov;20(11):1200-7.
- [96] Adelaide J, Finetti P, Bekhouche I, Repellini L, Geneix J, Sircoulomb F, et al. Integrated profiling of basal and luminal breast cancers. *Cancer Res.* 2007 Dec 15;67(24):11565-75.
- [97] Hewish M, Chau I, Cunningham D. Insulin-like growth factor 1 receptor targeted therapeutics: novel compounds and novel treatment strategies for cancer medicine. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2009 Jan;4(1):54-72.
- [98] Baserga R. Customizing the targeting of IGF-1 receptor. *Future Oncol.* 2009 Feb;5(1):43-50.

- [99] Tamimi RM, Colditz GA, Wang Y, Collins LC, Hu R, Rosner B, et al. Expression of IGF1R in normal breast tissue and subsequent risk of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2011 Jul;128(1):243-50.
- [100] Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, Sieuwerts AM, Look MP, Yang F, et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet.* 2005 Feb 19-25;365(9460):671-9.
- [101] Turner BC, Haffty BG, Narayanan L, Yuan J, Havre PA, Gumbs AA, et al. Insulin-like growth factor-I receptor overexpression mediates cellular radioresistance and local breast cancer recurrence after lumpectomy and radiation. *Cancer Res.* 1997 Aug 1;57(15):3079-83.
- [102] Nuyten DS, Kreike B, Hart AA, Chi JT, Sneddon JB, Wessels LF, et al. Predicting a local recurrence after breast-conserving therapy by gene expression profiling. *Breast Cancer Res.* 2006;8(5):R62.
- [103] Song MS, Salmena L, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 May;13(5):283-96.
- [104] Peiro G, Adrover E, Guijarro J, Ballester I, Jimenez MJ, Planelles M, et al. Synchronous bilateral breast carcinoma in a patient with Cowden syndrome: a case report with morphologic, immunohistochemical and genetic analysis. *Breast J.* 2010 Jan-Feb;16(1):77-81.
- [105] Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science.* 1997 Mar 28;275(5308):1943-7.
- [106] Peiro G, Peiro FM, Ortiz-Martinez F, Planelles M, Sanchez-Tejada L, Alenda C, et al. Association of mammalian target of rapamycin with aggressive type II endometrial carcinomas and poor outcome: a potential target treatment. *Hum Pathol.* 2013 Feb;44(2):218-25.
- [107] Bose S, Chandran S, Mirocha JM, Bose N. The Akt pathway in human breast cancer: a tissue-array-based analysis. *Mod Pathol.* 2006 Feb;19(2):238-45.
- [108] Jones N, Bonnet F, Sfar S, Lafitte M, Lafon D, Sierankowski G, et al. Comprehensive analysis of PTEN status in breast carcinomas. *Int J Cancer.* 2013 Jul 15;133(2):323-34.

- [109] Neto JC, Ikoma MM, Carvalho KC, Vassallo J, De Brot M, Gobbi H, et al. MGMT and PTEN as potential prognostic markers in breast cancer. *Exp Mol Pathol*. 2012 Feb;92(1):20-6.
- [110] Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell*. 2004 Aug;6(2):117-27.
- [111] Esteva FJ, Guo H, Zhang S, Santa-Maria C, Stone S, Lanchbury JS, et al. PTEN, PIK3CA, p-AKT, and p-p70S6K status: association with trastuzumab response and survival in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Am J Pathol*. 2010 Oct;177(4):1647-56.
- [112] Gallardo A, Lerma E, Escuin D, Tibau A, Munoz J, Ojeda B, et al. Increased signalling of EGFR and IGF1R, and deregulation of PTEN/PI3K/Akt pathway are related with trastuzumab resistance in HER2 breast carcinomas. *Br J Cancer*. 2012 Apr 10;106(8):1367-73.
- [113] Pandolfi PP. Breast cancer--loss of PTEN predicts resistance to treatment. *The New England journal of medicine*. 2004 Nov 25;351(22):2337-8.
- [114] Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev*. 1999 Nov 15;13(22):2905-27.
- [115] Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci*. 2004 May;29(5):233-42.
- [116] Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:481-507.
- [117] Miller TW, Rexer BN, Garrett JT, Arteaga CL. Mutations in the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role in tumor progression and therapeutic implications in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2011;13(6):224.
- [118] Liu P, Cheng H, Santiago S, Raeder M, Zhang F, Isabella A, et al. Oncogenic PIK3CA-driven mammary tumors frequently recur via PI3K pathway-dependent and PI3K pathway-independent mechanisms. *Nat Med*. 2011 Sep;17(9):1116-20.
- [119] Lerma E, Catusus L, Gallardo A, Peiro G, Alonso C, Aranda I, et al. Exon 20 PIK3CA mutations decreases survival in aggressive (HER-2 positive) breast carcinomas. *Virchows Arch*. 2008 Aug;453(2):133-9.

