



Universidad
Zaragoza



Trabajo Fin de Grado

ANÁLISIS DE LOS BIOMARCADORES EN EL
CÁNCER DE MAMA: ¿DIFERENCIAS ENTRE
GRUPOS DE EDAD?

ANALYSIS OF BIOMARKERS IN BREAST CANCER:
DIFFERENCES ACCORDING TO AGE GROUPS?

Autor

Marina Ubal Berlanga

Director

Prof. Dr. Francisco Javier Azúa Romeo M.D., PhD. Ms. Ed.

Facultad de Medicina
Departamento de Histología
Universidad de Zaragoza
2019

Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado gracias a la colaboración de varias personas y entidades que me han prestado ayuda para su elaboración.

Entre ellas, y en primer lugar quisiera agradecer la ayuda de mi director, el prof. Dr. Francisco Javier Azúa Romeo, por todo lo que me ha enseñado durante la realización de este proyecto y su esfuerzo por acercarme a la histología. Gracias también por haberme guiado en la elaboración del trabajo durante todo este año, corrigiendo con paciencia y apoyo en todo momento.

Al Departamento de Anatomía e Histología Humanas de la Universidad de Zaragoza, por permitirme esta investigación.

Este trabajo no habría sido posible sin la colaboración de los laboratorios Eurofins/Megalab y Roche, que nos facilitaron las muestras desde sus sedes centrales y gracias a las cuales se ha podido realizar esta investigación.

Por último, quisiera agradecer a mi familia el apoyo incondicional que me han brindado durante este año, y durante todo mi graduado, y que con ese cariño infinito han entendido mis ausencias y mis malos momentos. Gracias porque a pesar de la distancia siempre han estado a mi lado para saber como iba el proceso.

A todos ustedes, mi mayor reconocimiento y gratitud.



Departamento de
Anatomía
e Histología Humanas
Universidad Zaragoza



eurofins

MEGALAB



Índice

Índice de Ilustraciones	4
Índice de Tablas	5
Índice de Gráficos	6
Índice de Abreviaturas	7
Resumen	8
Introducción	9
• Etiología	10
• Clínica	10
• Diagnóstico precoz y Screening	10
• Pruebas diagnósticas	11
• Clasificación	12
• Marcadores biológicos	13
• Grado histológico de malignidad	16
• Tratamiento	16
Objetivos	18
• Hipótesis	18
Material y métodos	19
• Técnica de estudio de los biomarcadores	19
• Análisis y método estadístico	25
• Limitaciones	25
• Aspectos ético-legales	25
Resultados	26
• Revisión bibliográfica	26
• Análisis descriptivo	29
• Estudio de asociaciones	32
Discusión	34
Conclusiones	37
Bibliografía	38
Anexos	41

Índice de Ilustraciones

Ilustración 1. Tinción positiva para p63 en un ducto normal	15
Ilustración 2. Carcinoma ductal infiltrante con p63 negativo y control interno positivo	15
Ilustración 3. Muestra RE positivo Allred 8 (3+5)	20
Ilustración 4. Muestra RE positivo Allred 8 a mayor aumento	20
Ilustración 5. Muestra RE negativo, con control interno positivo	21
Ilustración 6. Software VENTANA Virtuoso	21
Ilustración 7. Muestra RP +/-+++	22
Ilustración 8. Muestra RP + (Allred 8)	22
Ilustración 9. Muestra Cerb2 negativo (+/+++)	23
Ilustración 10. Muestra Cerb2 +++	23
Ilustración 11. Muestra Cerb2 +++ a mayor aumento	23
Ilustración 12. HER2/neu no amplificado, ya que se visualizan señales SISH y ISH-rojo como 1 a 2 copias por cada célula tumoral	24
Ilustración 13. HER2/neu amplificado, se visualizan cúmulos de. HER2 SISH	24

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación BIRADS	46
Tabla 2. Subtipos de cáncer de mama	12
Tabla 3. Escala de Scarff-Bloom	23
Tabla 4. Estudios incluidos en nuestra revisión bibliográfica	25
Tabla 5. Resultados principales de los estudios revisados	26
Tabla 6. Estudio descriptivo de la edad al diagnóstico	46
Tabla 7. Sobreexpresión de HER2/neu en grupo 1 y grupo 3	31
Tabla 8. Chi-cuadrado y corrección de Yates para la sobreexpresión de HER2/neu en grupo 1 y grupo 3	47
Tabla 9. Valores observados del inmunofenotipo	47
Tabla 10. Valores esperados del inmunofenotipo	47
Tabla 11. Tabla chi-cuadrado	48

Índice de Gráficos

Gráfico 1. Número de casos de cáncer en mujeres en España durante 2018	9
Gráfico 2. Estudio descriptivo de la edad al diagnóstico	41
Gráfico 3. Distribución en grupos de edad	41
Gráfico 4. Estudio de la positividad a receptores de estrógenos	42
Gráfico 5. Estudio de la positividad a receptores de progesterona	42
Gráfico 6. Estudio de la positividad a receptores de estrógenos	43
Gráfico 7. Estudio de la expresión de Ki67	43
Gráfico 8. Expresividad de los receptores de estrógenos según la edad	44
Gráfico 9. Expresividad de los receptores de progesterona según la edad	44
Gráfico 10. Sobreexpresión de HER2/neu según la edad	45
Gráfico 11. Intensidad de tinción para receptores de estrógeno según grupos de edad	45
Gráfico 12. Intensidad de tinción para receptores de progesterona según grupos de edad	46
Gráfico 13. Sobreexpresión de HER2/neu según grupos de edad	46

Índice de abreviaturas

<u>Abreviatura</u>	<u>Término</u>
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASCO	American Society of Clinical Oncology
BIRADS	Breast Imaging Reporting and Data System
CAP	College of American Pathologists
CDI	Carcinoma ductal infiltrante
CEN-17	Centrómero 17
CK19	Citoqueratina 19
EBCN	European Breast Cancer Network
EE. UU	Estados Unidos de América
EUREF	European Reference Organisation for Quality Assured Breast Screening and Diagnostic Services.
EUSOMA	European Society of Breast Cancer Specialists
H0	Hipótesis nula
H1	Hipótesis alternativa
IHQ	Inhumohistoquímica
ISH	Hibridación In Situ
mm	Milímetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
OSNA	One Step Nucleic Acid Amplification
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
RT-LAMP	Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification
µm	Micrómetro

Resumen

El cáncer de mama es el más frecuente en el sexo femenino, siendo la edad su principal factor favorecedor. En este estudio se ha tratado de establecer si existen diferencias en el inmunofenotipo de mujeres de distintos grupos de edad.

Para ello se ha seleccionado finalmente una muestra de 90 mujeres diagnosticadas de cáncer de mama ductal infiltrante entre 2010 y 2019 en los laboratorios Eurofins. Para su estudio se establecieron tres grupos de edad: mujeres menores de 40 años, entre 40-65 años y las mayores de 65 años.

Los resultados de nuestro estudio no han demostrado diferencias significativas en los receptores de estrógeno, progesterona y la sobreexpresión del oncogen *cerb-HER2*, a pesar de que gran parte de la literatura estudiada demuestra una menor expresión de receptores hormonales en el grupo de mujeres jóvenes y una menor sobreexpresión de *HER2/neu* conforme aumenta la edad. Al estudiar la distribución por edades del inmunofenotipo se ha encontrado una mayor proporción del subtipo *HER2+* y del subtipo Triple negativo en el grupo de mujeres jóvenes, a pesar de que el subtipo más frecuente en los tres grupos es el Luminal A-like. En las mujeres añosas se ha observado una mayor frecuencia del subtipo Luminal B-like. Estas diferencias podrían ayudar a establecer pautas de tratamiento ajustadas a la edad del paciente, ya que existen distintas terapias dirigidas a los diferentes receptores analizados en este estudio.

Palabras clave: cáncer de mama, inmunofenotipo, biomarcadores, grupos de edad

Abstract

Breast cancer is the most frequent one in females, being the age the main risk factor. In this study we have tried to establish if there are differences in the immunophenotype of women of different age groups.

To this end, we have selected a sample of finally 90 women diagnosed with infiltrating ductal breast cancer between 2010 and 2019 in the Eurofins laboratories. For their study, three age groups were established: women under 40 years, between 40-65 years and those over 65 years.

The results of our study have not shown significant differences in the estrogen and progesterone receptors or in overexpression of the *cerb-HER2* oncogene, despite the fact that a large part of the literature studied shows a lower expression of hormone receptors in the group of young women and a lower overexpression of *HER2 / neu* as the age increases. When studying the age distribution of the immunophenotype, a bigger proportion of the *HER2 +* subtype and the Triple negative subtype was found in the group of young women, despite the fact that the most frequent subtype in the three groups is Luminal A-like. In older women, we have observed a bigger frequency of the Luminal B-like subtype. These differences could help to establish treatment guidelines adjusted to the age of the patient, since there are different therapies directed to the different receptors analysed in this study.

Keywords: breast cancer, immunophenotype, biomarkers, age groups

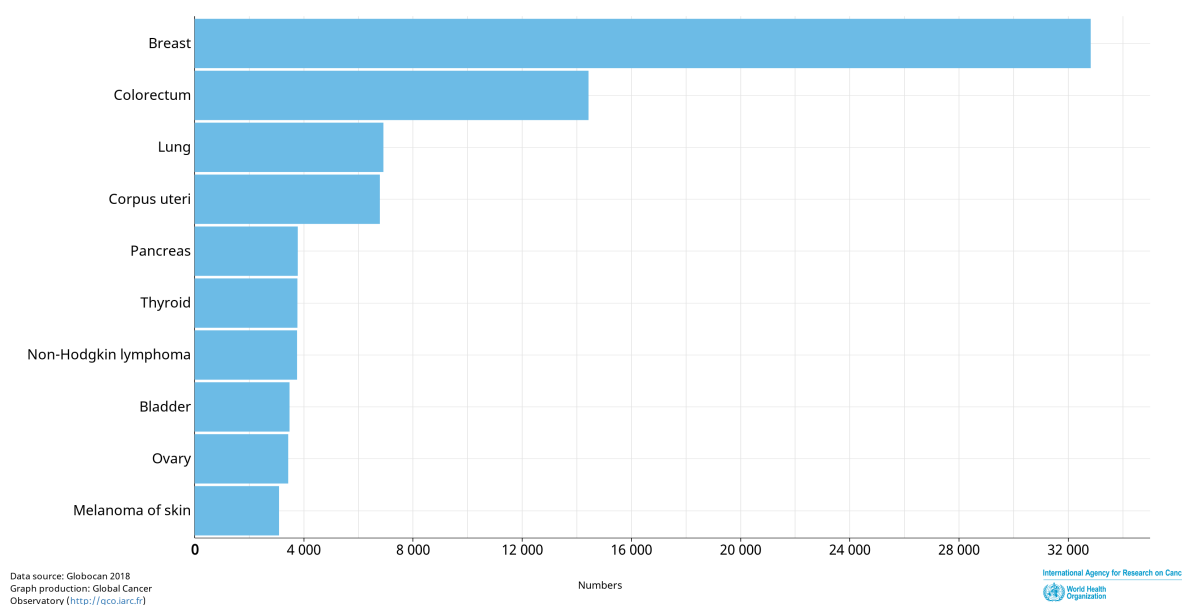
Introducción

El cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente en el sexo femenino (Gráfico 1), constituyendo un problema de salud pública mundial, fundamentalmente en los países desarrollados.

La edad es el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama, que afectará a 1 de cada 8 mujeres a lo largo de su vida. En España, la mayoría se diagnostican entre los 45 y los 65 años. **(1)**

Ocupa el segundo puesto en incidencia global, solo por debajo del cáncer de pulmón, con 32.825 casos nuevos en España en el 2018. **(2)**

Gráfico 1. Número de casos de cáncer en mujeres en España durante 2018



Fuente: Global Cancer Observatory

Los datos estadísticos muestran un incremento estable de la incidencia del cáncer de mama, que se estima en un 1-2% anual, probablemente por un diagnóstico cada vez más precoz y una población cada vez más envejecida.

A pesar de que el cáncer de mama continúa siendo la primera causa de muerte por cáncer entre las mujeres, el tiempo de supervivencia general se ha prolongado. Según Eurocare-4, la supervivencia global a los 5 años del diagnóstico es del 82% en nuestro país, por encima de la media europea y similar a los países con las mejores cifras de supervivencia.

Esto refleja el avance de las terapias farmacológicas y la mejora de la técnica quirúrgica, así como la eficacia de la detección precoz del cáncer de mama. **(2,3)**

Etiología

La etiología del cáncer de mama es mayoritariamente desconocida ya que en dos terceras partes de los casos no se asocia a factores de riesgo.

Entre los factores de riesgo más conocidos, destacan el sexo femenino, la raza blanca, la edad (máxima incidencia entre 50-70 años), la exposición prolongada a estrógenos, el sobrepeso, historia personal o familiar de cáncer de mama, antecedentes personales de otra patología mamaria (carcinoma in situ o lesiones proliferativas con atipia), anticonceptivos hormonales combinados y las radiaciones ionizantes.

El cáncer de mama hereditario supone aproximadamente del 5 al 10% de los casos, siendo los genes conocidos más importantes el *BCRA1* y *BCRA2*. En menor frecuencia, también se asocia a otros síndromes hereditarios como el síndrome de Li Fraumeni (mutación en el gen p53), el síndrome de Cowden (mutación en el gen PTEN), el síndrome de Lynch (mutación en el cromosoma 17), el síndrome de Peutz-Jeghers, el síndrome de ataxia-telangiectasia y mutaciones del gen CHEK2. (4)

Clínica

A pesar de que en numerosas ocasiones el cáncer de mama es asintomático, la clínica más característica es la de una masa dura palpable. Puede estar fija o no, a planos profundos y con o sin retracción de la piel.

El hallazgo de adenopatías axilares o en fosa supraclavicular apoyarían la sospecha diagnóstica, al igual que una secreción mamaria patológica. (1)

La exploración física se realiza mediante la palpación mamaria sistemática por cuadrantes, en sedestación, con los brazos extendidos y la paciente en decúbito supino.

El carcinoma inflamatorio de mama, en su exploración física, tiene signos compatibles con la mastitis (como el aumento de tamaño de la mama, eritema y calor), lo que se debe tener en cuenta ante una falta de respuesta al tratamiento antibiótico. (4)

Diagnóstico precoz y Screening

Hoy día el cáncer de mama se puede considerar una enfermedad no localizada, es decir, que se trata de una enfermedad sistémica desde el inicio, ya que tumores pequeños y sin afectación axilar pueden producir metástasis a distancia. (5)

Como resulta complicado evitar su aparición, ya que como se ha comentado previamente un gran número de casos aparecen sin factores de riesgo aparentes, la detección precoz es muy útil para disminuir la morbilidad.

Si es detectada a tiempo, es una enfermedad de relativamente buen pronóstico, con una supervivencia media a los 5 años del 78% en los países desarrollados. (1)

Actualmente, en España todas las comunidades autónomas cumplen programas de cribado poblacionales dirigidos a mujeres de entre 50 y 64 años en las que se realiza una mamografía de forma bianual. Estos programas tienen a las “Guías europeas de garantía de calidad en cribado” como documento de referencia, y siguiendo sus últimas

recomendaciones son varias las comunidades autónomas que van a incluir a mujeres de hasta 69 años.

