

Beatriz Galve Agudo

Valor pronóstico y predictivo del  
índice de proliferación Ki-67 en el  
carcinoma infiltrante de mama

Departamento  
Cirugía, Ginecología y Obstetricia

Director/es  
Fabre González, Ernesto



Reconocimiento – NoComercial –  
SinObraDerivada (by-nc-nd): No se  
permite un uso comercial de la obra  
original ni la generación de obras  
derivadas.

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Tesis Doctoral

**VALOR PRONÓSTICO Y PREDICTIVO  
DEL ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN KI-67  
EN EL CARCINOMA INFILTRANTE DE  
MAMA**

Autor

Beatriz Galve Agudo

Director/es

Fabre González, Ernesto

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
Cirugía, Ginecología y Obstetricia

2017



Universidad de Zaragoza

Tesis Doctoral

VALOR PRONÓSTICO Y PREDICTIVO DEL ÍNDICE DE  
PROLIFERACIÓN Ki-67 EN EL CARCINOMA INFILTRANTE DE  
MAMA

Autor

Beatriz Galve Agudo

Director

Ernesto Fabre González

Departamento

Cirugía, Ginecología y Obstetricia

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

**Universidad de Zaragoza**

**Facultad de Medicina**

**Departamento de Cirugía, Ginecología y Obstetricia**

**Tesis Doctoral**



**VALOR PRONÓSTICO Y PREDICTIVO DEL ÍNDICE DE  
PROLIFERACIÓN Ki-67 EN EL CARCINOMA INFILTRANTE  
DE MAMA.**

Beatriz Galve Agudo

Zaragoza, Octubre de 2016

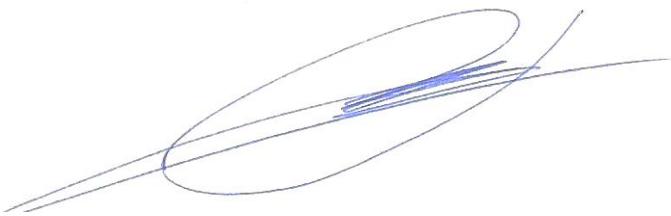
**Director:**

Dr. Ernesto Fabre González

Don Ernesto Fabre González, Doctor en Medicina por la Universidad Complutense de Madrid, Jefe de Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa y Catedrático de Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Zaragoza certifica que la tesis doctoral titulada "Valor pronóstico y predictivo del índice de proliferación Ki-67 en el carcinoma infiltrante de mama" recogida en la presente memoria y de la que es autora Doña Beatriz Galve Agudo, licenciada en Medicina y Cirugía, ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Cirugía, Ginecología y Obstetricia de la Universidad de Zaragoza.

La presente memoria se corresponde con el proyecto de tesis doctoral presentado y aprobado previamente por el correspondiente órgano responsable y una vez revisado el contenido, éste se considera adecuado para su presentación para optar al Título de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

Y para que así conste, firmo el presente certificado.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and curves, is placed here.

Prof. Dr. Ernesto Fabre González

Este trabajo constituye parte de mis actividades para la obtención del título de Doctor Universitario en Medicina de la Universidad de Zaragoza y no ha sido entregado previamente para la obtención de otro título.

Este documento es el resultado del trabajo propio excepto donde esté indicado y referido de otra forma.



Zaragoza, Octubre de 2016  
Fdo. Beatriz Galve Agudo

A nuestras pacientes, las heroínas de nuestro día a día.

## Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Fabre, director de este trabajo. Ha sido un verdadero honor contar con su inestimable colaboración, transmitiéndome sus conocimientos, su sabiduría y su experiencia. Gracias a su disponibilidad y paciencia, ha sido posible dar forma a este proyecto.

Gracias al Dr. Rodríguez Abad por su apoyo incondicional, sus enseñanzas, su generosidad y sus sabios consejos. Gracias por estar siempre ahí, como profesor, tutor y compañero. Y por darme el impulso necesario para que este trabajo saliera adelante.

Gracias a mis compañeros del Servicio de Ginecología del Hospital Nuestra Señora de Gracia de Zaragoza, por su apoyo, cariño y por haberse convertido a lo largo de estos años en una segunda familia para mí. Y especialmente gracias a la Dra. Casallo y al Dr. Ramón y Cajal por su ayuda en el desarrollo de este trabajo y en el día a día, compartiendo conmigo sus conocimientos y su amistad.

