

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Medicina i Odontologia

Departament de Medicina



TESIS DOCTORAL:

**EVALUACIÓN DEL PERFIL GENÓMICO DE LA PLATAFORMA  
DE INVESTIGACION BASADA EN PAM50 Y miRNAs EN EL  
CÁNCER DE MAMA EN MUJERES JÓVENES ( $\leq 35$  años):  
CORRELACIÓN CON PARÁMETROS CLÍNICOS**

Presentada por:

MARÍA TERESA MARTÍNEZ MARTÍNEZ

Directores de tesis:

Dra. ANA LLUCH HERNÁNDEZ

Dra. GLORIA RIBAS DESPUIG

SERVICIO DE HEMATOLOGÍA Y ONCOLOGÍA  
FUNDACIÓN DEL HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO/INCLIVA



Fundación Investigación Clínico de Valencia  
Instituto de Investigación Sanitaria – INCLIVA

Valencia 2015





**Facultad de Medicina y Odontología**  
**Departamento de Medicina**

Dra. **Ana Lluch Hernández**, Catedrática del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València y Jefa del Servicio de Oncología Médica y Hematología del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Dra. **Gloria Ribas Despuig**, investigadora del Grupo de Genómica Funcional del Cáncer de la Unidad de Oncología Médica y Hematología del Instituto de Investigación Sanitaria – INCLIVA

CERTIFICAN:

Que Dña. María Teresa Martínez Martínez, Licenciada en Medicina y Cirugía por la Universitat de València, ha realizado bajo su dirección la presente tesis doctoral titulada:

**EVALUACIÓN DEL PERFIL GENÓMICO DE LA  
PLATAFORMA DE INVESTIGACION BASADA EN PAM50  
Y miRNAs EN EL CÁNCER DE MAMA EN MUJERES  
JÓVENES ( $\leq 35$  años): CORRELACIÓN CON  
PARÁMETROS CLÍNICOS**

para la optar al grado de Doctora por la Universidad de Valencia.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman la presente certificación

Fdo. Dra. Ana Lluch Hernández      Fdo. Dra. Gloria Ribas Despuig

Valencia 2015



Esta tesis ha sido realizada en el Grupo de Genómica Funcional del Cáncer del Instituto de Investigaciones Sanitarias – INCLIVA, en colaboración con el Hospital Clínico Universitario de Valencia, bajo la supervisión de la Dra. Ana Lluch Hernández y la Dra. Gloria Ribas Despuig.

Las siguientes ayudas han permitido la realización de la presente Tesis Doctoral:

- Contrato de formación en Investigación "RIO HORTEGA". CM12/00264 (Instituto de Salud Carlos III),
- Proyecto del Ministerio Instituto Carlos III, PI13/00606 y Fondos FEDER.
- Proyecto Intramural a investigadores emergentes. INCLIVA
- Donación del Proyecto Flor de Vida de la Fundación Le Cadó.



**A mis padres y a Jacinto**





## **AGRADECIMIENTOS**

Esta tesis no hubiera sido posible sin la ayuda de un gran número de personas, por lo que espero haber sabido plasmar sobre estas líneas mi inmensa gratitud a todas ellas.

En primer lugar me gustaría expresar mi agradecimiento de manera muy especial a la Doctora Ana Lluch Hernández, principal motor de esta y tantas otras líneas de investigación en las que he tenido el privilegio de trabajar, y a la Doctora Gloria Ribas Despuig, por su labor en la dirección de esta tesis. Su apoyo, confianza y orientación han sido fundamentales en el desarrollo de la misma. Gracias por compartir conmigo su dilatada experiencia, por su disponibilidad, por permitirme asaltarlas con dudas en los pasillos dedicándome su tiempo cuando muchas veces no lo tenían. Sus consejos e ideas han sido fundamentales para el desarrollo de este trabajo y serán además una fuente de conocimiento en mí día a día.

Quiero expresar también mi agradecimiento al Dr. Andrés Cervantes. Por la confianza que junto a la Dra. Ana Lluch en mí han depositado. Por transmitirme que siempre se puede llegar un paso más lejos y que la nuestra es una profesión en la que siempre hay margen de mejora.

De igual modo me gustaría dar las gracias a mi tutora de MFyC Rosa González Candelas. Gracias por ayudarme a dar con firmeza mis primeros pasos en nuestra profesión, por estar siempre disponible y sobre todo gracias por tu amistad.

Gracias a todos mis compañeros del servicio de Oncología y Hematología del Hospital Clínico que han dedicado parte de su tiempo a mi formación, especialmente a Isabel y Begoña, por transmitirme sus conocimientos, ayudarme a nivel asistencial e introducirme en el mundo de la investigación.

Un agradecimiento muy especial a mis chicas del laboratorio: Maider, María, Marta, Sara y las que se han ido incorporando con el paso del tiempo, Anabel, Pepa y Rosa. Gracias de todo corazón por vuestra acogida, por haberme hecho sentir como si estuviese en mi casa y por estar siempre dispuestas a ayudarme. Gracias por vuestra alegría, por vuestra positividad y por todos los maravillosos momentos que hemos compartido.

Igualmente quiero dar las gracias a Elisa, Alejo y Cristina del Departamento de Anatomía Patológica por acogerme y enseñarme tantas técnicas, y a Octavio, por tu cercanía y buena disposición para conseguir gran parte del material utilizado en esta tesis y por tu labor docente.

Gracias a Francisco Santonja por tus consejos en el análisis estadístico.

A mis grandes amigas que siempre han estado ahí para cualquier cosa, dándome apoyo moral: Eva, M.Dolores, Rocío M., Mónica, María, Berta, Rocío R, Pilar y Noelia.

También quiero dar las gracias a todos los que han sido mis pacientes del Servicio de Oncología del Hospital Universitario de Valencia y porque no, también de manera anticipada a los que lo serán en el futuro. Son una lección de vida, una fuente inagotable de inspiración, sabiduría y de energía. Gracias por ayudarme a recordar cada día por qué decidí dedicarme a esta profesión y por ayudarme a distinguir lo que es verdaderamente importante en esta vida.

A mi hermano, por todos los buenos momentos compartidos de niños y por todo lo que me has enseñado y porque aunque estemos lejos eres un gran apoyo para mi.

A mis padres, gracias por ayudarme y apoyarme en todas mis decisiones, por el inmenso cariño que me dais, por confiar en mí, por vuestros sabios consejos, por animarme en los momentos

difíciles y por haberme enseñado el valor del esfuerzo. Gracias por todo.

Finalmente a Jacinto, gracias por tu comprensión, por tu ayuda y ternura y por todo lo que hemos vivido juntos y por lo que nos queda por vivir, que será maravilloso a tu lado.

A todos ellos, y a los que se me olvidan, Gracias ;



# **Resumen/Summary**

---



## RESUMEN

El cáncer de mama de mujeres jóvenes ( $\leq 35$  años) se ha evidenciado más agresivo que el de mujeres mayores, y con peor pronóstico a corto/largo plazo. Sin embargo, si el cáncer de mama en jóvenes es una entidad biológica distinta o simplemente un reflejo de un mayor porcentaje de casos con fenotipos agresivos es actualmente un motivo de controversia. El propósito de este estudio fue determinar si esta mayor agresividad se debe a la activación de vías genéticas diferentes en los tumores de mujeres jóvenes. Además, se analizaron las características clínicas y patológicas diferenciales en el cáncer de mama de jóvenes y mayores. Y finalmente se estudió si uno de los genes diferencialmente expresados en el tejido tumoral de mujeres jóvenes (erbB4) se asociaba con mayor agresividad.

Se revisaron las características clínicas y patológicas de 258 pacientes  $\leq 35$  años diagnosticadas de cáncer de mama en el Servicio de Oncología y Hematología del Hospital Clínico de Valencia y se correlacionaron con 101 pacientes mayores de 45 años. Para el estudio genético se utilizaron las muestras de tejido parafinado procedentes de la cirugía mamaria o de la biopsia diagnóstica de pacientes jóvenes y mayores que no hubieran recibido previamente tratamiento para su cáncer de mama. Se extrajo el RNA para los estudios moleculares (expresión microRNAs y plataforma de investigación basada en PAM50, pibPAM50).

Los resultados obtenidos mediante el estudio de miRNAs revelaron dos grupos de muestras claramente diferenciados. Se seleccionaron 20 miRNAs de los sub-nodos más llamativos y se comprobó que estaban relacionados con vías de proliferación celular, adhesión, etc. Los resultados obtenidos mediante el estudio de la pibPAM50 nos revelan que existen 29 genes que se encuentran expresados de forma diferencial en mujeres jóvenes y mayores ( $p < 0.005$ ) y que

los tumores de mujeres jóvenes sobreexpresan subtipos intrínsecos más agresivos que los de las mujeres mayores. El paso siguiente fue el estudio del gen *erbB4*, uno de los genes que se observaba, tanto por miRNAs como por PAM50, diferentemente expresado en tumores de cáncer de mama de mujeres jóvenes y mayores, y observamos que su co-expresión con el gen *erbB2* se asocia a un peor pronóstico en mujeres jóvenes.

Además, el estudio de las características clínicas y patológicas de los tumores nos han demostrado diferencias en términos de factores de riesgo entre mujeres jóvenes y mayores, con una disminución de la edad de la menarquía, una disminución del número de gestaciones y en la edad del primer embarazo en los últimos 15 años en las mujeres jóvenes con cáncer de mama. También hemos visto que los tumores de mujeres jóvenes son de mayor tamaño, con mayor grado histológico y mayor porcentaje de afectación axilar, así como mayor sobreexpresión de HER2. Y que existe una relación significativa entre afectación axilar y riesgo de recaída en las mujeres jóvenes de nuestra serie.

Todos estos datos nos sugieren que el cáncer de mama en mujeres jóvenes ( $\leq 35$  años) es una entidad biológica distinta del cáncer de mama de mujeres mayores.



## SUMMARY

Breast cancer in young women ( $\leq 35$  years) has shown more aggressive than older women and with worse prognosis in the short / long term. However, if breast cancer in young people is a distinct biological entity or simply a reflection of a higher percentage of cases with aggressive phenotypes it is now a subject of controversy. The purpose of this study was to determine whether this increased aggressiveness is caused by the activation of different genetic pathways in the tumors of young women. In addition, the clinical and pathological differential breast cancer in young and old women was analyzed. Finally, we studied whether one of the genes differentially expressed in tumor tissue of younger women (erbB4) was associated with increased aggression.

The clinical and pathological features of 258 patient's  $\leq 35$  years diagnosed with breast cancer at the Unit of Oncology and Hematology of the Hospital Clinico of Valencia and correlated with 101 patients older than 45 years were reviewed. For the genetic study were used the paraffin tissue samples from breast surgery or diagnostic biopsy of younger and older patients who had not previously received treatment for breast cancer. RNA was extracted for molecular studies (microRNAs expression and research platform based on PAM50, pibPAM50).

The results obtained by studying miRNAs revealed two distinct groups of samples. 20 miRNAs of the most striking sub-nodes were selected and were found to be associated with cell proliferation pathways, adhesion, etc. The results obtained by studying the pibPAM50 reveal that there are 29 genes that are differentially expressed in young and older women ( $p < 0.005$ ) and tumors of young women overexpress more aggressive intrinsic subtypes than older women. The next step was to study the gene erbB4, one of the genes that was observed, therefore miRNAs as PAM50, differently expressed in tumors of breast cancer younger and older women, and

found that co-expression with ERBB2 gene it is associated with a worse prognosis in younger women.

The study of the clinical and pathological features of the tumors have shown differences in terms of risk factors among younger and older women, with a decrease in age at menarche, a decrease in the number of pregnancies and age first pregnancy in the past 15 years in young women with breast cancer. We have also seen young women tumors are larger, with higher histologic grade and higher percentage of axillary involvement and greater overexpression of HER2. There is a statistically significant relationship between axillary involvement and risk of relapse in young women in our series.

All these data suggest that breast cancer in younger women ( $\leq 35$  years) is a distinct biological entity of breast cancer in older women.

# Índice

---



# ÍNDICE

I.	ABREVIATURAS.....	3
II.	INTRODUCCIÓN .....	9
II. 1.	CÁNCER DE MAMA.....	9
II. 1. 1.	Glándula mamaria y cáncer de mama .....	9
II. 1. 2.	Epidemiología .....	12
II. 1. 3.	Factores de riesgo.....	14
II. 1. 3. 1.	Edad.....	15
II. 1. 3. 2.	Factores reproductivos: .....	16
	Edad de menarquía .....	16
	Edad de menopausia.....	16
	Edad en el primer embarazo .....	17
	Lactancia materna.....	17
II. 1. 3. 3.	Factores relacionados con el estilo de vida: .....	17
	Dieta .....	17
	Índice de masa corporal (IMC).....	18
	Alcohol .....	19
II. 1. 3. 4.	Estado hormonal:.....	19
	Uso de anticonceptivos orales (ACOs).....	19
	Terapia hormonal sustitutiva .....	20
II. 1. 3. 5.	Exposición a radiación .....	20
II. 1. 3. 6.	Historia familiar y mutaciones genéticas .....	20
II. 1. 4.	Estadificación.....	22
II. 1. 5.	Factores pronósticos y predictivos .....	23
II. 1. 5. 1.	Tamaño tumoral .....	24
II. 1. 5. 2.	Subtipo histológico.....	24
II. 1. 5. 3.	Grado histológico .....	24
II. 1. 5. 4.	Afectación ganglionar .....	25
II. 1. 5. 5.	Índice de proliferación celular/Ki 67.....	25
II. 1. 5. 6.	Receptores hormonales .....	26
II. 1. 5. 7.	HER2/neu.....	26
II. 1. 5. 8.	Edad al diagnóstico .....	27

II. 2. CÁNCER DE MAMA EN MUJERES MUY JÓVENES ( $\leq 35$ años) .....	27
II. 2. 1. Consideraciones generales .....	27
II. 2. 2. Detección y diagnóstico .....	29
II. 2. 3. Consejo Genético .....	29
II. 2. 4. Características tumorales .....	30
II. 2. 5. Tratamiento .....	36
<i>Cirugía</i> .....	36
<i>Radioterapia</i> .....	37
<i>Terapia adyuvante sistémica</i> .....	37
a. Quimioterapia neo/adyuvante .....	37
b. Terapia endocrina.....	38
c. Tratamiento adyuvante anti-HER2 .....	39
<i>Enfermedad metastásica</i> .....	39
II. 2. 6. Fertilidad, embarazo y lactancia .....	40
II. 3. MÉTODOS DE ANÁLISIS GENÓMICO EN CÁNCER DE MAMA .....	41
II. 3. 1. MammaPrintR y Oncotype Dx™.....	41
II. 3. 2. PAM50 (ROR-S).....	43
II. 4. LOS MICRORNAs COMO REGULADORES GENÉTICOS ...	45
II. 4. 1. Génesis y función de los MicroRNAs.....	45
II. 4. 2. MicroRNAs y cáncer de mama .....	45
II. 5. IMPORTANCIA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LA FAMILIA HER Y SU RELACIÓN CON CÁNCER DE MAMA.....	46
III. <b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	51
III. 1. HIPÓTESIS .....	51
III. 2. OBJETIVOS.....	53
III. 2. 1. Principal .....	53
III. 2. 2. Secundarios .....	53

<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	57
<b>IV. 1. SELECCIÓN DE LA POBLACIÓN A ESTUDIO. CRITERIOS DE INCLUSIÓN</b> .....	57
<b>IV. 2. TIPOS DE MUESTRAS UTILIZADAS (PARAFINADAS)</b> .....	65
<b>IV. 3. ASIGNACIÓN DE EVENTOS</b> .....	69
IV. 3. 1. Diagnóstico .....	69
IV. 3. 2. Recaída.....	70
IV. 3. 3. Mortalidad.....	70
<b>IV. 4. ANÁLISIS GENÓMICO</b> .....	71
IV. 4. 1. Aislamiento de RNA a partir de tejido incluido en parafina	71
IV. 4. 2. Determinación de la concentración e integridad del RNA	72
IV. 4. 3. Estudio de la expresión de miRNAs con la plataforma Affymetrix .....	74
IV. 4. 4. Realización de PAM50 [tecnología de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)] .....	76
<b>IV. 5. PROCESAMIENTO DE LOS DATOS Y ANÁLISIS</b> .....	80
IV. 5. 1. Análisis de los datos clínicos .....	80
IV. 5. 2. Análisis de los datos generados por Affymetrix .....	81
IV. 5. 3. Análisis de los datos genómicos generados por PAM50 ..	81
IV. 5. 4. Herramientas online y bases de datos empleados .....	82
IV. 5. 5. Representación gráfica .....	85
<b>IV. 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	86
IV. 6. 1. Tamaño muestral.....	86
IV. 6. 2. Metodología estadística.....	86

<b>V. RESULTADOS</b> .....	91
<b>V. 1. FACTORES DE RIESGO DE CÁNCER DE MAMA EN MUJERES MUY JÓVENES (<math>\leq 35</math> AÑOS)</b> .....	92
V. 1. 1. Edad de menarquía.....	92
V. 1. 2. Embarazo .....	94
V. 1. 3. Edad del primer embarazo .....	94
V. 1. 4. Lactancia materna .....	97
V. 1. 5. IMC .....	97
V. 1. 6. Historia familiar y mutaciones en BRCA .....	97
<b>V. 2. FACTORES PRONÓSTICOS EN LAS MUJERES MUY JÓVENES Y SU CORRELACIÓN CON LAS MAYORES.</b> .....	100
V. 2. 1. Factores pronósticos histológicos .....	100
V. 2. 1. 1. Tamaño tumoral .....	100
V. 2. 1. 2. Grado histológico .....	100
V. 2. 1. 3. Afectación ganglionar .....	100
V. 2. 1. 4. Tipo histológico.....	101
V. 2. 2. Factores pronósticos moleculares .....	102
V. 2. 2. 1. Receptores de estrógenos .....	102
V. 2. 2. 2. Receptores de progesterona.....	103
V. 2. 2. 3. HER2.....	103
V. 2. 2. 4. Ki 67.....	103
V. 2. 3. Subtipos inmunohistoquímicos en jóvenes y mayores....	104
<b>V. 3. TRATAMIENTOS PAUTADOS EN EL CASO DE LAS MUJERES MUY JÓVENES Y SU CORRELACIÓN CON LAS MAYORES.</b> .....	106
V. 3. 1. Cirugía de la mama y de la axila.....	106
V. 3. 2. Quimioterapia y hormonoterapia .....	110
<b>V. 4. INTERVALO LIBRE DE ENFERMEDAD, RECAÍDA Y MORTALIDAD EN CADA SUBGRUPO</b> .....	111



V. 5. RESULTADOS DE VÍAS GENÉTICAS IMPLICADAS EN EL CÁNCER DE MAMA DE MUJERES MUY JÓVENES MEDIANTE EL ANÁLISIS GENÓMICO BASADO EN PAM50 Y SU CORRELACIÓN CON ESTUDIOS PREVIOS DE miRNAS. IMPORTANCIA DE LA FAMILIA HER .....	121
V. 5. 1. Clasificación de los tumores de mujeres muy jóvenes y mayores en los subtipos intrínsecos moleculares y su correlación con la clasificación inmunohistoquímica (IHQ). .....	121
V. 5. 2. Expresión genética diferencial en los tumores de mujeres muy jóvenes y mayores en función del PAM50 y su correlación con el perfil de expresión de miRNAs. ....	127
V. 5. 3. Expresión inmunohistoquímica de cerbB4 en los tumores de cáncer de mama de mujeres jóvenes y mayores. ....	142
VI. <b>DISCUSIÓN</b> .....	149
VI. 1. DIFERENCIAS CLÍNICAS ENTRE EL CÁNCER DE MAMA DE MUJERES JÓVENES Y MAYORES .....	150
VI. 2. DIFERENCIAS ANATOMOPATOLÓGICAS ENTRE EL CÁNCER DE MAMA DE MUJERES JÓVENES Y MAYORES Y ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA POR SUBGRUPOS.....	153
VI. 3. DIFERENCIAS GENÉTICAS ENTRE EL CÁNCER DE MAMA DE MUJERES JÓVENES Y MAYORES .....	159
VI. 4. CÁNCER DE MAMA EN MUJERES JÓVENES. BÚSQUEDA DE NUEVOS MARCADORES .....	163
VII. <b>CONCLUSIONES</b> .....	171
VIII. <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	175
IX. <b>ANEXOS</b> .....	I

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura del tejido mamario.....	11
<b>Figura 2.</b> Cambios genéticos y epigenéticos que derivan en la aparición del cáncer de mama. ....	12
<b>Figura 3.</b> Mortalidad en Europa secundaria al cáncer en hombres y mujeres .....	14
<b>Figura 4.</b> Distribución del cáncer de mama familiar .....	22
<b>Figura 5.</b> Subtipos intrínsecos de cáncer de mama. ....	35
<b>Figura 6.</b> Representación de la curva típica obtenida en una RT-PCR ...	79
<b>Figura 7.</b> Representación del porcentaje de la distribución de la edad de menarquia en pacientes de cáncer de mama mediante diagramas polares ... .....	93
<b>Figura 8.</b> Representación de la distribución del factor de riesgo gestación en pacientes de cáncer de mama de la población de estudio.....	96
<b>Figura 9.</b> Representación de la distribución de los factores de riesgo asociados a cáncer de mama según el grupo de edad.....	98
<b>Figura 10.</b> Representación de las características tumorales en mujeres jóvenes y mayores con cáncer de mama de la población estudiada.....	101
<b>Figura 11.</b> Representación del porcentaje de subtipos inmunohistoquímicos en las dos poblaciones estudiadas (mujeres jóvenes y mayores).....	106
<b>Figura 12.</b> Representación de los porcentajes de los tratamientos recibidos en función de la edad de las pacientes estudiadas .....	111
<b>Figura 13.</b> Representación de las recaídas en la población de cáncer de mama estudiada.....	114
<b>Figura 14.</b> Porcentajes del lugar de recaída según el subtipo IHQ en las mujeres con cáncer de mama estudiadas .....	116

<b>Figura 15.</b> Distribución de las recaídas y exitus en mujeres jóvenes con cáncer de mama.....	120
<b>Figura 16.</b> Descripción de los subtipos histológicos tumorales en función de la inmunohistoquímica y el perfil basado en PAM50 en la población estudiada y patrones de recaída en función de los subtipos intrínsecos en las mujeres jóvenes .....	125
<b>Figura 17.</b> Supervivencia Global en jóvenes y mayores con cáncer de mama y metástasis axilares en función de la expresión de los miRNAs relevantes.....	131
<b>Figura 18.</b> Expresión de los genes endógenos en cada muestra tumoral estudiada.....	132
<b>Figura 19.</b> Cluster genético diferencial basado en PAM50 entre las muestras tumorales de cáncer de mama de mujeres jóvenes y mayores	137
<b>Figura 20.</b> Expresión de los genes diferenciales en mujeres jóvenes por localización cromosómica .....	138
<b>Figura 21.</b> Rutas desreguladas por los genes diferenciales en los tumores de cáncer de mama de las mujeres jóvene.....	140
<b>Figura 22.</b> Rutas genéticas desreguladas en los tumores de cáncer de mama de mujeres jóvenes en base a las herramientas online biocarta, GO y reactome .....	141
<b>Figura 23.</b> Ruta del gen erbB4. Su expresión se encuentra alterada en los tumores de mujeres jóvenes de nuestra serie.....	142
<b>Figura 24.</b> Representación de la expresión inmunohistoquímica de erbB4 en las mujeres jóvenes con cáncer de mama estudiadas .....	144
<b>Figura 25.</b> Representación de la expresión inmunohistoquímica del gen erbB4 en las mujeres mayores con cáncer de mama estudiadas .....	145

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Factores de riesgo de cáncer de mama y factores protectores... 16	16
<b>Tabla 2.</b> Características de las principales plataformas genómicas..... 44	44
<b>Tabla 3.</b> Descripción de las variables clínicas estudiadas en la población con cáncer de mama. .... 62	62
<b>Tabla 4.</b> Descripción de las variables anatomopatológicas estudiadas en el tumor de las pacientes con cáncer de mama..... 63	63
<b>Tabla 5.</b> Descripción de las variables de tratamiento recibido en las pacientes estudiadas ..... 64	64
<b>Tabla 6.</b> Descripción de la población de estudio en términos de factores de riesgo ..... 99	99
<b>Tabla 7.</b> Descripción de ambas poblaciones (mujeres jóvenes y mayores) en función de los factores pronósticos histológicos. .... 102	102
<b>Tabla 8.</b> Descripción de ambas poblaciones (mujeres jóvenes y mayores con cáncer de mama) en función de los factores pronósticos moleculares. .... 104	104
<b>Tabla 9.</b> Comparación en el tipo de cirugía mamaria y axilar entre mujeres jóvenes y mayores en función de la edad de diagnóstico ..... 109	109
<b>Tabla 10.</b> Correspondencia entre el subtipo inmunohistoquímico y el basado en la plataforma PAM50 en las 31 mujeres jóvenes estudiada. . 123	123
<b>Tabla 11.</b> Correspondencia entre el subtipo inmunohistoquímico y el basado en la plataforma PAM50 en las 18 mujeres mayores estudiadas. .... 124	124
<b>Tabla 12.</b> Estudio de las pacientes jóvenes con subtipo intrínseco Luminal A basado en la plataforma genética PAM50 ..... 126	126
<b>Tabla 13.</b> Genes significativos ( $p < 0.005$ ) diferenciales entre los tumores de mujeres jóvenes y mayores..... 133	133

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO I.</b> Clasificación TNM.....	I
<b>ANEXO II.</b> Grado histológico (Scarf-Bloom-Richardson).....	VII
<b>ANEXO III.</b> Perfil de expresión diferencial de microRNAs obtenido en laboratorio. ....	VIII
<b>ANEXO IV.</b> Patrón genético de expresión entre los tumores de las pacientes muy jóvenes y de las mayores obtenido de la plataforma de investigación basada en PAM50. ....	VIII
<b>ANEXO V.</b> Publicaciones y pósters .....	XIII



# Abreviaturas

---





# I. ABREVIATURAS

ADN/DNA: Ácido desoxirribonucleico

ANGPTL4: Angiopoietin-like Protein 4

ANLN: Anillin actin binding protein

ATM: Gen ataxia telangiectasia mutado

BAG: Biopsia con aguja gruesa

BIRC5: Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5 (survivin)

BRCA: Gen del cáncer de mama

BRIP1: Proteína de interacción con BRCA1, también FANCD1

BSGC: Biopsia-escisión selectiva del ganglio centinela

CAV1: Caveolina-1

CCNB1: Ciclina B1

CCNE1: Ciclina-E1 específica de G1/S

CENPF: Centromere protein-F

CDC20: Cell-division cycle protein 20

CDH1: Cadherin 1

CDIS: Carcinoma ductal in situ

CHECK2: Kinasa del checkpoint del ciclo celular 2

CRYAB: Alpha-B crystallin gene

C-KIT: Homólogo del oncogén V-Kit Hardy-Zuckerman 4 viral del sarcoma felino.

c-MYC: Avian Myelocytomatosis viral oncogene homolog

DX: Diagnóstico

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico, también llamado HER1

ERBB4: Gen homólogo 4 del oncogén de la leucemia eritrobástica viral aviario, también HER4

EXO1: Exonucleasa 1

FBN1: Fibrilina 1

F11R: junctional adhesion molecule A gene

FGFR: Receptor del factor de crecimiento fibroblástico

FDA: Food and Drug Administration

FDR: Tasa de falsos positivos de Benjamini & Hochberg

FFPE: tejido embebido en parafina fijado con formalina

FIG: Figura

GH: Grado histológico

GNG11: Guanine nucleotide binding protein gamma 11 gene

GPR160: G protein-coupled receptor 160

HER2/erbB2: Human epidermal growth factor receptor 2

IHQ: Inmunohistoquímica

IL-1/IL-1R: Interleucina 1

ILE: Intervalo libre de enfermedad

IMC: Índice de masa corporal

Ki 67: Marcador de proliferación Ki 67

MDM2: Murine double minute 2

MELK: Maternal embryonic leucine zipper kinase

mRNA: RNA mensajero

miRNA : Molécula silenciadora de RNA de pequeño tamaño, también microRNA

MKI67: Marker of proliferation Ki 67

MPP1: Membrane protein palmitoylated

MRM: Mastectomía radical modificada

MYBL2: V-myb avian myeloblastosis viral oncogen homolog-like 2

N: Número de pacientes

NGF: Factor de crecimiento neuronal

NF- $\kappa$ B: Factor nuclear del polipéptido  $\kappa$

ORC6L: Origin recognition complex subunit 6

pibPAM50: Plataforma de investigación basada en PAM50

p53: celular tumor antigen p53, tumor suppressor gene

PALB2: Partner and localizar of BRCA2

PDGF: Platelet-derived growth factor receptor

PI3K/Akt: Fosfatidil inositol 3 cinasa.

PTEN: Homólogo de la fosfatasa y tensina

RAD17: Cell cycle checkpoint protein RAD17

RAD51C: Parálogo C de RAD51

RANK-ligando: Receptor activador del factor nuclear K B

RB1: Proteína del retinoblastoma

RCP: Respuesta completa patológica

RE: Receptor de estrógenos

RH: Receptores hormonales

RIN: RNA Integrity Number

RNA: Ácido Ribonucleico

RP: Receptor de progesterona

RR: Riesgo de recurrencia

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa mediante transcriptasa inversa

SF3A1: Splicing factor 3ª, subunit 1

SG: Supervivencia global

SKT11: Gen serine/threonine kinase 11

SH2B3:SH2B adapter protein 3

SLC16A3: Lactid acid and pyruvate transport across plasma membranes

SLP: Supervivencia libre de progresión

TGFA: Trasforming grown factor alpha

UBE2C: Ubiquitin-conjugating enzyme E2

VA: Vaciamiento axilar

VAMP8: Vesicle-associated membrane protein 8

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular

VIM: Vimentine gene

# Introducción

---



## **II. INTRODUCCIÓN**

### **II. 1. CÁNCER DE MAMA**

#### **II. 1. 1. Glándula mamaria y cáncer de mama**

La glándula mamaria es un órgano altamente especializado cuya función específica es sintetizar, secretar y proporcionar leche al recién nacido. De origen ectodérmico, está presente en ambos sexos. En el hombre se mantienen rudimentarias toda la vida, en cambio en la mujer están poco desarrolladas hasta antes de la pubertad, cuando comienza el proceso de la maduración. El máximo desarrollo de estas glándulas se produce durante el embarazo y especialmente en el periodo posterior al parto, durante la lactancia, que es cuando la glándula mamaria alcanza un estado maduro de desarrollo a través de las influencias hormonales (estrógenos, somatotropina y hormonas adrenales) a nivel celular. Estas influencias hormonales generan modificaciones en la anatomía de la glándula, convirtiéndola en un órgano secretor de leche. Este órgano tiene la capacidad de regresar a su estado inicial cuando cesa la lactancia y de volver al mismo ciclo de expansión y regresión en los siguientes embarazos que ocurran durante la vida reproductiva de la mujer(1, 2).

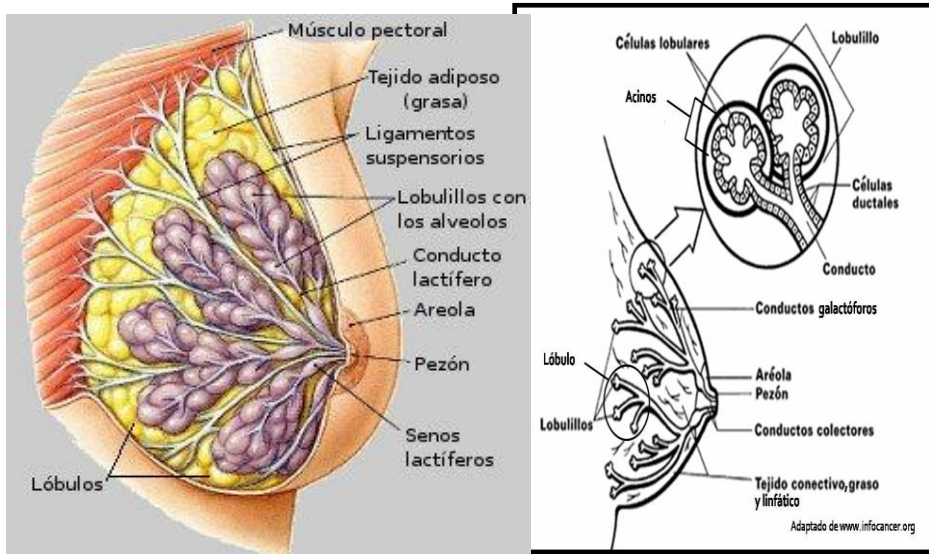
La glándula mamaria está formada por tres tipos de tejidos: glandular de tipo túbulo-alveolar, conjuntivo que conecta los lóbulos, y adiposo que ocupa los espacios interlobulares. El tejido glandular está formado por entre 15 y 20 lóbulos unidos por una red

de tubos delgados llamados ductos. Cada lóbulo a su vez se subdivide en lóbulos más pequeños (lobulillos) separados por bandas suspensorias fibrosas llamadas ligamentos de Cooper, que conectan la piel con la fascia (tejido conectivo) que cubre los músculos pectorales. Estos lobulillos están formados por entre diez y cien acinos o alveolos, cada uno con un conducto excretor denominado conducto terminal. Los acinos están estructurados por un conjunto de células secretoras que producen la secreción láctea y conforman una cavidad a la cual vierten dicha secreción. Éstos se encuentran rodeados de células mioepiteliales y capilares sanguíneos que participan activamente en el proceso de secreción y eyección de la leche (Figura 1).

El cáncer de mama es una enfermedad compleja que aparece tras la proliferación anormal y desorganizada de las células que componen el tejido mamario (3). Aparece tras múltiples alteraciones en la función y estructura de los genes de las células afectadas. Los distintos procesos moleculares que se asocian con la formación y progresión tumoral son:

- a) Activación de oncogenes (ras, myc, etc).
- b) Inactivación de genes supresores (Rb, p53, APC, BRCA1 y 2, etc).
- c) Alteraciones en los genes relacionados con la apoptosis (Caspasas, p53, etc).
- d) Alteraciones de los genes implicados en la reparación del ADN (Mismatch Repair System o MMR, Base escisión Repair, etc).
- e) Inestabilidad genómica (de microsatélites y cromosómica).

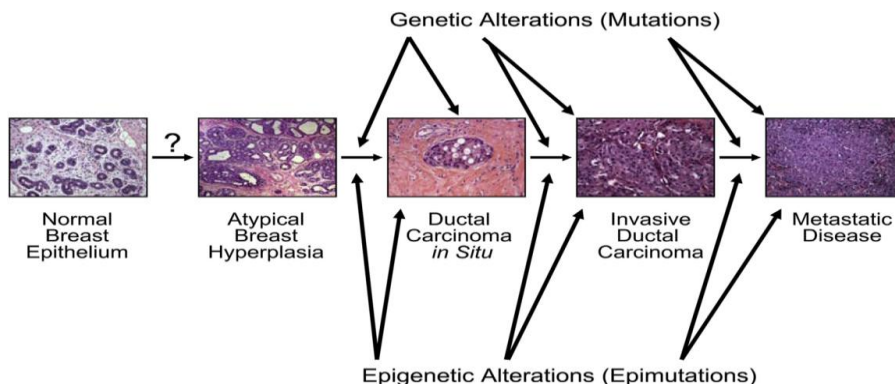




**Figura 1.** Estructura del tejido mamario: lóbulo, lobulillos, acinos, conductos galactóforos, conductos colectores y pezón, rodeados de tejido conectivo, graso y linfático.

Habitualmente, el cáncer de mama se inicia como una lesión premaligna denominada hiperplasia ductal atípica, después progresa a un estadio preinvasivo llamado carcinoma ductal in situ (CDIS) y culmina en un carcinoma ductal invasivo. Este es un proceso multipaso durante el cual las alteraciones genéticas y moleculares se van acumulando.

La evidencia patológica y molecular sugiere que el CDIS es un precursor de la enfermedad invasiva. Así como que el cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, con diferentes subtipos caracterizados por distintas alteraciones moleculares, con diferentes respuestas a los tratamientos y con diferencias en cuanto a supervivencia(4).



**Figura 2.** Cambios genéticos y epigenéticos que derivan en la aparición del cáncer de mama.

### II. 1. 2. Epidemiología

El cáncer es el mayor problema de salud pública en el mundo en la actualidad(5), y el cáncer de mama es, a nivel mundial, el cáncer más frecuente en incidencia.

En Europa el cáncer más común diagnosticado en el año 2012 fue el cáncer de mama con 464000 casos. En cuanto a mortalidad, el cáncer de mama ocupó el tercer puesto, con 131,000 casos(5, 6) (Figura 3).

En España el cáncer de mama es también el tumor maligno más frecuente en incidencia y mortalidad en la mujer española en el año 2012 (25215 casos nuevos diagnosticados, con una prevalencia a los 5 años de 104210 casos)(7, 8). En los años 80, España se encontraba entre los países europeos con menor incidencia de cáncer de mama. A partir de los años 90 se evidenció un aumento en la incidencia del mismo. Múltiples factores se han propuesto

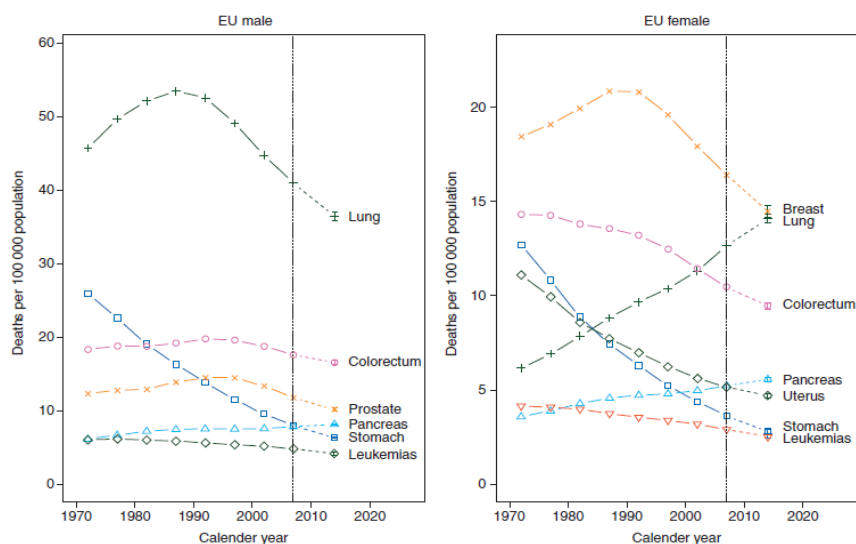
como causantes de este cambio de tendencia: el descenso de la fertilidad, el incremento de la obesidad, el estilo de vida sedentario y el consumo de alcohol (9, 10).

Cuando analizamos la incidencia del cáncer de mama por grupos de edad en España, en los últimos años, objetivamos que el grupo de edad de 25 a 44 años, presenta un incremento de alrededor un 1,7%, el grupo de edad de 45-64 años presenta una disminución en la incidencia y en el subgrupo de mayores de 65 años existe una estabilización de la incidencia.

El reciente incremento en la incidencia de cáncer de mama de las mujeres españolas menores de 45 años (mientras en el resto de países desarrollados la incidencia en este rango de edad se ha estabilizado) puede deberse a múltiples factores. Las mujeres españolas menores de 45 años no entran en el programa de screening con mamografía, sólo un 4% de las mujeres entre 25 y 34 años se realizan controles mamográficos, y un 19% de las mujeres entre 35 y 44 años. Por lo que el screening no parece ser la causa de este aumento de incidencia. Una explicación más plausible de este hecho es el cambio de vida que han experimentado las españolas en las últimas dos décadas. Por ejemplo, la disminución de la fertilidad que se ha observado en toda Europa ha sido especialmente importante en España, dónde el número de nacimientos por cada mujer ha pasado de un 2.9 en 1970 a un 1.2 en 1995. Además la edad del primer embarazo pasó de los 25 años en 1975 a los 29 años en el año 2000. Por otra parte, la edad de la menarquía, un factor de riesgo conocido asociado con cáncer de mama a edades tempranas,

ha disminuido más en España que en otras ciudades europeas. En resumen todo parece indicar que el reciente aumento de cáncer de mama en mujeres jóvenes en España es debido a cambios reproductores y en el estilo de vida(10).