El objetivo principal del cribado poblacional de un cáncer es el de reducir la mortalidad por esta causa, pero siempre teniendo presente que también implica efectos adversos. Un aspecto que ha tomado mucha relevancia es el posible sobrediagnóstico y sobretratamiento del cáncer detectado precozmente, lo que algunos autores han descrito como un “entusiasmo engañoso” en relación con los resultados de los cribados.

A pesar de esta controversia, la efectividad del cribado en el cáncer de mama está bien demostrada en mujeres de 50 a 69 años, que es el grupo de edad en el que se ha conseguido un beneficio en términos de reducción de mortalidad.

No existe un acuerdo entre los organismos médicos internacionales respecto al inicio del cribado por debajo de los 50 años, ya que los resultados en reducción de mortalidad del grupo de mujeres comprendido entre los 40-49 años no se han demostrado en los metaanálisis. Entre los organismos que NO recomiendan el cribado a mujeres menores de 50 años se incluye la European Commission (EBCN, EUSOMA, EUREF), 2006; y entre los que si lo recomiendan se incluye la U.S. Preventive Services Task Force, 2005. (6)

Pruebas diagnósticas

Ante un nódulo sospechoso, la prueba a realizar variará en función de la edad:

- Paciente ≥ 35 años realizar mamografía, y en función de los resultados solicitar una ecografía.
- Paciente < 35 años iniciar con una ecografía, ya que la densidad de la mama impide una valoración adecuada mediante mamografía, y si se hay sospecha de malignidad solicitar una mamografía.
- Paciente con lesión sospechosa de benignidad, embarazo o mamografía normal hace menos de un año, iniciar el estudio mediante mamografía.

Se consideran signos mamográficos de posible malignidad:

- Lesión espiculada (lo más frecuente): masa densa e irregular con un margen espiculado.
- Lesiones con márgenes mal definidos o margen lobulado.
- Distorsión de la arquitectura.
- Densidad focal asimétrica.
- Más de 5 microcalcificaciones agrupadas, cada una menor de 0'5 mm de diámetro, aisladas en un pequeño volumen de mama.

Los hallazgos se clasifican según las categorías del sistema BIRADS (Tabla 1).

Cuando las lesiones radiológicas son sospechosas de malignidad se procede al diagnóstico de certeza, que requiere la confirmación histológica o citológica. Para ello pueden usarse distintas técnicas, que se detallan a continuación:

- Biopsia de agua gruesa (BAG): si nódulo BIRADS 4-5 o adenopatías sospechosas.
- Biopsia asistida por vacío (BAV): si calcificaciones sospechosas o distorsión arquitectural.
- Punción aspiración con aguja fina (PAAF): si adenopatías axilares sospechosas.

Además del diagnóstico histológico, se debe evaluar mediante inmunohistoquímica los receptores de estrógenos y progesterona, la sobreexpresión de *herb-B2* y el índice proliferativo Ki-67 en el informe patológico. **(1)**

Clasificación

El cáncer de mama es una entidad de gran heterogeneidad que comprende varios tipos, con diferente pronóstico y tratamiento.

La clasificación histológica se basa en la anatomía de la mama, y la mayoría son carcinomas que surgen del epitelio ductal. Los carcinomas se diferencian, además, en carcinomas in situ (las células tumorales no sobrepasan la membrana basal) o carcinomas infiltrantes.

La clasificación de la OMS de 2002 contempla 18 tipos histológicos de cáncer de mama infiltrante, siendo los siguientes los más frecuentes:

- Carcinoma ductal infiltrante (CDI)
Es el más frecuente a todas las edades.
Las células del CDI suelen expresar E-cadherina en las técnicas de inmunohistoquímica, lo que permite diferenciarlo de otros tipos histológicos.
- Carcinoma lobulillar infiltrante
Es el segundo más frecuente. Originado en los acinos glandulares, suele ser multicéntrico y bilateral.
- Carcinoma medular
- Carcinoma tubular
- Carcinoma mucinoso o coloide
- Carcinoma micropapilar
- Carcinoma cribiforme
- Carcinoma papilar
- Enfermedad de Paget
- Tumores mesenquimatosos: angiosarcomas, liposarcomas, osteosarcomas, leiomiomasarcomas
- Metástasis

La clasificación histológica es extensa, pero no basta para explicar la diversidad de comportamiento biológico dentro de un mismo tipo histológico.

Es por esto que, en el año 2000, Perou y Sorlie sentaron las bases de la actual clasificación molecular del cáncer de mama, demostrando que los tumores se podían clasificar de acuerdo a patrones de expresión genómica. Aunque se conoce su gran importancia, los análisis de expresión molecular todavía no están muy extendidos al no ser tan accesibles. Por ello, se realizó una adaptación y los subtipos se definen en base a los resultados de inmunohistoquímica. Se identificaron 5 subtipos principales (Tabla 2).

- **Luminal**
Este subtipo es el más frecuente, constituyendo aproximadamente un 75-80% de los cánceres de mama.
 - **A-like:** receptores de estrógeno (RE) y progesterona (RP) positivos. HER2/neu negativo. Ki67 <14%.

Se asocia a buen pronóstico por buena tasa de respuesta a hormonoterapia. La respuesta a la quimioterapia es pobre.

- **B-like:** menos hormonosensible (expresión moderada de receptores hormonales) y por ello tiene peor pronóstico. Ki 67 >14%. Según la expresión de HER2/neu se diferencian en Luminal B HER2- o Luminal B HER2+.
- **HER2/ neu sobreexpresado:** con receptores estrogénicos negativos. Asocian un peor pronóstico, con una mayor agresividad biológica. Predice una mejor respuesta a la quimioterapia y a las terapias anti-HER2. Son tumores muy proliferativos.
- **Triple negativo o Basal-like:** RE -, RP-, HER2-. Es más común en mujeres jóvenes y se asocia a mutaciones de p53 y BRCA1. Se asocian a un mayor grado histológico y tamaño tumoral, así como más afectación ganglionar.
- **Normal:** son tumores con características similares a las del tejido mamario sano. (1,4,7)

Tabla 2. Subtipos de cáncer de mama.

Luminal A-like	Luminal B-like		Basal-like	HER2/neu sobreexpresado
RE +	RE +	RE +	RE -	RE -
RP \geq 20%	RP <20%	RP +/-	RP -	RP -
HER2/neu -	HER2/neu -	HER2/neu +	HER2/neu -	HER2/neu +
Ki67 bajo	Ki67 alto			

Fuente: elaboración propia

Marcadores biológicos

Receptores hormonales: RE y RP

Mediante una determinación inmunohistoquímica (IHQ) semicuantitativa, se identifica la expresión del receptor de estrógeno (ER) y del receptor de progesterona (PR) en tejidos normales y neoplásicos.

Los estudios histológicos confirman que el estado de los receptores hormonales está relacionado con el pronóstico sin tratamiento del cáncer de mama, y sobre todo está muy relacionado con la respuesta al tratamiento antihormonal. (5,8,9)

HER2/neu

En el 10-15% de los carcinomas invasivos de mama el oncogén *cerbB2* (localizado en el cromosoma 17) está amplificado o el receptor HER-2/neu sobreexpresado.

La expresión de HER2 es un factor pronóstico independiente y se correlaciona con una mayor agresividad biológica y una peor supervivencia de las pacientes. Son tumores muy proliferativos, con alta quimiosensibilidad y mal pronóstico. Al mismo tiempo es un factor pronóstico de alta sensibilidad a las terapias anti-HER2 (trastuzumab) y en los últimos años este tratamiento ha mejorado la supervivencia.

Su determinación se realiza por técnicas de inmunohistoquímica (proteína) para la determinación de screening, o bien por técnicas hibridación in situ cromogénica (ISH) o con fluorocromos (FISH) en casos dudosos. **(4,8,10)**

Ki67

La proliferación celular es un factor pronóstico que siempre ha influido en la clasificación tumoral.

El Ki67 es una proteína nuclear cuyo gen está situado en el brazo largo del cromosoma 10. Tiene un papel importante en la regulación del ciclo celular y su determinación se realiza mediante técnicas de IHQ.

El Ki 67 se expresa durante todas las fases activas del ciclo celular, pero está ausente en las células en reposo. Durante la interfase, el antígeno se detecta exclusivamente dentro del núcleo, mientras que durante la mitosis la mayoría de la proteína detectada está localizada en la superficie de los cromosomas.

En la actualidad no hay un consenso sobre los puntos de corte para su valoración, siendo un método que genera gran variabilidad en su interpretación entre laboratorios y patólogos. Sin embargo, numerosos estudios han demostrado su valor como factor predictivo, sirviendo tanto para medir la respuesta al tratamiento, como para predecir mejor respuesta a la quimioterapia si los índices son altos.

En el último consenso de Saint Gallen 2015 el punto de corte se estableció entre el 20% y el 29%, considerándose Luminal A por debajo y Luminal B por encima. **(8,11)**

E-cadherina

La E-cadherina es una molécula dependiente del calcio, que actúa fundamentalmente facilitando la adhesión intercelular de las células epiteliales y estableciendo la polarización epitelial y la diferenciación glandular.

Está codificada por el gen CDH1, por lo que su modificación epigenética explica la disminución de la expresión de E-cadherina. Esta falta de expresión provoca una pérdida de la adhesión celular y se relaciona típicamente con el carcinoma invasivo lobulillar.

Además de en el cáncer de mama, también se observa una disminución de su expresión en el cáncer gástrico y en el cáncer colorrectal. **(12)**

Queratina 19

La biopsia de ganglio centinela se considera de elección para el estudio de metástasis en cáncer de mama en fase temprana con ganglios clínicamente negativos. La estadificación axilar está indicada en todos los casos de tumores infiltrantes.

El análisis del ganglio centinela se realizaba de manera convencional por corte con congelación o impronta citológica, con tinción rápida en hematoxilina y eosina de manera

intraoperatoria. Este método ha sido destituido por su baja sensibilidad, ya que en muchos casos en los que el análisis intraoperatorio era negativo, se identificaban como positivos de manera postoperatoria, lo que requería de una segunda intervención quirúrgica para el vaciamiento axilar.

El análisis OSNA (One Step Nucleic Acid Amplification o amplificación de ácidos nucleicos en un solo paso) constituye un nuevo enfoque diagnóstico que permite analizar la totalidad del ganglio linfático de manera intraoperatoria, siendo posible establecer el diagnóstico sin necesidad de un análisis histopatológico confirmatorio.

OSNA es un ensayo de diagnóstico molecular automatizado que utiliza la tecnología RT-LAMP como método de amplificación de ácidos nucleicos para detectar a nivel de ARNm el grado de expresión del gen que codifica la citoqueratina 19 (CK19).

La CK19 es un marcador de células epiteliales que en condiciones normales no se expresa en el tejido linfático. La presencia de ARNm de CK19 se corresponde con el tamaño de los focos metastásicos presentes en el ganglio centinela, por lo que la valoración del resultado se basa en una curva estándar. (13)

Actina o P63

La estructura normal de los conductos y lobulillos mamarios la conforman dos capas de células, epiteliales y mioepiteliales, además de una membrana basal. Para el diagnóstico de la invasión estromal del tumor se requiere evaluar la integridad de la membrana basal, que se mantiene en el carcinoma in situ y en las lesiones benignas.

Los estudios de IHQ se basan en la identificación de células mioepiteliales en la periferia de la lesión, existiendo diversos marcadores.

Uno de ellos, y el que se considera más específico, es la proteína p63 (Ilustración 1 y 2), perteneciente a la familia de supresores tumorales p53. Esta proteína actúa como factor de transcripción regulando el ciclo celular, manteniendo la proliferación o induciendo la apoptosis en función del estímulo recibido. Es un marcador nuclear que se encuentra principalmente en la capa basal del epitelio escamoso estratificado y del epitelio de transición. (14)

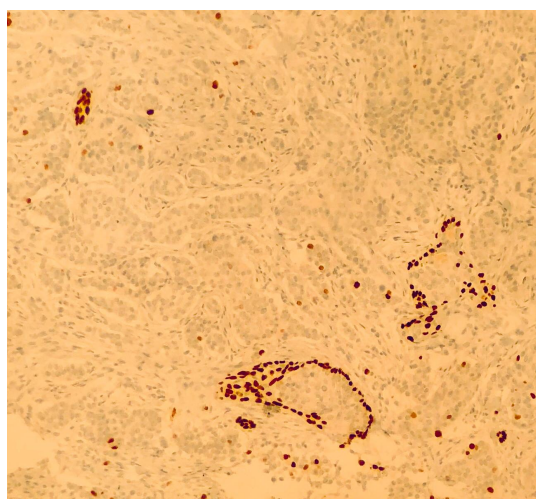


Ilustración 1. Tinción positiva para p63 en un ducto normal

Ilustración 2. Carcinoma ductal infiltrante con p63 negativo y control interno positivo

Otro marcador tradicional es la actina, que marca las células mioepiteliales del músculo liso. Es menos específico, ya que también marca los miofibroblastos y la pared vascular, dificultando el diagnóstico entre carcinoma in situ e infiltrante con estroma desmoplásico.

A diferencia del p63, se tiñe como una línea continua. **(15)**

Grado histológico de malignidad

El grado histológico representa la diferenciación celular y constituye un importante factor pronóstico, ya que se ha relacionado con el riesgo de recurrencia de los tumores y con una mayor frecuencia de metástasis. Algunos autores refieren que podría relacionarse también con el grado de respuesta a la quimioterapia.

El sistema Scarff Bloom de Richardson, con la modificación de Nottingham introducida por Elston y Ellis, es el sistema actualmente más utilizado. Esta clasificación incluye una evaluación de la arquitectura y la atipia celular, además de la proporción de mitosis. **(5)**

Tratamiento

El tratamiento primario del carcinoma de mama infiltrante dependerá del subtipo molecular, además del estadio al diagnóstico y de los factores pronósticos.

El *tratamiento quirúrgico* estándar en el cáncer de mama es la cirugía conservadora, siempre que sea posible la exéresis completa del tumor con márgenes libres y con un buen resultado estético. Posteriormente se completa con radioterapia.

La *quimioterapia neoadyuvante* se plantea en casos de tumores localmente avanzados en los que no es posible una cirugía de entrada. También se usa en tumores inicialmente resecables pero que asocian factores de mal pronóstico, como los tumores triple negativo, los que tienen afectación axilar o los que sobreexpresan HER2/neu.

Esta técnica, además de reducir el volumen tumoral, permite determinar “in vivo” la quimiosensibilidad del tumor. Los regímenes que han demostrado mayor índice de respuesta patológica completa son los que contienen de manera secuencial antraciclinas y/o taxanos, y se dan durante 5-6 meses.

Los tumores que sobreexpresan HER2/neu, además, se benefician de asociar trastuzumab (anticuerpo monoclonal humanizado de administración parenteral) o pertuzumab durante la quimioterapia, y hasta completar un año de tratamiento.

La *hormonoterapia neoadyuvante* se plantea en pacientes menopáusicas de edad avanzada con carcinomas luminales en las que no es posible una cirugía conservadora. También se usa en carcinomas localmente avanzados tipo luminal A-like.

Esta técnica, al igual que la quimioterapia neoadyuvante, además de reducir el volumen tumoral, permite determinar “in vivo” la hormonosensibilidad del tumor. Consiste en la administración de un inhibidor de la aromatasa durante 6-12 meses.

Respecto al *tratamiento sistémico* del cáncer de mama, después de la exéresis tumoral o cuando esta no va a ser posible, también varía en función del subtipo molecular del tumor:

- Quimioterapia adyuvante: se recomienda iniciarla en menos 6 semanas tras la cirugía. Los regímenes y duración son iguales que los de la quimioterapia neoadyuvante.