Gracias al Dr. Lao, oncólogo médico, por su colaboración en el desarrollo de la tesis y por ser una pieza clave en el Comité de Tumores del Hospital Nuestra Señora de Gracia.

Gracias a todos los Servicios implicados en el Comité de Tumores del Hospital Nuestra Señora de Gracia y sobre todo a los miembros de los Servicios de Anatomía Patológica y Radiología, por su inestimable colaboración.

Gracias a los Servicios de Documentación Clínica y Archivos de los hospitales Nuestra Señora de Gracia y Miguel Servet de Zaragoza, por el esfuerzo que conllevó la preparación de las historias clínicas revisadas.

Gracias a la Unidad de Mama del Hospital Universitario Miguel Servet, donde me formé y di mis primeros pasos en el campo de la patología mamaria.

Gracias a mis padres y mi hermano, por su cariño y comprensión y por ser mi principal apoyo.

Un recuerdo también para mis abuelos, que ya no están.

Gracias a mis amigas de siempre, Laura, Tere y Pili, por los buenos momentos que hemos vivido juntas y por otros muchos que vendrán.

En resumen, gracias a todas aquellas personas sin cuyo apoyo no hubiera sido posible llevar a cabo este proyecto.

# Contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	23
1.1. Epidemiología del cáncer de mama.....	23
1.2. Clasificación del cáncer de mama.....	25
1.2.1. Clasificación histológica del cáncer de mama.....	25
1.2.2. Clasificación molecular del cáncer de mama.....	26
1.2.3. Clasificación inmunohistoquímica del cáncer de mama.....	31
1.3. Estadiaje del cáncer de mama.....	33
1.4. Índice de proliferación Ki-67.....	36
1.4.1. Historia.....	36
1.4.2. Función de Ki-67 en el tejido mamario normal y patológico.....	36
1.4.3. Técnicas para la determinación de Ki-67.....	37
1.4.4. Valor pronóstico de Ki-67 en el cáncer de mama.....	38
1.4.5. Limitaciones de Ki-67 como factor pronóstico.....	41
1.4.6. Recomendaciones del Grupo Internacional de Ki-67 en cáncer de mama.....	43
1.5. Factores pronósticos en cáncer de mama no metastásico y su relación con Ki-67.....	45
1.5.1. Definición de factor pronóstico.....	45
1.5.2. Edad.....	45
1.5.3. Historia reproductiva.....	46
1.5.4. Índice de masa corporal.....	47
1.5.5. Tipo histológico.....	48

1.5.6. Tamaño tumoral.....	49
1.5.7. Afectación ganglionar.....	49
1.5.8. Grado histológico combinado de Nottingham.....	53
1.5.9. Receptores hormonales: estrógeno y progesterona.....	55
1.5.10. HER-2.....	55
1.5.11. p53.....	57
1.5.12. Clasificación molecular de cáncer de mama.....	57
1.5.13. Invasión linfovascular.....	59
1.5.14. Carcinoma intraductal asociado.....	59
1.5.15. Multifocalidad y multicentricidad.....	60
1.6. Técnicas de diagnóstico por imagen en cáncer de mama.....	61
1.6.1. Mamografía.....	61
1.6.2. Ecografía.....	61
1.6.3. Resonancia.....	62
1.6.4. Clasificación BI-RADS.....	64
1.7. Protocolo de manejo del cáncer de mama en el hospital Nuestra Señora de Gracia durante el año 2014.....	66
1.8. Seguimiento del paciente con cáncer de mama.....	69
2. OBJETIVOS.....	71
3. HIPÓTESIS.....	72
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	73
4.1. Tipo de estudio.....	73
4.2. Criterios de inclusión.....	73
4.3. Criterios de exclusión.....	73

4.4. Diseño del estudio.....	74
4.5. Variables incluidas.....	74
4.5.1. Variables epidemiológicas.....	75
4.5.2. Tipo de cirugía mamaria y axilar.....	76
4.5.3. Datos anatomo-patológicos obtenidos en el estudio de la pieza de resección quirúrgica.....	77
4.5.4. Perfil inmunohistoquímico del carcinoma infiltrante de mama.....	81
4.5.5. Afectación tumoral de los ganglios axilares.....	85
4.5.6. Tipo de terapia adyuvante.....	87
4.5.7. Datos del seguimiento de las pacientes.....	89
4.6. Análisis estadístico.....	90
4.6.1. Análisis descriptivo.....	91
4.6.2. Análisis inferencial.....	91
5. RESULTADOS .....	98
5.1. Correlación del índice de proliferación Ki-67 con los factores epidemiológicos en cáncer de mama.....	99
5.2. Correlación del índice de proliferación Ki-67 con otros factores anatomo-patológicos en cáncer de mama.....	106
5.3. Correlación del índice de proliferación Ki-67 con la afectación ganglionar axilar.....	121
5.3.1. Índice de proliferación Ki-67 como factor predictivo de macrometástasis en los ganglios axilares.....	121
5.3.2. Índice de proliferación Ki-67 como factor predictivo de macrometástasis en los ganglios axilares no centinelas, en caso de BSGC.....	127