En cuanto a la mortalidad por cáncer de mama en España, la implementación de programas de detección precoz, junto con los avances diagnósticos y terapéuticos, se han traducido en un incremento de la supervivencia, que se sitúa, según datos recientes de EUROCORE-4 por encima del 80% a los cinco años del diagnóstico en España(11).



**Figura 3.** Mortalidad en Europa secundaria al cáncer en hombres y mujeres de 1970-1974 a 2005-2009 y tasas de predicción de 2014(12)

### II. 1. 3. Factores de riesgo

Se han identificado numerosos factores de riesgo asociados al cáncer de mama. La mayoría de ellos están relacionados con los

antecedentes reproductivos y con la exposición hormonal durante la vida de la mujer(13). (Tabla 1).

### II. 1. 3. 1. Edad

El cáncer de mama aumenta exponencialmente con la edad como ocurre con todos los carcinomas. Sin embargo, la pendiente de crecimiento se ralentiza tras la menopausia, con la caída de los estrógenos circulantes. Aproximadamente un 64% de las mujeres diagnosticadas de cáncer de mama se encuentran alrededor de los 55 años (14-17).

Evidencia bien establecida	Magnitud del riesgo
<b>FACTORES DE RIESGO</b>	
Aumento de edad	++
País desarrollado	++
Mutaciones en BRCA1 & BRCA2	++
Mutaciones en otros genes de alta Penetrancia (p53, ATM, NBS1, LKB1)	++
Radiación ionizante (exposición en la infancia)	++
Hª de enfermedad mamaria benigna	++
Menopausia tardía (> 54)	++
Menarquia precoz (< 12)	++
Nuliparidad o primer parto tardío	++
Mama radiográficamente densa	++
Terapia hormonal sustitutiva	+
Uso reciente de anticonceptivos orales	+
Obesidad en mujeres posmenopáusicas	+

Evidencia bien establecida	Magnitud del riesgo
<b>FACTORES DE PROTECCIÓN</b>	
Países de Asia y África	--
Edad temprana de embarazo a término	--
Alta paridad	--
Lactancia de larga duración	--
Obesidad en mujeres premenopáusicas	-
Actividad física	-
Quimioprevención	-

**Tabla 1.** Factores de riesgo de cáncer de mama y factores protectores (14). Modificado de Dumitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk – where do we stand in 2005. J Cell Mol Med 2005; 9: 208-221 (14)

#### II. 1. 3. 2. Factores reproductivos:

##### *Edad de menarquía*

La menarquía temprana se asocia con un riesgo aumentado de cáncer de mama tanto en la premenopausia como en la postmenopausia. El inicio de la menarquía a la edad de 11 años o menor es un factor de riesgo establecido para el cáncer de mama, y el inicio de la menarquía a los 15 años o mayor es considerado un factor protector establecido. Un año de retraso en la aparición de la menarquía está asociada con una reducción del 5% en el riesgo de desarrollar cáncer de mama (18-20).

##### *Edad de menopausia*

Cada año de retraso en la menopausia aumenta el riesgo de cáncer de mama en un 3%(20) (21).

### *Edad en el primer embarazo*

El embarazo tiene un doble efecto a corto y largo plazo, ya que se asocia con un incremento en el riesgo inicial, ligado al aumento de hormonas circulantes, pero constituye un factor de protección a largo plazo, debido a la maduración del tejido mamario, que se traduce en una menor tasa de proliferación. Este efecto protector aumenta con el número de hijos. Cada embarazo reduce el riesgo relativo de cáncer de mama en un 7%. La reducción del riesgo es mayor si los embarazos son a edades más tempranas, de este modo la mujer que tiene su primer hijo antes de los 20 años tendrá un 30% menos de riesgo que la mujer que tenga su primer hijo a la edad de 35 años(17, 21, 22).

### *Lactancia materna*

La lactancia materna prolongada constituye un factor de protección, con un 4% de disminución del riesgo de cáncer de mama por cada 12 meses de lactancia materna(14, 16, 21).

## II. 1. 3. 3. Factores relacionados con el estilo de vida:

### *Dieta*

El papel que la dieta pueda tener como causa de cáncer de mama no está claramente definido. Más de 20 estudios han investigado la relación entre el consumo de carne y productos lácteos con el riesgo de cáncer de mama con resultados contradictorios. Algunos estudios han puesto en evidencia un aumento del riesgo de cáncer de mama con el consumo de carne (en especial carne roja y muy cocinada) (23). Sin embargo en un

análisis de varios estudios con 7379 casos, no se observó ninguna asociación entre el consumo de carne roja, o productos lácteos con el cáncer de mama (24). En el caso del consumo de grasas, existen también datos contradictorios, han sido reportados datos entre el consumo elevado de grasas y cáncer de mama pero los estudios prospectivos no confirman dicha asociación (25-30).

Recientemente el Grupo Español de Investigación en Cáncer de Mama (GEICAM) ha publicado los datos del estudio epi-GEICAM, dónde se investigó el papel de la dieta en la génesis del cáncer de mama en España en más de 1000 mujeres con diagnóstico reciente de cáncer de mama y 1000 mujeres control. Llegando a la conclusión de que el consumo de alimentos de la denominada “dieta mediterránea” (pescado, vegetales, legumbres, patatas, frutas, aceite y bajo consumo de zumos y bebidas calóricas) puede reducir el riesgo de desarrollar cáncer de mama hasta en un 30%(especialmente en los tumores triple negativos). Por el contrario, la dieta occidental (alto consumo de productos grasos, carne procesada, dulces, bebidas calóricas y bajo consumo de cereales) es la más perjudicial para desarrollar cáncer de mama y, lo que es más preocupante, es la dieta más frecuente en las mujeres jóvenes (31).

#### *Índice de masa corporal (IMC)*

La obesidad está asociada con un aumento de riesgo en pacientes postmenopáusicas (con un riesgo incrementado de un 2% por unidad de IMC) En las mujeres postmenopáusicas la principal



fuente de estrógenos procede del tejido adiposo, por ello la obesidad es un factor de riesgo (32-34).

Del mismo modo, múltiples estudios han puesto en evidencia que en las mujeres premenopaúsicas y/o menores de 50 años, no existe tal riesgo o incluso la obesidad se comportaría como un factor protector, dado que, la obesidad en niñas y adolescentes se asocia con irregularidades en el ciclo menstrual y mayor número de ciclos anovulatorios (16, 32, 35-37).

### *Alcohol*

El alcohol es el factor dietético que más asociado está con el riesgo de cáncer de mama, algunos estudios han demostrado hasta un 30% de incremento de riesgo en mujeres consumidoras de alcohol. Por cada 10 gramos de alcohol por día, el riesgo aumenta aproximadamente un 7%. El efecto por el que existe este aumento de riesgo parece ser por el efecto carcinogénico directo del acetaldehído, principal metabolito del alcohol, así como por un efecto hormonal, ya que el consumo de alcohol aumenta los niveles de estrógenos circulantes (38) (39).

## II. 1. 3. 4. Estado hormonal:

### *Uso de anticonceptivos orales (ACOs)*

Los anticonceptivos orales parecen producir un leve aumento del riesgo de cáncer de mama en mujeres consumidoras de ACOs durante muchos años, pero parece tener un corto efecto. En un metaanálisis publicado se observó que en las consumidoras habituales de ACOs (que contenían oestrógenos y progestágenos)

existía un riesgo relativo de 1.24. Pero tras 10 años de suspender el consumo no existía diferencia en el riesgo (Riesgo Relativo 1.01) con respecto a las que no habían consumido ACOs (40).

#### *Terapia hormonal sustitutiva*

La terapia hormonal sustitutiva aumenta el riesgo de cáncer de mama en las mujeres tratadas. Los estudios observacionales demuestran que la terapia con estrógenos más progestágenos incrementa el riesgo de cáncer de mama; y este efecto desaparece tras abandonar su uso(14, 41-45).

#### II. 1. 3. 5. Exposición a radiación

La exposición a altas o moderadas dosis de radiaciones ionizantes, sobre todo en los primeros años de vida y en la adolescencia aumenta el riesgo de padecer un cáncer de mama (14, 46, 47).

#### II. 1. 3. 6. Historia familiar y mutaciones genéticas

La historia familiar es uno de los factores de riesgo más importantes a la hora de desarrollar un cáncer de mama. La mayor parte de los cánceres de mama son esporádicos, mientras que alrededor de un 5-10% de los casos se producen en pacientes con una fuerte agregación familiar de cáncer de mama y con varios miembros afectados en las diferentes generaciones (48).

Las mujeres con historia familiar de cáncer de mama presentan un aumento de riesgo de enfermedad. Se ha estimado, que tener un familiar de primer grado afecto por cáncer de mama aumenta un 13.3% el riesgo y tener dos familiares de primer grado

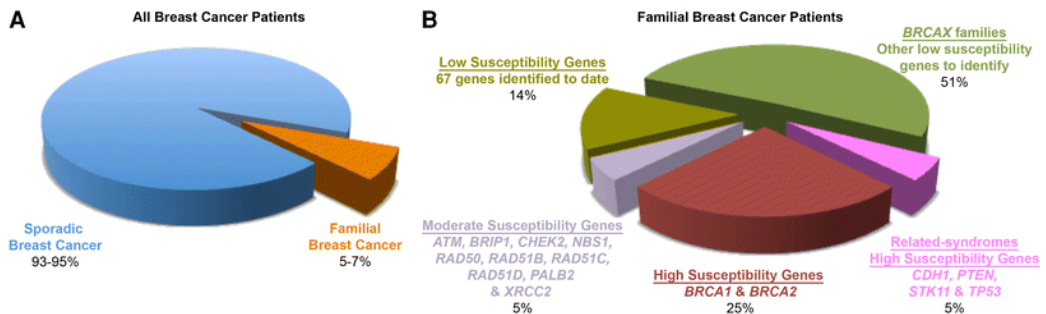
lo incrementa un 21.1% (49). Se estima que el 5-10% de los cánceres de mama son debidos a mutaciones en genes de alta penetrancia, de las cuales el 20-25% ocurre en BRCA 1 y 2, localizados en los cromosomas 17 y 13 respectivamente, con una frecuencia de 1.2 por 1000 mujeres (50).

La mayoría de los tumores BRCA 1 y BRCA 2 son carcinomas ductales invasivos. Los tumores BRCA 1 se caracterizan por un alto grado histológico e índice mitótico, mayor frecuencia de carcinomas medulares (hasta un 11%), de triples negativos (Receptores de estrógenos y progesterona negativos, HER2 negativo) y de fenotipo basal. Así como expresión de marcadores basales o mioepiteliales (citoqueratinas 5, 6, 14, 7, y EGFR). Los tumores BRCA 2 sólo parecen asociarse a una mayor presencia tubular. Los tumores no debidos a mutaciones en los genes BRCA 1/2 tienden a presentar grados histológicos e índices mitóticos menores que los asociados a mutación (51).

El riesgo de desarrollar un cáncer de mama a lo largo de la vida se sitúa en alrededor de un 60% en las portadoras de BRCA 1 y del 50% en las de BRCA 2 (52, 53).

Existen otros genes conocidos de alta penetrancia que incrementan el riesgo de cáncer de mama son: p53, PTEN, RAD51C y ATM , genes de alta penetrancia intermedia como SKT11 (Peutz- Jeghers) y CDH1 y genes de penetrancia intermedia como BRIP1,CHECK2 y PALB2 donde también se han descrito mutaciones relacionadas con el cáncer de mama.

Puesto que sólo entre un 5 y un 10% de los cánceres de mama pueden atribuirse a síndromes de predisposición familiar al cáncer que suponen mutaciones de genes únicos con alta penetrancia, probablemente gran parte de la fracción etiológica restante relacionada con una causa genética se deba a polimorfismos de un nucleótido único (SNP) o a una combinación de SNP. Los polimorfismos más investigados incluyen los genes implicados en las rutas de síntesis y metabolismo de los estrógenos, la reparación del ácido dextrirribonucleico (ADN) y las principales rutas metabólicas (16, 50, 54).



**Figura 4.** Distribución del cáncer de mama familiar. A: Una pequeña fracción de los casos de cáncer de mama es hereditaria. B: Proporción de casos de cáncer de mama hereditario explicables por los distintos genes de susceptibilidad.

#### II. 1. 4. Estadificación

La estadificación en el cáncer de mama se utiliza para agrupar a los pacientes en función de la extensión de su enfermedad (55) (56). Para la estadificación del cáncer de mama se utiliza la

clasificación TNM, descrita según las normas de la Internacional Union Against Cancer (U.I.C.C.) y que contiene tres parámetros que coinciden con los principales factores pronósticos clásicos:

T = Tamaño o extensión del tumor primario

N = Ausencia o presencia de afectación ganglionar axilar

M = Ausencia o presencia de metástasis a distancia

Esta clasificación fue revisada en 2010 y se detalla en el *anexo I. : (57)*

### **II. 1. 5. Factores pronósticos y predictivos**

Un factor pronóstico en cáncer se define como aquella característica disponible en el momento de la cirugía o del diagnóstico que se correlaciona con la evolución de la enfermedad en ausencia de tratamiento adyuvante sistémico. El factor pronóstico se relaciona con la historia natural de la enfermedad y puede utilizarse para calcular la probabilidad de que la enfermedad vuelva a aparecer. Los factores pronósticos nos pueden ayudar a seleccionar a las pacientes que pueden beneficiarse de un tratamiento adyuvante.

Un factor predictivo es aquel factor que predice la respuesta a un tratamiento específico. Los factores predictivos son capaces de identificar el mejor tratamiento para un paciente concreto.

### II. 1. 5. 1. Tamaño tumoral

Las pacientes con tumores mayores tienen menor supervivencia. Tras la afectación ganglionar, el tamaño tumoral es el factor pronóstico más relevante (58). El riesgo de recidiva aumenta de forma lineal con el tamaño del tumor en las pacientes con menos de 4 ganglios linfáticos afectados por metástasis. En pacientes sin adenopatías afectas, tratadas únicamente con mastectomía (59) con tumores  $\leq 1$  cm la supervivencia a los 20 años fue de un 92%, y en aquellas con tumores  $> 1$  cm y  $\leq 2$  cm fue del 75-80%.

### II. 1. 5. 2. Subtipo histológico

En general, los carcinomas ductales invasivos tienen un pronóstico similar a los carcinomas lobulillares. Los subtipos tubular, mucinoso y medular tienen mejor pronóstico que el carcinoma ductal infiltrante (60).

### II. 1. 5. 3. Grado histológico

La estimación del grado histológico es una apreciación subjetiva del anatomopatólogo, por lo que, intentando disminuir la variabilidad interobservador se ha propuesto el Índice de Scarff-Bloom-Richardson (58, 61) (Anexo II). En 2008, Rakha y colaboradores evaluaron el papel que jugaba el grado histológico (GH) como factor pronóstico independiente. En sus resultados el GH fue más decisivo que la afectación ganglionar, dado que pacientes con un GH 3 sin afectación ganglionar tenían menor

supervivencia libre de progresión (SLP) que aquellos con G2 o G1 con afectación ganglionar (62).

#### II. 1. 5. 4. Afectación ganglionar

La presencia o ausencia de afectación ganglionar axilar se ha considerado clásicamente como el factor pronóstico aislado más significativo en el cáncer de mama. Existe una relación directa entre el número de ganglios axilares afectos y el riesgo de desarrollar metástasis a distancia. De forma aproximada, el intervalo libre de enfermedad (ILE) para las pacientes sin afectación ganglionar es del 80%, mientras que las pacientes con afectación axilar tienen un riesgo de recaída de alrededor del 63% si no reciben tratamiento adyuvante. En los últimos años la clasificación TNM ha modificado los estadios en función de la afectación axilar y la linfadenectomía axilar ha sido rechazada en los casos de micrometástasis en el ganglio centinela (63).

Así mismo, en la actualidad se están llevando a cabo ensayos clínicos, como el ensayo clínico RxPONDER, con el objetivo de valorar en pacientes con 1 a 3 ganglios axilares afectos tras la cirugía y con receptores hormonales (RH) positivos, HER2 negativo, si existe beneficio de añadir a la hormonoterapia quimioterapia, con el fin de valorar si la afectación ganglionar es tan importante como se pensaba inicialmente (64).

#### II. 1. 5. 5. Índice de proliferación celular/Ki 67

El marcaje de la proliferación tumoral determinado por la inmunotinción ki-67 se correlaciona con los niveles de la fase S

calculados mediante citometría de flujo. La expresión de Ki-67 se ha relacionado con el pronóstico de las pacientes, de tal forma que un valor alto del mismo se asocia con peor pronóstico (65, 66).

En los últimos años también se ha observado que el Ki 67 puede actuar también como un factor predictivo de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante (67).

#### II. 1. 5. 6. Receptores hormonales

Tanto los receptores de estrógeno (RE) como los receptores de progesterona (RP) son factores pronósticos en la evolución inicial del cáncer de mama aunque perderán su valor pronóstico a largo plazo.

Las pacientes con tumores con RE positivos tienen mejor supervivencia en los 5 primeros años aunque esta ventaja desaparece en seguimientos más largos. El estado de los RP añade poca información pronóstica al de los RE. No existe ninguna duda de que el estado de RE es un potente predictor de respuesta al tamoxifeno y que la respuesta está relacionada con los niveles de RE (68-70).

#### II. 1. 5. 7. HER2/neu

Desde el punto de vista clínico, aproximadamente el 18-20% de los cánceres de mama invasivos son HER2-positivo, es decir, que se caracterizan por una amplificación y/o una sobreexpresión del oncogén HER2, un receptor transmembrana con actividad tirosina quinasa (TK), debido a la amplificación del gen que codifica HER2 en el cromosoma 17. La sobreexpresión de HER2 se



asocia a peor pronóstico en ausencia de un tratamiento específico (71-74).

La sobreexpresión/amplificación del oncogén HER2 proporciona información pronóstica y predictiva e identifica a las pacientes que pueden beneficiarse de las terapias anti-HER2 (75-79).

#### II. 1. 5. 8. Edad al diagnóstico

Las pacientes menores de 35 años tienen, en general, un peor pronóstico que las pacientes más mayores. Los cánceres de mama detectados en este subgrupo de pacientes se caracterizan por ser tumores más grandes, con mayor grado histológico, mayor afectación ganglionar y mayor proporción de tumores HER2 positivos o triples negativos. Este tema lo volveremos a analizar con mayor profundidad en el punto siguiente.

## **II. 2. CÁNCER DE MAMA EN MUJERES MUY JÓVENES ( $\leq 35$ años)**

### **II. 2. 1. Consideraciones generales**

Aunque la edad media de aparición del cáncer de mama sean los 61 años, aproximadamente una de cada cuarenta mujeres diagnosticadas con cáncer de mama es muy joven, lo que constituye de un 5 a un 7% de todas las muertes por cáncer en estas mujeres (80).

Los tumores de estas pacientes exhiben, habitualmente, características patológicas más agresivas (tamaño tumoral mayor,

grados histológicos elevados, mayor porcentaje de invasión de ganglios linfáticos, sobreexpresión de HER2 y mayor frecuencia de tumores triples negativos) que las pacientes mayores (81, 82). Por lo que, normalmente, reciben tratamientos más agresivos (en cuanto a cirugía, radiación, quimioterapia, terapias biológicas y terapia endocrina se refiere) (83).

Debemos también apuntar que las mujeres jóvenes son normalmente premenopáusicas al diagnóstico y en muchos casos tras la quimioterapia entran en una situación de amenorrea, que en algunos casos es permanente, e infertilidad (un problema muy importante para mujeres que probablemente deseaban tener hijos en el futuro). Todo esto puede causar efectos secundarios y tiene un impacto importante en la calidad de vida, llevando en muchas ocasiones a desequilibrios psicológicos a largo plazo (84).

Por todo esto, el primer consenso internacional sobre mujeres jóvenes con cáncer de mama recomienda que las mujeres diagnosticadas de cáncer de mama menores de 40 años, deban ser valoradas por un equipo multidisciplinar que incluya oncólogos médicos, cirujanos de mama, oncólogos radioterápicos, ginecólogos expertos en fertilidad, etc. Dado que, esta patología a esta edad temprana, con sus características psicosociales propias como son el mantenimiento de la fertilidad, salud sexual, consejo genético, y sus características tumorales diferenciales, requiere una valoración multidisciplinar (85, 86).

### **II. 2. 2. Detección y diagnóstico**

Siguiendo la premisa de que el mejor tratamiento frente al cáncer es un diagnóstico temprano, las mamografías representan la mejor arma frente al cáncer de mama. De hecho, el diagnóstico estandarizado de la mamografía en mujeres entre 50 y 70 años ha reducido la mortalidad por este tipo de tumor. Sin embargo, el tejido mamario en las mujeres jóvenes menores de 40 años es denso y dificulta la visualización de tumores o áreas de calcificaciones, de modo que con la mamografía es difícil diferenciar entre tumor o tejido normal. Por lo que las mujeres jóvenes, habitualmente, consultan por una masa mamaria y el cáncer de mama es diagnosticado en estadios más avanzados de la enfermedad (87).

Aunque la resonancia magnética nuclear (RMN) mamaria es más útil en mamas densas, no ha demostrado mejorar el pronóstico ni se ha evidenciado beneficio en términos de recurrencia local o a distancia en jóvenes o mayores cuando se realiza una RMN mamaria preoperatoria(82). Aunque sí se recomienda su uso en pacientes jóvenes de alto riesgo como aquellas con mutaciones conocidas en los genes BRCA 1 y 2 y las que hayan recibido radioterapia previo a los 30 años de edad (por ejemplo por una enfermedad de Hodgkin), entre otros(88), pero no existen datos suficientes para recomendarla como screening en mujeres menores de 40 años.

### **II. 2. 3. Consejo Genético**

Las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama por debajo de los 35 años deben ser remitidas a una Unidad de Consejo

Genético, independientemente de su historia familiar de cáncer de mama, para valorar la probabilidad de tener una mutación en los genes BRCA.

#### **II. 2. 4. Características tumorales**

El pronóstico y el manejo del cáncer de mama han estado siempre influenciados por variables clásicas como el tipo histológico, grado histológico, tamaño tumoral, afectación ganglionar y el estado de los RE, RP, y HER2. Recientemente, diferentes grupos de investigación han identificado firmas genéticas de expresión que predicen el pronóstico del cáncer de mama en función de los genes activados en el tumor.

En la práctica clínica, utilizamos los criterios inmunohistoquímicos para identificar los subtipos histopatológicos. En el año 2009 el estudio BCIRG 001,(70), y en el año 2011 el Consenso Internacional de expertos de St Gallen (89), definieron de forma retrospectiva y por criterios inmunohistoquímicos los siguientes subtipos tumorales:

- *Luminal A*: con RE positivos y/o RP positivos, HER2 negativo y Ki 67 < 14%.

- *Luminal B*: Dentro de este grupo se englobarían otros 2 subgrupos:

- Luminal B (HER2 negativo): RE y/o RP positivos, HER2 negativo, y un Ki 67 alto.

-Luminal B (HER2 positivo): RE y/o RP positivos, HER2 sobreexpresado o amplificado y cualquier Ki 67.

● *HER2 sobreexpresado*: RE/RP negativos y HER2 positivo.

● *Triple negativo*: RE negativos, RP negativos, HER2 negativo.

En la última década, los estudios basados en el análisis global de la expresión génica han identificado 4 subtipos intrínsecos principales de cáncer de mama: Luminal A, Luminal B, HER2 enriquecido y Basal-like. Estas entidades moleculares presentan significantes diferencias en términos de factores de riesgo epidemiológicos, historia natural, y diferentes respuestas a las terapias locales y sistémicas (4, 90-100). (Ver Figura 5)

Las siguientes características definen a los conocidos como subtipos intrínsecos de cáncer de mama:

● *Luminal A*. El cáncer de mama luminal A es el subtipo más común, representando un 50-60% del total. Se caracteriza por la expresión génica de RE, RP, Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), GATA3 y citoqueratina 8/18, entre otros. Presenta una baja expresión de genes relacionados con la proliferación celular y ausencia de expresión de HER2, así como una baja tasa de proliferación medida por Ki67 y un grado histológico bajo. Aunque sí son frecuentes las mutaciones de la vía PI3K (49%).

Las pacientes con este subtipo tumoral tienen un mejor pronóstico; la tasa de recaída es del 27,8% (significativamente menor que la de los otros subtipos) y la supervivencia media tras la

recaída es también mayor. El patrón de recaída más habitual es en forma de metástasis óseas y la respuesta a la quimioterapia es pobre.

- *Luminal B*. Los tumores con el perfil molecular Luminal B representan entre el 10% y el 20% de todos los cánceres de mama. En comparación con el subtipo Luminal A, poseen un fenotipo más agresivo, mayor grado histológico, mayor índice de proliferación, peor pronóstico y una respuesta intermedia a la quimioterapia. El patrón de recaída también difiere, aunque la enfermedad ósea continúa siendo el lugar de recaída más frecuente (30%).

Expresa también RE pero se evidencia un aumento en la expresión de genes de proliferación, tales como MK167, ciclina D1 y en ocasiones el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el gen HER2.

Las mutaciones de PI3K no son tan frecuentes como en el subgrupo anterior, son de un 32%, y coexisten con pérdidas de pTEN. También es frecuente la hipermetilación del DNA.

- *HER2 positivo*: De un 15 a un 20% de todos los cánceres de mama corresponden a este subtipo molecular. Se caracterizan por una alta expresión del gen HER2, y otros genes asociados con la vía HER2 y/o por la amplificación del gen HER2 situado en el cromosoma 17q12. Presenta también una sobreexpresión de los genes relacionados con la proliferación celular. Otra característica diferencial de este subtipo es la baja expresión de los genes del subtipo Luminal y del basal.

Son tumores muy proliferativos, con un alto grado histológico, inestabilidad genómica y más del 40% tienen mutaciones de p53 y un 42% mutaciones de PI3K.

Desde el punto de vista clínico, el subtipo HER2 positivo se caracteriza por una alta quimiosensibilidad y por un mal pronóstico (aunque en los últimos años el tratamiento anti-HER2 ha mejorado la supervivencia tanto del cáncer de mama metastásico como de la enfermedad localizada).

- *Basal-like*: El subtipo basal representa el 10-20% de todos los carcinomas de mama. Se caracteriza por una baja expresión de los genes Luminales, baja expresión del grupo de genes HER2 y alta expresión de los genes de proliferación y del denominado grupo de genes basal. El grupo de genes basal incluye citoqueratinas como la CK5, 6, 14, y la 17; el gen EGFR; c-Kit; vimentina; P-Cadherina; Fascina y Caveolinas 1 y 2.

Poseen también una gran frecuencia de mutaciones de P53 y es frecuente la hipometilación del DNA, la inestabilidad genómica y la aneuploidia,

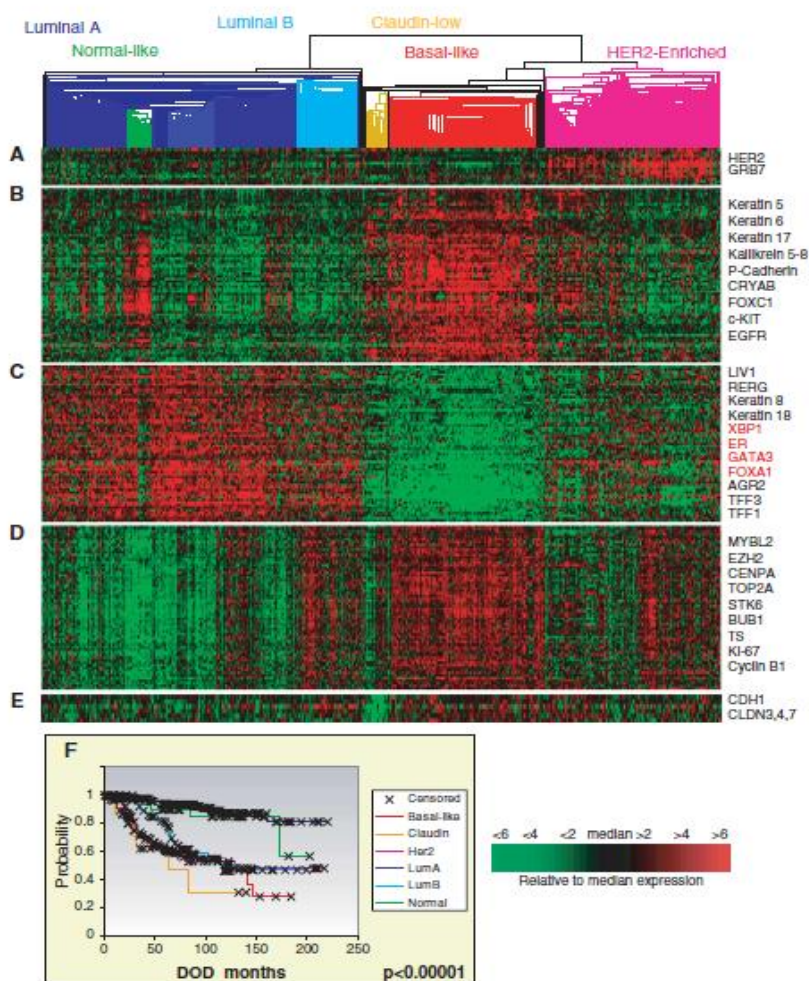
Clínicamente, son tumores que se caracterizan por su aparición a una edad más temprana, un mayor grado histológico y tamaño tumoral, así como mayor frecuencia de afectación ganglionar. Cuando estos tumores recidivan predominantemente es en órganos viscerales.

- *Claudin-low*. Después de la clasificación inicial en los cuatro subtipos anteriores, en el año 2007 se identifica este nuevo subtipo, caracterizado, genéticamente, por la baja expresión de genes relacionados con la adhesión celular como las claudinas 3, 4 y 7, y la E-cadherina, y una alta expresión de genes mesenquimales como vimentina, Snail1, Snail2 y twist1. Este subtipo tiene una expresión genética muy similar al subtipo Basal-like como una baja expresión de los genes del subtipo Luminal y HER2, pero a diferencia del Basal-like, se sobreexpresan genes relacionados con la respuesta inmune y con la transición epitelio-mesenquima.

Clinicamente, los tumores claudin-low tienen un peor pronóstico, una mala respuesta a la quimioterapia y poseen mayor frecuencia de mutaciones en los genes BRCA.



## SUBTIPOS INTRÍNSECOS DE CÁNCER DE MAMA



**Figura 5.** Subtipos intrínsecos de cáncer de mama. Modificado de PEROU et al. Cold Spring Harb Perspect Biol 2011.

A, B, C, D, E: Análisis de 677 tumores malignos de mama, identificando 5 subtipos intrínsecos mediante análisis genético: Luminal A, Luminal B, Normal-like y basal-like y la identificación de un nuevo subtipo llamado claudin-low.

F: Tabla de Kaplan-Meier dónde vemos la supervivencia basada en la SLP de cada subgrupo.

Aunque cuando estudiamos los subtipos intrínsecos del cáncer de mama no parecen existir diferencias basadas en la edad, todos estos avances en la Oncología molecular de los últimos años, nos hacen preguntarnos si estamos ante una entidad biológica única y diferenciada cuando nos enfrentamos al cáncer de mama de mujeres jóvenes. El hecho de si el cáncer de mama en pacientes jóvenes debe considerarse diferente genéticamente del cáncer de mama de mujeres mayores o si por el contrario, su comportamiento es solamente debido a una mayor frecuencia de los subtipos más agresivos, o incluso a un retraso en el diagnóstico es un tema que sigue siendo, a día de hoy, controvertido (81, 101-105).

Asimismo, hay estudios contradictorios sobre la identificación de corta edad como un factor pronóstico independiente (81).

Es por todo ello, que los tumores de este grupo de pacientes deben seguir siendo estudiados para intentar identificar factores pronósticos y vías tumorales diferenciales y con ello poder disponer de tratamientos específicos para nuestras mujeres jóvenes con cáncer de mama.

## **II. 2. 5. Tratamiento**

### *Cirugía*

La evidencia científica sugiere que la cirugía mamaria conservadora seguida de radioterapia se asocia con tasas de supervivencia y control local de la enfermedad similares a la mastectomía en las pacientes jóvenes (106-108).

La indicación de vaciamiento selectivo del ganglio centinela (BSGC) o de vaciamiento axilar (VA) debe ser el mismo que en pacientes de mayor edad, dado que no se han evidenciado diferencias en cuanto al pronóstico (109, 110).

### *Radioterapia*

Los efectos a largo plazo de la radioterapia en los órganos vecinos a la mama (corazón, mama contralateral, pulmón ipsilateral) hacen que sean especialmente importantes en las mujeres jóvenes por su potencial supervivencia a largo plazo. Por todo ello se recomienda la utilización de modernas técnicas de radioterapia con la finalidad de minimizar los riesgos y aumentar los beneficios. El resto de recomendaciones de Radioterapia son similares para mujeres jóvenes que para las de edad más avanzada (85, 111-114).

### *Terapia adyuvante sistémica*

#### a. Quimioterapia neo/adyuvante

Las indicaciones de terapia adyuvante/neoadyuvante sistémica en mujeres jóvenes debe basarse, como en las mayores, en las características biológicas del tumor (incluyendo RH, HER2, proliferación y GH), el estadio tumoral y las comorbilidades. El tipo de tratamiento debe ser independiente, a día de hoy, del estatus mutacional de BRCA. Previo a cualquier decisión terapéutica la paciente joven deberá ser informada sobre temas relacionados con la fertilidad y contracepción. La edad temprana por sí misma no es una indicación para prescribir un régimen quimioterápico específico

para mujeres jóvenes. Si bien es cierto que, como hemos comentado anteriormente, el cáncer de mama de mujeres jóvenes tiene características asociadas a peor pronóstico (tumores grandes, afectación ganglionar, etc) por lo que deberían ser tratadas con un régimen estándar que incluyera taxanos y antraciclinas (80, 85, 115-119).

#### b. Terapia endocrina

La terapia neoadyuvante endocrina no debe ser administrada en pacientes jóvenes fuera de ensayo clínico. Las pacientes jóvenes con cáncer de mama invasivo con receptores hormonales (RH) positivos serán candidatas a recibir tamoxifeno (tras la quimioterapia o inicialmente, si se descarta la quimioterapia en función de las características tumorales). El beneficio de tomar tamoxifeno durante 5 años es similar en pacientes muy jóvenes y más mayores y los beneficios en menores de 35 años no parecen modificarse en función del tiempo de amenorrea tras la quimioterapia (120).

La duración óptima del tamoxifeno no está clara, después de los resultados de los estudios ATLAS y ATTOM, continuar con tamoxifeno hasta cumplir 10 años de tratamiento comparado con 5 años, reduce el riesgo de mortalidad por cáncer de mama. Del mismo modo también hay que tener en cuenta lo que significa en pacientes con una larga expectativa de vida continuar 5 años más con tamoxifeno como por ejemplo el riesgo aumentado de trombosis venosas, de neoplasias de endometrio y de abandonar definitivamente el deseo de gestación. Por todo ello se recomienda

que la decisión sea individualizada, balanceando entre el riesgo de recaída, el beneficio absoluto y la calidad de vida (121, 122).

Recientemente se han publicado los datos conjuntos del ensayo TEXT y SOFT (123-125) donde se evidencia que en mujeres premenopáusicas con cáncer de mama precoz que hayan recibido quimioterapia neo/adyuvante, el tratamiento adyuvante con exemestano más supresión ovàrica reduce el riesgo de recurrencia más que con tamoxifeno más supresión ovàrica o tamoxifeno sin supresión ovàrica. Este beneficio es más evidente en mujeres menores de 35 años.

### c. Tratamiento adyuvante anti-HER2

Un año de tratamiento con trastuzumab adyuvante con o después de la quimioterapia es indicado para aquellas pacientes con tumores HER2 positivos, mayores de 1 cm, con ganglios positivos o negativos, con una fracción de eyección ventricular mayor del 50% y sin factores de riesgo cardiovascular importantes, independientemente de la edad.

En el estudio HERA se objetivó que las pacientes por debajo de los 35 años se beneficiaban de un año de trastuzumab al igual que el resto de la población del estudio (126).

### *Enfermedad metastásica*

Tal y como se recomienda en el cáncer de mama localizado, en el cáncer de mama metastásico la edad por sí misma no debe ser una razón para prescribir terapias más agresivas (tanto en lo referente a quimioterapia, terapias endocrinas en el caso de tumores

hormono-sensibles y terapias biológicas). En el momento actual no hay datos para prescribir tratamientos distintos o dosis distintas en mujeres jóvenes (80, 85).

### **II. 2. 6. Fertilidad, embarazo y lactancia**

La planificación familiar y la fertilidad son temas prioritarios en las pacientes jóvenes con cáncer de mama, por lo que todas ellas deberán ser asesoradas en este tema, tal y como recomiendan la Sociedad Americana de Oncología clínica y la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (84, 127, 128).

Con respecto a la gestación tras un cáncer de mama, todos los datos retrospectivos muestran que no existe un efecto perjudicial en el pronóstico. Por lo que, en principio la gestación tras un cáncer de mama no debe ser prohibida (129, 130).

Por otra parte señalar que el cáncer de mama durante la gestación es muy infrecuente. Aproximadamente 1 de cada 3000 mujeres diagnosticadas de cáncer de mama se encontrarán embarazadas en el momento del diagnóstico, y sólo un 10% de las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama por debajo de los 40 años desarrollan la enfermedad durante el embarazo (131). Lo mismo ocurre en el caso del cáncer de mama durante la lactancia, los estudios son escasos y con un número limitado de pacientes, aunque sí parece que se asocia a un peor pronóstico (132).

## **II. 3. MÉTODOS DE ANÁLISIS GENÓMICO EN CÁNCER DE MAMA**

Una de las barreras que nos encontramos cuando nos enfrentamos al cáncer de mama es su heterogeneidad clínica y genética. En los últimos años estamos asistiendo a una nueva forma de diferenciar a las pacientes en función de su pronóstico y de la diferente respuesta a la quimioterapia gracias a los biomarcadores moleculares. Los análisis de expresión génica nos ayudan a identificar distintas firmas moleculares en cáncer de mama con diferentes pronósticos. Los perfiles de expresión génica han tenido un gran impacto para el conocimiento de la biología del cáncer de mama y más recientemente en la asistencia clínica (4, 133, 134).

Los test genéticos que miden la expresión de 21-70 genes se usan, actualmente, de forma rutinaria en la clínica para evaluar el riesgo de recurrencia en el cáncer de mama localizado, y en función del resultado valorar el mejor tratamiento para las pacientes. Múltiples predictores de riesgo de base genética se encuentran actualmente en el mercado, pero nos centraremos en tres por ser los más estudiados (135, 136) (Tabla 2).

### **II. 3. 1. MammaPrintR y Oncotype Dx™**

Actualmente disponemos en la práctica clínica de dos plataformas de expresión de DNA comercializadas, validadas en series retrospectivas, denominadas MammaPrint® y Oncotype DX®.

Mammaprint ® utiliza la tecnología del microarray para analizar la expresión de 70 genes en tejido tumoral o fresco. Fue aprobado por la FDA en el año 2007 como test pronóstico para ser usado junto a otros factores clínico-patológicos. Sus resultados se reportan como bajo riesgo (riesgo de recurrencia del 10 % a los 10 años sin tratamiento adyuvante) o alto riesgo (riesgo de recurrencia del 29% a los 10 años sin tratamiento adyuvante)(137, 138).

El test Oncotype® evalúa la expresión de RNA mensajero (mRNA) de 21 genes (16 genes relacionados con cáncer y 5 genes de referencia) mediante técnicas de RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa mediante transcriptasa inversa). La expresión de estos 21 genes se reporta como una puntuación de riesgo de recurrencia (RR), que varía de 0 a 100. Este test define tres situaciones de riesgo según el RR: bajo riesgo (<18), intermedio (18-30), y alto riesgo ( $\geq 31$ ). Estas categorías corresponden a un riesgo de recurrencia a distancia a los 10 años tras 5 años de terapia endocrina de <12, de 12 a 21%, y de 21 a 33% respectivamente (139).

La integración de estas plataformas génicas validadas se contempla a nivel de las principales guías y consensos internacionales de expertos en cáncer de mama como una ayuda en la toma de decisiones, considerando criterios de disponibilidad y coste (89) (136) (140) (90) (141).

El perfil de pacientes candidatas al uso de estas plataformas son mujeres menores de 75 años, con cáncer de mama en estadio precoz (p T1b-2 p N0-1mic), HER 2 negativo y RH positivos.



