Universitat de Lleida

Cáncer de mama: Utilidad pronostica de los Perfiles de Expresión Proteica en pacientes con tumor residual viable (>1.0cm.) tras Quimioterapia adyuvante.

Serafín Morales Murillo

http://hdl.handle.net/10803/401677

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

Cáncer de mama: Utilidad pronostica de los Perfiles de Expresión Proteica en pacientes con tumor residual viable (>1.0cm.) tras Quimioterapia neoadyuvante.

SERAFIN MORALES MURILLO

DEPARTAMENTO DE MEDICINA
UNIVERSITAT DE LLEIDA

Universitat de Lleida

Cáncer de mama: Utilidad pronostica de los Perfiles de Expresión Proteica en pacientes con tumor residual viable (>1.0cm.) tras Quimioterapia neoadyuvante.

SERAFIN MORALES MURILLO

Director de Tesis:

DRA. ANTONIETA SALUD SALVIA

Lleida 2014

Dedicatoria: Trabajar en equipo no es una virtud, es una elección consciente y voluntaria que surge construyendo lazos de confianza basados en la vulnerabilidad humana que muestran los integrantes del equipo, ante sus errores, temores, y dificultades.

Patrick Lencioni

Agradecimientos:

En primer lugar a los Dres Llombart y Marias-Guiu que me ofrecieron la oportunidad de trabajar en este estudio no sólo con la idea sino con la infraestructura necesaria para llevar a cabo el proyecto.

A la Dra Anna Novell que ha efectuado el proceso más laborioso del trabajo como es la preparación e interpretación de todas las muestras de una manera excepcional que ha permitido tener los datos necesarios para la interpretación de los resultados.

A los compañeros del Hospital Arnau de Vilanova de Valencia que han colaborado con sus muestras y datos clínicos de una forma desinteresada.

A mis compañeros que han estado animándome en todo momento para que el proyecto no se me encalle y pueda ser finalizado con éxito.

A Joan Valls, estadístico del IRB lleida que ha conseguido que el el manejo estadístico de los datos se convierta en una tarea muy interesante e incluso hasta divertida.

Finalmente a mi familia que siempre ha estado a mi lado en los momentos más complicados del estudio dándome el aliento para seguir creyendo en el proyecto.

A todos ellos MUCHAS GRACIAS DE TODO CORAZON.

INDICE GENERAL
INDICE DE TABLAS
INDICE DE FIGURAS
RESUMEN
1. INTRODUCCIÓN
1.1 Técnicas de análisis molecular: tissue microarrays
1.2 Proteínas a estudiar
1.2.1. Fenotipado molecular
1.2.2. Mecanismos de superación de la apoptosis
1.2.3. Activación de las vías de señalización
1.2.4. Mecanismos de desregulación del ciclo celular
1.2.5. Moléculas de adhesión y otros
1.3 Análisis molecular del tumor residual
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO
3. OBJETIVOS
3.1 Principal
3.2 Secundarios
4. MATERIALES Y MÉTODOS
4.1 Pacientes
4.2 Tejidos
4.3 Diseño del array de tejidos (TMA)
4.4 Estudio inmunohistoquímico
4.5 Cálculo del tamaño muestral
4.6 Análisis bioinformático y estadístico de datos
5. RESULTADOS GLOBALES
5.1 Descripción global de la serie
5.2 Características de las pacientes
5.3 Perfiles de las muestras
6. RESULTADOS DE LAS DIFERENTES VARIABLES: VALORACIÓN GLOBAL PARA LA VARIABLE METÁSTASIS (M)
6.1 Evaluación del valor pronóstico individual de cada uno de los marcadores: UNIVARIABLE
6.2 Evaluación del valor pronóstico individual de cada uno de los marcadores: MULTIVARIABLE
7. RESULTADOS DE LAS DIFERENTES VARIABLES: VALORACIÓN GLOBAL PARA LA VARIABLE SUPERVIVENCIA LIBRE DE METÁSTASIS (SLED)
7.1. Evaluación del valor pronóstico individual de cada uno de los marcadores: UNIVARIABLE
7.2. Evaluación SLED individual de los marcadores con valor significativo en su punto de corte óptimo según el método de Kaplan-Meier y estudio de sus curvas de supervivencia
7.3 Evaluación del valor pronóstico para SLED de cada uno de los marcadores MULTIVARIABLE

8. DESARROLLO DE BÚSQUEDA DE UN MODELO PREDICTIVO DE MAL PRONÓSTICO
9. ASOCIACIÓN DE LOS BIOMARCADORES ESTUDIADOS CON LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES HORMONALES

10. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE BIOMARCADORES PARA LA APARICIÓN DE METÁSTASIS EN FUNCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE ESTRÓGENOS

10.1 Evaluación del valor pronóstico individual de cada uno de los marcadores en receptores de estrógenos negativos para la variable metástasis: UNIVARIABLE

10.2 Evaluación del valor pronóstico individual de cada uno de los marcadores en receptores de estrógenos positivos para la variable metástasis: UNIVARIABLE

10.3 Evaluación del valor pronóstico para metástasis de cada uno de los marcadores en función de la expresión de los receptores de estrógenos: MULTIVARIABLE

11. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE BIOMARCADORES PARA SLED EN FUNCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE ESTRÓGENOS: RECEPTORES DE ESTRÓGENOS NEGATIVOS

11.1 Evaluación de SLED individual de los marcadores con valor significativo en su punto de corte óptimo según el método de Kaplan-Meier y estudio de sus curvas de supervivencia para receptores de estrógenos negativos

12. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE BIOMARCADORES PARA SLED EN FUNCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE ESTRÓGENOS: RECEPTORES DE ESTRÓGENOS POSITIVOS.

12.1 Evaluación de SLED individual de los marcadores con valor significativo en su punto de corte óptimo según el método de Kaplan-Meier y estudio de sus curvas de supervivencia para receptores de estrógenos positivos

13. EVALUACIÓN DEL VALOR PRONÓSTICO INDIVIDUAL PARA SLED DE CADA UNO DE LOS MARCADORES EN FUNCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS: MULTIVARIABLE

14. RESUMEN DE TODAS LAS VARIABLES DE EXPRESIÓN

15. DISCUSIÓN

15.1 Características generales de la serie

15.2 Análisis de los resultados de los biomarcadores con significación estadística

15.3 Análisis de los resultados agrupados por marcadores de mal pronóstico

16. CONCLUSIONES

17. BIBLIOGRAFÍA

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 4.1: Detalle de los anticuerpos utilizados para el análisis de IHQ
Tabla 5.1: Relación de seguimiento de las muestras y aparición de metástasis
Tabla 5.2: Resultados de la SLED para la aparición del evento (metástasis)
Tabla 5.3: Características clínicas más relevantes de la serie
Tabla 5.4: Resultados de los análisis univariable y multivariable de las variables clínicas
Tabla 5.5: Análisis de los factores clínicos para ER: 0
Tabla 5.6: Análisis de los factores clínicos para ER>0
Tabla 5.7: Relación de eventos en función de la afectación ganglionar en los diferentes grupos en función de expresión de ER
Tabla 5.8: Detalle de las medias de supervivencia de los 3 sub-grupos en ER=0
Tabla 5.9: Detalle de las medias de supervivencia de los 3 subgrupos en ER>0
Tabla 5.10: Características biológicas más habituales del total de la serie de 256 pacientes, expresión de ER y progesterona, HER2 e índice de proliferación de KI67
Tabla 6.1: Análisis univariable de los biomarcadores en expresión cuantitativa
Tabla 6.2: Análisis univariable de los biomarcadores en función de su expresión>0
Tabla 6.3: Tabla de contingencia de PTEN, ER y RP
Tabla 6.4: Asociación entre PTEN y ER
Tabla 6.5: Análisis univariable según nivel de expresión mayor a la media
Tabla 6.6: Análisis univariable según nivel de expresión en 4 percentiles
Tabla 6.7: Análisis univariable según nivel de expresión por punto de corte óptimo
Tabla 6.8: Variables con significación y su asociación con metástasis
Tabla 6.9: Análisis multivariable con valores globales
Tabla 6.10: Análisis multivariable con valores en punto de corte
Tabla 7.1: Análisis univariable de los biomarcadores en expresión cuantitativa
Tabla 7.2. : Análisis univariable de los biomarcadores por nivel de expresión>0
Tabla 7.3: Análisis univariable según el nivel de expresión mayor a la media.
Tabla 7.4: Análisis univariable según el nivel de expresión para punto de corte óptimo
Tabla 7.5: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para la expresión de receptores de estrógenos.
Tabla 7.6: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para expresión de receptores de progesterona
Tabla 7.7: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para expresión de 53BP1
Tabla 7.8: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para la expresión de BCL2
Tabla 7.9: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para la expresión de Ciclina *nuclear*
Tabla 7.10: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para la expresión de HER4 *citoplasmático*
Tabla 7.11: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para la expresión de KI67
Tabla 7.12: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para la expresión de P65 *citoplasmática*
Tabla 7.13: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para la expresión de P65 *nuclear*
Tabla 7.14: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para la expresión de PTEN *nuclear*
Tabla 7.15: Modelo multivariable de Cox: valores globales
Tabla 7.16: Modelo multivariable de Cox: valores en punto de corte
Tabla 8.1: Proporción de aparición de metástasis en función de las condiciones de los biomarcadores analizados
Tabla 8.2: Modelos de regresión logística y de Cox según las condiciones encontradas
Tabla 8.3: Estudio de sensibilidad según los modelos de condiciones con más impacto pronóstico
Tabla 9.1: Correlación de todos los biomarcadores con los receptores de estrógenos

Tabla 9.2: Relación de los biomarcadores con mayor correlación con ER
Tabla 10.1: Análisis univariable de los biomarcadores en expresión cuantitativa
Tabla 10.2: Análisis univariable de los biomarcadores en función de su expresión>0
Tabla 10.3: Análisis univariable según nivel de expresión mayor a la media
Tabla 10.4: Análisis univariable según nivel de expresión por punto de corte óptimo
Tabla 10.5: Variables con significación y su asociación con metástasis
Tabla 10.6: Análisis univariable de los biomarcadores en expresión cuantitativa
Tabla 10.7: Análisis univariable de los biomarcadores en función de su expresión>0
Tabla 10.8 Análisis univariable según nivel de expresión mayor a la media
Tabla 10.9: Análisis univariable según nivel de expresión por punto de corte óptimo.
Tabla 10.10: Variables con significación y su asociación con SLED
Tabla 10.11: Modelo final multivariable de regresión logística para valores globales y según punto de corte para receptores de estrógenos negativos.
Tabla 10.12: Modelo final multivariable de regresión logística para valores globales y según punto de corte para receptores de estrógenos positivos.
Tabla 11.1: Análisis univariable de los biomarcadores en expresión cuantitativa
Tabla 11.2: Analisis univariable por nivel de expresión según un punto de corte óptimo
Tabla 11.3: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para expresión de 53BP1
Tabla 11.4: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para expresión de E-Cadherina *citoplasmática* para punto de corte superior a 82
Tabla 11.5: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para expresión de HER4 *citoplasmática* para punto de corte superior a 70
Tabla 11.6: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para expresión de p65 *citoplasmática* para punto de corte superior a 65
Tabla 11.7: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para expresión de p65 *nuclear* para punto de corte superior a 37
Tabla 11.8: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para expresión de PTEN *nuclear* para punto de corte superior a 195
Tabla 11.9: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para expresión de GATA 3 para punto de corte superior a 187
Tabla 12.1: Análisis univariable de los biomarcadores en expresión cuantitativa
Tabla 12.2: Resultados por nivel de expresión según un punto de corte óptimo
Tabla 12.3: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para expresión de BCL2 para punto de corte superior a 77
Tabla 12.4: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para expresión de Ciclina *nuclear* para punto de corte superior a 147
Tabla 12.5: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para expresión de Ki67 para punto de corte superior a 20
Tabla 12.6: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para expresión de pAKT *citoplasmática* para punto de corte superior a 145
Tabla 12.7: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para expresión de PTEN *nuclear* para punto de corte superior a 195
Tabla 12.8. Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para expresión de Survivin *nuclear* para punto de corte superior a 92
Tabla 13.1: Receptores de estrógenos negativos. RE=0. Valorares globales

Tabla 13.2: Receptores de estrógenos negativos. RE=0 Valores según punto de corte

Tabla 13.3: Receptores de estrógenos positivos. RE>0. Valores globales

Tabla 13.4: Receptores de estrógenos positivos. RE>0. Valores en punto de corte

Tabla 14.1. Resumen de los resultados de las variables con algún tipo de significación

Tabla 15.1. Detalle de los OR estimados individualmente para cada una de las condiciones evaluadas en la firma

Tabla 15.2. Proporción de aparición de metástasis en función de las condiciones

Tabla 15.3. Proporción de aparición de metástasis para RE negativo según las condiciones

Tabla 15.4. Proporción de aparición de metástasis para RE positivo según las condiciones

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 5.1 : Curva de SLED de la serie global
Figura 5.2: Supervivencia en función de la afectación ganglionar residual para ER=0
Figura 5.3: Supervivencia en función de la afectación ganglionar residual para ER>0
Figura 7.1: Supervivencia según la expresión de ER para punto de corte igual a cero
Figura 7.2: Supervivencia según expresión de RP para punto de corte igual a cero
Figura 7.3: Supervivencia según expresión de 53BP1 para punto de corte superior a 102
Figura 7.4: Supervivencia según expresión de BCL2 para punto de corte superior a 77
Figura 7.5: Supervivencia según la expresión de Ciclina *nuclear* para punto de corte superior a 102
Figura 7.6: Supervivencia según expresión de HER4 citoplasmático para punto de corte superior a 75
Figura 7.7: Supervivencia según expresión de KI67 para punto de corte superior a 20
Figura 7.8: Supervivencia según expresión de p65 citoplasmática para punto de corte superior a 85
Figura 7.9: Supervivencia según expresión de P65 nuclear para punto de corte superior a 47
Figura 7.10: Supervivencia según expresión de PTEN *nuclear* para punto de corte superior a 195
Figura 8.1: Supervivencia en función de las condiciones satisfechas
Figura 11.1: Supervivencia según expresión de 53BP1 para punto de corte superior a 100
Figura 11.2: Supervivencia según expresión de E-Cadherina *citoplasmática* para punto de corte superior a 82
Figura 11.3: Supervivencia según expresión de HER4 citoplasmática para punto de corte superior a 70
Figura 11.4: Supervivencia según expresión de p65 citoplasmática para punto de corte superior a 85
Figura 11.5: Supervivencia según expresión de p65 nuclear para punto de corte superior a 37
Figura 11.6: Supervivencia según expresión de PTEN nuclear para punto de corte superior a 195
Figura 11.7: Supervivencia según expresión de GATA 3 para punto de corte superior a 187
Figura 12.1: Supervivencia según expresión de BCL2 para punto de corte superior a 77
Figura 12.2: Supervivencia según expresión de Ciclina nuclear para punto de corte superior a 147.
Figura 12.3: Supervivencia según expresión de KI67 para punto de corte superior a 20.
Figura 12.4: Supervivencia según expresión de pAKT citoplasmática para punto de corte superior a 147**.**
Figura 12.5: Supervivencia según expresión de PTEN *nuclear* para punto de corte superior a 195.
Figura 12.6: Supervivencia según expresión de Survivin *nuclear* para punto de corte superior a 92.
Figura 15.1: Detalle de los biomarcadores que han presentado significación estadística en la serie global con el porcentaje de aparición de metástasis en función de su expresión .
Figura 15.2: Biomarcadores con significación para metástasis en RE negativos
Figura 15.3: Biomarcadores con significación para metástasis en RE positivos
Figura 15.4: Representación de OR de cada uno de los biomarcadores encontrados en la firma genética
Figura 15.5: SLED a 5 años en función de la presencia de las condiciones de la firma
Figura 15.6: Representación de las condiciones individuales y comparada con las agrupadas para poder diferenciar su magnitud.
Figura 15.7: Ejemplo del valor pronostico de la aparición de condiciones representado en dos casos según su perfil de expresión por IHQ :

RESUMEN

Introducción:

La quimioterapia neoadyuvante (QTN) es un tratamiento habitual en pacientes con estadios primarios de cáncer de mama. La persistencia de tumor residual viable (ypT > 1.0 cm y/o ypN > 1) identifica la población de mal pronóstico. Se carecen de marcadores moleculares sobre el tumor residual que puedan mejorar la capacidad de pronóstico e identificar potenciales dianas terapéuticas.

Materiales y métodos:

Se ha analizado una serie consecutiva de pacientes tratadas en dos centros entre 1996 y 2010. Los criterios de selección fueron: Confirmación histológica de carcinoma infiltrante de mama con Estadio clínico II – III; QTN basada en antraciclinas y/o taxanos (>4 ciclos); Tumor residual > 1.0 cm (>10% cels.); Tumor residual apto; y consentimiento informado firmado.

Se ha generado un tissue matrix-array (TMA) con análisis por inmunohistoquímica (IHQ) de 29 marcadores moleculares. Los Scores se corresponden de: (0 – 300) en los marcadores citoplasmáticos (cit) /nucleares (nuc) y de (0 – 3) en marcadores de membrana.

El análisis se ha realizado para la aparición de metástasis y supervivencia libre de enfermedad a distancia (SLED).

Resultados:

En total 256 pacientes han sido incluidas. El seguimiento medio fue de 53 meses con 80 eventos para SLED (32%). La SLED a 5 años era del 71%. El análisis multivariado (método *Stepwise*) identifica una firma con seis marcadores de mal pronóstico: ER [= 0], cit-P65 [<85], cit-HER4 [> 75], cit-PTEN [= 0], BCL2 [<78] y KI67 [> 20]. La SLED a 5 años para pacientes con 0-1, 2-3 o ≥ 4 factores es del 85%, 70% y 34% respectivamente (p <0.00001).

La estratificación por receptores estrogénicos (ER) señala marcadores diferenciados. ER-negativo: cit-HER4 (p 0.01), nuc-P65 (p 0.01), BP1 (p 0.001), cit-P65 (p 0.02) y cit-E-Cadherina (p 0.04). ER-positiva [>0]: nuc-CiclinD1 (p 0.02), KI67 (p 0.02), nuc-Survivin (p 0.02) , cit-pAKT (p 0.03), y GATA3 (p: 0,05).

Conclusión:

Un perfil de expresión molecular en el tumor residual tras QTN permite identificar las pacientes con mayor riesgo de recidiva. La expresión de ER en el tumor residual diferencia dos poblaciones con marcadores moleculares específicos. Un estudio de validación está actualmente en fase de diseño.

ABSTRACT

La identificación de marcadores moleculares en el tumor residual tras quimioterapia neoadyuvante (QTN) en Cáncer de Mama permite una mejor caracterización pronostica. Se han seleccionado un total de 256 pacientes con QTN entre 1996 y 2011, con tumor residual (> 1 cm). Se ha realizado un array matricial de tejidos y estudio IHQ de la expresión de 29 marcadores moleculares. El análisis se ha realizado sobre la aparición de metástasis y la supervivencia libre de progresión a distancia. El modelo multivariante (método stepwise) obtiene una firma molecular con seis marcadores de mal pronóstico: ER [= 0], cit-P65 [<85], cit-HER4 [> 75], cit-PTEN [= 0], BCL2 [<78] y KI67 [> 20].
Un análisis en función de la expresión de RE identifica marcadores asociados a mal pronostico en RE-negativo [=0]: HER4-cit [>70] (p 0.01), P65-nuc [>37] (p 0.01), BP1 [>100] (p 0.001) p65-cit [<85] (p 0.04) E-Cad-cit [>80] (p 0.04) y GATA 3 [<145] (p 0,05) , mientras que para RE-positivo [>0]: Ciclina D1-nuc [>145] (p 0.02) Ki67 [>24] (p 0.02) Survivina-nuc [<90] (p 0.02) y pAKT-cit [>145] (p 0.03) .

La identificació de marcadors moleculars en el tumor residual després de quimioteràpia neoadjuvant (QTN) en Càncer de Mama permet una millor caracterització pronostica . S'han seleccionat un total de 256 pacients amb QTN entre 1996 i 2011 , amb tumor residual (> 1 cm) . S'ha realitzat una matriu matricial de teixits i estudi inmunohistoquimic de l'expressió de 29 marcadors moleculars . L'anàlisi s'ha realitzat sobre l'aparició de metàstasi i la supervivència lliure de progressió a distància . El model multivariant (mètode stepwise) obté una signatura molecular amb sis marcadors de mal pronòstic : ER [= 0] , cit - P65 [< 85] , cit - HER4 [> 75] , cit - PTEN [= 0] , BCL2 [< 78] i Ki67 [> 20] . Una anàlisi en funció de l'expressió de receptors de estrògens identifica marcadors associats a mal pronòstic en RE -negatiu [= 0] :]: HER4-cit [>70] (p 0.01), P65-nuc [>37] (p 0.01), BP1 [>100] (p 0.001) p65-cit [<85] (p 0.04) E-Cad-cit [>80] (p 0.04) y GATA 3 [<145] (p 0,05), mentre que per RE - positiu [> 0] : Ciclina D1-nuc [>145] (p 0.02) Ki67 [>24] (p 0.02) Survivina-nuc [<90] (p 0.02) i pAKT-cit [>145] (p 0.03)

Identification of molecular markers in the residual tumor after neoadjuvant chemotherapy (QTN) in breast cancer allows better prognostic characterization . A total of a total of 256 patients between 1996 and 2011 QTN with residual tumor (> 1 cm) have been selected . A tissue array and inmunohistochemistry study of expression of 29 molecular markers has been performed. The analysis was conducted on the occurrence of metastasis and progression-free survival distance. The multivariate model (stepwise method) obtained a molecular signature of six prognostic markers : ER [= 0] , cit - P65 [< 85] , cit - HER4 [> 75] , cit - PTEN [= 0] , BCL2 [< 78] and Ki67 [> 20] . An analysis based on the expression of estrogen receptor identifies markers associated with poor prognosis in ER - negative [= 0]: HER4-cit [>70] (p 0.01), P65-nuc [>37] (p 0.01), BP1 [>100] (p 0.001) p65-cit [<85] (p 0.04) E-Cad-cit [>80] (p 0.04) y GATA 3 [<145] (p 0,05) , whereas ER - positive [> 0] : Ciclina D1-nuc [>145] (p 0.02) Ki67 [>24] (p 0.02) Survivina-nuc [<90] (p 0.02) y pAKT-cit [>145] (p 0.03)

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es un tumor sensible a terapias citotóxicas. En sus estadios iniciales la quimioterapia postoperatoria incrementa la supervivencia global (SG) a 5 años entre un 10 y un 30% en función del esquema utilizado y de las características del tumor. Los estudios de quimioterapia neoadyuvante (QTN), preoperatoria o tratamiento sistémico primario, obtienen cifras similares (10 – 25%) en las tasas de respuesta completa patológica (pCR); de tal forma que el grado de respuesta histológica a la QTN se convierte en el principal factor pronóstico tanto de SG como SLED[1].

Sobre la base de la neoadyuvancia como modelo experimental para identificar modelos transponibles a la adyuvancia, la búsqueda de marcadores de predicción de la respuesta histológica ha sido un objetivo prioritario. Numerosos estudios han evaluado tanto por métodos clásicos (IHQ) como con plataformas de microarray, los marcadores moleculares iniciales predictores de sensibilidad a los distintos agentes y esquemas de quimioterapia[2].

En la práctica clínica tan solo el grado histológico (bajo) y la expresión (elevada) de receptores hormonales han sido identificados como marcadores útiles para identificar pacientes con menos posibilidades de pCR. Sin embargo, la presencia de alguna de estas características no excluye un beneficio de la quimioterapia como pone de manifiesto el meta-análisis del EBCTSG[3], que analizando todos los ensayos de adyuvancia con quimioterapia, identifica beneficios en supervivencia de su aplicación en ambos grupos de pacientes (ER-positivos y bajo grado histológico). Es por ello que ningún marcador ni perfil genómico permite identificar poblaciones con posibilidad nula de beneficio de quimioterapia; y aún menos seleccionar el tipo de quimioterapia.

Por otro lado, el estudio de neoadyuvancia del grupo alemán GEOPARTRIO demostró que los mecanismos de resistencia y sensibilidad de un tumor són en general comunes a todos los agentes con acción citotóxica. El estudio aleatorizó cerca de 400 pacientes sin evidencia de respuesta clínica tras dos ciclos de quimioterapia con esquema TAC a proseguir el mismo esquema por 4 ciclos, o a 4 ciclos de un esquema con fármacos sin resistencia cruzada (*Vinorelbina* y *Capecitabina*). La exigua tasa de pCR en ambos

grupos (1.0% y 0.6%) confirma que los mecanismos de resistencia están presentes desde el inicio y son mayoritariamente comunes[4].

Si el beneficio de la quimioterapia se extiende a todos los grupos con criterios clínicos de riesgo (tamaño, afectación axilar), y los estudios de neoadyuvancia no han permitido identificar las pacientes con un beneficio nulo, todas las pacientes con criterios clínicos (T > 2-3 cm) podrían recibir QTN. Además, si la buena respuesta histológica es el mejor marcador pronóstico, la búsqueda de mejores marcadores debería concentrarse en las pacientes con respuesta insuficiente al tratamiento primario, y en concreto al pronóstico propiciado por el tumor residual y/o a los cambios moleculares inducidos por el propio tratamiento[5].

Una primera aproximación ha sido realizada por el grupo del MDACC, analizando el valor del tumor residual como marcador pronóstico. Los cuatro factores identificados serían: tamaño microscópico del tumoral residual, porcentaje de células tumorales viables, número de ganglios con afectación tumoral y tamaño de la metástasis ganglionar mayor. En función de estos cuatro marcadores histológicos se definen tres grupos de riesgo (Residual Cancer Burden). El primero (RCB–I), con un excelente pronóstico a cinco años es equiparable al de los pacientes con pCR (RCB-0), e incluye pacientes con pequeño-mínimo volumen tumoral residual. El segundo (RCB-II) y tercer grupos (RCB-III) comportan un progresivo riesgo de recaída (SLE a 5 años 78% y 42% respectivamente) y muerte[6]. Las críticas a este método es que carece de marcadores moleculares, y se basa exclusivamente en el volumen del tumor residual. Una segunda limitación es que cualquier tumor residual viable mayor de 1.0 cm. de diámetro entra en la categoría de riesgo moderado – alto, lo cual representa el 70% de los casos.

Existen otros modelos de predicción de supervivencia en función de la respuesta a la QTN. Recientemente el grupo alemán GBG[7] establece otro modelo predicitivo basado en el estadio clínico inicial y el patológico final así como el estado de receptores hormonales y el grado trumoral en una serie de 2453 pacientes con tumores con receptores hormonales positivos , encontrando que las pacientes con un valor superior a 3 tienen una supervivencia libre de progresión del 74 %.

La aparición de cambios moleculares precoces como marcadores predictivos y pronósticos han sido estudiados en profundidad sólo en el caso de la neoadyuvancia hormonal. Con este modelo se observan cambios moleculares precoces a las dos semanas de tratamiento, los cuales dan información predictiva de la respuesta a los 4 - 6 meses. Concretamente, las caídas >50% en el marcador de proliferación celular KI67 a las dos semanas, se traducen en una mayor posibilidad de respuesta final al tratamiento y también en una mayor supervivencia[8]. No existen estudios actuales analizando cambios moleculares precoces en curso de QTN.

Por lo tanto el utilizar marcadores moleculares como predictores de supervivencia constituye un modelo más novedoso y con un mejor enfoque biológico que nos puede ayudar a determinar si estos hallazgos biológicos encontrados en el tumor residual pueden predecir un pronóstico final de las pacientes.

1.1 Técnicas de análisis molecular: tissue microarrays

Las técnicas de análisis molecular a gran escala como los microarrays de DNA han desvelado la gran complejidad de los mecanismos moleculares ligados al cáncer de mama. Varios estudios han demostrado el potencial clínico de los perfiles de expresión genómica, incluyendo la identificación de los distintos fenotipos moleculares[9]. Su valor pronóstico, demostrado en estudios retrospectivos, esta siendo validado de forma prospectiva en grandes estudios internacionales como el MINDACT. Sin embargo, el coste, la complejidad y la dificultad en la interpretación de estas plataformas de DNA limitan el uso en la clínica diaria de esta tecnología.

La oportunidad de identificar y/o validar firmas moleculares mediante otras alternativas como el array matricial de tejidos (TMA) se ha demostrado altamente eficiente. La técnica puede ser ligada a la IHQ con el análisis simultáneo de cientos de muestras. La IHQ es aplicable a las muestras en parafina, evitando la necesidad de muestras congeladas. De hecho, la IHQ sobre TMA es un método práctico tanto para estudios de validación como en la rutina clínica. Un primer estudio de Jacquemier[10], sobre 552 casos consecutivos de cáncer de mama operado, demostró la validez de una firma

molecular en el pronóstico de una población. El análisis incluía 26 proteínas medidas por IHQ y TMA sobre más de 1600 muestras. En el análisis univariante, algunas de las proteínas analizadas (BCL2, GATA3, ER, RPg, a1-catepsina, KI67 y P53) presentaban valor pronóstico. En el análisis multivariante, una firma molecular que incluía 21 de estas proteínas identificaron poblaciones de buen y mal pronóstico ($p < 0.0001$), que junto al tamaño tumoral inicial y la afectación axilar fueron los únicos marcadores independientes.

Recientemente Charpin[11] et al. estudia en una serie de 572 pacientes con ganglios negativos 15 marcadores por IHQ, HIF-1a, PI3K, pAKT, pmTOR, Moesin, P21, BP1, P27, Citoqueratina 5-6, pMAPKAPK2, SHARP2, Claudin-1, ALDH, AF6 y CD24 encontrando un modelo predictivo de buena supervivencia con 5 marcadores: HIF-1a, PI3K, Claudin-1, AF6 y pAKT que llegan a predecir un subgrupo con un 90% de supervivencia libre de progresión a los 8 años .

1.2 Proteínas a estudiar

1.2.1. Fenotipado molecular

La mayor evolución en el conocimiento del cáncer de mama obtenido con las plataformas genómicas ha sido el fenotipado molecular de esta enfermedad. El grupo de Perou[12] identificaron en función de la expresión genética cuatro subtipos moleculares (Luminal A, Luminal B, HER2 y Triple negativo - basal-like). El subtipo molecular confiere no sólo un pronóstico diferente (bueno en los Luminal A, intermedio Luminal B y malo para los grupos HER2 y basal-like), sino una respuesta diferente a los tratamientos sistémicos.

1.2.2. Mecanismos de superación de la apoptosis

El mecanismo de acción más común de los agentes citotóxicos pasa por la activación de vías que llevan a la muerte de las células tumorales mediante la apoptosis. El primer paso es la activación de la expresión de los ligandos de los receptores de muerte y consecuentemente la vía de receptores de muerte mediante la Caspasa 8. El factor TNFα

activa la vía apoptótica mediante su receptor P55. Las caspasas son enzimas con capacidad proteolítica y actualmente se conocen dos vías que activan su cascada para llegar a la muerte por apoptosis. Una es la vía mediada por la familia de proteínas BCL2 y la liberación de Citocromo c de la mitocondria (vía intrínseca). En esta vía el Citocromo c activa la proteína Apaf-1, quien entonces activa la Procaspasa 9 y finalmente lleva a la activación de otras caspasas efectoras.

Se ha visto que la mitocondria es una de las dianas de la toxicidad inducida por TNFα. La otra vía es independiente a la mitocondria (vía extrínseca) y es inducida por la activación de los complejos proteicos de los receptores de muerte que producen la activación de la Caspasa 8. Entre las caspasas, se ha postulado que la presencia de la Caspasa 3 puede incrementar la sensibilidad de las células tumorales a las drogas que inducen apoptosis. Las principales proteínas reguladoras de la apoptosis son las proapoptóticas BCL2 y BCL-XL y la proapoptótica BAX. BCL-XL se une y activa a la proteína Apaf-1, y este efecto es equilibrado por las proteínas proapoptóticas que desplazan BCL-XL de la proteína Apaf-1. Se ha visto que la *Doxorubicina* y *Paclitaxel* producen una disminución de las proteínas proapoptóticas y un incremento de la expresión de BAX.

Clínicamente, los niveles elevados de BAX han sido relacionados con una buena respuesta a la quimioterapia y radioterapia, y al contrario, elevados niveles de BCL2 y BCL-XL se han relacionado con una peor respuesta.

1.2.3. Activación de las vías de señalización

Entre las proteínas que fosforilan AKT se encuentran BAD y NFKβ. En las células MCF-7, PI3K y AKT suprimen la apoptosis inducida por TNF, y estimulan la activación de NFKβ. En esta vía también se ha postulado que la pérdida de PTEN podría llevar a una adopción de resistencias. NFKβ en factor de transcripción con múltiples subunidades regula distintas funciones celulares incluyendo crecimiento celular, diferenciación, apoptosis…En su forma inactiva, reside en el citoplasma unido a inhibidores IkB que bloquean su unión al DNA.

Estímulos externos como los agentes quimioterapéuticos activan a NFKβ por fosforilación y degradación de IkB, entonces NFKβ se transporta en el núcleo y ocurre la transcripción de sus genes diana como la familia IAP y proteínas inhibidoras de

caspasas como TRAF1 y TRAF2, quienes suprimen la activación de la Caspasa 8. También se ha visto que la vía NFKβ puede mediar la supresión de la expresión de BAX.

En muchos estudios se ha descrito la importancia de NFKβ como mediador de la resistencia a *Trastuzumab*, quimioterapia y radioterapia.

El grupo de los receptores de factores de crecimiento con actividad tirosina kinasa, como HER2, EGFR, ER y RP, han sido unos de los factores más estudiados como factores de predicción y pronóstico, ya que su activación promueve diferentes cadenas de transducción como la vía de MAPK y PI3K/AKT.

El gen *HER2* se encuentra amplificado y sobre expresado en un 20-30% de los cáncer de mama invasivos. Respecto a EGFR, como se ha visto que heterodimeriza con HER2, se ha postulado que puede ser una nueva diana de tratamiento, y también se ha postulado que puede mediar la resistencia a las terapias endocrinas. El estatus de receptores ER y RP se está utilizando como factor predictivo de respuesta a terapias endocrinas, aunque hasta un 50% de pacientes muestran resistencias a los tratamientos con inhibidores de aromatasas.

1.2.4. Mecanismos de desregulación del ciclo celular

Las principales proteínas que regulan el ciclo celular son Ciclina D1 y Ciclina E, quienes tienen un papel clave en la progresión del ciclo de fase G1 a S. Cuando estas dos proteínas están sobre expresadas hay una hiperfosforilación de pRB y un incremento de la actividad proliferativa. La Ciclina D1 se encuentra sobre expresada en un 40-50% del cáncer de mama invasivo, y amplificada en un 10-20% de los casos. Los tumores con elevados niveles de Ciclina E resultan ser de más alto grado, con más índice de proliferación y de peor pronóstico que los tumores con altos niveles de Ciclina D1.

La proteína P27 es un regulador negativo del ciclo celular, concretamente es un inhibidor de kinasas dependientes de ciclinas y su función es evitar la entrada al ciclo celular. Se ha visto que P27 está implicada en la modulación de la resistencia a agentes antitumorales. Otra proteína con papel clave en la regulación del ciclo celular es el factor KI67. P53 es otra de las proteínas que participan en el proceso de regulación del ciclo celular. Entre un 20-30% de cáncer de mama se encuentran mutaciones en el gen.