Los factores predictores de respuesta a la quimioterapia son los siguientes:

- Alto grado histológico
- Receptores hormonales negativos
- Elevada proliferación tumoral
- Sobreexpresión de HER2
- Infiltrado inflamatorio

- Hormonoterapia adyuvante: si la determinación del receptor de estrógenos es al menos de un 10%.

En pacientes premenopáusicas debe realizarse con Tamoxifeno. Tradicionalmente se prolongaba la terapia durante 5 años, aunque actualmente tiende a ampliarse a 10 años.

En pacientes menopáusicas debe realizarse con inhibidores de la aromatasas, ya sea de inicio o tras 2-3 años de tratamiento con Tamoxifeno. También se tiende a ampliar a 10 años la duración de la terapia, sobre todo en mujeres con alto riesgo de recidiva.

Los factores predictores de respuesta a la hormonoterapia son los siguientes:

- Bajo grado histológico
- Alta expresión de receptores hormonales
- HER 2 negativo
- Baja proliferación tumoral **(1,4)**

Objetivos

El objetivo de este estudio es determinar si existen diferencias significativas en el inmunofenotipo del cáncer de mama ductal infiltrante entre mujeres menores de 40 años, mujeres entre 40 y 65 años y las mujeres mayores de 65 años, que pueda condicionar protocolos de coadyuvancia diferentes según el grupo de edad.

Entre los objetivos secundarios de nuestro estudio se incluye lo siguiente:

- El estudio de la frecuencia del cáncer de mama en cada uno de los grupos de edad establecidos.
- Establecer si existen diferencias en la expresión de los distintos marcadores biológicos según la edad al diagnóstico de cáncer de mama.
- El estudio del grado de proliferación celular de nuestra muestra.

Hipótesis

Hipótesis nula (H_0): no existen diferencias significativas en el inmunofenotipo del cáncer de mama según grupos de edad.

Hipótesis alternativa (H_1): existen diferencias significativas en el inmunofenotipo del cáncer de mama según grupos de edad.

Material y métodos

Se ha desarrollado un estudio epidemiológico observacional de tipo descriptivo y retrospectivo, sobre las características en el inmunofenotipo del cáncer de mama ductal infiltrante en mujeres de distintos grupos de edad.

Para la obtención de muestras hemos revisado los casos de patología mamaria maligna diagnosticados en el laboratorio Eurofins Megalab en los últimos 7 años, limitando el territorio demográfico a Aragón. Se ha seleccionado el subtipo de carcinoma ductal infiltrante, tanto por ser el más frecuente como por ser en el que mayor número de opciones terapéuticas existen.

Estos registros incluían la edad de la paciente, el tipo de tumor, el estadio del cáncer, el grado histológico y el inmunofenotipo determinado por el método VENTANA virtuoso en los laboratorios Eurofins.

Así, se obtuvo un total de 150 pacientes, de las que finalmente fueron válidas para nuestro estudio 90. El resto de los casos fueron descartados por carecer de datos demográficos o inmunohistoquímicos. Los parámetros evaluados fueron el receptor de estrógeno, el receptor de progesterona, el HER2/neu, el Ki-67 y la escala de Scarff Bloom.

Se realizó una revisión de la bibliografía existente en castellano y en inglés, mediante el buscador PubMed de la base de datos Medline y el buscador de Google Académico, durante el período comprendido entre el 1 de enero de 2012 y el 1 de marzo de 2019.

Como palabras clave se incluyeron: “cáncer”, “mama”, “mujer”, “joven”, “añosa” “inmunofenotipo”, “molecular”, “subtipo”, así como sus traducciones respectivas en inglés (*cancer, breast, young, elderly, immunophenotype, molecular, subtype*).

También se utilizaron las principales guías clínicas sobre cáncer de mama de nuestro entorno para analizar las recomendaciones al respecto.

Técnica de estudio de los biomarcadores

Receptor estrógeno

El CONFIRM anti-Estrogen Receptor (SP1) Rabbit Monoclonal Primary Antibody, ofrece un sistema estandarizado validado clínicamente para la determinación del estado del receptor de estrógeno y aplicable para el tratamiento del cáncer de mama.

Contiene los reactivos necesarios para completar un procedimiento de tinción inmunohistoquímica con el teñidor automático de portaobjetos VENTANA, una vez las muestras han sido fijadas en formol e incluidas en parafina.

Respecto a la fijación en formol, las guías internacionales recomiendan informar al patólogo del horario de extracción de la muestra y del horario del comienzo de su fijación, ya que no deben superarse los 45 minutos (tiempo de isquemia fría).

La muestra debe fijarse durante 18-24 horas, colocadas en bloques con un espesor de 3-4 mm. A continuación, la muestra se deshidrata en alcoholes y xileno, y se procede a la

infiltración con parafina fundida, para ser cortadas en secciones de 4-6 μm . Este proceso puede realizarse sobre cualquier tipo de muestra.

La evaluación del portaobjetos suele ser realizada por un patólogo, con un objetivo de 10 o 20 aumentos para evaluar la intensidad y la tinción IHQ de todas las células tumorales incluidas en el portaobjetos. Se debe utilizar células intactas, ya que las células necróticas o degeneradas se tiñen de forma inespecífica.

Para la evaluación, no todos los laboratorios usan el mismo método.

- Según la *escala de Allred*, se asigna una evaluación de proporción (PS), que representa la proporción estimada de las células positivas de la tinción, y se asigna una evaluación de intensidad (IS), que representa la intensidad de tinción media. Luego se calcula una evaluación total (TS) con la suma de las anteriores (rango de 0–8). Un resultado positivo se define como una evaluación $TS \geq 3$ (Ilustración 3 y 4).
- Puede indicarse solo el *porcentaje* de células que presentan receptores de estrógeno. De acuerdo con las guías de recomendación ASCO/CAP de 2010 se consideran positivos aquellos tumores con un 1% o más de células tumorales marcadas, pero se suele empezar a dar tratamiento específico con más del 10%.
- Nosotros hemos utilizado la evaluación de *intensidad* de tinción conocida como “HSCORE” de Wilbur y Kinse. Se asigna así un valor entre 0 y 3, donde “-” significa que no hay receptores (Ilustración 5), “+” significa que se tiñen con poca intensidad, “++” indica una intensidad media y “+++” indica una gran intensidad.

La fiabilidad de la determinación de RE puede variar mucho de un laboratorio a otro, lo que se atribuye a la diversidad de anticuerpos y de técnicas y a la diferente interpretación.

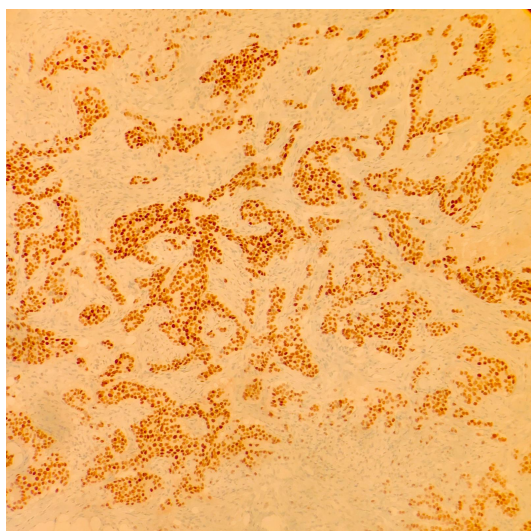


Ilustración 3. Muestra RE positivo Allred 8 (3+5)

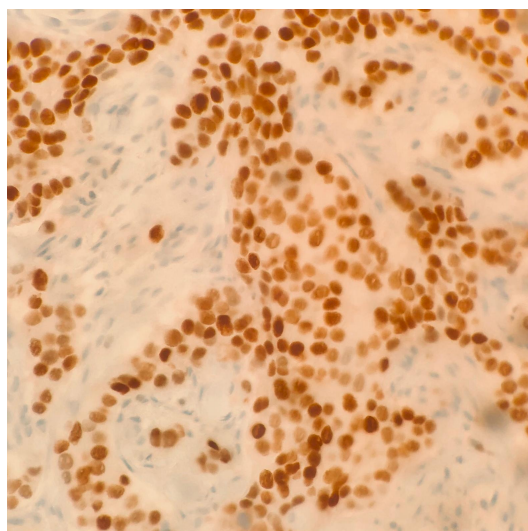


Ilustración 4. Muestra RE positivo Allred 8 a mayor aumento

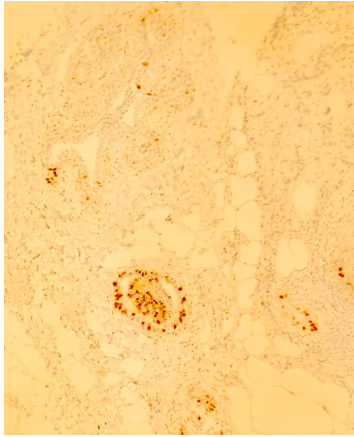


Ilustración 5. Muestra RE negativo, con control interno positivo

Para realizar una cuantificación más precisa y aumentar la fiabilidad, después de la tinción con los anticuerpos de Roche y el escaneado de las muestras mediante VENTANA DP 200 slide scanner, se procedió a la semi-cuantificación automática de las mismas, utilizando para ello el software VENTANA Virtuoso (Ilustración 6) en los laboratorios centrales de Eurofins.

Este software, mediante algoritmos de análisis de imágenes automatizados, proporciona a los patólogos más herramientas para mejorar la eficiencia y la precisión. Este desarrollo automatizado de extremo a extremo genera unos resultados de calidad, minimizando la variabilidad que pueda afectar al análisis de la muestra. (8,9,16)

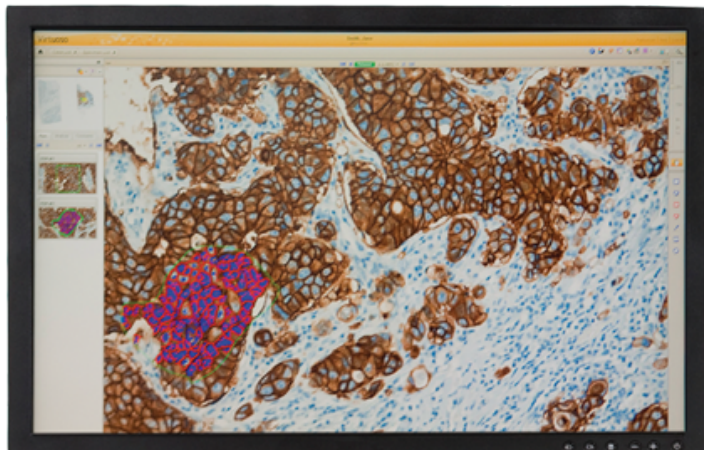


Ilustración 6. Software VENTANA Virtuoso (16)

Receptor progesterona

El CONFIRM anti-Progesterone Receptor (1E2) Rabbit Monoclonal Primary Antibody, está diseñado para su uso en el laboratorio en la detección del antígeno del receptor de progesterona. La muestra debe estar fijada con formol e incrustada en parafina, antes de introducirla en el teñidor de portaobjetos automático VENTANA con los reactivos auxiliares.

Este clon se dirige contra una proteína presente en el receptor de progesterona humana ubicada en el núcleo de las células normales y neoplásicas, siempre que sean positivas para dicho receptor.

CONFIRM anti-progesterone receptor (1E2) está indicado como ayuda en el manejo, pronóstico y predicción de la respuesta terapéutica en el cáncer de mama. El producto debe ser interpretado por un patólogo calificado, junto con un examen histológico, la información clínica relevante y controles apropiados.

Al igual que con el análisis para receptores de estrógeno, desde los laboratorios de Eurofins se nos remitió el resultado que el software VENTANA virtuoso diagnóstico para cada una de las muestras.

Nosotros revisamos los resultados proporcionados, cuantificando la intensidad de tinción a receptores de progesterona y asignando un valor de “-” a “+++” (Ilustración 7 y 8); al igual que habíamos realizado con los receptores de estrógeno. (16,17)

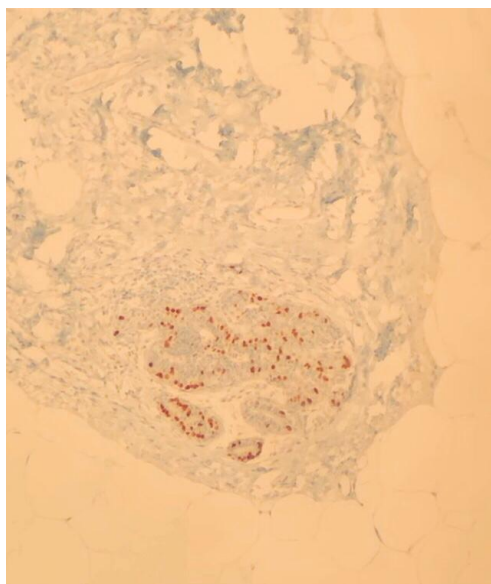


Ilustración 7. Muestra RP +/+++

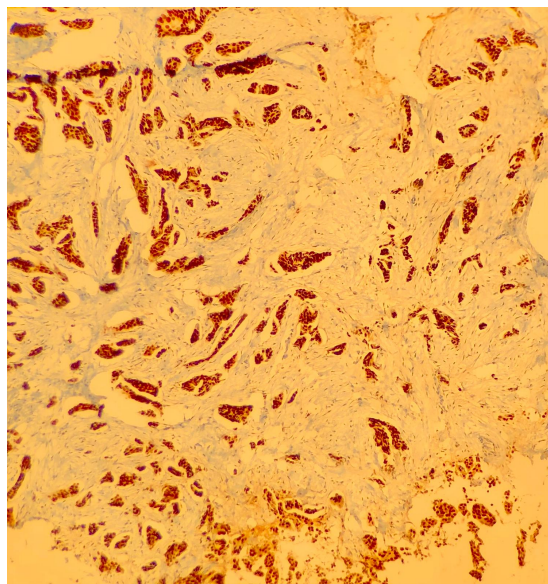


Ilustración 8. Muestra RP + (Allred 8)

HER2

Como ya se ha comentado, existen distintos métodos para determinar la expresión de HER2 que se desarrollarán a continuación.

El método de cribado se correspondería con la tinción IHQ, que en este caso se realizó con VENTANA anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody; mientras que la confirmación se realiza mediante hibridación in situ fluorescente, usando VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail Assay.

En este estudio, la expresión del HER2 se determinó mediante tinción inmunohistoquímica con VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody de manera automática mediante el teñidor de portaobjetos VENTANA (con las muestras previamente fijadas con formol e incluidas en parafina). Posteriormente se analizó automáticamente mediante el software VENTANA Virtuoso.

Se calificó en consecuencia, siendo 0/+ negativo (Ilustración 9) y +++ positivo (Ilustración 10 y 11). Para tumores con ++ de tinción con IHC o resultados ambiguos, se realizó la Hibridación in situ (ISH).