### II. 3. 2. PAM50 (ROR-S)

El predictor genético PAM50 es un clasificador de riesgo basado en la expresión de 50 genes mediante RT-PCR que clasifica los tumores malignos de mama intervenidos, RE positivos y negativos, en uno de los cuatro subtipos moleculares intrínsecos (Luminal A, Luminal B, HER2 enriquecido y Basal-like), prediciendo de este modo su pronóstico. Adicionalmente, la firma genética PAM50 genera una puntuación o score individualizado que estima la probabilidad de recurrencia de la enfermedad mediante la ponderación de las correlaciones de los subtipos moleculares, los genes de proliferación expresados y el tamaño tumoral tras la cirugía. Y con esta información puede ayudar a los clínicos a tomar decisiones basadas en el riesgo de muerte de las pacientes (98, 142, 143).

Esta herramienta presenta varias ventajas tales como el uso de RT-PCR, la utilidad del material fijado en parafina y su aplicabilidad a todos los subtipos de cáncer de mama y no sólo a tumores RE positivos. En el caso de clasificar un tumor como de bajo riesgo podría ser obviada la quimioterapia (144-146).

En 2012 se publica un estudio dónde se compara el test Oncotype con el PAM50 en 151 tumores RE positivos, estadio I, II. Los autores encuentran similitudes entre las dos plataformas genómicas para los tumores de alto (por ejemplo Luminales B o  $RR > 31$ ) y bajo riesgo (por ejemplo Luminal A o  $RR < 18$ ) pero PAM50 asigna más pacientes al bajo riesgo. Alrededor de la mitad del grupo

con RR intermedio por Oncotype fueron reclasificados como Luminal A por PAM50 (147).

TEST	TEJIDO	TÉCNICA	SCORE
<b>MAMMAPRINT</b>	Fresco/ congelado	Firma genética de 70 genes basada en microarrays	2 categorías con diferente riesgo de desarrollar metástasis a los 10 años: -Bajo riesgo (13%) -Alto riesgo (56%)
<b>ONCOTYPE</b>	Congelado/ fijado en parafina	RT-PCR (21 genes)	Obtiene un RS continuo(0-100) que predice el riesgo de recurrencia a distancia a los 10 años en tumores RE positivos, ganglios negativos: -Bajo riesgo(<18) -Riesgo intermedio(18-31) -Alto riesgo( $\geq$ 31)
<b>PAM50</b>	Fresco/ fijado en parafina	QRT-PCR(55 genes)	Riesgo continuo de recurrencia (0-100). Categoriza el tumor en función de los subtipos intrínsecos moleculares

**Tabla 2.** Características de las principales plataformas genómicas. Modificada de Arpino et al. Breast 2013

## **II. 4. LOS MICRORNAs COMO REGULADORES GENÉTICOS**

### **II. 4. 1. Génesis y función de los MicroRNAs**

Los microRNAs (miRNAs) son pequeñas (de 18 a 25 nucleótidos) secuencias de RNA no codificante que juegan un importante papel en la regulación de la expresión génica. Se unen a secuencias complementarias de mRNA llevando a la represión o degradación del mRNA complementario (se unen a la zona 3' de los mensajeros). Esta unión, por lo general, resulta en la represión de la traducción y el silenciamiento de genes mediada por el complejo RISC (complejo de silenciamiento inducido por RNA)(148-150).

La desregulación en la expresión de muchos de los miRNAs se ha relacionado con varios tipos de enfermedades (151, 152) y con algunos tipos de cáncer (153, 154)

Los miRNA pueden funcionar como supresores de tumores o como oncogenes (155).

### **II. 4. 2. MicroRNAs y cáncer de mama**

La evidencia científica ha demostrado que la expresión aberrante de miRNAs se asocia con el cáncer de mama. Varios estudios han identificado marcadores moleculares, como miR- 21, miR- 9, let-7, miR- 205, miR- 126 y miR -335, relacionados con tumores de mama con gran capacidad de proliferación y metastatización, tamaño mayor y peor pronóstico. Los miR-372 y

miR-373 han sido identificados como oncogenes, y miR-221 se ha visto sobreexpresado en cáncer de mama triple negativo (156-164).

Además, en algunos estudios se ha demostrado la correlación entre la expresión de miRNAs con características histopatológicas específicas del cáncer de mama, como el estadio tumoral, el índice de proliferación celular, la invasión vascular y el estatus de los RE, RP y HER2 (165). Estudios preliminares sugieren que las firmas de miRNAs podrían definir, de forma similar a como ha sido encontrado con el perfil de expresión génica, los diferentes subtipos intrínsecos de cáncer de mama (166).

## **II. 5. IMPORTANCIA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LA FAMILIA HER Y SU RELACIÓN CON CÁNCER DE MAMA**

La familia de las glicoproteínas HER/erbB que está compuesta por cuatro miembros: HER1 o EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), HER2 (que no tiene ligando conocido), HER3 (que carece de actividad tirosin-cinasa) y HER4. Los receptores HER se caracterizan por ser glicoproteínas transmembrana compuestas por 3 dominios (extracelular, transmembrana e intracelular con actividad protein kinasa).

Esta familia de receptores se encuentra expresada en células epiteliales, mesenquimales, neuronales y en sus progenitores celulares. La familia de receptores ErbB regula la proliferación,

diferenciación y la función de numerosos tejidos en humanos y una desregulación de su función está relacionada con diferentes neoplasias (167, 168).

Cuando estos receptores se activan son traslocados al núcleo, dónde participan en la señal celular. La dimerización de estos receptores genera una cascada de señalización capaz de activar otras vías, las más importantes son la vía Raf/Ras/MAP kinasa, la vía de la fosfolipasa C gamma y la vía de señalización PI3 kinasa/Akt. Controlando de este modo, numerosos procesos celulares como la angiogénesis, la proliferación, la diferenciación, la supervivencia/apoptosis, la migración, la invasión y metástasis.

En el caso del cáncer de mama el papel que juega HER2 en su patogénesis es bien conocido, y actualmente se está estudiando la implicación del resto de los receptores de la familia HER. En el caso de erbB4, la relación existente con la carcinogénesis mamaria está en investigación actualmente. ErbB4 se activa por múltiples ligandos: neuregulina-1 (heregulina), neuregulina-2, neuregulina-3, neuregulina-4, betacelulina y epiregulina entre otros. La unión de erbB4 a su ligando estimula la homodimerización de erbB4 o la heterodimerización con cualquier otro ErbB receptor (169-172). ErBb4 tiene 4 isoformas, pero sólo una se encuentra expresada en el cáncer de mama (JM-a) (173, 174). Mientras erbB1 es esencial en la diferenciación ductal de la mama, erbB4 juega un papel esencial en la maduración alveolar durante el embarazo y el inicio de la lactancia induciendo la diferenciación epitelial (175-177).

Los resultados de los distintos estudios que evalúan la significación de la sobreexpresión de erbB4 son a día de hoy contradictorios. En algunos de ellos la elevada expresión de erbB4 se asocia a larga SLP, bajo grado histológico, y RE positivos(177-184). En otros, por el contrario, la expresión de erbB4 se ha asociado a mal pronóstico, con tumores de alto grado, invasión vascular y ganglios axilares positivos (185, 186).

Parece evidente que la co-expresión de erbB4 con EGFR y ErbB2 en el cáncer de mama se asocia a peor pronóstico. Por el contrario, la sobreexpresión de erbB4 solo se correlaciona con un pronóstico más favorable (187). Por ello, se postula que erbB2 podría ser el responsable de que erbB4 se pueda comportar como un supresor de tumores o como un oncogén (188). También se ha observado que la coexpresión de erbB4 con HER2 se asociaría a mejor pronóstico y mayor SLP en las pacientes que reciben neoadyuvancia o adyuvancia con trastuzumab (189).

ErbB4 ha demostrado inmunoreactividad nuclear en un gran número de tejidos tumorales (182) (173). En el caso del cáncer de mama la inmunoreactividad nuclear de ErbB4 se ha asociado con peor pronóstico comparado con la inmunoreactividad de membrana o citoplasmática en el caso del cáncer de mama ErbB4-positivo (174, 190, 191).

# **Hipótesis y objetivos**

---





## **III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **III. 1. HIPÓTESIS**

El análisis de la bibliografía científica y el estado actual de los conocimientos nos permiten afirmar que el pronóstico del cáncer de mama viene determinado por las características biológicas del tumor, la precocidad de su diagnóstico y la calidad del tratamiento recibido.

Las determinaciones histológicas del cáncer de mama sólo identifican de forma parcial su comportamiento biológico. Pero combinándolas con los perfiles de expresión génica tumoral poseemos más datos acerca de la biología de cada cáncer de mama y podremos ofrecer a las pacientes tratamientos individualizados.

El cáncer de mama en las mujeres muy jóvenes (<35 años) posee unas características propias que lo diferencian del cáncer de mama de mujeres mayores. Son pacientes en las que, además de estudiar la biología del tumor, debemos tener en cuenta aspectos como la fertilidad, la salud sexual, la importancia de la imagen corporal, de la vida laboral y de las relaciones sociales. A todo ello se suma que parecen ser tumores más agresivos, altamente metastásicos y con peor pronóstico y supervivencia. Teniendo en cuenta que, suelen tratarse de igual modo los tumores que presentan similares características histológicas, sin diferenciar por edad, ni teniendo en cuenta la características sociales y psicológicas que

diferencian a jóvenes de mayores, es de vital importancia determinar si estos tumores podrían corresponder a tumores biológicamente distintos, con vías de señalización oncogénicas distintas y si podrían clasificarse como un nuevo subtipo particular dentro del cáncer de mama y, por lo tanto, podríamos utilizar nuevos marcadores para diseñar estrategias terapéuticas más específicas y menos agresivas.

Por todo ello, nuestra hipótesis principal es que el cáncer de mama de pacientes muy jóvenes ( $\leq$  de 35 años), es biológicamente distinto del cáncer de mama de pacientes mayores postmenopáusicas, activándose vías oncogénicas de señalización distintas de aquellas activadas en mujeres mayores. Que hacen que en las mujeres jóvenes el cáncer de mama sea más agresivo, con recaídas más frecuentes y peor pronóstico.

## **III. 2. OBJETIVOS**

### **III. 2. 1. Principal**

Determinar si el cáncer de mama de pacientes muy jóvenes ( $\leq$  de 35 años) es biológicamente distinto del cáncer de mama de mujeres postmenopáusicas, con diferentes vías oncogénicas activadas.

### **III. 2. 2. Secundarios**

Comparar las diferencias existentes entre la población de pacientes con cáncer de mama muy jóvenes con respecto a la población de pacientes con cáncer de mama postmenopáusicas

1. Investigar si en los últimos años existe un aumento en la incidencia de cáncer de mama en mujeres muy jóvenes y comparar en términos de factores de riesgo.
2. Identificar factores pronósticos histológicos y moleculares y evaluar si las mutaciones en los genes BRCA son más frecuentes en mujeres jóvenes.
3. Estudiar la asociación entre edad al diagnóstico y riesgo de recaída y mortalidad. Correlacionar con los factores pronósticos histológicos y moleculares.
4. Evaluar la concordancia entre los subtipos intrínsecos definidos por PAM50 y los subtipos inmunohistoquímicos.
5. Identificar patrones de recaída en función de los subtipos intrínsecos en mujeres jóvenes.
- 6- Identificar microRNAs correlacionados con parámetros clínicos.



## **Material y métodos**

---



## **IV. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **IV. 1. SELECCIÓN DE LA POBLACIÓN A ESTUDIO. CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

Se estudiaron de forma retrospectiva todas las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama con una edad de 35 años o menores y valoradas en el Servicio de Hematología y Oncología Médica del Hospital Clínico de Valencia desde el año 1998 al año 2014 (16 años), obteniendo un total de 258 pacientes. Se estudió como grupo control 101 pacientes diagnosticadas y tratadas en el mismo Servicio de Oncología Médica de un cáncer de mama, con edades comprendidas entre los 45 y los 95 años y que fueran postmenopáusicas.

Para localizar a las mujeres de ambos grupos se consultó la base de datos del Servicio de Hematología y Oncología Médica del HCUV. En esta base está recogida toda la información de las pacientes remitidas desde cirugía u otros centros, con un diagnóstico de cáncer de mama.

Los datos necesarios para el estudio se han obtenido principalmente a partir de la documentación presente en la historia clínica hospitalaria.

En las tablas siguientes (Tabla 3, 4 y 5) se detallan las variables clínicas y anatomopatológicas recogidas con su definición

correspondiente. Estas variables se obtienen de forma rutinaria en la primera visita en las consultas externas (CCEE) de Oncología, tras la cirugía y en las consecuentes visitas de las pacientes.

Para el estudio genético mediante la plataforma Affimetrix (con la finalidad de establecer un perfil molecular de expresión de microRNAs característico de cáncer de mama en mujeres jóvenes) y la plataforma PAM50 (con la intención corroborar que distintos genes se activan en función de la edad de diagnóstico del cáncer de mama) se identificaron un total de 100 muestras (de las 258 mujeres jóvenes diagnosticadas de cáncer de mama) con material parafinado en el Biobanco del Hospital Clínico Universitario de Valencia, de las cuales se conservaba material parafinado en buen estado de unas 60. Todas ellas sin mutación conocida en los genes BRCA. Se utilizaron como grupo a comparar las muestras de tejido tumoral mamario de las mujeres mayores, pareadas con los tumores de las pacientes jóvenes con el fin de eliminar cualquier variable de confusión. Se parearon en función del subtipo molecular, tamaño tumoral, estado nodal, GH, porcentaje de expresión de Ki 67, expresión de RH y sobreexpresión de HER2.

En el análisis inicial con Affimetrix se incluyeron un total de 33 pacientes con cáncer de mama: 21 mujeres diagnosticadas antes de los 35 años, y 12 pacientes con cáncer de mama mayores de 65 años de edad. También se recogieron muestras de tejido de tres mujeres jóvenes sin patología mamaria que se sometieron a cirugía de reducción mamaria, para emplearlas como control.



El estudio mediante la plataforma PAM50 se realizó en 31 muestras tumorales de pacientes jóvenes ( $\leq 35$  años) y en 18 de mujeres mayores de 45 años postmenopáusicas (dado que el resto de muestras fallaron por problemas técnicos). De estas 49 muestras, 33 fueron las utilizadas también en Affimetrix.

El estudio fue aprobado por el comité ético del hospital, y cuenta con el consentimiento firmado de todas las participantes (documento del Biobanco que permite el uso para investigación del material tumoral sobrante del diagnóstico).

<b>VARIABLE CLÍNICA</b>	<b>DEFINICIÓN</b>
<b>NOMBRE COMPLETO</b>	Tal y como consta en los datos administrativos recogidos en la Historia Clínica
<b>NÚMERO DE HISTORIA CLÍNICA</b>	Número de identificación asignado a la paciente en el Hospital
<b>FECHA DE NACIMIENTO</b>	Tal y como consta en los datos administrativos recogidos en la Historia Clínica
<b>FECHA DE DIAGNÓSTICO</b>	Fecha del resultado anatomopatológico que confirma el diagnóstico
<b>EDAD AL DIAGNÓSTICO</b>	Obtenida de la fecha de nacimiento y de la fecha del diagnóstico <36 años: 1 >50 años: 2
<b>IMC (MEDIDA DE ASOCIACIÓN ENTRE EL PESO Y LA TALLA DE UN INDIVIDUO).</b>	1: <25 2: 25-30 3: > 30 4: Desconocido
<b>BRCA MUTADO</b>	1: Sí 2: No 3: Desconocido
<b>ANTECEDENTES FAMILIARES DE CÁNCER DE MAMA</b>	1: Antecedentes de 1º grado 2: Antecedentes de 2º grado 3: Antecedentes de 1º y 2º grado 4: No antecedentes familiares 5: Desconocido
<b>EDAD DE LA MENARQUIA</b>	1: ≤ 11 años 2: 12-14 años 3: ≥ 15 años 4: Desconocido
<b>EMBARAZOS</b>	1: Sí (la paciente ha estado embarazada al menos una vez) 2: No 3: Desconocido
<b>EDAD DEL PRIMER EMBARAZO</b>	1: < 20 años 2: 20-30 años 3: > 30 años 4: Desconocido

<b>VARIABLE CLÍNICA</b>	<b>DEFINICIÓN</b>
EMBARAZO A TÉRMINO TRAS FINALIZAR EL TRATAMIENTO	1: Sí 2: No 3: Desconocido
LACTANCIA	1: Sí 2: No 3: Desconocido
GESTANTE AL DIAGNÓSTICO	1: Sí 2: No
MUJER LACTANTE AL DIAGNÓSTICO	1: Sí 2: No
ESTADO MENOPAÚSICO	1: Premenopáusica (la mujer mantenía la menstruación en el momento del diagnóstico del cáncer de mama) 2: Postmenopáusica (hacia más de un año que la mujer no tenía la menstruación cuando se diagnosticó el cáncer de mama)
ENFERMEDAD METASTÁTICA AL DIAGNÓSTICO	1: Sí 2: No 3: Desconocido 4: Sí, pero de otro cáncer
RECAIDA DE LA ENFERMEDAD	1: Sí 2: No 3: Desconocido
LUGAR DE RECAIDA	Órgano donde aparece la enfermedad nuevamente 1: Local 2: Hueso 3: Ganglionar 4: Visceral 5: Cerebral
FECHA DE RECAIDA	1: < 1 año tras el diagnóstico inicial 2: 1-5 años tras el diagnóstico 3: > 5 años tras el diagnóstico
FECHA DEL ÚLTIMO CONTROL MÉDICO	Fecha de la última visita al Servicio de Oncología Médica

<b>VARIABLE CLÍNICA</b>	<b>DEFINICIÓN</b>
SITUACIÓN EN EL ÚLTIMO CONTROL	1: Viva 2: Fallecimiento por la enfermedad 3: Fallecimiento por otra causa 4: Pérdida

**Tabla 3.** Descripción de las variables clínicas estudiadas en la población con cáncer de mama.

<b>CARACTERÍSTICA TUMORAL</b>	<b>DEFINICIÓN</b>
TIPO HISTOLÓGICO	1: Ductal 2: Lobulillar 3: Medular 4: Tubular 5: Otros
GH	1: I o bien diferenciado 2: II o moderadamente diferenciado 3: III o pobremente diferenciado 4: Desconocido
T.T. (EN EL CASO DE TUMORES MULTICÉNTRICOS O MULTIFOCALES SE HA CONSIDERADO EL DE MAYOR TAMAÑO)	1: < 2 cm 2: 2 -5 cm 3: >5 cm 4: Desconocido
GANGLIOS AXILARES AFECTOS	1: Sí 2: No 3: Dato desconocido 4: No cirugía axilar
NÚMERO DE GANGLIOS AXILARES AISLADOS	Tal y como consta en el informe de Anatomía Patológica
NÚMERO DE GANGLIOS AXILARES AFECTOS	Tal y como consta en el informe de Anatomía Patológica

CARACTERÍSTICA TUMORAL	DEFINICIÓN
PERFIL INMUNO-HISTOQUÍMICO	1: Luminal A 2: Luminal B 3: Luminal (Ki 67 no especificado) 4: HER 2 5: Luminal/HER2 6: Triple negativo 7: Desconocido
RECEPTORES ESTROGÉNICOS	1: Positivo 2: Negativo 3: Desconocido
RECEPTORES DE PROGESTERONA	1: positivo 2: negativo 3: desconocido
HER2	1: Positivo 2: Negativo 3: Indeterminado(++/+++, FISH/SISH no realizado) o desconocido
KI 67	1: < 14% 2: 14-30% 3: > 30% 4: Desconocido
ERB4	1: Positivo 2: Negativo 3: Desconocido
RESPUESTA COMPLETA TRAS LA NEOADYUVANCIA	1: Sí 2: No
SUBTIPO INTRÍNSECO BASADO EN PAM50	1: Luminal A 2: Luminal B 3: Normal 4: Basal 5: HER2 6: PAM50 no realizado

**Tabla 4.** Descripción de las variables anatomopatológicas estudiadas en el tumor de las pacientes con cáncer de mama. GH: Grado histológico (se codifica siguiendo los criterios de Scarff-Bloom Richardson). T.T: Tamaño tumoral.

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>DEFINICIÓN</b>
TIPO DE CIRUGIA MAMARIA Y AXILAR REALIZADA	1: Mastectomía radical modificada con vaciamiento axilar 2: Mastectomía radical modificada con BSGC 3: Tumorectomía con vaciamiento axilar 4: Tumorectomía con BSGC 5: Desconocido 6: No cirugía mamaria
TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO NEOADYUVANTE	1: Sí 2: No 3: Desconocido
TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO ADYUVANTE	1: Sí 2: No 3: Desconocido
ESQUEMA DE QUIMIOTERAPIA NEO/ADYUVANTE	1: Tratamiento dentro de un ensayo clínico 2: Quimioterapia basada en taxanos y antraciclinas 3: Quimioterapia con antraciclinas, sin taxanos 4: Quimioterapia con taxanos, sin antraciclinas 5: No quimioterapia
TRATAMIENTO HORMONAL ADYUVANTE	1: Sí 2: No 3: Desconocido
FARMACO HORMONAL UTILIZADO	1: Tamoxifeno 2: Tamoxifeno más análogos de LH-RH 3: Inhibidor de aromataasa 4: Desconocido

**Tabla 5.** Descripción de las variables de tratamiento recibido en las pacientes estudiadas. BSGC: Biopsia selectiva del ganglio centinela.

## **IV. 2. TIPOS DE MUESTRAS UTILIZADAS (PARAFINADAS)**

Todas las muestras de tejido utilizadas en la realización de esta tesis fueron recogidas de pacientes con cáncer de mama jóvenes ( $\leq 35$  años) y de pacientes mayores postmenopáusicas tras la cirugía del cáncer de mama o tras la biopsia con aguja gruesa (BAG) diagnóstica. Una de las condiciones iniciales fue que las muestras estudiadas serían de pacientes que no habían recibido ningún tratamiento para su cáncer de mama previamente.

Todas las muestras de tejido fueron incluidas en FFPE (tejido embebido en parafina fijado con formalina), eligiéndose un bloque de tejido con tumor y parénquima mamario normal que sirve de control interno.

Las secciones de parafina, de tres micras de espesor, se desparafinaron en estufa a 37°C, durante toda la noche.

La recuperación antigénica se realizó con tampón citrato, ajustando el Ph, y PTLINK de DAKO a 95°C durante 20 minutos.

Se utilizó para la tinción hematoxilina y eosina (H&E) con el fin de obtener un control histológico de todas las muestras.

Todas las muestras de tejido contenían material tumoral por encima del 30 %.

Los tumores fueron clasificados como triple negativo, HER2, Luminal B o Luminal A basándonos en la expresión de los marcadores inmunohistoquímicos (RE, RP, HER2, y Ki 67), siguiendo los criterios adoptados en el 12th St Gallen International Breast Cancer Conference, 2011.

- Receptores de estrógeno y progesterona

La tinción del anticuerpo es nuclear y se valora tanto la intensidad de la tinción como la proporción de núcleos tumorales teñidos:

Intensidad 0: No hay tinción

1: Tinción débil

2: Tinción moderada

3: Tinción intensa

Proporción 0: No hay tinción

1: <1% de núcleos teñidos

2: 1-10% de núcleos teñidos

3: 11-33% de núcleos teñidos

4: 34-66% de núcleos teñidos

5: 67-100% de núcleos teñidos



Un tumor se clasificó como positivo para receptores de estrógeno y progesterona cuando más del 1 % de los núcleos celulares del tumor expresaban el antígeno.

- Ki 67

La tinción del anticuerpo es nuclear. Se valora calculando el porcentaje de núcleos tumorales teñidos.

- HER2/erbB2

Para su determinación se utilizó el Herceptest, y en el caso de que este fuera indeterminado (++/+++) se realizaba la Hibridación In Situ con inmunofluorescencia (FISH) o la Hibridación In Situ con plata (SISH). HER-2 se consideró positivo con 3+ en el Herceptest® o cuando estaba amplificado con FISH/SISH.

*Herceptest:* Esta determinación se realizó en tejido fijado en formaldehído tamponado al 10%, eligiéndose un bloque de tejido con tumor infiltrante. La recuperación antigénica se realizó en baño a 96/99 grados. Se utilizó el anticuerpo policlonal de Pharma DX (Dako Corp) clon A0485. Se valoró la tinción membranosa de las células tumorales:

-3+: Tinción completa de membrana, intensa y uniforme > del 30% de las células infiltrantes tumorales.

-2+: Tinción completa de membrana, débil o no uniforme en al menos 10% de las células infiltrantes tumorales

-0/1+: Ausencia de tinción o tinción débil de membrana incompleta.

*FISH*: Determina si existe amplificación del HER2 neu en el cromosoma 17. La sonda utilizada es HER2 FISH PharmaDX™. *SISH* determina también la amplificación del HER2, mediante la sonda HER2 DNA Probe (Roche-Ventana).

- HER4/erbB4.

Para la tinción inmunohistoquímica (IHC), el tejido fue desparafinado mediante lavados sucesivos con xilol y posteriormente rehidratado mediante lavados consecutivos en un gradiente de concentraciones decrecientes de etanol: etanol absoluto, etanol al 95%, 80% y por último al 70%, se finalizó con un lavado con agua destilada.

Para el desenmascaramiento antigénico las muestras fueron sumergidas en tampón de desenmascaramiento y sometidas a presión mediante autoclave o incubadas en un baño a altas temperaturas, según el caso. Tras esto, las muestras fueron enfriadas a temperatura ambiente y se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena mediante incubación con peróxido de hidrógeno al 3% con azida sódica (NaN<sub>3</sub>) a 15 mM durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras un lavado concienzudo con tampón salino Tris 1X (TBS), las secciones de tejido fueron incubadas con el anticuerpo primario durante 1 hora o 30 minutos, según el caso, tras lo cual, se volvieron a lavar con TBS 1X y se incubaron con el anticuerpo secundario por 30 minutos (EnVision™ FLEX anti rabbit, Dako,

Glostrup, Denmark). Para la tinción se empleó el cromógeno Diaminobenzidina (DAB) al 5% (Dako, Glostrup, Denmark) además de hematoxilina ácida para contrastar. Una vez revelada la tinción, se deshidrató la muestra mediante lavados sucesivos en xilol tras etanol en concentración creciente (70%, 80% y 95%) hasta etanol absoluto, una vez deshidratada la muestra, se añadió al portaobjetos medio de montaje Entellan® y se aisló con un cubreobjetos.

Las secciones fueron examinadas mediante microscopía y la intensidad de la tinción fue calificada mediante un patólogo en una escala relativa (como en el caso de ErbB2) incluyéndose la localización de la tinción (membrana, citoplasmática o nuclear).

Para la tinción de HER4 se empleó el anticuerpo monoclonal Anti-ERBB4/HER4 (phospho-Tyr1162, clone EP2270Y) (LifeSpan Bioscience, Inc, Seattle, WA) (en base a la literatura consultada, dado que es un receptor estudiado en investigación) a una concentración 1:100 respecto a la proporcionada por el fabricante y se incubó con el anticuerpo secundario EnVision™ FLEX anti rabbit, (Dako, Glostrup, Denmark).

## **IV. 3. ASIGNACIÓN DE EVENTOS**

### **IV. 3. 1. Diagnóstico**

La información sobre la fecha del diagnóstico, la edad de la paciente cuando ocurre el mismo y todos los datos acerca de las

características tumorales (tamaño, ganglios extirpados, etc) se extraen de la historia clínica del paciente.

#### **IV. 3. 2. Recaída**

La recaída de la enfermedad se constata según los datos de la historia clínica. Donde debe figurar si se realizó nueva biopsia para confirmar anatomopatológicamente dicha recaída, el lugar y la fecha de la misma.

#### **IV. 3. 3. Mortalidad**

La información sobre la causa de la muerte fue extraída también de la historia clínica del paciente. Una vez identificada la causa de la muerte se estableció si el fallecimiento había ocurrido como consecuencia de la enfermedad o por otra causa distinta del cáncer de mama.

Las muertes fueron consideradas de causa no tumoral cuando una causa específica no tumoral fue identificada como el principal desencadenante del evento. En el resto de casos, incluidos los casos de fallecimiento secundarios a toxicidades del tratamiento administrado contra el cáncer, se consideró la etiología tumoral.

En las pacientes que fallecieron fuera del ámbito hospitalario, en los que la información sobre las circunstancias de la muerte fue proporcionada por miembros de la familia o por la revisión de los historiales, se asumió que si las pacientes se encontraban en situación de control de síntomas únicamente, que la causa de la muerte había sido tumoral.

## **IV. 4. ANÁLISIS GENÓMICO**

### **IV. 4. 1. Aislamiento de RNA a partir de tejido incluido en parafina**

Para la extracción de RNA total del tejido fijado en formaldehído e incluido en parafina, de las muestras tumorales de mujeres jóvenes y mayores, se partió de 4 secciones de 20  $\mu\text{m}$ , realizadas en microtomo a temperatura ambiente y recogidas en un microtubo de 1,5 ml, empleándose el kit comercial RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit de Ambion® (Applied Biosystems™ by Life Technologies™, Carlsbad, California, EE.UU.).

Resumiendo el proceso, a cada tubo de 1,5 ml que contiene las secciones de tejido se le añadieron 1000  $\mu\text{l}$  de xilol 100%, agitándose vigorosamente y dejándose la mezcla durante 3 minutos a 50°C. A continuación se centrifugó la mezcla durante 3 minutos a 10.000 g y se eliminó el xilol. Se repitió este paso con xilol para conseguir desparafinar mejor la muestra. Seguidamente, se realizaron 2 lavados de la muestra con etanol 100%, lo que permitió eliminar los restos de xilol y acelerar el secado de la muestra, que se dejó secar al aire durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de tampón de digestión y 4  $\mu\text{l}$  de proteasa, suministrados en el kit, incubándose la mezcla a 50°C durante una hora y, posteriormente, durante 15 minutos a 80°C. En este momento, se añadieron a cada muestra 240  $\mu\text{l}$  de la solución del kit Isolation Additive y 500  $\mu\text{l}$  de etanol 100%. La mezcla se pasó por columna, mediante centrifugación durante 30 segundos a 10.000

g. Seguidamente se realizó un lavado con 700  $\mu\text{l}$  de la solución de lavado 1 y otros dos lavados de 500  $\mu\text{l}$  con la solución de lavado 2/3 suministradas en el kit. Tras los lavados, se añadieron 60  $\mu\text{l}$  de la mezcla de DNasa en el centro del filtro de la columna y se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos. De nuevo, se realizó un lavado con 700  $\mu\text{l}$  de la solución de lavado 1 y otros dos lavados de 500  $\mu\text{l}$  con la solución de lavado 2/3 suministradas en el kit. Finalmente, se eluyó el RNA total (que incluía miRNAs) con 70  $\mu\text{l}$  (2 x 35  $\mu\text{l}$ ) de agua libre de RNasa, almacenándose el RNA extraído a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su conservación tras alicuotar 2  $\mu\text{l}$  para la medida de concentración.

#### **IV. 4. 2. Determinación de la concentración e integridad del RNA**

Para medir la concentración del RNA extraído, se cuantificó por espectrofotometría de absorción UV-Vis empleando el equipo Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington DE, USA). Con tan solo 1  $\mu\text{l}$  de RNA, este equipo determina la concentración y la pureza de la muestra. La concentración se determina a partir de la absorbancia a 260 nm, de acuerdo a la Ley de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon \cdot I \cdot c$$

Siendo: A = absorbancia

$\epsilon$  = coeficiente de extinción molar [para ssRNA a 260 nm,

$\epsilon = 0,025(\mu\text{g/ml}) \cdot 1\text{cm}^{-1}$ ]

I = distancia en cm

c = concentración molar

La pureza de la muestra se determina en base a la relación de absorbancias 260/280 y 260/230, que deben ser próxima a 2 para RNA puro y menor que X para asegurar que no quedan restos de reactivos empleados en la extracción, respectivamente.

La calidad y concentración del RNA total extraído se determinó con el RNA 6000 LabChip® junto con el 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

La integridad del RNA total se estudió empleando el equipo Agilent 2100 Bioanalyzer y el LabChip® Agilent RNA 6000 Nano Assay (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, EE.UU.). Esta tecnología se basa en la electroforesis capilar y este ensayo permite analizar muestras de RNA total de concentración entre 25 y 500 ng/μl, empleando 1 μl de muestra. El resultado del análisis se puede visualizar como una electroforesis convencional, en la que se observan los fragmentos de RNA separados por tamaño, además de proporcionar perfiles o electroferogramas de cada una de las muestras. Esta tecnología aplica un algoritmo complejo que determina automáticamente un valor de RIN (RNA Integrity Number), con valores entre 1 y 10, para cada una de las muestras analizadas. El RIN considera todo el perfil electroforético, incluyendo presencia y ausencia de productos de degradación, resultando una medida de la integridad del RNA fiable. El valor de RIN es muy reproducible y nos permite hacer una valoración numérica de la integridad del RNA y establecer comparaciones entre muestras.

Los LabChip® se prepararon siguiendo las instrucciones del fabricante. Los reactivos se dejaron 30 minutos a temperatura ambiente antes de su utilización. El gel se preparó utilizando una columna de 550 µl que se centrifugó a 1500 x g durante 10 min para el filtrado del gel.

Se desnaturalizó 1 µl del marcador de peso molecular (RNA 6000 ladder® Ambion) y 1 µl RNA de cada una de las muestras a analizar durante 2 min a 70°C y se introdujeron en los pocillos correspondientes. Finalmente el LabChip® se agitó en vórtex durante 1 min a máxima potencia y se introdujo en el Agilent 2100 Bioanalyzer.

El Agilent 2100 Bioanalyzer permitió visualizar los resultados en un ordenador mediante Expert Software v. B.01.02.SI136. El bioanalizador usa fluorescencia entre 670 nm y 700 nm para determinar la calidad e integridad del RNA total. Para cada muestra, el software calculó el cociente del área de los picos de RNA ribosomales (28S/18S), y el resultado se visualizó mediante un electroferograma. El cociente debe encontrarse alrededor de 2 ya que el peso molecular del 28S es el doble al del 18S.

#### **IV. 4. 3. Estudio de la expresión de miRNAs con la plataforma Affymetrix**

Un chip de RNA (del inglés RNA microarray) es una superficie sólida a la cual se une una colección de fragmentos de RNA. Las superficies empleadas para fijar el RNA son muy variables y pueden ser de vidrio, plástico e incluso de silicio. Los



chips de RNA se usan para analizar la expresión diferencial de genes, y se monitorean de manera simultánea los niveles de miles de ellos. Su funcionamiento consiste, básicamente, en medir el nivel de hibridación entre la sonda específica y la molécula diana, que se indica generalmente mediante fluorescencia y a través de un análisis de imagen, lo cual indica el nivel de expresión del gen mediante su RNA mensajero. Del mismo modo y bajo el mismo principio, se puede analizar la cantidad de expresión de miRNAs mediante chips con sondas específicas para los mismos.

En este estudio se empleó el chip de Affymetrix Genechip® miRNA 2.0 (Affymetrix Ltd., Santa Clara, CA, EE.UU.) para medir la expresión de RNA no codificante. Con este fin, se diluyeron todas las muestras de RNA total a una concentración final homogénea, 40ng/μl en un volumen de 10μl. En el ensayo de hibridación se emplearon 8μl, es decir un total de 320ng. Las 37 muestras se marcaron con biotina y se hibridaron durante 18 horas (según el protocolo estándar establecido por el fabricante), cada muestra en un chip GeneChip® miRNA 2.0 Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), que comprende un total de 4553 secuencias de RNA de pequeño tamaño, incluyendo 1105 secuencias de microRNAs.

El conjunto de datos del microarray está disponible en la base de datos pública de GEO (código de acceso GSE48088) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/info/linking.html>. Affimetrix está accesible a través del Servicio de expresión génica de la Unidad

Central de Investigación Médica (UCIM), de la facultad de Medicina, Universidad de Valencia)

#### **IV. 4. 4. Realización de PAM50 [tecnología de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)]**

Para la realización del PAM50 contactamos con el Dr. Aleix Prat Aparicio, del Hospital Universitario Vall d'Hebron, Instituto de Oncología, Grupo de Genómica Traslacional.

La realización del PAM50 requiere una concentración mínima de 40 ng/ul de RNA total, y un mínimo de 200 ng para realizar el análisis). Utiliza la técnica de la PCR cuantitativa en tiempo real. La PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) se trata de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional, en la que se mide, en tiempo real, la cantidad de producto amplificado por cada ciclo de la PCR, obteniendo así una curva de amplificación de la que nos valemos para cuantificar la cantidad inicial de producto.

La técnica de la PCR se desarrolló por primera vez por Mullis et al, 1986, y desde entonces ha sido una de las técnicas básicas en laboratorios de todo el mundo. El objetivo básico de la misma consiste en la amplificación específica de nucleótidos a partir de un molde de DNA. Esta técnica se basa en dos conceptos: la desnaturalización y renaturalización del DNA dependiente de la temperatura, y la resistencia a altas temperaturas de la polimerasa del organismo *Termus aquaticus* (Taq). La Taq polimerasa (como el resto de polimerasas) se encarga de sintetizar una secuencia de

nucleótidos a partir de una hebra molde, actualmente se emplean diversas polimerasas resistentes a altas temperaturas. La PCR consiste en aumentar y disminuir la temperatura alternadamente en ciclos, en los siguientes pasos:

- *Desnaturalización.* La temperatura sube por encima del nivel de desnaturalización del DNA. Ambas hebras del DNA se separan.

- *Hibridación.* La temperatura disminuye a un nivel en el que permite la unión de la Taq polimerasa y de los cebadores a las hebras del DNA desnaturalizadas, que sirven de molde.

- *Elongación:* La temperatura desciende permitiendo la síntesis de DNA de doble cadena por parte de la Taq polimerasa. Una vez sintetizado la Taq polimerasa se suelta de la hebra.

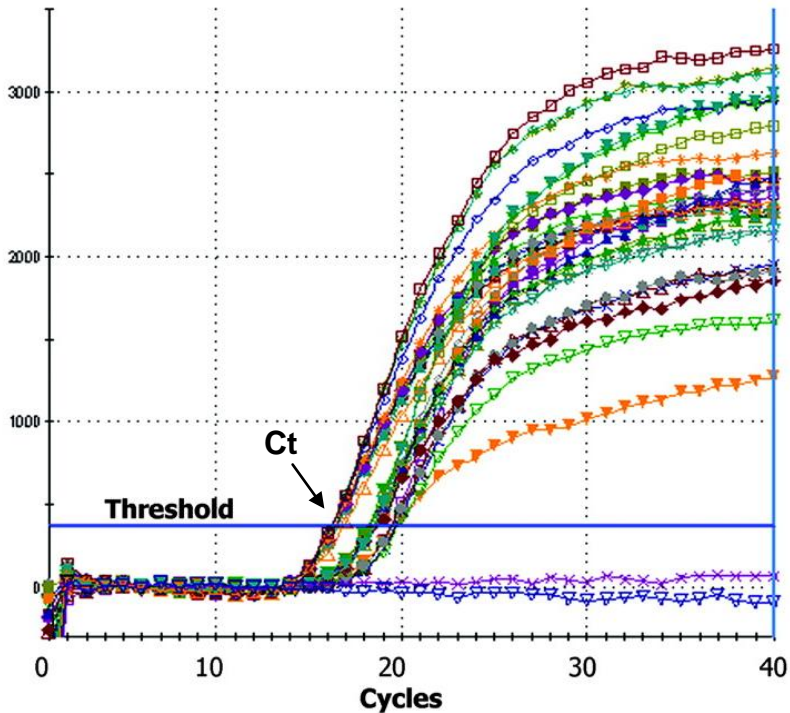
Tras cerrarse un ciclo de temperatura se inicia otro con los mismos pasos, esta vez, además de con la hebra completa de DNA como molde, cuenta con los fragmentos cortos de la secuencia específica de nucleótidos como sustrato, cuya cantidad aumentará de manera exponencial.

La especificidad de secuencia se consigue empleando unos cebadores complementarios a la secuencia nucleotídica problema, que se unen en el paso 2 del ciclo de temperatura y permiten el inicio de la polimerización del DNA por parte de la Taq. Obtenemos como producto final el fragmento de DNA de secuencia

específica amplificado varios órdenes de magnitud, permitiéndonos detectar la presencia de pequeñas cantidades de dicha secuencia.