1.2.5. Moléculas de adhesión y otros

Recientemente se han descrito otros marcadores que pueden tener un papel crucial como factores pronóstico del cáncer de mama, estos son el factor de transcripción GATA3 y las moléculas de adhesión Cadherina α1 y E-Cadherina[13] .

1.3 Análisis molecular del tumor residual

La persistencia de tumor residual macroscópico (> 1.0 cm) tras QTN está presente en un 70% de pacientes, y determina un riesgo de recaída a distancia del 35% a 3 años. Carecemos de marcadores pronósticos moleculares que nos identifiquen este grupo de pacientes. Utilizando técnicas de TMA pretendemos monitorizar la expresión de varias proteínas seleccionadas sobre muestras de 250 pacientes con tumor residual viable (> 1.0cm.) tras QTN por cáncer de mama estadio II-III. El presente proyecto pretende identificar *clusters* proteicos sobre el tumor residual con implicaciones pronosticas.

Las proteínas analizadas han sido: 53BP1; ALDH-1; BCL2; Cathepsina L; Ciclina D1 (CIT y NUC); CK 5/6; E-Cadherina (MEMB y CIT); EGFR ER; FGFR2 (MEMB y CIT); GATA3; HER2; HER4 (MEMB, CIT y NUC); KI67; P27; P65 (CIT y NUC); pAKT (CIT y NUC); HER3; RP; PTEN (CIT y NUC); Survivin (CIT y NUC) y VDR.
Varios de los AcMo han sido analizados en función de su tinción citoplasmática, nuclear y/o de membrana de forma separada.

Por último, la valoración de dichos anticuerpos se ha realizado por dos observadores independientes. Se desestimó la utilización del analizador de imagen (ACIS, DAKO) por la imposibilidad de analizar separadamente la expresión nuclear - citoplasmática - de membrana del propio equipo.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La persistencia de tumor residual viable (> 1cm.), o afectación ganglionar tras QTN en cáncer de mama condiciona un riesgo de recaída. La determinación en el tumor residual de variables moleculares y/o firmas moleculares puede contribuir a definir el pronóstico de esta población de alto riesgo. La identificación de marcadores específicos o firmas proteicas permitirá separar sub-poblaciones de buen y mal pronóstico, así como la selección de dianas moleculares potenciales para tratamientos específicos.

Es posible que una firma proteica con inclusión de un panel de proteínas con estrecha relación con mecanismos de resistencia, superación de apoptosis, desregulación del ciclo celular, proliferación, señalización y angiogénesis (53BP1; ALDH-1; BCL2; Cathepsina L; CICLINA D1(CIT y NUC); CK 5/6; E-Cadherina (CIT y NUC); EGFR; ER; FGFR2 (MEMB y CIT); GATA3; HER2; HER4 (MEMB, CIT y NUC); KI67; P27; P65 (CIT y NUC); pAKT (CIT y NUC); HER3; RP; PTEN (CIT y NUC); Survivin (CIT y NUC) y VDR.) permita identificar dos poblaciones con pronóstico diferenciado a pesar de presentar ambas en enfermedad residual tras QTN.

3. OBJETIVOS

3.1 Principal

Identificación de un perfil proteico sobre el tumor residual tras QTN, y en base a 22 proteínas especificas analizadas sobre tissue microarray, capaz de discernir una sub-población de pacientes de buen pronóstico. Hemos definido el grupo de buen pronóstico como el que presente un riesgo de recaída a distancia (metástasis) <15% a cinco años.

3.2 Secundarios

1. Búsqueda de un perfil proteico (firma molecular) resultante del análisis combinado de la expresión proteica del tumor residual con capacidad de identificar una población de buen pronóstico con una mejor SLED.

2. Estudio de un perfil proteico que identifique una población de mejor pronóstico en los subgrupos según expresión de ER.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Pacientes

Hemos incluido un total de 256 muestras de pacientes con tejido residual tras QTN diagnosticadas entre los años 1996 y 2010 de los dos centros participantes en el estudio (HUAV y HAV de Valencia), y de las que se disponia de tejido parafinado viable para efectuar las determinaciones de IHQ para este estudio. No se han incluido 40 muestras dado que al conseguir una pCR no había tejido residual. Por lo que finalmente se han analizado 216 muestras.

Las pacientes seleccionadas cumplían según sus datos clínicos los siguientes criterios de inclusión:

- Diagnóstico histológico de adenocarcinoma infiltrante de mama por trucut - BAG
- Estadio clínico inicial II – III (ausencia de metástasis)
- Quimioterapia sistémica primaria, completando un mínimo de 4 ciclos incluyendo antraciclinas
- Ausencia de cualquier otro tratamiento previo a la cirugía (RT, terapia molecular u hormonal)
- Cirugía radical incluyendo vaciamiento axilar (GC) efectuada en el propio centro
- Tumor residual histológico > 10mm. y con celularidad tumoral viable >10%
- Preservación adecuada y suficiente de material histológico para la realización del tissue array.
- Seguimiento adecuado y cumplimiento clínico del tratamiento.

La revisión de los datos clínicos de las pacientes se llevó a cabo durante los años 2011 y 2012, registrándose el tiempo hasta metástasis o muerte cuando se sucede el evento o el tiempo hasta la fecha de su último seguimiento.

Todas las pacientes en seguimiento dieron su consentimiento firmado. Una hoja de información fue diseñada para este propósito y aprobada por el CEIC del HUAV. Las historias clínicas y documentación radiológica de los pacientes fueron revisadas y se recogieron los siguientes parámetros: fecha de nacimiento, estado menopáusico, fecha de diagnóstico histológico, tipo histológico, grado inicial, infiltración linfovascular,

tamaño clínico del tumor, estadio TNM clínico, tamaño radiológico del tumor, esquema de la QTN, duración de la QTN en semanas, número ciclos de QTN, respuesta clínica final, respuesta radiológica final, respuesta patológica final (*Miller and Pain*), tamaño tumoral residual, porcentaje de células viables, número de ganglios extraídos, número de ganglios afectados, tamaño de la metástasis ganglionar mayor, tipo de cirugía, fecha de la cirugía, tratamiento hormonal adyuvante, tratamiento con quimioterapia adyuvante, tratamiento con radioterapia, tipo de radioterapia, fecha de inicio de la radioterapia, fecha del primer evento tumoral, fecha del primer evento metastásico, fecha del último seguimiento, fecha de muerte y causa de muerte.

4.2 Tejidos

Se analizaron por métodos de inmunohistoquímica sobre el tumor residual los siguientes marcadores relacionados con fenotipos (ER, RPg, HER2, EGFR1 y CK 5/6), apoptosis inducida (BCL2), vías de señalización (PI3K, AKT, PTEN, FGFR2, NFkβ), desregulación del ciclo celular (Ciclina D1, P27 y KI67), factores de transcripción (GATA3) y proteínas de adhesión (E-Cadherina). Se ha correlacionado dicha expresión con la aparición de recaída y con la SLED.

4.3 Diseño del array de tejidos (TMA)

En cada muestra se ha realizado un análisis de expresión de los marcadores seleccionados. Para ello se procedió a: Un diseño, construcción y validación de un TMA. La confección de un esquema del array de tejidos tiene que permitir la identificación de cada cilindro, la disposición de la muestra en el array y la determinación del número de muestras que incluimos en el estudio para asegurar que sean representativas del tumor de origen. Se incluyó en el diseño los controles adecuados. La construcción del array de tejidos se inició con la recolección de muestras y bloques representativos de los carcinomas incluidos en el estudio, así como la confección de la base de datos correspondiente. Los bloques tenían un grosor mínimo de 3mm. y mostraron una adecuada preservación antigénica. De cada muestra se obtuvieron tres cilindros de tejido tumoral de un diámetro de 0,6mm.

Para la construcción del array se utilizó un "*tissue arrayer*" manual de Beecher Instruments, disponible actualmente en el Laboratorio de Investigación del Hospital Universitari Arnau de Vilanova.
Para asegurarnos que las muestras incluidas en el array eran representativas de los tumores de origen se realizó una validación del mismo mediante la tinción aleatoria de 30 casos en el bloque de origen. Posteriormente se realizaron unas tinciones inmunohistoquímicas con los diversos anticuerpos de los marcadores a estudiar y se procedió al análisis estadístico del resultado para demostrar la representatividad de las muestras del array.

4.4 Estudio inmunohistoquímico

Las muestras estaban fijadas en formol tamponado al 10%, e incluidas en parafina. Se realizaron cortes del array de tejidos siguiendo un protocolo específico. Tras el desparafinado con xilol a 60ºC y la hidratación con alcoholes decrecientes, se procedió al desenmascaramiento antigénico con Citrato pH6 en olla a presión con un máximo de 3 minutos. Posteriormente se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 0,03% incubando las muestras durante 5 minutos. Se incubó la muestra con los anticuerpos primarios de marcadores. Tras lavados con PBS, las secciones se incubaron durante 60 minutos siguiendo el método de la *Streptavidina* marcada (HRP) y se llevó a cabo su revelado con diaminobencidina durante 5 minutos.

Finalmente, se contrastaron las secciones con hematoxilina acuosa de Mayer, se deshidrataron y se montaron de forma permanente. Para valorar la integridad antigénica de las muestras, se efectúo una tinción inmunohistoquímica mediante Ki-67 y Vimentina, que permite valorar la integridad antigénica de las proteínas nucleares y citoplasmáticas. Aquellos casos en que la expresión de estos antígenos no era la esperada se excluyeron de la interpretación de las proteínas objeto de estudio. Para la valoración IHQ se utilizó un *histoscore* que combina el porcentaje de células positivas con la intensidad de tinción.

La IHQ fue valorada por dos observadores independientes, con una sesión conjunta para valorar los casos discrepantes. En un 15% de los cilindros (incluyendo los que había

discrepancia entre los observadores) se realizó verificación mediante el analizador de imagen de IHQ (ACIS, Dako) del que se dispone en los laboratorios del IRBLleida.

Tabla 4.1: Detalle de los anticuerpos utilizados para el análisis de IHQ

Anticuerpo	Tipo Ac	Clon	Compañía	Dilución	Kit Anticuerpo Secundario	Control
53BP1	PaB	NB100-304	Novus Biologicals	1/2500	Envision Flex (Dako)	Tj Normal Próstata
ALDH-1	MaB	44	BD Transduction Laboratories	1/100	Envision Flex (Dako)	Carcinoma Pulmonar
Bcl-2	MaB	124	DAKO	ready-to-use	Envision Flex (Dako)	Tj Normal Amígdala
Capthesin L	PaB	S-20	Santa Cruz Biotecnology	1/50	Streptovidina-Biotina (Dako)	Carcinoma de Bufeta
CICLINA D1	MaB	EP12	DAKO	ready-to-use	Envision Flex (Dako)	Linfoma del Manto
CK 5/6	MaB	D5/16 B4	DAKO	ready-to-use	Envision Flex (Dako)	Tj Normal Amígdala
E-cadherina	MaB	NCH-38	DAKO	ready-to-use	Envision Flex (Dako)	Carcinoma Colorectal
EGFR	MaB	2-18C9	DAKO	ready-to-use	EGFR pharmaDx (Dako)	Celular perteneciente al Kit
ER	MaB	1D5	DAKO	ready-to-use	Envision Flex (Dako)	Tj Normal de Mama
FGFR2	MaB	ab58201	ABCAM	1/200	Envision Flex (Dako)	Carcinoma Intestinal
GATA-3	MaB	HG3-31	Santa Cruz Biotecnology	1/50	Envision Flex (Dako)	Tj Normal Amígdala
HER 2	MaB		DAKO	ready-to-use	HercepTest (Dako)	Celular perteneciente al Kit
HER 4	PaB	RB-9045	Thermo Scientific	1/2	Envision Flex (Dako)	Control de Her2
KI67	MaB	MIB-1	DAKO	ready-to-use	Envision Flex (Dako)	Tj Normal Amígdala
p27	MaB	SX53G8	DAKO	1/50	Envision Flex (Dako)	Tj Normal Amígdala
p65	PaB	c-20	Santa Cruz Biotecnology	1/600	Envision Flex (Dako)	Tj Normal Amígdala
pAKT	MaB	736E11	Cell Signaling	1/50	Envision Flex (Dako)	Carcinoma Próstata
pHER3	MaB		Cell Signaling	1/200	Envision Flex (Dako)	Control de Her2
PR	MaB	PgR 636	DAKO	ready-to-use	Envision Flex (Dako)	Tj Normal de Mama
PTEN	MaB	6H2.1	DAKO	1/50	Envision Flex (Dako)	Carcinoma de Enometrio
SURVIVIN	MaB	D-8	Santa Cruz Biotecnology	1/50	Envision Flex (Dako)	Carcinoma Colorectal
VDR	PaB	ab3508	ABCAM	1/2000	Envision Flex (Dako)	Tj Normal de Riñón

4.5 Cálculo del tamaño muestral

Los cálculos iniciales del tamaño muestral establecieron la inclusión de un mínimo de 167 muestras, garantizando una potencia estadística del 80%, asumiendo una SLED en el grupo de buen pronóstico del 90% a 5 años y del 50% en el grupo de mal pronóstico con un 37% de eventos metastásicos. Debido a que la determinación por IHQ no fue realizable para todos los biomarcadores, por falta de tejido, se decidió ampliar el número de muestras incluidas hasta un total de 256, para que de esta manera se pudiera contar con un mínimo de 167 muestras con todos los biomarcadores analizados. Para lograr dicho tamaño muestral se contó con la colaboración del HAV de Valencia.

En la base de datos del HUAV se identificaron 174 pacientes sometidas a QTN en el período 1990 - 2005. La tasa de eventos metastásicos observados en esta población de pacientes fue del 27% (48 casos) a cinco años. En el HAV de Valencia se han identificado 81 pacientes con un 40% de recaídas (32 casos). Por lo tanto el tamaño final de la muestra es de 256 pacientes con un total de 80 eventos lo que supone un índice de recaídas a distancia del 31%.

4.6 Análisis bioinformático y estadístico de datos

En primer lugar, se efectuó un análisis descriptivo de las variables incluidas en la base de datos, identificando y corrigiendo convenientemente los valores extremos y/o faltantes.

En segundo lugar, se procedió a realizar un estudio univariante para evaluar el valor predictivo de cada uno de los biomarcadores, por lo que refiere a su immunoexpresión en escala original (de 0 a 300 en HS), respecto a la aparición de metástasis y SLED. Además, también se consideraron 4 categorizaciones de los valores de inmunoexpresión: (1) considerando cuando la expresión por IHQ es mayor a cero, (2) a partir de la mediana (2 categorías) y (3) a partir de los cuartiles (4 categorías) y (4) a partir de un punto de corte óptimo para la discriminación de la aparición de metástasis, utilizando para ello el criterio de *Gini*. Para evaluar la asociación de los biomarcadores con la respuesta se ajustaron modelos de regresión logística, a partir de los cuales se obtuvieron estimaciones de los *Odds-ratio* (OR) y sus respectivos intervalos de

confianza al 95%. También se pudieron obtener los respectivos p-valores y se utilizó el pseudo coeficiente de determinación de *Nagelkerke* para medir el grado de predictibilidad de cada marcador.
Por otro lado, también se calcularon las estimaciones de *Kaplan-Meier* para evaluar el SLED, y se ajustaron diferentes modelos de riesgos proporcionales de *Cox*, obteniendo los respectivos *Hazard ratios* (HR) y p-valores, utilizando la prueba no paramétrica del *log-rank* para evaluar diferentes SLED según los grupos de riesgo definidos por los biomarcadores.

En tercer lugar, se efectuó un estudio multivariante para analizar qué conjunto de biomarcadores presentaba un buen valor predictivo de metástasis o SLED. Para ello, se utilizó un algoritmo *Stepwise* para seleccionar diferentes conjuntos de biomarcadores con un valor predictivo conjunto estadísticamente significativo. De esta forma, se pudo establecer una firma molecular a partir de un conjunto de biomarcadores, definiendo para cada uno de ellos una condición de mal pronóstico a partir de un punto de corte en la escala HS. Con el objetivo de evaluar su efecto conjunto, se calculó para cada una de las pacientes el número de condiciones satisfechas, determinando entonces el número de condiciones a partir del cual se constataba un aumento en la aparición de metástasis. Esta firma se evaluó mediante pruebas estadísticas de independencia (*Xi-cuadrado* y *Fisher*), y también se calcularon los OR y HR según el número de condiciones satisfechas.

En cuarto lugar, se realizó un estudio de sensibilidad y especificidad para evaluar el valor pronóstico de la firma molecular por lo que refiere a su habilidad para predecir recaídas, estimando los intervalos de confianza al 95% correspondientes.

Por último, también se analizó el valor pronóstico de cada uno de los biomarcadares, específicamente y separadamente para pacientes ER+ y ER-. No se efectuó el análisis multivariable para la búsqueda de una firma molecular específica dado que el tamaño de la muestra no lo permitió.

Para los análisis estadísticos se utilizaron los programas SPSS versión 21 y R, estableciendo un nivel de significación de α=0.05.

5. RESULTADOS GLOBALES

5.1 Descripción global de la serie

Se han revisado un total de 256 muestras de pacientes con cáncer de mama que han recibido tratamiento con QTN desde los períodos de abril de 1997 hasta octubre de 2010 y se dispone de su seguimiento clínico. Se evaluó por IHQ la expresión de un conjunto formado por 22 marcadores (proteínas), que se detallan a continuación: ALDH, 53BP1, BCL2, CICLINA CITO, CICLINA NUCLEAR, CK 5/6, Cadherina MEM, CADERINA CIT, EGFR, FGRF2 CIT, FGFR2 NUC, HER4 MEM, HER4 CIT, HER4 NUC, P27, ER, KI67, HER2, NFKβ CIT, NFKβ NUC, pAKT CIT, pAKT NUC, HER3, RP, PTEN CIT, PTEN NUC, Survivin CIT, Survivin NUC, y GATA3 del tejido residual y se ha correlacionado con las variables clínicas principales que pueden dar un valor pronóstico como son la presencia de recidiva a distancia (metástasis, M) , y la supervivencia hasta la aparición de recidiva a distancia (SLED). No se ha evaluado la SG dado que el bajo número de eventos (19% de *exitus*) no son suficientes para poder hacer un estudio estadístico.

Tabla 5.1: Relación de seguimiento de las muestras y aparición de metástasis

	Met.	NO Met.	Seguimiento media (rango)	EXITUS	PERDIDOS
HUAV Lleida	48(28%)	125 (72%)	52,9 m (1-188)	31 (24%)	10 (5%)
HAV Valencia	32 (40%)	49 (60%)	81 m (3-178)	18 (22%)	2 (2%)
Total	80 (32%)	174(68%)	68 m (1-188)	49 (19%)	12 (4%)

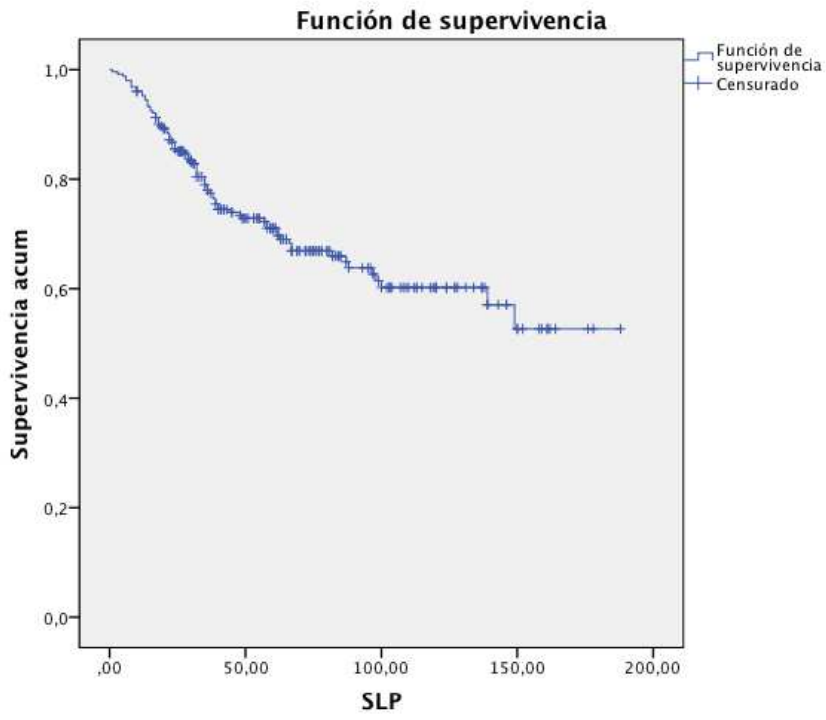
El tiempo medio de seguimiento de la serie es de 68 meses (rango 1-188). Se ha calculado la SLED en meses desde el diagnóstico inicial hasta la fecha de la primera recidiva a distancia.

Tabla 5.2: Resultados de la SLED para la aparición del evento (metástasis)

	Núm.	Eventos	Estim. Kaplan-Meier	
			Media	IC 95%
HUAV Lleida	172	47 (27%)	130,8 m	116,6 - 145,0
HAV Valencia	81	32 (39%)	119,2 m	103,5 - 134,4
Total	253	79 (31%)	126,5 m	115,4 - 137,6

La supervivencia media según el método de *Kaplan-Meier* es de 126 meses (desviación estándar de 5,56) y con unos límites de 115-137 meses. La mediana de supervivencia de la serie global no se ha alcanzado todavía. La SLED calculada a 5 años es del 70% por método de *Kaplan-Meier*.

Figura 5.1 : Curva de SLED de la serie global



5.2. Características de las pacientes

Todas las pacientes recibieron QTN con esquemas de antraciclinas, taxanos o ambos, al presentar criterios de recibir tratamiento neoadyuvante ya sea por el tamaño del tumor o por el perfil biológico.

Tabla 5.3: Características clínicas más relevantes de la serie

VARIABLES	INTERVALOS	MEDIA	DESV. STAND	LÍMITES
EDAD	<40:39 (15%) 40-65:169 (66%) >65:48 (19%)	53,12	12,71	17 – 86 años
T.INICIAL	<2 cm: 28 (11%) 2-5 cm: 155 (60%) > 5 cm: 73 (28%)	4,6 cm	2,11	2 cm – 9 cm
T.FINAL	<1 cm: 75 (29%) 1-3 cm: 110 (43%) > 3 cm: 66 (26%)	2,52 cm	2,57	0 – 25
GANGLIOS	0: 105 (59%) 1-3: 82 (32%) > 3: 67 (26%)	2,87	4,59	0 - 37
CICLOS QT	<4: 83 (32%) 4-6:48 (19%) > 6: 124 (48%)	6,08	2,09	2 - 10

Las características de las pacientes se adaptan bastante bien a una serie de pacientes que reciben tratamiento neoadyuvante, con una edad más joven de lo que representa el cáncer de mama en general y con tamaños en el inicio bastante grandes, ya que es uno de los parámetros más importantes a la hora de planificar un tratamiento con QTN.

En cuanto a las respuestas obtenidas al tratamiento con QTN, se ha conseguido 40 pCR (15%), 68 (25%) con una disminución del tumor inicial superior al 75% y en 149 no se ha conseguido ninguna respuesta (58%). El porcentaje relativamente alto de respuestas completas se justificaría por la inclusión de pacientes con fenotipo HER2 y ER negativos, debido a que son las que más respuestas obtienen con el tratamiento neoadyuvante.

Se ha efectuado un análisis multivariable de todas las variables clínicas citadas en la tabla anterior para el riesgo de metástasis según un modelo de regresión logística y para SLED según un modelo de *Cox*, encontrándose una asociación con mayor riesgo de metástasis y SLED con las variables tamaño inicial y la presencia de ganglios residuales.

Tabla 5.4: Resultados de los análisis univariable y multivariable de las variables clínicas

REGRESIÓN LOGÍSTICA : MODELO UNIVARIABLE						**MODELO MULTIVARIABLE**			
		p-Val	OR	I.C. 95% para OR		p-Val	OR	I.C. 95% para OR	
				Inferior	Superior			Inferior	Superior
GANGLIOS	0 GANGLIOS		1				1		
	1-3 GANGLIOS	**0,001**	3,39	1,64	7,01	**0,001**	3,77	1,75	8,08
	>3 GANGLIOS	**0,001**	7,46	3,56	15,64	**0,001**	7,4	3,38	16,17
T INICIAL	T INICIAL	**0.001**	1,36	1,18	1,55	**0,001**	1,315	1,14	1,51
CICLOS QT	ciclos	0,698	1,13	0,59	2,16				
TAM FINAL	TFINAL	0,477	1,07	0,88	1,31				
EDAD	EDAD	0,752	0,99	0,97	1,01				
MODELO DE COX: MODELO UNIVARIABLE						**MODELO MULTIVARIABLE**			
		p-Val	HR	95,0% IC para OR		p-Val	HR	95,0% IC para OR	
				Inferior	Superior			Inferior	Superior
T INICIAL	T INICIAL	**0,001**	1,22	1,117	1,35	**0,004**	1,17	1,05	1,30
GANGLIOS	GANG : 0		1				1		
	GANG: 1-3	**0,004**	2,56	1,35	4,87	**0,001**	2,96	1,53	5,73
	GANG >3	**0,001**	4,85	2,61	9,02	**0,001**	4,99	2,57	9,68
EDAD	EDAD	0,641	0,99	0,97	1.01				
CICLOS QT	CICLOS QT	0,494	1,04	0,93	1,16	**0,025**	1,14	1.01	1,28
TAM FINAL	T FINAL	**0,012**	1,07	1,01	1,12				

Dado que la expresión de receptores de estrógenos divide claramente dos poblaciones diferentes de cáncer de mama con un comportamiento pronóstico muy distinto, resulta interesante analizar si existen diferencias en el comportamiento de estas variables clínicas en función de la expresión de los receptores de estrógenos. Para ello se ha efectuado el mismo análisis en función de la expresión de receptores de estrógenos.

Tabla 5.5: Análisis de los factores clínicos para ER: 0

REGRESION LOGISTICA : MODELO UNIVARIABLE						**MODELO MULTIVARIABLE**			
		p-Val	OR	I.C. 95% para OR		p-Val	OR	I.C. 95% para OR	
				Inferior	Superior			Inferior	Superior
GANGLIOS	0 GANGLIOS		1				1		
	1-3 GANGLIOS	0,196	1,88	0,72	4,91	0,087	2,43	0,87	6,75
	>3 GANGLIOS	**0,002**	4,44	1,75	11,27	**0,001**	5.74	2,10	15,70
T INICIAL	T INICIAL	**0,011**	1,26	1.05	1,50	**0,009**	1,29	1,06	1,56
CICLOS QT	ciclos	0,374	1,07	0,91	1,27				
T FINAL	TFINAL	0,366	1,06	0,93	1,21				
EDAD	EDAD	0,940	0,99	0,97	1,02				
MODELO DE COX: MODELO UNIVARIABLE						**MODELO MULTIVARIABLE**			
		p-Val	HR	95,0% IC para OR		p-Val	HR	95,0% IC para OR	
				Inferior	Superior			Inferior	Superior
T INICIAL	T INICIAL	**0,017**	1,15	1,02	1,29	**0,016**	1,17	1.03	1,33
GANGLIOS	GANG : 0		1				1		
	GANG: 1-3	0,228	1,61	0,74	3,51	0,067	2,13	0,94	4,82
	GANG >3	**0,005**	2,76	1,36	5,60	**0,001**	3,37	1,60	7,06
EDAD	EDAD	0,870	1,00	0,98	1,02				
CICLOS QT	CICLOS QT	**0,026**	1,15	1,01	1,32	**0,03**	1,22	1,07	1,39
T FINAL	T FINAL	0,538	1,02	0,95	1,10				

Para las pacientes con receptores de estrógenos negativos, las variables clínicas con mayor significación son el tamaño inicial y los ganglios residuales. Aunque en el modelo multivariable, sólo los ganglios residuales mantienen la significación, siendo en la práctica clínica habitual el factor de peor pronóstico reconocido en este grupo de pacientes.

Tabla 5.6: Análisis de los factores clínicos para ER>0

REGRESIÓN LOGÍSTICA : MODELO UNIVARIABLE						MODELO MULTIVARIABLE			
		p-Val	OR	I.C. 95% para OR		p-Val	OR	I.C. 95% para OR	
				Inferior	Superior			Inferior	Superior
GANGLIOS	0 GANGLIOS		1				1		
	1-3 GANGLIOS	**0,011**	15,32	1,86	125,61	**0,013**	14,84	1,75	125,39
	>3 GANGLIOS	**0,003**	25,07	2,91	216,17	**0,011**	17,16	1,89	155,2
T INICIAL	T INICIAL	**0,001**	1,564	1,21	2,01	**0,007**	1,445	1,10	1,89
CICLOS QT	ciclos	0,693	0,952	0,74	1,21				
T FINAL	TFINAL	**0,009**	1,331	1,07	1,65				
EDAD	EDAD	0,184	0,973	0,93	1,01				
MODELO DE COX: MODELO UNIVARIABLE						**MODELO MULTIVARIABLE**			
		p-Val	HR	95,0% IC para OR		p-Val	HR	95,0% IC para HR	
				Inferior	Superior			Inferior	Superior
T INICIAL	T INICIAL	**0,001**	1,4	1,16	1,68				
GANGLIOS	GANG : 0		1				1		
	GANG: 1-3	**0,017**	12,21	1,57	94,67	**0,022**	10,94	1,41	84,95
	GANG >3	**0,002**	25,79	3,25	204,42	**0,007**	17,91	2,18	146,82
EDAD	EDAD	0,113	0,97	0,93	1,00				
CICLOS QT	CICLOS QT	0,710	1,04	0,82	1,33				
T FINAL	T FINAL	**0,001**	1,31	1,13	1,53	**0,015**	1,22	1,04	1,44

Para ER positivos, los ganglios residuales y el tamaño inicial tienen significación para un mayor riesgo de metástasis en el modelo multivariable. Resulta llamativo que en el grupo de tumores menores de 2cm. ninguno de los 12 pacientes con ER positivos

desarrolla metástasis mientras que en los tumores con receptores negativos, 5 de las 11 pacientes progresan. Por lo tanto se destaca la importancia pronostica de la ausencia de expresión de ER sobre en el tamaño tumoral, dado que incluso en los tumores de menos de 2cm., el tener ER negativos le confiere un factor de mal pronóstico.

También es importante destacar la influencia de la afectación ganglionar sobre todo en el grupo de pacientes con ER>0, donde la afectación ganglionar supone un incremento de riesgo de metástasis de 12 y 25 en función si hay de 1-3 ganglios o más de 3 ganglios residuales. Este incremento de riesgo es menos notable en el grupo de ER=0 que pasa de 2 a 4 veces más de riesgo. La explicación sería que debido a que el grupo de ER>0 y sin afectación en ganglios residuales es un grupo de excelente pronóstico (solo hay un evento de las 40 pacientes de dicho grupo) y el aumento es proporcionalmente mayor conforme hay afectación ganglionar que en el grupo de ER=0 donde en el grupo sin afectación ganglionar residual tiene un peor pronóstico (11 eventos de las 40 pacientes de dicho subgrupo) y por tanto el incremento del riesgo conforme hay mayor afectación ganglionar residual es proporcionalmente menor.

Tabla 5.7: Relación de eventos en función de la afectación ganglionar en los diferentes grupos en función de expresión de ER

ER=0			**ER>0**		
GANGLIOS	Total	Eventos	GANGLIOS	Total	Eventos
0 ganglios	40	11	0 ganglios	40	1
1-3 ganglios	36	15	1-3 ganglios	39	11
+ 3 ganglios	42	26	+ 3 ganglios	23	9

También se ha efectuado una grafica de supervivencia en función de la expresión de receptores de estrógenos según método de Kaplan-Meier y con su significación estadística por método log-rank.

Figura 5.2: Gráfica de supervivencia de los dos grupos en función de la afectación ganglionar residual para ER=0

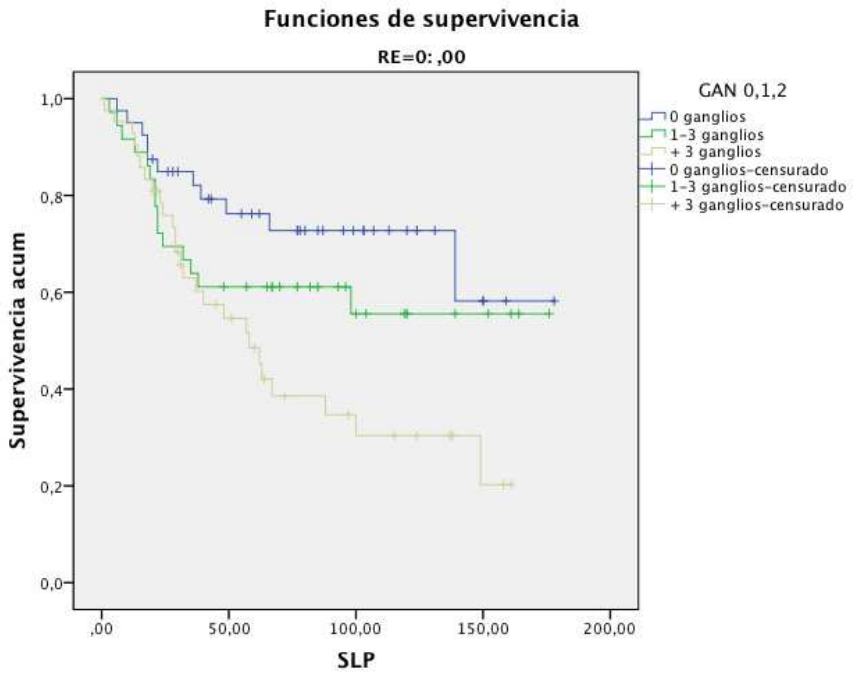


Tabla 5.8: Detalle de las medias de supervivencia de los 3 sub-grupos en ER=0

ER=0 Medias del tiempo de supervivencia			
GANGLIOS	Estimación	Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior
0 ganglios	131,993	109,283	154,704
1-3 ganglios	111,056	85,936	136,175
+ 3 ganglios	76,126	56,983	95,269
P-Valor: 0,010			

Figura 5.3: Gráfica de supervivencia de los dos grupos en función de la afectación ganglionar residual para ER>0

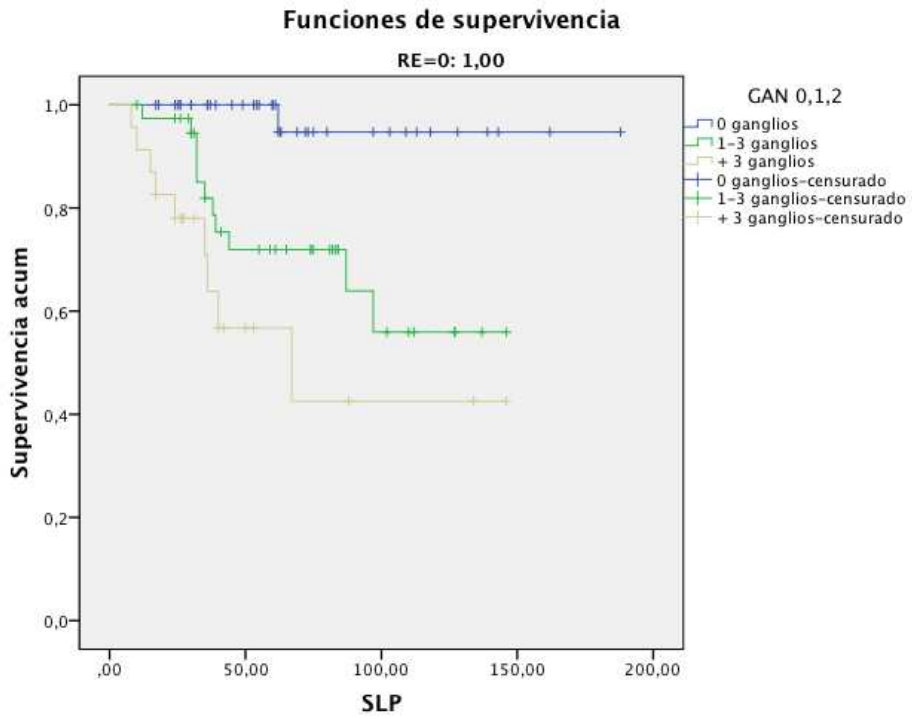


Tabla 5.9: Detalle de las medias de supervivencia de los 3 subgrupos en ER>0

ER>0 Medias del tiempo de supervivencia			
GANGLIOS	Estimación	Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior
0 ganglios	181,368	168,717	194,02
1-3 ganglios	105,713	86,704	124,722
+ 3 ganglios	82,784	52,478	113,09
P-Valor <0,0001			

5.3 Perfiles de las muestras

Tabla 5.10: Características biológicas más habituales del total de la serie de 256 pacientes, expresión de ER y progesterona, HER2 e índice de proliferación de KI67

VARIABLES	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
R. ESTRÓGENOS	103 (46%)	122 (54%)	220 (100%)
R. PROGESTERONA	109 (50%)	113 (50%)	222 (100%)
HER 2 (+++ o FISH+)	40 (18%)	176 (82%)	216 (100%)
KI 67<20	86 (47%)	97 (53%)	183 (100%)

Se observa que la expresión de dichas variables están en concordancia con las series de pacientes en tratamiento neoadyuvante publicados en la literatura, donde se observa una mayor proporción de pacientes con ER negativos.