- [120] Luo J, Cantley LC. The negative regulation of phosphoinositide 3-kinase signaling by p85 and its implication in cancer. *Cell Cycle*. 2005 Oct;4(10):1309-12.
- [121] Campbell RA, Bhat-Nakshatri P, Patel NM, Constantinidou D, Ali S, Nakshatri H. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J Biol Chem*. 2001 Mar 30;276(13):9817-24.
- [122] Massarweh S, Osborne CK, Creighton CJ, Qin L, Tsimelzon A, Huang S, et al. Tamoxifen resistance in breast tumors is driven by growth factor receptor signaling with repression of classic estrogen receptor genomic function. *Cancer Res*. 2008 Feb 1;68(3):826-33.
- [123] Van Tine BA, Crowder RJ, Ellis MJ. ER and PI3K independently modulate endocrine resistance in ER-positive breast cancer. *Cancer Discov*. 2011 Sep;1(4):287-8.
- [124] Baselga J, Semiglazov V, van Dam P, Manikhas A, Bellet M, Mayordomo J, et al. Phase II randomized study of neoadjuvant everolimus plus letrozole compared with placebo plus letrozole in patients with estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Jun 1;27(16):2630-7.
- [125] Crowder RJ, Phommaly C, Tao Y, Hoog J, Luo J, Perou CM, et al. PIK3CA and PIK3CB inhibition produce synthetic lethality when combined with estrogen deprivation in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Res*. 2009 May 1;69(9):3955-62.
- [126] Miller TW, Forbes JT, Shah C, Wyatt SK, Manning HC, Olivares MG, et al. Inhibition of mammalian target of rapamycin is required for optimal antitumor effect of HER2 inhibitors against HER2-overexpressing cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2009 Dec 1;15(23):7266-76.
- [127] Carpten JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL, Robbins CM, et al. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature*. 2007 Jul 26;448(7152):439-44.
- [128] Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*. 2004 Nov;9(6):667-76.
- [129] Capodanno A, Camerini A, Orlandini C, Baldini E, Resta ML, Bevilacqua G, et al. Dysregulated PI3K/Akt/PTEN pathway is a marker of a short disease-free survival in node-negative breast carcinoma. *Hum Pathol*. 2009 Oct;40(10):1408-17.

- [130] Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jul;2(7):489-501.
- [131] Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, Neve RM, Kuo WL, Davies M, et al. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res*. 2008 Aug 1;68(15):6084-91.
- [132] Hirai H, Sootome H, Nakatsuru Y, Miyama K, Taguchi S, Tsujioka K, et al. MK-2206, an allosteric Akt inhibitor, enhances antitumor efficacy by standard chemotherapeutic agents or molecular targeted drugs in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther*. 2010 Jul;9(7):1956-67.
- [133] von Manteuffel SR, Dennis PB, Pullen N, Gingras AC, Sonenberg N, Thomas G. The insulin-induced signalling pathway leading to S6 and initiation factor 4E binding protein 1 phosphorylation bifurcates at a rapamycin-sensitive point immediately upstream of p70s6k. *Mol Cell Biol*. 1997 Sep;17(9):5426-36.
- [134] Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth. *Cell*. 2000 Oct 13;103(2):253-62.
- [135] Bakarakos P, Theohari I, Nomikos A, Mylona E, Papadimitriou C, Dimopoulos AM, et al. Immunohistochemical study of PTEN and phosphorylated mTOR proteins in familial and sporadic invasive breast carcinomas. *Histopathology*. 2010 Jun;56(7):876-82.
- [136] Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Colomer R, Brunet J, Menendez JA. Low-scale phosphoproteome analyses identify the mTOR effector p70 S6 kinase 1 as a specific biomarker of the dual-HER1/HER2 tyrosine kinase inhibitor lapatinib (Tykerb) in human breast carcinoma cells. *Ann Oncol*. 2008 Jun;19(6):1097-109.
- [137] Baselga J. Targeting the phosphoinositide-3 (PI3) kinase pathway in breast cancer. *The oncologist*. 2011;16 Suppl 1:12-9.
- [138] Macaskill EJ, Bartlett JM, Sabine VS, Faratian D, Renshaw L, White S, et al. The mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus (RAD001) in early breast cancer: results of a pre-operative study. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Aug;128(3):725-34.
- [139] Mercier I, Camacho J, Titchen K, Gonzales DM, Quann K, Bryant KG, et al. Caveolin-1 and accelerated host aging in the breast tumor microenvironment: chemoprevention with rapamycin, an mTOR inhibitor and anti-aging drug. *Am J Pathol*. 2012 Jul;181(1):278-93.