La qRT-PCR (PCR cuantitativa a tiempo real) es una variación de esta técnica, descrita en primer lugar por Higuchi et al. 1993, en la cual se detecta la cantidad de producto amplificado (amplicón) a tiempo real, es decir, en cada ciclo. Esto se consiguió mediante la incorporación en la reacción de un agente intercalante fluorescente (BrEt), que permitía detectar la cantidad de producto sintetizado a tiempo T, mediante la acumulación de fluorescencia. La cinética de la acumulación de la fluorescencia con cada ciclo depende directamente de la cantidad inicial de DNA, pudiendo extrapolar así dicha cantidad.

En la actualidad se emplean tanto agentes de unión al DNA de doble cadena (como el SYBR Green), como sondas fluorescentes unidas a los cebadores, que sólo emiten fluorescencia al tener lugar la elongación en cada ciclo de la PCR, aumentando así intensidad de fluorescencia al aumentar la cantidad de producto amplificado que es sintetizado. Al detectar únicamente la secuencia amplificada es un método mucho más específico y preciso.



**Figura 6.** Representación de la curva típica obtenida en una RT-PCR. El eje X muestra el ciclo de la reacción de PCR en el que se encuentra y en el eje Y viene dada la intensidad de fluorescencia emitida por el fluorocromo unido a la sonda, directamente relaciona con la cantidad de producto amplificado. La curva en morado muestra el patrón de una muestra negativa y correspondería con una expresión basal, la curva en azul oscuro es el aguna, mientras que el resto de curvas muestran el patrón típico de una muestra amplificada. La curva consta de 3 fases, una fase exponencial, en la que la cantidad de producto aumenta de manera exponencial, hasta que la enzima alcanza su rendimiento máximo y se pasa a la fase lineal, dónde la cinética de la enzima sigue un comportamiento lineal, de modo que se puede calcular su pendiente. La fase de meseta o estacionaria es la última fase, en la que la cantidad de producto llega al nivel de saturación de la enzima y se caracteriza por un aumento lento. El ciclo umbral o Ct es aquel ciclo en el que la curva corta con un nivel de intensidad llamado umbral, que marca un límite por encima del cual una muestra se considera significativamente positiva.

Remitimos para el análisis genético mediante PAM50 51 muestras. Pero en 2 de ellas hubo un fallo técnico (bien por la cantidad de RNA remitido o por un fallo durante el proceso). Finalmente se realizó el estudio en 31 muestras tumorales de pacientes jóvenes ( $\leq 35$  años) y en 18 de mujeres mayores de 45 años postmenopáusicas.

## **IV. 5. PROCESAMIENTO DE LOS DATOS Y ANÁLISIS**

### **IV. 5. 1. Análisis de los datos clínicos**

La información clínica recogida se registró en una base de datos diseñada con el programa Excell y todos los análisis se llevaron a cabo con el programa SPSS para Windows (versión 17.0). Para los análisis de supervivencia se utilizó el programa GraphPad Prism. GraphPad Prism, es otra herramienta online que combina estadística, organización de datos y métodos de regresión lineal. Permite realizar comparaciones no paramétricas, análisis de supervivencia, etc. ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

#### -Introducción y validación de los datos

Tras la introducción de los datos se detectaron incongruencias o ausencias de información o valores incorrectos. Para subsanar estos errores se revisó nuevamente la hoja de recogida de datos y en algún caso los datos originales.

#### **IV. 5. 2. Análisis de los datos generados por Affymetrix**

Los datos pasaron los controles de calidad implementados en el software, (Affymetrix, Santa Clara, CA, EE.UU.). Todos los datos se normalizaron por DABG – RMA. Se seleccionaron los 1.100 miARNs humanos, y se estableció como umbral para una baja expresión el valor de intensidad común más alto obtenido en miARN de organismos vegetales (que se supone no expresan los humanos) incluidos en el microarray. Después de filtrar los datos, con el fin de determinar las diferencias en el patrón de expresión entre los tumores de los pacientes jóvenes con cáncer de mama y de las mayores, llevamos a cabo un análisis de expresión diferencial con la herramienta online POMELO II (<http://asterias.bioinfo.cnio.es>). Se realizó un t-test con 20000 permutaciones. Los resultados estadísticos se corrigieron por múltiples comparaciones mediante FDR (tasa de falso positivo de Benjamini y Hochberg). Los miARNs con un FDR p-valor < 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

#### **IV. 5. 3. Análisis de los datos genómicos generados por PAM50**

Se recibieron los valores crudos de la Plataforma Molecular PAM50, posteriormente se realizó el cálculo del logaritmo en base 2 de todos los valores. Al mismo tiempo se hizo la media de los 5 genes housekeeping o endógenos, que son ACTB, MRPL19, PSMC4, RPLO y SF3A1. A continuación, a cada muestra se le restó el valor de la media correspondiente (en todos los genes). Después de filtrar los datos, con el fin de determinar las diferencias en el

patrón genético de expresión entre los tumores de las pacientes muy jóvenes y de las mayores, llevamos a cabo un análisis de expresión diferencial con la herramienta online POMELO II. Se realizó un t-test con 20000 permutaciones. Los resultados estadísticos se corrigieron por múltiples comparaciones mediante FDR. Los genes con un p-valor  $< 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos. Se utilizó posteriormente, el software informático Gene Cluster y Treeview software (<http://www.eisenlab.org/eisen/>) con la intención de agrupar todos los datos obtenidos en función de las muestras tumorales estudiadas. Para el análisis de enriquecimiento de rutas usamos la herramienta DIANA, pudiendo profundizar en las redes moleculares globales y las rutas relacionadas con los genes obtenidos (<http://83.212.96.7/DianaToolsNew/index.php?r>). El algoritmo realiza un análisis de todos los genes diana y sus rutas. Se consideraron significativamente enriquecidas las rutas que muestran un FDR p-valor  $< 0,05$ . Se realizaron, asimismo, búsquedas de genes candidatos mediante Target scan (<http://www.targetscan.org/>) y la bibliografía publicada.

#### **IV. 5. 4. Herramientas online y bases de datos empleados**

Para el análisis bioinformático se han utilizado las siguientes herramientas online: BioCarta, Gene Ontology (GO) y Reactome.

BioCarta fue fundada en abril de 2000 para convertirse en el principal desarrollador, proveedor y distribuidor de reactivos y ensayos para la investigación biofarmacéutica y académica. La



proteómica es un nuevo campo prometedor que comprende el estudio de la expresión de la proteína y su función. Un número creciente de empresas e instituciones entienden la proteómica como un medio de mejorar la información genómica o como una vía alternativa de investigación en Ciencias básicas y en el descubrimiento de nuevos fármacos. Trazando un mapa completo de cómo las proteínas actúan en el organismo humano proporciona una comprensión general de los patrones de expresión. La proteómica funcional determina con precisión la función de las proteínas tanto en estados normales como en estados patológicos. Debido a estos avances en la investigación genómica y proteómica, Biocarta ha experimentado un crecimiento exponencial en los últimos años, aspirando a ser el líder en el desarrollo y comercialización de nuevas tecnologías para la proteómica funcional mediante la creación de una organización internacional orientada a la identificación, adquisición y comercialización de productos novedosos. Por otra parte, el sitio web BioCarta sirve como un recurso basado en la web interactiva para los científicos. Una herramienta de comunicación del estado de los datos. En términos generales, esta información se divide en cuatro categorías: la función de genes, vías proteómicas, ePosters y reactivos de investigación. Al mismo tiempo, ofrece un foro BioCarta fácil y dinámico para el intercambio de información y la colaboración entre investigadores, educadores y estudiantes. [www.biocarta.com](http://www.biocarta.com)

El proyecto de Gene Ontology (GO) es un esfuerzo de colaboración para hacer frente a la necesidad de descripciones

coherentes de los genes a través de bases de datos. Fundado en 1998, el proyecto comenzó como una colaboración entre tres bases de datos: FlyBase (*Drosophila*), la base de datos del genoma *Saccharomyces* (SGD) y la base de datos del genoma del ratón (MGD). El Consorcio GO (GOC) ha crecido desde entonces para incorporar muchas bases de datos, entre ellas varias de las principales del mundo para plantas, animales, y de los genomas microbianos. El proyecto GO ha desarrollado tres ontologías estructuradas que describen los productos genéticos en términos de sus procesos biológicos asociados, componentes celulares y funciones moleculares. El uso de GO, que unifica distintas bases de datos, facilita las consultas de los investigadores, por ejemplo, los usuarios pueden consultar GO para encontrar todos los productos de los genes en el genoma humano que están implicados en la transducción de señales. <http://geneontology.org/>

Por último, Reactome es una base de datos abierta, cuyo objetivo es proporcionar herramientas bioinformáticas intuitivas para la visualización, interpretación y análisis de las vías genéticas para apoyar la investigación básica, el análisis del genoma, el modelado y la biología de sistemas. Tiene su sede en el Instituto de Ontario para la Investigación del Cáncer (OICR), New York University Medical Centre (NYUMC) y el Instituto Europeo de Bioinformática (EBI). <http://www.reactome.org/pages/about/>

#### **IV. 5. 5. Representación gráfica**

En la representación gráfica de las variables hemos utilizado tres tipos de gráficos: histogramas, diagrama de sectores y diagramas polares.

Un histograma es una representación gráfica de una variable en forma de barras, donde la superficie de cada barra es proporcional a la frecuencia de los valores representados. Ofrece una visión en grupo, permitiendo observar una tendencia de la población por ubicarse hacia una determinada región de valores posibles. En el eje vertical se representan las frecuencias, es decir el porcentaje de población que se ubica en un determinado valor o sub-rango de valores.

El gráfico o diagrama de sectores está formado por un círculo dividido en sectores circulares, de forma que los ángulos de cada sector sean proporcionales a la frecuencia del resultado representado, siendo más ancho cuanto más grande sea el porcentaje de esa categoría.

Un Diagrama polar es una variante de los gráficos de sectores en donde se representa la frecuencia del resultado proporcional a su tamaño. Tiene la ventaja de que puede utilizarse para representar características diferenciales entre dos poblaciones usando círculos concéntricos.

## **IV. 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

### **IV. 6. 1. Tamaño muestral**

Basándonos en la bibliografía publicada previamente acerca de mujeres jóvenes con cáncer de mama, dado que la frecuencia es baja (depende de series, alrededor del 4%) se decidió estudiar todas las pacientes valoradas en nuestro Servicio desde el año 1998 al año 2014.

Revisando la bibliografía de los artículos publicados en mujeres jóvenes, las series de pacientes menores de 40 años varían entre 57 pacientes estudiadas (192), 94 (193), y en la mayor encontrada, el estudio se realiza en 276 mujeres (194). Los estudios que se centran en las pacientes  $\leq$  de 35 años son escasos y los que más pacientes estudian son de procedencia asiática con 551 pacientes y 256 pacientes jóvenes estudiadas (195, 196).

En nuestra investigación contamos con los datos de 258 pacientes  $\leq$  35 años.

### **IV. 6. 2. Metodología estadística**

El análisis que se ha llevado a cabo contempla un:

6.2. a. Análisis descriptivo del conjunto de pacientes identificadas.

Para las variables cualitativas se han descrito frecuencias y para las cuantitativas los estimadores de tendencia central y de dispersión habituales (media, desviación típica y tamaño).

6.2. b. Análisis bivariante para examinar la relación entre dos variables categóricas

La prueba de independencia se ha realizado con el test chi-cuadrado de K.A. Pearson, que contrasta la hipótesis de que las variables son independientes, frente a la hipótesis alternativa de que una variable se distribuye de modo diferente para diversos niveles de la otra. Se ha tenido en cuenta que, para que se pueda considerar correcta la significación calculada por el estadístico chi-cuadrado de Pearson, se debe cumplir que las frecuencias esperadas no sean inferiores a 5.

Los análisis estadísticos que han sido implementados en esta tesis se han realizado mediante el programa informático SPSS software package, versión 17.0 (IBM) y mediante las herramientas online POMELO y GraphPad Prism. En todos los análisis referidos, se tomó como un dato estadísticamente significativo aquel con un valor de p-valor menor de 0.05.



## **Resultados**

---





## V. RESULTADOS

Un gran número de estudios han explorado en los últimos años si el diagnóstico de cáncer de mama por debajo de los 40 años podría ser un factor independiente asociado a un mayor riesgo de recidiva y muerte. En distintas series se ha descrito que estas mujeres presentan características tumorales más agresivas y peor pronóstico con menor SLP y menor supervivencia global (SG), pero pocos son los autores que han estudiado si la biología tumoral de las pacientes jóvenes es diferente de las pacientes de mayor edad.

Teniendo en cuenta que en los últimos años estamos evidenciando un incremento del cáncer de mama en estas mujeres jóvenes, el primer objetivo de esta tesis es determinar si el cáncer de mama de pacientes muy jóvenes ( $\leq$  de 35 años) es biológicamente distinto del cáncer de mama de mujeres postmenopáusicas, con vías oncogénicas específicas activadas que puedan en un futuro servir para el desarrollo de terapias dianas (105, 197-201).

Durante los años 1998 al 2014, 258 pacientes diagnosticadas en nuestro hospital de un cáncer de mama tenían 35 años o menos. De estas pacientes, 12 tenían  $\leq$  25 años (4.7%), 60 se encontraban entre los 26 y los 30 años (23,2%) y 186 pacientes se diagnosticaron entre los 31 y los 35 años (72,1%). De las 101 pacientes mayores postmenopáusicas estudiadas, 6 tenían entre 46 y 50 años (5.5%), 55 presentaban una edad comprendida entre los 50 y los 65 años

(54.4%), y 40 eran mayores de 65 años (39,6%). En todas ellas estudiamos sus características clínicas, tumorales y mortalidad y las comparamos entre grupos de edad ( $\leq 35$  años y  $> 45$  años).

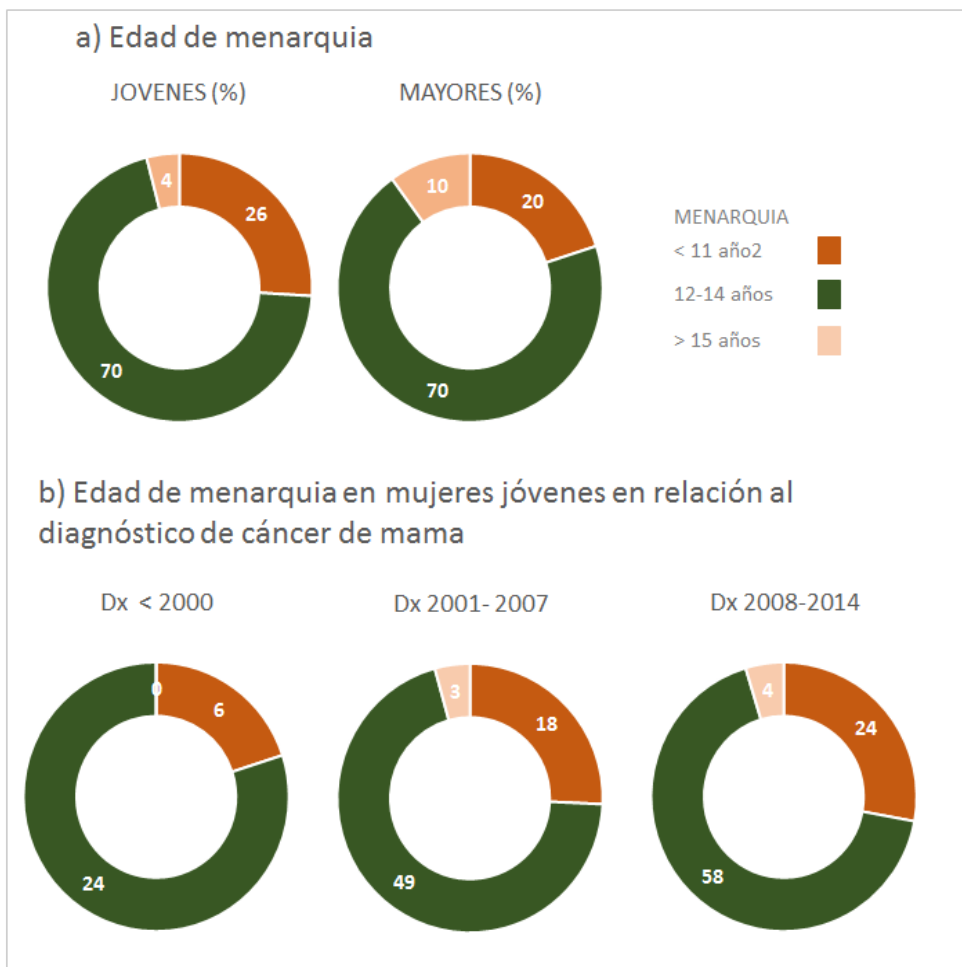
## **V. 1. FACTORES DE RIESGO DE CÁNCER DE MAMA EN MUJERES MUY JÓVENES ( $\leq 35$ AÑOS)**

### **V. 1. 1. Edad de menarquía**

De nuestro total de mujeres jóvenes conocíamos los datos de menarquía de 186 de ellas y de 69 de las mujeres mayores. En ambos grupos un 70% de las pacientes tienen la menarquía entre los 12 y los 14 años (131 jóvenes y 48 mayores).

De las mujeres jóvenes, 48 (26%) tuvieron la menarquía con menos de 11 años, en contraposición a 14 (20%) mayores. Sólo 7 jóvenes (4%) tuvieron la menstruación con 15 años o más, mientras que 7 mayores (10%) la tuvieron a esta edad. (Los datos se representan en la Figura 7).

Con la intención estudiar la relación entre la menarquía de las pacientes jóvenes y la fecha de diagnóstico de su cáncer de mama, se realizó el contraste estadístico Chi-cuadrado ( $p=0.663$ ), aunque como vemos no es significativo. Pero observamos que las pacientes jóvenes diagnosticadas antes del año 2000 un 20% tenían la menarquía a edades menores de 11 años y en los últimos 7 años este porcentaje ha aumentado hasta un 28%.



**Figura 7.** Representación del porcentaje de la distribución de la edad de menarquia en pacientes de cáncer de mama mediante diagramas polares a) Se representa la edad de menarquia en mujeres jóvenes y mayores b). Representación de la edad de menarquia en mujeres jóvenes en función de la fecha del diagnóstico. Dx: Año de diagnóstico del cáncer de mama.

### **V. 1. 2. Embarazo**

Al estudiar cuantas de nuestras pacientes habían tenido un embarazo a término obtuvimos los siguientes resultados:

De las pacientes jóvenes poseíamos ese dato de 199, de ellas, 108 (54.3%) habían tenido al menos un embarazo a término y 91 (46%) pacientes no.

En el caso de las pacientes mayores, de las 69 que teníamos el dato 63 (91.3%) habían tenido al menos un hijo y 6 (9%) pacientes ninguno.

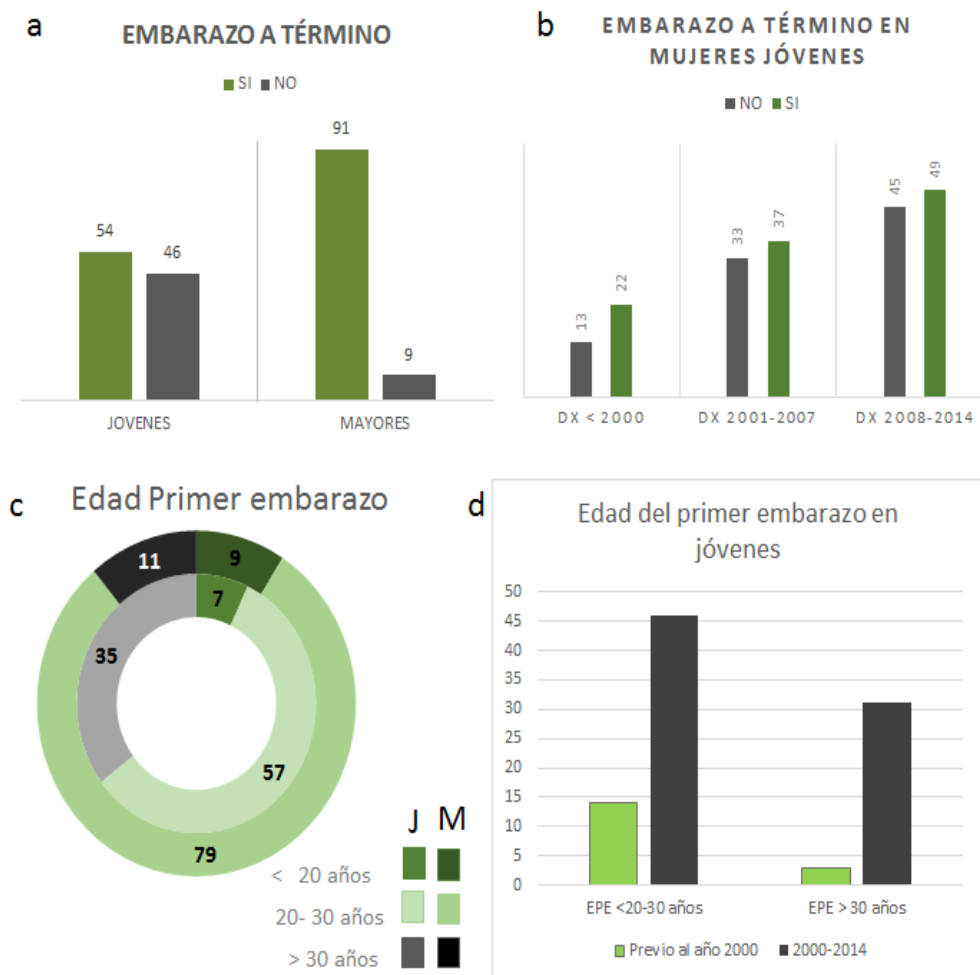
Posteriormente quisimos estudiar si existía algún cambio en las pacientes jóvenes con respecto al embarazo en los últimos años y observamos que previo al año 2000 de las pacientes jóvenes diagnosticadas menores de 35 años, un 68% habían tenido, al menos, un embarazo a término. En los últimos 14 años ese porcentaje disminuye hasta el 52% (el valor de  $p$  es de 0.530), aunque no es significativo puede verse un cambio de tendencia.

### **V. 1. 3. Edad del primer embarazo**

En nuestra serie, de las 108 mujeres jóvenes que habían tenido hijos, la edad del primer embarazo era conocida en 94. Y en las 63 pacientes mayores que habían estado embarazadas. A una edad menor de 20 años, 7 pacientes jóvenes tuvieron hijos (7.4%) y 6 mayores (9.5%). Entre los 20 y los 30 años 54 jóvenes habían tenido su primer hijo (57%), y 50 mayores (79%). Por encima de los 30 años, 33 pacientes jóvenes tuvieron su primer embarazo (35%), y 7 mayores (11%).

Posteriormente, se decidió estudiar si en los últimos años, en el caso de las mujeres jóvenes existe un aumento en la edad del primer embarazo. Un 88% de las mujeres jóvenes diagnosticadas antes del año 2000 que habían sido madres lo fueron antes de los 30 años (un 12% después). Del 2000 al 2007 este porcentaje baja a un 68% (un 32% después de los 30 años). Y en los últimos 7 años el porcentaje es de un 54% (un 46% mayores de 30 años). Las diferencias no son estadísticamente significativas y existen 5 casillas con una frecuencia menor a 5, por lo que se realiza de nuevo la estadística dividiendo la edad del primer embarazo a antes de los 30 años y después.

Aunque en este caso las diferencias no sean tampoco estadísticamente significativas ( $p = 0.79$ ) vemos que en los últimos 14 años existe un cambio de tendencia a tener hijos a edades más mayores. Previo al año 2000 sólo un 17,6% tenían un primer embarazo después de los 30 años, y a partir del año 2000 esta cifra pasa a ser de un 40,3%.



**Figura 8.** Representación de la distribución del factor de riesgo gestación en pacientes de cáncer de mama de la población de estudio. a) Porcentaje de pacientes mayores y jóvenes que han tenido al menos un embarazo a término. b) Relación entre la fecha del diagnóstico de cáncer de mama y la gestación en mujeres jóvenes. c) Relación porcentual entre la edad del primer embarazo en mujeres jóvenes (circulo interior) y mayores (circulo exterior) con cáncer de mama. d) Número de mujeres con un embarazo a edades menores y mayores de 30 años en función de la fecha de diagnóstico de cáncer de mama.

#### **V. 1. 4. Lactancia materna**

De las 108 pacientes jóvenes de nuestra serie que habían tenido hijos en 82 de ellas conocíamos el dato de lactancia, y en 63 de las pacientes mayores. En el caso de las jóvenes 59 (72%) habían dado lactancia a sus hijos, y 31(49%) de las mayores (Fig. 9b).

#### **V. 1. 5. IMC**

De la serie de pacientes jóvenes se conocía el dato del IMC en 116 pacientes, de ellas un 3 % (3 pacientes) presentan obesidad. Un 23% (27 pacientes) sobrepeso y un 74% (86) normopeso. En las pacientes mayores un 5% son obesas, un 47% presentan sobrepeso y un 47% normopeso (Fig 9a).

#### **V. 1. 6. Historia familiar y mutaciones en BRCA**

De las 258 pacientes jóvenes, poseemos información sobre los antecedentes familiares en 212 de ellas. Y en 71 de las pacientes mayores (Fig 9c).

De las 212 mujeres jóvenes, 22 (10.4%) tenían antecedentes familiares de primer grado (madre, hermana, hija), 33 antecedentes de 2º grado (15.5%) y 15 (7%) de 1º y 2º grado. 142 pacientes (67%) no tenían ningún antecedente.

De las 71 pacientes mayores, 4 tenían antecedentes de 1º grado (5.6%), 7 de 2º grado (10%), 3 de 1º y 2º grado (4.2%) y 57 de ellas no tenían ningún antecedente (80%).

Se estudió la mutación BRCA en 92 jóvenes, encontrándose mutación en los genes BRCA en 31 de ellas (34%). Se estudió la mutación en 8 pacientes mayores que cumplían los criterios para el estudio, y no se encontró alteraciones en los genes BRCA en ninguna de ellas (Fig 9d).



**Figura 9.** Representación de la distribución de los factores de riesgo asociados a cáncer de mama según el grupo de edad. a, Porcentaje según el índice de masa corporal. b, Porcentaje de los patrones de lactancia materna entre mujeres jóvenes (círculo interior) y mayores (círculo exterior). c, Comparación porcentual en términos de antecedentes familiares entre mujeres jóvenes y mayores d, Porcentaje de mutaciones en BRCA en cada subgrupo (jóvenes círculo interior y mayores exterior).



	<b>JÓVENES</b>	<b>MAYORES</b>
<b>Menarquia</b>	N= 186	N= 69
≤ 11 años	26 %(N= 48)	20 %(N =14)
12-14 años	70 %(N= 131)	70 % (N =48)
≥ 15 años	4 %(N= 7)	10 %(N= 7)
<b>IMC</b>	N=116	N=19
< 25	74 % ( N=86)	47 %(N=9)
25-30	23 %(N= 27)	47 %(N= 9)
> 30	3 %(N=3)	5 %(N=1)
<b>Embarazo</b>	N= 199	N= 69
Sí	54.3 %(N=108)	91.3 % (N=63)
No	46 %(N =91)	9 %( N=6)
<b>Edad primer embarazo</b>	N= 94	N=63
< 20 años	7.4 %(N=7)	9.5 %(N=6)
20-30 años	57 %(N=54)	79 %(N=50)
> 30 años	35 %(N=33)	11 %(N=7)
<b>Lactancia</b>	N= 82	N=63
Sí	72 % (N= 59)	49 %(N=31)
No	28 %(N=23)	51 %(N=32)
<b>Mutación BRCA</b>	N=92	N=8
Sí	34 %(N= 31)	0
No	66 %(N=58)	100 %(N=8)
<b>Antecedentes familiares</b>	N=212	N=71
1º grado	10.4 %(N=22)	5.6 %(N=4)
2º grado	15.5% (N=33)	10 %(N=7)
1º y 2º grado	7%(N=15)	4.4 %(N=3)
No antecedentes	67%(N=142)	80 %(N=57)

**Tabla 6** .Descripción de la población de estudio en términos de factores de riesgo

## **V. 2. FACTORES PRONÓSTICOS EN LAS MUJERES MUY JÓVENES Y SU CORRELACIÓN CON LAS MAYORES.**

### **V. 2. 1. Factores pronósticos histológicos**

#### V. 2. 1. 1. Tamaño tumoral

Poseiamos el dato del tamaño tumoral de 241 mujeres jóvenes, de ellas 94 (un 39%) presentaban un tumor < 2 cm, 112 (un 46.5%) entre 2 y 5 cm y 35 (un 14.5%) un tumor mayor de 5 cm. Por el contrario, la mayor parte de las mujeres mayores (un 66%) presentaban un tumor < 2 cm, 29 pacientes (29%) tenían un tamaño tumoral entre 2 y 5 cm y sólo un 5% un tumor > de 5cm.

#### V. 2. 1. 2. Grado histológico

De las 193 mujeres jóvenes en las que conocíamos el dato del GH, 28 pacientes (un 14%) tenían un GH I o bien diferenciado, 71 pacientes (un 37%) tenían un GH II o moderadamente diferenciado y 94 (un 49%) un GH III o pobremente diferenciado. Por otra parte, en las 96 pacientes mayores en las que teníamos el dato del GH, 18 mujeres poseían un GH I (un 19%), 39 un GH II (un 40 %) y otras 39 pacientes un GH III (40%).

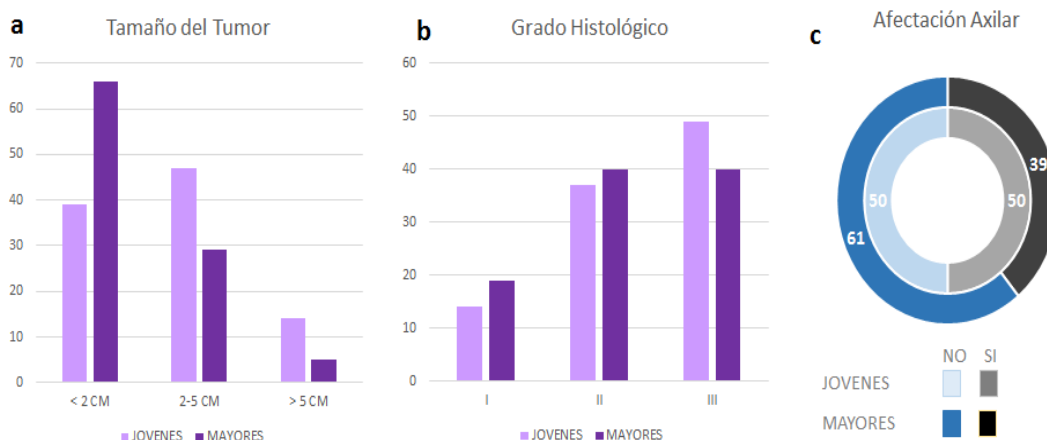
#### V. 2. 1. 3. Afectación ganglionar

En 241 pacientes jóvenes conocíamos el dato acerca de la afectación ganglionar axilar tras la cirugía, en 121 de ellas (un 50%) existía afectación ganglionar y en 120 (50%) no. Por el contrario, sólo 38 pacientes mayores de las 97, en las que teníamos el dato de afectación axilar, tenían ganglios axilares afectos (un 39%) mientras

que la mayor parte, un 61% no tenían axila afectada por metástasis del cáncer de mama.

#### V. 2. 1. 4. Tipo histológico

Tanto en el caso de las mujeres muy jóvenes como en el de las pacientes mayores el carcinoma ductal infiltrante es el tipo histológico invasivo más frecuente (con un 81% y un 72% respectivamente), seguido del carcinoma lobulillar.



**Figura 10.** Representación de las características tumorales en mujeres jóvenes y mayores con cáncer de mama de la población estudiada. a) Comparación porcentual del tamaño tumoral. b) Comparación porcentual en función del grado histológico del tumor. c) Porcentaje de afectación axilar en función de la edad de las pacientes (jóvenes círculo interior y mayores círculo exterior).

	JÓVENES	MAYORES
<b>Tamaño tumoral</b>	N= 241	N= 101
< 2 cm	39 % (N= 94)	66 % (N =67)
2-5 cm	46.5 % (N= 112)	29 % (N =29)
> 5 cm	14.5 % (N= 35)	5 % (N= 5)
<b>GH</b>	N=193	N=96
I o bien diferenciado	14 % ( N=28)	19 % (N=18)
II o moderadamente diferenciado	37 % (N= 71)	40 % (N= 39)
III o pobremente diferenciado	49 % (N=94)	40 % (N=39)
<b>Afectación ganglionar axilar</b>	N= 241	N= 97
Sí	50 % (N=121)	39 % (N=38)
No	50 % (N =120)	61 % ( N=59)
<b>Tipo histológico invasivo</b>	N= 258	N=101
Ductal	81 % (N=209)	72 % (N=73)
Lobulillar	4 % (N=10)	7 % (N=7)
Medular	3 % (N=8)	0
Tubular	2 % (N= 6)	4 % (N=4)
Otros	10 % (N=25)	17 % (N= 17)

**Tabla 7.** Descripción de ambas poblaciones (mujeres jóvenes y mayores) en función de los factores pronósticos histológicos.

## V. 2. 2. Factores pronósticos moleculares

### V. 2. 2. 1. Receptores de estrógenos

Tanto en la serie de pacientes muy jóvenes como en las pacientes mayores el mayor porcentaje de tumores expresan RE (un

70% en el caso de las jóvenes y un 71% en el caso de las mujeres mayores).

#### V. 2. 2. 2. Receptores de progesterona

En lo que a RP nos referimos también las pacientes jóvenes como las mayores expresan en su mayoría RP (un 59% y un 68% respectivamente).

#### V. 2. 2. 3. HER2

En el caso de la sobreexpresión de la proteína HER2 la mayor parte de los tumores de mujeres mayores son negativos, un 70%, frente a un 53% en las pacientes jóvenes (aunque hay un 18% de tumores en los que no conocemos el estado de HER2 en las pacientes jóvenes).

#### V. 2. 2. 4. Ki 67

Tanto en el caso de los tumores de mujeres jóvenes como en el caso de las mujeres mayores los tumores presentan un Ki 67 entre el 14 y el 30 % (un 43% y un 48,5% respectivamente). Aunque en el caso de los tumores de pacientes jóvenes vemos un 38% de Ki > 30% (frente a un 24% en el caso de pacientes más mayores).

	JÓVENES	MAYORES
<b>Receptores Estrogenos</b>	N= 258	N= 101
Positivos	70 % (N= 180)	71.3 % (N =72)
Negativos	24 % (N= 62)	28 % (N =29)
Desconocido	6 % (N= 16)	0
<b>Receptores Progesterona</b>	N=258	N=101
Positivos	59.3 % ( N=153)	68.3% (N=69)
Negativos	33.7 % (N= 87)	31 % (N= 32)
Desconocido	7 % (N=18)	0
<b>HER2</b>	N= 258	N= 101
Positivo	28.3 % (N=73)	22.8 % (N=23)
Negativo	53.5 % (N =138)	70.3 % ( N=71)
Desconocido	18.2 % (N= 47)	4 % (N=4)
Indeterminado (++/+++, FISH no realizado)	0	3 % (N=3)
<b>Ki 67</b>	N= 258	N=101
< 14%	18.7 % (N=20)	27.3 % (N=18)
14-30%	43 % (N=46)	48.5 % (N=32)
> 30%	38.3 % (N=41)	24.2 % (N= 16)
Desconocido	(N= 151)	(N= 35)

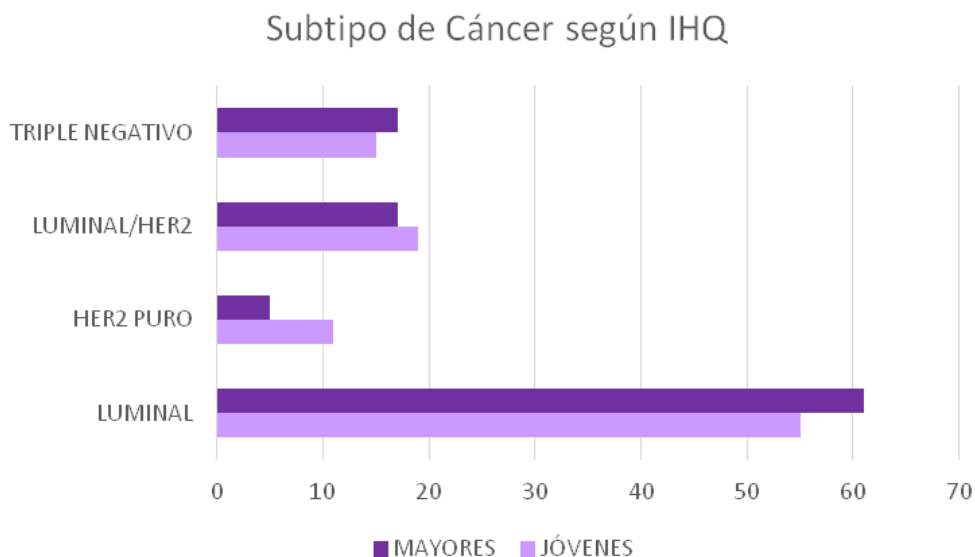
**Tabla 8.** Descripción de ambas poblaciones (mujeres jóvenes y mayores con cáncer de mama) en función de los factores pronósticos moleculares.

### V. 2. 3. Subtipos tumorales por inmunohistoquímica en jóvenes y mayores

De las 258 pacientes muy jóvenes de nuestra base de datos 7 de ellas fueron diagnosticadas de un carcinoma no infiltrante (5 carcinomas ductales in situ, 1 carcinoma lobulillar in situ y 1 hiperplasia ductal atípica), por lo que analizamos en este punto 251

pacientes. De las 5 pacientes con carcinomas in situ, dos de ellas presentan un carcinoma infiltrante años después (siendo mayores de 35 años, por lo que ya no se consideran en nuestro estudio). Dado que en las pacientes jóvenes con tumores Luminales en 82 de ellas no conocemos el Ki 67 para el estudio estadístico las dividimos en tumores Luminales, HER2 puro, Luminal/HER2 y triple negativo. En los casos dónde no estaba realizado el HER2 se consideró este como negativo. Finalmente se pudo obtener el perfil Inmunohistoquímico de 238 pacientes muy jóvenes y de las 101 mayores.

De las 238 pacientes jóvenes un 55% presentan tumores Luminales (N= 131), un 11% HER2 puro (N= 26), un 19% (N=46) tumores Luminal/HER2 y un 15% (N=35) subtipo triple negativo. De las 101 pacientes mayores estudiadas un 61% (N= 62) poseen tumores de perfil Luminal, un 5% (N=5) HER2 puro, un 17% Luminal/HER2 (N=17) y finalmente un 17% (N= 17) presentan un subtipo triple negativo (Fig 11).



**Figura 11.** Representación del porcentaje de subtipos inmunohistoquímicos en las dos poblaciones estudiadas (mujeres jóvenes y mayores). IHQ: Inmunohistoquímica.

### **V. 3. TRATAMIENTOS PAUTADOS EN EL CASO DE LAS MUJERES MUY JÓVENES Y SU CORRELACIÓN CON LAS MAYORES**

#### **V. 3. 1. Cirugía de la mama y de la axila**

En este punto inicialmente se quería analizar si en las pacientes jóvenes se realizan tratamientos quirúrgicos más agresivos. Observamos que de las 219 pacientes jóvenes de las que tenemos datos de la cirugía en 98 (un 45%) se realizó una mastectomía radical modificada con vaciamiento axilar (MRM+VA), en 5 (2%) de ellas una MRM con biopsia selectiva del



ganglio centinela (BSGC), en 86 (un 39%) una tumorectomía con VA y en 30 (14%) una tumorectomía con BSGC.

En las pacientes mayores, conocíamos el dato de la cirugía en 97 de ellas, en 30 (31%) se realizó una MRM + VA, en 5 (5%) una MRM + BSGC, en 34 (35%) una tumorectomía con VA, y en las 28 restantes (un 29%) una tumorectomía con BSGC.

Posteriormente con los datos que poseíamos quisimos evaluar si hay un cambio estadísticamente significativo en la cirugía de la mama y la axila en los últimos años, tanto en jóvenes como en mayores.

Previo al año 2000 las pacientes jóvenes diagnosticadas de cáncer de mama un 50% se realizaba MRM + VA, ninguna MRM + BSGC, un 48% tumorectomía con VA y un 2% tumorectomía con BSGC. Del 2001 al 2007 las pacientes jóvenes diagnosticadas de cáncer de mama un 47% se realizaba MRM + VA, ninguna MRM + BSGC, un 44% tumorectomía con VA y un 10% tumorectomía con BSGC. A partir del año 2008 las pacientes jóvenes diagnosticadas de cáncer de mama un 38,5% se realizaba MRM + VA, un 6,4% MRM + BSGC, un 28,2% tumorectomía con VA y un 27% tumorectomía con BSGC.