6. RESULTADOS DE LAS DIFERENTES VARIABLES: VALORACIÓN GLOBAL PARA VARIABLE METÁSTASIS (M)

Se han analizado la expresión de los siguientes biomarcadores por immunohistoquímica (IHQ): ALDH, 53BP1, BCL2, Ciclina CITO, Ciclina *nuclear*, CK 5/6, Cadherina *membrana*, Cadherina *citoplasmática*, EGFR, FGRF2 *citoplasmática*, FGFR2 *nuclear*, HER4 *membrana*, HER4 *citoplasmática*, HER4 *nuclear*, P27, ER, KI67, HER2, NFKβ *citoplasmática*, NFKβ *nuclear*, pAKT *citoplasmática*, pAKT *nuclear*, HER3, RP, PTEN *citoplasmática*, PTEN *nuclear*, Survivin *citoplasmática*, Survivin *nuclear*, y GATA3 del tejido residual y se han correlacionado con la variable pronostica definida como aparición de metástasis (M).

El valor definitivo de la expresión de IHQ se ha determinado en función de las réplicas obtenidas, en el caso de tener varias réplicas se ha determinado la media de la expresión por histoscore. En caso de que la expresión de proteína sea de membrana se ha utilizado la expresión basada en 3 niveles (negativa, intermedia y alta como 0, 1 y 2) y se ha escogido la de mayor expresión (caso de la Citoqueratina 5/6, Cadherina de *membrana*, EGFR, HER4 de *membrana* y HER2).

6.1 Evaluación del valor pronóstico individual de cada uno de los marcadores: UNIVARIABLE

Hemos ajustado un modelo de regresión logística para evaluar el valor pronóstico (M: si/no) a partir de los niveles de expresión por IHQ en la escala cuantitativa original obtenida de cada uno de los marcadores de forma individual.

Tabla 6.1: Análisis univariable de los biomarcadores en expresión cuantitativa

BIOMARC.	Odds Ratio	Intervalo confianza 95%	p-valor	R^2 Nagelkerke
RE	**0,99**	**0,99 (0,98 - 0,99)**	**0,0002**	**0,10**
KI67	**1,02**	**1,02 (1,01 - 1,03)**	**0,001**	**0,08**
BCL2	**0,99**	**0,99 (0,98 - 0,99)**	**0,01**	**0,05**
HER4 CIT	1,01	1,01 (0,99 - 1,01)	0,07	0,03
pAKT NUC	0,99	0,99 (0,98 - 1,00)	0,12	0,02
GATA3	0,99	0,99 (0,99 - 1,01)	0,15	0,02
EGFR	1,54	1,54 (0,77 - 3,07)	0,21	0,01
p65 CIT	0,99	0,99 (0,99 - 1,00)	0,21	0,01
CIC NUC	1,00	1,00 (0,99 - 1,00)	0,25	0,01
PTEN CIT	0,99	0,99 (0,99 - 1,00)	0,26	0,01
PTEN NUC	0,99	0,99 (0,99 - 1,00)	0,29	0,01
P27	0,99	0,99 (0,99 - 1,00)	0,29	0,01
ECAD MEM	1,19	1,19 (0,84 - 1,75)	0,32	0,01
pAKT CIT	0,99	0,99 (0,98 - 1,00)	0,32	0,01
p65 NUC	1,01	1,00 (0,99 - 1,01)	0,36	0,01
PR	0,99	0,99 (0,99 - 1,00)	0,36	0,01
HER2	1,31	1,31 (0,63 - 2,64)	0,45	0,00
CIC CIT	1,01	1,00 (0,99 - 1,01)	0,47	0,00
HER4 NUC	0,99	0,99 (0,97 - 1,00)	0,47	0,00
SURV NUC	0,99	0,99 (0,99 - 1,00)	0,48	0,00
FGFR2 CIT	0,99	0,99 (0,99 - 1,00)	0,57	0,00
ALDH	1,18	1,18 (0,63 - 2,22)	0,58	0,00
FGFR2 NUC	0,99	0,99 (0,99 - 1,00)	0,66	0,00
CK5/6	0,89	0,89 (0,51 - 1,54)	0,68	0,00
SURV CIT	0,99	0,99 (0,99 - 1,00)	0,69	0,00
BP1	0,99	0,99 (0,99 - 1,00)	0,84	0,00
ECAD CIT	1,00	1,00 (0,99 - 1,00)	0,89	0,00
pHER3	1,00	1,00 (0,99 - 1,00)	0,93	0,00
HER4 MEM	0,99	0,99 (0,65 - 1,48)	0,97	0,00

Observamos la existencia de tres marcadores potencialmente asociados a un valor pronóstico de metástasis. Concretamente valores elevados de KI67 y bajos de ER y BCL2 estarían asociados a mayores probabilidades de metástasis.

Dado que en muchas de las variables de biomarcadores no hay datos en la bibliografía del valor pronóstico de su expresión, se han analizado los resultados obtenidos cuando tomamos en consideración las variables cualitativas al categorizar los niveles de IHQ de cuatro formas diferentes: (1) considerando cuando la expresión por IHQ es mayor a cero, (2) a partir de la mediana (2 categorías) y (3) a partir de los cuartiles (4 categorías) y (4) a partir de un punto de corte óptimo para la discriminación de la aparición de metástasis.

A continuación se detallan los resultados obtenidos según estas 4 formas de categorización de las variables:

Tabla 6.2: Análisis univariable de los biomarcadores en función de su expresión>0

BIOMARC.	Odds Ratio	Intervalo confianza 95%	p-valor	R^2 Nagelkerke
RE =0	**3,03**	**3,03 (1,69 - 8,58)**	**0,0002**	**0,08**
PR =0	**1,85**	**1,85 (1,06 - 3,33)**	**0,03**	**0,03**
PTEN CIT =0	**2,77**	**2,77 (1,02 - 8,33)**	**0,04**	**0,03**
BCL2 =0	1,88	1,88 (0,84 - 4,16)	0,13	0,02
pHER3 >0	1,56	1,56 (0,83 - 2,93)	0,16	0,02
P27 =0	1,85	1,85 (4,76 - 0,71)	0,20	0,01
EGFR >0	1,54	1,54 (0,77 - 3,07)	0,21	0,01
PTEN NUC =0	1,51	1,55 (0,78 - 2,85)	0,22	0,01
HER4 NUC =0	1,66	1,66 (0,76 - 3,84)	0,22	0,01
pAKT NUC =0	1,47	1,47 (0,79 - 2,71)	0,23	0,01
CIC CIT =0	1,51	1,51 (0,76 - 3,03)	0,24	0,01
SURV CIT >0	2,07	2,07 (0,61 - 9,41)	0,28	0,01
GATA3 =0	1,42	1,42 (0,74 - 2,85)	0,30	0,01
CIC NUC =0	1,35	1,35 (0,71 - 2,56)	0,36	0,01
HER2 >0	1,31	1,31 (0,63 - 2,64)	0,45	0,00
ECAD CIT >0	1,51	1,51 (0,42 - 7,10)	0,55	0,00
pAKT CIT =0	1,19	1,19 (0,62 - 2,32)	0,58	0,00
ALDH >0	1,18	1,18 (0,63 - 2,22)	0,59	0,00
SURV NUC =0	1,88	1,88 (0,07 - 50)	0,66	0,00
BP1 >0	1,66	1,66 (0,20 - 34,26)	0,67	0,00
HER4 MEM >0	1,13	1,13 (0,61 - 2,11)	0,69	0,00
CK 5/6 =0	1,12	1,12 (0,64 - 1,96)	0,69	0,00
ECAD MEM >0	1,31	1,31 (0,35 - 6,26)	0,70	0,00
FGFR2 NUC =0	1,12	1,12 (0,54 - 2,38)	0,77	0,00
FGFR2 CIT =0	1,08	1,08 (0,49 - 2,32)	0,84	0,00
p65 CIT >0	1,16	1,16 (0,22 - 8,53)	0,87	0,00
KI67 >0	1,09	1,09 (0,20 - 8,07)	0,92	0,00
p65 NUC >0	1,01	1,01 (0,55 - 1,88)	0,95	0,00
HER4 CIT >0	NA	NA	0,99	0,01

Los valores de expresión a nivel de 0 frente a superior a 0 han salido asociados a mayores probabilidades de metástasis para ER, PR y PTEN *citoplasmático*. Siendo el

valor de ER el que presenta una asociación estadísticamente más significativa. Se han analizado estas 3 variables en tablas de contingencia 2x2 para calcular los porcentajes de aparición de metástasis y calcular el riesgo relativo del mismo.

Tabla 6.3: Tabla de contingencia de PTEN, ER y RP

VARIABLES	M: SI	M:NO	p-valor	OR (INTERVALO)
PTEN CIT : 0	10 (59%)	7 (41%)	0,04	0,36 (0,12 - 0,98)
>0	57 (34%)	111 (66%)		
ER : 0	34 (50%)	35 (50%)	0,002	0,33 (0,18 - 0,59)
>0	43 (28%)	112 (72%)		
RP : 0	47 (42%)	65 (58%)	0,03	0,54 (0,30 - 0,94)
>0	28 (26%)	80 (74%)		

La expresión de PTEN=0 se asocia de forma significativa a ER negativos, por lo que el valor pronóstico de dicha variable podría ser explicado por esta asociación.

Tabla 6.4: Asociación entre PTEN y ER

	PTEN CIT = 0	PTEN CIT > 0	
ER : 0	13(12%)	93 (88%)	106(100%)
ER >0	3 (4%)	75(96%)	78(100%)
TOTAL	16(9%)	168(91%)	184 (100%)
P:0,038			

Destacando que únicamente 3 de los 16 casos PTEN CIT=0 tienen expresión de receptores de estrógenos. Aunque en la mayoría de la serie hay una expresión de PTEN>0

Tabla 6.5: Análisis univariable según nivel de expresión mayor a la media

BIOMARC.	Odds. Ratio	Intervalo confianza	p-valor	R^2 Nagelkerke

		95%		
RE=0	**3,03**	**3,03 (1,69 - 5,55)**	**0,0002**	**0,08**
KI67>15	**2,65**	**2,65 (1,42 - 5,04)**	**0,0024**	**0,07**
PR<9	**2,12**	**2,12 (1,21 - 3,84)**	**0,009**	**0,04**
BCL2<130	**2,12**	**2,12 (1,16 - 3,99)**	**0,015**	**0,04**
pAKT CIT<50	2,04	2,04 (1,01 - 4,54)	0,06	0,03
PTEN NUC<60	1,75	1,75 (0,96 - 3,33)	0,07	0,02
GATA3<87,5	1,78	1,78 (0,94 - 3,44)	0,08	0,03
pAKT NUC<17,5	1,58	1,58 (0,86 - 3,03)	0,13	0,02
pHER3>5	1,54	1,54 (0,83 - 2,88)	0,17	0,01
CIC NUC>80	1,50	1,55 (0,82 - 2,74)	0,18	0,01
P27<90	1,47	1,47 (0,81 - 2,77)	0,20	0,01
EGFR>0	1,55	1,54 (0,77 - 3,07)	0,21	0,01
HER4 NUC<0	1,66	1,66 (0,76 - 3,84)	0,22	0,01
SURV CIT<60	1,26	1,26 (0,68 - 2,38)	0,45	0,00
HER2>0	1,31	1,31 (0,63 - 2,64)	0,45	0,00
FGFR2 CIT<90	1,25	1,25 (0,68 - 2,32)	0,47	0,00
BP1>105	1,34	1,33 (0,59 - 3,00)	0,48	0,01
p65 NUC>10	1,22	1,22 (0,66 - 2,23)	0,52	0,00
PTEN CIT<100	1,21	1,21 (0,66 – 2,27)	0,53	0,00
HER4 CIT>117,5	1,22	1,21 (0,65 - 2,26)	0,53	0,00
ALDH=0	1,19	1,18 (0,63 - 2,22)	0,59	0,00
SURV NUC<100	1,92	1,92 (0,64 - 2,22)	0,60	0,00
CIC CIT<20	1,13	1,13 (0,62 - 2,08)	0,67	0,00
HER4 MEM>0	1,14	1,13 (0,61 - 2,11)	0,69	0,00
CK=0	1,12	1,12 (0,64 - 1,96)	0,69	0,00
ECAD CIT<140	1,09	1,09 (0,61 - 2,04)	0,75	0,00
FGFR2 NUC=0	1,11	1,11 (0,54 - 2,38)	0,77	0,00
p65 CIT>130	1,01	1,01 (0,55 - 1,85)	0,96	0,00
ECAD MEM>3	NA	NA	NA	NA

Al salir significativos los valores de expresión de BCL2, RE, RP y KI67 no se han efectuado análisis posteriores dado que para ER, RP y KI67 son parámetros conocidos con un punto de corte muy bien establecido y la asociación de BCL2 con metástasis ya

nos salió de forma cuantitativa lo que demuestra que hay una relación directa de niveles de expresión con aparición de metástasis, en este caso el estudio de un punto de corte nos dará un mejor detalle y seguramente no diferirá mucho de este valor.

Tabla 6.6: Análisis univariable según nivel de expresión en 4 percentiles

BIOMARC.	INTERVALOS	p-valor	R^2 Nagelkerke

ER	**0;[6,160);[160,295]**	**0,0001**	**0,10**
KI67	**[0, 6);[6,16);[16,36);[36,95]**	**0,013**	**0,08**
PR	**0;[5, 10);[10,120);[120,300]**	**0,02**	**0,06**
pAKT CIT	**0;[10, 60);[60, 80);[80,200]**	**0,04**	**0,06**
BCL2	[0, 70);[70,135);[135,195);[195,300]	0,05	0,05
CIC NUC	[0, 35);[35, 85);[85,125);[125,280]	0,16	0,04
HER4 NUC	0;[5,140]	0,21	0,01
EGFR	0;1	0,21	0,01
PTEN NUC	0;[2, 65);[65,125);[125,240]	0,22	0,03
GATA3	0;[5, 90);[90,140);[140,300]	0,25	0,03
ECAD MEM	[0, 3);3	0,26	0,01
ECAD CIT	[0,110);[110,145);[145,160);[160,250]	0,27	0,03
HER4 CIT	[0,105);[105,120);[120,155);[155,270]	0,28	0,03
CIC CIT	0;[5, 30);[30, 55);[55,170]	0,30	0,03
pHER3	0;[2, 10);[10, 50);[50,240]	0,41	0,02
p65 CIT	[0,105);[105,135);[135,180);[180,300]	0,42	0,02
P27	[0, 35);[35,100);[100,160);[160,270]	0,45	0,02
HER2	0;1	0,46	0,00
p65 NUC	0;[2, 14);[14, 35);[35,140]	0,49	0,02
pAKT NUC	0;[5, 20);[20, 90);[90,160]	0,51	0,02
BP1	[0, 90);[90,110);[110,145);[145,250]	0,57	0,03
ALDH	0;1	0,59	0,00
HER4 MEM	0;1;[2,3]	0,62	0,01
SURV CIT	[0, 60); 60;[70,105);[105,240]	0,62	0,01
SURV NUC	[0, 69);[69,105);[105,130);[130,220]	0,67	0,01
CK 5/6	0;1	0,69	0,00
FGFR2 NUC	0;[3,300]	0,77	0,00
FGFR2 CIT	[0, 19);[19, 95);[95,175);[175,300]	0,83	0,01
PTEN CIT	[0, 60);[60,110);[110,160);[160,240]	0,90	0,00

También se asocian las variables ER, PR y KI67 como ocurre con el análisis por la media de expresión. La expresión de pAKT *citoplasmática* también sale asociada pero

con un nivel de significación muy discreto por lo que no se ha considerado interesante hacer un análisis especifico de la misma.

Dado que en muchas variables no se tienen datos en la bibliografía del significado de su expresión ni del valor de la misma que se pueda considerar como significativo ,sobre todo porque muchas veces se ha estudiado por diferentes métodos (Histoscore, porcentaje de células con expresión, etc.), el estudio de un punto de corte que nos pueda separar la aparición de metástasis con significación estadística va a resultar el método más interesante, sobre todo para después poder calcular las curvas de supervivencia.

Tabla 6.7: Análisis univariable según nivel de expresión por punto de corte óptimo

BIOMARC.	Odd. Ratio	Intervalo confianza 95%	p-valor	R^2 Nagelkerke
KI67>=19,5	**2,95**	**2,95 (1,58 - 5,63)**	**0,0007**	**0,09**
BCL2<=77,5	**2,55**	**2,55 (1,31 - 4,76)**	**0,005**	**0,05**
HER4 CIT>=75	**7,02**	**7,02 (1,97 - 44,82)**	**0,009**	**0,08**
p65 CIT<=85	**2,55**	**2,55 (1,23 - 5,26)**	**0,011**	**0,05**
PTEN NUC<=27	**2,17**	**2,17 (1,16 - 4)**	**0,015**	**0,04**
PTEN CIT<=15	**2,94**	**2,94 (1,19 - 7,24)**	**0,021**	**0,04**
CIC NUC>=102,5	**2,08**	**2,08 (1,11 - 3,91)**	**0,021**	**0,04**
p65 NUC>=47,5	2,29	2,28 (0,98 - 5,37)	0,05	0,03
pAKT CIT<=55	2,04	2,04 (0,99 - 4,54)	0,06	0,03
GATA3<=92,5	1,81	1,81 (0,97 - 3,57)	0,07	0,03
CIC CIT>=95	2,53	2,53 (0,84 - 8,01)	0,10	0,02
BP1>=102,5	1,96	1,96 (0,87 - 4,51)	0,11	0,03
P27>=217,5	2,57	2,56 (0,78 - 9,00)	0,12	0,02
pHER3>=3,5	1,62	1,61 (0,86 - 3,04)	0,13	0,02
SURV CIT>=15	2,49	2,49 (0,76 - 11,18)	0,17	0,02
FGFR2 NUC<=13,5	1,75	1,75 (0,76 - 4,54)	0,21	0,01
FGFR2 CIT<=295	3,57	3,57 (0,59 - 100)	0,24	0,01
ALDH	NA	NA(NA - NA)	NA	NA
CK 5/6	NA	NA(NA - NA)	NA	NA
ECAD MEM	NA	NA(NA - NA)	NA	NA
ECAD CIT	NA	NA(NA - NA)	NA	NA
EGFR	NA	NA(NA - NA)	NA	NA
HER4 MEM	NA	NA(NA - NA)	NA	NA
HER4 NUC	NA	NA(NA - NA)	NA	NA
RE	NA	NA(NA - NA)	NA	NA
HER2	NA	NA(NA - NA)	NA	NA
pAKT NUC	NA	NA(NA - NA)	NA	NA
PR	NA	NA(NA - NA)	NA	NA
SURV NUC	NA	NA(NA - NA)	NA	NA

Se ha encontrado asociación estadísticamente significativa con la variable aparición de M en la expresión de BCL2, Ciclina *nuclear*, HER4 *citoplasmático*, KI67, P65

citoplasmático, PTEN *citoplasmático* y PTEN *nuclear* con los distintos puntos de corte que se detallan en la tabla.

También se han analizado estas variables a partir de sus diferentes puntos de corte en tablas de contingencia 2 x 2 para calcular los porcentajes de aparición de metástasis (test de *Xi-cuadrado*) y para calcular el riesgo relativo.

Tabla 6.8: Variables con significación y su asociación con metástasis

VARIABLES		M: SI	M: NO	p-Valor	RR (INTERVALO)
BCL2	: <77	28 (50%)	27 (50%)	0,005	2,55 (1,31 - 4,76)
	: >77	40 (30%)	96 (70%)		
CIC NUC	:>102	30 (48%)	33 (52%)	0,021	2,08 (1,11 - 3,91)
	:<102	38 (31%)	87 (69%)		
HER4 CIT	: >75	60 (40%)	94 (61%)	0,009	7,02 (1,97 - 44,82)
	:<75	2 (8%)	22 (91%)		
KI67	: >20	41 (49%)	44 (51%)	0,0007	2,9 (1,5 - 5,6)
	: <20	23 (24%)	73 (76%)		
P65 CIT	: <85	22 (53%)	19 (47%)	0,011	2,55 (1,23 - 5,26)
	: >85	45 (32%)	97 (68%)		
PTEN CIT	: <15	13 (60%)	9 (40%)	0,021	2,94 (1,19 - 7,24)
	: >15	54 (33%)	109 (67%)		
PTEN NUC	: <27	35 (46%)	40 (53%)	0,015	2,17 (1,16 - 4)
	: >27	32 (30%)	78 (70%)		

Encontrándose como la más discriminativa la expresión de HER4 citoplasmática, con un riesgo relativo de 7, ya que solo un 8% de las que tienen expresión baja (<75) presentarían metástasis.

6.2. Evaluación del valor pronóstico individual de cada uno de los marcadores: MULTIVARIABLE

También se ha analizado un modelo multivariable de regresión logística con todas las variables y los datos clínicos, con las 2 diferentes formas de expresión, cuantitativa y el mejor punto de corte. Se expresan las variables que han mostrado significación estadística.

Tabla 6.9: Análisis multivariable con valores globales

VARIABLES	p-Valor	OR	I.C. 95% para OR	
			Inferior	Superior
T INI	0,003	5,964	1,844	19,284
RE	0,006	0,974	0,956	0,993
HER4 CIT	0,007	1,063	1,017	1,11
PTEN NUC	0,016	1,052	1,009	1,096
GANGLIOS: 0	0,014	1		
GANGLIOS: 1-3	0,007	533,674	5,658	50339,384
GANGLIOS > 3	0,004	948,16	9,253	97161,712
PTEN CIT	0,057	0,961	0,923	1,001
p65 CIT	0,074	0,981	0,96	1,002

Tabla 6.10: Análisis multivariable con valores en punto de corte

	p-Valor	OR	I.C. 95% para OR	
			Inferior	Superior
KI67>20	0,003	18,089	2,69	121,631
T.INI<2	0,008	1		
T. INI: 2-5	0,477	0,457	0,053	3,952
T. INI >5	0,052	11,393	0,983	132,083
p65 CIT <85	0,02	7,98	1,30	45
GANGLIOS: 0	0,031	1		
GANGLIOS: 1-3	0,031	14,381	1,267	163,228
GANGLIOS> 3	0,009	28,038	2,329	337,612
PTEN NUC>27	0,04	9,461	1,103	81,176

Las variables clínicas tamaño inicial y ganglios residuales siguen manteniéndose en el modelo con significación estadística, y siendo especialmente llamativa la expresión de p65 citoplasmático y PTEN nuclear que mantiene su significación estadística a pesar de tener en cuenta las variables clínicas estudiadas en el modelo.

7. RESULTADOS DE LAS DIFERENTES VARIABLES: VALORACIÓN GLOBAL PARA VARIABLE SLED.

7.1. Evaluación del valor pronóstico individual de cada uno de los marcadores: UNIVARIABLE

Se ha utilizado un modelo de Cox para calcular el valor pronóstico en función de cada variable de forma individual y con los diferentes puntos de corte.

Tabla 7.1: Análisis univariable de los biomarcadores en expresión cuantitativa

BIOMARC.	Hazard Ratio	INTERVALO CONFIANZA	p-Valor
KI67	**1,01**	**1,01 (1,00 - 1,02)**	**0,0001**
RE	**0,99**	**0,99 (0,99 - 0,99)**	**0,004**
HER4 CIT	**1,01**	**1,00 (1,00 - 1,01)**	**0,03**
BCL2	**0,99**	**0,99 (0,99 - 0,99)**	**0,04**
EGFR	1,61	1,61 (0,94 - 2,76)	0,08
PR	1,00	0,99 (0,99 - 1,00)	0,14
GATA3	1,00	0,99 (0,99 - 1,00)	0,15
P27	1,00	0,99 (0,99 - 1,00)	0,25
CIC NUC	0,74	0,74 (0,44 - 1,23)	0,25
p65 NUC	1,00	1,00 (0,99 - 1,01)	0,27
ECAD MEM	1,18	1,18 (0,87 - 1,61)	0,28
pAKT NUC	1,00	0,99 (0,99 - 1,00)	0,38
SURV CIT	1,00	0,99 (0,99 - 1,00)	0,41
p65 CIT	1,00	0,99 (0,99 - 1,00)	0,42
HER2	1,23	1,23 (0,70 - 2,14)	0,46
PTEN CIT	1,00	0,99 (0,99 - 1,00)	0,48
BP1	1,00	1,00 (0,99 - 1,00)	0,49
ALDH	1,19	1,19 (0,72 - 1,96)	0,50
CK 5/6	1,16	1,16 (0,73 - 1,84)	0,51
PTEN NUC	1,00	0,99 (0,99 - 1,00)	0,54
pHER3	1,00	0,99 (0,99 - 1,00)	0,58
SURV NUC	1,00	0,99 (0,99 - 1,00)	0,59
FGFR2 CIT	1,00	0,99 (0,99 - 1,00)	0,62
CIC CIT	1,00	1,00 (0,99 - 1,00)	0,63
pAKT CIT	1,00	0,99 (0,99 - 1,00)	0,71
HER4 MEM	0,95	0,94 (0,68 - 1,30)	0,74
ECAD CIT	1,00	1,00 (0,99 - 1,00)	0,80
HER4 NUC	1,00	0,99 (0,98 - 1,01)	0,82
FGFR2 NUC	1,00	0,99 (0,99 - 1,00)	0,82

Observamos la existencia de cuatro marcadores potencialmente asociados a un valor pronóstico de SLED. Concretamente valores elevados de KI67 y HER4 CIT estarían asociados a un menor tiempo libre de progresión, mientras que valores elevados de expresión de RE y BCL2 serían indicadores de un mayor tiempo libre de progresión.

Presentamos los resultados obtenidos cuando tomamos en consideración las variables cualitativas fruto de categorizar los niveles de immunoexpresión de tres formas diferentes: (1) considerando cuando la immunoexpresión es mayor a cero, (2) a partir de la mediana (2 categorías) y (3) a partir de la determinación de un *threshold* óptimo.

Tabla 7.2. : Análisis univariable de los biomarcadores por nivel de expresión>0

BIOMARC.	Hazard ratio	Intervalo confianza 95%	p-Valor
PR =0	**2**	**2 (1,26 - 3,22)**	**0,003**
RE =0	**2,04**	**2,04 (1,23 - 3,45)**	**0,005**
EGFR >0	1,62	1,62 (0,94 - 2,76)	0,08
PTEN CIT =0	1,64	1,64 (0,82 - 3,45)	0,16
GATA3 =0	1,45	1,45 (0,86 - 2,44)	0,17
BCL2 =0	1,43	1,43 (0,8 - 2,63)	0,23
CIC NUC =0	1,35	1,35 (0,81 - 2,27)	0,25
pAKT NUC =0	1,25	1,25 (0,77 - 2,08)	0,36
P27 =0	1,39	1,39 (0,68 - 2,86)	0,37
SURV CIT >0	1,66	1,66 (0,51 - 5,28)	0,39
pHER3 >0	1,23	1,23 (0,73 - 2,05)	0,42
HER2 >0	1,23	1,23 (0,70 - 2,14)	0,46
ALDH >0	1,19	1,19 (0,72 - 1,96)	0,50
HER4 NUC =0	1,26	1,26 (0,64 - 2,5)	0,51
CK 5/6 >0	1,16	1,16 (0,73 - 1,84)	0,51
PTEN NUC =0	1,17	1,17 (0,71 -1,96)	0,53
ECAD CIT >0	1,37	1,37 (0,43 - 4,36)	0,59
SURV NUC =0	1,56	1,56 (0,21 - 12,5)	0,65
CIC CIT =0	1,09	1,09 (0,65 - 1,88)	0,72
ECAD MEM >0	1,23	1,23 (0,38 - 3,91)	0,73
p65 NUC >0	1,09	1,09 (0,66 - 1,77)	0,73
HER4 MEM >0	1,07	1,07 (0,64 - 1,76)	0,81
BP1 >0	1,15	1,15 (0,15- 8,45)	0,89
p65 CIT >0	1,10	1,10 (0,26 - 4,48)	0,90
KI67 >0	1,09	1,09 (0,26 - 4,45)	0,91
FGFR2 NUC =0	1,03	1,03 (0,57 - 1,88)	0,91
FGFR2 CIT >0	1,01	1,01 (0,54 - 1,88)	0,98
pAKT CIT >0	1,00	1,00 (0,59 - 1,68)	0,99
HER4 CIT >0	9250855,72	9250855,7189(0 - ∞.)	1,00

Solo salen significativos los valores de ER y de progesterona que coincide con lo ya conocido con estos marcadores, que valores de 0 tienen un significado pronóstico por lo que a partir de ahora se consideran estos valores.

Tabla 7.3: Análisis univariable según el nivel de expresión mayor a la media.

BIOMARC.	Hazard ratio	Intervalo confianza 95%	p-Valor
PR<9	**2,27**	**2,27 (1,38 - 3,69)**	**0,0009**
KI67>15	**2,25**	**2,25 (1,34 - 3,77)**	**0,001**
RE<0	**2,04**	**2,04 (1,23 - 3,45)**	**0,005**
BCL2<130	**1,66**	**1,66 (1,01 - 2,77)**	**0,04**
GATA3<87,5	1,61	1,61 (0,97 - 2,75)	0,07
EGFR>0	1,62	1,61 (0,94 - 2,76)	0,08
BP1>105	1,70	1,7 (0,87 - 3,28)	0,12
PTEN NUC<60	1,45	1,45 (0,88 - 2,38)	0,14
P27<90	1,43	1,43 (0,87 - 2,32)	0,16
pAKT CIT<50	1,56	1,56 (0,82 - 2,94)	0,17
CIC NUC>80	1,35	1,35 (0,83 - 2,17)	0,22
pAKT NUC<17,5	1,31	1,31 (0,8 - 2,17)	0,28
SURV CIT<60	1,31	1,31 (0,8 – 2,17)	0,28
p65 NUC>10	1,24	1,24 (0,76 - 2,02)	0,38
pHER3>5	1,24	1,24 (0,75 - 2,05)	0,40
HER2>0	1,23	1,23 (0,70 - 2,14)	0,46
ALDH>0	1,19	1,19 (0,72 - 1,96)	0,50
HER4 NUC<0	1,26	1,26 (0,64 - 2,55)	0,51
CK 5/6>0	1,16	1,16 (0,73 - 1,84)	0,51
HER4 CIT>117,5	1,18	1,18 (0,71 - 1,94)	0,52
SURV NUC<100	1,16	1,16 (0,71 - 1,92)	0,54
FGFR2 CIT<90	1,12	1,12 (0,69 - 1,82)	0,65
PTEN CIT<100	1,11	1,11 (0,68 - 1,82)	0,68
p65 CIT>130	1,08	1,08 (0,66 - 1,75)	0,74
CIC CIT<20	1,07	1,07 (0,66 - 1,75)	0,76
HER4 MEM>0	1,07	1,07 (0,64 - 1,76)	0,81
ECAD CIT<140	1,03	1,03 (0,64 - 1,69)	0,89
FGFR2 NUC<0	1,03	1,03 (0,57 - 1,89)	0,91
ECAD MEM>3	NA	NA	NA

También salen significativos los valores de ER y de progesterona además de el valor de KI67 y BCL2, como se efectúo antes se valorara según si el punto de corte coincide con estos valores.

Tabla 7.4: Análisis univariable según el nivel de expresión para punto de corte óptimo

BIOMARC.	Hazard ratio	Intervalo confianza 95%	p-Valor
KI67>=19,5	**2,45**	**2,45 (1,47 - 4,11)**	**0,0006**
PR<=9,5	**2,27**	**2,27 (1,39 - 3,70)**	**0,0009**
RE<=55	**2,44**	**2,44 (1,37 - 4,16)**	**0,002**
BP1>=102,5	**2,34**	**2,34 (1,18 - 4,65)**	**0,014**
HER4 CIT>=75	**5,51**	**5,51 (1,34 - 22,59)**	**0,017**
PTEN NUC>=195	**2,35**	**2,35 (1,15 - 4,80)**	**0,018**
BCL2<=77,5	**1,82**	**1,82 (1,09 - 2,94)**	**0,018**
CIC NUC>=102,5	**1,77**	**1,77 (1,09 - 2,87)**	**0,02**
p65 CIT<=85	**1,85**	**1,85 (1,09 - 3,12)**	**0,02**
p65 NUC>=47,5	**1,92**	**1,92 (1,06 - 3,48)**	**0,03**
GATA3<=92,5	1,64	1,64 (0,99 - 2,77)	0,06
PTEN CIT<=15	1,85	1,85 (0,99 - 3,45)	0,06
EGFR>=0,5	1,62	1,62 (0,94 - 2,76)	0,08
P27<=72,5	1,54	1,54 (0,95 - 2,55)	0,08
pAKT NUC<=45	1,61	1,61 (0,93 - 2,77)	0,09
SURV CIT<=37,5	1,61	1,61 (0,91 - 2,94)	0,11
ECAD CIT>=82,5	1,83	1,83 (0,83 - 4,01)	0,13
SURV NUC<=165	4,16	4,16 (0,58 - 33,3)	0,15
pAKT CIT<=55	1,56	1,56 (0,83 - 2,94)	0,17
pHER3<=172,5	3,84	3,84 (0,53 - 33,3)	0,18
CIC CIT>=95	1,54	1,54 (0,73 - 3,22)	0,25
CK 5/6	NA	NA	NA
ECAD MEM	NA	NA	NA
FGFR2 CIT	NA	NA	NA
FGFR2 NUC	NA	NA	NA
HER4 MEM	NA	NA	NA
HER4 NUC	NA	NA	NA
HER2	NA	NA	NA

Los biomarcadores encontrados con significación estadística con SLED son ER, BCL2, HER4 *citoplasmático* y KI67 estudiando su expresión de forma cuantitativa y BP1, BCL2, Ciclina *nuclear*, HER4 *citoplasmático*, P65 *citoplasmática*, P65 *nuclear* y PTEN nuclear cuando se analizan por su punto de corte óptimo tal como se indica en la tabla. La expresión con valores de HR superior a 1 quieren decir que a más expresión peor pronóstico como sucede con 53BP1, Cicilina *nuclear*, HER4 *citoplasmático*, KI67, P65 *nuclear* y PTEN *nuclear* y para valores de HR menor de 1 seria al revés.