- [140] Markman B, Tabernero J, Krop I, Shapiro GI, Siu L, Chen LC, et al. Phase I safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of the oral phosphatidylinositol-3-kinase and mTOR inhibitor BGT226 in patients with advanced solid tumors. *Ann Oncol*. 2012 Sep;23(9):2399-408.
- [141] Ramirez-Prado D, Palazon-Bru A, Folgado-de-la Rosa DM, Carbonell-Torregrosa MA, Martinez-Diaz AM, Gil-Guillen VF. Predictive models for all-cause and cardiovascular mortality in type 2 diabetic inpatients. A cohort study. *International journal of clinical practice*. 2014 Sep 19.
- [142] Sullivan LM, Massaro JM, D'Agostino RB, Sr. Presentation of multivariate data for clinical use: The Framingham Study risk score functions. *Statistics in medicine*. 2004 May 30;23(10):1631-60.
- [143] Keegan TH, DeRouen MC, Press DJ, Kurian AW, Clarke CA. Occurrence of breast cancer subtypes in adolescent and young adult women. *Breast Cancer Res*. 2012;14(2):R55.
- [144] Bleyer A, Barr R, Hayes-Lattin B, Thomas D, Ellis C, Anderson B. The distinctive biology of cancer in adolescents and young adults. *Nat Rev Cancer*. 2008 Apr;8(4):288-98.
- [145] Mayer EL, Carey LA, Burstein HJ. Clinical trial update: implications and management of residual disease after neoadjuvant therapy for breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2007;9(5):110.
- [146] Kurian AW, Fish K, Shema SJ, Clarke CA. Lifetime risks of specific breast cancer subtypes among women in four racial/ethnic groups. *Breast Cancer Res*. 2010;12(6):R99.
- [147] Kurtz JM, Jacquemier J, Amalric R, Brandone H, Ayme Y, Hans D, et al. Why are local recurrences after breast-conserving therapy more frequent in younger patients? *J Clin Oncol*. 1990 Apr;8(4):591-8.
- [148] Voogd AC, Nielsen M, Peterse JL, Blichert-Toft M, Bartelink H, Overgaard M, et al. Differences in risk factors for local and distant recurrence after breast-conserving therapy or mastectomy for stage I and II breast cancer: pooled results of two large European randomized trials. *J Clin Oncol*. 2001 Mar 15;19(6):1688-97.

- [149] Freedman GM, Anderson PR, Li T, Nicolaou N. Locoregional recurrence of triple-negative breast cancer after breast-conserving surgery and radiation. *Cancer*. 2009 Mar 1;115(5):946-51.
- [150] Yang XR, Chang-Claude J, Goode EL, Couch FJ, Nevanlinna H, Milne RL, et al. Associations of breast cancer risk factors with tumor subtypes: a pooled analysis from the Breast Cancer Association Consortium studies. *J Natl Cancer Inst*. 2011 Feb 2;103(3):250-63.
- [151] VandenBussche CJ, Elwood H, Cimino-Mathews A, Bittar Z, Illei PB, Warzecha HN. Clinicopathologic features of ductal carcinoma in situ in young women with an emphasis on molecular subtype. *Hum Pathol*. 2013 Nov;44(11):2487-93.
- [152] Chagpar AB, McMasters KM, Sahoo S, Edwards MJ. Does ductal carcinoma in situ accompanying invasive carcinoma affect prognosis? *Surgery*. 2009 Oct;146(4):561-7; discussion 7-8.
- [153] Kurbel S. In search of triple-negative DCIS: tumor-type dependent model of breast cancer progression from DCIS to the invasive cancer. *Tumour Biol*. 2013 Feb;34(1):1-7.
- [154] Liao N, Zhang GC, Liu YH, Li XR, Yao M, Xu FP, et al. HER2-positive status is an independent predictor for coexisting invasion of ductal carcinoma in situ of the breast presenting extensive DCIS component. *Pathol Res Pract*. 2011 Jan 15;207(1):1-7.
- [155] Fu P, Ibusuki M, Yamamoto Y, Hayashi M, Murakami K, Zheng S, et al. Insulin-like growth factor-1 receptor gene expression is associated with survival in breast cancer: a comprehensive analysis of gene copy number, mRNA and protein expression. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Nov;130(1):307-17.
- [156] Shin SJ, Gong G, Lee HJ, Kang J, Bae YK, Lee A, et al. Positive expression of insulin-like growth factor-1 receptor is associated with a positive hormone receptor status and a favorable prognosis in breast cancer. *J Breast Cancer*. 2014 Jun;17(2):113-20.
- [157] Bhargava R, Beriwal S, McManus K, Dabbs DJ. Insulin-like growth factor receptor-1 (IGF-1R) expression in normal breast, proliferative breast lesions, and breast carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2011 May;19(3):218-25.