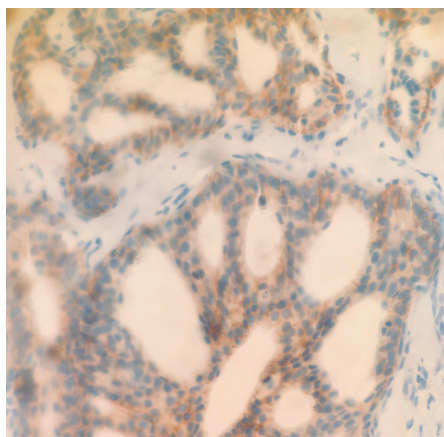


Ilustración 9. Muestra Cerb2 negativo (+/+++)

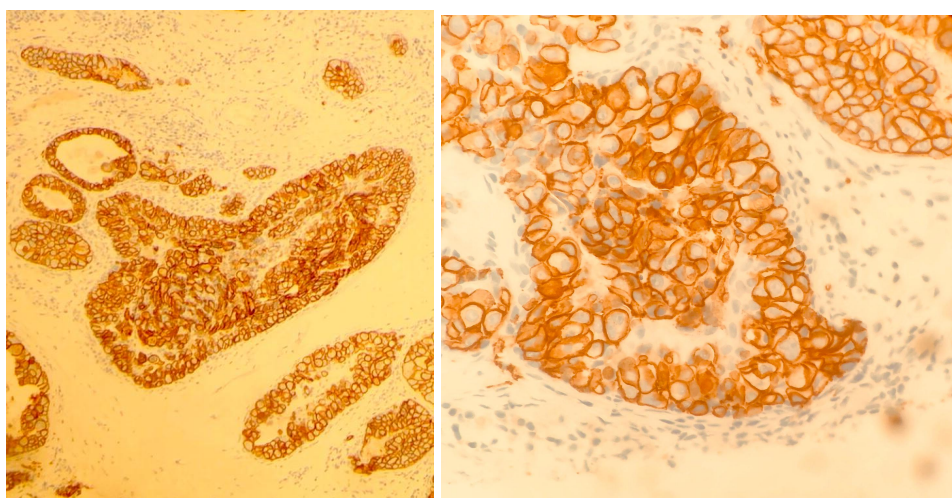


Ilustración 10. Muestra Cerb2 +++

Ilustración 11. Muestra Cerb2 +++ a mayor aumento

Para la hibridación in situ, se usó el VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail Assay, diseñado para la determinación cuantitativa de la amplificación del gen HER2 en muestras tisulares de cáncer de mama previamente fijadas con formol e incluidas en parafina. La determinación puede realizarse sobre cualquier tipo de muestra.

El sistema se compone de una mezcla de sondas de ADN diseñadas para posibilitar la cohibridación y visualización del gen HER2 y del centrómero del cromosoma 17 mediante microscopía óptica. Concretamente, el gen HER2 se detecta mediante una sonda marcada con dinitrofenilo (DNP) y el centrómero del cromosoma 17 mediante una sonda marcada con digoxigenina (DIG).

La tinción Dual ISH permite así la visualización del gen mediante microscopía óptica, apareciendo el HER2 como señales negras discretas y el cromosoma 17 como señales rojas, tanto en núcleos de células normales (que actúan como control positivo interno) como en células de carcinoma.

A continuación, se localizan las células tumorales, y se lleva a cabo la enumeración de las señales negras (HER2) y rojas (CEN-17) para calcular la proporción HER2/CEN-17. Las muestras que presenten una proporción HER2/CEN-17 igual o superior a 2 deben considerarse como amplificadas en el gen HER2 (Ilustración 12 y 13). **(8,10,18)**

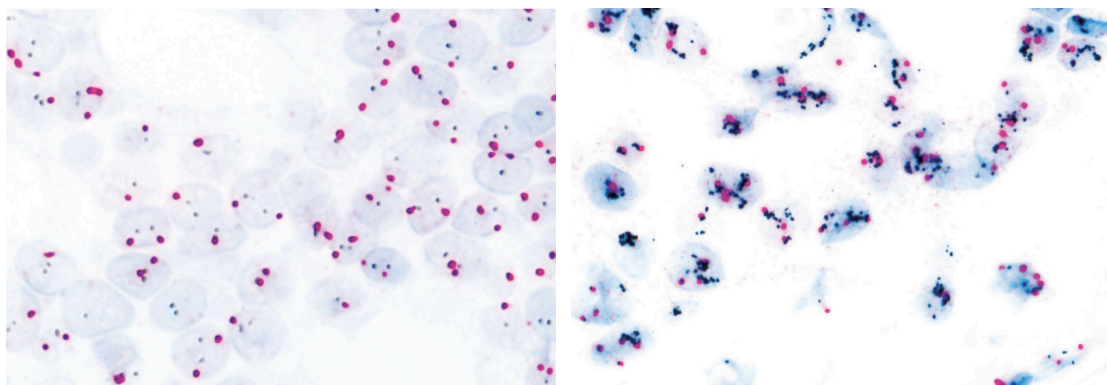


Ilustración 12. HER2/neu no amplificado, ya que se visualizan señales SISH y ISH-rojo como 1 a 2 copias por cada célula tumoral (18)

Ilustración 13. HER2/neu amplificado, se visualizan cúmulos de HER2 SISH (18)

Ki67

El CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) Primary Antibody de Ventana Medical Systems, es un el anticuerpo monoclonal de conejo cuya finalidad es la identificación del antígeno Ki67. Las muestras deben estar previamente incluidas en parafina y fijadas en formol.

La interpretación clínica de los resultados de cualquier tinción, o su ausencia, debe complementarse con estudios morfológicos con controles adecuados y debe evaluarla un patólogo calificado dentro del contexto de la historia clínica del paciente.

El CONFIRM anti-Ki-67 está prediluido para su uso óptimo en los módulos de tinción automatizados de Ventana, que provoca una reacción con color en las zonas donde se encuentra el antígeno. El valor de Ki67 se definió como el porcentaje de células que muestran tinción nuclear. (8,11)

Escala de Scarff Bloom Richardson

Para la clasificación del grado histológico se usó la escala de Scarff Bloom Richardson (Tabla 2), asignándose los puntos de acuerdo con el siguiente cuadro:

Tabla 3. Escala de Scarff-Bloom

Parámetro	Puntos
1. Formación de túbulos	
- Mayor o igual al 75%	1
- 10-75%	2
- Menor de 10%	3
2. Pleomorfismo nuclear	
- Variación escasa en relación al núcleo normal	1
- Variación moderada en relación al núcleo normal	2
- Variación marcada en relación al núcleo normal	3
3. Mitosis (x40)	
- 0-9 mitosis por 10 campos	1
- 10-19 mitosis por 10 campos	2
- Más de 20 mitosis por 10 campos	3

Fuente: elaboración propia

Según los puntos obtenidos en cada categoría, la suma obtenida puede ser de tres a nueve puntos, asignándose un grado histológico I (bien diferenciado) con una puntuación entre 3-5, grado II (moderadamente diferenciado) con una puntuación entre 6-7, y un grado III (poco diferenciado) con una puntuación entre 8-9. **(5)**

Análisis y método estadístico

El análisis estadístico descriptivo y el estudio de asociaciones se realizó con el programa IBM SPSS Statistics 22.0 para Windows y con el programa de Microsoft Excel.

- Para la estadística descriptiva de las variables cuantitativas, se obtuvo la media, desviación estándar, máximo, mínimo, mediana, etc.
- Para la estadística descriptiva de las variables cualitativas, se obtuvo la frecuencia y porcentaje de cada una de las categorías.
- Para el análisis de las variables, hemos realizado tablas de contingencia donde se reflejaba el número y porcentaje de positividad para los distintos receptores respecto a cada una de las variables estudiadas.
- Para poder determinar la significación de las variables entre sí hemos utilizado la prueba de chi-cuadrado (χ^2), considerando valores significativos con una $p < 0.05$ (Intervalo de Confianza 95%).

Limitaciones

Las limitaciones del estudio son una muestra no demasiado amplia, una base de datos que no permitía recuperar datos que faltasen de las pacientes y una muestra seleccionada por conveniencia y existencia de posibles variables intercurrentes y condicionantes.

Una de las limitaciones enfrentadas durante la búsqueda de información fue la falta de consenso para establecer el límite de edad entre mujer joven y mujer añosa. Debido a la ausencia de una definición estándar, los artículos revisados presentaron evidencia heterogénea, lo que dificultó el análisis de los datos.

Aspectos ético-legales

El trabajo se ha realizado siempre con el respeto a la privacidad, intimidad y confidencialidad de la totalidad de los datos, y de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de Protección de Datos de Carácter Personal. Por tanto, los resultados expuestos no permiten, ni en su totalidad, ni en parte, la identificación de ninguna persona implicada en la muestra estudiada.

No ha existido ningún tipo de financiación externa ni conflicto de intereses en la elaboración de este estudio.

Resultados

Revisión bibliográfica

Después de la lectura del título y/o resúmenes de todos los artículos encontrados y del documento al completo de los potencialmente elegibles, se procedió a la selección definitiva de 14 artículos.

De los 14 artículos seleccionados, 10 fueron retrospectivos, uno prospectivo, uno transversal, una revisión bibliográfica y un metaanálisis.

Tabla 4. Estudios incluidos en nuestra revisión bibliográfica

Autor del estudio	Fecha	Tipo estudio	N	Grupo 1	Grupo 2
Johansson A. L, et al. (19)	2019	Retrospectivo	27.120	<40 años	>70 años
Anwar S, et al. (20)	2019	Retrospectivo	114	<40 años	
Olivier M. et al. (21)	2019	Prospectivo	126	<45 años	
Villarreal-Garza C, et al. (22)	2019	Metaanálisis	40	Jóvenes	
Wang MX, et al. (23)	2018	Retrospectivo	970	<40 años	>60 años
Martínez Ramos D, et al. (24)	2018	Retrospectivo	1416	<45 años <40 años	>69 años > 40 años
Hironaka-Mitsubishi A, et al. (25)	2018	Retrospectivo	164	< 35 años	40-44
Malvasio S, et al. (26)	2017	Retrospectivo	107	<40 años	
Medina Bueno G.A. (27)	2017	Retrospectivo	122	<40años	> 60 años
Arra M, et al. (28)	2017	Retrospectivo	132	≤35años	>35 años premenopáusicas
Berra M.G, et al. (29)	2016	Transversal	131		
Raul Gasin (30)	2016	Revisión	25	>65 años	
Eugênio D.S.G, et al. (31)	2016	Retrospectivo	113	< 40años	
Grybach S.M, et al. (3)	2018	Retrospectivo	202	32-64 años	65-84 años

Fuente: elaboración propia

Tabla 5. Resultados principales de los estudios revisados

Autor del estudio	Resultados
Johansson A. L, et al. (19)	<ul style="list-style-type: none"> - El grupo de jóvenes tuvo mayor proporción de tumor triple negativo, luminal B-like con HER2/neu +, y tumores HER2/neu +. - Las mujeres de mediana edad y las incluidas en el grupo de añosas tuvieron mayor proporción de tumores Luminal A-like. - Las mujeres jóvenes tuvieron más tumores de alto grado respecto a las de edad media. - Tanto las mujeres jóvenes como las añosas fueron diagnosticadas de tumores en un estadio más avanzado.
Anwar S.L, et al. (20)	<ul style="list-style-type: none"> - Frecuencia de cáncer de mama en jóvenes de 11,4%; muy superior a la proporción en EE. UU. y Europa. - Tumores más agresivos, con una proporción relativamente alta de tumores de gran tamaño, afectación linfática y metástasis. - Un 39,6% de tumores fueron positivos para receptores de estrógeno o progesterona. - Un 30,6% de tumores mostraron sobreexpresión de HER2/neu. - Un 38,20% fueron tumores triple negativo.
Olivier M, et al. (21)	<ul style="list-style-type: none"> - La incidencia de cáncer de mama está en aumento en los países en transición económica. - En América Latina la proporción de cáncer de mama en mujeres <45 es casi el doble que en países desarrollados. - Un 72% fueron tumores RE + o RP +. - Un 16% fueron tumores HER2/neu +. - Un 80% tuvieron un Ki67% elevado (>14%). - Un 21% fueron tumores triple negativo.
Villarreal-Garza C, et al. (22)	<ul style="list-style-type: none"> - Los distintos artículos demuestran una incidencia aumentada de cáncer de mama entre las mujeres jóvenes de América Latina. - Las mujeres jóvenes tienen una mayor proporción de tumores de grado alto y receptores hormonales negativos, triple negativos y luminal B. - Los estudios de países latinoamericanos apoyan que las características tumorales más agresivas prevalecen en la población joven. - En la cohorte mayor de este estudio, los tumores en mujeres jóvenes fueron con mayor frecuencia de alto grado (60,9%, $p < 0.001$), receptor de estrógeno negativo (40.5%, $p < 0.001$) y receptor de progesterona negativo (44.1%, $p < 0.001$) que los pacientes > 40 años.
Wang MX, et al. (23)	<ul style="list-style-type: none"> - El grupo de jóvenes tuvo una mayor proporción de tumores RE negativos (<.001). - La diferencia respecto a receptores de progesterona y HER2/neu, por grupos de edad, no fue significativa.
Martínez Ramos D. et al. (24)	<ul style="list-style-type: none"> - No se demostró un aumento en la incidencia del cáncer de mama en mujeres jóvenes (ni <40, ni <45) en nuestro entorno.

Hironaka-Mitsuhashi A, et al. (25)	<ul style="list-style-type: none"> - No se demostraron diferencias estadísticamente significativas en el tamaño ni el grado histológico del tumor entre los dos grupos de edad. -En comparación con el otro grupo, las mujeres menores de 40 años presentaron mayor frecuencia de RE- (28% respecto a 6%, $p < 0.001$). -También presentaron mayor frecuencia de RP- (22% respecto a 10%, $p = 0.03$). -La diferencia en el porcentaje de expresión de HER2/neu y Ki67 no fue significativa.
Malvasio S, et al. (26)	<ul style="list-style-type: none"> -Respecto al perfil biológico: 53% pacientes fueron HER2- y RE/RP+, un 24,5% fueron HER2+, y un 22,5% fueron triple negativo. -Al comparar resultados con estudios nacionales, las pacientes presentaron mayor porcentaje de HER 2+.
Medina Bueno G.A. (27)	<ul style="list-style-type: none"> -No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con respecto al subtipo de cáncer de mama.
Arra M, et al. (28)	<ul style="list-style-type: none"> -No se demostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de edad.
Berra M.G, et al. (29)	<ul style="list-style-type: none"> -53% fueron Luminal A. -18% fueron Luminal B. -18% fueron Triple negativo. -11% fueron HER2/neu .
Gasin R, et al. (30)	<ul style="list-style-type: none"> -La incidencia y mortalidad del cáncer de mama aumenta con la edad. -La sobreexpresión del HER2/neu disminuye con la edad. -Con la edad aumenta la positividad a RE, concretamente la proporción de receptores estrógeno positivos entre los 30-34 años es de 55,9%, mientras que en el grupo de edad de 80-89 años es de 85%.
Eugênio D.S.G, et al. (31)	<ul style="list-style-type: none"> -Respecto a la IHQ, el luminal B-like fue el subtipo mayoritario (42,6%), seguido del triple negativo (18,6%).
Grybach S.M, et al. (3)	<ul style="list-style-type: none"> -El subtipo luminal A predominó en las mujeres añosas, pero no en las jóvenes ($p < 0.05$). -El subtipo luminal B no mostró diferencias significativas entre ambos grupos. -El subtipo triple negativo se encontró con mayor frecuencia en el grupo de mujeres jóvenes.

Fuente: elaboración propia

En general, se ha descrito tumores más agresivos en mujeres jóvenes, con tumores de mayor tamaño al diagnóstico y mayor afectación linfática y metastásica.

Los tumores en mujeres jóvenes fueron más frecuentemente de alto grado y con receptores hormonales negativos. Por el contrario, la sobreexpresión de HER2/neu fue mayor en las mujeres añosas, aunque con evidencia heterogénea entre los artículos.