5.4. Evolución y supervivencia de las pacientes después de la cirugía mamaria.....	131
5.5. Correlación del índice de proliferación Ki-67 con la supervivencia libre de enfermedad en cáncer de mama.....	135
5.5.1. Índice de proliferación Ki-67 como factor pronóstico de supervivencia libre de enfermedad en cáncer de mama.....	137
5.5.2. Índice de proliferación Ki-67 como factor pronóstico de supervivencia libre de enfermedad en las pacientes sin macrometástasis ganglionares axilares.....	143
5.5.3. Índice de proliferación Ki-67 como factor pronóstico de supervivencia libre de enfermedad en las pacientes con macrometástasis ganglionares axilares.....	147
5.6. Correlación del índice de proliferación Ki-67 con la supervivencia por cáncer de mama.....	154
5.6.1. Índice de proliferación Ki-67 como factor pronóstico de supervivencia por cáncer de mama.....	154
5.6.2. Índice de proliferación Ki-67 como factor pronóstico de supervivencia por cáncer de mama en las pacientes sin macrometástasis ganglionares axilares.....	160
5.6.3. Índice de proliferación Ki-67 como factor pronóstico de supervivencia por cáncer de mama en las pacientes con macrometástasis ganglionares axilares.....	164
6. DISCUSIÓN.....	170
6.1. Correlación del índice de proliferación KI-67 con los factores epidemiológicos.....	170

6.2. Correlación del índice de proliferación Ki-67 con otros factores anatomopatológicos.....	174
6.3. Índice de proliferación Ki-67 como factor predictivo de afectación tumoral ganglionar axilar.....	183
6.4. Índice de proliferación de Ki-67 como factor pronóstico de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia específica por cáncer de mama.....	189
7. CONCLUSIONES .....	208
8. BIBLIOGRAFÍA.....	210

## Índice de cuadros

<b>Cuadro 1.</b> 3 <sup>a</sup> edición de la clasificación histológica del carcinoma invasivo de mama de la Organización Mundial de la Salud.....	27
<b>Cuadro 2.</b> 4 <sup>a</sup> edición de la clasificación histológica del carcinoma invasivo de mama de la Organización Mundial de la Salud.....	28
<b>Cuadro 3.</b> Clasificación inmunohistoquímica del cáncer de mama consensuada en las conferencias de Saint Gallen de 2011 y 2013.....	33
<b>Cuadro 4.</b> Clasificación clínica TNM (séptima edición).....	34
<b>Cuadro 5.</b> Clasificación patológica TNM (séptima edición).....	35
<b>Cuadro 6.</b> Estadios según la clasificación TNM (séptima edición).....	35
<b>Cuadro 7.</b> Cálculo del Grado histológico combinado de Nottingham según las recomendaciones del Colegio Americano de Patología en 2016.....	54
<b>Cuadro 8.</b> Clasificación de la determinación de la sobreexpresión de HER2 mediante técnicas de inmunohistoquímica según las recomendaciones del Colegio Americano de Patología.....	56
<b>Cuadro 9.</b> Plantilla del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Nuestra Señora de Gracia empleada para realizar los informes de los carcinomas de mama intervenidos, en la que se detallan las variables incluídas.....	77-78
<b>Cuadro 10.</b> Estadio pT de la 7 <sup>a</sup> edición de la clasificación TNM.....	80
<b>Cuadro 11.</b> Anticuerpos empleados en las técnicas de inmunohistoquímica por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Nuestra Señora de Gracia.....	82