Podemos ver en los últimos años un aumento de cirugía conservadora y BSGC (Diferencias estadísticamente significativas,  $p=0.000$ ) en mujeres jóvenes aunque hay más de 2 casillas con una frecuencia esperada menor de 5, por lo que se decide retirar la variable MRM + BSGC, obteniendo como vemos en la tabla 9 datos

que siguen siendo estadísticamente significativos hacia un aumento en los últimos años hacia la cirugía conservadora con BSGC en jóvenes.

Previo al año 2000 las pacientes mayores diagnosticadas de cáncer de mama un 44% se realizaba MRM + VA, 8% MRM + BSGC, un 40% tumorectomía con VA y un 8% tumorectomía con BSGC. Del 2001 al 2007 las pacientes mayores diagnosticadas de cáncer de mama un 44,4% se realizaba MRM + VA, 4,5% MRM + BSGC, un 22,7% tumorectomía con VA y un 27,2% tumorectomía con BSGC. A partir del año 2008 las pacientes mayores diagnosticadas de cáncer de mama un 18% se realizaba MRM + VA, un 4% MRM + BSGC, un 38% tumorectomía con VA y un 40% tumorectomía con BSGC.

Podemos ver en los últimos años un aumento de cirugía conservadora y BSGC (aunque las diferencias no son estadísticamente significativas en mujeres mayores pero con tendencia a la significación, aunque hay más de 2 casillas con una frecuencia esperada menor de 5, por lo que se decide retirar también la variable MRM + BSGC, obteniendo datos que siguen siendo no estadísticamente significativos ( $p = 0.12$ ) pero más cercanos a la significación).

EDAD/AÑO DE DIAGNÓSTICO	CIRUGÍA			Total
	MRM+ VA (N)	T + VA (N)	T + BSGC (N)	
Menores de 36 años				
Previo al año 2000	27	26	1	<b>54</b>
Del año 2001 al año 2007	41	38	8	<b>87</b>
Del año 2008 al 2014	30	23	20	<b>73</b>
<b>Total</b>	<b>98</b>	<b>87</b>	<b>29</b>	<b>214</b>
Mayores de 50 años				
Previo al año 2000	11	10	2	<b>23</b>
Del año 2001 al año 2007	10	5	6	<b>21</b>
Del año 2008 al 2014	9	19	20	<b>48</b>
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>34</b>	<b>28</b>	<b>92</b>

EDAD		VALOR	SIG. ASINTÓTICA (BILATERAL)
MENOR 36	Chi-cuadrado de Pearson	20,038 <sup>a</sup>	,000
MAYOR DE 50	Chi-cuadrado de Pearson	12,833 <sup>b</sup>	,012

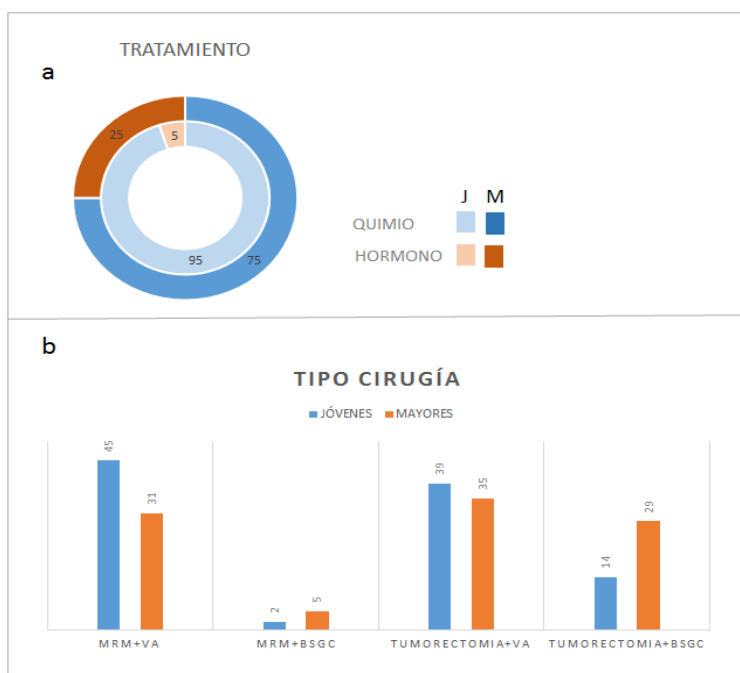
**Tabla 9.** Comparación en el tipo de cirugía mamaria y axilar entre mujeres jóvenes y mayores en función de la edad de diagnóstico. MRM: Mastectomía radical modificada. VA: Vaciamiento axilar. T: Tumorectomía. BSGC: Biopsia selectiva del ganglio centinela. N: Número de pacientes.

### V. 3. 2. Quimioterapia y hormonoterapia

De las 219 mujeres jóvenes de las que poseemos el dato del tratamiento neo/adyuvante, sólo 10 (4.6%) recibieron únicamente hormonoterapia adyuvante, sin quimioterapia. En el resto de casos todas las pacientes recibieron quimioterapia. Cuando estudiamos los tratamientos que reciben las pacientes mayores vemos que en 4 de ellas no se pautó tratamiento adyuvante por las comorbilidades asociadas. De las 97 restantes, 24 (un 25%) recibieron únicamente hormonoterapia. En cuanto a los diferentes agentes quimioterápicos administrados, no existen diferencias significativas en función de la edad de las pacientes.

Posteriormente se estudió si en los últimos años ha existido un aumento en el número de pacientes que recibe neoadyuvancia, viendo que en las mujeres jóvenes, de las 60 diagnosticadas previo al año 2000, sólo 7 recibieron tratamiento neoadyuvante. De las diagnosticadas del 2001 al 2007 se incrementa pasando a ser 24 pacientes de 96 diagnosticadas y del 2008 al 2014 más de la mitad de las pacientes jóvenes reciben neoadyuvancia (diferencias estadísticamente significativas;  $p=0.000$ ). En las mujeres mayores se repite lo visto en las mujeres jóvenes, las diagnosticadas previo al 2007 un 4% reciben neoadyuvancia. Y del 2008 al 2014 se incrementa a un 29%. ( $p= 0.004$ ; diferencias estadísticamente significativas aunque en este caso en 2 casillas existe una frecuencia esperada inferior a 5, por lo que no podemos considerar válido este dato).

Cuando estudiamos los datos de respuesta completa patológica (RCP) tras la neoadyuvancia, en las pacientes jóvenes con tumores Luminales un 4% obtienen una RCP tras la neoadyuvancia, un 8% en el caso de los HER2 puros, un 2,3% en los Luminal/Her2 y un 3% en los triples negativos (p=0.665, diferencias no estadísticamente significativas). En las pacientes mayores con tumores Luminales un 6.6% obtienen una RCP tras la neoadyuvancia, un 20% en el caso de los HER2 puros, un 6% en los Luminal/Her2 y un 6% en los triples negativos (p=0.715, diferencias no estadísticamente significativas).



**Figura 12.** Representación de los porcentajes de los tratamientos recibidos en función de la edad de las pacientes estudiadas. a) Comparación entre el tipo de tratamiento recibido neo/adyuvante (jóvenes círculo interior y mayores exterior) b) Representación de cirugía mamaria y axilar realizada en las dos poblaciones estudiadas.

## **V. 4. INTERVALO LIBRE DE ENFERMEDAD, RECAÍDA Y MORTALIDAD EN CADA SUBGRUPO**

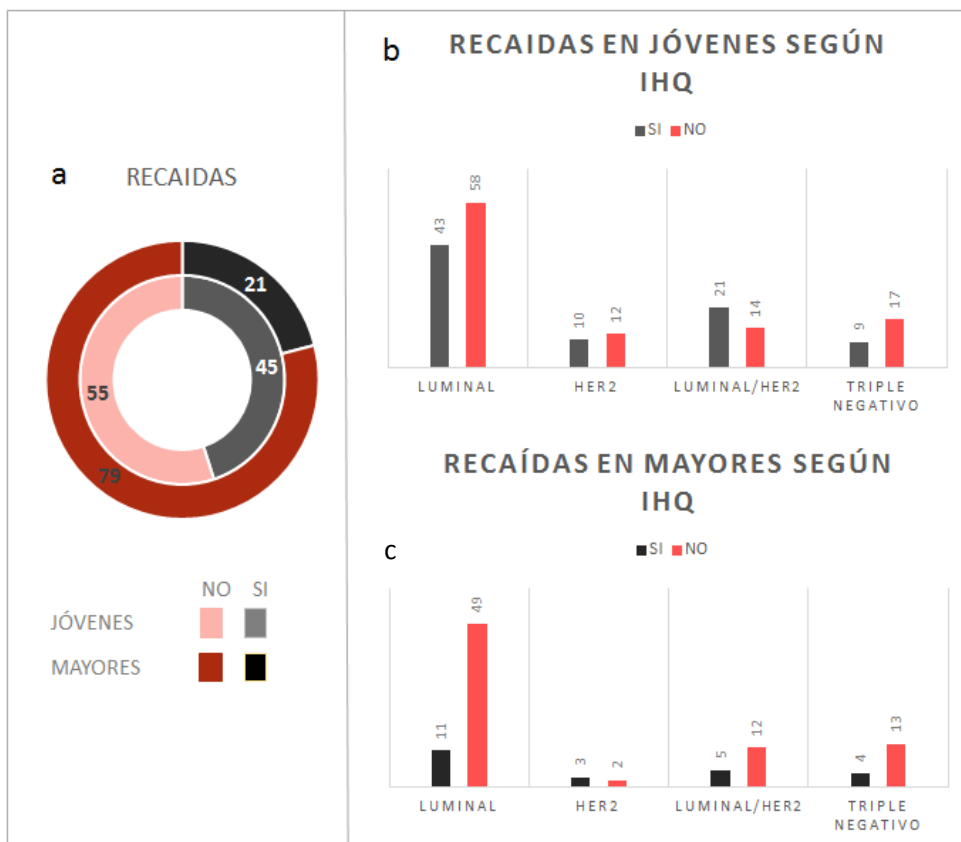
En este punto pretendimos averiguar si nuestra hipótesis inicial de que las mujeres jóvenes tienen recaídas por el cáncer de mama con mayor frecuencia que las mayores se cumplía en nuestra serie de pacientes.

De las 258 pacientes muy jóvenes con carcinomas infiltrantes de mama, poseemos los datos de años de seguimiento de 184 (en el resto se perdió el seguimiento y 8 de ellas se diagnostican inicialmente metastásicas), de ellas 83 (45%) han recaído y 101 (55%) no. De las 101 pacientes mayores, 2 se diagnostican inicialmente con metástasis, por lo que se hace el seguimiento de las 99 restantes, y 21 (21%) han recaído y 78 (un 79%) no.

Una vez contestada nuestra hipótesis inicial, nos preguntamos si en nuestra serie de pacientes, aquellas con subtipos inmunohistoquímicos triple negativo o HER2 tienen mayor riesgo de recaída (independientemente de la edad). Lo que podemos ver es que de nuestras 184 mujeres muy jóvenes en las que tenemos el seguimiento, 101 (55%) poseen tumores de perfil Luminal, de estas 43 (42.5%) han recaído y 58(57.4%) no. 22 pacientes poseen un tumor HER2 puro, 10 de ellas han recaído (45.5%) y 12 no (54.5%). En el caso de los tumores Luminal/HER2 35 pacientes poseían este tipo de tumor, y 21 (60%) han recaído y 14 (40%) no lo han hecho.

De las 26 pacientes con subtipo histológico triple negativo, 9 han recaído (34.6%) y 17 no (65.3%). Aunque inicialmente parece que las pacientes con tumores Luminal/HER2 tienen mayor riesgo de recaída, la estadística nos señala que no es así, dado que las diferencias no son estadísticamente significativas ( $p= 0.208$ ).

En el caso de las pacientes mayores postmenopáusicas, la mayoría de ellas presentan un tumor de subtipo Luminal, un 60%, de las que poseen este subtipo han recaído 11 (18,3%) y el resto no. De aquellas con un subtipo HER2 positivo, un total de 5 pacientes, han recaído 3 (60%) y el resto no ha presentado recidiva de la enfermedad. De las 17 con subtipo Luminal/HER2, 5 (29.4%) han recaído y 12 no. Por último, las 17 con subtipo tumoral triple negativo, 4 (23.5%) han recaído y las 13 restantes no. A primera vista, en las pacientes mayores de nuestra serie parece que el subtipo tumoral HER2 positivo sería el que tendría peor pronóstico, pero la estadística también nos confirma que las diferencias no son estadísticamente significativas ( $p=0.175$ ).



**Figura 13.** Representación de las recaídas en la población de cáncer de mama estudiada. a) Porcentaje de recaídas en cada subgrupo de estudio (mujeres jóvenes círculo interior y mayor círculo exterior). b) Número de pacientes jóvenes que han presentado una recaída en función del subtipo inmunohistoquímico del tumor. c) Número de pacientes mayores que han presentado una recaída en función del subtipo inmunohistoquímico del tumor. IHQ: Inmunohistoquímica.

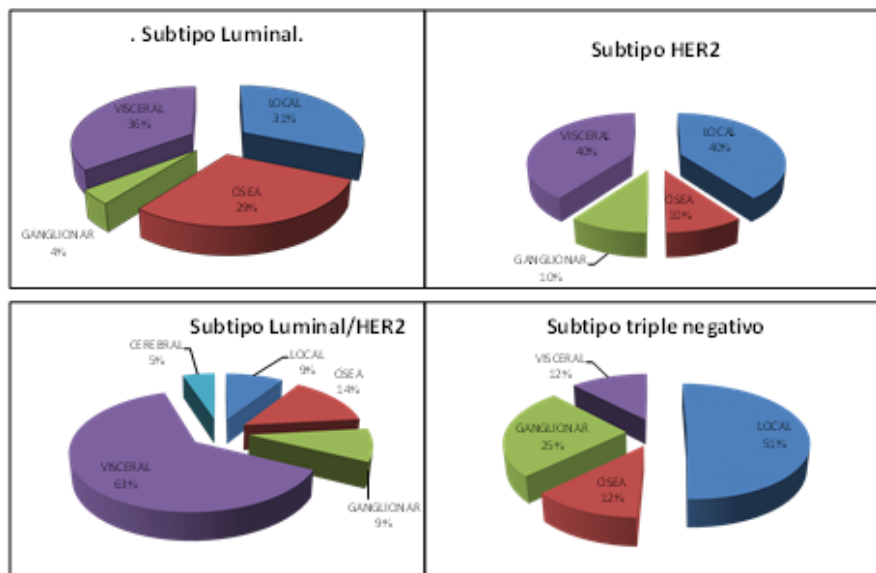
Posteriormente, quisimos estudiar a las pacientes que presentan una recaída por la enfermedad. Nuestra intención era ver si existían diferencias entre mujeres jóvenes y mayores en el lugar de la primera recaída de la enfermedad en función del subtipo tumoral.



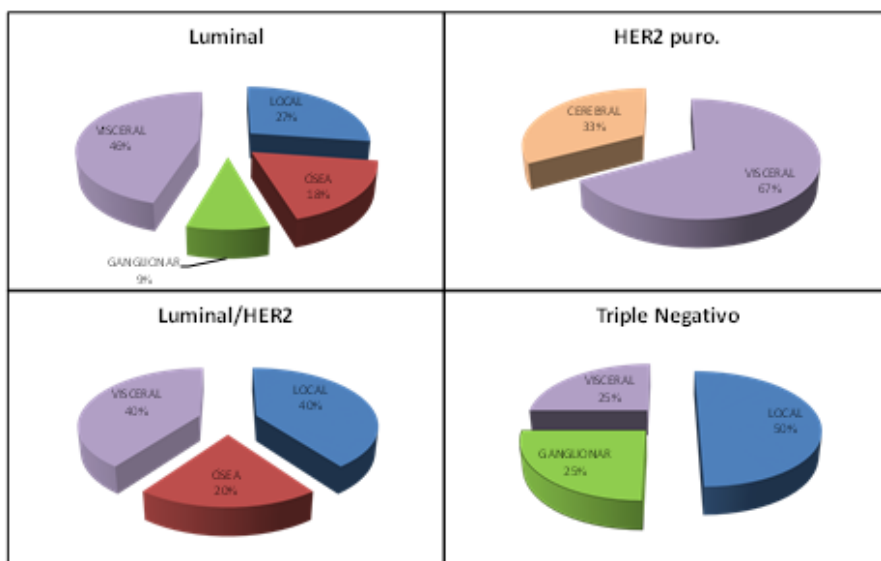
En las pacientes jóvenes, la primera recaída en aquellas con un perfil Luminal fue: local (en el lecho de mastectomía, mama ipsilateral o piel y tejido subcutáneo):31,2%, ósea: 29.2%, ganglionar: 4,2% y visceral (hígado, pulmón, pleura, peritoneo, ovario, colonrecto, estómago, otros): 35,4%. En el caso de las pacientes con tumores HER2 puro el patrón de recaída fue: local: 40%, ósea: 10%, ganglionar: 10% y visceral: 40%. En los tumores Luminal/HER2 la primera recaída fue: local: 9,5%, ósea: 14,3%, ganglionar: 9,5%, Visceral: 61.9% y cerebral: 4,8%. Por último, la enfermedad triple negativa presenta la primera recaída en forma: local: 50%, ósea: 12,5%, ganglionar: 25% y visceral: 12,5%. Estadísticamente los datos no son significativos ( $p=0.103$ )

En las pacientes mayores de nuestra serie, la primera recaída de las pacientes con subtipo Luminal es local: 27,3%, ósea: 18,2%, ganglionar: 9,1% y visceral: 45,4%. En el caso de los tumores HER2 puro, la recaída es visceral con un 66.7% y cerebral con un 33.3%. En el caso de la enfermedad Luminal/HER2 un 40% tuvo una recaída local, un 20% a nivel óseo, y un 40% a nivel visceral. Por último, los tumores triples negativos que han recaído lo han hecho un 50% a nivel local, y un 25% a nivel ganglionar y visceral. En este caso las diferencias no son tampoco estadísticamente significativas ( $p=0.428$ ).

a. Porcentaje de recaídas según el subtipo IHQ en mujeres Jóvenes.



b. Porcentaje de recaídas según el subtipo IHQ en mujeres mayores.



**Figura 14.** Porcentajes del lugar de recaída según el subtipo IHQ en las mujeres con cáncer de mama estudiadas a) En mujeres jóvenes en función del subtipo tumoral por IHQ. b) En mujeres mayores en función del subtipo tumoral por IHQ.

Por último estudiamos si en nuestra serie de jóvenes y mayores con cáncer de mama la recaída por la enfermedad se correlacionaba de una forma estadísticamente significativa con algún factor pronóstico histológico. Y evidenciamos que si existe afectación axilar recaen un 56,3 % de las pacientes jóvenes (diferencia estadísticamente significativa  $p= 0.02$ ), mientras que no hay diferencias en pacientes mayores entre afectación axilar y recaída. Ante estos resultados nos propusimos estudiar a las pacientes muy jóvenes con cáncer de mama y ganglios afectados y ver si existía alguna relación estadísticamente significativa también entre el subtipo inmunohistoquímico, la afectación axilar y la recaída y en los resultados vemos que un 47,3% de las pacientes jóvenes con tumores luminales con ganglios afectados recaen. Mientras un 36.6% recaen con ganglios negativos. En el caso de los tumores HER2 un 66.7% de las pacientes con ganglios afectados recaen y sólo un 14.3% con ganglios negativos recaen. En las pacientes con ganglios afectados y tumores luminal/HER2 un 77.3% con ganglios afectados recaen (en este caso la diferencia es estadísticamente significativa;  $p= 0.03$ ). Sólo un 25% con ganglios negativos recaen. En el caso de los tumores triples negativos con ganglios axilares metastásicos un 40% de las pacientes recaen frente a un 31.2% con ganglios negativos que recaen.

Al estudiar el resto de factores pronósticos histológicos, como son el tamaño tumoral, el GH y el porcentaje de ki 67 no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre estos

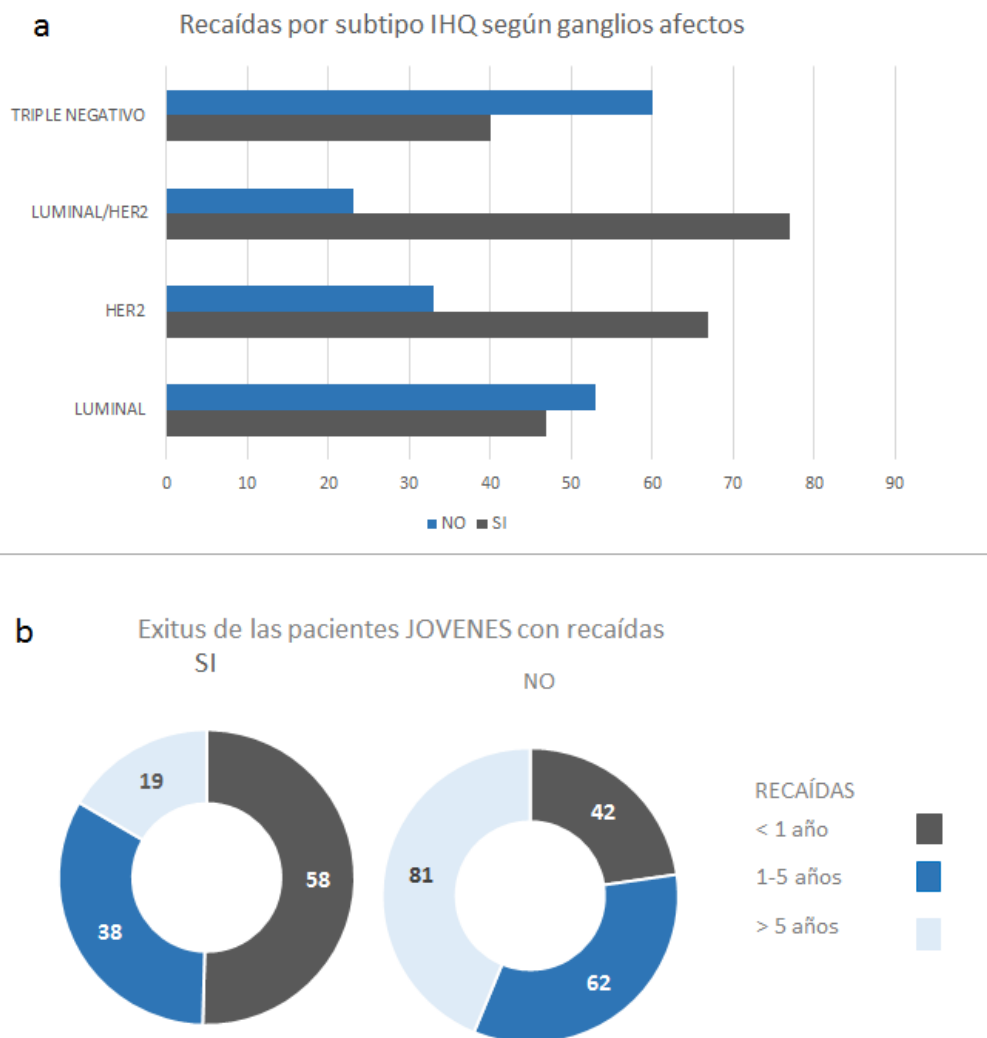
factores y el riesgo de recaída por la enfermedad, ni en pacientes jóvenes ni en mayores (Fig 15 a).

Por lo que respecta al porcentaje de exitus tras la recaída, un 39.3% de las pacientes jóvenes que han recaído han fallecido por la enfermedad( estadísticamente significativo,  $p=0.000$  ). Un 32% de las pacientes mayores que recaen fallecen por la enfermedad ( estadísticamente significativo,  $p=0.000$ ). Como conclusión podemos afirmar que tanto en las pacientes jóvenes como en las mayores de nuestra serie, una primera recaída está asociada a mayor riesgo de fallecimiento por cáncer de mama.

También hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre la fecha de la primera recaída por la enfermedad y el fallecimiento por cáncer de mama ,de modo que las pacientes jóvenes que presentan una recaída a  $< 1$  año del diagnóstico un 58% han fallecido por la enfermedad, las que presentan una recaída entre el 1-5 año un 38% han fallecido y las que recaen a  $> 5$  años, han fallecido un 19% ( diferencias estadísticamente significativas;  $p=0.002$ , cuanto menos tiempo entre el diagnóstico de la enfermedad y la primera recaída mayor probabilidad de fallecer por la enfermedad) (Fig 15b). Por el contrario en las pacientes mayores no encontramos que esta asociación sea estadísticamente significativa.

En el caso de las pacientes jóvenes con cáncer de mama en función del lugar dónde se produzca la primera recaída por la enfermedad existe una asociación estadísticamente significativa con

el riesgo de fallecimiento por cáncer de mama. En las mujeres jóvenes, aquellas que presentan una primera recaída de forma local un 36% han fallecido, primera recaída en hueso un 84% han fallecido, primera recaída ganglionar un 43% han fallecido, una primera recaída en forma visceral un 86.5% han fallecido a día de hoy y una recaída cerebral fallecida (diferencias estadísticamente significativas;  $p=0.001$ ), podemos concluir que en los casos en que la primera recaída sea local existe una probabilidad mayor del 50% de sobrevivir, pero si la primera recaída es visceral o cerebral no. En las mujeres mayores, aquellas que presentan una primera recaída de forma local sólo una falleció y fue por otra causa, la primera recaída en hueso sólo una paciente ha fallecido y ha sido por otra causa, de aquellas que presentan una primera recaída ganglionar no ha fallecido ninguna, y un 64% de las que presentaron una primera recaída en forma visceral han fallecido a día de hoy y una recaída cerebral fallecida (diferencias no estadísticamente significativas;  $p=0.11$ ), pero podemos concluir que en los casos en que la primera recaída sea visceral o cerebral la enfermedad se comporta de forma agresiva, en el caso de enfermedad local, osea o ganglionar no existe esa agresividad. Aunque en el caso de las mujeres jóvenes una primera recaída es más agresiva que en mayores (aunque sea local, osea o ganglionar).



**Figura 15.** Distribución de las recaídas y exitos en mujeres jóvenes con cáncer de mama. a) Porcentaje de recaídas en mujeres jóvenes con ganglios axilares afectados por carcinoma de mama en función del subtipo tumoral por IHQ. b) Porcentaje de exitos/fallecimiento en mujeres jóvenes en función de la fecha de recaída por el cáncer de mama.

## **V.5. RESULTADOS DE VÍAS GENÉTICAS IMPLICADAS EN EL CÁNCER DE MAMA DE MUJERES MUY JÓVENES MEDIANTE EL ANÁLISIS GENÓMICO BASADO EN PAM50 Y SU CORRELACIÓN CON ESTUDIOS PREVIOS DE MIRNAS. IMPORTANCIA DE LA FAMILIA HER**

### **V.5.1. Clasificación de los tumores de mujeres muy jóvenes y mayores en los subtipos intrínsecos moleculares y su correlación con la clasificación inmunohistoquímica (IHQ).**

Se realizó el estudio de PAM50 en 31 de las muestras tumorales de cáncer de mama de mujeres muy jóvenes y en 18 de mujeres mayores de 45 años postmenopáusicas. En las mujeres jóvenes estudiadas, coincide el subtipo intrínseco con el subtipo inmunohistoquímico en 14 de ellas (un 45%), 5 de los tumores son clasificados como normales y en 12 de las muestras no existe coincidencia (un 38%). De las 18 pacientes mayores estudiadas, en 4 de ellas coincide la clasificación molecular y la inmunohistoquímica (un 22%), en 10 no existe coincidencia (55%) y 4 tumores son clasificados como normales. En ambos casos, jóvenes y mayores, el PAM50 asigna más tumores al subtipo Luminal A, pero esto es más evidente en las pacientes mayores (Tablas 10 y 11).

También podemos observar cómo en las mujeres jóvenes la coincidencia entre el perfil PAM50 y la clasificación IHQ es mayor.

Otro punto interesante de mencionar es que tal y como podemos ver en las figuras y tablas siguientes los tumores de mujeres jóvenes exhiben subtipos intrínsecos más agresivos (sobrexpresión de HER2) en comparación con las mayores (con una mayoría de subtipo Luminal A).

Posteriormente, quisimos valorar cuantas pacientes jóvenes y de qué subtipo por PAM 50 habían recaído. Al evidenciar que un 75% de las pacientes catalogadas como Luminal A por PAM50, con bajo riesgo de recaída por subtipo y por proliferación, habían sufrido una recaída por la enfermedad decidimos estudiar estas pacientes, su recaída y su perfil por IHQ. Hicimos lo mismo con las pacientes mayores que la plataforma genética PAM50 había recatalogado como Luminal A y ninguna de ellas ha presentado una recaída por la enfermedad (Fig 16 c y d y Tabla 12).

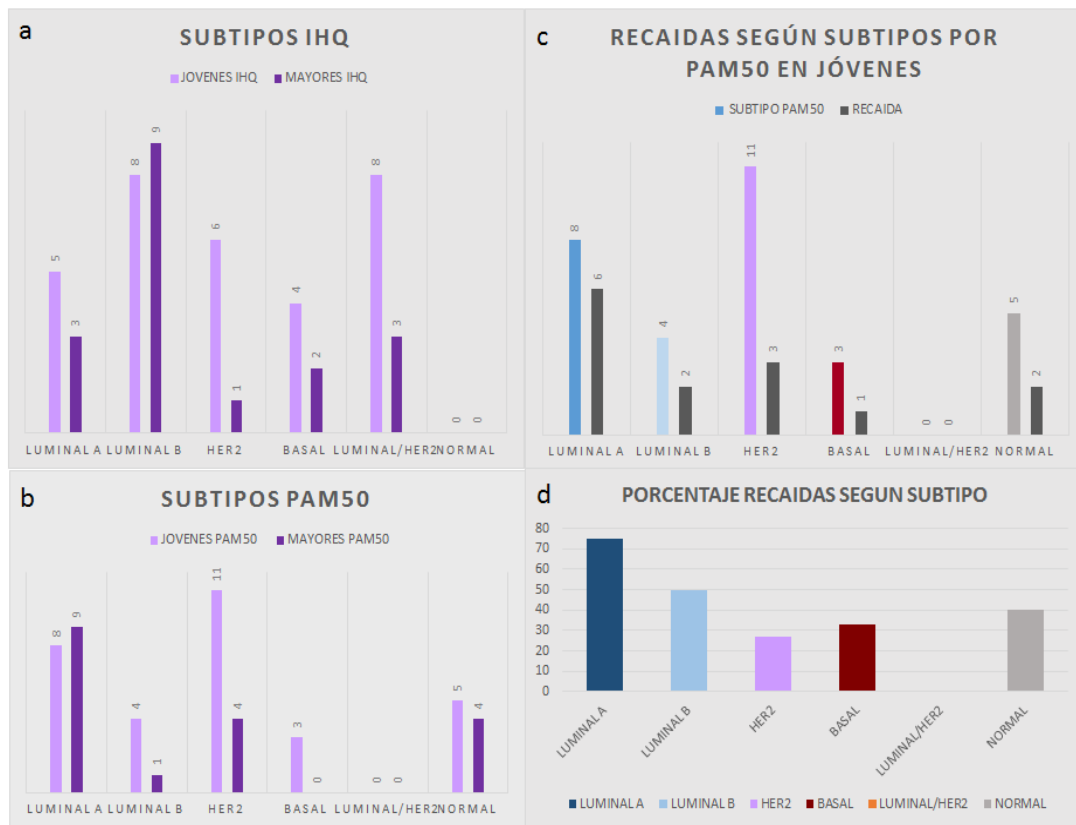


<b>SUBTIPO PAM50</b>	<b>PERFIL IHQ</b>
<b>HER2</b>	HER2/LUMINAL
<b>NORMAL</b>	LUMINAL B
<b>HER2</b>	HER2 PURO
<b>HER2</b>	HER2 +/LUMINAL
<b>NORMAL</b>	LUMINAL A
<b>LUMINAL A</b>	LUMINAL A
<b>BASAL</b>	TRIPLE NEGATIVA
<b>LUMINAL A</b>	LUMINAL/HER2
<b>LUMINAL A</b>	LUMINAL A
<b>LUMINAL B</b>	TRIPLE NEGATIVA
<b>HER2</b>	LUMINAL B
<b>BASAL</b>	TRIPLE NEGATIVO
<b>HER2</b>	HER2/LUMINAL
<b>NORMAL</b>	LUMINAL/HER2
<b>HER2</b>	LUMINAL B/HER2
<b>NORMAL</b>	LUMINAL B
<b>LUMINAL A</b>	LUMINAL B
<b>LUMINAL B</b>	LUMINAL B
<b>LUMINAL A</b>	HER2 PURO
<b>NORMAL</b>	HER2 PURO
<b>BASAL</b>	TRIPLE NEGATIVA
<b>LUMINAL A</b>	LUMINAL A
<b>HER2</b>	HER2 +/LUMINAL
<b>HER2</b>	HER2 +/LUMINAL
<b>LUMINAL A</b>	LUMINAL A
<b>HER2</b>	HER2 PURO
<b>LUMINAL A</b>	LUMINAL B
<b>LUMINAL B</b>	LUMINAL B
<b>LUMINAL B</b>	LUMINAL B
<b>HER2</b>	HER2 + PURO
<b>HER2</b>	HER2 + PURO

**Tabla 10.** Correspondencia entre el subtipo inmunohistoquímico y el basado en la plataforma PAM50 en las 31 mujeres jóvenes estudiada.

<b>PERFIL PAM50</b>	<b>PERFIL IHQ</b>
<b>NORMAL</b>	LUMINAL B
<b>HER2</b>	LUMINAL B/HER2
<b>LUMINAL A</b>	LUMINAL B
<b>HER2</b>	LUMINAL B/HER2
<b>NORMAL</b>	LUMINAL B
<b>LUMINAL A</b>	LUMINAL B
<b>LUMINAL B</b>	LUMINAL B
<b>NORMAL</b>	TRIPLE NEGATIVO
<b>HER2</b>	LUMINAL/HER2
<b>LUMINAL A</b>	LUMINAL A
<b>LUMINAL A</b>	TRIPLE NEGATIVO
<b>LUMINAL A</b>	LUMINAL B
<b>LUMINAL A</b>	LUMINAL A
<b>LUMINAL A</b>	LUMINAL B
<b>LUMINAL A</b>	LUMINAL B
<b>LUMINAL A</b>	LUMINAL B
<b>LUMINAL A</b>	LUMINAL B
<b>NORMAL</b>	LUMINAL A
<b>HER2</b>	HER2

**Tabla 11.** Correspondencia entre el subtipo inmunohistoquímico y el basado en la plataforma PAM50 en las 18 mujeres mayores estudiadas.



**Figura 16.** Descripción de los subtipos histológicos tumorales en función de la inmunohistoquímica y el perfil basado en PAM50 en la población estudiada y patrones de recaída en función de los subtipos intrínsecos en las mujeres jóvenes. a) Comparación entre los subtipos inmunohistoquímicos tumorales en jóvenes y mayores. b) Comparación entre los subtipos intrínsecos tumorales obtenidos de PAM50 entre mujeres jóvenes y mayores. c) Número de recaídas en función del subtipo intrínseco por PAM50 en mujeres jóvenes. d) Porcentaje de recaídas en función del subtipo intrínseco por PAM50 en mujeres jóvenes. IHQ: Inmunohistoquímica.

PERFIL PAM50 JÓVENES	PERFIL IHQ JÓVENES	RECAIDA	EXITUS
<b>Luminal A</b>	Luminal A	NO	NO
<b>Luminal A</b>	Luminal/HER2	SI(Tras ILE de 1 año, hepática)	SI
<b>Luminal A</b>	Luminal A	SI( tras ILE de 4 años cutánea en cicatriz)	NO
<b>Luminal A</b>	Luminal B	SI (Tras ILE de 4 años, PE oseo, pulmonar y ganglionar)	SI
<b>Luminal A</b>	HER2 puro	SI (Tras ILE 8 años, PE hepática)	SI
<b>Luminal A</b>	Luminal A	NO	NO
<b>Luminal A</b>	Luminal A	SI (tras ILE 4 años, PE osea)	NO
<b>Luminal A</b>	Luminal B	SI (Tras ILE 7 años Recaída local en zona de cicatriz perfil luminal B (Ki 40%))	NO

**Tabla 12.** Estudio de las pacientes jóvenes con subtipo intrínseco Luminal A basado en la plataforma genética PAM50. Correspondencia con el subtipo tumoral basado en inmunohistoquímica y patrones de recaída y exitus/fallecimiento. ILE: Intervalo Libre de Enfermedad. PE: Progresión de enfermedad.

### **V.5.2. Expresión genética diferencial en los tumores de mujeres muy jóvenes y mayores en función del PAM50 y su correlación con el perfil de expresión de miRNAs.**

Con el fin de establecer si realmente existía un patrón de miARNs diferenciador entre mujeres jóvenes y mayores diagnosticadas de cáncer de mama, se utilizó la plataforma Affymetrix miARN array. Se obtuvo una matriz de expresión de 20248 sondas. Se seleccionaron únicamente los 1100 miARNs humanos y, tras el procesado inicial para eliminar los miARNs con baja expresión, se redujeron a 251 hsa-miARNs (homo sapiens). Con el fin de detectar diferencias en la expresión de miARN en el tejido tumoral de mama de las mujeres jóvenes (22 jóvenes con tejido tumoral que se remitió también para la realización del PAM50) frente a las mayores (12 muestras de tejido tumoral que seremitieron también para el estudio con PAM50) se analizó su expresión diferencial mediante t-test, obteniendo 120 miARNs expresados diferencialmente entre los dos grupos, 96 de los cuales se mantenían significativos tras el ajuste por múltiples comparaciones.

Al evaluar la influencia de los posibles factores de confusión (el tamaño del tumor, estado ganglionar, ki67 % y el grado histológico), ninguno de los miARNs dio valores significativos en ninguno de los análisis realizados (FDR valor de  $p > 0,1$ ), lo cual apoyaba la hipótesis inicial en la que el perfil diferencial de miARNs obtenidos era debido a la edad.

Además, tres muestras parafinadas de mama normal de tres mujeres jóvenes sometidas a reducción mamaria fueron incluidas en el análisis con el fin de discriminar un perfil de miRNAs asociado a mujeres muy jóvenes y no a cáncer de mama. Los resultados obtenidos revelaron dos grupos de muestras claramente diferenciados (Anexo III). Un grupo incluía todas excepto una de las muestras de tejido de cáncer de mama de mujeres muy jóvenes. El otro grupo contenía todas las muestras de mujeres mayores y el tejido normal de jóvenes. Pudimos identificar dos grandes nodos de miARN regulados diferencialmente en el grupo de cáncer de mama de mujeres jóvenes (CMMJ). Como se muestra en la Figura del Anexo III, los 52 miARN sobreexpresados en el grupo CMMJ se pueden ver en el clúster en el nodo superior 115 (correlación de 0,383), mientras que el nodo inferior muestra los 67 miARNs reprimidos (nodo 119 con una correlación de 0,102).

En el nodo sobreexpresado (nodo 115) se pueden diferenciar varios sub-nodos: el nodo 92, con una correlación de 0.63, y el nodo 84, con una correlación de 0.66. El sub-nodo 92 es el que más variabilidad tiene entre las muestras. Por lo que seleccionamos del nodo 84 el sub-nodo 15, donde convergen 12 miARNs (correlación de 0.923), dado que es el que presenta una mayor diferencia entre jóvenes/mayores-normales.