Los subtipos Triple negativo y luminal B fueron más frecuentes en el grupo de jóvenes en la mayoría de los estudios, no siendo así en el estudio de Arra M, et al, en el estudio de Medina Bueno G.A, y en el estudio de Grybach S.M, et al.

Análisis descriptivo

Se seleccionó una muestra de 90 pacientes, todas ellas mujeres diagnosticadas de cáncer de mama ductal infiltrante entre 2010 y 2019.

La media de edad al diagnóstico de las pacientes fue de 51,97 años, siendo el rango de 62 años; con una edad mínima de 26 y una edad máxima de 88 (Tabla 6).

Se identificaron varias modas en la muestra, la menor de 42 años (Gráfico 2).

Tras el estudio de la distribución por edades, se decidió dividir las muestras para su análisis en tres grupos según la edad de la paciente al diagnóstico (Gráfico 3):

- Grupo 1 o de jóvenes: <40 años, que incluye 17 pacientes (19%)
- Grupo 2 o de edad intermedia: 40-65 años, que incluye 56 pacientes (62%)
- Grupo 3 o de añosas: > 65 años, que incluye 17 pacientes (19%)

Además, la European Society of Breast Cancer Specialists (eusoma) define a las mujeres jóvenes como aquellas menores de 40 años y como muy jóvenes a las menores de 35 años.

Respecto al estudio de los receptores de estrógenos, la mayoría de las mujeres de nuestra muestra ha presentado una intensidad de tinción de tres cruces para los receptores de estrógenos (51,11%). Un 17,78% se han diagnosticado como receptores de estrógeno negativo (Gráfico 4).

En el estudio de los receptores de progesterona, también ha predominado una intensidad de tinción de tres cruces para los receptores de progesterona (45,56%). En este caso, un porcentaje mayor (24,44) se ha diagnosticado como negativo para receptores de progesterona (Gráfico 5).

En nuestra muestra la mayoría de las mujeres tuvo un cáncer con expresión HER2/neu negativo (75,56%), lo que indicaría un mejor pronóstico, pero una peor respuesta a la quimioterapia (Gráfico 6).

Respecto al estudio del grado de Scarff-bloom se obtuvo una media de 6,63 para las 90 muestras incluidas. La mediana fue de 7, con un máximo de 9 y un mínimo de 5.

La distribución del índice de proliferación se representa mediante el Ki67 (Gráfico 7), destacando mayores porcentajes en índices proliferativos más bajos.

La distribución de los distintos marcadores con la edad puede consultarse en el Gráfico 8 (RE), Gráfico 9 (RP) y Gráfico 10 (HER2/neu).

Respecto al análisis de los distintos receptores por grupos de edad, se obtuvieron los resultados detallados a continuación.

Destaca un mayor porcentaje de receptores de estrógeno +++ en el grupo de mediana edad (55,4%), aunque también se aprecia esta mayoría en el resto de los grupos (41,2% en jóvenes y 47,1% en añosas).

El grupo 1 tuvo un 35,3% de muestras con receptor de estrógeno negativo, mientras que este porcentaje fue de 14,3% en el grupo 2 y de 11,8% en el grupo 3 (Gráfico 11).

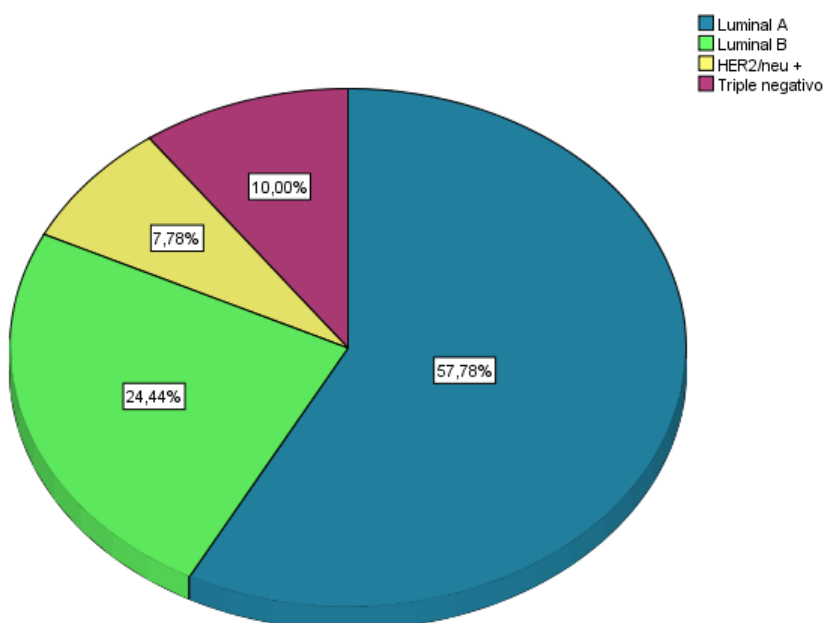
El porcentaje de receptores de progesterona que se tiñen con intensidad +++ es similar en los tres grupos a estudio (grupo jóvenes 41,2%, grupo edad media 44,6%, grupo añosas 52,9%). El porcentaje menor de receptores de progesterona negativo se da en el grupo 2 (17,9%), siendo de 35,3% en los otros dos grupos (Gráfico 12).

El porcentaje de sobreexpresión del HER2/neu es similar en los tres grupos a estudio, aproximadamente de 24% (Gráfico 13).

Por último, se estudió la frecuencia de aparición de los distintos subtipos de cáncer de mama en los grupos de edad establecidos.

De forma global, el inmunofenotipo más frecuente (57,78%) fue el Luminal A-like, seguido del Luminal B-like (Gráfico 14).

Gráfico 14. Estudio de la frecuencia de subtipos en las 90 muestras



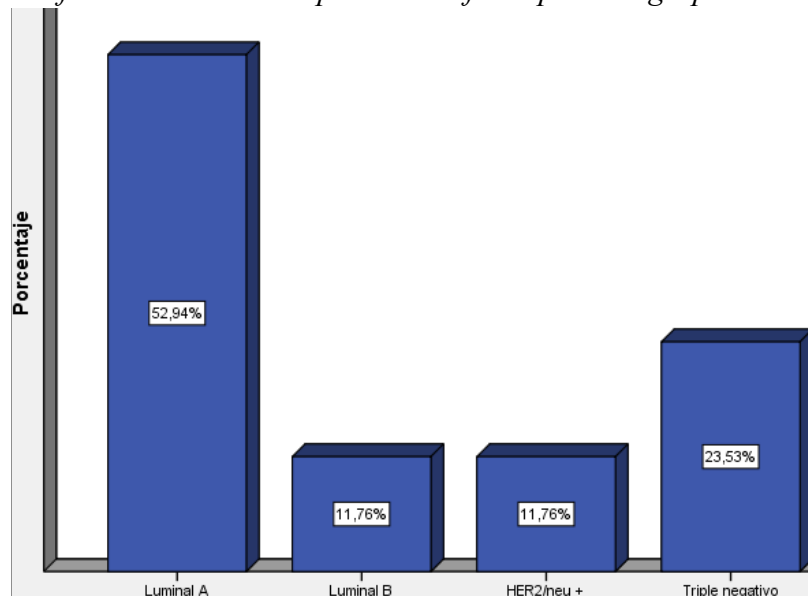
Fuente: elaboración propia

Respecto a las diferencias en el inmunofenotipo en cada uno de los grupos de edad, vemos un aumento llamativo de la frecuencia del triple negativo en las mujeres jóvenes, y un aumento también del subtipo HER2 positivo (Gráfico 15).

El inmunofenotipo más frecuente en los tres grupos fue el Luminal A-like, representado al menos la mitad de los casos (Gráfico 16).

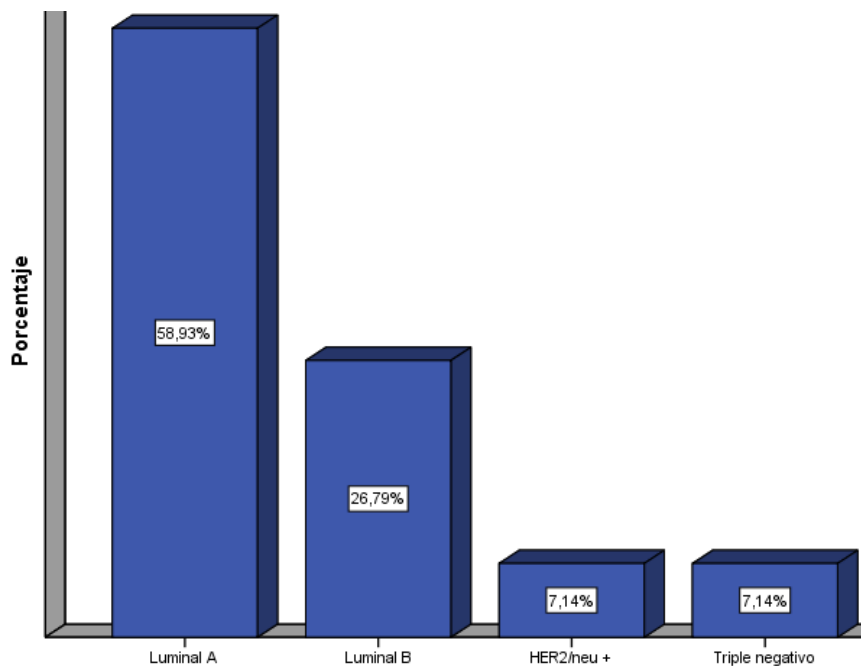
Se distingue un aumento del subtipo Luminal B-like en el grupo de mujeres añosas (Gráfico 17).

Gráfico 15. Frecuencia por inmunofenotipo en el grupo 1



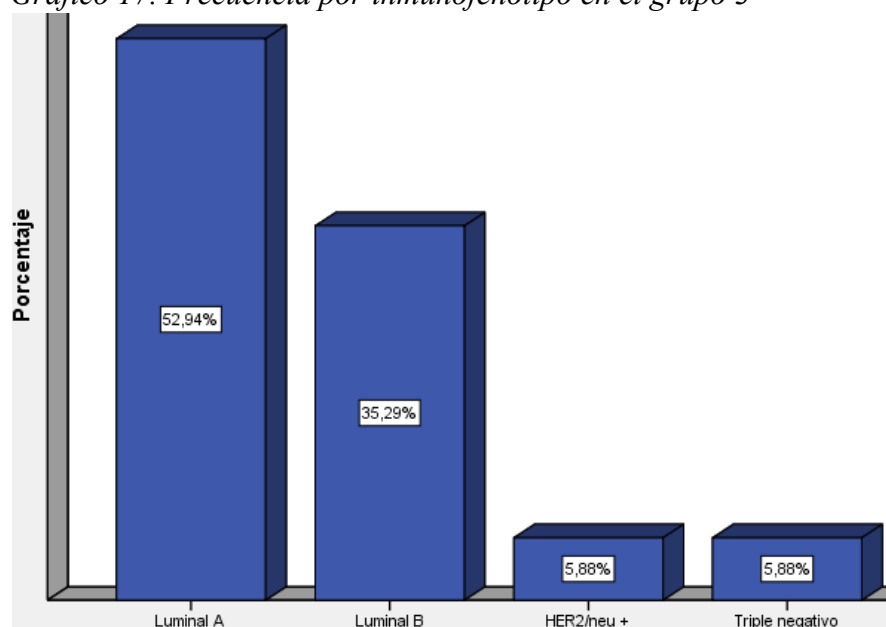
Fuente: elaboración propia

Gráfico 16. Frecuencia por inmunofenotipo en el grupo 2



Fuente: elaboración propia.

Gráfico 17. Frecuencia por inmunofenotipo en el grupo 3



Fuente: elaboración propia

Estudio de asociaciones

Para el estudio de las relaciones entre las distintas variables hemos utilizado la prueba de chi-cuadrado de Pearson, determinando el valor $p < 0,05$ para establecer diferencias estadísticamente significativas.

Para simplificar el estudio, y aproximar los resultados al de la literatura revisada, se estudió las diferencias para receptores de estrógeno y progesterona negativos o positivos, sin distinguir entre los distintos grados de positividad.

Según Cochran (1952), las frecuencias esperadas menores de 5 no deben superar el 20%, en cuyo caso el resultado de chi-cuadrado debe interpretarse con cautela. En los casos en los que esto sucedía, se aplicó la corrección de Yates o de continuidad.

Así, para establecer si existían diferencias en la sobreexpresión del HER2/neu en el grupo de mujeres jóvenes y el grupo de mujeres jóvenes, se realizó la tabla de contingencia que se muestra a continuación (Tabla 7).

Tabla 7. Sobreexpresión de HER2/neu en grupo 1 y grupo 3

			Edad al diagnóstico (agrupado)		Total
			26 - 39	66+	
Receptor HER2/neu	-	Recuento	13	13	26
		Recuento esperado	13,0	13,0	26,0
	+	Recuento	4	4	8
		Recuento esperado	4,0	4,0	8,0
Total	Recuento		17	17	34
	Recuento esperado		17,0	17,0	34,0

Fuente: elaboración propia

Después se realizó la prueba de chi-cuadrado para estos datos (Tabla 8). El valor p (sig. Asintótica) según la prueba de Chi-cuadrado fue de 1, pero al ser el recuento esperado menor que 5 en un 50% de las casillas se aplicó la corrección de Yates. El valor fue entonces igual a 1, y por tanto mayor de 0'05, por lo que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Esto mismo se realizó para los receptores de estrógeno y para los de progesterona, sin encontrarse diferencias significativas en ninguno de ellos. También se estudió si existían diferencias entre el grupo de menores de cuarenta años y el de edad media, y entre el grupo de menores de cuarenta y el de añosas, para cada uno de los marcadores biológicos incluidos en el estudio, sin encontrarse diferencias significativas en ninguno de ellos.

Para establecer si existían diferencias en el inmunofenotipo de las mujeres de los distintos grupos a estudio, se aplicó la prueba de chi-cuadrado. En esta ocasión se realizó en Microsoft Excel, realizando en primer lugar una tabla de asociación (Tabla 9) para los valores observados.

Con esto tratamos de resolver la hipótesis planteada al inicio de este estudio, siendo la hipótesis nula (H_0) que el inmunofenotipo es independiente de la edad, y la hipótesis alternativa (H_1) que el inmunofenotipo depende del grupo de edad.

A continuación, se calcula la tabla de frecuencias esperadas (Tabla 10), que coincidiría con las observadas en caso de que H_0 fuera cierta.

Por último, se aplica la fórmula de chi-cuadrado, que se basa en la diferencia al cuadrado entre las frecuencias observadas (o_i) y las esperadas (e_i).

$$\chi^2 = \sum \frac{(o_i - e_i)^2}{e_i}$$

El valor obtenido fue de 5,460797716.

Para saber si el valor obtenido permite rechazar la hipótesis nula, por ser estadísticamente significativa la diferencia entre los grupos, habrá que aplicar la tabla de chi-cuadrado (Tabla 11) para determinar el valor de p.

En este caso, al ser el grado de libertad de 6, se obtuvo un valor $p=12,59$.

Como p no es menor de 5,460797716, no pueden establecerse diferencias significativas en el inmunofenotipo según la edad, aceptándose la hipótesis nula.