- [158] Esparis-Ogando A, Ocana A, Rodriguez-Barrueco R, Ferreira L, Borges J, Pandiella A. Synergic antitumoral effect of an IGF-IR inhibitor and trastuzumab on HER2-overexpressing breast cancer cells. *Ann Oncol*. 2008 Nov;19(11):1860-9.
- [159] Jin Q, Esteva FJ. Cross-talk between the ErbB/HER family and the type I insulin-like growth factor receptor signaling pathway in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2008 Dec;13(4):485-98.
- [160] Chakraborty AK, Welsh A, Digiovanna MP. Co-targeting the insulin-like growth factor I receptor enhances growth-inhibitory and pro-apoptotic effects of anti-estrogens in human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Apr;120(2):327-35.
- [161] Camirand A, Lu Y, Pollak M. Co-targeting HER2/ErbB2 and insulin-like growth factor-1 receptors causes synergistic inhibition of growth in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Med Sci Monit*. 2002 Dec;8(12):BR521-6.
- [162] Lehmann BD, Pietschmann JA. Identification and use of biomarkers in treatment strategies for triple-negative breast cancer subtypes. *J Pathol*. 2014 Jan;232(2):142-50.
- [163] Marty B, Maire V, Gravier E, Rigault G, Vincent-Salomon A, Kappler M, et al. Frequent PTEN genomic alterations and activated phosphatidylinositol 3-kinase pathway in basal-like breast cancer cells. *Breast Cancer Res*. 2008;10(6):R101.
- [164] Cao JQ, Olson RA, Tyldesley SK. Comparison of recurrence and survival rates after breast-conserving therapy and mastectomy in young women with breast cancer. *Curr Oncol*. 2013 Dec;20(6):e593-601.
- [165] Schnitt SJ. Traditional and newer pathologic factors. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2001(30):22-6.
- [166] Connolly JL. Changes and problematic areas in interpretation of the AJCC Cancer Staging Manual, 6th Edition, for breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2006 Mar;130(3):287-91.
- [167] Ito M, Moriya T, Ishida T, Usami S, Kasajima A, Sasano H, et al. Significance of pathological evaluation for lymphatic vessel invasion in invasive breast cancer. *Breast Cancer*. 2007;14(4):381-7.
- [168] Richards CH, Mohammed Z, Qayyum T, Horgan PG, McMillan DC. The prognostic value of histological tumor necrosis in solid organ malignant disease: a systematic review. *Future Oncol*. 2011 Oct;7(10):1223-35.

- [169] Hasebe T, Iwasaki M, Hojo T, Shibata T, Kinoshita T, Tsuda H. Histological factors for accurately predicting first locoregional recurrence of invasive ductal carcinoma of the breast. *Cancer Sci.* 2013 Sep;104(9):1252-61.
- [170] Yu L, Yang W, Cai X, Shi D, Fan Y, Lu H. Centrally necrotizing carcinoma of the breast: clinicopathological analysis of 33 cases indicating its basal-like phenotype and poor prognosis. *Histopathology.* 2010 Aug;57(2):193-201.
- [171] Jimenez RE, Wallis T, Visscher DW. Centrally necrotizing carcinomas of the breast: a distinct histologic subtype with aggressive clinical behavior. *The American journal of surgical pathology.* 2001 Mar;25(3):331-7.
- [172] Black MM, Zachrau RE, Hankey BF, Feuer EJ. Prognostic significance of in situ carcinoma associated with invasive breast carcinoma. A natural experiment in cancer immunology? *Cancer.* 1996 Aug 15;78(4):778-88.
- [173] Wong H, Lau S, Yau T, Cheung P, Epstein RJ. Presence of an in situ component is associated with reduced biological aggressiveness of size-matched invasive breast cancer. *Br J Cancer.* 2010 Apr 27;102(9):1391-6.
- [174] Hasebe T, Iwasaki M, Akashi-Tanaka S, Hojo T, Shibata T, Kinoshita T, et al. Important histologic outcome predictors for patients with invasive ductal carcinoma of the breast. *The American journal of surgical pathology.* 2011 Oct;35(10):1484-97.