En el nodo reprimido (nodo 119), se identificaron seis sub-nodos interesantes : sub - nodo 102 (correlación 0,582 ) , sub - nodo 79 (correlación 0,667 ) , sub - nodo 76 (correlación 0,678 ) , sub -

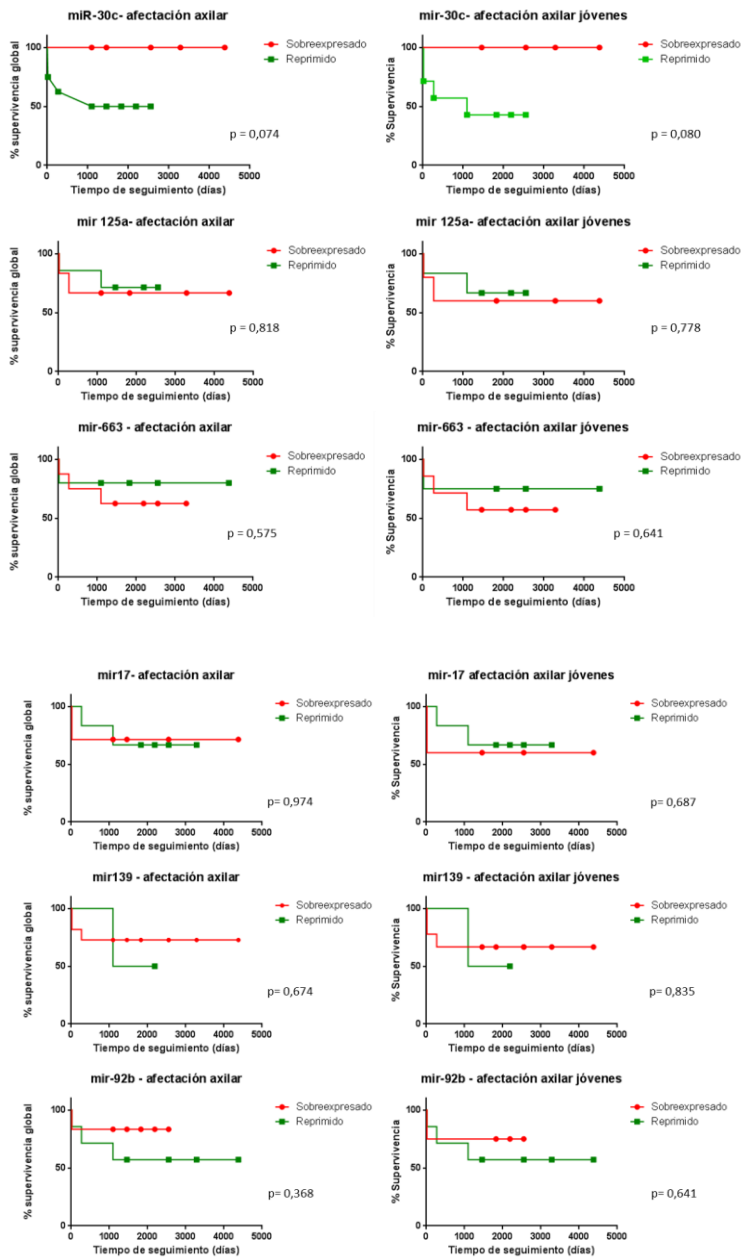
nodo 63 (correlación 0,72) , sub - nodo 54 (correlación de 0,75 ) y el sub - nodo 52 (correlación de 0,75 ) .

Con los 20 miARNs seleccionados que componen los dos sub-nodos más llamativos, se realizó una búsqueda para determinar cuáles podrían ser biológicamente más relevantes en el contexto del cáncer de mama. Para ello utilizamos DIANA miRPathv2.0. Al estudiar los miARNs de los sub- nodos seleccionados , encontramos distintas vías con FDR p-valor  $< 0,05$  , incluyendo la vías relacionadas con adherencia y movilidad ( biosíntesis de glicosaminoglicanos ,unión adherente, adhesión focal, moléculas de adhesión celular y la regulación del citoesqueleto de actina) , con la proliferación celular (señalización de MAPK , endocitosis ) ,el ritmo circadiano y miocardiopatías.

Dado que, como hemos visto anteriormente, las mujeres jóvenes con afectación axilar tienen de un modo significativo, mayor riesgo de recaída por el cáncer de mama, nos propusimos evaluar si alguno de los miRNAs que se consideraron relevantes a la hora de diferenciar el cáncer de mama entre mujeres jóvenes y mayores podría asociarse también con la mayor agresividad del cáncer de mama de mujeres jóvenes con metástasis axilares. Para ello, con el programa estadístico GraphPad Prism ,estudiamos la SG asociada a los miRNAs que fueron considerados como relevantes marcadores moleculares (miR-30c, miR-125a, miR-17, miR-92b, miR-139 y miR-663) tanto por sus niveles de significatividad en los tres grupos de muestras analizados mediante la plataforma Affimetrix como por resultar funcionalmente relevantes en la

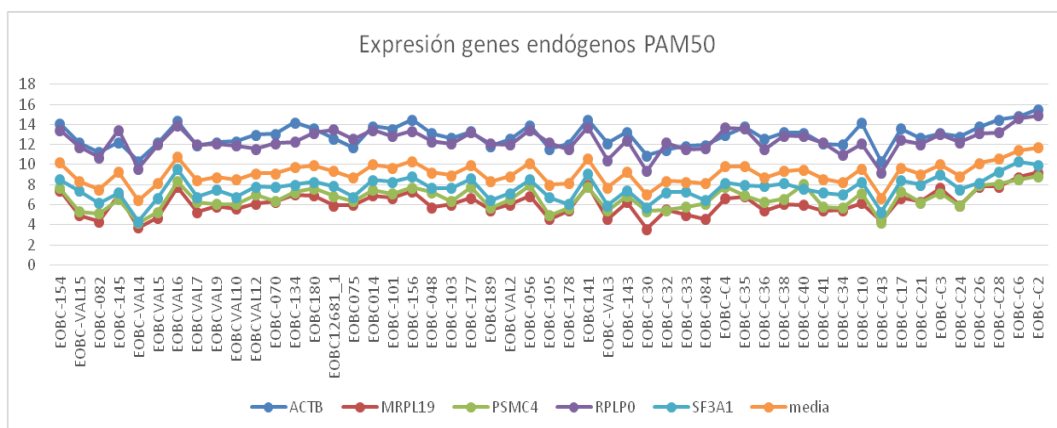
bibliografía. Se utilizó la prueba de Mantel-Cox. En los análisis de la supervivencia, la prueba de Mantel-Cox (conocida a veces como la prueba logrank) es una técnica estadística no paramétrica utilizada para contrastar las funciones de supervivencia de dos poblaciones. Realizamos el estudio en las pacientes jóvenes y mayores que tuvieron al diagnóstico afectación axilar por el cáncer de mama y hubieran sido utilizadas en el chip de la plataforma Affimetrix. Se realizó el estudio en las 11 pacientes jóvenes con afectación axilar y en las 2 mayores que tenían metástasis axilares por cáncer de mama. Se revisó si habían presentado alguna recaída y el tiempo desde el diagnóstico hasta la misma. Con estos datos estudiamos si existía alguna relación entre las pacientes con afectación axilar y los miRNAs anteriores. No se observaron diferencias significativas en ninguno de ellos, probablemente debido al poco número de casos estudiados, aunque como podemos ver en la Figura 17 el miR-30 muestra valores de p cercanos a la significación ( $p = 0.080$ ). Las pacientes con afectación axilar y con el miR-30 reprimido tienen menor SG que aquellas que lo tienen sobreexpresado y la diferencia es más evidente en mujeres jóvenes, dado que 7 de ellas lo tienen reprimido y 4 han fallecido, mientras que la paciente mayor que lo tiene reprimido sigue viva y sin recaída por la enfermedad. El resto de pacientes lo tienen sobreexpresado y todas ellas están vivas.





**Figura 17.** Supervivencia Global en jóvenes y mayores con cáncer de mama y metástasis axilares en función de la expresión de los miRNAs relevantes. En rojo observamos la curva de supervivencia si el miRNA a estudio se encuentra sobreexpresado. En verde vemos la curva de supervivencia si el miRNA a estudio se encuentra reprimido.

Con estos datos obtenidos basados en miRNAs, nos propusimos estudiar los 110 genes (incluyendo los 5 genes housekeeping o endógenos, que son ACTB, MRPL19, PSMC4, RPL0 y SF3A1) expresados en cada muestra de las remitidas para la realización de PAM50. En el Anexo IV se expone la expresión de cada uno de los genes en cada una de las muestras tumorales. Posteriormente, con el fin de determinar, si al igual que con miRNAs, con la expresión génica obtenida de la plataforma PAM50 existían diferencias en el patrón genético de expresión entre los tumores de las pacientes muy jóvenes y de las mayores, llevamos a cabo un análisis de expresión diferencial con la herramienta online POMELO II (<http://asterias.bioinfo.cnio.es>). Se realizó un t-test con 20000 permutaciones. Los resultados estadísticos se corrigieron por múltiples comparaciones mediante FDR (tasa de falso positivo de Benjamini y Hochberg). Los genes con un FDR p-valor  $< 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos y se obtuvo un perfil genético diferenciador (Tabla 13):



**Figura 18.** Expresión de los genes endógenos en cada muestra tumoral estudiada.

<b>NOMBRE GEN</b>	<b>UNADJ,P</b>	<b>FDR_INDEP</b>	<b>OBS_STAT</b>
<b>UBE2C</b>	0,00034	0,0244734	4,041861
<b>GNG11</b>	0,00065	0,0244734	-3,700198
<b>CDC20</b>	0,0008349	0,0244734	3,66326
<b>VIM</b>	0,0008899	0,0244734	-3,546425
<b>MELK</b>	0,0012649	0,0278282	3,423547
<b>ANLN</b>	0,0022799	0,0377031	3,296306
<b>CRYAB</b>	0,0024748	0,0377031	-3,249624
<b>ANGPTL4</b>	0,0028248	0,0377031	-3,198303
<b>CCNB1</b>	0,0030848	0,0377031	3,162332
<b>VAMP8</b>	0,0035398	0,0389375	-3,115691
<b>CENPF</b>	0,0054196	0,0522924	2,942082
<b>MYBL2</b>	0,0057046	0,0522924	2,923696
<b>MKI67</b>	0,0096694	0,0818178	2,681036
<b>MPP1</b>	0,0134141	0,0997635	-2,610869
<b>RB1</b>	0,0136041	0,0997635	-2,526636
<b>CAV1</b>	0,0176289	0,1196658	-2,480362
<b>SF3A1</b>	0,0184938	0,1196658	-2,450201
<b>RAD17</b>	0,0214236	0,1266918	2,381769
<b>CCNE1</b>	0,0227485	0,1266918	2,362884
<b>SLC16A3</b>	0,0249384	0,1266918	2,318452
<b>F11R</b>	0,0243284	0,1266918	2,314732
<b>BIRC5</b>	0,0253384	0,1266918	2,312811
<b>EXO1</b>	0,0286881	0,1372041	2,265629
<b>ERBB4</b>	0,0334478	0,1471704	-2,206695
<b>FBN1</b>	0,0321979	0,1471704	-2,2035
<b>GPR160</b>	0,0353927	0,1497383	-2,177043
<b>SH2B3</b>	0,0397674	0,1617681	-2,115988
<b>MDM2</b>	0,0411773	0,1617681	2,091763
<b>ORC6L</b>	0,0445621	0,1690287	2,074758

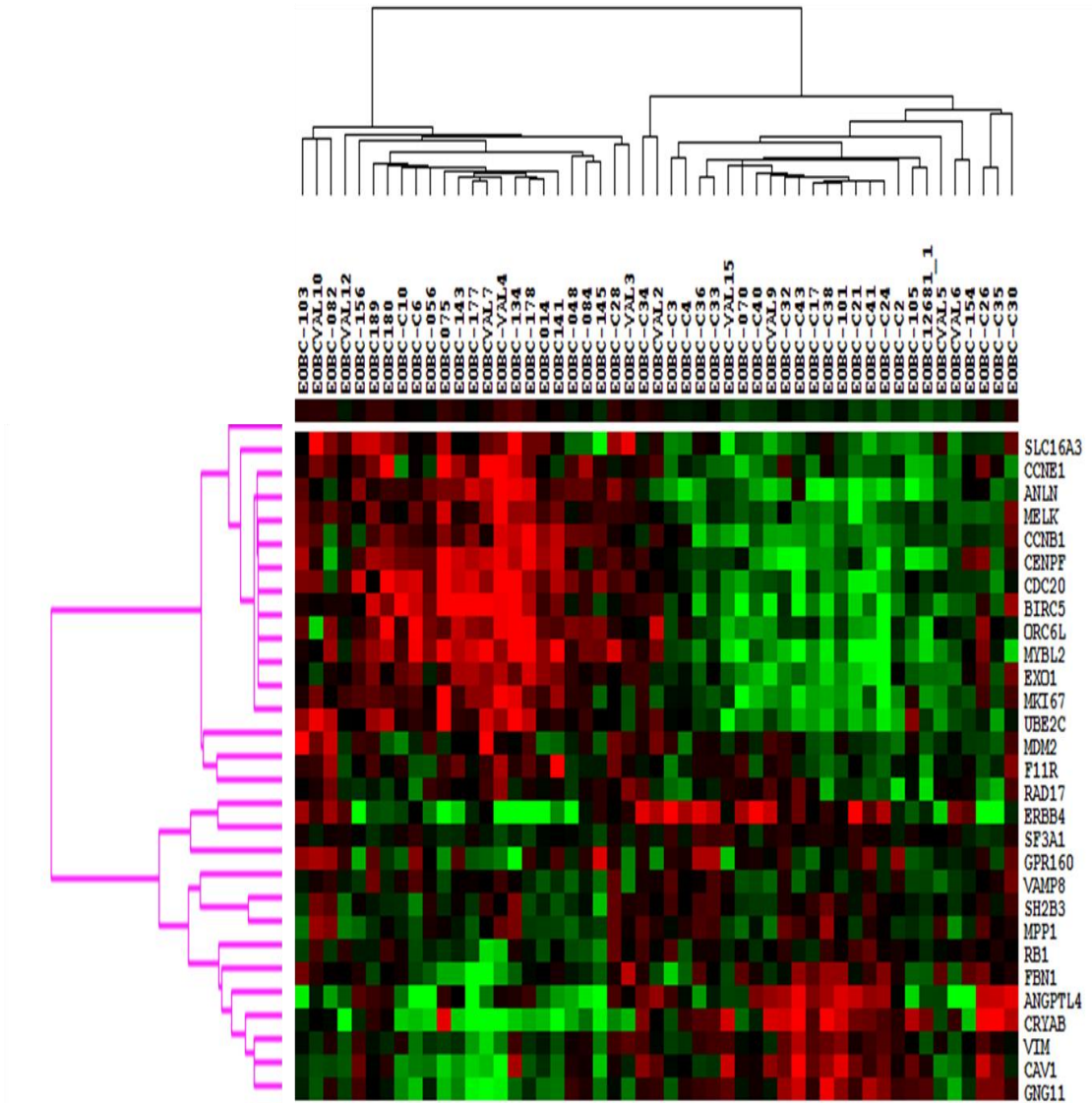
**Tabla 13.** Genes significativos ( $p < 0.005$ ) diferenciales entre los tumores de mujeres jóvenes y mayores. Basado en los resultados obtenidos mediante la plataforma genética PAM50.

Obtuvimos este resultado, viendo como la expresión de 29 genes diferencia genéticamente los tumores de cáncer de mama de mujeres jóvenes y mayores. Estos 29 genes están relacionados con cáncer y más específicamente con cáncer de mama. Confirmando no sólo con la expresión de miRNAs, sino también con la expresión génica que los tumores de mujeres mayores y jóvenes son genéticamente diferentes. Posteriormente se realizó una búsqueda bibliográfica de cada uno de estos genes: el gen UBE2C está implicado en la proliferación celular y la distorsión del ciclo celular, se ha asociado con la diferenciación tumoral en cancer de mama, ovario, pulmón, y vejiga. El gen GNG11 es un miembro del complejo de las proteínas G, que juega un importante papel en la señal transmembrana de las células, la represión de su expresión se ha asociado a linfomas esplénicos. El gen CDC20 codifica para una proteína esencial en la regulación del ciclo celular y cuya función esencial es activar el complejo que promueve la anafase (APC/C). El gen VIM codifica una proteína fibrosa que forma los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular, su función es mantener la integridad física de la célula y las uniones intercelulares. El gen MELK, actua como un regulador del ciclo celular y activa la apoptosis y juega un papel esencial en la proliferación celular y carcinogénesis. El gen ANLN, codifica para una proteína de unión implicada en el crecimiento y la migración, sus mutaciones se han relacionado con glomeruloesclerosis y cáncer. El gen CRYAB codifica para dos proteínas implicadas en prevenir la agregación proteínica, en inhibir la apoptosis y en contribuir en la arquitectura

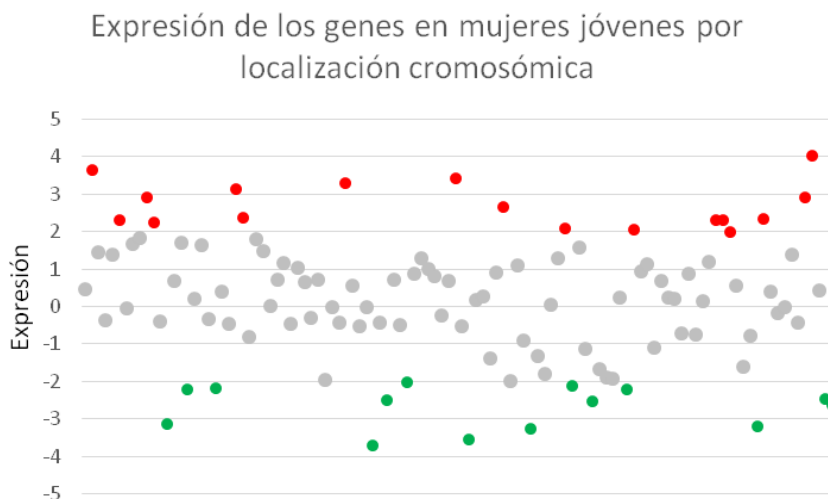
intracelular. El gen *ANGPTL4* juega un importante papel en numerosas neoplasias y en la formación de metástasis modulando la permeabilidad vascular, la movilidad celular y la invasión. El gen *CCNB1* codifica para la proteína ciclina B1, que es una proteína reguladora implicada en la mitosis celular, su alteración se ha implicado con una gran variedad de neoplasias. El gen *VAMP8* codifica para una proteína implicada en la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana presináptica. El gen *CENPF* codifica la proteína centromérica F, y cuya función principal se lleva a cabo en la fase G2 del ciclo celular. El gen *MYBL2* es un gen de proliferación celular implicado en múltiples estudios en cáncer de mama. El gen *MKI67* codifica para la proteína Ki 67, asociada a proliferación celular e implicada en multitud de neoplasias. El gen *MPP1* codifica para una proteína de unión intracelular que está implicada en la regulación de la proliferación celular y las uniones intracelulares. El gen *RB1* codifica para la proteína del retinoblastoma, una proteína supresora de tumores que se encuentra alterada en muchos tipos de cáncer. El gen *CAV1* codifica la proteína *CAV1* (caveolina-1), que es la principal componente de las caveolas formadas en la membrana plasmática de la mayoría de tipos celulares. El gen *CAV1* es un regulador negativo de la cascada Ras-p42/44 MAPK. El gen *SF3A1* codifica una proteína del complejo de splicing factor 3 que juega un importante papel en la unión pre-mRNA. El gen *RAD17* codifica para la proteína *RAD17*, implicada en la regulación del ciclo celular. El gen *CCNE1* codifica para la ciclina E1 que actúa como reguladora del ciclo celular y la

mitosis. El gen SLC16A3 codifica para una proteína implicada en la glicolisis. El gen F11R está implicado en la adhesión plaquetar. El gen BIRC5 codifica para una proteína con actividad ubiquitin-transferasa implicada en la ubiquitinización proteica y en la mitosis celular. El gen EXO1 codifica para la exonucleasa 1, implicada en la respuesta inmune y en la reparación del DNA, entre otros. Del gen ERBB4 ya hemos hablado en la introducción. El gen FBN1 codifica para la proteína fibrilina 1 que actúa como un componente estructural de las microfibrillas que unen el calcio. El gen GPR160 codifica para un receptor de membrana con actividad en la regulación de la acetilación de histonas y en la transcripción genética. El gen SH2B3 está relacionado con la hematopoyesis y la regulación de la señal de las citoquinas. El gen MDM2 es un oncogén que codifica la proteína mdm2 que es un importante regulador negativo del supresor tumoral p53. Por último, el gen ORC6L está implicado en la coordinación de la replicación cromosómica.

En la Figura 19, donde se representa el cluster diferencial de los 29 genes en función de la edad de las pacientes, podemos ver como existen dos subgrupos genéticamente diferenciados. Las 26 muestras a la derecha (hasta la muestra VAL2) corresponden a pacientes jóvenes (excepto 3 mayores: C-10, C28 y C34) y de las muestras de la izquierda 17 corresponden a pacientes mayores. En color rojo se representan los genes sobreexpresados y en color verde los genes reprimidos.



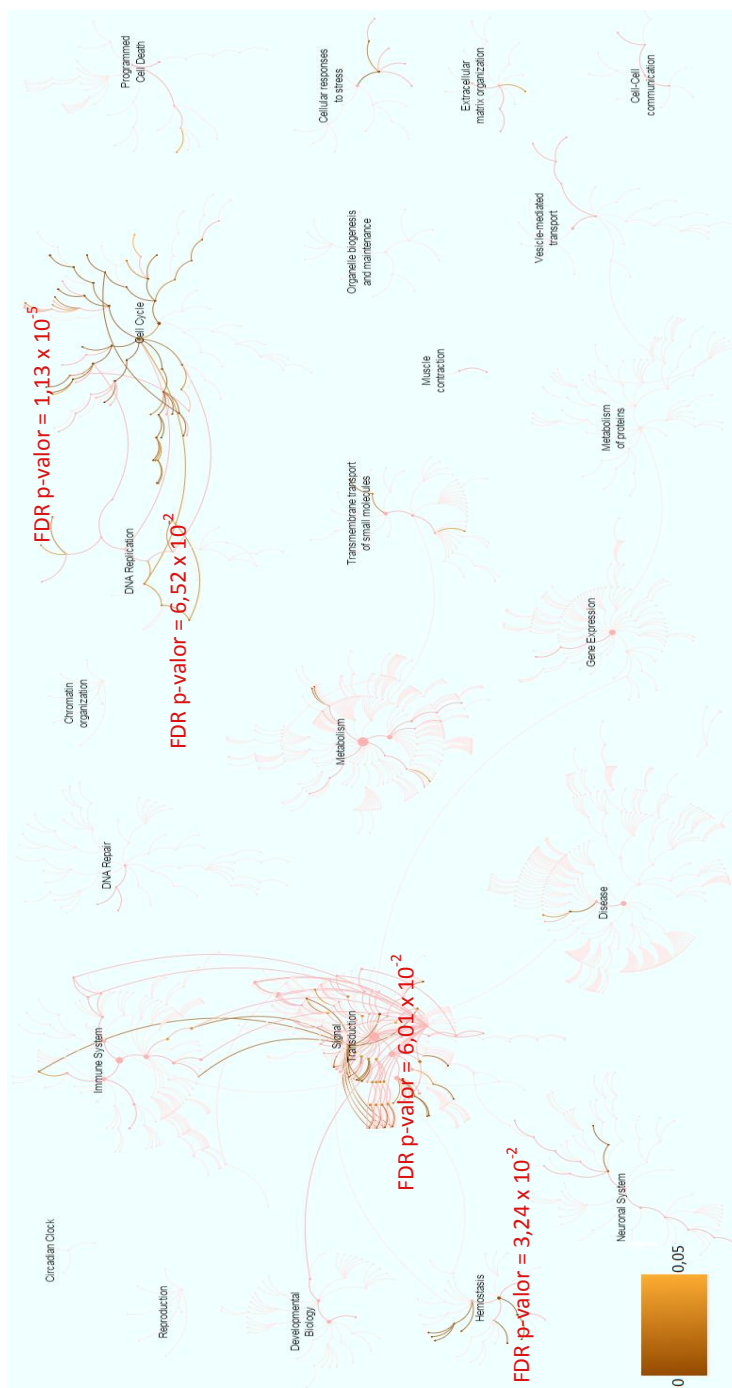
**Figura 19.** Cluster genético diferencial basado en PAM50 entre las muestras tumorales de cáncer de mama de mujeres jóvenes y mayores. El color rojo indica los genes sobreexpresados y el color verde los genes reprimidos.



**Figura 20.** Expresión de los genes diferenciales en mujeres jóvenes por localización cromosómica. Datos en rojo representan genes sobreexpresados y Datos en verde genes reprimidos.

Posteriormente hicimos un análisis bioinformático con los datos de los genes diferencialmente expresados en mujeres jóvenes, para ello utilizamos las herramientas online Reactome, Biocarta y Go ontology. Y observamos que los genes alterados en los tumores de nuestras pacientes jóvenes estudiadas están relacionados de una forma estadísticamente significativa con el ciclo celular ( $FDR= 1,13 \times 10^{-5}$ ), la transducción de señales ( $FDR= 6,01 \times 10^{-2}$ ), la hemostasis ( $FDR= 3,24 \times 10^{-2}$ ) y la replicación de DNA ( $FDR= 6,52 \times 10^{-2}$ ), entre otros. Dentro de los genes implicados en la transducción de señales y que la bioinformática nos indica que se encuentran alterados en los tumores de las mujeres jóvenes de nuestra serie se encuentran; erbB4, erbB2, c-Kit, VEGF, PDGF, EGFR, FCFR, NGF y el receptor de insulina. Todos ellos conocidos por su implicación con el desarrollo del cáncer. (Figura 21,22 y 23)

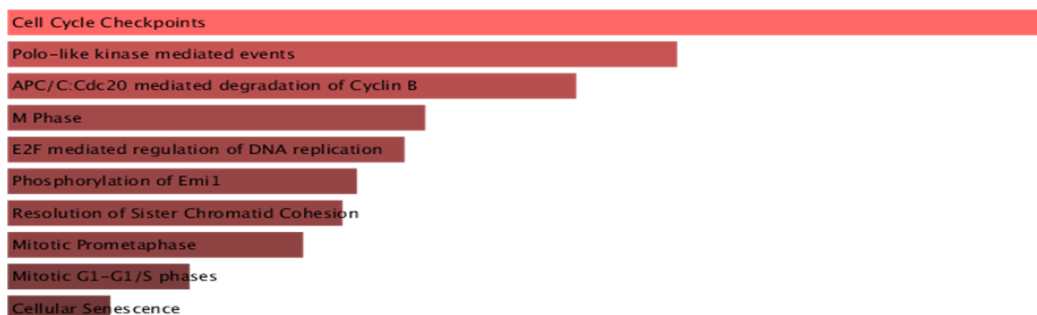




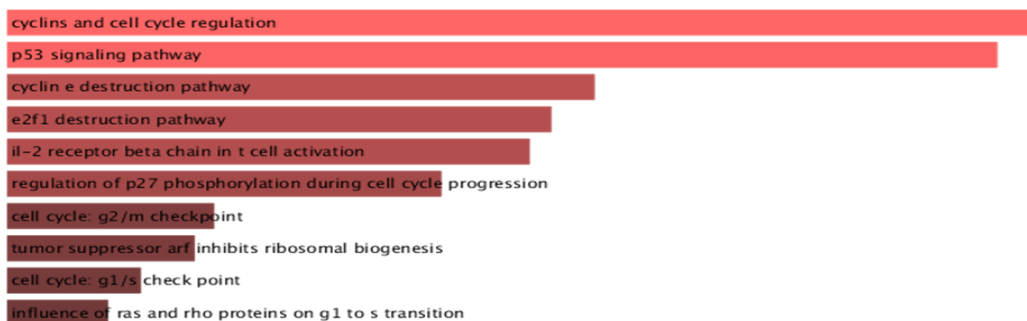
**Figura 21.** Rutas desreguladas por los genes diferenciales en los tumores de cáncer de mama de las mujeres jóvenes. Modificada de Reactome ([www.reactome.org](http://www.reactome.org))

Pathway name	Entities found	Entities Total	Entities ratio	Entities pValue	Entities FDR	Reactions found	Reactions total	Reactions ratio
GAB1 signalosome	3	124	0.012	9.53E-3	3.81E-2	2	38	0.005
Nuclear signaling by ERBB4	2	44	0.004	1.07E-2	4.26E-2	15	29	0.004
RHO GTPases Activate Formins	3	135	0.013	1.5E-2	4.79E-2	3	27	0.003
Glucagon-like Peptide-1 (GLP1) regulates insulin secretion	2	48	0.005	1.26E-2	5.03E-2	3	11	0.001
S Phase	3	140	0.014	1.32E-2	5.28E-2	6	52	0.006
Vasopressin regulates renal water homeostasis via Aquaporins	2	50	0.005	1.36E-2	5.43E-2	3	14	0.002
G beta:gamma signalling through PI3Kgamma	2	52	0.005	1.46E-2	5.85E-2	2	4	0
Condensation of Prophase Chromosomes	2	53	0.005	1.52E-2	6.01E-2	4	10	0.001
G-protein beta:gamma signalling	2	57	0.006	1.74E-2	6.01E-2	4	6	0.001
G alpha (z) signalling events	2	57	0.006	1.74E-2	6.01E-2	4	8	0.001
Neurotransmitter Receptor Binding And Downstream Transmission In The Postsynaptic Cell	3	158	0.016	1.82E-2	6.01E-2	3	52	0.006
p53-Dependent G1 DNA Damage Response	2	60	0.006	1.91E-2	6.01E-2	2	10	0.001
p53-Dependent G1/S DNA damage checkpoint	2	60	0.006	1.91E-2	6.01E-2	2	10	0.001
DNA Damage/Telomere Stress Induced Senescence	2	63	0.006	2.09E-2	6.01E-2	2	16	0.002
G1/S DNA Damage Checkpoints	2	63	0.006	2.09E-2	6.01E-2	2	16	0.002
Assembly of the ORC complex at the origin of replication	1	6	0.001	2.1E-2	6.01E-2	1	5	0.001
APC/C:Cdc20 mediated degradation of Securin	2	64	0.006	2.16E-2	6.01E-2	3	3	0
Aquaporin-mediated transport	2	65	0.006	2.22E-2	6.01E-2	3	24	0.003
G2/M DNA replication checkpoint	1	7	0.001	2.44E-2	6.01E-2	2	2	0
APC/C:Cdh1 mediated degradation of Cdc20 and other APC/C:Cdh1 targeted proteins in late mitosis/early G1	2	69	0.007	2.48E-2	6.01E-2	4	4	0

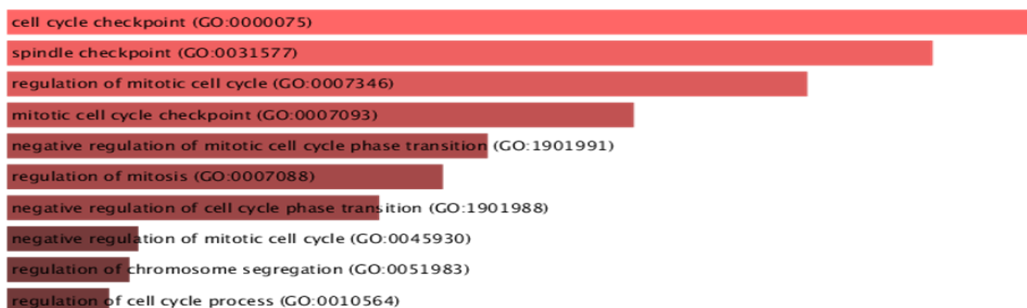
**Figura 22.** Rutas desreguladas por los genes diferenciales en los tumores de cáncer de mama de las mujeres jóvenes. Modificada de Reactome ([www. Reactome.org](http://www.Reactome.org))



### Reactome

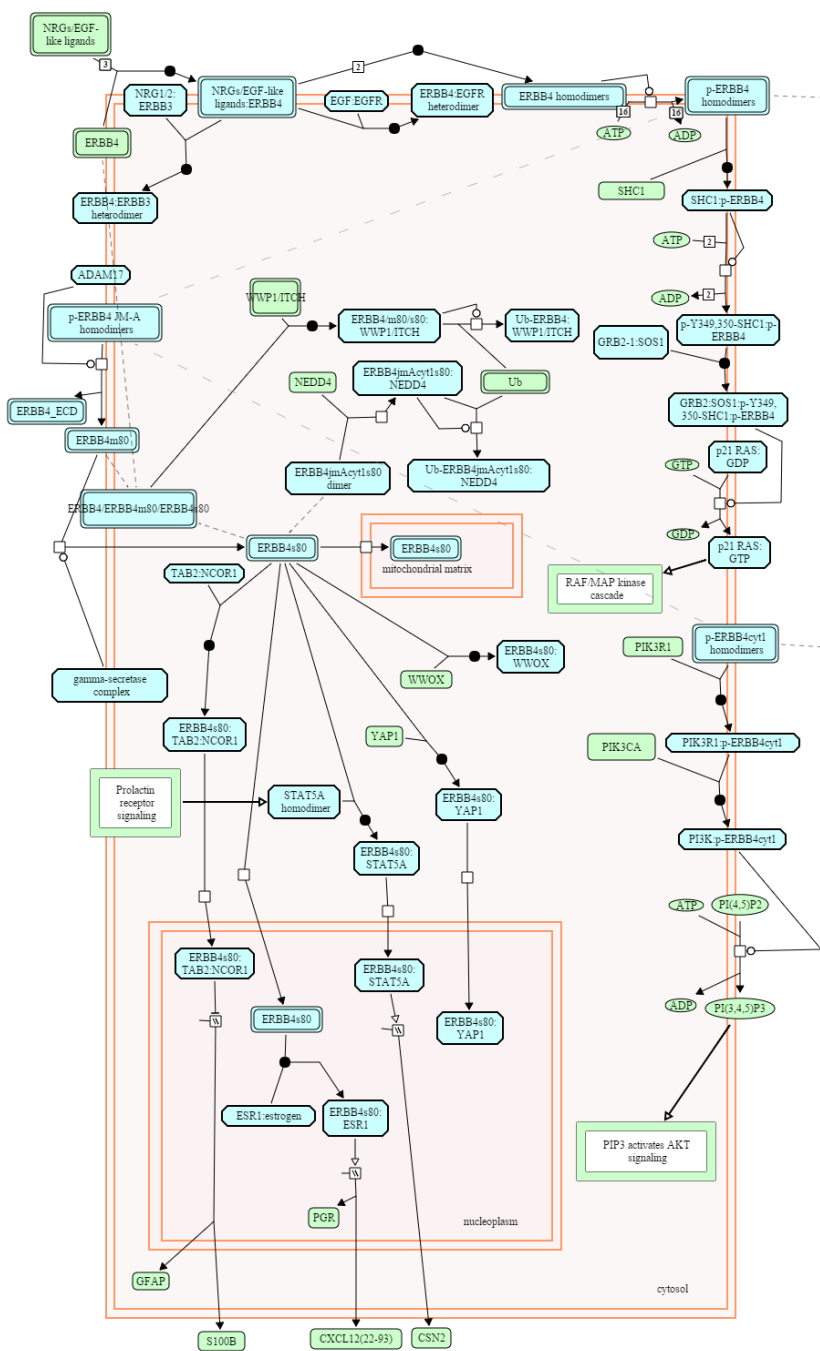


### Biocarta Pathways



### Gene Ontology Biological Process

**Figura 23.** Rutas genéticas desreguladas en los tumores de cáncer de mama de mujeres jóvenes en base a las herramientas online biocarta, GO y reactome.



**Figura 24.** Ruta del gen erbB4. Su expresión se encuentra alterada en los tumores de mujeres jóvenes de nuestra serie ([www.Reactome.org](http://www.Reactome.org)).

### **V.5.3. Expresión inmunohistoquímica de *cerbB4* en los tumores de cáncer de mama de mujeres jóvenes y mayores.**

Dado que los tumores de las pacientes muy jóvenes con cáncer de mama presentaban una diferente expresión del gen *erbB4* en comparación con los tumores de las pacientes mayores, tanto mediante el estudio de miRNAs como por la plataforma genómica PAM50, se decidió el estudio mediante IHQ de la expresión de este gen.

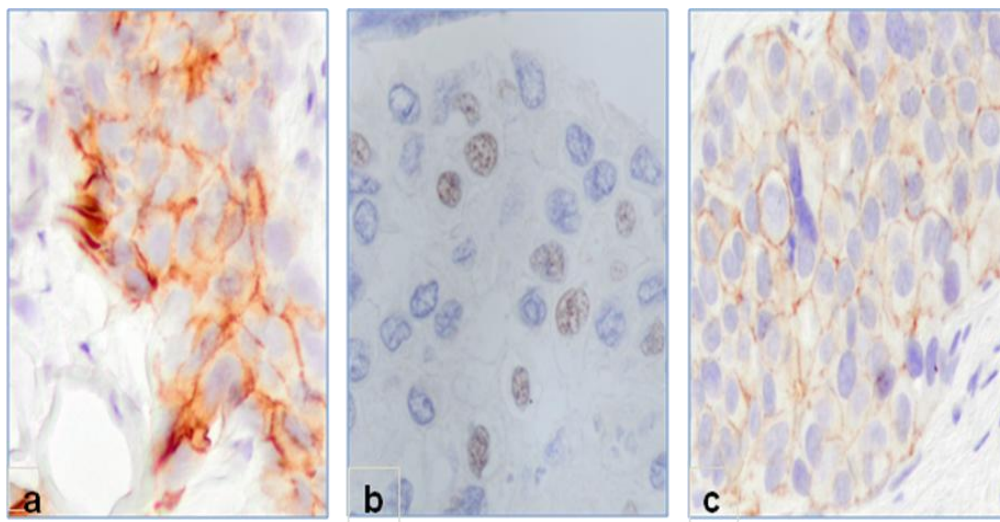
Se evaluó la tinción celular (nuclear y citoplasmática) en 81 muestras de cáncer de mama de las pacientes muy jóvenes y en 52 mayores. Finalmente en cuatro de las jóvenes no quedaba muestra tumoral suficiente y en una de las mayores, de modo que material válido tenemos de 77 tumores de mujeres jóvenes y de 51 tumores malignos de mama de mujeres mayores.

Se consideró una sobreexpresión de *erbB4* positiva si la expresión de la membrana y/o nuclear era de  $> 10\% \rightarrow 30\%$  (3+/2+), en el caso de ausencia de tinción o tinción débil membrana/nuclear incompleta (0/1+) se consideró negativo.

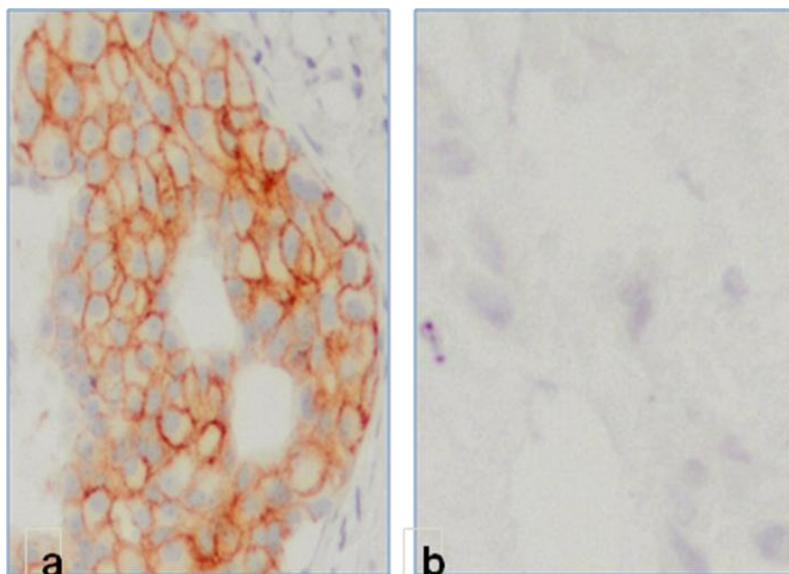
De las 77 mujeres jóvenes estudiadas, 15 son *cerbB4* positivas (2+/3+), lo que supone un 20% del total, 12 de ellas son también HER2 positivas (un 80%), de estas 7 con RH negativos y 5 con RH positivos. 2 presentan un tumor Luminal A (un 13%) y 1 tiene un perfil Triple negativo (7%).

De las 51 mujeres mayores con cáncer de mama estudiadas, 8 son HER4 positivas (supone un 16% del total), y todas ellas son HER2 positivas (un 100%).

De las 12 jóvenes HER2/HER4 positivas, todas habían recibido trastuzumab neo/adyuvante, y cuatro han recaído (un 33.3%, 2 con RH positivos y 2 con RH negativos) y de estas, tres han fallecido por la enfermedad. De las 8 pacientes mayores con cáncer de mama HER2/HER4 positivo no ha recaído por su cáncer de mama ninguna de ellas.