Discusión

La finalidad de este trabajo es determinar los perfiles inmunofenotípicos del cáncer de mama en tres grupos de edad (<40 años, 40-65 años, >65 años), analizando los receptores de estrógeno, los receptores de progesterona y la sobreexpresión de HER2/neu, además de valorar el grado de Scarff-Bloom y la capacidad proliferativa celular mediante el Ki67%.

Conocemos que las modernas técnicas terapéuticas están encaminadas a actuar sobre los perfiles hormonales o el gen HER2/neu **(4)**. Por ello, el objetivo último de nuestra investigación es ayudar a determinar los distintos perfiles para colaborar en lo posible con las unidades de mama a ajustar los protocolos terapéuticos. Esto podría ser útil en determinados casos en los que no se dispusiera de la inmunohistoquímica, para orientar el tratamiento sistémico de forma empírica según la edad de la paciente.

El cáncer de mama es uno de los más mediáticos, con numerosos casos de mujeres famosas que condicionan una respuesta por parte de la sociedad. Esto ha contribuido a que las campañas de screening tengan un elevado cumplimiento **(6)** y a numerosas campañas de recogida de fondos para su investigación, lo que ha convertido el cáncer de mama en un problema social, además de un problema de salud.

El screening del cáncer de mama también es un tema de conflicto a nivel social, ya que crea una confusión en la población, que espera una disminución en la incidencia del cáncer mediante estas campañas. Hay que entender que el objetivo del screening no es más que el de reducir la morbilidad por esta causa, sin pretender disminuir la aparición del mismo. Una disminución en la incidencia solo podría esperarse en una disminución de los factores de riesgo que favorecen su aparición, aunque se debe tener en cuenta que en la mayoría de los casos se desconoce su etiología. **(4)**

En nuestro estudio, la edad media al diagnóstico fue de 51,97 años, coincidiendo con el rango de máxima incidencia de cáncer de mama en España (45-65 años). **(1)**

La frecuencia de cáncer de mama en mujeres jóvenes de EE. UU. y Europa varía entre el 5-10%, dependiendo del corte que se establezca en la edad **(24)**. En nuestro estudio esta proporción fue del 19%, lo que podría considerarse superior a la media, y bastante superior a la proporción de casos encontrados en el estudio realizado en España en 2018 por Martínez Ramos D, et al, que fue de 6,1% **(24)**. Esto apoya los recientes estudios realizados en el ámbito de América Latina que demuestran un aumento de la incidencia de cáncer de mama en los grupos de edad más jóvenes, aunque el estudio realizado en España **(24)** no reflejó ese aumento de incidencia en nuestro ámbito.

No obstante, se deben tener en cuenta las diferencias étnicas, demográficas y sociales entre los distintos países, que podrían hacer que los resultados, en cuanto a incidencia por edad, no fueran aplicables en nuestro entorno.

Como se ha comentado, una de las limitaciones que presentó nuestro estudio para hablar de mujer joven fue precisamente la discordancia a la hora de establecer un criterio de mujer joven. En la literatura científica existen numerosos criterios, aunque la mayoría de

los estudios definen un punto de corte de 40 años de modo arbitrario, algunos lo establecen en 35, otros en 50 años e incluso algunos hablan del estado menopáusico de las pacientes. Respecto a la frecuencia de cáncer de mama en mujeres jóvenes, no existe tanta literatura como en el grupo de jóvenes, pero se calcula que, en Europa, un tercio del cáncer de mama se diagnostica a mujeres de este grupo (4). En nuestro estudio la proporción de mujeres diagnosticadas a esta edad fue del 19%, inferior a lo estimado.

Si sumamos el porcentaje de mujeres jóvenes (<40 años) y de mujeres jóvenes (>65 años) de nuestro estudio, encontramos que un 38% de nuestras pacientes no fueron diagnosticadas por screening mediante mamografía, ya que este cribado, en España, cubre a las mujeres de entre 50 y 64 años. Es un porcentaje, en este caso, muy elevado el que no se beneficia de estas campañas, por lo que es importante tratar de ampliar el límite superior de edad hasta los 69 cuanto antes, como recomiendan las guías, (6) para poder disminuir la morbilidad por esta causa.

A pesar de que el porcentaje que se queda sin diagnosticar por este método en el grupo de jóvenes es igual que en el grupo de jóvenes, no recomendamos aumentar el límite inferior de edad porque los estudios no han demostrado una disminución de la morbilidad con su implantación. En general en estos casos, el diagnóstico se realiza como tumor palpable. (4, 6)

En cuanto a los receptores hormonales, la mayoría de las mujeres de nuestro estudio mostraron positividad tanto a los receptores de estrógeno (82,2%), como a los de progesterona (75,6%); sin encontrarse diferencias significativas entre grupos de edad. Esto difiere de la literatura estudiada, que globalmente confirma una mayoría de mujeres con receptores hormonales positivos, pero que en las mujeres más jóvenes refiere con más frecuencia la negatividad a receptores hormonales. Aún así, varios estudios tampoco encuentran diferencias significativas entre grupos de edad, como el de Medina Bueno G.A. (27) y el de Arra M, et al. (28)

La sobreexpresión de HER2/neu en nuestro estudio fue mayoritariamente negativa (75,6%), sin encontrarse diferencias significativas entre grupos de edad. En la literatura, la evidencia en cuanto a la sobreexpresión del HER2/neu según grupos de edad es heterogénea, encontrándose diferencias en el estudio con mayor cohorte incluido en nuestra revisión, el de Johansson A.L, et al, (19) que establece una mayor proporción en el grupo de jóvenes. Parece que la tendencia es a disminuir la sobreexpresión conforme aumenta la edad (30), aunque numerosos artículos no encuentran diferencias.

Respecto al inmunofenotipo, el subtipo más frecuente fue el Luminal, representando un 82,22% del total de la muestra. La literatura también lo refiere como el subtipo más frecuente, calculándose que constituye entre un 75-80% de los cánceres de mama (4).

De acuerdo con la literatura estudiada, en nuestro estudio también observamos una mayor frecuencia del subtipo triple negativo en las mujeres jóvenes, donde es del 23,53%, con respecto al grupo intermedio, donde es del 7,14%. Se triplica el porcentaje en el grupo de jóvenes, lo que explica en parte el carácter más agresivo del cáncer de mama que típicamente se describe en las mujeres jóvenes.

A pesar de no encontrarse diferencias estadísticamente significativas en el inmunofenotipo entre grupos de edad, a modo descriptivo si que vemos una gran

diferencia en los porcentajes. Esto nos lleva a pensar en la necesidad de ampliar el número de pacientes en un posible futuro estudio, ya que esta falta de diferencias significativas podría explicarse en parte al limitado tamaño muestral del que hemos dispuesto.

Resultaría interesante ampliar el estudio a otras comunidades autónomas, cubriendo todos los casos del laboratorio que ha colaborado en este estudio, Eurofins Megalab, e incluso colaborando con más laboratorios para que la muestra sea más representativa.

El subtipo HER2+ también es más frecuente en las mujeres menores de cuarenta años (11,76%) que en el resto de los grupos (7,14% en el grupo 2), aunque de forma menos llamativa.

También se observa una disminución, conforme avanza la edad, en el porcentaje que representa el subtipo HER2+ dentro de cada grupo. Con esto se podría orientar el tratamiento con trastuzumab hacia mujeres jóvenes, de forma protocolizada.

Las mujeres añosas de nuestro estudio tienen una mayor proporción del subtipo Luminal B, lo que se asocia a un peor pronóstico y a peor respuesta al tratamiento sistémico.

A pesar de estas diferencias de frecuencia en el inmunofenotipo, el diagnóstico histopatológico del cáncer de mama siempre debe completarse con la evaluación de los receptores de estrógenos, de progesterona y del marcador HER2/neu, para así determinar qué pacientes se beneficiarían de un tratamiento hormonal específico o del uso de anticuerpos monoclonales como el Trastuzumab. Esta es una herramienta indispensable para establecer un diagnóstico adecuado y orientar al médico en el manejo terapéutico.

Con esto queremos decir, que con este estudio no se pretende suprimir este método durante el diagnóstico de cáncer de mama, sino que su finalidad es estudiar estas diferencias para orientar el tratamiento según la edad de la paciente solo en los casos en los que la determinación inmunohistoquímica no sea posible.

Conclusiones

1. La incidencia de cáncer de mama en mujeres menores de 40 años es mayor en Aragón que en las series de casos estudiados.
2. No se han encontrado diferencias significativas en la expresión de los distintos marcadores biológicos según grupos de edad.
3. Las mujeres jóvenes tienen descriptivamente fenotipos más agresivos, lo que podría utilizarse para condicionar protocolos de tratamiento coadyuvante según la edad.
4. Aunque no haya diferencias estadísticamente significativas, a modo descriptivo si se ven diferencias grandes entre los porcentajes del inmunofenotipo según la edad, por lo que sería interesante continuar este estudio ampliando la muestra y así obtener resultados probablemente significativos.

Bibliografía

1. Oncoguía SEGO: Cáncer infiltrante de mama. Guías de práctica clínica en cáncer ginecológico y mamario. Publicaciones SEGO, Junio 2017.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Mery L, Bray F. Cancer today. Globocan [Internet]. Gco.iarc.fr. 2019. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/home>
3. Grybach S. M, Polishchuk L. Z, Chekhun V. F. Analysis of the survival of patients with breast cancer depending on age, molecular subtype of tumor and metabolic syndrome. Exp Oncol. 2018;40(3):243–248.
4. M. Arroyo Yustos M, Martín Angulo M, Álvarez-Mon Soto M. Cáncer de mama. Medicine. 2017;12(34):2011-2023.
5. Baulies S, Xercavins J, Cusidó M. Factores predictivos de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante en cáncer de mama [Tesis Doctoral]. Facultad de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona; 2014.
6. Castells X, Sala M, Ascunce N, Salas D, Zubizarreta R, Casamitjana M, et al. Descripción del cribado del cáncer en España. Proyecto DESCRIC. Madrid: Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud. Ministerio de Sanidad y Consumo. Agència d'Avaluació de Tecnologia i Recerca Mèdiques de Catalunya; 2007;(2006/01).
7. Begue J.P, Begue P, Rodríguez L, Blumetti H, Alvarado E. Clasificación molecular (IHQ): subtipos intrínsecos y compromiso axilar. Rev. argent. mastología. 2016;36(128):106-133.
8. Consenso nacional inter-sociedades. Factores pronósticos y predictivos en cáncer de mama temprano. Rev. argent. mastología. [Internet]. 2016; 36(128):12-33. Disponible en: http://www.revistasamas.org.ar/revistas/2016_v36_n128/4.pdf
9. Roche Diagnostics International Inc, Ventana Medical Systems Inc. CONFIRM anti-Estrogen Receptor (ER) (SP1) Rabbit Monoclonal Primary Antibody [Internet]. 2013. Disponible en: https://productlibrary.ventana.com/ventana_portal/OpenOverlayServlet?launchIndex=1&objectId=790-432414535ES
10. VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody [Internet]. Reagent-catalog.roche.com. 2019 [citado 23 May 2019]. Disponible en: <http://reagent-catalog.roche.com/product/1711?type=2325>
11. Roche Diagnostics International Inc, Ventana Medical Systems Inc. CONFIRM™ anti-Ki-67 (30-9) Rabbit Monoclonal Primary Antibody [Internet]. 2009. Disponible en: https://productlibrary.ventana.com/ventana_portal/OpenOverlayServlet?launchIndex=1&objectId=790-428620687ES
12. Roche Diagnostics International Inc, Ventana Medical Systems Inc. VENTANA anti-E-cadherin (36) Mouse Monoclonal Primary Antibody [Internet]. 2014. Disponible en:

https://productlibrary.ventana.com/ventana_portal/OpenOverlayServlet?launchIndex=1&objectId=790-44971007821ES

13. OSNA in breast cancer - Sysmex España [Internet]. Sysmex.es. 2019 [citado 23 May 2019]. Disponible en: <https://www.sysmex.es/nuestros-productos/product-singleview/osna-en-cancer-de-mama-4781.html>

14. Roche Diagnostics International Inc, Ventana Medical Systems Inc. VENTANA anti-p63 (4A4) Mouse Monoclonal Primary Antibody [Internet]. 2016. Disponible en: https://productlibrary.ventana.com/ventana_portal/OpenOverlayServlet?launchIndex=1&objectId=790-45091007911ES

15. Roche Diagnostics International Inc, Ventana Medical Systems Inc. Anti- Actin, Muscle (HUC 1-1) Primary Antibody [Internet]. 2008. Disponible en: https://productlibrary.ventana.com/ventana_portal/OpenOverlayServlet?launchIndex=1&objectId=760-250214117ES

16. VENTANA Virtuoso [Internet]. Diagnostics. 2019 [citado 23 May 2019]. Disponible en: <https://diagnostics. Roche.com/us/en/products/instruments/ventana-virtuoso.html>

17. Roche Diagnostics International Inc, Ventana Medical Systems Inc. CONFIRM anti-Progesterone Receptor (PR) (1E2) Rabbit Monoclonal Primary Antibody. [Internet]. 2012. Disponible en: https://productlibrary.ventana.com/ventana_portal/OpenOverlayServlet?launchIndex=1&objectId=790-222314849ES

18. Roche Diagnostics International Inc, Ventana Medical Systems Inc. VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail: Guía de interpretación para el carcinoma de mama o gástrico [Internet]. 2019. Disponible en: https://productlibrary.ventana.com/ventana_portal/OpenOverlayServlet?launchIndex=1&objectId=800-60431018386ES

19. Johansson A. L, Trewin C. B, Hjerkind K. V, Ellingjord-Dale M, Johannesen, T. B, Ursin, G. Breast cancer-specific survival by clinical subtype after 7 years follow-up of young and elderly women in a nationwide cohort. *Int. J. Cancer*. 2019; (144): 1251-1261.

20. Anwar SL, Raharjo CA, Herviastuti R, Dwianingsih E.K, Setyoheriyanto D, Avanti W.S, et al. Pathological profiles and clinical management challenges of breast cancer emerging in young women in Indonesia: A hospital-based study. *BMC Womens Health*. 2019. Disponible en: <https://bmcmwomenshealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12905-019-0724-3>

21. Olivier M, Bouaoun L, Villar S, Robitaille A, Cahais V, Heguy A, et al. Molecular features of premenopausal breast cancers in Latin American women: Pilot results from the PRECAMA study. *PLoS One*. 2019.

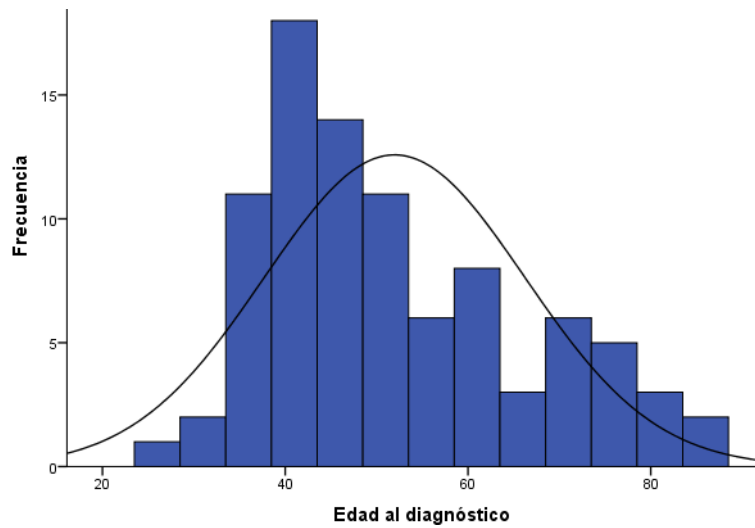
22. Villarreal-Garza C, Lopez-Martinez E.A, Muñoz-Lozano J.F, Unger-Saldaña K. Locally advanced breast cancer in young women in Latin America. *Ecancermedalscience*. 2019;13(894).