7.2. Evaluación SLED individual de los marcadores con valor significativo en su punto de corte optimo según método de *Kaplan-Meier* y estudio de sus curvas de supervivencia.

Figura 7.1: Estudio de la curva de supervivencia según la expresión de receptores de estrógenos para punto de corte igual a cero

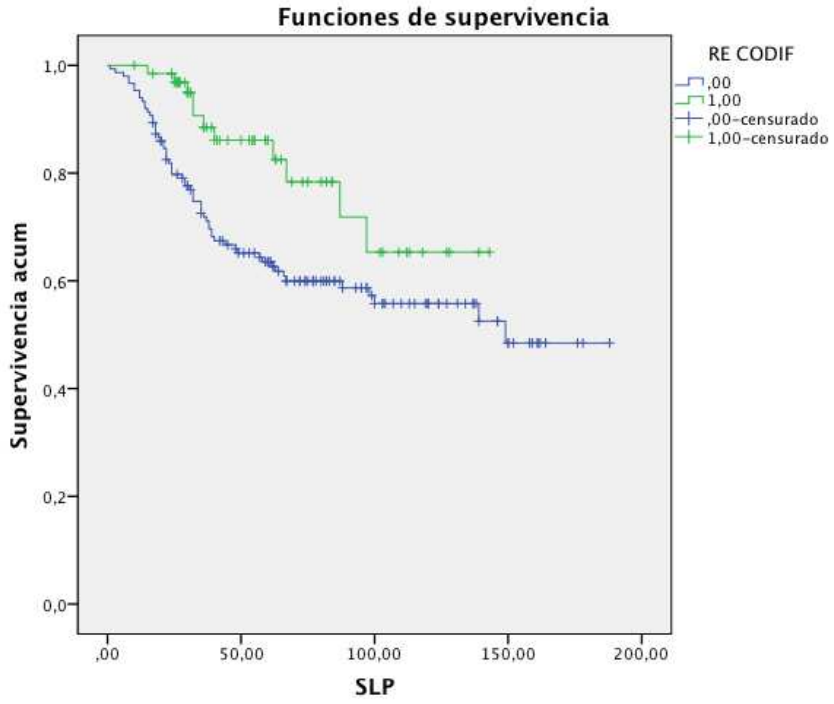


Tabla 7.5: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para la expresión de receptores de estrógenos.

VARIABLE	Total	Eventos	Media	Intervalo	Mediana	Log-rank	Sup 5 a.
RE: >0	67	11	114	100-129	NA	0,01	65%
RE: 0	150	61	117	104-130	149		67%

La curva de supervivencia según la expresión de receptores es similar a lo que esta publicado, aunque las medias de supervivencia son muy parecidas, las pacientes con ER negativos presentan una caída de la supervivencia más rápida en los primeros años y luego se estabiliza, mientras que en las que tienen ER positivos la caída en la supervivencia aparece de forma más progresiva y se va manteniendo a lo largo de los años.

Figura 7.2: Estudio de curva de supervivencia según expresión de receptores de progesterona para punto de corte igual a cero.

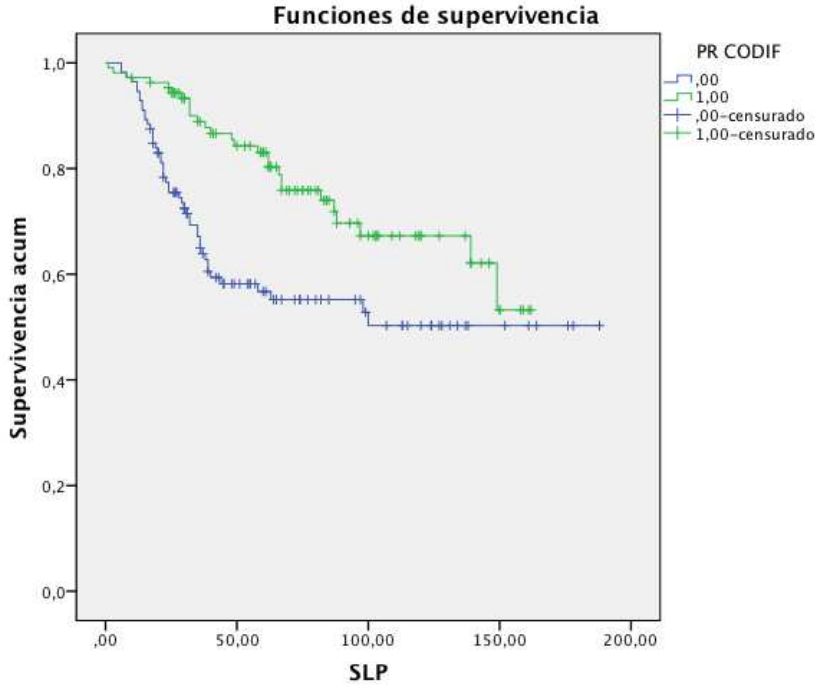


Tabla 7.6: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para expresión de receptores de progesterona

VARIABLE	Total	Eventos	Media	Intervalo	Mediana	Log-rank	Sup 5 a.
PR: 0	112	47	111	95-127	NA	0,001	60%
PR: >0	107	27	124	112-135	NA		75%

La curva de supervivencia es muy parecida a la anterior pero la aparición de progresión precoz en las pacientes con receptores de progesterona negativos es más evidente, y después la curva se estabiliza, mientras que las pacientes con receptores de progesterona positivos van presentando progresivamente una caída de la supervivencia. Recientemente se han publicado series donde se observa este fenómeno, por lo que se tendrá que dar más importancia a la menor expresión de los receptores de progesterona como factor de mal pronóstico, sobre todo en la supervivencia[14].

Figura 7.3. Estudio de curva de supervivencia según expresión de 53bp1 para punto de corte superior a 102

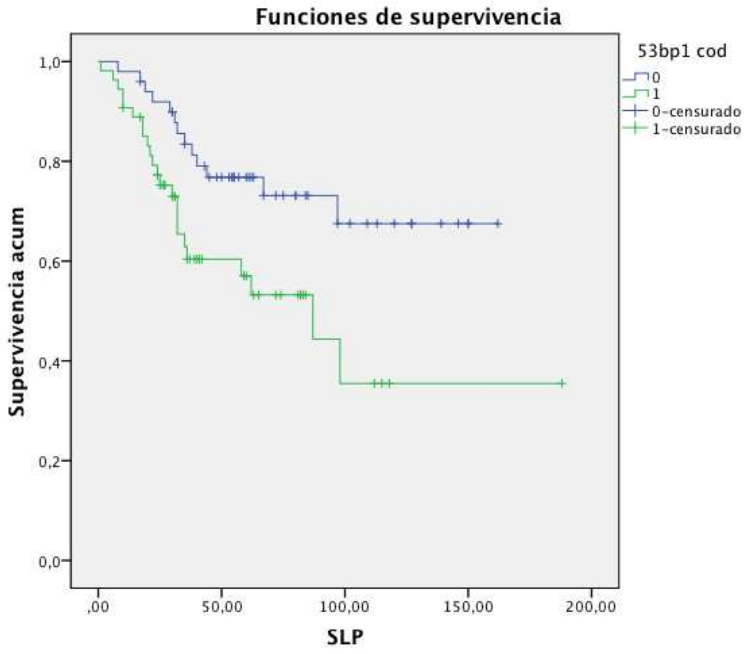


Tabla 7.7: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para expresión de 53BP1

VARIABLE	Total	Eventos	Media	Intervalo	Mediana	Log-rank	Sup 5 a.
53BP1<102	50	13	124	106-141	NA	0,012	76%
53BP1>102	54	23	96	68-123	87		57%

La expresión de 53BP1>102 se asocia a peor supervivencia, aunque no hay datos en la literatura de la expresión de 53BP1 después de tratamiento neoadyuvante, sí que se ha asociado la menor expresión de 53BP1 con fenotipo triple negativo y con peor supervivencia pero eran series que no recibían ningún tipo de tratamiento con quimioterapia[15].

Figura 7.4: Estudio de curva de supervivencia según expresión de BCL2 para punto de corte superior a 77

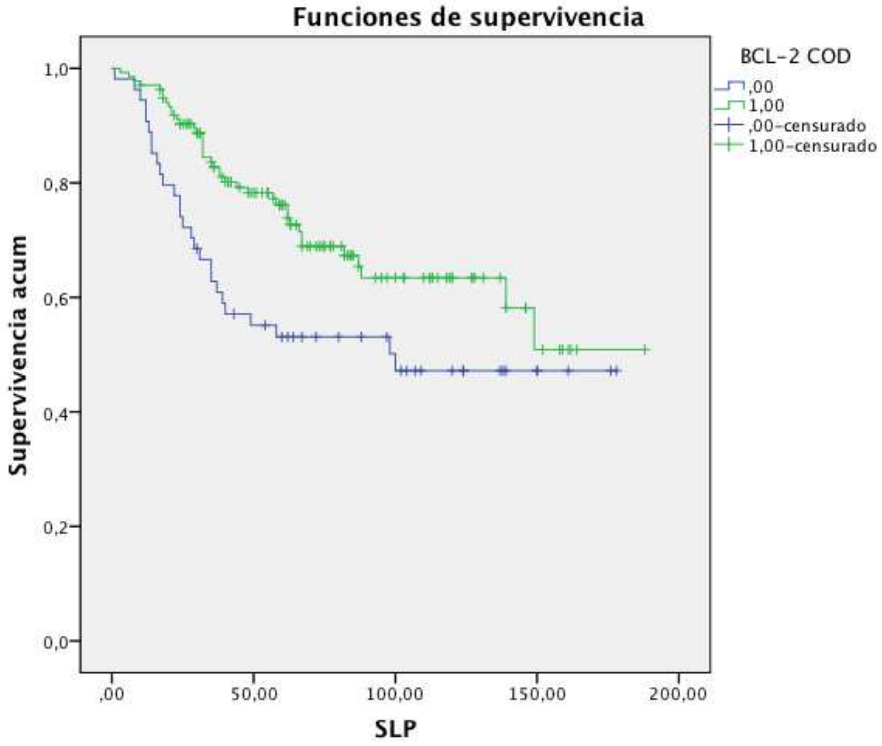


Tabla 7.8: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para la expresión de BCL2

VARIABLE	Total	Eventos	Media	Intervalo	Mediana	Log-rank	Sup 5 a.
BCL2<77	54	27	101	80-120	100	0,017	53%
BCL2>77	136	40	130	115-144	NA		76%

La expresión de BCL2>77 se asocia a mejor supervivencia, en otras series publicadas también se observa este efecto[16] con una reducción de la mortalidad a 10 años del 38% en las pacientes con expresión de BCL2. Aunque se conoce el efecto antiapoptótico de BCL2 sobre todo en linfomas con una mejor supervivencia de la célula, en el caso de cáncer de mama no se conoce su efecto y se ha visto su asociación con marcadores de diferenciación[17]. En nuestra serie también hay una asociación entre niveles altos de expresión de BCL-2 y receptores de estrógenos positivos, de tal manera que el 93% de muestras con expresión de BCL2<77 tienen receptores de estrógenos negativos.

Figura 7.5: Estudio de la curva de supervivencia según la expresión de Ciclina *nuclear* para punto de corte superior a 102

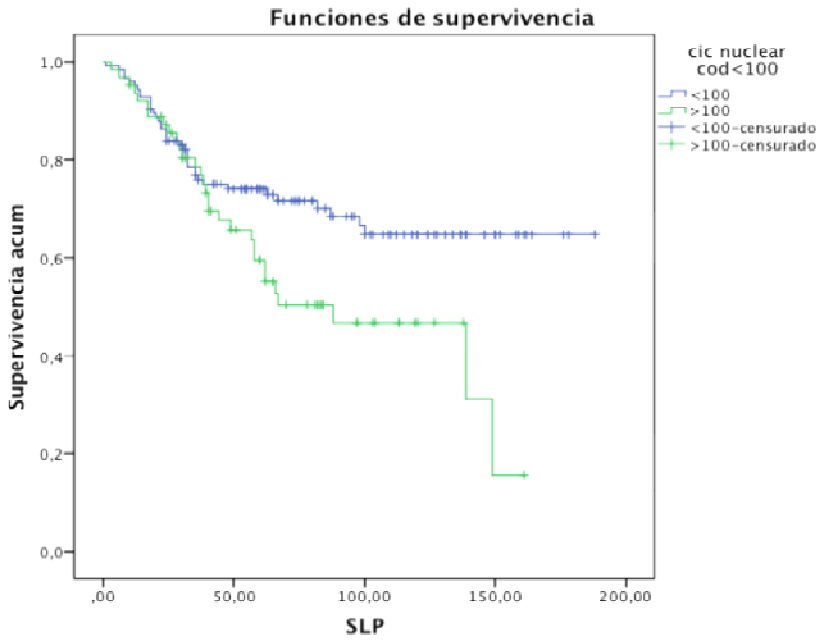


Tabla 7.9: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para la expresión de Ciclina *nuclear*

VARIABLE	Total	Eventos	Media	Intervalo	Mediana	Log-rank	Sup 5 a.
CIC NUC<102	124	37	135	121-149	NA	0,019	74%
CIC NUC>102	63	30	92	75-108	88		60%

La Ciclina D1 tiene un papel muy importante en la regulación del ciclo celular a través de la activación de CDK4 induciendo una activación del ciclo celular. Se ha visto que juega un papel muy importante a través de la acción de los estrógenos y se ha correlacionado con la expresión de ER[18]. También se ha encontrando que su expresión se asocia a peor pronóstico sobre todo en el grupo de pacientes con ER positivos[19] considerándose la Ciclina D1 como la diana de los estrógenos. En nuestra serie no hay asociación entre la expresión de ER y niveles de Ciclina, pero sí que en el grupo de expresión de ER la supervivencia es peor en los que expresan niveles altos de Ciclina.

Figura 7.6: Estudio de curva de supervivencia según expresión de her4 citoplasmático para punto de corte superior a 75

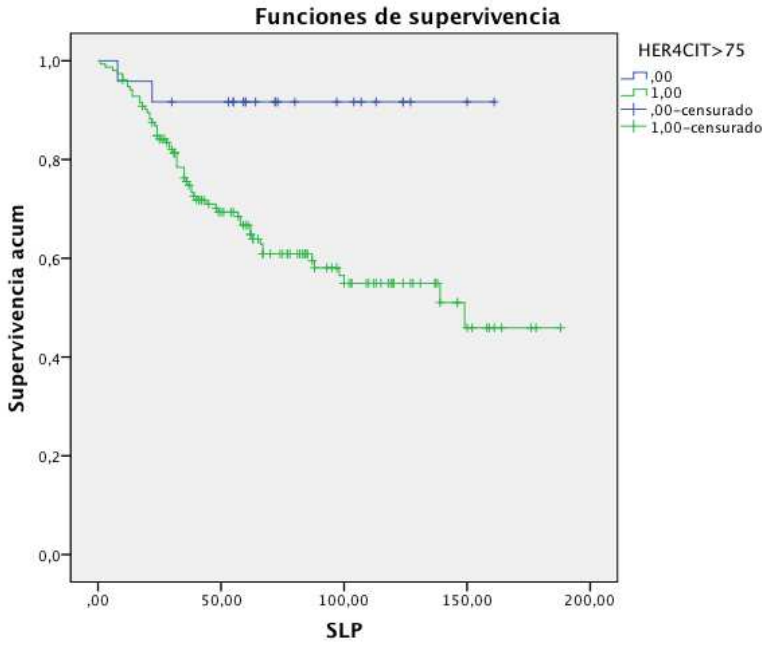


Tabla 7.10: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para la expresión de HER4 *citoplasmático*

VARIABLE	Total	Eventos	Media	Intervalo	Mediana	Log-rank	Sup 5 a.
HER4 CIT<75	24	2	148	132-164	NA	0,007	91%
HER4 CIT>75	153	59	118	104-131	149		66%

La proteína HER4 forma parte de la familia de receptores de membrana HER2 y su expresión no se asocia a la expresión HER2. Está regulado por la unión con su factor de crecimiento Eregulina y se han estudiado mecanismos de bloqueo del mismo como diana terapeutica[20]. En nuestra serie encontramos un subgrupo de pacientes con muy baja expresión de HER4 que tienen una excelente supervivencia libre de progresión.

Figura 7.7: Estudio de curva de supervivencia según expresión de KI67 para punto de corte superior a 20

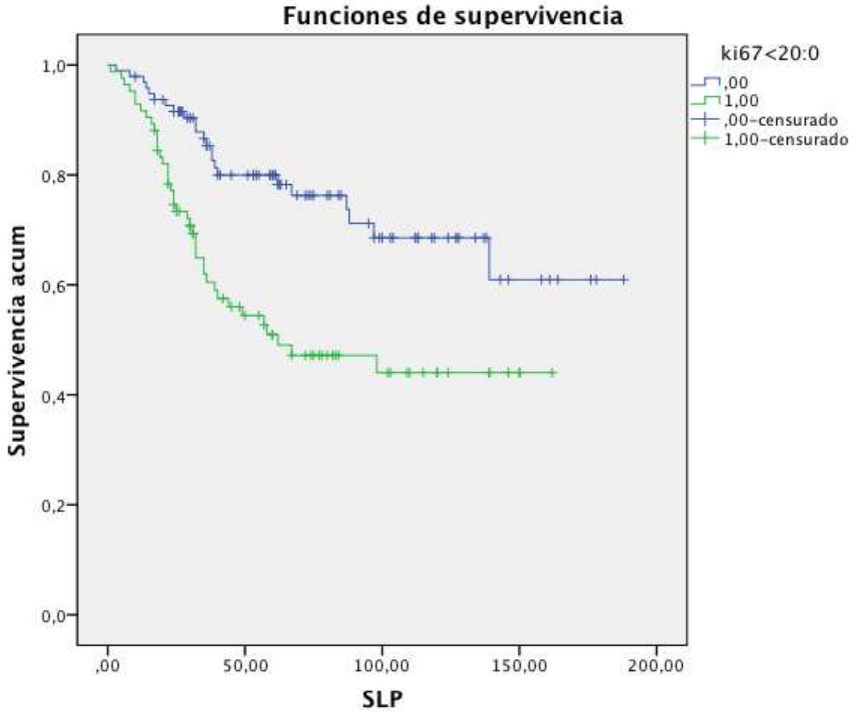


Tabla 7.11: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para la expresión de KI67

VARIABLE	Total	Eventos	Media	Intervalo	Mediana	Log-rank	Sup 5 a.
KI67<20	96	23	139	123-156	NA	0,000	76%
KI67>20	84	40	89	74-105	62		50

La expresión de KI67 se correlaciona con índice de proliferación y es uno de los parámetros más utilizados en la práctica clínica para diferenciar los tumores de alto grado y bajo grado. Lo único que esta discutido es el punto de corte establecido, para muchos autores esta en un 12% y para otros esta en el 30%, en nuestro modelo el valor de corte ha estado en el 20%, diferenciando bastante bien la supervivencia de ambos grupos.

Figura 7.8: Estudio de curva de supervivencia según expresión de p65 citoplasmática para punto de corte superior a 85

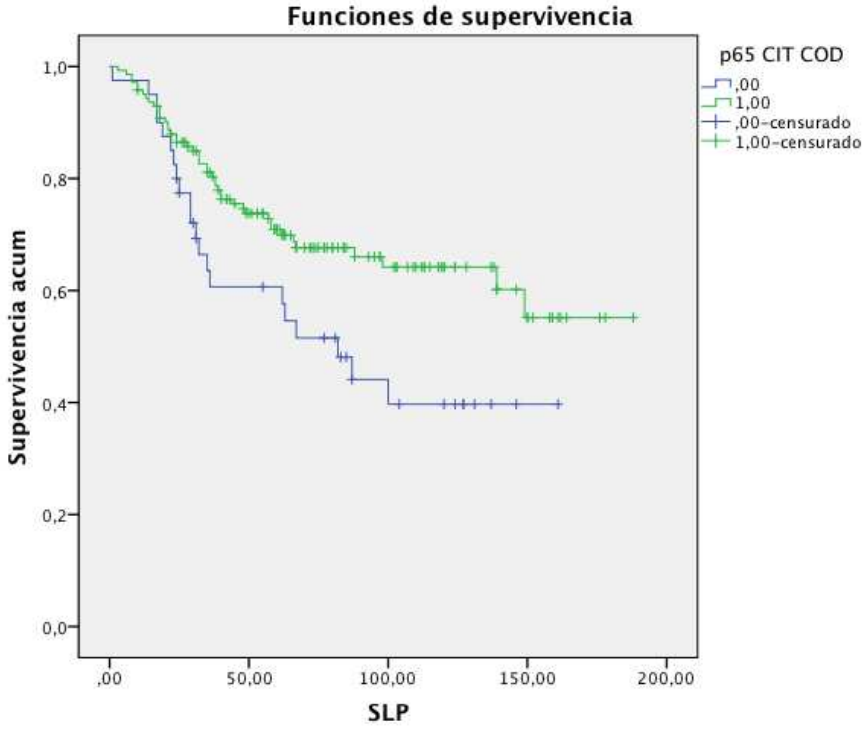


Tabla 7.12: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para la expresión de P65 *citoplasmática*

VARIABLE	Total	Eventos	Media	Intervalo	Mediana	Log-rank	Sup 5 a.
P65 CIT<85	40	21	89	69-110	82	0,021	57%
P65 CIT>85	142	45	130	116-144	NA		70%

La expresión de P65 *citoplasmática* se asocia a mejor supervivencia. P65 forma parte de la proteína NFKB que se ha asociado a proliferación, sobre todo su inclusión en el núcleo. No hay estudios que correlacione la P65 *citoplasmática* con pronóstico en cáncer de mama.

Figura 7.9: Estudio de curva de supervivencia según expresión de P65 nuclear para punto de corte superior a 47

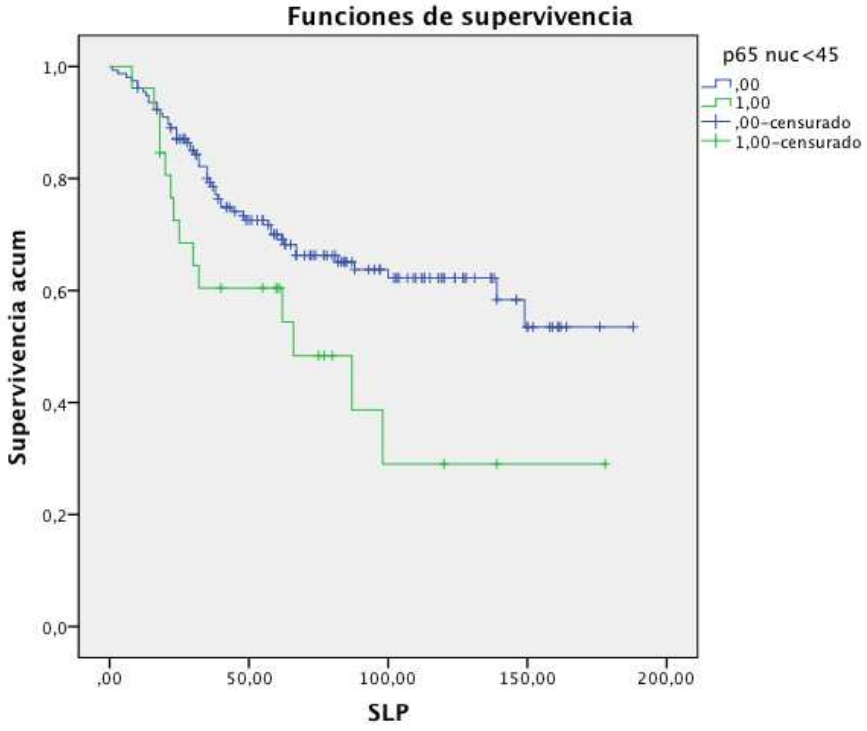


Tabla 7.13: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para la expresión de P65 *nuclear*

VARIABLE	Total	Eventos	Media	Intervalo	Mediana	Log-rank	Sup 5 a.
P65 NUC<47	156	52	127	114-141	NA	0,027	70%
P65 NUC>47	26	14	85	56-115	66		54%

La expresión de P65 *nuclear* se asocia a peor supervivencia. P65 forma parte de la proteína NFKB que se ha asociado a proliferación, sobre todo su inclusión en el núcleo, por lo que puede resultar lógico que su expresión nuclear se asocie a peor pronóstico. No hay estudios que correlacionen la P65 *nuclear* como factor pronóstico en cáncer de mama aunque sí que hay algún estudio que lo asocia con el fenotipo triple negativo en nuestra serie no se asocia a este fenotipo[21].

Figura 7.10: Estudio de curva de supervivencia según expresión de PTEN *nuclear* para punto de corte superior a 195

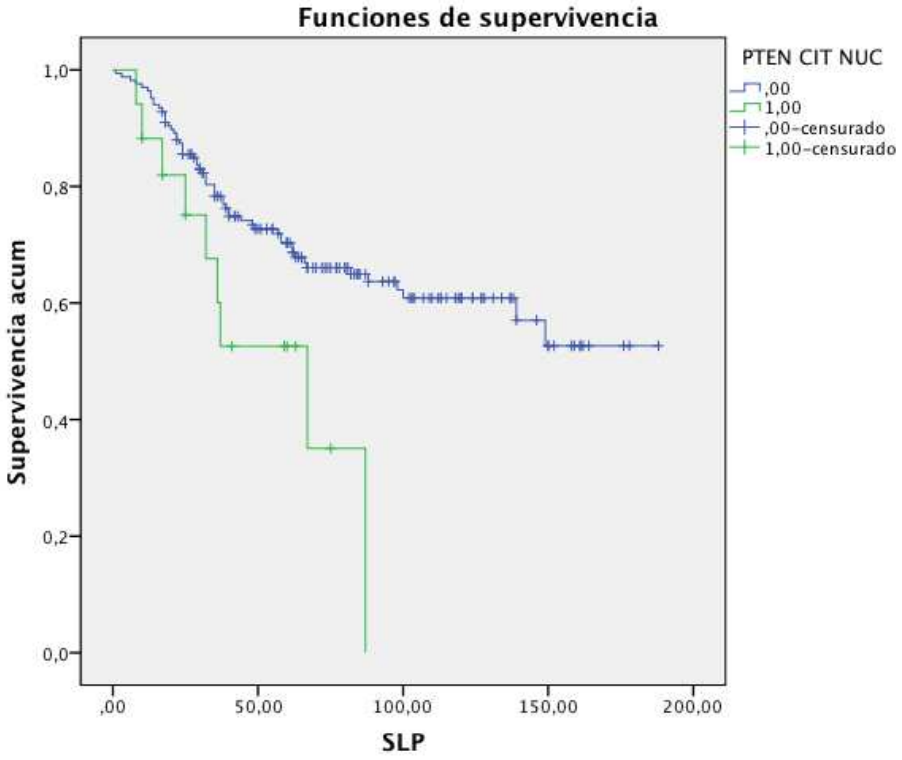


Tabla 7.14: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para la expresión de PTEN *nuclear*

VARIABLES	Total	Eventos	Media	Intervalo	Mediana	Log-rank	Sup 5 a.
PTEN NUC<195	167	57	126	114 – 139	NA	0,015	70%
PTEN NUC>195	17	9	53	37-70	67		52%

La expresión de PTEN *nuclear* se asocia a peor supervivencia sobre todo el subgrupo con expresión superior a 195. PTEN forma parte del complejo de señalización de la vía PI3K que se encarga sobre todo de la supervivencia celular, siendo PTEN un inhibidor de esta vía sobre todo la forma citoplasmática. La pérdida de PTEN se asocia a activación de la vía PI3K y resistencia a fármacos más dirigidos como el tratamiento hormonal y con *Trastuzumab*, pero se desconoce su papel como factor pronóstico.

7.3 Evaluación del valor pronóstico para SLED de cada uno de los marcadores MULTIVARIABLE

También se ha analizado un modelo multivariable de *Cox* con todas las variables y los datos clínicos, con las 2 diferentes formas de expresión, cuantitativa y el mejor punto de corte. Se expresan las variables que han mostrado significación estadística.

Tabla 7.15: Modelo multivariable de Cox: valores globales

	p-Valor	HR	95,0% IC para HR	
			Inferior	Superior
T. INI	0,001	1,596	1,284	1,984
CICLOS QT	0,005	1,705	1,179	2,465
GANGLIOS: 0	0,001			
GANGLIOS 1-3	0,037	4,125	1,088	15,639
GANGLIOS>3	0,001	17,03	3,691	78,583
p65 CIT	0,032	0,993	0,987	0,999

Tabla 7.16: Modelo multivariable de Cox: valores en punto de corte

VARIABLE	p-Valor	HR	95,0% IC para HR	
			Inferior	Superior
TINI	0,001	1,62	1,291	2,033
ER: 0	0,004	0,278	0,115	0,671
p65 CIT<85	0,012	0,32	0,131	0,78
HER4 CIT<75	0,015	7,396	1,478	37,021
GANGLIOS	0,003	1,248	1,079	1,443
CICLOS QT	0,032	1,432	1,031	1,99

Siendo especialmente significativo la expresión de HER4 *citoplasmático* y sobre todo P65 *citoplasmática* que se asocia en todos los modelos. El tamaño inicial y la afectación ganglionar siguen teniendo un impacto importante en la supervivencia, sobre todo la presencia de más de 3 ganglios con una HR de 17.

8. DESARROLLO DE BÚSQUEDA DE UN MODELO PREDICTIVO DE MAL PRONÓSTICO.

Se ha efectuado un modelo de regresión logística multivariante agrupando todas las variables significativas y todas las posibles interacciones 2 a 2. Se ha aplicado un algoritmo *Stepwise* encontrándose las siguientes variables con significado pronóstico:

- RE =0
- P65 CIT < 85
- HER4 CIT >=75
- PTEN CIT=0
- BCL2 < 77.5
- KI67 >=19.5

En este modelo tipo *Stepwise* se han correlacionado la aparición de estas condiciones con el desarrollo de metástasis, de tal manera que se ha encontrado un incremento del riesgo de aparición de metástasis en función de la aparición de las condiciones anteriores:

Tabla 8.1: Proporción de aparición de metástasis en función de las condiciones de los biomarcadores analizados

Núm. condic.	Met: Si (núm./%)	Met : No (núm./%)
0 condiciones	7 (12%)	50 (88%)
1 condiciones	8 (16%)	41 (84%)
2 condiciones	20 (33%)	41 (67%)
3 condiciones	21 (38%)	34 (62%)
4 condiciones	17 (68%)	8 (32%)
5 condiciones	6 (100%)	0 (0%)
6 condiciones	1 (100%)	0 (0%)

En la tabla siguiente se muestra los OR y HR en función del número de condiciones satisfechas, observándose como se definen claramente tres grupos de riesgo: leve, moderado y elevado, correspondientes a tener 0 o 1, 2 o 3 o más de 3 condiciones respectivamente.. También se aportan las estimaciones de la supervivencia libre de progresión a 5 años según los tres grupos de riesgo definidos.

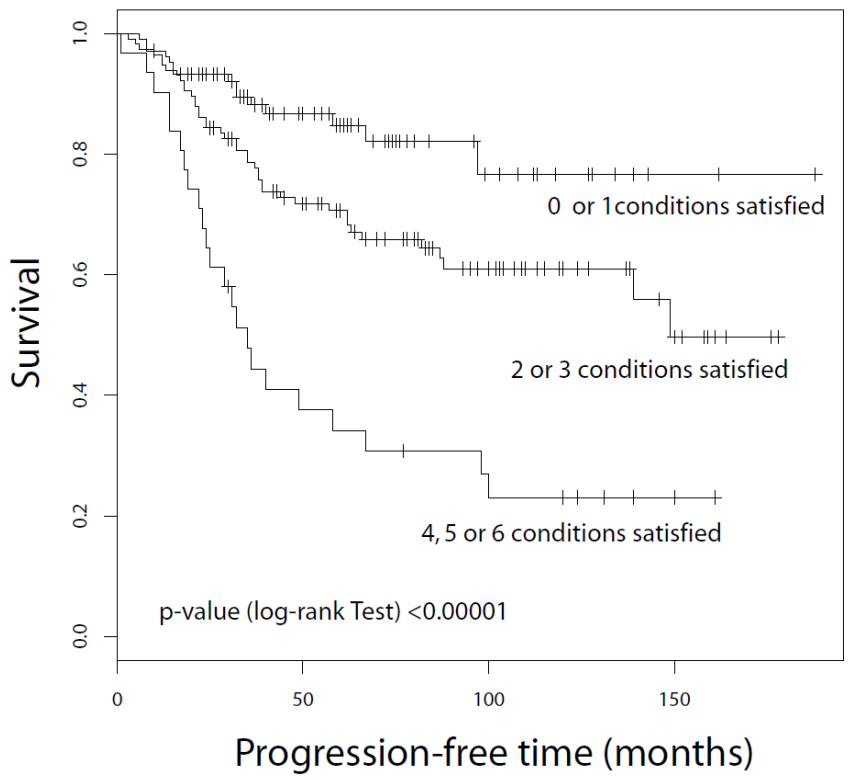
Tabla 8.2: Modelos de regresión logística y de Cox según las condiciones encontradas

	Occurrence of metastases			**Progression-free survival time**				
	Logistic regression model			Cox Proportional Hazards Regression Model			Kaplan-Meier estimates	
Number of conditions satisfied	OR	CI 95%	p-Value	HR	CI 95%	p-Value	5-years survival	CI 95%
0 or 1	1	-	-	1	-	-	84.8%	(77.3% - 93.1%)
2 or 3	3.31	(1.75 – 6.62)	0.0004	2.15	(1.18 – 3.89)	0.01	70.7%	(62.6% - 79.8%)
4, 5 or 6	18.20	(7.19 – 50.70)	<0.00001	5.73	(2.98 – 11.01)	<0.00001	34.2%	(20.8% – 56.2%)

De tal manera que cuando solo se manifiestan 0 o 1 condiciones, se establece un grupo de relativo buen pronostico, incluso mejor que la serie global, si son entre 2 o 3 condiciones el riesgo de metástasis aumenta y sobre todo cuando se establecen más de 3 condiciones el riesgo de metástasis se incrementa 18 veces. Este efecto también se traslada a las curvas de supervivencia.