**Figura 25.** Representación de la expresión inmunohistoquímica de erbB4 en las mujeres jóvenes con cáncer de mama estudiadas. a. Mujer < 35 años. Perfil HER2 puro, erbB4 positivo (2+/3+ en membranas). b. Mujer < 35 años. Perfil Luminal A, erbB4 2+ en núcleos tumorales. c. Mujer < 35 años. Perfil Luminal/HER2. erbB4 negativo (1+en membranas)



**Figura 26.** Representación de la expresión inmunohistoquímica del gen erbB4 en las mujeres mayores con cáncer de mama estudiadas. a. Paciente postmenopáusica. Perfil HER2 puro, erbB 4 positivo (tinción de membrana 2+). b. Paciente postmenopáusica. Perfil Triple negativo, erbB 4 negativo (Score 0)





## **Discusión**

---



## VI. DISCUSIÓN

El cáncer de mama es una enfermedad que habitualmente encontramos en mujeres mayores, menos del 7.5% de todas las mujeres diagnosticadas de cáncer de mama anualmente serán menores de 40 años (193).

La definición de juventud en estos casos es controvertida. El corte de edad varía entre los 30 y los 40 años. En las pacientes menores de 35 años, el riesgo de muerte por cáncer de mama se incrementa alrededor de un 5% por cada año en que se reduce dicha edad. Mientras que este hecho no se observa en las pacientes de 35 a 50 años(201). Es por esta razón, que en muchos trabajos se ha definido que los 35 años son el corte de edad razonable para definir el cáncer de mama de mujeres muy jóvenes.

Nuestros resultados indican que el cáncer de mama de mujeres muy jóvenes, menores de 35 años, presenta características que sugieren mayor agresividad biológica, con mayor tamaño tumoral, pobremente diferenciados, y con una alta frecuencia de afectación ganglionar axilar en comparación con los tumores de las pacientes que se diagnostican a mayor edad. Y hemos podido comprobar que estas diferencias no son debidas a un retraso en el diagnóstico, sino que, genéticamente los tumores de las mujeres jóvenes son distintos de los tumores de mujeres mayores, con

activación de vías genéticas diferentes. Confirmando que el cáncer de mama de las mujeres jóvenes es una entidad biológica única.

Los resultados que hemos obtenido demuestran que la edad de la paciente en el momento del diagnóstico es una importante variable a la hora de determinar el pronóstico del cáncer de mama. Además de las características clinicopatológicas, las pacientes diagnosticadas de un cáncer de mama con una edad  $\leq$  de 35 años tienen una menor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global que aquellas pacientes de mayor edad.

Aunque las comparaciones con otros artículos publicados pueden ser difíciles, sobretodo por las diferencias en la población de estudio (dado que muchos estudios se han realizado en otras poblaciones como la asiática), el número de pacientes analizadas, y la forma de analizar y presentar los datos obtenidos, nuestros resultados han sido congruentes con los de otros autores.

## **VI. 1. DIFERENCIAS CLÍNICAS ENTRE EL CÁNCER DE MAMA DE MUJERES JÓVENES Y MAYORES**

En el año 2012 se publica el estudio GRELL, dónde se evalúa la incidencia de cáncer de mama en mujeres menores de 40 años desde el año 1990 al 2008 en Europa. Treinta y siete registros europeos poblacionales fueron consultados, entre ellos los españoles, y se concluye que en los últimos años se está

evidenciando un aumento en la incidencia de cáncer de mama en mujeres menores de 35 años, y este aumento podría estar relacionado con la disminución de la edad de la menarquía, el aumento de la edad en los embarazos, la obesidad o el consumo de alcohol (202).

Pollán y colaboradores también estudian la incidencia de cancer de mama en España desde la implantación de los programas de screening (203), evidenciando también un moderado incremento del cáncer de mama en las mujeres menores de 45 años españolas, debido a factores genéticos y también a los cambios reproductivos que hemos sufrido las mujeres españolas en los últimos 20 años, siendo nuestro país uno de los países desarrollados dónde más se ha observado la disminución de la fertilidad y de la edad de la menarquía y el aumento en la edad del primer embarazo. Pudiendo contribuir todos estos factores en el riesgo individual de cáncer de mama.

Con estos datos quisimos estudiar si en nuestra población de 258 mujeres muy jóvenes podíamos observar también esa tendencia en los cambios reproductivos españoles.

Nuestros datos confirman lo descrito anteriormente, dado que previo al año 2000 se diagnosticaron en nuestro centro 60 pacientes menores de 36 años (un 23%) y en los últimos años se han diagnosticado el resto (un 77%).

Los resultados de nuestro trabajo muestran que en los últimos 15 años el porcentaje de las pacientes diagnosticadas de

cáncer de mama que tienen la menarquía a edades menores de 11 años ha aumentado, aunque las diferencias no sean estadísticamente significativas si que apoya la hipótesis de Pollán y colaboradores en cuanto a los cambios reproductivos y en el estilo de vida de las mujeres españolas jóvenes. Lo mismo ocurre en el caso del embarazo y la edad en que tiene lugar el primero. Aunque las diferencias no sean significativas, antes del año 2000 de las pacientes jóvenes diagnosticadas menores de 35 años, un 68% habían tenido, al menos, un embarazo a término. En los últimos 14 años ese porcentaje disminuye un 16%. Y aunque en el caso de la edad del primer embarazo las diferencias no sean tampoco estadísticamente significativas ( $p = 0.79$ ) podemos observar un cambio de tendencia a tener hijos a edades más mayores.

Nuestros resultados nos muestran también que en los últimos 10 años estamos asistiendo a un aumento de las pacientes jóvenes diagnosticadas durante la gestación. Pasando de un 1.7% en los diagnósticos previos al año 2000, a un 6% en los últimos 6 años. Como también a un aumento en el diagnóstico de mujeres en periodo de lactancia, pasando de un 1% previo al año 2008 a un 4% en los últimos 6 años.

Leclercq y colaboradores (202) indican también que entre los factores a considerar como causantes de este aumento de cáncer de mama en mujeres jóvenes estarían la obesidad y el consumo de alcohol. En nuestra serie de pacientes con los datos que poseemos no podemos apoyar ni refutar esta hipótesis, dado que, en España los índices de obesidad en el momento actual continúan siendo

bajos, al menos en las pacientes jóvenes y en las mayores estudiadas. En cuanto al consumo de alcohol, aunque inicialmente estaba entre nuestros objetivos estudiarlo, pocas son las mujeres que confiesan un consumo de alcohol, por lo que de este dato tampoco se pueden extraer conclusiones de las pacientes de nuestra serie.

## **VI. 2. DIFERENCIAS ANATOMOPATOLÓGICAS ENTRE EL CÁNCER DE MAMA DE MUJERES JÓVENES Y MAYORES Y ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA POR SUBGRUPOS**

En nuestra serie no se han detectado diferencias en la distribución de los subtipos histológicos tumorales entre mujeres muy jóvenes y mayores, siendo el carcinoma ductal el subtipo más frecuente. Los datos de la literatura a este respecto describen el mismo fenómeno (193).

Los resultados de múltiples estudios indican que existe una elevada proporción de factores pronósticos adversos en mujeres con cáncer de mama  $\leq 35$  años en comparación con pacientes más mayores. Mayor porcentaje de sobreexpresión de HER2, mayor frecuencia de RE negativos, mayor GH y mayor Ki 67 se ha encontrado sobrerrepresentado en mujeres jóvenes (195, 204-209).

Nuestros resultados nos indican que los tumores de mujeres muy jóvenes exhiben mayor tamaño, con menor diferenciación celular y mayor afectación ganglionar axilar que las pacientes con cáncer de mama de mayor edad. Estas diferencias son un constante en la mayor parte de los estudios que analizan los tumores procedentes de mujeres jóvenes y los comparan con aquellos de mujeres mayores (196, 210-213).

En cuanto a los factores pronósticos moleculares, nuestros datos muestran que tanto en los tumores de mujeres jóvenes como en los de las mayores existe un alto porcentaje de expresión de RE y RP (un 70% de las pacientes jóvenes tienen RE positivos frente a un 71% de las pacientes mayores). Siendo esta positividad mayor que la descrita en otras series como en la de Karihtala et al. En cuanto a la sobreexpresión del gen HER2 nuestros datos demuestran que las pacientes jóvenes tienen mayor porcentaje de tumores HER2 positivos (un 28% frente a un 22% en mujeres mayores, aunque también es importante señalar que el estado de HER2 es desconocido en un 18% de las mujeres jóvenes de nuestra serie). Los datos existentes publicados a este respecto son variables, en algunas de las series no se encuentran diferencias(193, 196) y en otras se objetiva un aumento de la amplificación de HER2 (192, 194, 198, 209, 214, 215).

En cuanto al índice de proliferación Ki 67, en la mayor parte de la bibliografía consultada no se describen las diferencias en este



factor entre mayores y jóvenes, o simplemente se describe como positivo o negativo (193). En nuestra serie podemos observar que en los tumores de mujeres jóvenes la mayor parte, un 81%, tiene un Ki 67 > 14%, frente al 72% de las mujeres mayores.

En lo que a los subtipos inmunohistoquímicos se refiere, nuestros resultados muestran un aumento de los tumores HER2 puro y Luminal/HER2 en los cánceres de mama de mujeres jóvenes.

En lo que respecta al tratamiento locoregional de la mama y de la axila no existen diferencias estadísticamente significativas entre la cirugía de las pacientes más jóvenes y la de las mayores en nuestra serie. Donde sí evidenciamos diferencias estadísticamente significativas es en el cambio de cirugía en los últimos años en las mujeres jóvenes, a favor de cirugías de mama y axila más conservadoras ( $p < 0.005$ ). Lo cual es congruente con que en los últimos años la tendencia es a ser lo menos agresivos posible para conseguir una menor morbilidad en las pacientes. Desde el año 1970 se han publicado 6 estudios aleatorizados que comparan la cirugía conservadora seguida de radioterapia con la mastectomía. Los resultados de estos estudios ponen de manifiesto que el tratamiento conservador de la mama es tan satisfactorio para pacientes con ganglios negativos como positivos. Y recientemente se han publicado los resultados del ensayo EORTC 10801, donde tras 20 años de seguimiento se evidencia que la cirugía conservadora seguida de radioterapia es similar a la mastectomía en

términos de supervivencia global (216) (217, 218). A estos estudios se unen los resultados del ensayo NSABP B-04104 en los que se compara la mastectomía radical, la mastectomía simple con RT y la mastectomía simple en estadios iniciales sin afectación ganglionar y donde no se ha demostrado, con 25 años de seguimiento, mejoría en la supervivencia global de las pacientes que habían recibido tratamiento regional axilar (linfadenectomía o radioterapia). Por lo tanto, se considera que la linfadenectomía axilar es una técnica diagnóstica y sólo se considera terapéutica si existe afectación ganglionar(219).

En nuestros dos grupos de análisis, no existen diferencias entre las pacientes  $\leq 35$  años y las  $>$  de 45 años en cuanto al tipo de agente quimioterápico utilizado, únicamente podemos ver que en pacientes jóvenes sólo un 4% recibe como tratamiento único hormonoterapia (sin quimioterapia) frente a un 24% en mayores. Ello es probablemente al mayor número de factores pronósticos agresivos que exhiben los tumores de las pacientes jóvenes de nuestra serie.

En cuanto a si las pacientes que hemos analizado reciben tratamiento adyuvante o neoadyuvante, observamos que en los últimos años existe un aumento en la quimioterapia neoadyuvante (siendo en jóvenes este dato estadísticamente significativo) lo que concuerda con lo descrito en la literatura, dado que, aunque no se ha demostrado que exista un aumento en la SLP ni en la SG en

aquellas mujeres que reciben neoadyuvancia versus aquellas que reciben adyuvancia, se ha podido saber mucho más acerca de la biología del tumor gracias a los estudios de quimioterapia neoadyuvante (220-222). La quimioterapia neoadyuvante nos aporta información también acerca de la respuesta patológica tras la cirugía (sobre todo en aquellos tumores en los que conseguimos una RCP) y de las modificaciones biológicas tumorales. En nuestras pacientes podemos observar, aunque las diferencias no sean estadísticamente significativas, que en el caso de las pacientes > 45 años, existe un mayor porcentaje de RCP tras la neoadyuvancia que en las pacientes jóvenes. Y en ambos grupos el mayor porcentaje de RCP es para los tumores HER2 puros (223).

En lo que a la asociación con mutaciones genéticas se refiere, vemos que las mutaciones en los genes BRCA son mucho más frecuentes en las mujeres jóvenes que hemos estudiado que en las pacientes mayores, (en las mujeres mayores de las 8 pacientes estudiadas porque cumplían criterios de estudio de mutaciones en los genes BRCA, ninguna de ellas expresa ningún tipo de alteración en dichos genes) lo que reafirma diferentes estudios publicados a ese respecto (224, 225). Nuestros resultados muestran también que de las pacientes jóvenes en las que se estudió la mutación de los genes BRCA, de las que tenían tumores perfil Luminal un 24,4% presentan mutación en BRCA, un 22,2% de los HER2 puros, un 21,4% de los Luminal/HER2, y un 53,3% de los triple negativos. Aunque la diferencia no sea estadísticamente significativa;  $p=0.147$ ;

vemos indicios de mayor frecuencia de pacientes con tumores triple negativos que son mutadas para BRCA, más de la mitad de las mujeres triple negativas estudiadas tienen la mutación. Tal y como se ha descrito previamente en la literatura publicada. (226).

En cuanto a los análisis de recaída por la enfermedad y supervivencia global de nuestras pacientes estudiadas, vemos que casi la mitad de las mujeres jóvenes diagnosticadas, un 45%, han presentado una recaída por el cáncer de mama frente al 21% de las mujeres mayores. No parece asociarse ningún subtipo inmunohistoquímico a mayor riesgo de recaída ni en jóvenes ni en mayores, dado que las diferencias no son estadísticamente significativas. Pero sí parece que la afectación axilar tiene una relación estadísticamente significativa con el riesgo de recaída en mujeres jóvenes, y se mantiene la significación si además de afectación axilar asociamos el subtipo Luminal/HER2. Siendo la afectación axilar un factor pronóstico histológico independiente. Tal y como también describen en su serie de pacientes Karihtala y colaboradores y recientemente Zhao y colaboradores (193, 227).

Por lo que respecta al fallecimiento por cáncer de mama, vemos que el riesgo de fallecer por esta enfermedad está asociado de forma significativa a una primera recaída, tanto en nuestras pacientes jóvenes como en las mayores. Y si esta recaída aparece antes del año del diagnóstico o es en forma de recaída visceral o cerebral está asociada, de forma estadísticamente significativa, a exitus en mujeres jóvenes, tal y como refleja la literatura publicada donde se describe que las pacientes diagnosticadas de cáncer de

mama antes de los 40 años tienen un mayor riesgo de fallecer por la enfermedad que las pacientes de mayor edad (198).

### **VI. 3. DIFERENCIAS GENÉTICAS ENTRE EL CÁNCER DE MAMA DE MUJERES JÓVENES Y MAYORES**

Actualmente, los datos disponibles acerca de porqué las mujeres jóvenes desarrollan cánceres de mama más agresivos que las pacientes mayores son escasos. Todos los datos parecen sugerir que la agresividad de los tumores de mujeres jóvenes es debida a diferencias biológicas.

En el año 2008, Anders y colaboradores publicaron uno de los primeros trabajos que pretendía demostrar que genéticamente el cáncer de mama de mujeres jóvenes era distinto del de mujeres mayores (228). A este trabajo le han seguido otros como el de Azim y colaboradores (105) donde se identifica en una cohorte de 191 pacientes menores de 40 años con una sobreexpresión de genes como RANK-ligando y c-kit entre otros o el de Colak et al, donde los autores concluyen que el cáncer de mama de mujeres muy jóvenes parece ser una entidad distinta más allá de la clasificación por subtipos del cáncer de mama (104).

En el año 2013, se revela un trabajo en el que los autores proponen que existe un perfil molecular diferente que caracteriza el cáncer de mama en mujeres muy jóvenes. Identifican 63 genes con distinta expresión en mujeres jóvenes, encontrándose entre ellos los genes PI3K/Akt, c-Myc, NF- $\kappa$ B, TGFA, ErbB2, y IL-1/IL-1R, todos ellos relacionados con procesos cancerígenos como la angiogénesis, el crecimiento tumoral, y las metástasis (105).

Johnson et al, publican en mayo de este año un estudio donde revelan que hay diferencias en la expresión genética del cáncer de mama en función de la edad (229).

Con todas estas nuevas publicaciones, decidimos estudiar si también existían diferencias entre mujeres jóvenes con cáncer de mama y mujeres mayores a nivel de miRNAs. Estudiamos y validamos el perfil de expresión basado en miRNAs inicial mediante Affimetrix, en 42 tumores de mujeres de  $\leq 35$  años, 17 tumores de pacientes entre 45 y 65 años y en 29 de mujeres mayores de 65 años. Objetivamos que existe un perfil de expresión de 96 miRNAs (miR) diferenciales entre tumores de pacientes jóvenes ( $\leq 35$  años) y mayores, de los que finalmente 12 miR se seleccionan por ser los más diferenciales entre los subgrupos y se validan 6 de ellos (miR-1228, miR-3196, miR-1275, miR-92b, miR-139 y el miR-1207). Comprobándose que todos los genes validados están relacionados con motilidad celular, invasión y proliferación. Por lo que concluimos que existe una firma basada en miRNAs que

diferenciaría el cáncer de mama de mujeres muy jóvenes ( $\leq 35$  años) del cáncer de mama de las mujeres mayores (230).

A raíz de estos datos iniciales pretendimos seguir nuestras investigaciones, ampliando el estudio de las características clínicas y patológicas diferenciales y estudiando el patrón basado en los subtipos intrínsecos del cáncer de mama de mujeres jóvenes y si se diferenciaba del cáncer de mama de mayores y sobretodo si existían vías genéticas activadas diferentes en los tumores de ambos subgrupos. Para todo esto llevamos a cabo el estudio con la plataforma genética PAM50. La existencia de los subtipos intrínsecos de cáncer de mama luminal A, luminal B, HER2 enriquecido y basal ha sido validada mediante diferentes y múltiples métodos de laboratorio y en múltiples poblaciones (98). Nuestros resultados demuestran que, aunque inicialmente se remitieron las muestras entre mayores y jóvenes intentando que los porcentajes por subtipos inmunohistoquímicos fueran muy similares, hay importantes diferencias en cuanto a los resultados por PAM50. Vemos una mayoría del subtipo intrínseco HER2 en mujeres jóvenes (un 35% frente a un 22% en mujeres mayores) mientras que en los tumores de mujeres  $> 45$  años vemos un predominio del subtipo Luminal A (un 50% frente a un 26% en mujeres jóvenes). También observamos que un 10% de las pacientes jóvenes presentan un fenotipo basal frente a un 0% en las pacientes mayores. Estos porcentajes se incrementan si consideramos que los tumores clasificados como normales por PAM50 no parecen ser un

subtipo en sí, y que podrían ser un artefacto de contaminación del RNA tumoral por RNA de células mamarias normales (231). Por lo que, si excluimos los tumores tipificados como normales por PAM50 observamos que en mujeres jóvenes el subtipo intrínseco más frecuente es el HER2 enriquecido (42%), seguido del Luminal A (31%), del Luminal B (15%) y por último el basal (12%). En las mujeres mayores el subtipo más común continúa siendo el Luminal A (un 64%), seguido del HER2 enriquecido (29%) y por último el Luminal B (7%). En línea con otros estudios publicados (105) vemos en mujeres jóvenes mayor sobreexpresión de HER2 y menor expresión de RH. Continuando con nuestro análisis, podemos observar que PAM50 asigna más tumores de pacientes mayores a bajo riesgo, mientras que en las pacientes de menor edad al diagnóstico los subtipos intrínsecos que predominan son los de alto riesgo. Esto concuerda con la literatura publicada a este respecto, donde se evidencia que el valor pronóstico de los análisis genéticos de expresión es similar en todos los grupos de edad, siendo igual de válido en mujeres jóvenes como en aquellas de más edad (232) (233). Lo que no está descrito en estudios previos es el valor del subtipo intrínseco Luminal A, de bajo riesgo, en las pacientes  $\leq 35$  años. En nuestros resultados, siempre teniendo en cuenta que sólo son 8 pacientes jóvenes con subtipo Luminal A, nos parece significativo que un 75% haya presentado una recaída por la enfermedad, es por ello que nos preguntamos si en estas pacientes muy jóvenes se cumple el buen pronóstico del que nos informa el análisis de expresión genética o si por el contrario el subtipo



Luminal A en mujeres  $\leq 35$  años se comportaría también como agresivo o si se debería tener en cuenta también en estos casos la clasificación IHQ. La respuesta a esta pregunta la obtendremos de los diferentes ensayos clínicos en los que se está utilizando el PAM50 para tipificar los tumores de las pacientes, dado que, las pacientes muy jóvenes son muy buenas candidatas para participar en ensayos clínicos.

## **VI. 4. CÁNCER DE MAMA EN MUJERES JÓVENES. BÚSQUEDA DE NUEVOS MARCADORES**

El estudio de miRNAs nos ha revelado que existe una diferencia en la expresión de los mismos en función de la edad de la paciente con cáncer de mama, confirmando que nos encontramos ante una entidad biológica distinta cuando nos encontramos ante un cáncer de mama en una mujer menor de 35 años. Por ello, y tras los resultados descritos previamente dónde hemos evidenciado que en nuestra serie de pacientes muy jóvenes con cáncer de mama existe una relación estadísticamente significativa entre la afectación axilar por la enfermedad y el riesgo de recaída, nos propusimos estudiar si alguno de los miRNAs diferencialmente expresados en el cáncer de mama de mujeres jóvenes y mayores podría tener alguna implicación en la menor supervivencia de las pacientes con metástasis axilares por cáncer de mama. Estudiamos para ello 6

miRNAs (miR-30c, miR-125a, miR-17, miR-92b, miR-139 y miR-663) y aunque los resultados obtenidos no sean significativos, probablemente debido al pequeño número de pacientes estudiadas, podemos observar que las pacientes muy jóvenes con cáncer de mama y afectación de los ganglios linfáticos axilares por la enfermedad que presentan una expresión del miR-30c disminuida tienen mayor riesgo de fallecer por su enfermedad. Esto concuerda con lo descrito en la literatura científica, donde se describe al miR-30c como un biomarcador pronóstico en el cáncer de mama, implicado en la resistencia a la quimioterapia, en la invasión celular y asociado a la vía EGFR y erbB4 (234-236).

Posteriormente decidimos estudiar aquellos genes que tanto por miRNAs como por el estudio genético de PAM50 parecían estar activados de forma diferente en mujeres con cáncer de mama en función de su edad.

Los resultados de PAM50 nos demuestran la existencia de 29 genes diferencialmente expresados en tumores de mujeres jóvenes versus mujeres mayores y que se mantienen significativos tras la corrección por subtipo ( $p \leq 0.005$ ). Estos genes son UBE2C, GNG11, CDC20, VIM, MELK, ANLN, CRYAB, ANGPTL4, CCNB1, VAMP8, CENPF, MYBL2, MKI67, MPP1, RB1, CAV1, SF3A1, RAD17, CCNE1, SLC16A3, F11R, BIRC5, EXO1, ERBB4, FBN1, GPR160, SH2B3, MDM2, ORC6L. Todos ellos relacionados con distintos procesos biológicos implicados en el desarrollo y progresión del cáncer, tales como la regulación del ciclo celular, la mitosis y la trasducción de señales. Múltiples

estudios previos han estudiado la relación de estos genes con cáncer de mama y en algunos de ellos se han reportado diferencias en cuanto a la edad del diagnóstico. Tal es el caso del estudio de Benz et al (237) donde se reportan diferencias en invasión y angiogénesis entre los tumores de jóvenes y mayores o el estudio de Johnson R et al(229). Para nuestro conocimiento este es el primer estudio donde se evidencia mediante el estudio de los genes de la plataforma génica PAM50 una firma genética única y exclusiva del cáncer de mama de mujeres jóvenes, donde 10 de los 29 genes serían los más significativos (dado que mantienen la significación mediante FDR) y estos genes son UBE2C, GNG11, CDC20, VIM, MELK, ANLN, CRYAB, ANGPTL4, CCNB1 y VAMP8. Todos estos genes están relacionados con la aparición y desarrollo tumoral.

Tras comparar los resultados obtenidos mediante el estudio de las vías genéticas afectadas por nuestros miRNAs diferenciales en mujeres jóvenes con los genes obtenidos tras la realización de la plataforma genética PAM50, todos los datos nos dirigían al estudio del gen *erbB4*, dado que se encuentra expresado de forma diferencial en los tumores de cáncer de mama de mujeres jóvenes y mayores. Es por ello, que nos propusimos estudiar la expresión de este gen mediante IHQ tanto a nivel de membrana como nuclear, tras consultar la bibliografía existente (174, 190, 191) y valorar si realmente existían diferencias en los tumores de nuestras mujeres jóvenes comparado con los de las mayores. Lo primero que comprobamos al estudiar nuestras dos muestras fue que existe un

mayor porcentaje de mujeres jóvenes con erbB4 positivo (un 20% frente a un 16% en mujeres mayores), lo cual sería coincidente con los resultados previos. Mientras que erbB2 es un marcador predictivo muy conocido cuando estudiamos el cáncer de mama, el valor que tiene erbB4 es desconocido. En la literatura publicada, se ha implicado como un nuevo marcador predictivo en pacientes que reciben terapia anti-HER2 (189) pero en nuestros resultados no podemos confirmar ni desmentir esta afirmación, dado que todas las pacientes habían recibido Trastuzumab en la neo/adyuvancia. Por el contrario, sí que podemos afirmar, en base a nuestros datos obtenidos, que en la mayoría de los casos la sobreexpresión de erbB4 se asocia a una sobreexpresión de erbB2, tanto en mujeres jóvenes como en mayores (un 80% del total de mujeres jóvenes y un 100% en mujeres mayores). También hemos observado que la sobreexpresión de erbB4 se puede asociar a la expresión de RH (en un 47% de las mujeres jóvenes y en un 87% en las mayores), pero no parece que esta asociación juegue un papel importante en nuestra serie (a diferencia de lo que sugieren Portier y colaboradores en su estudio). Sí parece evidente que la sobreexpresión de erbB2/erbB4 podría conllevar un peor pronóstico en las mujeres jóvenes, dado que un 33% de estas pacientes han presentado una recaída por la enfermedad y de estas el 75% ha fallecido, y este hecho no se cumple en las pacientes mayores, donde ninguna de las que sobreexpresan erbB2/erbB4 ha recaído. Estos resultados apoyan los datos descritos previamente en la literatura (187, 188) que sugieren que si erbB2 se asocia también a una sobreexpresión de erbB4 este

último se comportaría como un oncogén (en nuestra serie se cumpliría únicamente en mujeres jóvenes); mientras que si sólo existe sobreexpresión de erbB4 (como es el caso de nuestras 3 mujeres jóvenes, dos con subtipo IHQ luminal A y otra con subtipo triple negativo en las que no ha existido recidiva tumoral) este actuaría como un gen supresor de tumores.

En conclusión, en nuestro estudio vemos que la sobreexpresión de cerbB4 en el cáncer de mama tiene una diferente implicación en cuanto al pronóstico de las pacientes en función de la edad, y este fenómeno no ha sido descrito previamente. Es por ello, que debemos continuar con estos estudios con la finalidad de conseguir tratamientos dirigidos contra las alteraciones genéticas que se están evidenciando diferenciales en los tumores de cáncer de mama de mujeres muy jóvenes y con ello mejorar el pronóstico y reducir la mortalidad en este subgrupo de pacientes.



## **Conclusiones**

---





## VII. CONCLUSIONES

1. Hemos definido 29 genes que discriminan los tumores de mama de mujeres jóvenes ( $\leq 35$  años) de los de mujeres mayores. El análisis funcional indica que estos genes podrían estar regulando diferentes procesos biológicos relacionados con el desarrollo y la progresión del cáncer.
2. La comparación entre la firma genética única de los tumores de mama de mujeres muy jóvenes basada en 6 microRNAs (miR-1228, miR-3196, miR-1275, miR-92b, miR-139 y el miR-1207) y la basada en los 29 genes, mostró que el gen *erbB4* juega un papel fundamental en el cáncer de mama de mujeres jóvenes y que asociado a *erbB2* confiere mayor agresividad al tumor.
3. Hemos observado un aumento en la incidencia de cáncer de mama de mujeres jóvenes en los últimos años y hemos definido que estas pacientes presentan diferencias en términos de factores de riesgo que se han hecho más evidentes en los últimos 15 años; con una disminución en la edad de la menarquía, una disminución en el número de embarazos y en la edad de la primera gestación.
4. La comparación entre los tumores de mujeres jóvenes y mayores en términos de factores pronósticos histológicos y moleculares nos ha demostrado que los tumores de las mujeres muy jóvenes exhiben características más agresivas, con mayor tamaño tumoral, mayor grado histológico, mayor índice de proliferación tumoral y mayor

afectación ganglionar axilar. Así como la existencia de mayor sobreexpresión de HER2 y mayor frecuencia de mutaciones en los genes BRCA.

5. Hemos identificado un mayor riesgo de recaída y de fallecimiento por la enfermedad si el cáncer de mama se diagnostica a edades  $\leq 35$  años, sobretodo si se asocia a afectación axilar.

6. Hemos observado una mayor concordancia en las mujeres muy jóvenes entre el subtipo tumoral definido por inmunohistoquímica y el definido por la plataforma de investigación basada en PAM50. Siendo definidos subtipos intrínsecos más agresivos en mujeres jóvenes que en mayores.

7. Hemos podido ver un mayor número de recaídas por el cáncer de mama en las mujeres jóvenes con subtipo intrínseco Luminal A, seguido de aquellas con subtipo Luminal B, basal y Her2.

8. Las pacientes con cáncer de mama y afectación ganglionar axilar por la enfermedad que presentan el miR-30c reprimido en el tumor tienen menor supervivencia.

## **Bibliografía**

---



## VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Hassiotou F, Geddes D. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clin Anat* 2013;26:29-48.
2. Asselin-Labat ML, Vaillant F, Sheridan JM, et al. Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling. *Nature* 2010;465:798-802.
3. Pharoah PD, Caldas C. Molecular genetics and the assessment of human cancers. *Expert Rev Mol Med* 1999;1999:1-19.
4. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406:747-52.
5. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014;64:9-29.
6. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013;49:1374-403.
7. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer* 2013;132:1133-45.
8. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0 Cancer incidence and mortality worldwide: IARC Cancerbase No.11 [Internet]. 2013 [cited; Available from: <http://globocan.iarc.fr>
9. Sanchez MJ, Payer T, De Angelis R, Larranaga N, Capocaccia R, Martinez C. Cancer incidence and mortality in Spain: estimates and projections for the period 1981-2012. *Ann Oncol* 2010;21 Suppl 3:iii30-6.
10. Pollan M, Pastor-Barriuso R, Ardanaz E, et al. Recent changes in breast cancer incidence in Spain, 1980-2004. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:1584-91.
11. Sant M, Allemani C, Santaquilani M, Knijn A, Marchesi F, Capocaccia R. EURO-CARE-4. Survival of cancer patients

- diagnosed in 1995-1999. Results and commentary. *Eur J Cancer* 2009;45:931-91.
12. Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2014. *Ann Oncol* 2014;25:1650-6.
  13. Colditz GA, Bohlke K, Berkey CS. Breast cancer risk accumulation starts early: prevention must also. *Breast Cancer Res Treat* 2014;145:567-79.
  14. Dumitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med* 2005;9:208-21.
  15. American-Cancer-Society. Probability (%) of Developing Invasive Cancer during Selected Age Intervals by Sex, US, 2009-2011. 2009-2011.
  16. Colditz GA, Baer HJ, Tamini RM. Breast Cancer. En: *Cancer epidemiology and prevention*. 3<sup>a</sup> ed; 2006.
  17. Pike MC, Pearce CL, Wu AH. Prevention of cancers of the breast, endometrium and ovary. *Oncogene* 2004;23:6379-91.
  18. Hunter DJ, Spiegelman D, Adami HO, et al. Non-dietary factors as risk factors for breast cancer, and as effect modifiers of the association of fat intake and risk of breast cancer. *Cancer Causes Control* 1997;8:49-56.
  19. Kelsey JL, Bernstein L. Epidemiology and prevention of breast cancer. *Annu Rev Public Health* 1996;17:47-67.
  20. Willet WC, Rockhill B, Hankinson SE, Hunter D, Colditz GA. Non genetic factors in the causation of breast cancer. En: *Disease of the breast*. 3<sup>a</sup> ed; 2004.
  21. Collaborative-Group-on-Hormonal-Factors-in-Breast-Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet* 1997;350:1047-59.

22. Ewertz M, Duffy SW, Adami HO, et al. Age at first birth, parity and risk of breast cancer: a meta-analysis of 8 studies from the Nordic countries. *Int J Cancer* 1990;46:597-603.
23. Dai Q, Shu XO, Jin F, Gao YT, Ruan ZX, Zheng W. Consumption of animal foods, cooking methods, and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:801-8.
24. Missmer SA, Smith-Warner SA, Spiegelman D, et al. Meat and dairy food consumption and breast cancer: a pooled analysis of cohort studies. *Int J Epidemiol* 2002;31:78-85.
25. Willet WC. Dietary fat and breast cancer. En: *Nutritional epidemiology*. 2<sup>a</sup> ed; 1998.
26. Smith-Warner SA, Spiegelman D, Adami HO, et al. Types of dietary fat and breast cancer: a pooled analysis of cohort studies. *Int J Cancer* 2001;92:767-74.
27. Mattisson I, Wirfalt E, Johansson U, Gullberg B, Olsson H, Berglund G. Intakes of plant foods, fibre and fat and risk of breast cancer--a prospective study in the Malmo Diet and Cancer cohort. *Br J Cancer* 2004;90:122-7.
28. Michels KB, Mohllajee AP, Roset-Bahmanyar E, Beehler GP, Moysich KB. Diet and breast cancer: a review of the prospective observational studies. *Cancer* 2007;109:2712-49.
29. Rohan TE, Howe GR, Friedenreich CM, Jain M, Miller AB. Dietary fiber, vitamins A, C, and E, and risk of breast cancer: a cohort study. *Cancer Causes Control* 1993;4:29-37.
30. Terry P, Jain M, Miller AB, Howe GR, Rohan TE. No association among total dietary fiber, fiber fractions, and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:1507-8.
31. Castello A, Pollan M, Buijsse B, et al. Spanish Mediterranean diet and other dietary patterns and breast cancer risk: case-control EpiGEICAM study. *Br J Cancer* 2014;111:1454-62.
32. Lahmann PH, Hoffmann K, Allen N, et al. Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer And Nutrition (EPIC). *Int J Cancer* 2004;111:762-71.

33. Tehard B, Lahmann PH, Riboli E, Clavel-Chapelon F. Anthropometry, breast cancer and menopausal status: use of repeated measurements over 10 years of follow-up-results of the French E3N women's cohort study. *Int J Cancer* 2004;111:264-9.
34. Neuhouser ML, Aragaki AK, Prentice RL, et al. Overweight, Obesity, and Postmenopausal Invasive Breast Cancer Risk: A Secondary Analysis of the Women's Health Initiative Randomized Clinical Trials. *JAMA Oncol* 2014.
35. Hunter DJ, Willett WC. Diet, body size, and breast cancer. *Epidemiol Rev* 1993;15:110-32.
36. Brinton LA, Swanson CA. Height and weight at various ages and risk of breast cancer. *Ann Epidemiol* 1992;2:597-609.
37. Cleary MP, Maihle NJ. The role of body mass index in the relative risk of developing premenopausal versus postmenopausal breast cancer. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997;216:28-43.
38. Singletary KW, Gapstur SM. Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms. *JAMA* 2001;286:2143-51.
39. Terry P, Suzuki R, Hu FB, Wolk A. A prospective study of major dietary patterns and the risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:1281-5.
40. Collaborative-Group-on-Hormonal-Factors-in-Breast-Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet* 1996;347:1713-27.
41. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002;288:321-33.
42. Olsson HL, Ingvar C, Bladstrom A. Hormone replacement therapy containing progestins and given continuously increases breast carcinoma risk in Sweden. *Cancer* 2003;97:1387-92.



43. Li CI, Malone KE, Porter PL, et al. Relationship between long durations and different regimens of hormone therapy and risk of breast cancer. *JAMA* 2003;289:3254-63.
44. Beral V. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 2003;362:419-27.
45. Hofvind S, Moller B, Thoresen S, Ursin G. Use of hormone therapy and risk of breast cancer detected at screening and between mammographic screens. *Int J Cancer* 2006;118:3112-7.
46. Hancock SL, Tucker MA, Hoppe RT. Breast cancer after treatment of Hodgkin's disease. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:25-31.
47. Ronckers CM, Erdmann CA, Land CE. Radiation and breast cancer: a review of current evidence. *Breast Cancer Res* 2005;7:21-32.
48. Melchor L, Benitez J. The complex genetic landscape of familial breast cancer. *Hum Genet* 2013;132:845-63.
49. Collaborative-Group-on-Hormonal-Factors-in-Breast-Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet* 2001;358:1389-99.
50. Pharoah PD, Antoniou A, Bobrow M, Zimmern RL, Easton DF, Ponder BA. Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. *Nat Genet* 2002;31:33-6.
51. Bane AL, Beck JC, Bleiweiss I, et al. BRCA2 mutation-associated breast cancers exhibit a distinguishing phenotype based on morphology and molecular profiles from tissue microarrays. *Am J Surg Pathol* 2007;31:121-8.
52. Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J Clin Oncol* 2007;25:1329-33.
53. Lee EH, Park SK, Park B, et al. Effect of BRCA1/2 mutation on short-term and long-term breast cancer survival: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2010;122:11-25.

54. Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* 2007;447:1087-93.
55. Singletary SE, Allred C, Ashley P, et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:3628-36.
56. Woodward WA, Strom EA, Tucker SL, et al. Changes in the 2003 American Joint Committee on Cancer staging for breast cancer dramatically affect stage-specific survival. *J Clin Oncol* 2003;21:3244-8.
57. AJCC Cancer Staging Manual 7<sup>a</sup> ed; 2010.
58. Rosenberg J, Chia YL, Plevritis S. The effect of age, race, tumor size, tumor grade, and disease stage on invasive ductal breast cancer survival in the U.S. SEER database. *Breast Cancer Res Treat* 2005;89:47-54.
59. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989;63:181-7.
60. Burnstein HJ, Harris JR, Morrow M. Malignant tumours of the breast. En: *Cancer. Principles and practice of oncology*. 8<sup>a</sup> ed; 2008.
61. Lyman GH, Giuliano AE, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:7703-20.
62. Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AH, et al. Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol* 2008;26:3153-8.
63. Galimberti V, Cole BF, Zurrada S, et al. Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel-node micrometastases (IBCSG 23-01): a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2013;14:297-305.
64. A study of tamoxifen citrate, letrozole, anastrozole, or exemestane with or without chemotherapy in treating patients with

- invasive RxPONDER breast cancer. NCT01272037. Last verified: March 2015. [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov). [cited; Available from: [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)]
65. Barnadas A. Factores pronósticos y predictivos. En: Guía práctica del tratamiento del cáncer de mama.; 2007.
  66. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G, Jr., et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer* 2007;96:1504-13.
  67. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:7212-20.
  68. Martin M. Molecular biology of breast cancer. *Clin Transl Oncol* 2006;8:7-14.
  69. Cui X, Schiff R, Arpino G, Osborne CK, Lee AV. Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. *J Clin Oncol* 2005;23:7721-35.
  70. Hugh J, Hanson J, Cheang MC, et al. Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *J Clin Oncol* 2009;27:1168-76.
  71. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-82.
  72. Cardoso F, Castiglione M. Locally recurrent or metastatic breast cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2009;20 Suppl 4:15-8.
  73. Press MF, Bernstein L, Thomas PA, et al. HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J Clin Oncol* 1997;15:2894-904.
  74. Autier P, Boniol M, La Vecchia C, et al. Disparities in breast cancer mortality trends between 30 European countries:

retrospective trend analysis of WHO mortality database. *BMJ* 2010;341:c3620.

75. Slamon D, Eiermann W, Robert N, et al. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2011;365:1273-83.

76. Joensuu H, Bono P, Kataja V, et al. Fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide with either docetaxel or vinorelbine, with or without trastuzumab, as adjuvant treatments of breast cancer: final results of the FinHer Trial. *J Clin Oncol* 2009;27:5685-92.

77. Perez EA, Romond EH, Suman VJ, et al. Four-year follow-up of trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: joint analysis of data from NCCTG N9831 and NSABP B-31. *J Clin Oncol* 2011;29:3366-73.

78. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344:783-92.