23. Martínez Ramos D, Simón Monterde L, Torrella Ramos A, Queralt Martín R, Suelves Piqueres C, Menor Durán P et al. ¿Se ha incrementado la incidencia del cáncer de mama en la mujer joven?: Análisis de un registro poblacional de tumores. *Rev Senol Patol Mamar*. 2018;31(1):12-19.
24. Wang MX, Ren JT, Tang LY, Ren ZF. Molecular features in young vs elderly breast cancer patients and the impacts on survival disparities by age at diagnosis. *Cancer Medicine*. 2018;7:3269–3277.
25. Hironaka-Mitsubishi A, Tsuda H, Yoshida M, Shimizu C, Asaga S, Hojo T, et al. Invasive breast cancers in adolescent and young adult women show more aggressive immunohistochemical and clinical features than those in women aged 40–44 years. *Breast Cancer*. 2018; 26(3):386-396.
26. Malvasio S, Schiavone A, Camejo N, Castillo C, Artagaveytia N, Di Matteo C, et al. Características clínico-patológicas y evolución del cáncer de mama en mujeres uruguayas jóvenes. *Rev Méd Urug*. 2017;33(2):94-101.
27. Medina Bueno G.A. Características clínicas y pronósticas de los subtipos moleculares de cáncer de mama determinados por inmunohistoquímica. *Rev perú med exp salud pública*. 2017; 34(3)472-477.
28. Arra M, Casimo C, Prieto C, Stigliano J, Gentile L, Martínez F et al. Cáncer de mama en mujeres menores de 35 años. *Rev. argent. mastología*. 2017; 36(132):92-104.
29. Berra M.G, Morcos P.S, Sarrouf M.C, Galleano J, Sarrouf J. Influencia del perfil inmunohistoquímico sobre la sobrevida libre de enfermedad y la sobrevida global en Cáncer de Mama Localmente Avanzado. *Rev. argent. Mastología*. 2016; 36(127):75-89.
30. Gascin R, Gosain R, Pollock Y, Jain D. Age-related Disparity: Breast Cancer in the Elderly. *Curr Oncol Rep*. 2016; 18(11):69.
31. Eugênio D.S.G, Souza J.A, Chojniak R, Bitencourt A.G.V, Graziano L, Souza E.F. Breast cancer features in women under the age of 40 years. *Rev Assoc Med Bras*. 2016;62(8):755-761.