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Casos de cáncer de mama diagnosticados en Aragón por año, según los datos del Registro Hospitalario de cáncer de Aragón.....	23
<b>Tabla 2.</b> Criterios de exclusión y número de casos eliminados en cada apartado.....	98
<b>Tabla 3.</b> Expresión tumoral del índice de proliferación Ki-67 (%). . . . .	99
<b>Tabla 4.</b> Distribución de la población en grupos de edad.....	100
<b>Tabla 5.</b> Índice de proliferación Ki-67 (%) según los grupos de edad.....	100
<b>Tabla 6.</b> Índice de proliferación Ki-67 (%) en las pacientes premenopáusicas y postmenopáusicas.....	101
<b>Tabla 7.</b> Índice de proliferación Ki-67 (%) en las pacientes premenopáusicas y postmenopáusicas, con edad comprendida entre 45 y 55 años.....	102
<b>Tabla 8.</b> Distribución de la población según el tipo de paridad.....	102
<b>Tabla 9.</b> Índice de proliferación Ki-67 (%) según la paridad.....	103
<b>Tabla 10.</b> Distribución de la población según el tipo de índice de masa corporal.....	103
<b>Tabla 11.</b> Índice de proliferación Ki-67 según el tipo de índice de masa corporal.....	104
<b>Tabla 12.</b> Índice de proliferación Ki-67 según el tipo de índice de masa corporal, en los carcinomas de mama de tipo Luminal A-like.....	104
<b>Tabla 13.</b> Índice de proliferación Ki-67 según el tipo de índice de masa corporal, en los carcinomas de mama de tipo Luminal B-like HER2 negativo.....	104
<b>Tabla 14.</b> Índice de proliferación Ki-67 según el tipo de índice de masa corporal, en los carcinomas de mama de tipo Luminal B-like HER2 positivo.....	105
<b>Tabla 15.</b> Índice de proliferación Ki-67 según el tipo de índice de masa corporal, en los carcinomas de mama de tipo HER2 positivo.....	105

<b>Tabla 16.</b> Índice de proliferación Ki-67 según el tipo de índice de masa corporal, en los carcinomas de mama de tipo triple negativo.....	105
<b>Tabla 17.</b> Tipo de cirugía mamaria.....	106
<b>Tabla 18.</b> Tipo de cirugía axilar.....	106
<b>Tabla 19.</b> Tipo histológico de cáncer de mama.....	107
<b>Tabla 20.</b> Índice de proliferación Ki-67 (%) según el tipo histológico de carcinoma de mama.....	107
<b>Tabla 21.</b> Resultado de las comparaciones múltiples del valor de Ki-67 (%) entre los tipos histológicos de carcinoma de mama.....	108
<b>Tabla 22.</b> Distribución de la muestra según el tamaño tumoral, aplicando el sistema de estadiaje TNM (pT) .....	109
<b>Tabla 23.</b> Índice de proliferación Ki-67 (%) según el estadio pT.....	109
<b>Tabla 24.</b> Tumores unifocales, multifocales y multicéntricos.....	110
<b>Tabla 25.</b> Índice de proliferación Ki-67 (%) según la presencia de multifocalidad y multicentricidad.....	110
<b>Tabla 26.</b> Asociación a carcinoma ductal <i>in situ</i> .....	111
<b>Tabla 27.</b> Índice de proliferación Ki-67 (%) según la asociación a carcinoma ductal <i>in situ</i> o a carcinoma intraductal extenso.....	111
<b>Tabla 28.</b> Distribución del grado histológico combinado de Nottingham en nuestra muestra.....	112
<b>Tabla 29.</b> Índice de proliferación Ki-67 (%) según el grado histológico combinado de Nottingham.....	112
<b>Tabla 30.</b> Índice de proliferación Ki-67 (%) según la presencia o ausencia de invasión linfovascular.....	113
<b>Tabla 31.</b> Expresión tumoral del receptor de estrógeno.....	114
<b>Tabla 32.</b> Expresión tumoral del receptor de estrógeno: porcentaje e intensidad.....	115