79. Goldhirsch A, Gelber RD, Piccart-Gebhart MJ, et al. 2 years versus 1 year of adjuvant trastuzumab for HER2-positive breast cancer (HERA): an open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2013;382:1021-8.

80. Cardoso F, Loibl S, Pagani O, et al. The European Society of Breast Cancer Specialists recommendations for the management of young women with breast cancer. *Eur J Cancer* 2012;48:3355-77.

81. Anders CK, Fan C, Parker JS, et al. Breast carcinomas arising at a young age: unique biology or a surrogate for aggressive intrinsic subtypes? *J Clin Oncol* 2011;29:e18-20.

82. Partridge AH, Hughes ME, Ottesen RA, et al. The effect of age on delay in diagnosis and stage of breast cancer. *Oncologist* 2012;17:775-82.

83. Pesce CE, Liederbach E, Czechura T, Winchester DJ, Yao K. Changing surgical trends in young patients with early stage

- breast cancer, 2003 to 2010: a report from the National Cancer Data Base. *J Am Coll Surg* 2014;219:19-28.
84. Howard-Anderson J, Ganz PA, Bower JE, Stanton AL. Quality of life, fertility concerns, and behavioral health outcomes in younger breast cancer survivors: a systematic review. *J Natl Cancer Inst* 2012;104:386-405.
85. Partridge AH, Pagani O, Abulkhair O, et al. First international consensus guidelines for breast cancer in young women (BCY1). *Breast* 2014;23:209-20.
86. Ekwueme DU, Guy GP, Jr., Rim SH, et al. Health and economic impact of breast cancer mortality in young women, 1970-2008. *Am J Prev Med* 2014;46:71-9.
87. Foxcroft LM, Evans EB, Porter AJ. The diagnosis of breast cancer in women younger than 40. *Breast* 2004;13:297-306.
88. Sardanelli F, Boetes C, Borisch B, et al. Magnetic resonance imaging of the breast: recommendations from the EUSOMA working group. *Eur J Cancer* 2010;46:1296-316.
89. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol* 2011;22:1736-47.
90. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol* 2013;24:2206-23.
91. Vuong D, Simpson PT, Green B, Cummings MC, Lakhani SR. Molecular classification of breast cancer. *Virchows Arch* 2014;465:1-14.
92. Eroles P, Bosch A, Perez-Fidalgo JA, Lluch A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev* 2012;38:698-707.

93. Rivenbark AG, O'Connor SM, Coleman WB. Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine. *Am J Pathol* 2013;183:1113-24.
94. Cornejo KM, Kandil D, Khan A, Cosar EF. Theranostic and molecular classification of breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2014;138:44-56.
95. Cancer-Genome-Atlas-Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012;490:61-70.
96. Perou CM, Borresen-Dale AL. Systems biology and genomics of breast cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3.
97. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol* 2011;5:5-23.
98. Prat A, Ellis MJ, Perou CM. Practical implications of gene-expression-based assays for breast oncologists. *Nat Rev Clin Oncol* 2012;9:48-57.
99. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:5367-74.
100. Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res* 2008;14:1368-76.
101. Ruddy KJ, Gelber S, Tamimi RM, et al. Breast cancer presentation and diagnostic delays in young women. *Cancer* 2014;120:20-5.
102. Assi HA, Khoury KE, Dbouk H, Khalil LE, Mouhieddine TH, El Saghir NS. Epidemiology and prognosis of breast cancer in young women. *J Thorac Dis* 2013;5 Suppl 1:S2-8.
103. Colleoni M, Anders CK. Debate: The biology of breast cancer in young women is unique. *Oncologist* 2013;18:e13-5.
104. Colak D, Nofal A, Albakheet A, et al. Age-specific gene expression signatures for breast tumors and cross-species conserved potential cancer progression markers in young women. *PLoS One* 2013;8:e63204.

105. Azim HA, Jr., Michiels S, Bedard PL, et al. Elucidating prognosis and biology of breast cancer arising in young women using gene expression profiling. *Clin Cancer Res* 2012;18:1341-51.
106. Bantema-Joppe EJ, de Munck L, Visser O, et al. Early-stage young breast cancer patients: impact of local treatment on survival. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011;81:e553-9.
107. Mahmood U, Morris C, Neuner G, et al. Similar survival with breast conservation therapy or mastectomy in the management of young women with early-stage breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012;83:1387-93.
108. van Laar C, van der Sangen MJ, Poortmans PM, et al. Local recurrence following breast-conserving treatment in women aged 40 years or younger: trends in risk and the impact on prognosis in a population-based cohort of 1143 patients. *Eur J Cancer* 2013;49:3093-101.
109. Pinero A. Present and future of sentinel lymph node biopsy in breast cancer staging. *Clin Transl Oncol* 2010;12:457-8.
110. Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, et al. Sentinel-lymph-node resection compared with conventional axillary-lymph-node dissection in clinically node-negative patients with breast cancer: overall survival findings from the NSABP B-32 randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010;11:927-33.
111. Poortmans PM, Collette L, Bartelink H, et al. The addition of a boost dose on the primary tumour bed after lumpectomy in breast conserving treatment for breast cancer. A summary of the results of EORTC 22881-10882 "boost versus no boost" trial. *Cancer Radiother* 2008;12:565-70.
112. Arvold ND, Taghian AG, Niemierko A, et al. Age, breast cancer subtype approximation, and local recurrence after breast-conserving therapy. *J Clin Oncol* 2011;29:3885-91.
113. Antonini N, Jones H, Horiot JC, et al. Effect of age and radiation dose on local control after breast conserving treatment: EORTC trial 22881-10882. *Radiother Oncol* 2007;82:265-71.

114. Calvo FA, Sole CV, Rivera S, et al. The use of radiotherapy for early breast cancer in woman at different ages. *Clin Transl Oncol* 2014;16:680-5.
115. Letourneau JM, Melisko ME, Cedars MI, Rosen MP. A changing perspective: improving access to fertility preservation. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8:56-60.
116. Trivers KF, Fink AK, Partridge AH, et al. Estimates of young breast cancer survivors at risk for infertility in the U.S. *Oncologist* 2014;19:814-22.
117. Canello G, Montagna E. Treatment of breast cancer in young women: do we need more aggressive therapies? *J Thorac Dis* 2013;5 Suppl 1:S47-54.
118. Freedman RA, Partridge AH. Management of breast cancer in very young women. *Breast* 2013;22 Suppl 2:S176-9.
119. Huober J, von Minckwitz G, Denkert C, et al. Effect of neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy in different biological breast cancer phenotypes: overall results from the GeparTrio study. *Breast Cancer Res Treat* 2010;124:133-40.
120. Davies C, Godwin J, Gray R, et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2011;378:771-84.
121. Davies C, Pan H, Godwin J, et al. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet* 2013;381:805-16.
122. Gray RG, Rea D, Handley K, et al. aTTom: Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years in 6,953 women with early breast cancer. *J Clin Oncol* 2013;31:18-suppl.
123. Francis PA, Regan MM, Fleming GF, et al. Adjuvant ovarian suppression in premenopausal breast cancer. *N Engl J Med* 2015;372:436-46.



124. Pagani O, Regan MM, Francis PA. Exemestane with ovarian suppression in premenopausal breast cancer. *N Engl J Med* 2014;371:1358-9.
125. Pagani O, Regan MM, Walley BA, et al. Adjuvant exemestane with ovarian suppression in premenopausal breast cancer. *N Engl J Med* 2014;371:107-18.
126. Partridge AH, Gelber S, Piccart-Gebhart MJ, et al. Effect of age on breast cancer outcomes in women with human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: results from a herceptin adjuvant trial. *J Clin Oncol* 2013;31:2692-8.
127. Partridge AH, Gelber S, Peppercorn J, et al. Web-based survey of fertility issues in young women with breast cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:4174-83.
128. Loren AW, Mangu PB, Beck LN, et al. Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2013;31:2500-10.
129. Azim HA, Jr., Santoro L, Pavlidis N, et al. Safety of pregnancy following breast cancer diagnosis: a meta-analysis of 14 studies. *Eur J Cancer* 2011;47:74-83.
130. Pagani O, Partridge A, Korde L, et al. Pregnancy after breast cancer: if you wish, ma'am. *Breast Cancer Res Treat* 2011;129:309-17.
131. Azim HA, Jr., Del Mastro L, Scarfone G, Peccatori FA. Treatment of breast cancer during pregnancy: regimen selection, pregnancy monitoring and more. *Breast* 2011;20:1-6.
132. Stensheim H, Moller B, van Dijk T, Fossa SD. Cause-specific survival for women diagnosed with cancer during pregnancy or lactation: a registry-based cohort study. *J Clin Oncol* 2009;27:45-51.
133. Paik S, Shak S, Tang G, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351:2817-26.

134. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347:1999-2009.
135. Arpino G, Generali D, Sapino A, et al. Gene expression profiling in breast cancer: a clinical perspective. *Breast* 2013;22:109-20.
136. Harris L, Fritsche H, Mennel R, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:5287-312.
137. Buyse M, Loi S, van't Veer L, et al. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:1183-92.
138. Cusumano PG, Generali D, Ciruelos E, et al. European inter-institutional impact study of MammaPrint. *Breast* 2014;23:423-8.
139. Carlson JJ, Roth JA. The impact of the Oncotype Dx breast cancer assay in clinical practice: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2013;141:13-22.
140. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol* 2009;20:1319-29.
141. NCCN Clinical practice guidelines in oncology (NCCN Guidelines). National comprehensive cancer network: breast cancer. Version 1.2015. [www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/breast.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf). [cited; Available from:
142. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 2009;27:1160-7.
143. Nielsen TO, Parker JS, Leung S, et al. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16:5222-32.

144. Chia SK, Bramwell VH, Tu D, et al. A 50-gene intrinsic subtype classifier for prognosis and prediction of benefit from adjuvant tamoxifen. *Clin Cancer Res* 2012;18:4465-72.
145. Harvell DM, Spoelstra NS, Singh M, et al. Molecular signatures of neoadjuvant endocrine therapy for breast cancer: characteristics of response or intrinsic resistance. *Breast Cancer Res Treat* 2008;112:475-88.
146. Nielsen T, Wallden B, Schaper C, et al. Analytical validation of the PAM50-based Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay and nCounter Analysis System using formalin-fixed paraffin-embedded breast tumor specimens. *BMC Cancer* 2014;14:177.
147. Kelly CM, Bernard PS, Krishnamurthy S, et al. Agreement in risk prediction between the 21-gene recurrence score assay (Oncotype DX(R)) and the PAM50 breast cancer intrinsic Classifier in early-stage estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncologist* 2012;17:492-8.
148. Chen K, Rajewsky N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nat Rev Genet* 2007;8:93-103.
149. Kusenda B, Mraz M, Mayer J, Pospisilova S. MicroRNA biogenesis, functionality and cancer relevance. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2006;150:205-15.
150. Hammond SM. RNAi, microRNAs, and human disease. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006;58 Suppl 1:s63-8.
151. Care A, Catalucci D, Felicetti F, et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med* 2007;13:613-8.
152. Beveridge NJ, Gardiner E, Carroll AP, Tooney PA, Cairns MJ. Schizophrenia is associated with an increase in cortical microRNA biogenesis. *Mol Psychiatry* 2009;15:1176-89.
153. Hammond SM. MicroRNAs as oncogenes. *Curr Opin Genet Dev* 2006;16:4-9.

154. He L, Thomson JM, Hemann MT, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005;435:828-33.
155. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:259-69.
156. Shimono Y, Zabala M, Cho RW, et al. Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells. *Cell* 2009;138:592-603.
157. Gravgaard KH, Lyng MB, Laenkholm AV, et al. The miRNA-200 family and miRNA-9 exhibit differential expression in primary versus corresponding metastatic tissue in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012;134:207-17.
158. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* 2008;10:593-601.
159. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005;65:7065-70.
160. Lee YM, Lee JY, Ho CC, et al. miRNA-34b as a tumor suppressor in estrogen-dependent growth of breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2011;13:R116.
161. Sun X, Qin S, Fan C, Xu C, Du N, Ren H. Let-7: a regulator of the ERalpha signaling pathway in human breast tumors and breast cancer stem cells. *Oncol Rep* 2013;29:2079-87.
162. Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* 2008;451:147-52.
163. Pastrello C, Polesel J, Della Puppa L, Viel A, Maestro R. Association between hsa-mir-146a genotype and tumor age-of-onset in BRCA1/BRCA2-negative familial breast and ovarian cancer patients. *Carcinogenesis* 2010;31:2124-6.
164. Tanic M, Yanowsky K, Rodriguez-Antona C, et al. Deregulated miRNAs in hereditary breast cancer revealed a role for miR-30c in regulating KRAS oncogene. *PLoS One* 2012;7:e38847.

165. Mattie MD, Benz CC, Bowers J, et al. Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Mol Cancer* 2006;5:24.
166. Blenkiron C, Goldstein LD, Thorne NP, et al. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol* 2007;8:R214.
167. Carpenter G, Liao HJ. Trafficking of receptor tyrosine kinases to the nucleus. *Exp Cell Res* 2009;315:1556-66.
168. Kainulainen V, Sundvall M, Maatta JA, Santiestevan E, Klagsbrun M, Elenius K. A natural ErbB4 isoform that does not activate phosphoinositide 3-kinase mediates proliferation but not survival or chemotaxis. *J Biol Chem* 2000;275:8641-9.
169. Carpenter G. ErbB-4: mechanism of action and biology. *Exp Cell Res* 2003;284:66-77.
170. Jones RB, Gordus A, Krall JA, MacBeath G. A quantitative protein interaction network for the ErbB receptors using protein microarrays. *Nature* 2006;439:168-74.
171. Schulze WX, Deng L, Mann M. Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. *Mol Syst Biol* 2005;1:2005 0008.
172. van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* 1994;10:251-337.
173. Hollmen M, Elenius K. Potential of ErbB4 antibodies for cancer therapy. *Future Oncol* 2010;6:37-53.
174. Junttila TT, Sundvall M, Lundin M, et al. Cleavable ErbB4 isoform in estrogen receptor-regulated growth of breast cancer cells. *Cancer Res* 2005;65:1384-93.
175. Wiesen JF, Young P, Werb Z, Cunha GR. Signaling through the stromal epidermal growth factor receptor is necessary for mammary ductal development. *Development* 1999;126:335-44.

176. Jones FE, Welte T, Fu XY, Stern DF. ErbB4 signaling in the mammary gland is required for lobuloalveolar development and Stat5 activation during lactation. *J Cell Biol* 1999;147:77-88.
177. Long W, Wagner KU, Lloyd KC, et al. Impaired differentiation and lactational failure of Erbb4-deficient mammary glands identify ERBB4 as an obligate mediator of STAT5. *Development* 2003;130:5257-68.
178. Barnes NL, Khavari S, Boland GP, Cramer A, Knox WF, Bundred NJ. Absence of HER4 expression predicts recurrence of ductal carcinoma in situ of the breast. *Clin Cancer Res* 2005;11:2163-8.
179. Kew TY, Bell JA, Pinder SE, et al. c-erbB-4 protein expression in human breast cancer. *Br J Cancer* 2000;82:1163-70.
180. Witton CJ, Reeves JR, Going JJ, Cooke TG, Bartlett JM. Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. *J Pathol* 2003;200:290-7.
181. Tovey SM, Witton CJ, Bartlett JM, Stanton PD, Reeves JR, Cooke TG. Outcome and human epidermal growth factor receptor (HER) 1-4 status in invasive breast carcinomas with proliferation indices evaluated by bromodeoxyuridine labelling. *Breast Cancer Res* 2004;6:R246-51.
182. Srinivasan R, Gillett CE, Barnes DM, Gullick WJ. Nuclear expression of the c-erbB-4/HER-4 growth factor receptor in invasive breast cancers. *Cancer Res* 2000;60:1483-7.
183. Sassen A, Rochon J, Wild P, et al. Cytogenetic analysis of HER1/EGFR, HER2, HER3 and HER4 in 278 breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2008;10:R2.
184. Koutras AK, Kalogeras KT, Dimopoulos MA, et al. Evaluation of the prognostic and predictive value of HER family mRNA expression in high-risk early breast cancer: a Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG) study. *Br J Cancer* 2008;99:1775-85.
185. Lodge AJ, Anderson JJ, Gullick WJ, Haugk B, Leonard RC, Angus B. Type 1 growth factor receptor expression in node positive

breast cancer: adverse prognostic significance of c-erbB-4. *J Clin Pathol* 2003;56:300-4.

186. Bieche I, Onody P, Tozlu S, Driouch K, Vidaud M, Lidereau R. Prognostic value of ERBB family mRNA expression in breast carcinomas. *Int J Cancer* 2003;106:758-65.

187. Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE, et al. Expression and co-expression of the members of the epidermal growth factor receptor (EGFR) family in invasive breast carcinoma. *Br J Cancer* 2004;91:1532-42.

188. Mill CP, Zordan MD, Rothenberg SM, Settleman J, Leary JF, Riese DJ, 2nd. ErbB2 Is Necessary for ErbB4 Ligands to Stimulate Oncogenic Activities in Models of Human Breast Cancer. *Genes Cancer* 2011;2:792-804.

189. Portier BP, Minca EC, Wang Z, et al. HER4 expression status correlates with improved outcome in both neoadjuvant and adjuvant Trastuzumab treated invasive breast carcinoma. *Oncotarget* 2013;4:1662-72.

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

191. Hollmen M, Liu P, Kurppa K, et al. Proteolytic processing of ErbB4 in breast cancer. *PLoS One* 2012;7:e39413.

192. McAree B, O'Donnell ME, Spence A, Lioe TF, McManus DT, Spence RA. Breast cancer in women under 40 years of age: a series of 57 cases from Northern Ireland. *Breast* 2010;19:97-104.

193. Karihtala P, Winqvist R, Bloigu R, Jukkola-Vuorinen A. Long-term observational follow-up study of breast cancer diagnosed in women  $\leq 40$  years old. *Breast* 2010;19:456-61.

194. Kheirlesei EH, Boggs JM, Curran C, et al. Younger age as a prognostic indicator in breast cancer: a cohort study. *BMC Cancer* 2011;11:383.

195. Zhang Q, Ma B, Kang M. A retrospective comparative study of clinicopathological features between young and elderly women with breast cancer. *Int J Clin Exp Med* 2015;8:5869-75.
196. Peng R, Wang S, Shi Y, et al. Patients 35 years old or younger with operable breast cancer are more at risk for relapse and survival: a retrospective matched case-control study. *Breast* 2011;20:568-73.
197. Ribnikar D, Ribeiro JM, Pinto D, et al. Breast cancer under age 40: a different approach. *Curr Treat Options Oncol* 2015;16:16.
198. Gnerlich JL, Deshpande AD, Jeffe DB, Sweet A, White N, Margenthaler JA. Elevated breast cancer mortality in women younger than age 40 years compared with older women is attributed to poorer survival in early-stage disease. *J Am Coll Surg* 2009;208:341-7.
199. Fredholm H, Eaker S, Frisell J, Holmberg L, Fredriksson I, Lindman H. Breast cancer in young women: poor survival despite intensive treatment. *PLoS One* 2009;4:e7695.
200. Canello G, Maisonneuve P, Rotmensz N, et al. Prognosis and adjuvant treatment effects in selected breast cancer subtypes of very young women (<35 years) with operable breast cancer. *Ann Oncol* 2010;21:1974-81.
201. Han W, Kang SY. Relationship between age at diagnosis and outcome of premenopausal breast cancer: age less than 35 years is a reasonable cut-off for defining young age-onset breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010;119:193-200.
202. Leclere B, Molinie F, Tretarre B, Stracci F, Daubisse-Marliac L, Colonna M. Trends in incidence of breast cancer among women under 40 in seven European countries: a GRELL cooperative study. *Cancer Epidemiol* 2012;37:544-9.
203. Pollan M, Michelena MJ, Ardanaz E, Izquierdo A, Sanchez-Perez MJ, Torrella A. Breast cancer incidence in Spain before, during and after the implementation of screening programmes. *Ann Oncol* 2010;21 Suppl 3:iii97-102.



204. Fowble BL, Schultz DJ, Overmoyer B, et al. The influence of young age on outcome in early stage breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;30:23-33.
205. Elkum N, Dermime S, Ajarim D, et al. Being 40 or younger is an independent risk factor for relapse in operable breast cancer patients: the Saudi Arabia experience. *BMC Cancer* 2007;7:222.
206. Kollias J, Elston CW, Ellis IO, Robertson JF, Blamey RW. Early-onset breast cancer--histopathological and prognostic considerations. *Br J Cancer* 1997;75:1318-23.
207. Walker RA, Lees E, Webb MB, Dearing SJ. Breast carcinomas occurring in young women (< 35 years) are different. *Br J Cancer* 1996;74:1796-800.
208. Hartley MC, McKinley BP, Rogers EA, et al. Differential expression of prognostic factors and effect on survival in young (< or =40) breast cancer patients: a case-control study. *Am Surg* 2006;72:1189-94; discussion 94-5.
209. Colleoni M, Rotmensz N, Robertson C, et al. Very young women (<35 years) with operable breast cancer: features of disease at presentation. *Ann Oncol* 2002;13:273-9.
210. Dubsy PC, Gnant MF, Taucher S, et al. Young age as an independent adverse prognostic factor in premenopausal patients with breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2002;3:65-72.
211. Gonzalez-Angulo AM, Broglio K, Kau SW, et al. Women age < or = 35 years with primary breast carcinoma: disease features at presentation. *Cancer* 2005;103:2466-72.
212. Han W, Kim SW, Park IA, et al. Young age: an independent risk factor for disease-free survival in women with operable breast cancer. *BMC Cancer* 2004;4:82.
213. Zabicki K, Colbert JA, Dominguez FJ, et al. Breast cancer diagnosis in women < or = 40 versus 50 to 60 years: increasing size and stage disparity compared with older women over time. *Ann Surg Oncol* 2006;13:1072-7.
214. Bharat A, Aft RL, Gao F, Margenthaler JA. Patient and tumor characteristics associated with increased mortality in young

- women (< or =40 years) with breast cancer. *J Surg Oncol* 2009;100:248-51.
215. Vrieling C, Collette L, Fourquet A, et al. Can patient-, treatment- and pathology-related characteristics explain the high local recurrence rate following breast-conserving therapy in young patients? *Eur J Cancer* 2003;39:932-44.
216. Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, et al. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347:1227-32.
217. Fisher B, Anderson S, Bryant J, et al. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347:1233-41.
218. Litiere S, Werutsky G, Fentiman IS, et al. Breast conserving therapy versus mastectomy for stage I-II breast cancer: 20 year follow-up of the EORTC 10801 phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol* 2012;13:412-9.
219. Fisher B, Jeong JH, Anderson S, Bryant J, Fisher ER, Wolmark N. Twenty-five-year follow-up of a randomized trial comparing radical mastectomy, total mastectomy, and total mastectomy followed by irradiation. *N Engl J Med* 2002;347:567-75.
220. Fisher B, Bryant J, Wolmark N, et al. Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *J Clin Oncol* 1998;16:2672-85.
221. Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD, et al. Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. *J Clin Oncol* 2008;26:778-85.
222. Wolmark N, Wang J, Mamounas E, Bryant J, Fisher B. Preoperative chemotherapy in patients with operable breast cancer: nine-year results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2001:96-102.

223. von Minckwitz G, Loibl S, Maisch A, Untch M. Lessons from the neoadjuvant setting on how best to choose adjuvant therapies. *Breast* 2011;20 Suppl 3:S142-5.
224. Klauber-DeMore N. Tumor biology of breast cancer in young women. *Breast Dis* 2005;23:9-15.
225. Wang F, Fang Q, Ge Z, Yu N, Xu S, Fan X. Common BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer families: a meta-analysis from systematic review. *Mol Biol Rep* 2011;39:2109-18.
226. Criscitiello C, Azim HA, Jr., Schouten PC, Linn SC, Sotiriou C. Understanding the biology of triple-negative breast cancer. *Ann Oncol* 2012;23 Suppl 6:vi13-8.
227. Zhao Y, Dong X, Li R, Song J, Zhang D. Correlation Between Clinical-Pathologic Factors and Long-Term Follow-Up in Young Breast Cancer Patients. *Transl Oncol*;8:265-72.
228. Anders CK, Acharya CR, Hsu DS, et al. Age-specific differences in oncogenic pathway deregulation seen in human breast tumors. *PLoS One* 2008;3:e1373.
229. Johnson RH, Hu P, Fan C, Anders CK. Gene expression in "young adult type" breast cancer: a retrospective analysis. *Oncotarget* 2015;6:13688-702.
230. Pena-Chilet M, Martinez MT, Perez-Fidalgo JA, et al. MicroRNA profile in very young women with breast cancer. *BMC Cancer* 2014;14:529.
231. Bastien RR, Rodriguez-Lescure A, Ebbert MT, et al. PAM50 breast cancer subtyping by RT-qPCR and concordance with standard clinical molecular markers. *BMC Med Genomics* 2012;5:44.
232. Azim HA, Jr., Partridge AH. Biology of breast cancer in young women. *Breast Cancer Res* 2014;16:427.
233. Sweeney C, Bernard PS, Factor RE, et al. Intrinsic subtypes from PAM50 gene expression assay in a population-based breast cancer cohort: differences by age, race, and tumor characteristics. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014;23:714-24.

234. Rodríguez-Gonzalez FG, Sieuwerts AM, Smid M, et al. MicroRNA-30c expression level is an independent predictor of clinical benefit of endocrine therapy in advanced estrogen receptor positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*;127:43-51.
235. Bockhorn J, Dalton R, Nwachukwu C, et al. MicroRNA-30c inhibits human breast tumour chemotherapy resistance by regulating TWF1 and IL-11. *Nat Commun*;4:1393.
236. Bockhorn J, Yee K, Chang YF, et al. MicroRNA-30c targets cytoskeleton genes involved in breast cancer cell invasion. *Breast Cancer Res Treat*;137:373-82.
237. Benz CC. Impact of aging on the biology of breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;66:65-74.

## **Anexos**

---



## IX. ANEXOS

### ANEXO I. Clasificación TNM

#### TUMOR PRIMARIO (T)

<b>Tx</b>	No se puede evaluar el tumor primario
<b>T0</b>	No existe prueba de tumor primario
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ
<b>Tis(CDIS)</b>	CDIS
<b>Tis(CLIS)</b>	CLIS
<b>Tis(Paget)</b>	Enfermedad de Paget del pezón que no está relacionada con el carcinoma invasivo o carcinoma in situ (CDIS o CLIS) en el parénquima mamario subyacente. Los carcinomas mamaros del parénquima mamario relacionados con la enfermedad de Paget se clasifican sobre la base del tamaño y las características de la enfermedad parenquimal, aunque la presencia de la enfermedad de Paget aún se debería señalar.
<b>T1</b>	El tumor mide $\leq 20$ mm en su mayor dimensión
<b>T1 mi</b>	El tumor mide $\leq 1$ mm en su mayor dimensión
<b>T1a</b>	El tumor mide $> 1$ mm pero $\leq 5$ mm en su mayor dimensión
<b>T1b</b>	El tumor mide $> 5$ mm pero $\leq 10$ mm en su mayor dimensión
<b>T1c</b>	El tumor mide $> 10$ mm pero $\leq 20$ mm en su mayor dimensión
<b>T2</b>	El tumor mide $> 20$ mm pero $\leq 50$ mm en su mayor dimensión
<b>T3</b>	El tumor mide $> 50$ mm en su mayor dimensión
<b>T4</b>	El tumor es de cualquier tamaño con extensión directa a la pared pectoral o a la piel (ulceración o nódulos cutáneos)
<b>T4a</b>	Extensión a la pared torácica que no sólo incluye adherencia o invasión a los músculos pectorales
<b>T4b</b>	Ulceración o nódulos satélites ipsilaterales o edema (incluyendo la piel de naranja) la cual no satisface el criterio de carcinoma inflamatorio
<b>T4c</b>	Ambos, T4a y T4 b
<b>T4d</b>	Carcinoma inflamatorio

CDIS: Carcinoma Ductal In Situ; CLIS: Carcinoma lobulillar in situ. La clasificación del tumor primario T es la misma, independientemente de si se fundamenta en el criterio clínico o patológico, o en ambos. Modificado de : .AJCC Cancer Staging Manual Edge, S., Byrd, D.R., Compton, C.C., Fritz, A.G., Greene, F.L., Trotti, A. (Eds.) 7th ed. 2010, XV, 649 p

## Ganglios linfáticos regionales (N)

Clínico	
<b>NX</b>	No se puede evaluar el ganglio linfático regional (p.ej., se extirpó previamente).
<b>N0</b>	No hay metástasis regional a los ganglios linfáticos.
<b>N1</b>	Metástasis en grado ipsilateral movable I, II ganglio linfático axilar o axilares.
<b>N2</b>	Metástasis en grado ipsilateral I, II ganglios linfáticos axilares que están clínicamente fijos o apelmazados.
	Metástasis en ganglios mamarios ipsilaterales internos detectados clínicamente <sup>b</sup> en <i>ausencia</i> de metástasis a ganglio linfático axilar clínicamente manifiesta.
<b>N2a</b>	Metástasis ipsilateral en grado I, II a ganglios linfáticos axilares fijos unos a otros (apelmazados) o a otras estructuras.
<b>N2b</b>	Metástasis solo en ganglios mamarios internos ipsilaterales detectados clínicamente <sup>b</sup> en <i>ausencia</i> de metástasis clínicamente manifiesta a ganglio linfático axilar de grado I, II.
<b>N3</b>	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) infraclavicular(es) ipsilateral(es) (grado III axilar) con implicación de ganglio linfático axilar de grado I, II.
	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) mamario(s) ipsilateral(es) interno(s) clínicamente detectado(s) <sup>b</sup> con metástasis manifiesta en ganglios linfáticos axilares grados I, II.
	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) supraclavicular(es) ipsilateral(es) con implicación axilar o mamaria interna de ganglios linfáticos o sin esta.
<b>N3a</b>	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) infraclavicular(es) ipsilateral(es).
<b>N3b</b>	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) mamario(s) interno(s) ipsilateral(es) y ganglio(s) linfático(s) axilar(es).
<b>N3c</b>	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) ipsilateral(es) supraclavicular(es).

Modificado de AJCC: Breast. En: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al., eds.: AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010, pp 347–76.

<sup>b</sup> Clínicamente detectado se define como encontrado mediante estudios de imagen o mediante examen clínico.



**(pN) Patológico**

<b>pNX</b>	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales (p.ej., extirpación previa o no se extirpó para un estudio patológico).
<b>pN0</b>	No se identificó metástasis en ganglios linfáticos regionales por medios histológicos.

*Nota:* los ITC se definen como pequeños grupos de células  $\leq 0.2$  mm, o células de un solo tumor o una aglomeración de  $< 200$  células en una sección histológica cruzada única. Las ITC se pueden localizar mediante una histología rutinaria o mediante métodos IHC. Los nódulos que solo contienen ITC se excluyen del recuento total de nódulos positivos para el proceso de clasificación N, pero se deben incluir en el número total de nódulos evaluados.

<b>pN0(i-)</b>	Histológicamente, no hay metástasis regional a ganglio linfático regional, IHC negativo.
<b>pN0(i+)</b>	Células malignas en ganglio(s) linfático(s) regional(es) $\leq 0.2$ mm (detectado mediante H&E o IHC, incluyendo la ITC).
<b>pN0(mol-)</b>	Histológicamente no hay metástasis a ganglio linfático regional, hallazgos moleculares negativos (RT-PCR).
<b>pN0(mol+)</b>	Hallazgos moleculares positivos (RT-PCR), pero no se localizó metástasis a ganglio linfático regional alguno mediante histología o IHC.
<b>pN1</b>	Micrometástasis.
	Metástasis en 1–3 ganglios linfáticos axilares.
	Metástasis en ganglios mamarios internos con detección de metástasis localizada mediante biopsia de ganglio linfático centinela, pero sin detección clínica. <sup>c</sup>
<b>pN1mi</b>	Micrometástasis ( $>0,2$ mm o $>200$ células pero ninguna $>2,0$ mm).
<b>pN1a</b>	Metástasis en 1–3 ganglios linfáticos axilares, al menos una metástasis $>2,0$ mm.
<b>pN1b</b>	Metástasis en ganglios mamarios internos con micrometástasis o macrometástasis detectada mediante biopsia de ganglio linfático centinela, pero sin detección clínica.
<b>pN1c</b>	Metástasis en 1–3 ganglios linfáticos axilares y ganglios linfáticos mamarios internos con micrometástasis o macrometástasis localizado mediante biopsia de ganglio linfático, pero sin detección clínica.
<b>pN2</b>	Metástasis in 4–9 ganglios linfáticos axilares.
	Metástasis en ganglios linfáticos mamarios internos detectadas clínicamente <sup>d</sup> en ausencia de metástasis a ganglio linfático axilar.

<b>pN2a</b>	Metástasis en 4–9 ganglios linfáticos axilares (al menos un depósito tumoral >2 mm).
<b>pN2b</b>	Metástasis en ganglios linfáticos mamaros internos detectados clínicamente en <i>ausencia</i> de metástasis a ganglio linfático axilar.
<b>pN3</b>	Metástasis en $\geq 10$ ganglios linfáticos axilares.
	Metástasis en ganglios linfáticos infraclaviculares (grado III axilar).
	Metástasis en ganglios linfáticos mamaros internos ipsilaterales detectados clínicamente <sup>c</sup> en <i>presencia</i> de $\geq 1$ ganglios linfáticos axilares positivos de grado I o II.
	Metástasis en >3 ganglios linfáticos axilares y ganglios linfáticos internos mamaros con micrometástasis o macrometástasis localizada mediante biopsia de ganglio linfático centinela pero sin detección clínica. <sup>c</sup>
	Metástasis en ganglios linfáticos ipsilaterales supraclaviculares.
<b>pN3a</b>	Metástasis en $\geq 10$ ganglios linfáticos axilares (por lo menos un depósito tumoral >2,0 mm).
	Metástasis a los ganglios infraclaviculares (ganglio axilar de grado III).
<b>pN3b</b>	Metástasis en >3 ganglios linfáticos axilares y ganglios mamaros internos detectados clínicamente <sup>d</sup> en <i>presencia</i> de metástasis a ganglio linfático axilar de $\geq 1$ ganglio linfático axilar positivo.
	Metástasis en >3 ganglios linfáticos axilares y ganglios linfáticos internos mamaros con micrometástasis o macrometástasis localizada mediante biopsia de ganglio linfático centinela pero sin detección clínica.
<b>pN3c</b>	Metástasis en ganglios linfáticos ipsilaterales supraclaviculares.

#### Postratamiento ypN

Postratamiento yp "N" se deberían evaluar como métodos clínicos (pretratamiento) "N" arriba. El modificador "sn" solo se usa si una evaluación de un ganglio linfático se llevó a cabo luego del tratamiento. Se asume que la evaluación del ganglio axilar fue mediante DGA.

Se usará la clasificación X (ypNX) si no se llevó a cabo el postratamiento yp SN o DGA.

N las categorías son las mismas que se usan para la pN.

*Modificado de AJCC: Breast. En: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al., eds.: AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010, pp 347–76.*

*DGA = disección ganglionar axilar; H&E = tinción de hematoxilina y eosina; IHC = inmunohistoquímico; ITC = células tumorales aisladas; RT-PCR = reacción en cadena de la transcriptasa/polimerasa inversa.<sup>b</sup>*

*La clasificación se fundamenta en la disección de ganglios linfáticos axilares con biopsia de ganglio linfático centinela o sin esta. La clasificación que se fundamenta sólo en la biopsia de ganglio linfático centinela sin una disección de ganglio linfático axilar subsiguiente, se designa como (sn) para "ganglio centinela", por ejemplo pN0(sn).*

## METÁSTASIS A DISTANCIA

<b>M0</b>	<b>No hay prueba clínica o radiográfica de metástasis a distancia.</b>
<b>cM0(i+)</b>	No hay prueba clínica o radiográfica de metástasis a distancia, pero sí detección de depósitos de células tumorales moleculares o microscópicas en la sangre circulante, médula ósea u otros tejidos ganglionares no regionales, que tienen $\leq 0.2$ mm en pacientes sin signos o síntomas de metástasis.
<b>M1</b>	Hay metástasis a distancia según lo determinan medios clínicos o radiográficos clásicos o se comprueba por medios histológicos que tiene $>0.2$ mm.

Modificado de AJCC: Breast. En: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al., eds.: AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010, pp 347–76.

## ESTADIO ANATÓMICO/GRUPOS PRONÓSTICOS

<b>Estadio</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>IA</b>	T1	N0	M0
<b>IB</b>	T0	N1mi	M0
	T1	N1mi	M0
<b>IIA</b>	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
<b>IIB</b>	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
<b>IIIA</b>	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
<b>IIIB</b>	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
<b>IIIC</b>	Cualquier T	N3	M0
<b>IV</b>	Cualquier T	Cualquier N	M1

Modificado de AJCC: Breast. En: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al., eds.: AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010, pp 347-76

**ANEXO II: Grado histológico (Scarf-Bloom-Richardson)**

CARACTERISTICAS	PUNTOS
<b>Formación de tubulos (porcentaje de carcinoma compuesto por estructuras tubulares)</b>	
> 75 %	1 punto
10 - 75 %	2 puntos
< 10 %	3 puntos
<b>Pleomorfismo nuclear</b>	
<b>Células uniformes pequeñas</b>	1 punto
<b>Aumento moderado en el tamaño y en la variación</b>	2 puntos
<b>Notable variación</b>	3 puntos
<b>Cifra mitótica (por 10 campos potenciados)</b>	
<b>Hasta 7</b>	1 punto
<b>8 - 14</b>	2 puntos
<b>15 o más</b>	3 puntos
<b>Grado histológico final</b>	
<b>Grado 1</b>	3 - 5
<b>Grado 2</b>	6 y 7
<b>Grado 3</b>	8 y 9













## ***ANEXO V. Publicaciones y pósters***

### **Publicaciones**

Peña-Chilet M, **Martínez MT**, Pérez-Fidalgo JA, Peiró-Chova L, Oltra SS, Tormo E, Alonso-Yuste E, Martínez-Delgado B, Eroles P, Climent J, Burgués O, Ferrer-Lozano J, Bosch A, Lluch A, Ribas G. MicroRNA profile in very young women with breast cancer. *BMC Cancer*. 2014 Jul 21;14:529. doi: 10.1186/1471-2407-14-529.

### **Posters**

M.T. MARTÍNEZ, M. Peña-Chilet, J. A. Pérez-Fidalgo, A. Bosch, E. Alonso, J. Ferrer, O. Burgues, B. Bermejo, A. Lluch, G. Ribas. Breast cancer in very young patient is a more aggressive entity independent from breast cancer subtype. San Antonio Breast Cancer Symposium. San Antonio, Texas. December 2013

M. Peña-Chilet, M. T. MARTINEZ, J. A. Perez-Fidalgo, L. Peiro-Chova, B. Bermejo, J. Ferrer, E. Alonso, O. Burgues, A. Bosch, A. Lluch, G. Ribas. A distinctive miRNA profile highlights Breast Cancer in very young women (BCVY) as a new molecular subgroup. San Antonio Breast Cancer Symposium. San Antonio, Texas. December 2013

M. T. MARTINEZ, M. Peña-Chilet, J.A. Perez-Fidalgo, S. Oltra, E. Alonso, O. Burgues, B. Bermejo, A. Lluch, G. Ribas. Perfil distintivo de microARNs en tumores de mujeres muy jóvenes con

cáncer de mama. VI Symposium Bases Biológicas del Cancer y Terapias personalizadas. Mayo 2014. Salamanca. POSTER GANADOR DE 2º PREMIO.

Sara S Oltra, Maria Peña-Chilet, M. MARTÍNEZ, Marta Llorca, Edu Tormo, Pilar Eroles, Ana Lluch, G. Ribas. Molecular characterization of breast cancer cell lines from young women. I Congreso Biomedicina Predocs Valencia. Noviembre 2014.

Gloria Ribas, Maria Peña-Chilet, Sara Oltra, MARIA TERESA MARTINEZ, Ana Lluch, Guillermo Ayala. Differential expression in microRNAs in breast cancer patients 35 years or younger. IMPAKT 2015. Mayo 2015.

Sara S Oltra, Maria Peña-Chilet, MAITE MARTINEZ, Marta J Llorca-Cardenosa, Eduardo Tormo, Pilar Eroles, Ana Cuesta, Ana Lluch, Gloria Ribas. Molecular characterization of breast cancer cell lines from young women. European Cancer Congress 2015, Viena, Austria, del 25-29 de Septiembre de 2015