Anexos

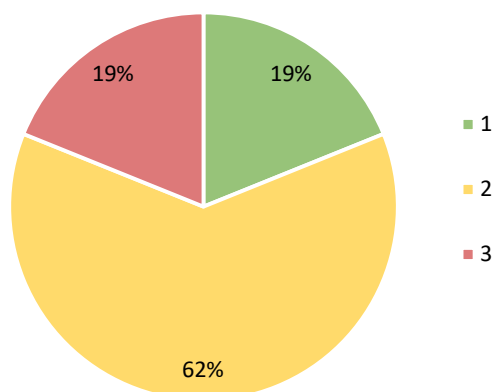
Anexo 1. Gráficos

Gráfico 2. Estudio descriptivo de la edad al diagnóstico



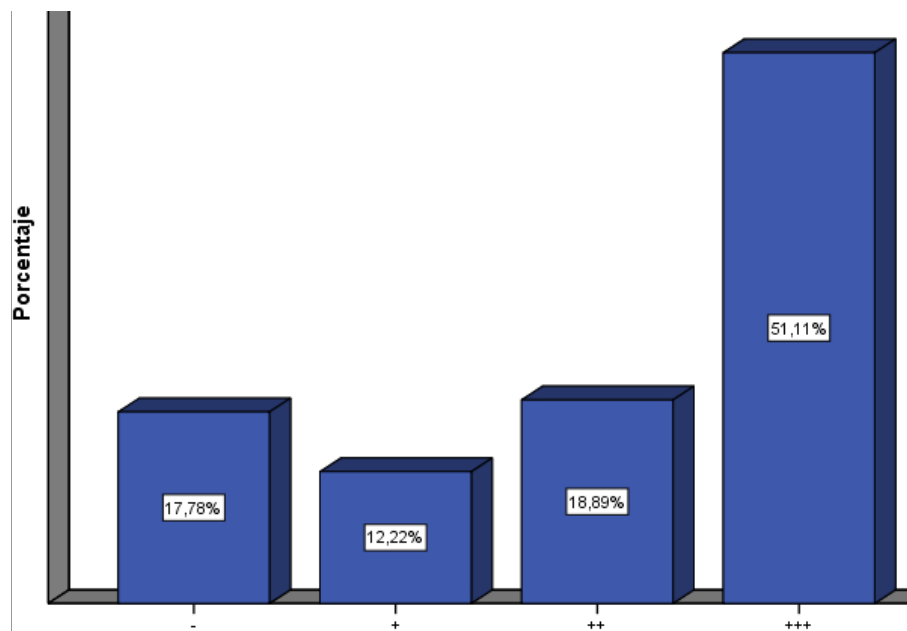
Fuente: elaboración propia

Gráfico 3. Distribución en grupos de edad



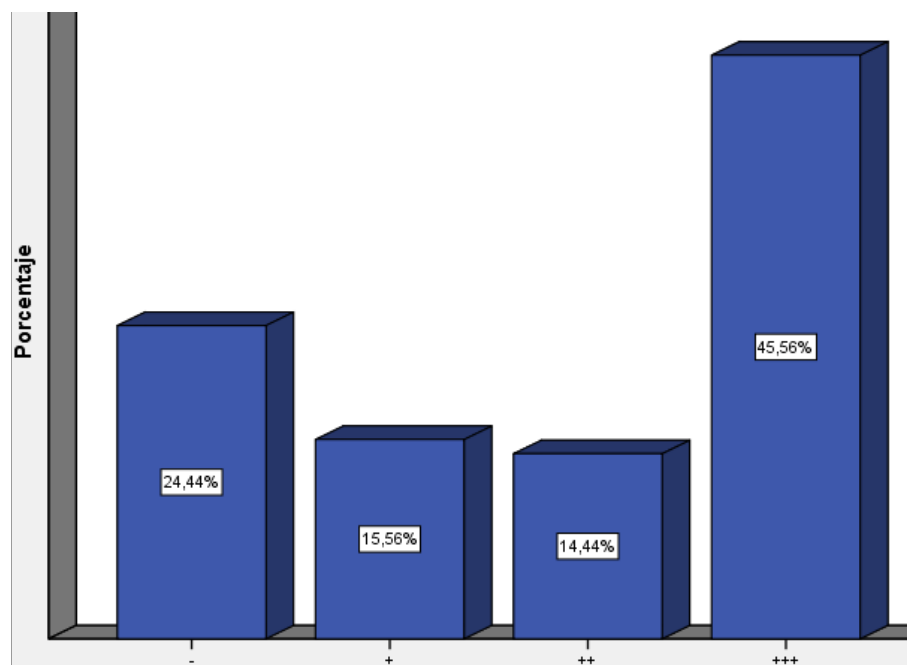
Fuente: elaboración propia

Gráfico 4. Estudio de la positividad a receptores de estrógenos



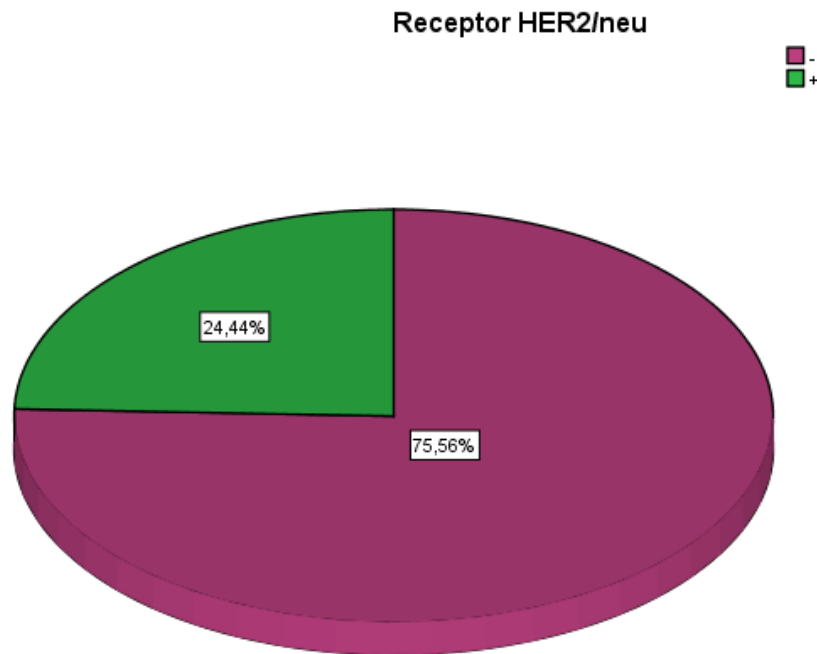
Fuente: elaboración propia

Gráfico 5. Estudio de la positividad a receptores de progesterona



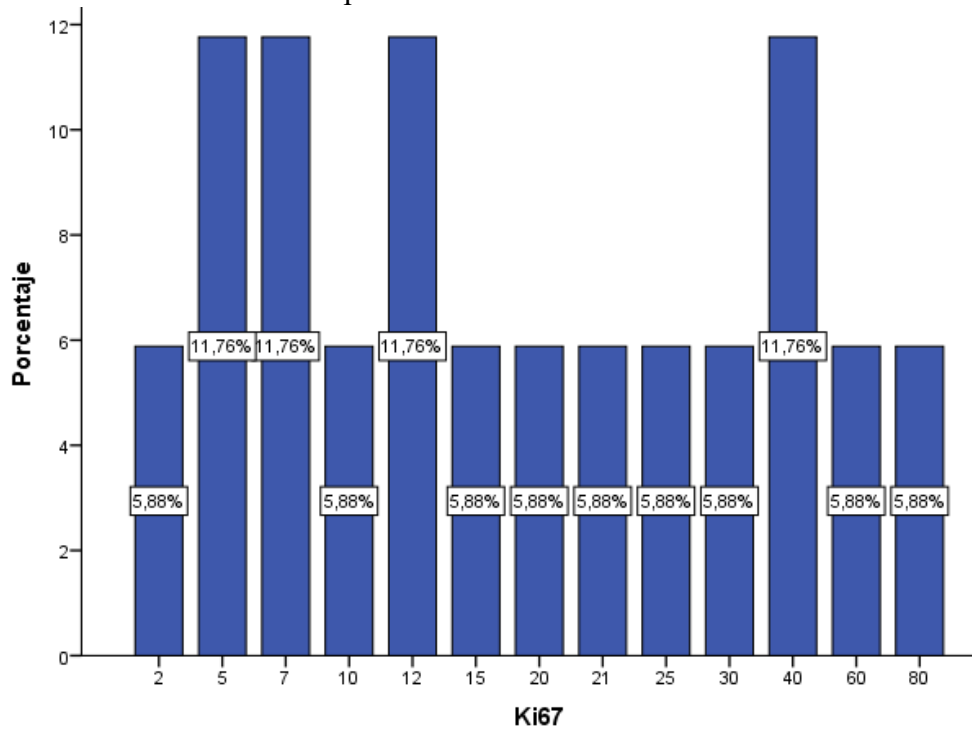
Fuente: elaboración propia

Gráfico 6. Estudio de la positividad a receptores de estrógenos



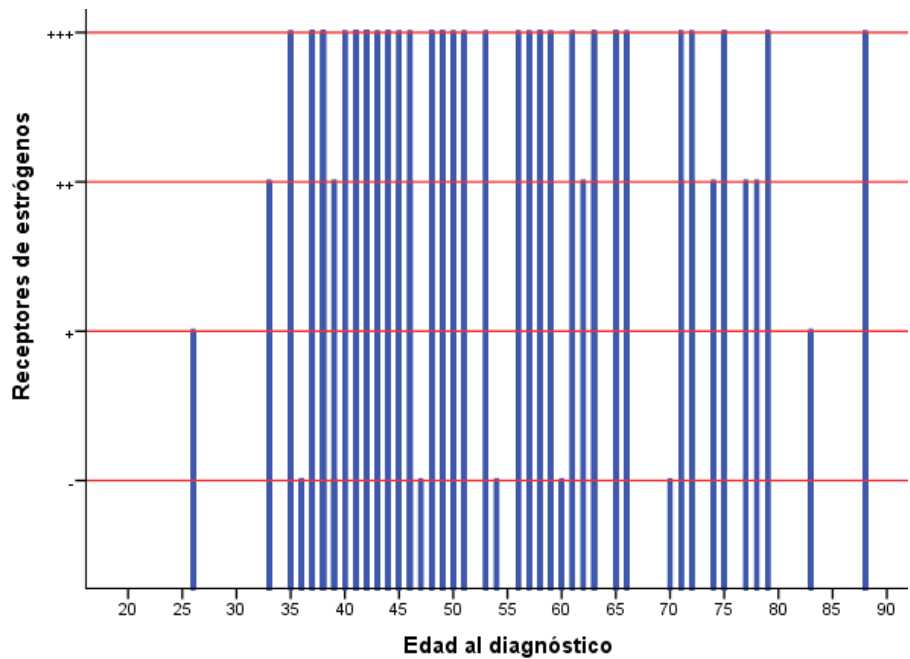
Fuente: elaboración propia

Gráfico 7. Estudio de la expresión de Ki67



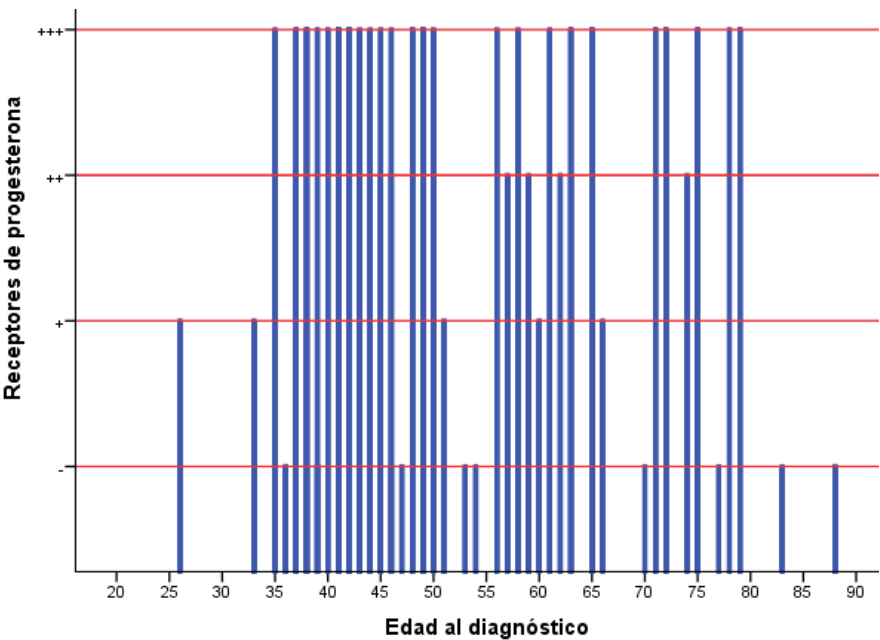
Fuente: elaboración propia

Gráfico 8. Expresividad de los receptores de estrógenos según la edad



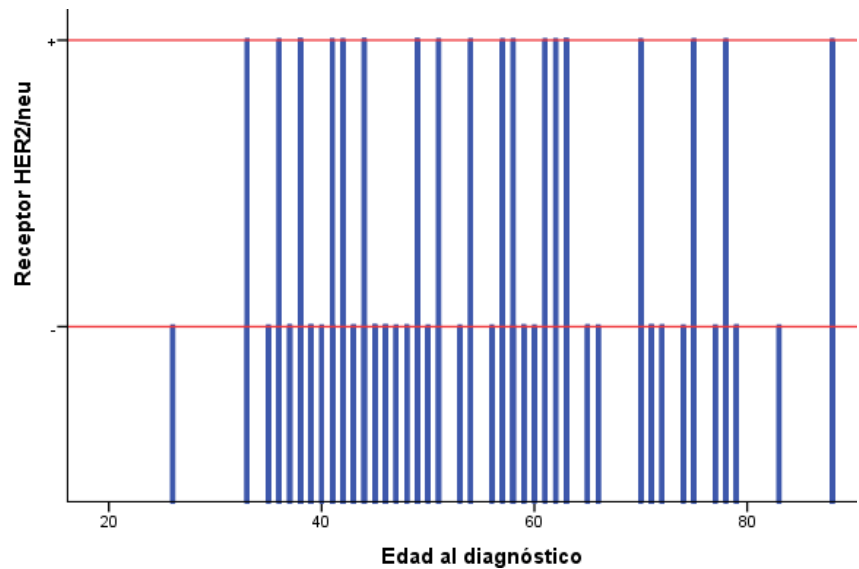
Fuente: elaboración propia

Gráfico 9. Expresividad de los receptores de progesterona según la edad



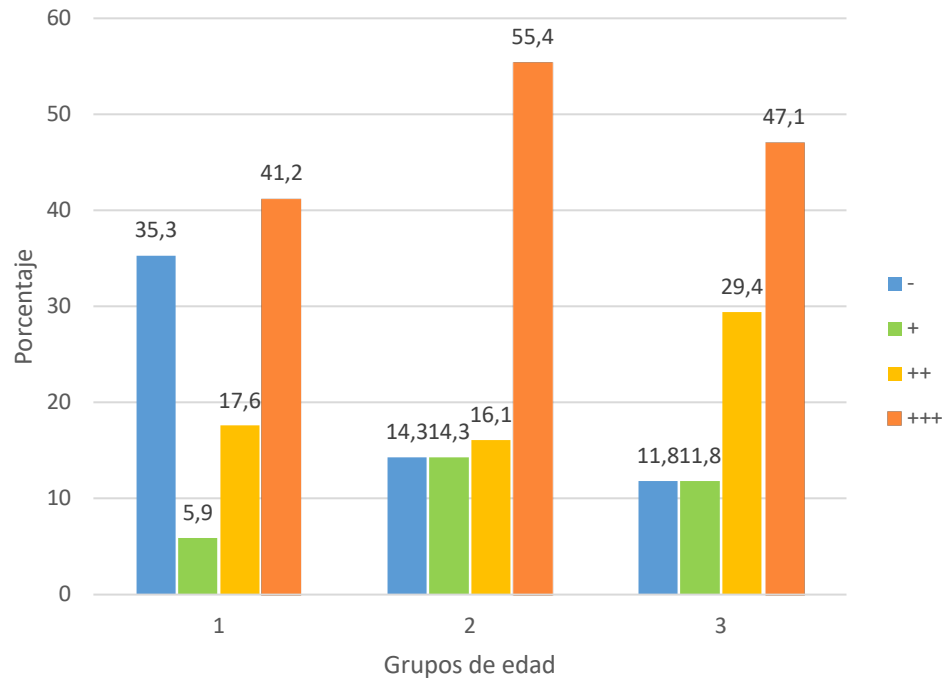
Fuente: elaboración propia

Gráfico 10. Sobreexpresión de HER2/neu según la edad



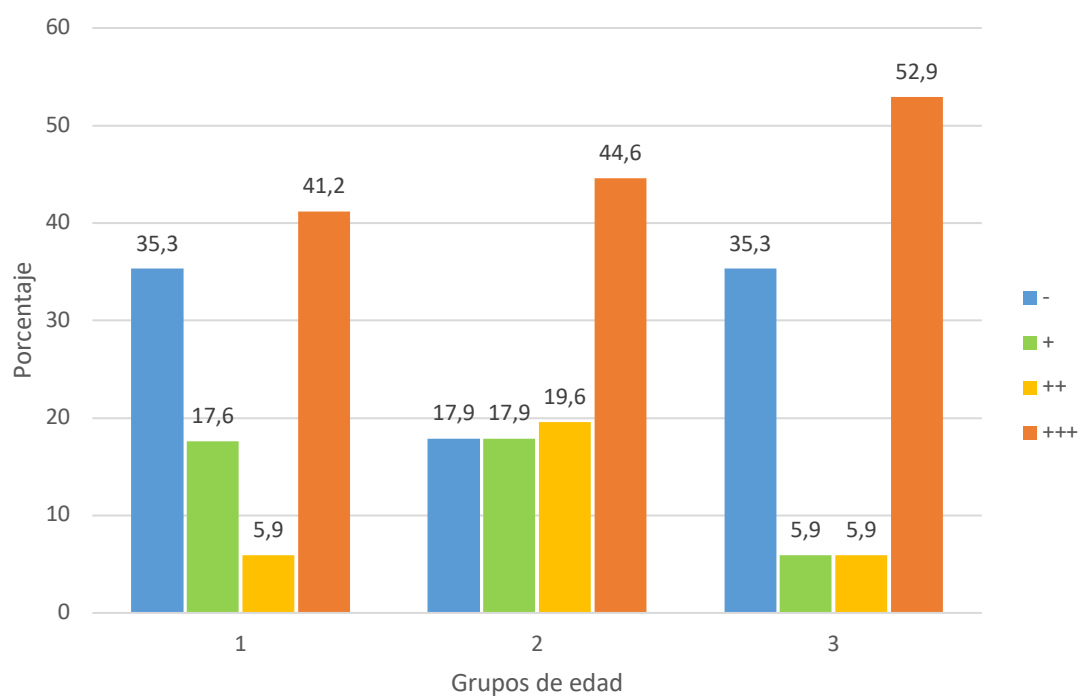
Fuente: elaboración propia

Gráfico 11. Intensidad de tinción para receptores de estrógeno según grupos de edad



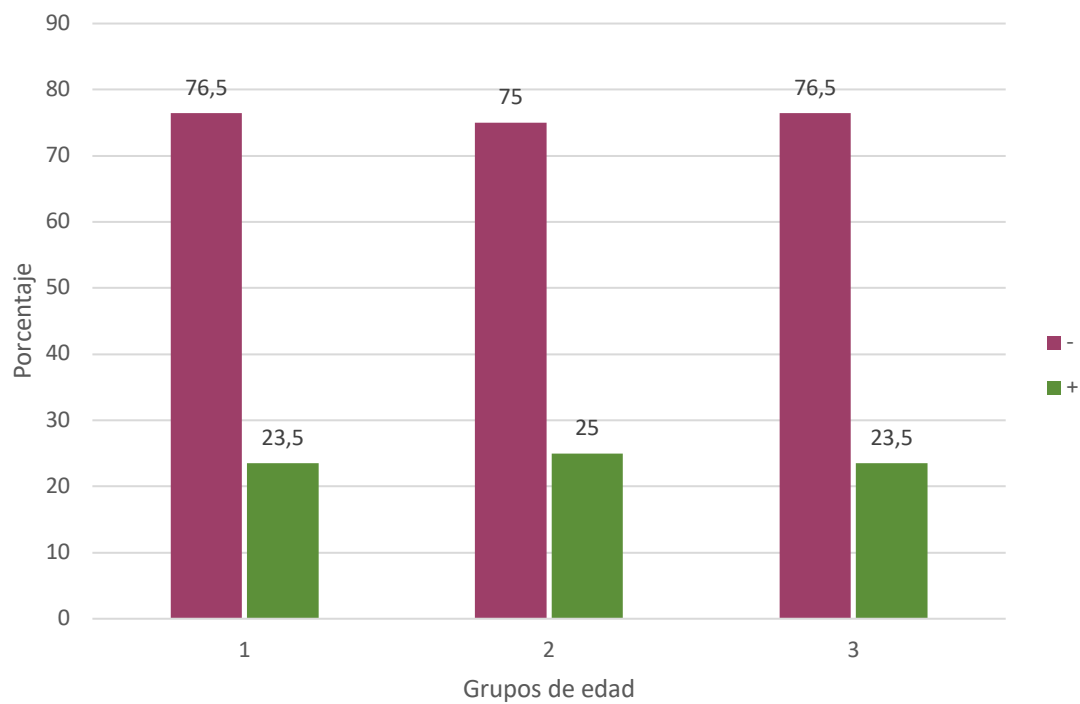
Fuente: elaboración propia

Gráfico 12. Intensidad de tinción para receptores de progesterona según grupos de edad



Fuente: elaboración propia

Gráfico 13. Sobreexpresión de HER2/neu según grupos de edad



Fuente: elaboración propia

Anexo 2. Tablas

Tabla 1. Clasificación BIRADS

Categoría	Tipo de exploración, según hallazgo Probabilidad de cáncer	Actitud
BIRADS 0	Incompleta	Necesita estudios adicionales
BIRADS 1	Negativa, Normal	Exploraciones habituales
BIRADS 2	Hallazgo benigno	Exploraciones habituales
BIRADS 3	Hallazgo probablemente benigno, < 2% probabilidad de cáncer	Asignar tras estudio radiológico completo. Seguimiento a corto plazo o biopsia. Mamografía cada 6-12 meses hasta 24 meses. Y biopsia si aumenta el grado de sospecha.
BIRADS 4A	Hallazgo con baja sospecha de cáncer, > 2 % y < 10 % probabilidad de cáncer	Diagnóstico histológico
BIRADS 4B	Hallazgo con moderada sospecha de cáncer, > 10 % ≤ 50 % de probabilidad de cáncer	Diagnóstico histológico
BIRADS 4C	Hallazgo con alta sospecha de cáncer, > 50 % y < 95% de probabilidad de cáncer	Diagnóstico histológico
BIRADS 5	Hallazgo altamente sugestivo de cáncer, > 95% de probabilidad de cáncer	Diagnóstico histológico
BIRADS 6	Biopsia conocida de Cáncer	Tratamiento adecuado

Fuente: *Oncoguía SEGO: Cáncer infiltrante de mama. Guías de práctica clínica en cáncer ginecológico y mamario. Publicaciones SEGO, Junio 2017.*

Tabla 6. Estudio descriptivo de la edad al diagnóstico

		Edad al diagnóstico
N	Válido	90
	Perdidos	0
Media		51,97
Error estándar de la media		1,504
Mediana		48,00
Moda		42 ^a
Desviación estándar		14,266
Varianza		203,516
Rango		62
Mínimo		26
Máximo		88

Fuente: *elaboración propia*

Tabla 8. Chi-cuadrado y corrección de Yates para la sobreexpresión de HER2/neu en grupo 1 y grupo 3

	Valor	gl	Sig. asintótica (2 caras)	Significación exacta (2 caras)	Significación exacta (1 cara)
Chi-cuadrado de Pearson	,000 ^a	1	1,000	1,000	,656
Corrección de continuidad ^b	,000	1	1,000		
Razón de verosimilitud	,000	1	1,000		
Prueba exacta de Fisher					
Asociación lineal por lineal	,000	1	1,000		
N de casos válidos	34				

a. 2 casillas (50,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 4,00.

b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2

Fuente: elaboración propia

Tabla 9. Valores observados del inmunofenotipo

Subtipo	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Total
Luminal A	9	33	9	51
Luminal B	2	15	6	23
HER2+	2	4	1	7
Triple negativo	4	4	1	9
Total	17	56	17	90
	0,18888889	0,62222222	0,18888889	

Fuente: elaboración propia

Tabla 10. Valores esperados del inmunofenotipo

Subtipo	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Total
Luminal A	9,633333333	31,73333333	9,633333333	51
Luminal B	4,344444444	14,31111111	4,344444444	23
HER2+	1,322222222	4,355555556	1,322222222	7
Triple negativo	1,7	5,6	1,7	9
Total	17	56	17	90

Fuente: elaboración propia

Tabla 11. Tabla chi-cuadrado

P = Probabilidad de encontrar un valor mayor o igual que el chi cuadrado tabulado, v = Grados de Libertad

v/p	0,001	0,0025	0,005	0,01	0,025	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3
1	10,8274	9,1404	7,8794	6,6349	5,0239	3,8415	2,7055	2,0722	1,6424	1,3233	1,0742
2	13,8150	11,9827	10,5965	9,2104	7,3778	5,9915	4,6052	3,7942	3,2189	2,7726	2,4079
3	16,2660	14,3202	12,8381	11,3449	9,3484	7,8147	6,2514	5,3170	4,6416	4,1083	3,6649
4	18,4662	16,4238	14,8602	13,2767	11,1433	9,4877	7,7794	6,7449	5,9886	5,3853	4,8784
5	20,5147	18,3854	16,7496	15,0863	12,8325	11,0705	9,2363	8,1152	7,2893	6,6257	6,0644
6	22,4575	20,2491	18,5475	16,8119	14,4494	12,5916	10,6446	9,4461	8,5581	7,8408	7,2311
7	24,3213	22,0402	20,2777	18,4753	16,0128	14,0671	12,0170	10,7479	9,8032	9,0371	8,3834
8	26,1239	23,7742	21,9549	20,0902	17,5345	15,5073	13,3616	12,0271	11,0301	10,2189	9,5245
9	27,8767	25,4625	23,5893	21,6660	19,0228	16,9190	14,6837	13,2880	12,2421	11,3887	10,6564
10	29,5879	27,1119	25,1881	23,2093	20,4832	18,3070	15,9872	14,5339	13,4420	12,5489	11,7807
11	31,2635	28,7291	26,7569	24,7250	21,9200	19,6752	17,2750	15,7671	14,6314	13,7007	12,8987
12	32,9092	30,3182	28,2997	26,2170	23,3367	21,0261	18,5493	16,9893	15,8120	14,8454	14,0111
13	34,5274	31,8830	29,8193	27,6882	24,7356	22,3620	19,8119	18,2020	16,9848	15,9839	15,1187
14	36,1239	33,4262	31,3194	29,1412	26,1189	23,6848	21,0641	19,4062	18,1508	17,1169	16,2221
15	37,6978	34,9494	32,8015	30,5780	27,4884	24,9958	22,3071	20,6030	19,3107	18,2451	17,3217
16	39,2518	36,4555	34,2671	31,9999	28,8453	26,2962	23,5418	21,7931	20,4651	19,3689	18,4179
17	40,7911	37,9462	35,7184	33,4087	30,1910	27,5871	24,7690	22,9770	21,6146	20,4887	19,5110
18	42,3119	39,4220	37,1564	34,8052	31,5264	28,8693	25,9894	24,1555	22,7595	21,6049	20,6014
19	43,8194	40,8847	38,5821	36,1908	32,8523	30,1435	27,2036	25,3289	23,9004	22,7178	21,6891
20	45,3142	42,3358	39,9969	37,5663	34,1696	31,4104	28,4120	26,4976	25,0375	23,8277	22,7745

Fuente: apuntes de la carrera, asignatura de estadística.