El gráfico siguiente aporta una visualización de las curvas de supervivencia libre de progresión de *Kaplan-Meier*, según el número de condiciones satisfechas, siendo la diferencia entre las curvas estadísticamente significativa (p-valor<0.00001 según la prueba del log-rank)

Figura 8.1: Gráficas de supervivencia en función de las condiciones satisfechas



Este modelo, en vez de encontrar una fórmula establece una serie de condiciones, ya que dada la heterogeneidad del cáncer de mama, será muy difícil encontrar que una muestra tenga todas las condiciones, por eso hemos considerado más práctico establecer un modelo de condiciones de tal manera que a partir de tener más de 3 condiciones se establece de forma muy significativa un grupo de muy mal pronóstico con un riesgo de metástasis de 18 veces y una estimación de supervivencia a 5 años del 20%.

También se ha efectuado un análisis de sensibilidad y especificidad considerando como un método predictivo de metástasis la aparición de las diferentes condiciones. Se ha considerado el cumplir 2 o más condiciones como factor de riesgo de aparición de metástasis.

Tabla 8.3: Estudio de sensibilidad según los modelos de condiciones con más impacto pronóstico

CONDICIONES	METASTASIS SI	METASTASIS NO
2-3-4-5-6 (positivos)	65 (verdadero positivo)	83 (falsos positivos)
0 y 1 (negativo)	15 (falsos negativos)	91 (verdaderos negativos

Se ha encontrado una sensibilidad del 81,25 % (IC 95% 70,91 – 89,11%) y especificidad del 52,3% (IC 95% 44,6 – 59-91).

9. ASOCIACIÓN DE LOS BIOMARCADORES ESTUDIADOS CON LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES HORMONALES.

Cada vez es más importante la expresión de los receptores hormonales para el conocimiento de la evolución y la historia natural del cáncer de mama. Desde hace tiempo se consideran imprescindibles para decidir el tratamiento global del cáncer de mama. Tanto es así que incluso en fenotipos muy establecidos como es el HER2+++ la expresión de receptores hormonales está teniendo un papel cada día mas importante, que incluso ya hay autores que consideran diferente el fenotipo HER2 en función de la expresión de receptores.

Por esto hemos considerado interesante conocer la expresión de los biomarcadores estudiados en función de la expresión por receptores y estudiar cómo se comportan en función de los mismos:

Los biomarcadores 53BP1, BCL2, Ki67, P65 *citoplasmático*, P65 *nuclear*, PR y PTEN nuclear que se asocian a expresión de ER, también se asocian a factor pronóstico. En cambio los biomarcadores Ciclina *nuclear* y HER4 *citoplasmático* que se asociaban a factor pronósticos no se asocian a ER. Por otro lado los biomarcadores CK5/6, Cadherina *citoplasmática*, FGFR *citoplasmático* y *nuclear*, HER4 *nuclear*, pAKT *citoplasmático* y *nuclear*, HER3 y Survivin *citoplasmática* sólo se asocian a expresión de ER pero no a factor pronóstico. Desconocemos si es posible que el valor pronóstico tenga que ver con su asociación a la expresión de receptores o que biológicamente tenga un comportamiento implicado a su expresión de forma independiente. Para ello será interesante ver el comportamiento de pronóstico de estos biomarcadores en función de la expresión de receptores de estrógenos.

En la siguiente tabla se detalla los niveles de correlación de los biomarcadores que se han asociado de forma significativa con la expresión de ER. La expresión de 53BP1, BCL2, PTEN nuclear, pAKT citoplasmática y pAKT nuclear son las que más fuerte es la asociación y de forma directa, o sea a mas expresión más niveles de ER.

Tabla 9.1: Correlación de todos los biomarcadores con los receptores de estrógenos

BIOMARC		RE	BIOMARC		RE
53BP1	C. de Pearson	,401**	**KI67**	C. de Pearson	-,337**
	Sig. (bilateral)	0		Sig. (bilateral)	0
	N	104		N	183
BCL2	C. de Pearson	,466**	**pAKT CIT**	C. de Pearson	,431**
	Sig. (bilateral)	0		Sig. (bilateral)	0
	N	190		N	181
CK 5/6	C. de Pearson	,281**	**pAKT NUC**	C. de Pearson	,608**
	Sig. (bilateral)	0		Sig. (bilateral)	0
	N	221		N	181
CADHERINA CIT	C. de Pearson	,155*	HER3	C. de Pearson	-,271**
	Sig. (bilateral)	0,032		Sig. (bilateral)	0
	N	192		N	172
FGRF2 CITO	C. de Pearson	,247**	PR	C. de Pearson	,247**
	Sig. (bilateral)	0,001		Sig. (bilateral)	0
	N	183		N	220
FGFR2 NUC	C. de Pearson	,203**	PTEN CIT	C. de Pearson	,259**
	Sig. (bilateral)	0,006		Sig. (bilateral)	0
	N	182		N	184
HER4 NUC	C. de Pearson	,163*	**PTEN NUC**	C. de Pearson	,437**
	Sig. (bilateral)	0,03		Sig. (bilateral)	0
	N	178		N	184
P65 CIT	C. de Pearson	,165*	SURV CIT	C. de Pearson	-,164*
	Sig. (bilateral)	0,026		Sig. (bilateral)	0,027
	N	182		N	182
P65 NUC	C. de Pearson	,146*			
	Sig. (bilateral)	0,049			
	N	182			

.

Se ha resumido en una tabla la asociación de la expresión de los biomarcadores con mayor correlación: BCL2, 53BP1, pAKT *citoplasmática*, pAKT *nuclear* y KI67 con receptores de estrógenos, sus porcentajes y significación estadística.

Tabla 9.2: Relación de los biomarcadores con mayor correlación con ER

VARIABLES	ER negativo	ER positivo	p-Valor	RR (INTERVALO)
BCL2 <77 **>77**	53 (93%) 86 /63%)	4 (7%) 46 (47%)	0,000	7 (2,4 – 20)
53BP1 <100 **>100**	33 (63%) 24 (46%)	19 (36%) 28 (53%	0,057	2 (0,9 - 4,4)
KI67 : <20 **: >20**	49 (51%) 68 (80%)	47 (49%) 17 (20%)	0,000	0,26 (0,134 – 0,507)
pAKT CIT : <45 **: >45**	8 (92%) 53 (57%)	7 (8%) 39 (42%)	0,000	8,4 (3,5 - 20)
pAKT NUC : **<45** **: >45**	97 (90%) 109 (67%)	11 (10%) 54 (33%)	0,000	8,5 (3,9 - 18,6)
PTEN NUC: **<195** **:>195**	129 (78%) 6 (35%)	36 (22%) 11 (64%)	0,000	6,5 (2,2 - 18,9)

La menor expresión de BCL2, pAKT citoplasmática y nuclear tiene una asociación muy potente con la ausencia de ER. El 90% de las muestras que tienen baja expresión de estos biomarcadores son ER negativos. Aunque solo BCL2 se ha encontrado que presentaba un impacto pronostico, probablemente la ausencia de expresión de pAKT es un efecto biológico inherente de los tumores con ER negativos. Se tendrá que estudiar el comportamiento pronóstico de estos biomarcadores en función de la expresión de receptores, para valorar su posible efecto en riesgo de recaída y en supervivencia libre de progresión.

También se ha analizado la correlación de los diferentes biomarcadores con los niveles de receptores de progesterona y se ha encontrado significación en los siguientes: 53BP1, BCL2, Ciclina *nuclear*, KI67, Ciclina *citoplasmática*, EGFR, HER2 y HER3 aunque en ninguno de ellos supera un nivel de correlación de 0,3. Dada la poca magnitud de esta correlación no hemos estimado oportuno analizar con más detalle la asociación entre estos biomarcadores.

10. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE BIOMARCADORES PARA LA APARICIÓN DE METÁSTASIS EN FUNCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ER.

10.1 Evaluación del valor pronóstico individual de cada uno de los marcadores en receptores de estrógenos negativos para la variable metástasis: UNIVARIABLE

Hemos ajustado un modelo de regresión logística para evaluar el valor pronóstico (M: si/no) a partir de los niveles de expresión por IHQ en la escala cuantitativa original de cada uno de los marcadores de forma individual. En esta ocasión se ha considerado el subconjunto formado por las 122 pacientes con un valor nulo (cero) de expresión por IHQ de ER. La tabla siguiente muestra los resultados obtenidos.

Como en el modelo de expresión global también además del análisis según expresión cuantitativo de la escala original se ha efectuado los resultados obtenidos cuando tomamos en consideración las variables cualitativas al categorizar los niveles de IHQ de cuatro formas diferentes: (1) considerando cuando la IHQ > a cero, (2) a partir de la mediana (2 categorías) y (3) a partir de un punto de corte óptimo para la discriminación de la aparición de metástasis

Tabla 10.1: Análisis univariable de los biomarcadores en expresión cuantitativa

BIOMARC.	Odds Ratio	Intervalo confianza 95%	p-valor	R2,Naglekerke
HER4 CIT	**1,01**	**1,01 (0,99 - 1,01)**	**0,068**	**0,04**
HER4 NUC	1,02	1,02 (0,99 - 1,06)	0,13	0,04
KI67	1,01	1,01 (0,99 - 1,02)	0,17	0,03
P27	1,00	1,00 (1,00 - 1,00)	0,19	0,02
BP1	1,01	1,01 (0,99 - 1,03)	0,21	0,07
p65 NUC	1,01	1,01 (0,99 - 1,02)	0,22	0,02
SURV CIT	0,99	0,99 (0,98 - 1,00)	0,22	0,02
GATA3	1,00	0,99 (0,99 - 1,00)	0,26	0,02
BCL2	1,00	1,00 (0,99 - 1,00)	0,31	0,01
pAKT NUC	1,01	1,01 (0,99- 1,01)	0,36	0,01
ECAD CIT	1,00	1,00 (0,99 - 1,01)	0,40	0,01
ECAD MEM	1,20	1,20 (0,78 - 1,91)	0,41	0,01
SURV NUC	1,00	1,00 (0,99 - 1,01)	0,49	0,01
EGFR	1,34	1,34 (0,57 - 3,14)	0,49	0,01
pHER3	1,00	1,00 (0,99 - 1,00)	0,51	0,01
FGFR2 CIT	1,00	1,00 (0,99 - 1,00)	0,52	0,01
HER2	1,31	1,31 (0,53 - 3,22)	0,56	0,00
FGFR2 NUC	1,01	1,01 (0,95 - 1,08)	0,65	0,00
PTEN CIT	1,00	1,00 (0,99 - 1,00)	0,68	0,00
PR	1,00	1,00 (0,99 - 1,00)	0,69	0,00
CIC NUC	1,00	1,00 (0,99 - 1,00)	0,71	0,00
ALDH	1,09	1,09 (0,48 - 2,43)	0,84	0,00
p65 CIT	1,00	1,00 (0,99 - 1,00)	0,88	0,00
CK 5/6	0,94	0,94 (0,43 - 2,02)	0,88	0,00
HER4 MEM	0,97	0,97 (0,58 - 1,59)	0,91	0,00
pAKT CIT	1,00	1,00 (0,98 - 1,00)	0,91	0,00
PTEN NUC	1,00	1,00 (0,99 - 1,00)	0,92	0,00
CIC CIT	1,00	1,00 (0,98 - 1,00)	0,96	0,00

Sólo la expresión de valores elevados de HER4 *citoplasmático* se correlaciona con la aparición de M en el subgrupo de receptores de estrógenos negativos.

Tabla 10.2: Análisis univariable de los biomarcadores en función de su expresión>0

BIOMARC.	Odds Ratio	Intervalo confianza 95%	p-valor	R2,Naglekerke
PR >0	0,52	0,52 (0,23 - 1,10)	0,09	0,03
FGFR2 NUC >0	3,91	3,91 (0,85 - 27,57)	0,11	0,04
P27 >0	0,51	0,51 (0,17 - 1,44)	0,21	0,02
pAKT NUC >0	1,57	1,57 (0,69 - 3,60)	0,28	0,02
BCL2 >0	0,68	0,68 (0,28 - 1,64)	0,39	0,01
CIC CIT >0	0,73	0,72 (0,31 - 1,64)	0,44	0,01
CIC NUC >0	0,73	0,73 (0,31 - 1,64)	0,44	0,01
HER4 NUC >0	1,69	1,69 (0,42 - 7,19)	0,46	0,01
p65 NUC >0	1,33	1,33 (0,61 - 2,92)	0,47	0,01
EGFR >0	1,34	1,34 (0,57 - 3,14)	0,49	0,01
PTEN NUC >0	1,30	1,30 (0,60 - 2,85)	0,50	0,01
SURV CIT >0	1,76	1,76(0,32 - 13,13)	0,53	0,01
pAKT CIT >0	1,27	1,27 (0,57 - 2,82)	0,55	0,00
PTEN CIT >0	0,70	0,70 (0,21 - 2,27)	0,55	0,00
HER2 >0	1,31	1,30 (0,53 - 3,22)	0,56	0,00
FGFR2 CIT >0	1,28	1,28 (0,54 - 3,08)	0,58	0,00
GATA3 >0	0,81	0,81 (0,35 - 1,84)	0,61	0,00
ECAD CIT >0	1,44	1,44 (0,33 - 7,34)	0,63	0,00
p65 CIT >0	1,77	1,77 (0,16 - 38,88)	0,64	0,00
pHER3 >0	0,89	0,89 (0,37 - 2,10)	0,79	0,00
HER4 MEM >0	1,09	1,09 (0,49 - 2,39)	0,83	0,00
ALDH >0	1,09	1,09 (0,48 - 2,43)	0,84	0,00
BP1 >0	1,31	1,31 (0,04 - 35,20)	0,85	0,00
ECAD MEM >0	1,13	1,13 (0,23 - 5,99)	0,88	0,00
CK 5/6>0	0,94	0,94 (0,43 - 2,02)	0,88	0,00
KI67 >0	NA	NA	0,99	0,02
SURV NUC >0	NA	NA	0,99	0,02
HER4 CIT >0	NA	NA	0,99	0,01

No se ha encontrado ninguna asociación a partir de la expresión de valores de> 0. Dado que en el global solo se encontró significación en ese punto de corte para receptores de estrógenos, al subdividir la serie por la expresión de receptores es lógico que no salga ninguno significativo.

Tabla 10.3: Análisis univariable según nivel de expresión mayor a la media

BIOMARC.	Odds Ratio	Intervalo confianza 95%	p-valor	R2,Naglekerke
BP1>100	**7,33**	**7,33 (1,60 - 42,82)**	**0,015**	**0,26**
PR>0	0,52	0,52 (0,23 - 1,10)	0,09	0,03
FGFR2 NUC>0	3,91	3,91 (0,85 - 27,57)	0,11	0,04
FGFR2 CIT>50	1,60	1,60 (0,74 - 3,47)	0,23	0,02
BCL2>100	0,65	0,65 (0,29 - 1,39)	0,27	0,02
pAKT NUC>0	1,57	1,57 (0,69 - 3,60)	0,28	0,02
pAKT CIT>10	1,54	1,54 (0,70 - 3,40)	0,28	0,02
SURV CIT>70	0,65	0,65 (0,29 - 1,43)	0,29	0,01
KI67>22	1,55	1,55 (0,65 - 3,71)	0,32	0,02
P27>90	0,69	0,69 (0,31 - 1,49)	0,35	0,01
p65 NUC>5	1,39	1,39 (0,63 - 3,05)	0,41	0,01
CIC CIT>20	0,73	0,73 (0,32 - 1,61)	0,44	0,01
pHER3>20	0,73	0,73 (0,32 - 1,62)	0,44	0,01
HER4 CIT>120	1,36	1,36 (0,61 - 2,98)	0,45	0,01
HER4 NUC>0	1,69	1,69 (0,42 - 7,19)	0,46	0,01
EGFR>0	1,34	1,34 (0,57 - 3,14)	0,49	0,01
GATA3>50	0,77	0,77 (0,33 - 1,73)	0,53	0,01
ECAD CIT>130	1,27	1,27 (0,58 - 2,75)	0,55	0,00
HER2>0	1,31	1,31 (0,53 - 3,22)	0,56	0,00
SURV NUC>95	1,27	1,27 (0,57 - 2,79)	0,56	0,00
HER4 MEM>1	0,71	0,71 (0,17 - 2,52)	0,61	0,00
PTEN CIT>100	0,83	0,83 (0,36 - 1,86)	0,66	0,00
PTEN NUC>10	0,85	0,85 (0,38 - 1,83)	0,67	0,00
CIC NUC>60	1,15	1,15 (0,53 - 2,50)	0,72	0,00
ALDH>0	1,09	1,09 (0,48 - 2,43)	0,84	0,00
CK>0	0,94	0,94 (0,43 - 2,02)	0,88	0,00
p65 CIT>120	1,04	1,04 (0,47 - 2,25)	0,93	0,00
ECAD MEM>3	NA	NA	NA	NA

En este caso se ha encontrado asociación con los niveles de expresión de 53BP1 con un riesgo de metástasis de siete veces para valores superiores a la media.

Finalmente se ha efectuado el análisis de asociación con aparición de metástasis a partir de la búsqueda del mejor punto de corte. obteniéndose los siguiente resultados.

Tabla 10.4: Análisis univariable según nivel de expresión por punto de corte óptimo

BIOMARC.	Odds Ratio	Intervalo confianza 95%	p-valor	R2,Naglekerke
BP1>=102,5	**7,33E+00**	**7,33 (1,60 - 42,82)**	**0,015**	**0,26**
p65 NUC>=37,5	**4,25E+00**	**4,25 (1,35 - 16,17)**	**0,019**	**0,08**
p65 CIT>=85	**0,34**	**0,34 (0,13 - 0,88)**	**0,02**	**0,06**
HER4 CIT>=70	**1,03E+01**	**10,29 (1,88 - 192,11)**	**0,02**	**0,10**
ECAD CIT>=82,5	**3,07E+00**	**3,07 (1,08 - 10,13)**	**0,04**	**0,06**
GATA3>=187,5	**2,59E-01**	**0,25 (0,05 - 0,90)**	**0,05**	**0,06**
P27>=145	4,42E-01	0,44 (0,17 - 1,04)	0,07	0,04
SURV NUC>=82,5	2,12E+00	2,12 (0,94 - 4,92)	0,07	0,04
FGFR2 CIT>=42,5	1,98E+00	1,97 (0,91 - 4,35)	0,09	0,04
PR>=2,5	5,19E-01	0,51 (0,23 - 1,10)	0,09	0,03
FGFR2 NUC>=2	3,91E+00	3,90 (0,85 - 27,57)	0,11	0,04
CIC NUC>=17,5	4,49E-01	0,44 (0,16 - 1,18)	0,11	0,03
pAKT CIT>=60	3,81E-01	0,38 (0,09 - 1,21)	0,12	0,03
pHER3>=172,5	2,14E-01	0,21 (0,01 - 1,39)	0,17	0,03
BCL2>=132,5	5,61E-01	0,56 (0,23 - 1,28)	0,18	0,02
HER2>=0,5	1,31E+00	1,30 (0,53 - 3,22)	0,56	0,00
pAKT NUC>=140	7,20E+06	7197266 (0 - NA)	0,99	0,04
PTEN CIT>=195	7,01E+06	7009511 (0 - NA)	0,99	0,04
PTEN NUC>=190	1,99E+07	19919910 (0 - NA)	0,99	0,08
HER4 NUC>=60	2,16E+07	21613780 (0 - NA)	0,99	0,06
CIC CIT>=125	1,95E+07	19477250 0 - NA)	0,99	0,06
KI67>=4	1,73E+07	17298870 (0 - NA)	0,99	0,07
SURV CIT>=165	0,00E+00	0(NA - 1,997465E+71)	0,99	0,05
ALDH	NA	NA	NA	NA
CK	NA	NA	NA	NA
ECAD MEM	NA	NA	NA	NA
EGFR	NA	NA	NA	NA
HER4 MEM	NA	NA	NA	NA

En este caso se encuentra asociación entre los siguientes biomarcadores: BP1>102, ECAD *citoplasmática* >82, HER4 *citoplasmático* >70, p65 *citoplasmático* > 162, p65 *nuclear* >37,5 y GATA3> 187. Siendo 53 BP1 y HER4 *citoplasmático* los que más nivel de significación presentan, pero para poder ver con más claridad el efecto de estos biomarcadores hemos efectuado un estudio de cada una de ellos mediante tablas de contingencia 2 x 2 para así poder valorar el porcentaje de las frecuencias, la asociación y el riesgo relativo de cada uno de ellos.

En la siguiente tabla se expresan los resultados de dichas variables.

Tabla 10.5: Variables con significación y su asociación con metástasis

VARIABLES	M=NO	M= SI	VALOR P	RR (INTERVALO)
53BP1 : <100 :>100	21 (65%) 8 (33%)	11 (35%) 16 (69%)	0,016	3,8 (1,2 - 11,6)
ECAD CIT: <82 : >82	15 (75%) 42 (50%)	5 (25%) 43 (50%)	0,033	3 (1 - 9,2)
HER4 CIT : <70 : >70	11 (91%) 47 (51%)	1 (8%) 44 (48%)	0,007	10,2 (1,2 – 83)
P65 CIT : <85 : >85	8 (33%) 47 /60%)	16 (66%) 32 (40%)	0,022	0,34 (0,13 – 0,889)
P65 NUC : <37 : >37	52 (57%) 3 (25%)	39 (43%) 9 (75%)	0,036	4 (1 – 15)
GATA 3 :<187 :>187	39 (48%) 11 (78%)	41 (51%) 3 (22%)	0,036	0,2 (0,06 – 1)

Para los biomarcadores 53BP1 y P65 *nuclear* ,ECAD *citoplasmatica* y HER4 *citoplasmatica* la relación es a mayor expresión, mayor riesgo de aparición de metástasis; mientras que para p65 *citoplasmatica* y GATA3 la relación es a la inversa. La expresión de HER4 citoplasmática y de 53BP1 son las que se relacionan con mayor potencia tal y como ocurría en el anterior modelo.

10. 2 Evaluación del valor pronóstico individual de cada uno de los marcadores en receptores de estrógenos positivos para la variable metástasis : UNIVARIABLE

Hemos ajustado igual que para el subgrupo anterior un modelo de regresión logística para evaluar el valor pronóstico (M: si/no) a partir de los niveles de expresión por IHQ en la escala cuantitativa original de cada uno de los biomarcadores de forma individual. En esta ocasión se ha considerado el subconjunto formado por las 103 pacientes con un valor superior a cero de expresión por IHQ de ER .

Igual que en los anteriores análisis además del estudio según expresión cuantitativa de la escala original se ha efectuado los resultados obtenidos cuando tomamos en consideración las variables cualitativas al categorizar los niveles de IHQ de tres formas diferentes: (1) considerando cuando la IHQ > a cero, (2) a partir de la mediana (2 categorías) y (3) a partir de un punto de corte óptimo para la discriminación de la aparición de metástasis

Tabla 10.6: Análisis univariable de los biomarcadores en expresión cuantitativa

BIOMARC.	Odds Ratio	Intervalo confianza 95%	p-valor	R2,Naglekerke
KI67	**1,02**	**1,02 (0,99 - 1,05)**	**0,07**	**0,05**
CIC CIT	1,02	1,02 (0,99 - 1,04)	0,11	0,05
CIC NUC	1,01	1,00 (0,99 - 1,01)	0,12	0,05
SURV NUC	0,99	0,99 (0,97 - 1,00)	0,17	0,04
BCL2	1,00	0,99 (0,98 - 1,00)	0,19	0,03
HER4 NUC	0,98	0,98 (0,94 - 1,00)	0,24	0,04
PTEN NUC	1,00	1,00 (0,99 - 1,01)	0,26	0,03
p65 NUC	1,01	1,00 (0,99 - 1,02)	0,27	0,02
pAKT CIT	1,01	1,00 (0,99 - 1,01)	0,35	0,02
SURV CIT	0,99	0,99 (0,97 - 1,00)	0,41	0,01
ALDH	1,47	1,47 (0,47 - 4,41)	0,49	0,01
p65 CIT	1,00	0,99 (0,99 - 1,00)	0,50	0,01
pHER3	0,99	0,99 (0,96 - 1,01)	0,60	0,01
BP1	1,00	0,99 (0,98 - 1,00)	0,61	0,01
CK	1,27	1,26 (0,48- 3,48)	0,64	0,00
HER4 MEM	0,82	0,81 (0,30 - 1,82)	0,65	0,00
FGFR2 NUC	1,00	1,00 (0,99 - 1,00)	0,69	0,00
GATA3	1,00	0,99 (0,99 - 1,00)	0,70	0,00
ECAD MEM	1,12	1,11 (0,68 - 2,28)	0,74	0,00
PTEN CIT	1,00	1,00 (0,99 - 1,01)	0,74	0,00
P27	1,00	1,00 (0,99 - 1,00)	0,77	0,00
pAKT NUC	1,00	0,99 (0,98 - 1,01)	0,82	0,00
ECAD CIT	1,00	1,00 (0,99 - 1,01)	0,82	0,00
FGFR2 CIT	1,00	1,00 (0,99 - 1,00)	0,83	0,00
PR	1,00	0,99 (0,99 - 1,00)	0,85	0,00
HER4 CIT	1,00	1,00 (0,98 - 1,01)	0,89	0,00
HER2	0,94	0,94 (0,19 - 3,36)	0,93	0,00
EGFR	1,00	1 (0,20 - 3,81)	1,00	0,00

En esta ocasión solo la expresión de KI67 muestra una significación pronostica de mayor riesgo de metástasis para el subgrupo de ER positivos. Las pacientes con

expresión de ER y alta expresión de KI67 tienen mayor riesgo de aparición de M, este hecho esta constatado en la literatura y de hecho muchos autores subdividen las pacientes con receptores de estrógenos con KI67 como fenotipo Luminal B.

Tabla 10.7: Análisis univariable de los biomarcadores en función de su expresión>0

BIOMARC.	Odds Ratio	Intervalo confianza 95%	p-valor	R2,Nagelkerke
PTEN CIT >0	0,12	0,12 (0,005 - 1,38)	0,10	0,06
pHER3 >0	1,88E+00	1,87 (0,61 - 5,72)	0,26	0,03
PTEN NUC >0	0,41	0,41 (0,09 - 2,22)	0,27	0,02
CIC CIT >0	2,83	2,83 (0,47 - 54,15)	0,34	0,02
KI67 >0	0,41	0,41 (0,06 - 3,27)	0,35	0,01
HER4 NUC >0	0,625	0,62 (0,17 - 1,96)	0,44	0,01
ALDH >0	1,47	1,47 (0,47- 4,41)	0,49	0,01
pAKT NUC >0	0,60	0,60 (0,14 - 3,07)	0,50	0,01
SURV CIT >0	1,84E+00	1,84 (0,29 - 35,81)	0,58	0,01
CIC NUC >0	1,79E+00	1,78 (0,27 - 35,03)	0,60	0,01
CK 5/6 >0	1,26	1,26 (0,48 - 3,48)	0,64	0,00
p65 CIT >0	0,55	0,55 (0,04 - 12,31)	0,64	0,00
HER4 MEM >0	0,81	0,81 (0,23 - 2,6)	0,74	0,00
pAKT CIT >0	1,30E+00	1,29 (0,29 - 9,11)	0,75	0,00
PR >0	8,75E-01	0,87 (0,32 - 2,44)	0,79	0,00
GATA3 >0	1,17E+00	1,16 (0,30 - 5,75)	0,83	0,00
p65 NUC >0	9,17E-01	0,91 (0,30 - 2,98)	0,88	0,00
FGFR2 CIT >0	1,19E+00	1,18 (0,16 - 24,06)	0,88	0,00
HER2 >0	9,44E-01	0,94 (0,19 - 3,36)	0,93	0,00
FGFR2 >0	9,63E-01	0,96 (0,31 - 2,87)	0,95	0,00
SURV NUC >0	0,00E+00	0(NA - 2,473263E+121)	0,99	0,06
P27 >0	5,32E+06	5315556,4976(0 - NA)	0,99	0,03
ECAD MEM >0	4720251,663	4720251,6628(0 - NA)	0,99	0,03
ECAD CIT >0	4,72E+06	4720251,6628(0 - NA)	0,99	0,03
BP1 >0	5,52E+06	5524009,6889(0 - NA)	0,99	0,02
BCL2 >0	4,80E+06	4796384,75 (0 - NA)	0,99	0,02
EGFR >0	1	1(0,20- 3,81)	1,00	0,00
HER4 CIT >0	NA	NA	NA	NA

En este caso no se ha encontrado ningún tipo de significación pronostica de mayor riesgo SLED como ya ocurriera en el subgrupo de receptores de estrógenos negativos.

Tabla 10.8: Análisis univariable según nivel de expresión mayor a la media

BIOMARC.	Odds Ratio	Intervalo confianza 95%	p-valor	R2,Naglekerke
SURV NUC>100	0,35	0,35 (0,09 - 1,14)	0,10	0,06
KI67>10	2,16	2,16 (0,82 - 5,98)	0,12	0,04
CIC NUC>80	2,24	2,24 (0,77 - 6,81)	0,14	0,04
PTEN NUC>112,5	2,16	2,16 (0,72 - 6,97)	0,18	0,04
BCL2>160	0,51	0,51 (0,17 - 1,44)	0,22	0,03
pHER3>0	1,88	1,88 (0,61 - 5,72)	0,26	0,03
GATA3>100	0,55	0,55 (0,16 - 1,66)	0,30	0,02
SURV CIT>50	0,55	0,55 (0,15 - 1,69)	0,31	0,02
PR>50	0,65	0,65 (0,23 - 1,70)	0,39	0,01
HER4 NUC>0	0,63	0,62 (0,17 - 1,96)	0,44	0,01
BP1>110	0,66	0,66 (0,21 - 1,94)	0,46	0,01
ALDH>0	1,47	1,47 (0,47 - 4,41)	0,49	0,01
P27>100	0,77	0,77 (0,23 - 2,30)	0,65	0,00
pAKT CIT>50	1,28	1,28 (0,42 - 3,79)	0,65	0,00
FGFR2 CIT>130	1,21	1,21 (0,40 - 3,63)	0,74	0,00
p65 NUC>10	1,20	1,20 (0,40 - 3,60)	0,74	0,00
HER4 MEM>0	0,82	0,82 (0,23 - 2,6)	0,74	0,00
p65 CIT>140	0,86	0,86 (0,27 - 2,53)	0,78	0,00
PTEN CIT>122,5	1,16	1,16 (0,39 - 3,48)	0,78	0,00
ECAD CIT>150	0,86	0,86 (0,27 - 2,49)	0,79	0,00
CIC CIT>30	1,14	1,14 (0,38 - 3,27)	0,81	0,00
pAKT NUC>80	0,88	0,88 (0,28 - 2,60)	0,82	0,00
HER4 CIT>110	0,93	0,93 (0,29 - 2,83)	0,89	0,00
HER2>0	0,94	0,94 (0,19 - 3,36)	0,93	0,00
FGFR2 NUC>0	0,96	0,96 (0,30 - 2,87)	0,95	0,00
EGFR>0	1,00	1 (0,20 - 3,81)	1,00	0,00
CK 5/6>1	NA	NA	NA	NA
ECAD MEM>3	NA	NA	NA	NA

Tampoco existe significación pronostica en esta serie con punto de corte en la media de la expresión de los diferentes biomarcadores.

Tabla 10.9: Análisis univariable según nivel de expresión por punto de corte óptimo

BIOMARC.	Odds Ratio	Intervalo confianza 95%	p-valor	R2,Nagl ekerke
KI67>=24,5	**3,22E+00**	**3,22 (1,19 - 8,79)**	**0,02**	**0,08**
CIC NUC>=147,5	**3,82E+00**	**3,81 (1,15 - 12,61)**	**0,02**	**0,09**
SURV NUC>=92	**2,73E-01**	**0,27 (0,07 - 0,84)**	**0,02**	**0,10**
pAKT CIT>=145	**1,29E+01**	**12,85 (1,52 - 270,97)**	**0,03**	**0,10**
BCL2>=77,5	**2,66E-01**	**0,26 (0,07 - 0,94)**	**0,03**	**0,07**
GATA3>=87,5	3,34E-01	0,33 (0,10 - 1,02)	0,06	0,08
PR>=17,5	4,27E-01	0,42 (0,15 - 1,12)	0,09	0,05
FGFR2 CIT>=215	2,68E+00	2,68 (0,82 - 8,57)	0,09	0,05
PTEN CIT>=5	1,25E-01	0,12 (0,005 - 1,38)	0,10	0,06
BP1>=202,5	6,50E+00	6,5 (0,58 - 145,37)	0,14	0,05
p65 CIT>=32,5	3,61E-01	0,36 (0,08 - 1,58)	0,15	0,04
HER4 NUC>=35	2,50E-01	0,25 (0,01 - 1,43)	0,20	0,05
FGFR2 NUC>=130	2,84E+00	2,83 (0,51 - 14,38)	0,20	0,03
pHER3>=2,5	1,88E+00	1,87 (0,61 - 5,72)	0,26	0,03
pAKT NUC>=135	2,40E+00	2,4 (0,44 - 11,03)	0,27	0,02
p65 NUC>=130	2,16E+07	21591800(0 - NA)	0,99	0,06
CIC CIT>=85	2,13E+07	21337780(0 - NA)	0,99	0,06
P27>=235	1,90E+07	18966910(0 - NA)	0,99	0,06
ECAD CIT>=25	4,72E+06	4720252(0 - NA)	0,99	0,03
PTEN NUC>=235	6,36E+07	63648870(0 - NA)	0,99	0,12
ALDH	NA	NA	NA	NA
CK 5/6	NA	NA	NA	NA
ECAD MEM	NA	NA	NA	NA
EGFR	NA	NA	NA	NA
HER4 MEM	NA	NA	NA	NA
HER4 CIT	NA	NA	NA	NA
HER2	NA	NA	NA	NA
SURV CIT	NA	NA	NA	NA

En este caso se encuentra asociación entre diversos biomarcadores: Ciclina *nuclear* >147, Ki67 >24, pAKT *citoplasmática* >145 y Survivin *nuclear* >92 también se ha efectuado un estudio de cada una de ellos a trabes de tablas de contingencia 2 x 2 para axial poder valorar el porcentaje de las frecuencias, la asociación y el riesgo relativo de cada uno de ellos.

Tabla 10.10: Variables con significación y su asociación con metástasis

VARIABLES	M=NO	M= SI	VALOR P	RR (INTERVALO)
CICLINA NUC : <147	54 (83%)	11(17%)	0,028	3,8 (1,1 – 12,4)
: >147	9 (53%)	7 (47%)		
KI67 : <24	54 (84%)	10 (15%)	0,026	2,9 (1,1 – 7,8)
: >24	22 (64%)	12 (35%)		
PAKT CIT : <145	60 (81%)	14 (19%)	0,031	12 (1,2 – 133)
: >145	1 (25%)	3 (75%)		
SURVIVIN NUC: <92	24 (68%)	11 (31%)	0,024	0,2 (0,08 – 0,88)
: >92	40 (88%)	5 (12%)		

En este subgrupo la asociación con mayor riesgo de metástasis es menor que en grupo anterior con receptores hormonales negativos, ya que aparte de haber menos pacientes, el hecho de tener una expresión de receptores ya confiere un buen pronostico y las posibilidades de aparición de metástasis son menores (21 vs 45%) que con ER positivos.

La menor expresión de Ciclina *nuclear*, KI67 y pAKT *citoplasmática* se asocia a menor riesgo de aparición de metástasis, mientras que la mayor expresión de Survivin *nuclear* se asocia a menor riesgo de metástasis.