<b>Tabla 33.</b> Índice de proliferación Ki-67 (%) según la expresión tumoral del receptor de estrógeno.....	115
<b>Tabla 34.</b> Expresión tumoral del receptor de progesterona.....	116
<b>Tabla 35.</b> Expresión tumoral del receptor de progesterona: porcentaje e intensidad.....	116
<b>Tabla 36.</b> Índice de proliferación Ki-67 (%) según la expresión tumoral del receptor de progesterona.....	117
<b>Tabla 37.</b> Índice de proliferación Ki-67 según la sobreexpresión de HER2.....	118
<b>Tabla 38.</b> Subtipos intrínsecos de cáncer de mama, obtenidos mediante inmunohistoquímica.....	119
<b>Tabla 39.</b> Índice de proliferación Ki-67 según los subtipos intrínsecos de cáncer de mama....	120
<b>Tabla 40.</b> Afectación tumoral de los ganglios axilares.....	122
<b>Tabla 41.</b> Punto de corte de Ki-67 $\geq 10\%$ como factor predictivo de macrometástasis en los ganglios axilares.....	124
<b>Tabla 42.</b> Factores de riesgo de macrometástasis en los ganglios axilares, según el modelo de regresión logística.....	125
<b>Tabla 43.</b> Análisis bivariante de los factores predictivos de macrometástasis en los ganglios axilares.....	126
<b>Tabla 44.</b> Factores de riesgo de macrometástasis en los ganglios no centinela axilares, según el modelo de regresión logística.....	129
<b>Tabla 45.</b> Análisis bivariante de los factores predictivos de macrometástasis en los ganglios no centinela axilares.....	130
<b>Tabla 46.</b> Tipo de tratamiento adyuvante.....	132
<b>Tabla 47.</b> Tipos de esquemas quimioterápicos adyuvantes.....	133
<b>Tabla 48.</b> Tipos de radioterapia.....	134
<b>Tabla 49.</b> Índice de proliferación Ki-67 (%) según el tipo de recidiva.....	135
<b>Tabla 50.</b> Índice de proliferación Ki-67 (%) según la localización de la recidiva a distancia.....	136

<b>Tabla 51.</b> Sensibilidad y especificidad de los diferentes puntos de corte de Ki-67 para predecir la aparición de recidivas según la curva ROC.....	138
<b>Tabla 52.</b> Resumen de los resultados obtenidos en el análisis de la supervivencia libre de enfermedad con las curvas de Kaplan-Meier y el contraste de Mantel-Haenszel.....	141
<b>Tabla 53.</b> Modelo de regresión de Cox para la supervivencia libre de enfermedad por cáncer de mama.....	142
<b>Tabla 54.</b> Resumen de los resultados obtenidos en el análisis de la supervivencia libre de enfermedad con las curvas de Kaplan-Meier y el contraste de Mantel-Haenszel en el grupo sin macrometástasis ganglionares.....	145
<b>Tabla 55.</b> Modelo de regresión de Cox para la supervivencia libre de enfermedad en las pacientes sin macrometástasis ganglionares.....	147
<b>Tabla 56.</b> Resumen de los resultados obtenidos en el análisis de la supervivencia libre de enfermedad con las curvas de Kaplan-Meier y el contraste de Mantel-Haenszel en el grupo con macrometástasis ganglionares.....	150
<b>Tabla 57.</b> Modelo de regresión de Cox para la supervivencia libre de enfermedad en las pacientes con macrometástasis ganglionares.....	151
<b>Tabla 58.</b> Sensibilidad y especificidad de los diferentes puntos de corte de Ki-67 para predecir el éxito por cáncer de mama según la curva ROC.....	156
<b>Tabla 59.</b> Resumen de los resultados obtenidos en el análisis de la supervivencia por cáncer de mama con las curvas de Kaplan-Meier y el contraste de Mantel-Haenszel.....	158
<b>Tabla 60.</b> Modelo de regresión de Cox para supervivencia específica por cáncer de mama....	159
<b>Tabla 61.</b> Resumen de los resultados obtenidos en el análisis de la supervivencia por cáncer de mama con las curvas de Kaplan-Meier y el contraste de Mantel-Haenszel en el grupo sin macrometástasis ganglionares.....	163
<b>Tabla 62.</b> Modelo de regresión de Cox para la supervivencia por cáncer de mama en las pacientes sin macrometástasis ganglionares.....	164