10.3 Evaluación del valor pronóstico para metástasis de cada uno de los marcadores en función de la expresión de los receptores de estrógenos: MULTIVARIABLE

Se analizan las variables con mayor implicación en el modelo univariable en un modelo multivariable de regresión logística para los grupos de RE>0 y RE=0 y añadiéndose también los factores clínicos: ganglios residuales, tamaño inicial y final. Los resultados de las variables que se mantienen con significación en el modelo final de los dos grupos son:

Tabla 10.11: Modelo final multivariable de regresión logística para valores globales y según punto de corte para receptores de estrógenos negativos.

MODELO MULTIVARIABLE FINAL : VALORES GLOBALES				
	P-Valor	OR	I.C. 95% para OR	
			Inferior	Superior
p65 CIT	0,049	0,983	0,967	1

MODELO MULTIVARIABLE FINAL: PUNTO DE CORTE				
	P.Valor	O.R.	I.C. 95% para O.R.	
			Inferior	Superior
BP1<100	0,019	18,909	1,622	220,39
p65 CIT <85	0,009	0,021	0,001	0,383

Tabla 10.12: Modelo final multivariable de regresión logística para valores globales y según punto de corte para receptores de estrógenos positivos.

MODELO MULTIVARIABLE FINAL : VALORES GLOBALES				
VARIABLE	P-Valor	O.R.	I.C. 95% para O.R.	
			Inferior	Superior
TINI	0,004	2,077	1,269	3,4

MODELO MULTIVARIABLE FINAL : PUNTO DE CORTE				
	Sig.	O.R.	I.C. 95% para O.R.	
			Inferior	Superior
TINI	0,006	2,611	1,324	5,147
GANGLIOS=0	0,026			
GANGLIOS 1-3	0,055	23,708	0,932	603,317
GANGLIOS >3	0,008	206,002	4,12	10301,35
GATA3<187	0,053	0,021	0	1,048

En el subgrupo de ER negativos las variables P65 *citoplasmática* y 53BP1 son las que se repiten en los modelos univariable y multivariable destacando que tienen más valor que las variables clínicas. Mientras que en el subgrupo de ER positivos son las variables clínicas las que tienen más impacto, sobre todo los ganglios residuales y el tamaño inicial siendo únicamente la expresión de GATA3 la que adquieren significación.

11. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE BIOMARCADORES PARA SLED EN RECEPTORES DE ESTRÓGENOS NEGATIVOS

Hemos ajustado un modelo de Cox para evaluar SLED a partir de los niveles de expresión por IHQ de cada uno de los marcadores individualmente y el punto de corte establecido. No se han analizado los resultados en función de expresión por valor > 0, la media o por los cuartiles ya que no dio ningún resultado en el modelo global.

Tabla 11.1: Análisis univariable de los biomarcadores en expresión cuantitativa

BIOMARC	Hazard Ratio	INTERVALO CONFIANZA	p.Valor
HER4 NUC	**1,02**	**1,02 (1,01 - 1,03)**	**0,003**
KI67	**1,01**	**1,01 (1 - 1,021)**	**0,04**
HER4 CIT	**1,01**	**1,01 (1 - 1,01)**	**0,05**
P27	1,00	1,00 (0,99 - 1,00)	0,13
p65 NUC	1,01	1,01 (0,99 - 1,01)	0,16
EGFR	1,56	1,56 (0,83 - 2,93)	0,16
GATA3	1,00	1,00 (0,99 - 1,00)	0,20
PR	1,00	1,00 (0,99- 1,00)	0,22
SURV CIT	1,00	1,00 (0,98 - 1,00)	0,27
BCL2	1,00	1,00 (0,99 - 1,00)	0,34
pHER3	1,00	1,00 (0,99 - 1,00)	0,40
pAKT NUC	1,00	1,00 (0,99 - 1,01)	0,46
HER2	1,26	1,26 (0,67 - 2,37)	0,47
HER4 MEM	0,88	0,88 (0,60 - 1,27)	0,50
CK 5/6	1,22	1,22(0,68 - 2,17)	0,50
ECAD CIT	1,00	1,00 (0,99 - 1,00)	0,57
ECAD MEM	1,10	1,10 (0,77 - 1,57)	0,59
FGFR2 CIT	1,00	1,00 1(0,99 - 1,00)	0,60
SURV NUC	1,00	1,00 (0,99- 1,00)	0,61
FGFR2 NUC	1,01	1,01 (0,97 - 1,04)	0,71
PTEN NUC	1,00	1,00 (0,99 - 1,00)	0,76
ALDH	1,10	1,10 (0,60 - 1,98)	0,76
BP1	1,00	1,00 (0,99 - 1,00)	0,83
p65 CIT	1,00	1,00 (0,99 - 1,00)	0,85
CIC CIT	1,00	1,00 (0,99 - 1,00)	0,85
CIC NUC	1,00	1 (0,99 - 1,00)	0,90
PTEN CIT	1,00	1 (0,99 - 1,00)	0,90
pAKT CIT	1,00	1 (0,99 - 1,00)	0,96

Se encuentran significativos los biomarcadores HER4 *citoplasmática* y *nuclear* y la expresión de KI67, tal y como aparecía en el anterior modelo.

Tabla 11.2: Analisis univariable por nivel de expresión según un punto de corte óptimo

BIOMARC	Hazard Ratio	INTERVALO CONFIANZA	p.Valor
PTEN NUC<195	**4,97**	**4,9 (1,74 - 14,23)**	**0,003**
BP1<100	**4,00**	**4,0 (1,39 - 11,47)**	**0,01**
PR<10	**0,50**	**0,50 (0,27 - 0,92)**	**0,02**
p65 NUC<37	**2,15**	**2,15 (1,03 - 4,46)**	**0,03**
HER4 CIT<70	**7,52**	**7,52 (1,03 - 54,69)**	**0,04**
p65 CIT<85	**0,53**	**0,53 (0,28 - 0,98)**	**0,04**
GATA 3 < 187	**0,33**	**0,33 (0,10 - 1,08)**	**0,06**
ki67<20	**1,83**	**1,83 (0,94 - 3,56)**	**0,07**
p27<72	0,61	0,61 (0,32 - 1,13)	0,12
EGFR	1,56	1,56 (0,83 - 2,93)	0,16
PTEN CIT<10	0,64	0,64 (0,30 - 1,32)	0,23
CIC NUC<147	1,42	1,42 (0,79 - 2,54)	0,24
BCL2 < 77	0,71	0,71 (0,39 - 1,27)	0,25
SURV CIT<50	0,82	0,82 (0,45 - 1,46)	0,50
PHER3>0	0,85	0,85 (0,45 - 1,61)	0,62
SURV NUC <92	1,16	1,16 (0,64 - 2,09)	0,62
pAKT CIC<145	1,64	1,64 (0,22 - 11,93)	0,63
E-CAD CIT<82	1,07	1,07 (0,60 - 1,89)	0,83
CIC CIT<95	1,09	1,09 (0,48 - 2,43)	0,84
pAKT NUC <45	0,92	0,92 (0,41 - 2,06)	0,84

11.1 Evaluación SLED individual de los marcadores con valor significativo en su punto de corte óptimo según el método de *Kaplan-Meier* y el estudio de sus curvas de supervivencia para ER negativos

Figura 11.1: Estudio de curva de supervivencia según expresión de 53BP1 para punto de corte superior a 100

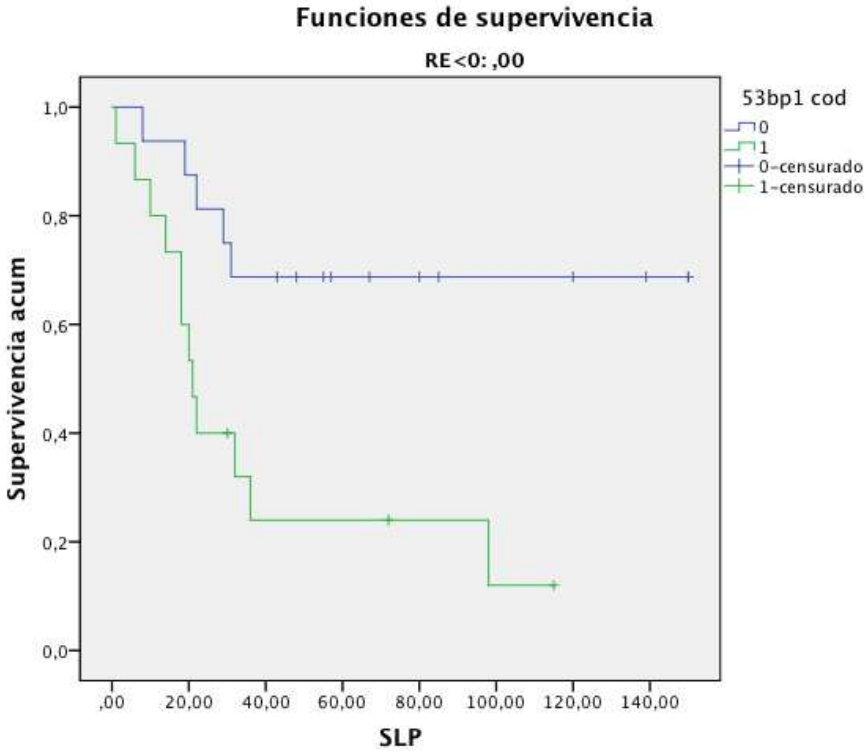


Tabla 11.3: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para expresión de 53BP1

	Total	Eventos	Media	Intervalo de confianza al 95%		
				Límite inferior	Límite superior	Valor P
53BP1<100	16	5	109,938	80,734	139,141	0,005
53BP1>100	15	12	39,667	19,296	60,037	
Global	31	17	77,674	54,688	100,659	

En este caso solo se encuentra significación en valores >100 para el subgrupo de ER negativos, aunque como se vio anteriormente también se encuentra esta asociación en el grupo global, por lo que su valor es exclusivo para receptores de estrógenos negativos.. Por lo tanto el tener valores altos en el tejido residual de 53BP1 condiciona un mal pronóstico para el subgrupo de ER negativos.

Figura 11.2: Estudio de curva de supervivencia según expresión de E-Cadherina *citoplasmática* para punto de corte superior a 82

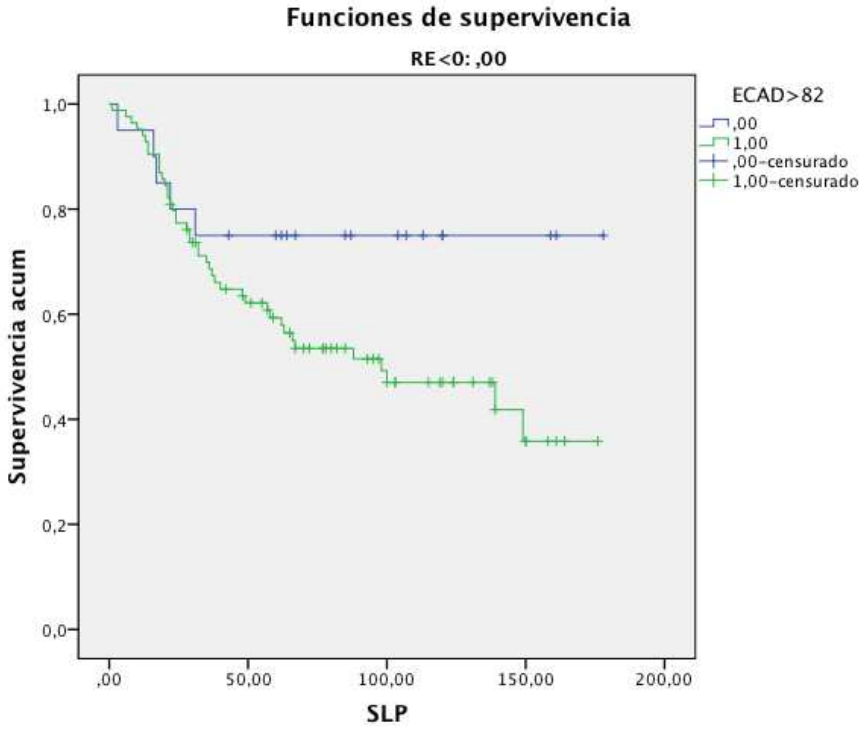


Tabla 11.4: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para expresión de E-Cadherina *citoplasmática* para punto de corte superior a 82

	Total	Eventos	Media	Intervalo de confianza al 95%		
				Límite inferior	Límite superior	Valor P
ECAD CIT<82	20	5	137,95	107,482	168,418	
ECAD CIT >82	84	42	99,954	84,146	115,762	
Global	104	47	107,863	93,268	122,458	0,079

La pérdida de expresión de E-Cadherina se ha asociado al subtipo lobulillar que presenta unas características algo diferentes del ductal sobe todo en cuanto a un mejor pronóstico y por tanto mejor supervivencia. En nuestra serie la baja expresión de E-Cadherina *citoplasmática* se asocia a una mejor supervivencia libre de progresión.

Figura 11.3. Estudio de curva de supervivencia según expresión de HER4 citoplasmática para punto de corte superior a 70

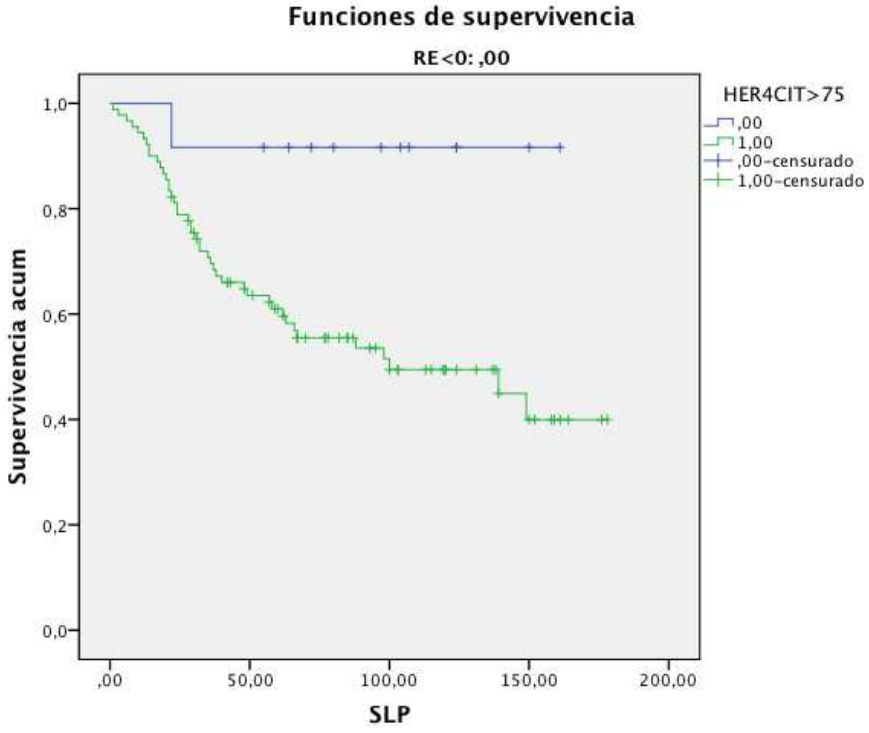


Tabla 11.5: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para expresión de HER4 *citoplasmática* para punto de corte superior a 70

	Total	Eventos	Media	Intervalo de confianza al 95%		
				Límite inferior	Límite superior	Valor P
HER4CIT<70	12	1	149,417	127,68	171,153	
HER4CIT>70	90	43	104,304	88,733	119,875	
Global	102	44	111,552	96,969	126,134	0,019

HER4 forma parte de la familia de receptores de membrana HER2 y su expresión no se asocia a la expresión HER2. Está regulado por la unión con su factor de crecimiento E-Regulina y se han estudiado mecanismos de bloqueo del mismo como diana terapéutica. Todavía no se ha asociado su expresión a factor pronóstico. En nuestra serie hay una asociación muy significativa entre la expresión de HER4 y SLED.

Figura 11.4. Estudio de curva de supervivencia según expresión de p65 citoplasmática para punto de corte superior a 85

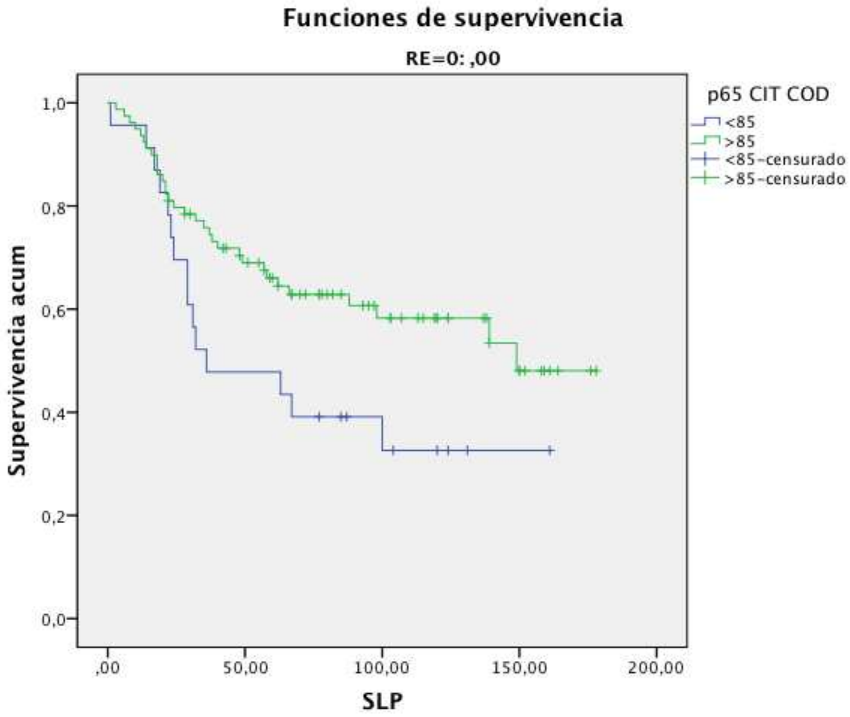


Tabla 11.6: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para expresión de p65 *citoplasmática* para punto de corte superior a 65

	Total	Eventos	Media	Intervalo de confianza al 95%		
				Límite inferior	Límite superior	Valor P
P65 CIT<85	23	15	76,717	50,836	102,591	
P65 CIT>85	79	32	115,513	99,040	131,986	
Global	102	47	107,301	92,644	121,958	0,042

P65 forma parte del complejo NFKb implicado en proliferación celular. Se desconoce su papel como factor pronostico. En nuestra serie tiene una notable significación pronostica tanto en los modelos multivariables como a nivel univariable. Valores de expresión altos de p65 se correlacionan con mejor supervivencia.

Figura 11.5. Estudio de curva de supervivencia según expresión de p65 nuclear para punto de corte superior a 37

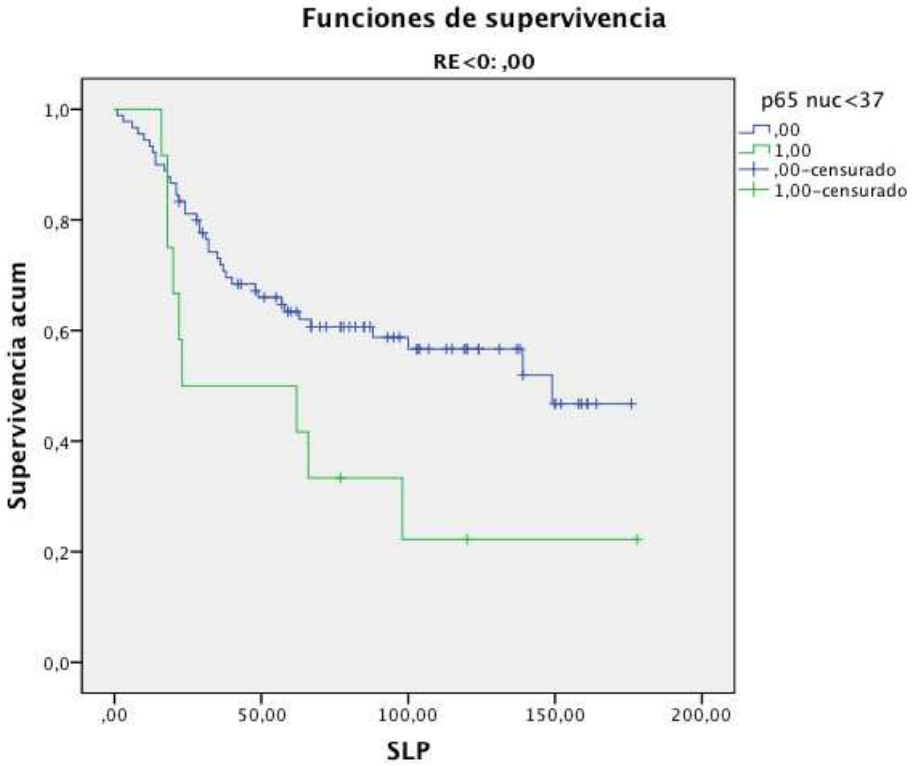


Tabla 11.7: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para expresión de p65 *nuclear* para punto de corte superior a 37

	Total	Eventos	Media	Intervalo de confianza al 95%		
				Límite superior	Límite inferior	Valor P
p65 NUC<37	90	38	133,576	111,768	96,425	
p65 NUC>37	12	9	96,569	70,861	34,539	
Global	102	47	121,958	107,301	92,644	0,034

También se comporta de una forma similar que p65 nuclear , la menor expresión se asocia con mejor supervivencia.

Figura 11.6. Estudio de curva de supervivencia según expresión de PTEN nuclear para punto de corte superior a 195

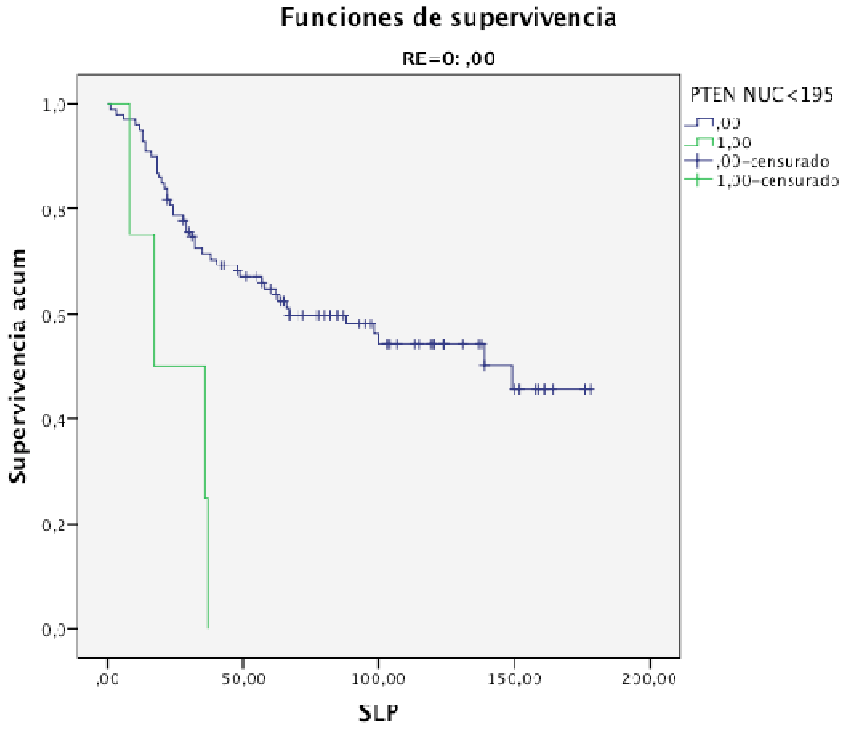


Tabla 11.8: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para expresión de PTEN *nuclear* para punto de corte superior a 195

	Total	Eventos	Media	Intervalo de confianza al 95%		
				Límite inferior	Límite superior	Valor P
PTEN NUC<195	99	43	111,002	96,162	125,841	
PTEN NUC>195	4	4	24,5	10,446	38,554	
Global	103	47	107,53	92,895	122,177	0,001

La pérdida de PTEN se asocia a activación de la vía PI3K y resistencia a fármacos más dirigidos como el tratamiento hormonal y con *Trastuzumab*, pero se desconoce su papel como factor pronóstico sobre todo su expresión a nivel nuclear. En nuestra serie se asocia a mal pronóstico a nivel global y especialmente en el subgrupo de receptores negativos.

Figura 11.7: Estudio de curva de supervivencia según expresión de GATA 3 para punto de corte superior a 187

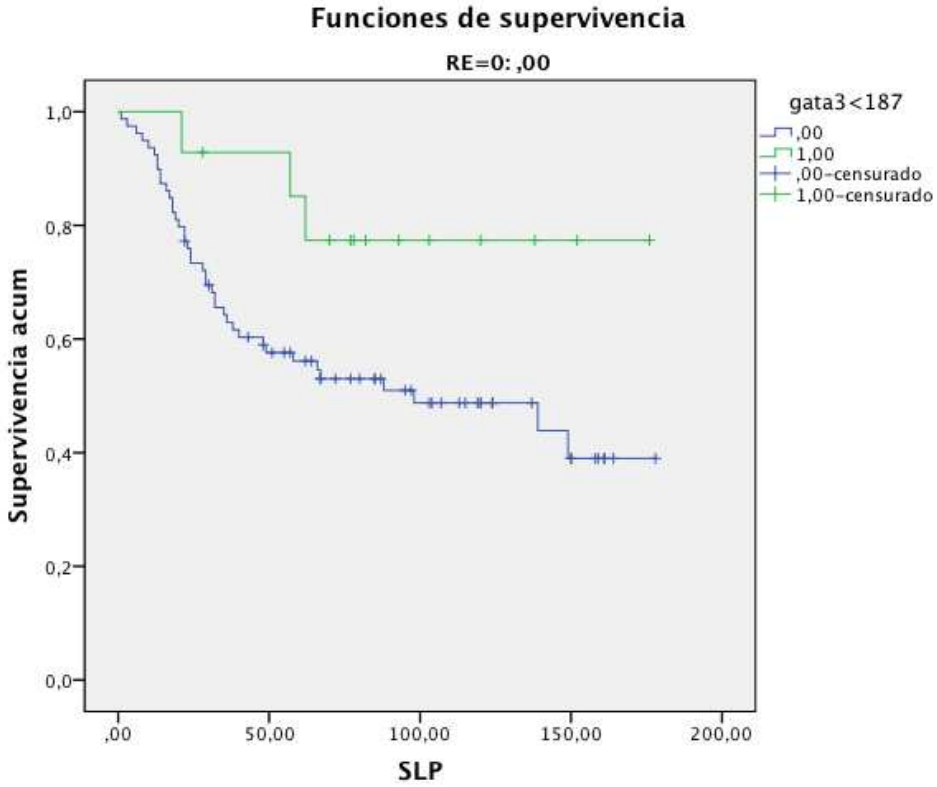


Tabla 11.9: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para expresión de GATA 3 para punto de corte superior a 187

GATA3<187	Nº total	Eventos	Media	Intervalo de confianza al 95%		
				Límite inferior	Límite superior	Valor P
GATA3<187	79	40	100,011	83,202	116,82	
GATA3>187	14	3	146,899	117,655	176,142	
Global	93	43	106,897	91,451	122,343	0,055

La expresión de GATA3 se ha asociado con la diferenciación a Luminal y con mejor pronóstico[22]. En el subgrupo de ER negativos hay una clara asociación entre niveles altos de GATA3 y mejor supervivencia que iría en consonancia con los datos publicados. La hipótesis seria que la expresión de GATA 3 induciría una mayor diferenciación a luminal y con ello a un mejor pronostico.

12. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE BIOMARCADORES PARA SLED EN RECEPTORES DE ESTRÓGENOS POSITIVOS.

Hemos ajustado un modelo de *Cox* para evaluar el valor pronóstico (SLED) a partir de los niveles de expresión por IHQ de cada uno de los marcadores individualmente.

Tabla 12.1: Análisis univariable de los biomarcadores en expresión cuantitativa

BIOMARCADOR	Hazard Ratio	INTERVALO CONFIANZA	p.Valor
KI67	**1,01**	**1,01 (0,99 - 1,04)**	**0,05**
CIC NUC	**1,00**	**1,00 (0,99 - 1,01)**	**0,08**
CIC CIT	1,02	1,01 (0,99 - 1,03)	0,13
SURV NUC	0,99	0,99 (0,97 - 1,00)	0,16
pAKT CIT	1,01	1,00 (0,99 - 1,01)	0,17
HER4 NUC	0,98	0,98 (0,95 - 1,01)	0,21
SURV CIT	0,99	0,99 (0,97 - 1,00)	0,22
p65 NUC	1,01	1,00 (0,99 - 1,01)	0,29
BCL2	1,00	0,99 (0,99 - 1,00)	0,31
CK 5/6	1,51	1,50 (0,63 - 3,59)	0,36
PTEN NUC	1,00	1,00 (0,99 - 1,01)	0,41
pHER3	0,99	0,99 (0,97 - 1,01)	0,42
ALDH	1,47	1,47 (0,56 - 3,87)	0,43
ECAD MEM	1,23	1,22 (0,68 - 2,19)	0,49
p65 CIT	1,00	0,99 (0,99 - 1,00)	0,52
P27	1,00	1,00 (0,99 - 1,01)	0,63
HER4 CIT	1,00	1,00 (0,99 - 1,01)	0,65
FGFR2 NUC	1,00	1,00 (0,99 - 1,00)	0,70
ECAD CIT	1,00	1,00 (0,99 - 1,01)	0,71
GATA3	1,00	0,99 (0,99 - 1,00)	0,74
pAKT NUC	1,00	1,00 (0,99 - 1,01)	0,75
PR	1,00	0,99 (0,99 - 1,00)	0,76
FGFR2 CIT	1,00	0,99 (0,99 - 1,00)	0,80
PTEN CIT	1,00	1,00 (0,99 - 1,01)	0,81
HER2	0,89	0,88 (0,26 - 3,02)	0,85
EGFR	1,10	1,10 (0,32 - 3,77)	0,88
BP1	1,00	1,00 (0,99 - 1,01)	0,91
HER4 MEM	1,01	1,00 (0,46 - 2,15)	0,99

En este caso solo la expresión de Ki67 muestra significación aunque la expresión de Ciclina *nuclear* se acerca bastante a la significación y sería un biomarcador a tener en cuenta dado que también salía significativo en modelos anteriores.

Tabla 12.2: Resultados por nivel de expresión según un punto de corte óptimo

BIOMARCADOR	Hazard Ratio	INTERVALO CONFIANZA	p.Valor
pAKT CIT<145	**5,81**	**5,81 (1,64 - 20,54)**	**0,006**
SURV NUC <92	**0,29**	**0,29 (0,10 - 0,85)**	**0,024**
CIC NUC<147	**2,87**	**2,87 (1,12 - 7,32)**	**0,027**
ki67<20	**2,58**	**2,58 (1,11 - 5,98)**	**0,027**
BCL2 < 77	**0,39**	**0,39 (0,14 - 1,03)**	**0,059**
PTEN NUC<195	**2,73**	**2,73 (0,96 - 7,81)**	**0,06**
CIC CIT<95	5,55	5,55 (0,72 - 42,73)	0,1
PR<10	0,49	0,49 (0,21 - 1,16)	0,11
p65 NUC<37	2,14	2,14 (0,75 - 6,10)	0,15
SURV CIT<50	0,52	0,51 (0,18 - 1,49)	0,23
BP1<100	1,75	1,74 (0,68 - 4,47)	0,24
HER4 CIT<70	3,09	3,08 (0,41 - 23,42)	0,28
p65 CIT<85	0,60	0,60 (0,21 - 1,71)	0,34
PHER3>0	1,59	1,59 (0,61 - 4,13)	0,34
PTEN CIT<10	0,55	0,54 (0,12 - 2,42)	0,43
GATA 3 < 187	1,50	1,49 (0,42 - 5,26)	0,53
p27<72	0,86	0,85 (0,31 - 2,31)	0,76
ECAD CIT<82	0,87	0,86 (0,32 - 2,27)	0,77
EGFR	1,10	1,10 (0,321 - 3,778)	0,88
pAKT NUC <45	0,93	0,933(0,344 - 2,535)	0,89

En este caso las variables significativas son pAKT *citoplasmática* <145, Survivin >92, Ciclina *nuclear* >147, KI67<20, BCL2<77 y PTEN *nuclear* <195. Destacando que la expresión de KI67 y Ciclina *nuclear* eran las que as se asociaban en el modelo con expresión cuantitativa.

12.1 Evaluación SLED individual de los marcadores con valor significativo en su punto de corte optimo según método de *Kaplan-Meier* y el estudio de sus curvas de supervivencia para receptores de estrógenos positivos

Figura 12.1: Estudio de curva de supervivencia según expresión de BCL2 para punto de corte superior a 77.

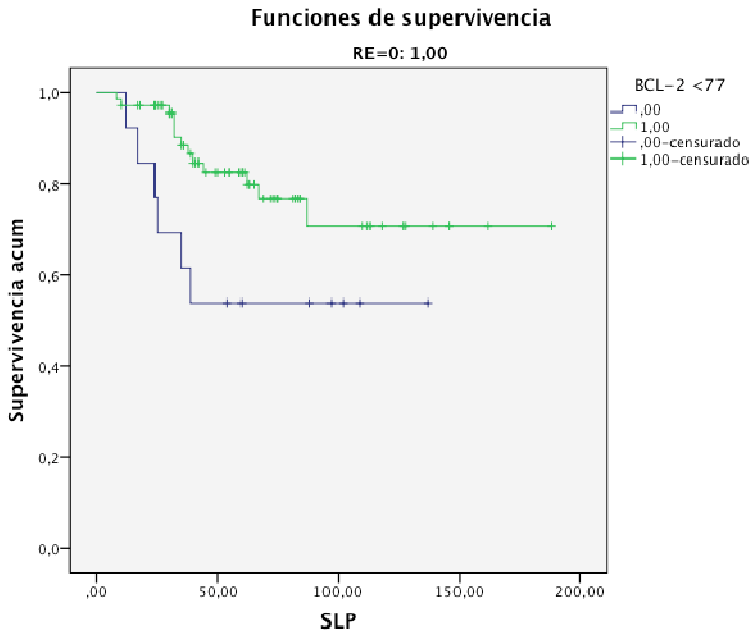


Tabla 12.3: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para expresión de BCL2 para punto de corte superior a 77

			Media			
	Nº total	Eventos	Estimación	Intervalo de confianza al 95%		valor P
				Límite inferior	Límite superior	
BCL2 <77	13	6	85,462	55,002	115,921	
BCL2>77	70	13	147,380	127,296	167,465	
Global	83	19	142,747	124,945	160,549	0,05

La expresión de BCL2 se asocia a mejor pronostico en la serie global y en el subgrupo de ER positivos. Probablemente la menor expresión de BCL 2 puede diferenciar un subgrupo de tumores con expresión de ER que no se comporte como tal.

Figura 12.2. Estudio de curva de supervivencia según expresión de ciclina nuclear para punto de corte superior a 147.

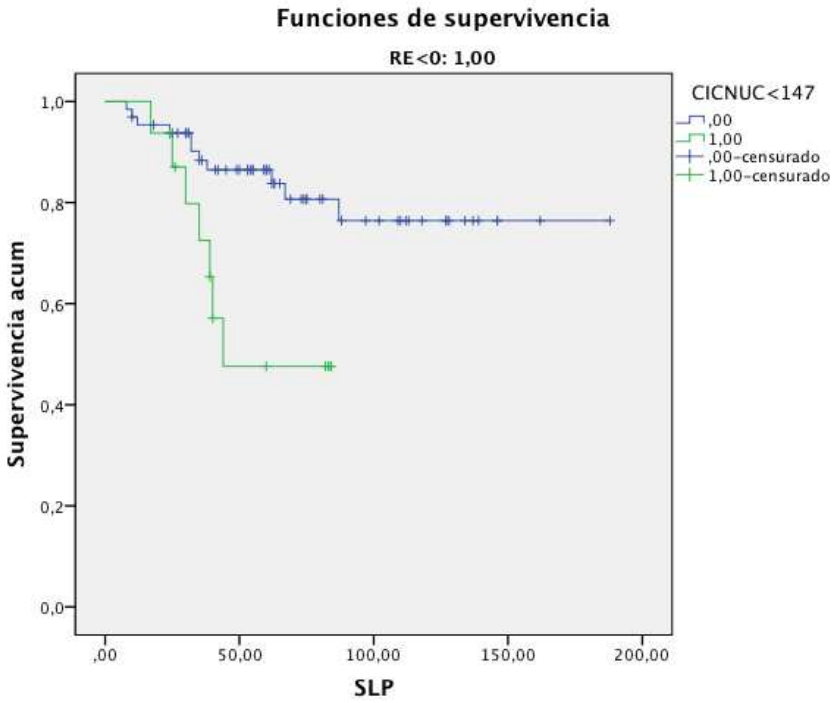


Tabla 12.4: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para expresión de Ciclina *nuclear* para punto de corte superior a 147

			Media			
	Total	Eventos	Estimación	Intervalo de confianza al 95%		valor P
				Límite inferior	Límite superior	
CIC NUC<147	65	11	154,481	136,498	172,464	
CIC NUC>147	16	7	57,725	43,797	71,654	
Global	81	18	145,161	127,728	162,594	0,009

En este caso la asociación es para ER positivos para la expresión de Ciclina *nuclear* >147. En los últimos estudios se ha considerado a Ciclina D *nuclear* como la diana de los ER por lo que tendría sentido esta asociación. También resulta interesante conocer que existen fármacos que actúan contra Ciclina D1 en pacientes con expresión de ER.

Figura 12.3: Estudio de curva de supervivencia según expresión de KI67 para punto de corte superior a 20.

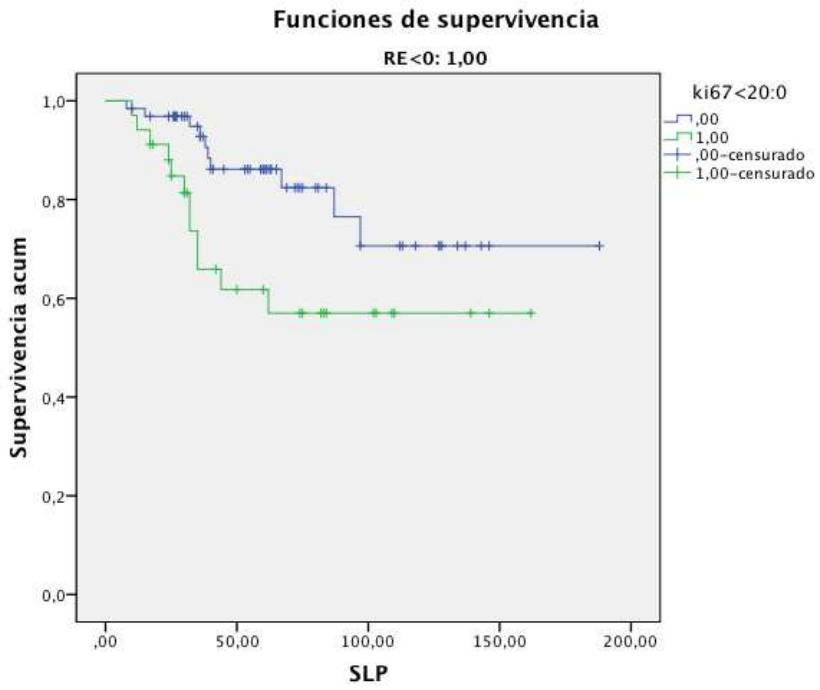


Tabla 12.5: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para expresión de Ki67 para punto de corte superior a 20

	Total	Eventos	Media	Intervalo de confianza al 95%		
				Límite inferior	Límite superior	Valor P
KI67<20	64	10	150,454	129,331	171,576	
KI67>20	34	12	106,043	81,55	130,536	
Global	98	22	140,899	123,815	157,983	0,021

La expresión de KI67 alcanza significado pronóstico para el grupo de receptores de estrógenos positivos. Desde hace bastante tiempo se considera que el grupo de receptores de estrógenos positivos se subdivide en dos subgrupos en función, sobretodo, de la expresión de KI67 (Luminal A y B) ya que diferencia el pronóstico de ambos. Por lo que nuestros hallazgos concuerdan con lo que ya está plenamente establecido.

Figura 12.4: Estudio de curva de supervivencia según expresión de pAKT *citoplasmática* para punto de corte superior a 147**.**

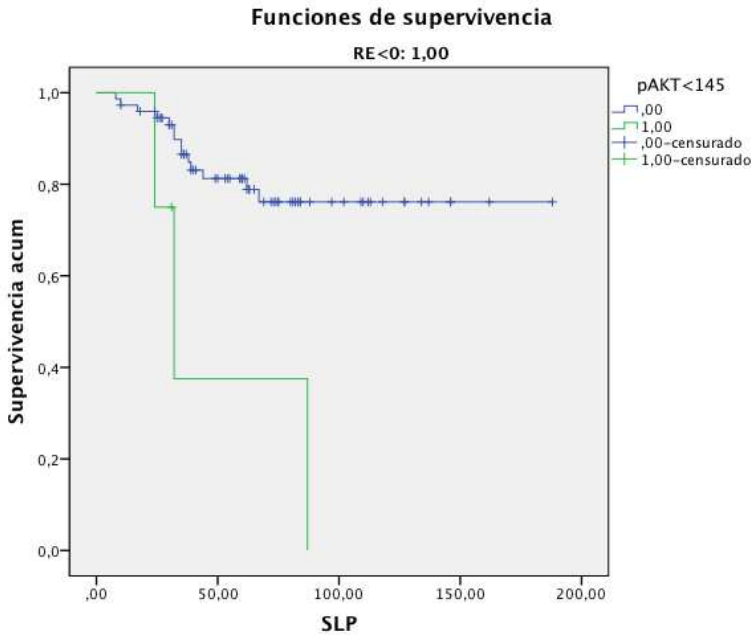


Tabla 12.6: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para expresión de pAKT *citoplasmática* para punto de corte superior a 145

	Total	Eventos	Estimación	Intervalo de confianza al 95%		
				Límite inferior	Límite superior	Valor P
pAKT CIT<145	74	14	152,034	135,26	168,808	
pAKT CIT >145	4	3	50,625	11,052	90,198	
Global	78	17	144,81	126,675	162,945	0,002

Aunque la expresión de pAKT >145 se asocia a peor supervivencia de forma muy significativa , el hecho de que solo se encuentren 4 pacientes con esta expresión le resta importancia a este biomarcador.

Figura 12.5. Estudio de curva de supervivencia según expresión de PTEN *nuclear* para punto de corte superior a 195.

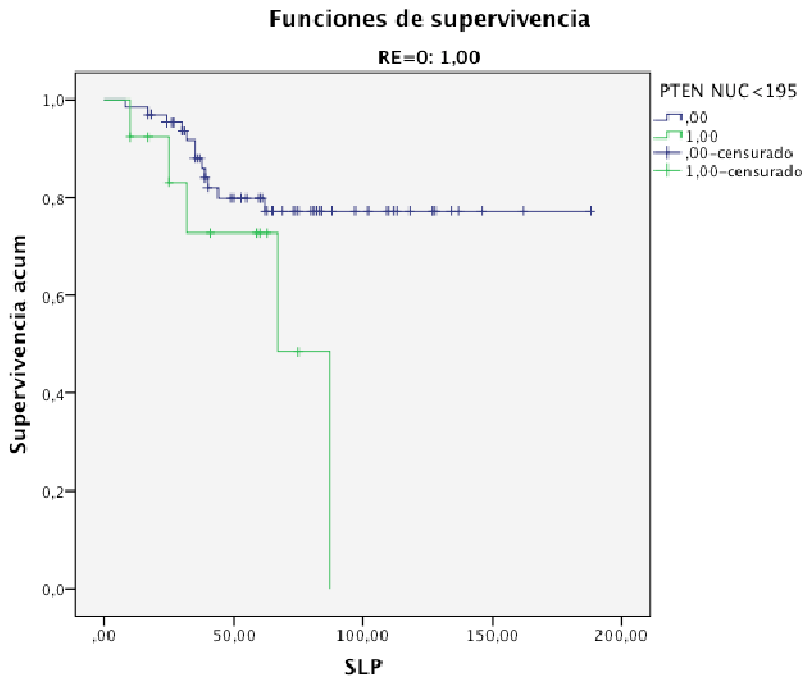


Tabla 12.7: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para expresión de PTEN *nuclear* para punto de corte superior a 195

PTEN NUC<195	Total	Eventos	Media	Intervalo de confianza al 95%		Valor P
				Límite inferior	Límite superior	
PTEN NUC<195	65	12	153,218	135,712	170,724	
PTEN NUC>195	13	5	64,796	45,745	83,847	
Global	78	17	143,947	125,572	162,322	0,049

La alta expresión de PTEN *nuclear* también se asocia a mal pronóstico en este subgrupo, tal como pasa en la serie global y en el grupo de receptores de estrógenos negativos. Este hecho le tiene que dar una gran importancia como factor de mal pronóstico independiente de la expresión de receptores

Figura 12.6: Estudio de curva de supervivencia según expresión de Survivin *nuclear* para punto de corte superior a 92.

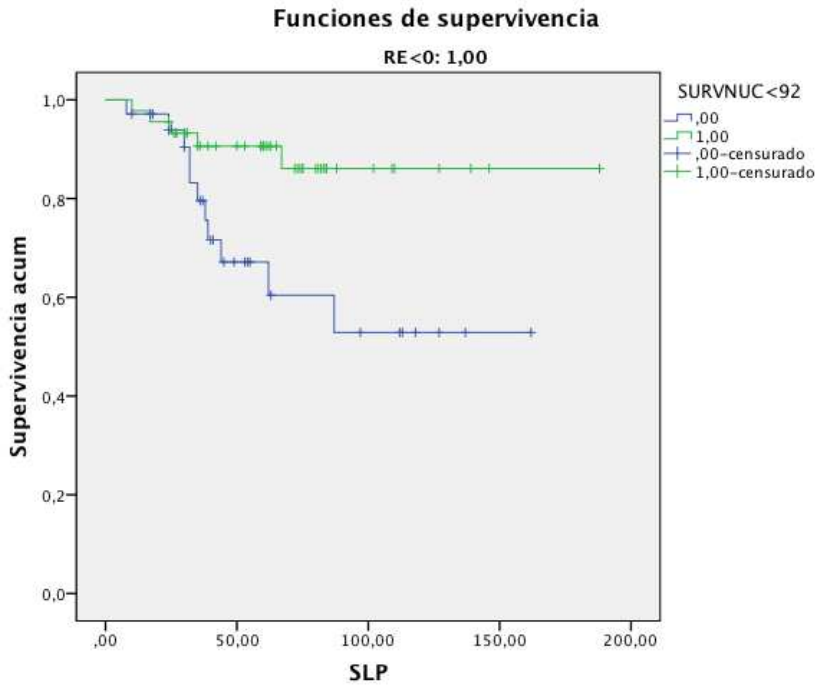


Tabla 12.8: Medias de supervivencia según el método de *Kaplan-Meier* para expresión de Survivin *nuclear* para punto de corte superior a 92

	Total	Eventos	Media	Intervalo confianza al 95%		Valor P
				Límite inferior	Límite superior	
SURV NUC<92	35	11	107,054	81,985	132,122	
SURV NUC>92	45	5	166,976	149,489	184,463	
Global	80	16	146,443	128,12	164,765	0,016

La baja expresión de Survivin *nuclear* se asocia de forma significativa con peor supervivencia, hay que tener en cuenta que también sale significativa en el modelo multivariable teniendo en consideración factores clínicos por lo que posiblemente sea la que más significado pronóstico tiene en este grupo de receptores de estrógenos positivos.

13. EVALUACIÓN DEL VALOR PRONÓSTICO INDIVIDUAL PARA SLED DE CADA UNO DE LOS MARCADORES EN FUNCION DE LA EXPRESION DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS: MULTIVARIABLE

Se ha analizado un modelo de *Cox* multivariable con los valores globales y según los distintos puntos de corte encontrado para los subgrupos de receptores hormonales teniendo también en cuenta las variables clínicas. Para el subgrupo de receptores negativos los resultados de las variables con mayor significación se resumen en las siguientes tablas.

Tabla 13.1: Receptores de estrógenos negativos. RE=0. Valorares globales

MODELO MULTIVARIABLE DE COX FINAL. VARIABLES GLOBALES				
VARIABLE	P-Valor	HR	95,0% IC para HR	
			Inferior	Superior
TINI	0,013	3,679	1,32	10,251
GANGLIOS	0,023	2,798	1,152	6,8
HER4 Cit	0,006	1,084	1,023	1,15
HER4 Nuclear	0,005	1,103	1,029	1,182
KI67	0,032	1,05	1,004	1,099
SURV Cit	0,006	0,857	0,766	0,957

Tabla 13.2: Receptores de estrógenos negativos. RE=0 Valores según punto de corte

MODELO MULTIVARIALBE DE COX FINAL: PUNTO DE CORTE				
VARIABLES	P-Valor	HR	95,0% IC para HR	
			Inferior	Superior
TINI	0,023	1,45	1,053	1,996
P65 cit<85	0,014	0,198	0,054	0,719
BP1<100	0,059	3,12	0,959	10,154

En el grupo de receptores negativos las variables : expresión de HER4 *citoplasmático* y *nuclear* y Survivin *citoplasmática* como valores globales son las que más significación alcanzan, incluso más que las variables clínicas.

En los análisis con punto de corte son P65 *citoplasmático* y 53BP1 las que más se asocian con SLED, también con mayor poder que las variables clínicas.

Los resultados para el subgrupo de receptores de estrógenos positivos también se resumen en las siguientes tablas

Tabla 13.3: Receptores de estrógenos positivos. RE>0. Valores globales

MODELO MULTIVARIABLE DE COX FINAL VALORES GLOBALES				
VARIABLE	Sig.	HR	95,0% IC para HR	
			Inferior	Superior
T INI	0,001	3,587	1,742	7,383
GANGLIOS	0,002	1,55	1,182	2,034
FGFR2 NUC	0,008	1,015	1,004	1,026
HER2	0,05	0,129	0,017	1,001

Tabla 13.4: Receptores de estrógenos positivos. RE>0. Valores en punto de corte

MODELO MULTIVARIABLE DE COX FINAL: PUNTO DE CORTE				
VARIABLE	P-Valor	HR	95,0% IC para HR	
			Inferior	Superior
T INI	0,003	1,68	1,198	2,357
GANGLIOS	0,001	1,345	1,136	1,592

Sin embargo en el subgrupo de receptores hormonales positivos solo se ha encontrado significación en las variables HER2 y FGFR nuclear según su expresión cuantitativa global pero siendo las variables clínicas (T INI y GANGLIOS) las que tienen mayor potencia. Por tanto son las variables clínicas las que tienen mayor significación en este subgrupo. En el modelo univariable se encontraron pocas variables con significación estadística por lo que al añadir las variables clínicas se pierde la significación de estas variables, siendo mas relevantes las variables clinicas en este subgrupo

14. RESUMEN DE TODAS LAS VARIABLES DE EXPRESIÓN

Tabla 14.1. Resumen de los resultados de las variables con algún tipo de significación

		Todas las pacientes		Pacientes ER=0		Pacientes ER>0		Pacientes ER<100		Pacientes ER>=100	
Marcador	Escala	OR	p-valor	OR	p-valor	OR	p-valor	OR	p-valor	OR	p-valor
BCL2	original	0.99	0.01								
	BCL2>130	0.47	0.01								
	BCL2>=77.5	0.40	0.005								
	BCL2>=162.5									0.22	0.04
RE	original	0.99	0.0002								
	RE>0	0.33	0.0002								
KI67	original	1.02	0.001								
	KI67>15	2.65	0.002								
	KI67>=19.5	1.58	0.0007								
	KI67>=24.5					3.22	0.02				
	KI67>=53							1.17	0.02		
PR	PR>0	0.54	0.03								
	PR>9	0.47	0.009								
PTEN CIT	PTEN CIT>0	0.35	0.04								
	PTEN CIT>=15	0.34	0.02								
PTEN NUC	PTEN NUC>=27.5	0.25	0.01								
CIC NUC	CIC NUC>=102.5	2.08	0.02								
	CIC NUC>=147.5					3.81	0.02				
	CIC NUC>=105									5.6	0.02
HER4CIT	HER4CIT>=75	7.02	0.009								
	HER4CIT>=70			1.88	0.019						
P65 CIT	P65 CIT>=85	0.40	0.01	0,34	0,022			0.14	0.02		
P65 NUC	P65 NUC>=37.5			4.25	0.01			1.09	0.03		
BP1	BP1>100			1.60	0.01						
	BP1>=102.5			1.604	0.01						
ECADCIT	ECADCIT>=82.5			1.08	0.04						
PAKT CIT	PAKT CIT>=145					1.52	0.03			2.28	0.01
SURV NUC	SURV NUC>=92.5					0.27	0.02				
GATA 3	GATA3>=187			0,259	0,05						

15. DISCUSION

15.1 Características generales de la serie

Aunque la ausencia de respuesta completa tras un tratamiento con QTN se asocia a peor pronóstico, sin embargo todavía hay un número importante de pacientes que a pesar de no tener una respuesta completa no presentan recidiva a los 5 años , 84% en los pacientes con receptores hormonales positivos y un 65% en receptores hormonales negativos[23] .

En nuestra serie las pacientes que alcanzan respuesta completa presentan una supervivencia libre de progresión a 5 años del 90% frente un 72% en los que no responden. Siendo en este subgrupo de no respuesta del 57% en el caso de ER negativos y del 71% en ER positivos.

Las características clínicas de las pacientes coinciden bastante con series parecidas con pacientes que reciben tratamiento con QTN, con una media de edad de 53 años, tamaño inicial de más de 2 cm en la mayoría de los casos , estado de HER2 positivo en un 20% y sí que hay una mayor incidencia de tumores con receptores hormonales negativos (54%) por lo que se seleccionó bastante por este estatus a la hora de planificar el tratamiento.

Se ha efectuado un análisis estadístico complejo para estudiar qué variables biológicas (29 biomarcadores) se asocian con las variables clínicas explicativas de pronóstico como son la aparición o no de metástasis y la SLED. Para ello se ha efectuado un primer análisis univariante para determinar qué biomarcadores se asocian a metástasis (regresión logística) y cuales a SLED (modelo de Cox). En este análisis de biomarcadores se han excluido los casos con respuesta completa al no disponer de tejido viable residual y no ser el objetivo del estudio.

15.2 análisis de los resultados de los biomarcadores con significación estadística

Se han encontrado 14 biomarcadores con significación pronostica: ER, RP, KI67, BCL2, PTEN *citoplasmático*, PTEN *nuclear*, P65 *citoplasmático*, P65 *nuclear*, Ciclina *nuclear*, 53BP1, GATA3, HER4 *citoplasmático*, ECAD *citoplasmático*, pAKT *citoplasmática* y Survivin *nuclear*.

Figura 15.1. Detalle de los biomarcadores que han presentado mejor significación estadística en la serie global con el porcentaje de aparición de metástasis en función de su expresión y según la expresión de ER. Se ha considerado como valor positivo como expresión por encima del punto de corte óptimo encontrado:

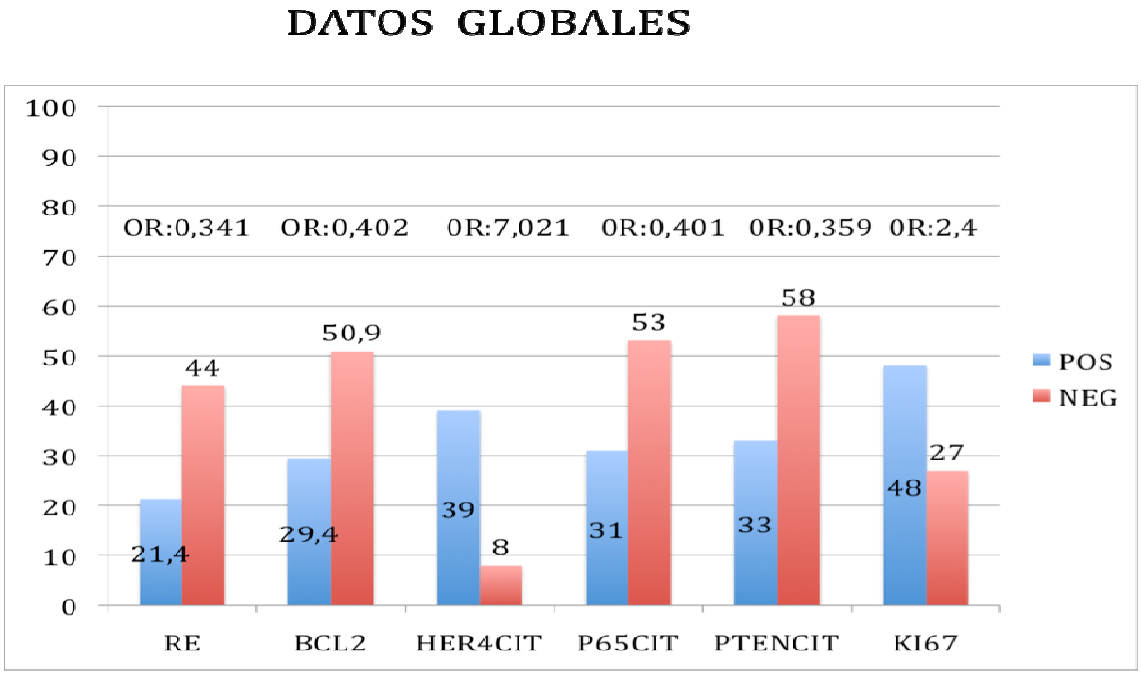


Figura 15.2 : Biomarcadores con significación para metástasis en RE negativos

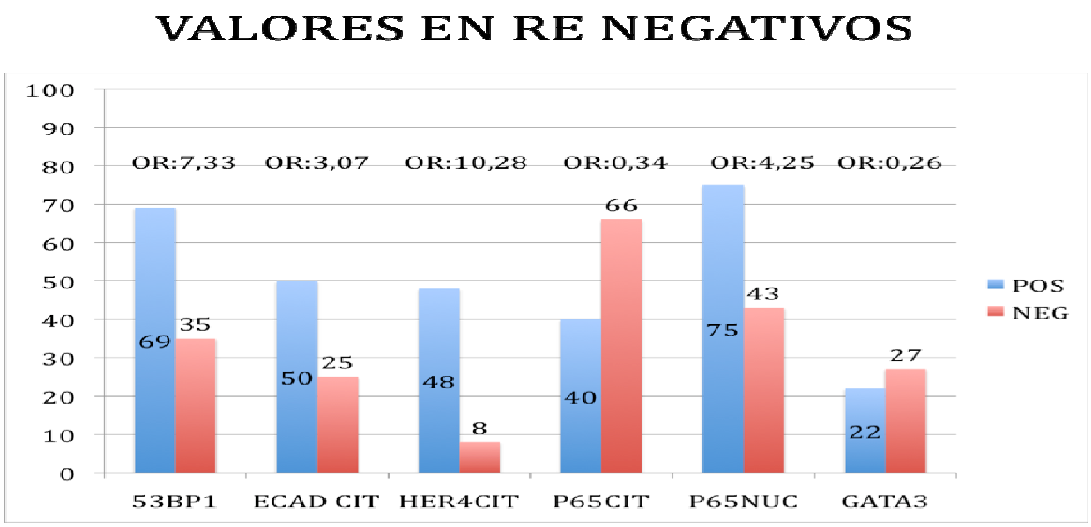
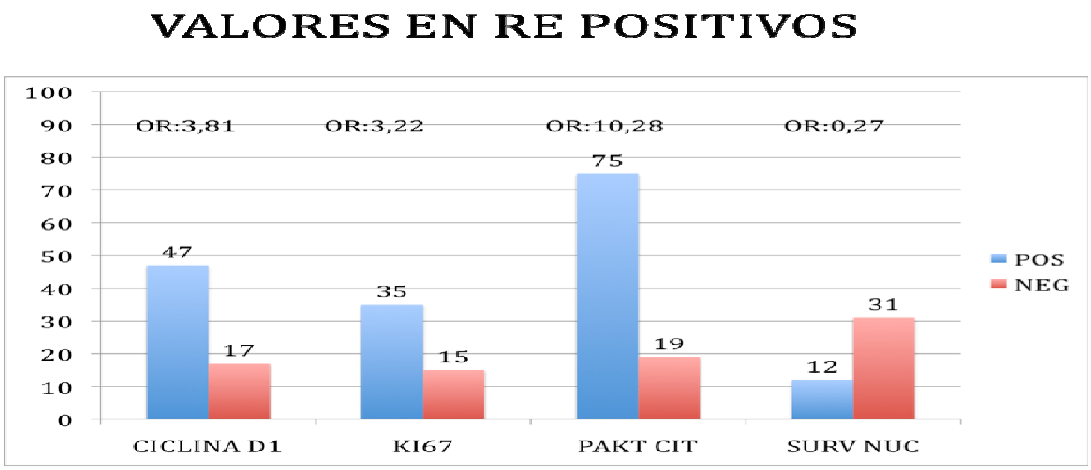


Figura 15.3: Biomarcadores con significación para metástasis en RE positivos



En cuanto a los resultados de la expresión de receptores hormonales y de KI67 se ajustan bastante a lo conocido desde hace mucho tiempo y ampliamente publicado, las pacientes con ER positivos tienen menos riesgo de metástasis con un 28% de aparición de metástasis frente a un 50% en el grupo de ER negativos (OR : 0,39) así como una SLED del 78% en el grupo de ER positivos frente a un 60% en el de receptores de estrógenos negativos (log rank p: 0,004) y también ocurre de forma muy parecida con los receptores de progesterona.

Con respecto a la expresión de KI67, la baja expresión de KI67 tienen un menor riesgo de metástasis (24%) frente a niveles altos de KI67 (49%) con un OR de 2,95 (p:0,001), a pesar de que también se ha asociado a mejor respuesta, el hecho de que se mantenga alto después de recibir un tratamiento con QTN condiciona un mal pronóstico. También se traduce en un efecto en SLED con un 80% a los 5 años en el grupo de KI67<20 frente a un 51% en los que tienen un KI67 >20 (p<0,001) . Estos datos concuerdan con los recientemente publicados por el grupo alemán GBG con una serie de más de 1000 pacientes[24].

La expresión de BCL2 se asocia en nuestros diferentes modelos de análisis con un menor riesgo de metástasis, ya sea su expresión global como con los diferentes puntos de corte. Esta asociación ya ha sido publicada en varios estudios, concretamente en el estudio de Callagy[25] se encuentra una asociación entre la expresión de BCL2 y mejor supervivencia. Se ha postulado la asociación de BCL2 con una mayor diferenciación y expresión de ER[17]. De hecho su expresión por PCR se incluye en el test de Oncotype en el apartado de expresión de receptores hormonales.
En nuestra serie hay una franca asociación entre expresión de BCL2 con ER (anova <0,0001), con una media de valor de expresión por *Histoscore* de BCL2 de 157 (142-172) en ER positivos frente a 92 (78 – 107) en receptores de estrógenos negativos, y también con la expresión de KI67 (anova p: <0,001). Siendo el que más se correlaciona con la expresión de receptores de estrógenos de todos los biomarcadores estudiados con un índice de correlación de 0,466.

En algunas series se ha constatado una expresión del 70% de BCL2, siendo muy parecido tanto en el grupo de receptores de estrógenos positivos como negativos[26]. En nuestra serie también hemos encontrado un 70% de casos con niveles altos de expresión de BCL2 (*Histoscore* >77) siendo en el 84% de las pacientes con receptores hormonales positivos y en el 58% de receptores negativos. además este grupo de pacientes con expresión de ER y de BCL2>77 presenta un excelente pronóstico ya que únicamente un 18% desarrollan metástasis, frente a un 52% en el grupo de baja expresión de BCL2 y receptores de estrógenos negativos.

En el análisis de supervivencia la expresión de BCL2 por encima de 77 también se asocia a mejor supervivencia (*Kaplan-Meier* p:0,01) pero mientras que en el grupo de receptores hormonales positivos se alcanza significación estadística (*Kaplan-Meier* p: 0,05), en el grupo de receptores negativos no se encuentra esta significación, lo que sugiere que la baja expresión de BCL2 sería un factor de mal pronóstico en el subgrupo de receptores hormonales positivos, por lo que sería un potencial marcador pronóstico en pacientes con receptores hormonales positivos.

Aunque este dato de buen pronóstico para supervivencia, en el grupo de receptores hormonales positivos con alta expresión de BCL2, no ha sido valorado en las diferentes series publicadas como tal, en la serie de Callagy[25] se encuentra un beneficio en supervivencia para este grupo con una HR de 0,40 que es significativamente mejor que en el resto de subgrupos. En nuestra serie también se da esta condición, las pacientes con ER+ y expresión de BCL2>77 tienen una HR de 0,40 (p: 0,004) frente al resto de subgrupos.

Algunos autores[27] han encontrado que la expresión de BCL-2 puede diferenciar un grupo de mejor pronostico en el perfil de pacientes Luminales B categorizados por la expresión de KI67 (*Kaplan-Meier* p:0,004), en nuestra serie no se llega alcanzar significación estadística dado el numero bajo de pacientes analizado con expresión de ambos biomarcadores, pero sí que se refleja un mejor pronostico en las pacientes con alta expresión de KI67 y de BCL2 (*Kaplan-Meier* p:0,09).

PTEN es un gen supresor de la vía PI3K de gran importancia en el proceso de señalización intracelular de las vías EGFR y otras vías que activan los procesos de proliferación y supervivencia de las células. La presencia de mutaciones de PTEN se ha encontrado en numerosos procesos neoplásicos, incluidos el cáncer de mama. En algunas series de cáncer de mama se ha encontrado alrededor de un 30% de falta de expresión de PTEN siendo este hecho asociado a peor pronóstico[28] .

En nuestra serie encontramos una pérdida de expresión de PTEN (PTEN=0) en un 30% en cuanto a la expresión nuclear y en un 10% en expresión citoplasmática aunque con un 30% si consideramos niveles bajos de expresión (*Histoscore*<50). También se ha visto que la baja expresión de PTEN tanto *citoplasmático* como *nuclear* se asocia con peor pronóstico. Aunque en la mayoría de las series se valora solo la expresión citoplasmática de PTEN, en nuestra serie se han valorado ambas, existiendo una gran concordancia entre la expresión de PTEN *citoplasmática* y la *nuclear* y también en cuanto a su valor pronostico siendo muy similar en ambas. En la serie de Janssen[29] se encuentra una asociación entre la baja expresión de PTEN con RE negativos, RP negativos, KI67 y P27, este efecto que también sucede en nuestra serie , aunque sin llegar a haber diferencias en supervivencia entre estos diferentes subgrupos.

Hemos visto un efecto significativo en supervivencia tanto para PTEN *citoplasmático* como *nuclear* (*Kaplan-Meier* p: 0,053) favorable para la alta expresión de PTEN, hecho que también se ha constatado en algunas series[30] considerándose la perdida de PTEN ya sea por baja expresión por IHQ como por aparición de mutaciones como un factor de mala supervivencia[31].

P65 forma parte de la proteína Nfkb que se ha asociado a proliferación, sobre todo su expresión en el núcleo, encontrándose una asociación entre P65 *nuclear* con factores de mal pronóstico como ER y RP negativos, alta proliferaron y tamaño tumoral[32]. En nuestra serie la expresión de P65 *nuclear* se asocia a peor supervivencia (KM log-rank p:0,027).

De hecho, en nuestra serie, hay una correlación inversa entre la expresión de P65 *citoplasmática* y *nuclear*, siendo la baja expresión de P65 *citoplasmática* y la alta expresión de P65 *nuclear* la que se comporta con peor supervivencia. (análisis de supervivencia según método *Kaplan-Meier* para P65 *citoplasmática* log rank p :0,02).

En la mayoría de las series se ha analizado la expresión nuclear de P65 como factor pronóstico considerándose la expresión de P65 en citoplasma como una forma inactiva que es incapaz de acceder al núcleo donde ejerce su función proliferativa. Este hecho explicaría los datos de la expresión de P65 *citoplasmática* que hemos encontrado.

También se ha encontrado una asociación entre niveles de expresión de P65 *nuclear* con tumores con resistencia hormonal[33]. En nuestra serie la expresión de P65 tiene un valor pronóstico solamente en el grupo de tumores con receptores de estrógenos negativos (análisis de supervivencia según método *Kaplan-Meier* para P65 *citoplasmática* con log rank p: 0,042 y para la expresión nuclear p:0,034), con un riesgo de metástasis de 11 veces superior).

La proteína Ciclina D1 tiene un papel muy importante en la regulación del ciclo celular a trabes de la activación de CDK4 induciendo una activación del ciclo celular. Se ha visto que desarrolla un papel muy importante mediante la acción de los estrógenos y se ha correlacionado con la expresión de receptores de estrógenos[18].

También se ha encontrando que la expresión de Ciclina D1 se asocia a peor pronóstico sobre todo en el grupo de pacientes con receptores de estrógenos positivos[19] considerándose la Ciclina D1 como la diana de los estrógenos.
En nuestra serie no hay asociación entre la expresión de receptores de estrógenos y niveles de Ciclina (anova p: 0,851), pero si hemos encontrado en el grupo de receptores de estrógenos positivos que la supervivencia es peor en lo que expresan niveles altos de Ciclina con valor de *Histoscore* por encima de 147 (HR 3,3 p:0,014). También se encuentra asociación de la expresión de Ciclina *nuclear* con menor supervivencia (log rank p: 0,032) a nivel global pero con mayor efecto en el grupo de receptores de estrógenos positivos (log rank p: 0,009).

En la mayoría de las series[34] se encuentra una expresión de Ciclina D1 del 50-70% .
Siendo su significado conflictivo, de tal manera que en algunas series su expresión se asocia con receptores hormonales y baja proliferación así como mejor supervivencia[35] ; en otras series se asocia a peor pronóstico, sobre todo en pacientes con receptores de estrógenos positivos[36] . En nuestra serie encontramos una alta expresión de Ciclina D1 (valor de *Histoscore* por encima de 102) en un 33% y siendo un factor de mal pronóstico para aparición de metástasis (RR 2, P-valor: 0,02)

Existen datos muy controvertidos en la expresión de Ciclina D1 *nuclear* y su asociación como factor pronóstico, la diversidad de las series y la diferente cuantificación puede que sea un factor a tener en cuenta. La expresión de la Ciclina por mRNA parece que tiene datos mas consistentes[34], teniendo en cuenta que la incidencia de expresión de mRNA de Ciclina (CCND1) es mucho menor (15-20%) podría explicar nuestros datos que se ha escogido un punto de corte de expresión mucho más alto.

53bp1 se considera como un gen supresor siendo interesante en los tumores deficientes de BRCA 1 donde se ha visto que la perdida de 53BP1 restaura la capacidad de reparación produciendo una mejor supervivencia a la célula tras ser tratada con los diferentes tratamiento antineoplásicos y por lo tanto le hace más resistente al tratamiento[37] .

En nuestra serie se encuentra significación de mal pronóstico en valores de expresión de 53BP1 >100 para toda la serie sobre todo en supervivencia (KM p:0,012 HR 2,3) aunque es el subgrupo de receptores negativos el que más se observa este efecto (KM p:0,005 HR:4). Sin embargo valores altos de 53BP1 se correlacionan con mayor expresión de receptores de estrógenos (ANOVA P:0,05) así como con niveles altos de BCL2 y GATA3 que son biomarcadores de diferenciación Luminal como algunos autores consideran[38] y por tanto de mejor pronostico.

Nuestro datos contrastan con los publicados en otras series donde se ha visto como las pacientes con baja expresión de 53bp1 tienen peor supervivencia[37]. Una posible explicación seria que en estas series publicadas las pacientes no han recibido ningún tratamiento y es posible que el efecto del tratamiento neoadyuvante previo puede cambiar el efecto biológico de 53 BP1 o hacer una selección clonal dejando un grupo de células que no han sido afectadas por el tratamiento con quimioterapia que son de muy mal pronóstico como sucede en los casos de triple negativo con mala respuesta al tratamiento con quimioterapia.

La expresión de GATA3 se ha asociado con la diferenciación a Luminal y con mejor pronostico[22] .En alguna serie se ha encontrado que dentro del subgrupo de receptores negativos la expresión de GATA3 le confiere un pronóstico favorable[38].

En nuestra serie no hay asociación de expresión de GATA3 con receptores de estrógenos positivos pero si con biomarcadores asociados a fenotipo triple negativo como EGFR y Ki67 (anova p<0,001). En cuanto a su valor pronostico, existe una asociación de mejor supervivencia con niveles altos de expresión de GATA 3 (valor de *Histoscore* por encima de 147), pero solo en el subgrupo de pacientes con RE negativos (HR:0,336).

Probablemente la expresión de GATA 3 en el subgrupo RE negativos le puede conferir signos de diferenciación luminal que le puede otorgar un mejor pronostico con respecto al resto de pacientes con receptores negativos.

HER4 forma parte de la familia de receptores de membrana HER2 pero su expresión no se asocia a la del HER2. Esta regulado por la unión con su factor de crecimiento propio Eregulina y se han estudiado mecanismos de bloqueo del mismo como diana terapeutica[20]. En nuestra serie hay una asociación significativa entre la expresión de HER4 y SLED tanto de forma global como según expresión de receptores de estrógenos tanto positivos como negativos (KM p:0,007 HR: 5,5)

No hay demasiados estudios para establecer el factor pronostico de la expresión de HER4 siendo muy conflictiva su determinación. Aunque en la mayoría de los estudios no se ha encontrado significación pronostica[39], en algunas series se ha determinado la fracción especifica de HER4 en citoplasma y en núcleo siendo significativa para supervivencia solo la fracción citoplasmática , de tal manera que valores altos de HER4 presentan mejor supervivencia[40].

Otros autores han encontrado significativa la expresión de HER4 nuclear, siendo la expresión de HER4 la que confiere peor supervivencia, mientras que la expresión citoplasmática no encuentra significación. En estos estudios se determinan ambas expresiones por diferentes anticuerpos lo que puede explicar las diferencias encontradas con nuestra serie[41].

Por tanto es difícil darle un significado a nuestros resultados con respecto a los estudios publicados dado que es muy diferente según el anticuerpo utilizado. En nuestra serie se ha utilizado el mismo anticuerpo tanto para la expresión en membrana como la nuclear y la de citoplasma, hecho que no se ha efectuado en ninguna otra seria. Los datos de supervivencia son bastantes consistentes por lo que tiene un valor biológico interesante que se deberá de seguir estudiando.

El complejo E-cadherina/Caterina es conocido como un potente inhibidor de la progresión a cáncer al mantener la adhesión célula-célula. además también se ha visto que la perdida de este complejo induce la transformación epitelio-mesénquima y con ello se adquiere la posibilidad de metastatizar[42]. Por otro lado la perdida de expresión de E-Cadherina se ha asociado al subtipo lobulillar que presenta unas características algo diferentes del ductal sobe todo en cuanto a un mejor pronostico y por tanto mejor supervivencia.

En nuestra serie hay una asociación directa entre la expresión de E-Cadherina de membrana y citoplasmática (índice de correlación de 0,594) siendo la baja expresión de E-cadherina citoplasmática la que se asocia una mejor supervivencia libre de progresión pero solo en el subgrupo de receptores negativos. Aunque esta baja expresión de E-Cadherina solo acontece en apenas un 25% del total de pacientes con receptores negativos.

En algunas series se ha constatado una mayor malignidad asociada a la expresión de E-Cadherina, sobre todo por mayor presencia de multifocalidad asociada a la perdida de expresión de E-cadherina, sin embargo, aunque no se comenta en el articulo, las pacientes con tumor unifocal con baja expresión de beta catenina presentan una mejor supervivencia[43].

Existe una clara asociación entre expresión de pAKT (tanto citoplasmática como nuclear) con la expresión de receptores de estrógenos. De tal manera que la media de expresión de pAKT para receptores positivos es el doble en la expresión de citoplasma y mas de 3 veces para la expresión nuclear

Aunque la expresión de pAKT >145 se asocia a peor supervivencia de forma muy significativa , el hecho de que solo se encuentren 4 pacientes con esta expresión le resta importancia a este biomarcador.

La baja expresión de survivin nuclear se asocia de forma significativa con peor supervivencia en el grupo de pacientes con ER positivos (RR:0,2 P-valor : 0,024). Diversos estudios de expresión de survivin ya sea por RT-PCR o por IHQ no han mostrado relevancia pronostica o se han asociado con mejor o peor pronostico[44] pudiéndose ser esta discordancia debido los diferentes métodos de detección de expresión de survivin así como de su localización a nivel nuclear o en citoplasma.

En estudios más recientes se ha asociado la expresión de survivin a mal pronostico en pacientes con expresión de ER, contrariamente a lo que sale en nuestros datos, aunque son datos de muestras de pacientes que aun no han recibido ningún tipo de tratamiento[45]

15.3 análisis de los resultados agrupados por marcadores de mal pronostico

La necesidad de encontrar una firma de expresión de biomarcadores que nos pueda predecir el riesgo de recidiva siempre se ha considerado como una herramienta muy útil de cara a predecir el riesgo de forma mas exacta y así contemplar la necesidad de un tratamiento. En la actualidad existen diversos test genéticos que se utilizan en la practica habitual y que se han confirmado su valor en estudios retrospectivos de gran validación, como son el oncotype, mamaprint, etc. Sin embargo, dado el coste de este tipo de test y su complejidad, han condicionado la búsqueda de otros métodos que nos ayude a predecir este riesgo.

Algunos autores han desarrollado diferentes test que han sido validados en series retrospectivas. En una serie reciente de Charpin[11] se ha encontrado un modelo predictivo a través de IHQ con una sensibilidad y especificidad de un 90% aunque eran pacientes que solo habían recibido tratamiento quirúrgico de forma inicial. Otros autores[46] han buscado modelos predictivos de respuesta a quimioterapia sobre todo a regimenes con antraciclinas con marcadores por IHQ sin encontrar un modelo que no sea diferente a los factores clínicos y biológicos conocidos como serian la afectación ganglionar y el status de receptores hormonales y Ki67.

Por lo que nos falta encontrar un modelo predictivo de biomarcadores en el tumor residual tras un tratamiento inicial con quimioterapia que nos ayude a una valoración pronostica tras finalizar dicho tratamiento.

En nuestra serie con los biomarcadores asociados a mal pronóstico hemos podido construir un modelo de regresión logística multivariante con todas las variables significativas en el análisis multivariante y aplicando un algoritmo de tipo stepwise se ha podido construir un modelo de condiciones con los siguientes biomarcadores:

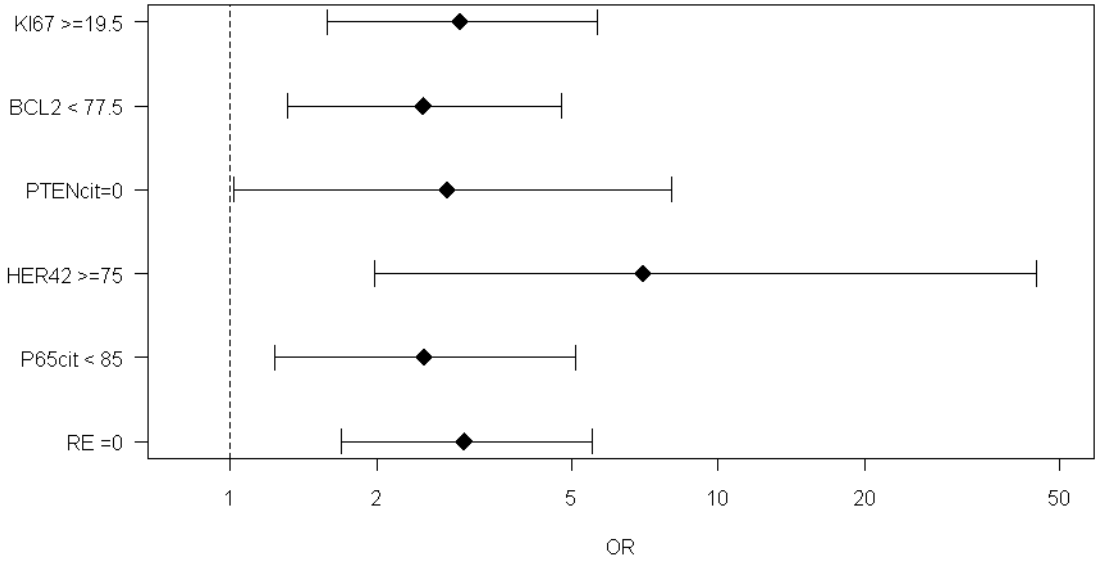
- RE =0
- P65 CIT < 85
- HER4 CIT >=75
- PTEN CIT=0
- BCL2 < 77.5
- KI67 >=19.5

Tabla 15.1. Detalle de los OR estimados individualmente para cada una de las condiciones evaluadas en la firma:

Biomarcadores	p-valor	Odds Ratio	Odds Ratio IC 95%	
RE=0	0.00026	3.01	1.68	5.52
p65 CIT<85	0.011	2.49	1.23	5.11
HER4CIT>75	0.009	7.02	1.97	44.82
PTEN CIT=0	0.048	2.78	1.01	8.02
BCL2<77	0.005	2.48	1.31	4.76
KI67 >20	0.0007	2.95	1.58	5.63

También se ha efectuado una representación gráfica para poder comparar la magnitud de cada uno de los biomarcadores seleccionados para la firma genética con sus intervalos de confianza que se han representado en una grafica logarítmica dados los resultados de cada uno de ellos.

Figura 15.4. Representación de OR de cada uno de los biomarcadores encontrados en la firma genética



Se han correlacionado la presencia de estas condiciones con el desarrollo de metástasis, de tal manera que se ha encontrado un incremento del riesgo de aparición de metástasis en función de la aparición de las condiciones anteriores:

Tabla 15.2. Proporción de aparición de metástasis en función de las condiciones

num. condic.	Met : No (num/%)	Met: Si (num/%)
0 condiciones	50 (88%)	7 (12%)
1 condiciones	41 (84%)	8 (16%)
2 condiciones	41 (67%)	20 (33%)
3 condiciones	34 (62%)	21 (38%)
4 condiciones	8 (32%)	17 (68%)
5 condiciones	0 (0%)	6 (100%)
6 condiciones	0 (0%)	1 (100%)

De tal manera que a partir de cumplir 4 condiciones la posibilidad de aparición de metástasis se incrementa de forma muy significativa (68% vs un 12% si no se cumple ninguna condición).

Figura 15.5: SLED a 5 años en función de la presencia de las condiciones de la firma

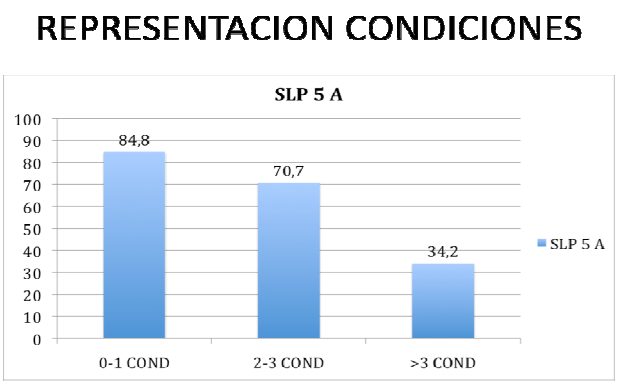


Figura 15.6: Representación de las condiciones individuales y comparada con las agrupadas para poder diferenciar su magnitud.

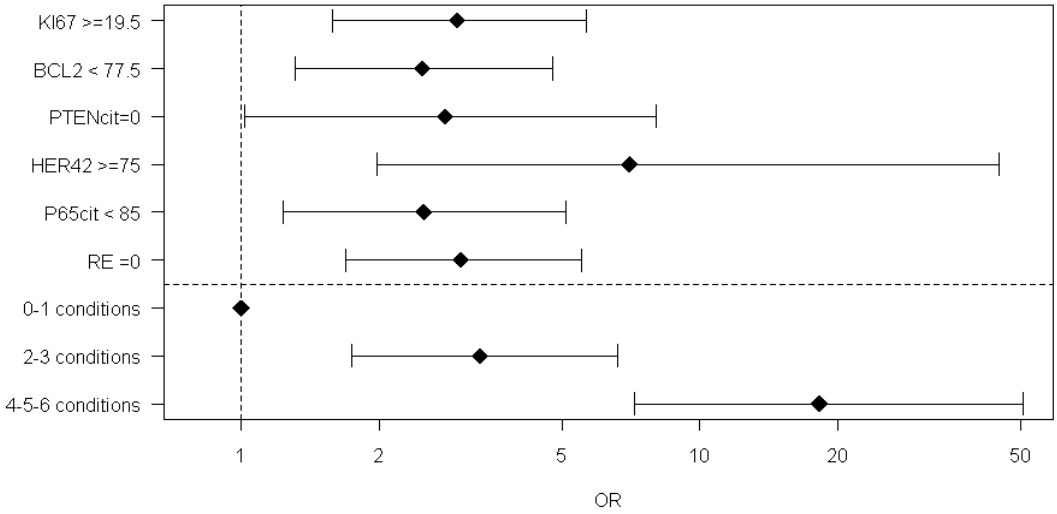
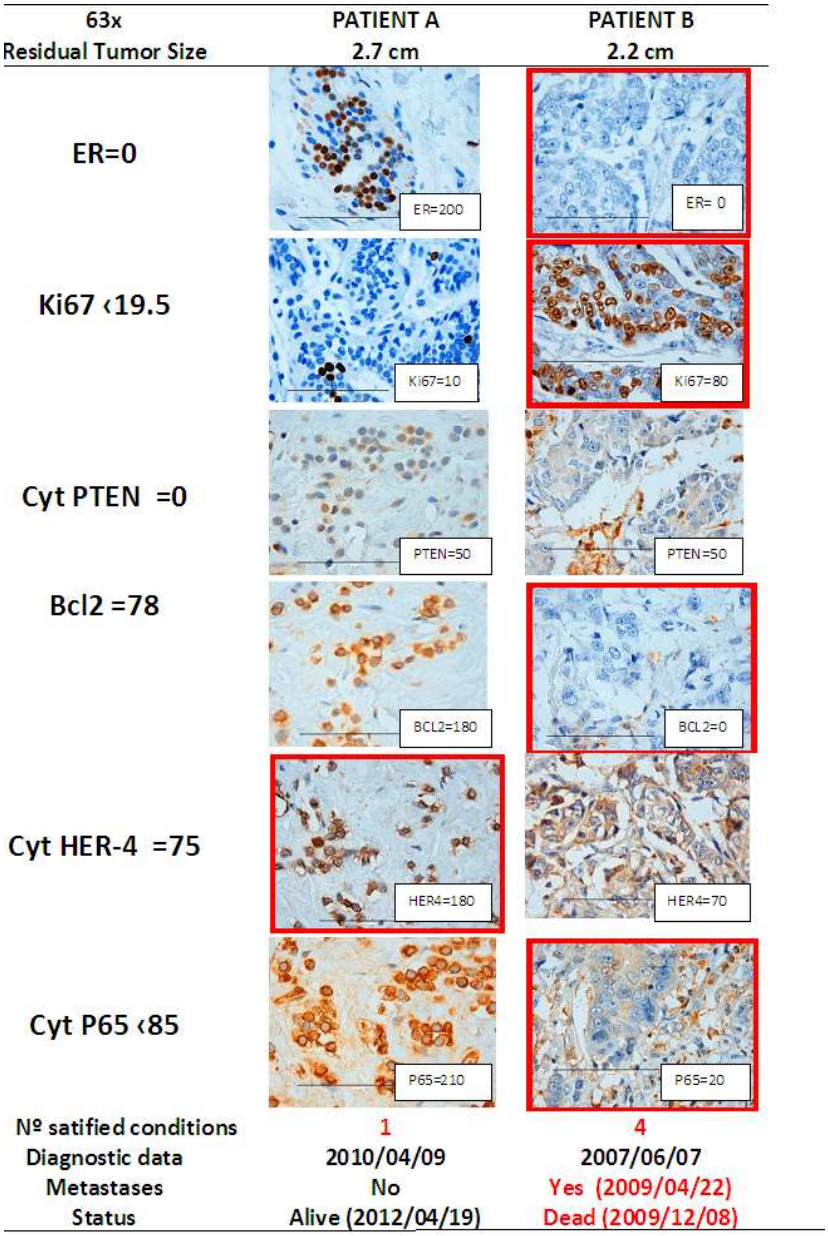


Figura 15.7: Ejemplo del valor pronostico de la aparición de condiciones representado en dos casos según su **Perfil de Expresión por IHQ :**

Paciente A solo cumple **una condición** de la firma de mal pronostico (HER4 CIC>75) , por lo que la probabilidad de DFS a 5 años es del 85%. La paciente esta viva sin enfermedad a distancia en el último seguimiento analizado.

Paciente B cumple **4 condiciones** de nuestra firma (RE=0, Ki67>20, BCL2<78 y p65 CIT <85), La paciente presenta una probabilidad de DFS a 5 años del 34%. La paciente fallece a los 2 años del diagnostico con metástasis a distancia



Angulo y col[47] también ha encontrado un modelo de proteómica en el tumor residual tras tratamiento con QTN siendo diferente en el grupo de pacientes con expresión de receptores hormonales frente al global general, por lo que también resulta interesante investigar una firma genética que tenga un significado pronostico según la expresión de receptores hormonales.

Las condiciones asociadas a mal pronostico según el modelo univariable encontrado para el subgrupo con receptores de estrógenos negativos son:

GATA 3 <187
HER4>75
P65>162
53 BP1>100

Agrupando estas diferentes condiciones también se encuentra diferencias estadísticamente significativas en función del cumplimiento de las mismas:

Tabla 15.3: Proporción de aparición de metástasis para ER negativo según las condiciones

Num condic.	Met : No (num/%)	Met: Si (num/%)
0 condiciones	3 (100 %)	0 (0 %)
1 condiciones	7 (77 %)	2 (22 %)
2 condiciones	3 (21 %)	11 (79 %)
3 condiciones	0 (0%)	3 (100%)
Chi-cuadrado : 13,180 Valor P : 0,004		

Dado que la variables 53BP1 se ha analizado en menos pacientes que en el resto de la serie, al incluir este biomarcador el numero de pacientes queda limitado solo a 29 pacientes por lo que su significación quedaría muy comprometida.

Las condiciones asociadas a mal pronostico según el modelo univariable encontrado para el subgrupo con receptores de estrógenos positivos son:

CICLINA NUCLEAR > 147
KI67>20
SURVIVIN NUCLEAR< 92

Y agrupando las 3 condiciones se encuentra un mal pronostico en función si se van cumpliendo alguna de ellas:

Tabla 15.4. Proporción de aparición de metástasis para ER positivo según las condiciones

Num condic.	Met : No (num/%)	Met: Si (num/%)
0 condiciones	22 (95 %)	5 (0 %)
1 condiciones	25 (83 %)	5 (17 %)
2 condiciones	10 (21 %)	41 (79 %)
3 condiciones	0 (0%)	2 (100%)
Chi cuadrado: 15,917 Valor P: 0,001		

Las condiciones asociadas a mal pronostico son muy diferentes según la expresión de receptores de estrógenos, lo que se explica por el diferente comportamiento biológico del cáncer de mama en función de la expresión de estos receptores.

16. CONCLUSIONES

Como conclusiones y en respuesta a los objetivos principales y secundarios que nos planteamos en este estudio, podemos concluir lo siguiente:

1. Hemos encontrado un perfil proteico sobre el tumor residual tras QTN, en base a 22 proteínas especificas analizadas sobre TMA, que es capaz de discernir subpoblaciónes de pacientes de diferente pronóstico. Siendo la expresión de los siguientes biomarcadores los que identifican dicho perfil: RE =0, P65 CIT < 85, HER4 CIT <=75, PTEN CIT=0, BCL2 < 77.5 y KI67 >=19.5.

2. Hemos identificado un grupo de buen pronostico que presente un riesgo de recaída a distancia (metástasis) <15% a cinco años, y que serian aquellas pacientes que no cumplen ninguna de las condiciones de mal pronostico que se han identificado.

3. También este perfil de biomarcadores identifica unos grupos de pronostico bien diferenciados con una supervivencia libre de progresión a 5 años que va desde un 84% si no se cumple ninguna condición a un 34% si se cumplen mas de 3 condiciones.

4. Los biomarcadores que condicionan un pronostico son diferentes en función de la expresión de ER. De tal manera que para los que expresan ER serian : CICLINA NUCLEAR > 147, KI67>20 y SURVIVIN NUCLEAR< 92; mientras que para ER negativos serian: GATA 3 <187, HER4>75, P65>162 y 53 BP1>100. Lo que explica un comportamiento biológico diferente en función de la expresión de receptores de estrógenos.

17. BIBLIOGRAFÍA

1. Kuerer HM, Newman LA, Smith TL, et al: Clinical course of breast cáncer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. J Clin Oncol 17:460-469, 1999.

2. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, Hess KR, Stec J, Ayers M, Wagner P, Morandi P, Fan C, Rabiul I, Ross JS, Hortobagyi GN, Pusztai L. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. Clin Cancer Res. 2005 Aug 15;11(16):5678-85

3. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG)Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. Lancet. 2005 May 14-20;365(9472):1687-717.

4. G. von Minckwitz, J. U. Blohmer, S. Costa et al., “Neoadjuvant chemotherapy adapted by interim response improves overall survival of primary breast cancer patients—results of the gepartrio trial,”. Cancer Research, 2011, vol. 71, no. 24, abstract S3-2.

5. Gampenrieder SP, Rinnerthaler G, Greil R. Neoadjuvant Chemotherapy and Targeted Therapy in Breast Cancer: Past, Present, and Future. J Oncol. 2013;2013:732047. Epub 2013 Aug 20. Review.

6. Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C, Rajan R, Kuerer H, Valero V, Assad L, Poniecka A, Hennessy B, Green M, Buzdar AU, Singletary SE, Hortobagyi GN, Pusztai L. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. J Clin Oncol. 2007 Oct 1;25(28):4414-22. Epub 2007 Sep 4.

7. Mittendorf EA, Jeruss JS, Tucker SL, Kolli A, Newman LA, Gonzalez-Angulo AM, Buchholz TA, Sahin AA, Cormier JN, Buzdar AU, Hortobagyi GN, Hunt KK.ol. Validation of a novel staging system for disease-specific survival in patients with breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. J Clin Onc 2011 May 20;29(15):1956-62.

8. Dowsett M, Smith IE, Ebbs SR, et al. Prognostic value of Ki67 expression after short-term presurgical endocrine therapy for primary breast cancer. J Natl Cancer Inst 2007;99:167-70.

9. Paik S, Shak S, Tang G, et al. A multi-gene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. N Engl J Med. 2004;351:2817–2826.

10. Jacquemier J, Ginestier C, Rougemont J, Bardou VJ, Charafe-Jauffret E, Geneix J, Adélaïde J, Koki A, Houvenaeghel G, Hassoun J, Maraninchi D, Viens P, Birnbaum D, Bertucci F. Protein expression profiling identifies subclasses of breast cancer and predicts prognosis. Cancer Res. 2005 Feb 1;65(3):767-79.

11. Charpin C, Tavassoli F, Secq V, Giusiano S, Villeret J, Garcia S, Birnbaum D, Bonnier P, Lavaut MN, Boubli L, Carcopino X, Iovanna J. Validation of an immunohistochemical signature predictive of 8-year outcome for patients with breast carcinoma. Int J Cancer. 2012 Aug 1;131(3).

12 Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expresión patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:10869-74.

13. Robet A Weinber. The Biology of Cancer. Second Edition. May 2013 ISBN-13 978-0815342205

14. Prat A, Cheang MC, Martín M, Parker JS, Carrasco E, Caballero R, Tyldesley S, Gelmon K, Bernard PS, Nielsen TO, Perou CM. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. J Clin Oncol. 2013 Jan 10;31(2)

15. Bouwman P, Aly A, Escandell JM, Pieterse M, Bartkova J, van der Gulden H, Hiddingh S, Thanasoula M, Kulkarni A, Yang Q, Haffty BG, Tommiska J, Blomqvist C, Drapkin R, Adams DJ, Nevanlinna H, Bartek J, Tarsounas M, Ganesan S, Jonkers J. 53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers . Nat Struct Mol Biol. 2010 Jun;17(6):688-95.

16 . Callagy GM, Webber MJ, Pharoah PD, Caldas C. Meta-analysis confirms BCL2 is an independent prognostic marker in breast cancer. BMC Cancer. 2008 May 29;8:153.

17. Dawson SJ, Makretsov N, Blows FM, Driver KE, Provenzano E, Le Quesne J, Baglietto L, Severi G, Giles GG, McLean CA, Callagy G, Green AR, Ellis I, Gelmon K, Turashvili G, Leung S, Aparicio S, Huntsman D, Caldas C, Pharoah P. BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. Br J Cancer. 2010 Aug 24;103(5):668-75.

18. Boström P, Söderström M, Palokangas T, Vahlberg T, Collan Y, Carpen O, Hirsimäki P : Analysis of cyclins A, B1, D1 and E in breast cancer in relation to tumour grade and other prognostic factors. BMC Res Notes 2009, 2:140-147.

19. Kenny FS, Hui R, Musgrove EA, et al. Overexpression of cyclin D1 messenger RNA predicts for poor prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. Clin Cancer Res 1999; 5: 2069-76.

20. 1. Haas S, Gevensleben H, Rabstein S, Harth V, Pesch B, Brüning T, Justenhoven C, Brauch H, Hamann U, Ko YD, Baisch C, Fischer HP, Büttner R. Expression of heregulin, phosphorylated HER-2, HER-3 and HER-4 in HER-2 negative breast cancers. Oncol Rep. 2009 Feb;21(2):299-304.

21. Zhu Y, Singh B, Hewitt S, Liu A, Gomez B, Wang A, Clarke R. Int J Oncol. 2006 Expression patterns among interferon regulatory factor-1, human X-box binding protein-1, nuclear factor kappa B, nucleophosmin, estrogen receptor-alpha and progesterone receptor proteins in breast cancer tissue microarrays.
Jan;28(1):67-76.

22. Pei XH, Bai F, Smith MD, Usary J, Fan C, Pai SY, Ho IC, Perou CM, Xiong Y.
CDK inhibitor p18(INK4c) is a downstream target of GATA3 and restrains mammary luminal progenitor cell proliferation and tumorigenesis. Cancer Cell. 2009 ;15(5):389-401.

23. Guarneri V, Broglio K, Kau SW et al.. Prognostic value of pathologic complete response after primary chemotherapy in relation to hormone receptor status and other factors. J Clin Oncol 2006; 24: 1037–1044).

24. Von Minckwitz G, Schmitt WD, Loibl LS, et al. Ki67 measured after neaodyuvant chemotherapy for primary breast cancer. Clin Cancer Research 2013;15(19) 4521-4531

25. Callagy GM, Pharoah PD, Pinder SE, Hsu FD, Nielsen TO, Ragaz J, Ellis IO, Huntsman D, Caldas C. Bcl-2 is a prognostic marker in breast cancer independently of the Nottingham Prognostic Index. Clin Cancer Res. 2006;12(8):2468-75.

26. Abd El-Hafez A, Shawky Mohamed Ael-A, Elesawy BH. Different Prognostic Factors Correlate with Bcl-2 Expression among Triple Negative and Non-Triple Negative Breast Cancers. Asian Pac J Cancer Prev. 2013;14(2):1037-41.

27 Kim HS, Park I, Cho HJ, Gwak G, Yang K, Bae BN, Kim KW, Han S, Kim HJ, Kim YD.J Analysis of the potent prognostic factors in luminal-type breast cancer. Breast Cancer. 2012 Dec;15(4):401-6.

28. Tsutsui S, Inoue H, Yasuda K, Suzuki K, Higashi H, Era S, Mori M. Reduced expression of PTEN protein and its prognostic implications in invasive ductal carcinoma of the breast. Oncology. 2005;68(4-6):398-404.

29 Janssen EA, Søiland H, Skaland I, Gudlaugson E, Kjellevold KH, Nysted A, Søreide JA, Baak JP. Comparing the prognostic value of PTEN and Akt expression with the Mitotic Activity Index in adjuvant chemotherapy-treated node-negative breast cancer patients aged <55 years.Cell Oncol. 2007;29(1):25-35.

30. Jones N, Bonnet F, Sfar S, Lafitte M, Lafon D, Sierankowski G, Brouste V, Banneau G, Tunon de Lara C, Debled M, MacGrogan G, Longy M, Sevenet N. Comprehensive analysis of PTEN status in breast carcinomas. Int J Cancer. 2013 Jul 15;133(2):323-34.

31 Pérez-Tenorio G, Alkhori L, Olsson B, Waltersson MA, Nordenskjöld B, Rutqvist LE, Skoog L, Stål O. PIK3CA mutations and PTEN loss correlate with similar prognostic factors and are not mutually exclusive in breast cancer. Clin Cancer Res. 2007 Jun 15;13(12):3577-84

32. Jana D, Das S, Sarkar DK, Mandal S, Maji A, Mukhopadhyay M. Role of nuclear factor-κB in female breast cancer: a study in Indian patients. Asian Pac J Cancer Prev. 2012;13(11):5511-5.

33.. Zhou Y, Yau C, Gray JW, Chew K, Dairkee SH, Moore DH, Eppenberger U, Eppenberger-Castori S, Benz CC. Enhanced NF kappa B and AP-1 transcriptional activity associated with antiestrogen resistant breast cancer BMC Cancer. 2007 Apr 3;7:59.

34. Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J, Stone A, Sutherland RL. Cyclin D as a therapeutic target in cancer.Nat Rev Cancer. 2011 Jul 7;11(8):558-72.

35. Peurala E, Koivunen P, Haapasaari KM, Bloigu R, Jukkola-Vuorinen A. The prognostic significance and value of cyclin D1, CDK4 and p16 in human breast cancer. Breast Cancer Res. 2013 Jan 21;15(1):1-10

36. Rudas M, Lehnert M, Huynh A, Jakesz R, Singer C, Lax S, Schippinger W, Dietze O, Greil R, Stiglbauer W, Kwasny W, Grill R, Stierer M, Gnant MF, Filipits M; Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. Cyclin D1 expression in breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen-based therapy. Clin Cancer Res. 2008 Mar 15;14(6):1767-74.

37. Bouwman P, Aly A, Escandell JM, Pieterse M, Bartkova J, van der Gulden H, Hiddingh S, Thanasoula M, Kulkarni A, Yang Q, Haffty BG, Tommiska J, Blomqvist C, Drapkin R, Adams DJ, Nevanlinna H, Bartek J, Tarsounas M, Ganesan S, Jonkers J. 53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers . Nat Struct Mol Biol. 2010 Jun;17(6):688-95.

38. Yu KD, Zhu R, Zhan M, Rodriguez AA, Yang W, Wong S, Makris A, Lehmann BD, Chen X, Mayer I, Pietenpol JA, Shao ZM, Symmans WF, Chang JC. Identification of prognosis-relevant subgroups in patients with chemoresistant triple-negative breast cancer. Clin Cancer Res. 2013 May 15;19(10):2723-33. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2986 .

39.. Chiu CG, Masoudi H, Leung S, Voduc DK, Gilks B, Huntsman DG, Wiseman SM. HER-3 overexpression is prognostic of reduced breast cancer survival: a study of 4046 patients. Ann Surg. 2010 Jun;251(6):1107-16.

40. Thor AD, Edgerton SM, Jones FE Am J Subcellular localization of the HER4 intracellular domain, 4ICD, identifies distinct prognostic outcomes for breast cancer patients.Pathol. 2009 Nov;175(5):1802-9.

41. Tovey SM, Dunne B, Witton CJ, Cooke TG, Bartlett JM. HER4 in breast cancer: comparison of antibodies against intra- and extra-cellular domains of HER4.Breast Cancer Res. 2006;8(2):R19.

42. Baranwal S, Alahari SK. Molecular mechanisms controlling E-cadherin expression in breast cancer.Biochem Biophys Res Commun. 2009 Jun 19;384(1):6-11.

43. Weissenbacher T, Hirte E, Kuhn C, Janni W, Mayr D, Karsten U, Rack B, Friese K, Jeschke U, Heublein S, Dian D, Ditsch N. Multicentric and multifocal versus unifocal breast cancer: differences in the expression of E-cadherin suggest differences in tumor biology. BMC Cancer. 2013 Jul 26;13:361.

44. Hinnis AR, Luckett JC, Walker RA. Survivin is an independent predictor of short-term survival in poor prognostic breast cancer patients. Br J Cancer 2007, 96(4):639-645.

45. Rexhepaj E, Jirstrom K, O'Connor DP, O'Brien SL, Landberg G, Duffy MJ, Brennan DJ, Gallagher WM. Validation of cytoplasmic-to-nuclear ratio of survivin as an indicator of improved prognosis in breast cancer.. BMC Cancer. 2010 Nov 23;10:639.

46. Wachter DL, Fasching PA, Haeberle L, Schulz-Wendtland R, Dimmler A, Koscheck T, Renner SP, Lux MP, Beckmann MW, Hartmann A, Rauh C, Schrauder MG. Prognostic molecular markers and neoadjuvant therapy response in anthracycline-treated breast cancer patients. Arch Gynecol Obstet. 2013 Feb;287(2):337-44.

47. Gonzalez-Angulo AM, Liu S, Chen H, Chavez-Macgregor M, Sahin A, Hortobagyi GN, Mills GB, Do KA, Meric-Bernstam F Functional proteomics characterization of residual breast cancer after neoadjuvant systemic chemotherapy. Ann Oncol. 2013 Apr;24(4):909-16.