<b>Tabla 63.</b> Resumen de los resultados obtenidos en el análisis de la supervivencia por cáncer de mama con las curvas de Kaplan-Meier y el contraste de Mantel-Haenszel en el grupo con macrometástasis ganglionares.....	167
<b>Tabla 64.</b> Modelo de regresión de Cox para la supervivencia por cáncer de mama en las pacientes con macrometástasis ganglionares.....	168
<b>Tabla 65.</b> Resumen de los estudios que han analizado la expresión tumoral de Ki-67 en las pacientes jóvenes con cáncer de mama.....	172
<b>Tabla 66.</b> Resumen de los estudios que han analizado la relación entre la expresión del índice de proliferación Ki-67 y el tamaño tumoral en el cáncer de mama.....	176
<b>Tabla 67.</b> Resumen de los estudios que han analizado la relación entre la expresión del índice de proliferación Ki-67 y la de los receptores de estrógeno y progesterona.....	180
<b>Tabla 68.</b> Estudios en los que Ki-67 resultó ser un factor pronóstico independiente para la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global (y/o específica) por cáncer de mama.....	195-196
<b>Tabla 69.</b> Estudios en los que Ki-67 resultó ser un factor independiente de supervivencia libre de enfermedad, pero no de supervivencia global (y/o específica) por cáncer de mama.....	197
<b>Tabla 70.</b> Estudios en los que Ki-67 resultó ser un factor independiente de supervivencia global (y/o específica), pero no de supervivencia libre de enfermedad por cáncer de mama.....	198
<b>Tabla 71.</b> Estudios en los que Ki-67 no resultó ser un factor independiente de supervivencia libre de enfermedad ni de supervivencia global por cáncer de mama.....	198
<b>Tabla 72.</b> Estudios que analizaron el valor pronóstico de Ki-67 para la supervivencia libre de enfermedad y/o la supervivencia global por cáncer de mama, en pacientes con ganglios axilares negativos para malignidad.....	203-204
<b>Tabla 73.</b> Estudios que analizaron el valor pronóstico de Ki-67 para la supervivencia libre de enfermedad y/o la supervivencia global por cáncer de mama, en pacientes con ganglios axilares positivos para malignidad.....	206-207

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Evolución de la incidencia de cáncer de mama en el Hospital Nuestra Señora de Gracia de Zaragoza desde 2005 a 2015.....	24
<b>Figura 2.</b> Ilustración de las dos posibles definiciones de "componente intraductal extenso"....	60
<b>Figura 3.</b> Tipos de curvas de intensidad de señal / tiempo en resonancia mamaria.....	63
<b>Figura 4.</b> Diagrama que resume el manejo del cáncer de mama en el Hospital Nuestra Señora de Gracia durante el año 2014.....	66
<b>Figura 5.</b> Distribución de la población según la edad en el momento del diagnóstico.....	99
<b>Figura 6.</b> Índice de proliferación Ki-67 según la expresión tumoral de p53.....	117
<b>Figura 7.</b> Distribución de Ki-67 según los subtipos intrínsecos de cáncer de mama.....	120
<b>Figura 8.</b> Tipo de cirugía axilar.....	121
<b>Figura 9.</b> Correlación entre el índice de proliferación Ki-67 (%) y el número de ganglios axilares con macrometástasis.....	123
<b>Figura 10.</b> Correlación entre el índice de proliferación Ki-67 y el número de ganglios axilares con afectación extracapsular.....	123
<b>Figura 11.</b> Curva ROC asociada al modelo de regresión logística para predecir la presencia de macrometástasis en los ganglios axilares.....	127
<b>Figura 12.</b> Curva ROC asociada al modelo de regresión logística para predecir la existencia de macrometástasis en los ganglios no centinela axilares.....	131
<b>Figura 13.</b> Curva de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad.....	137
<b>Figura 14.</b> Curva ROC de Ki-67 y la variable recidiva en cáncer de mama.....	137
<b>Figura 15.</b> Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad con la variable Ki-67 < o $\geq$ 19%.....	139
<b>Figura 16.</b> Curva de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad en el grupo sin macrometástasis ganglionares axilares.....	143

<b>Figura 17.</b> Curva de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad con la variable Ki-67 < o $\geq$ 19%, en el grupo de pacientes sin macrometástasis ganglionares axilares.....	144
<b>Figura 18.</b> Curva de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad en el grupo con macrometástasis ganglionares.....	148
<b>Figura 19.</b> Curva de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad con la variable Ki-67 < o $\geq$ 19%, en el grupo de pacientes con macrometástasis ganglionares.....	149
<b>Figura 20.</b> Resumen de los resultados obtenidos al analizar el valor predictivo de supervivencia libre de enfermedad del índice de proliferación Ki-67, en el total de la muestra y según la presencia o no de macrometástasis en los ganglios axilares.....	153
<b>Figura 21.</b> Curva de Kaplan-Meier de supervivencia por cáncer de mama.....	154
<b>Figura 22.</b> Curva ROC de Ki-67 y la supervivencia por cáncer de mama.....	155
<b>Figura 23.</b> Curva de Kaplan-Meier de supervivencia por cáncer de mama con la variable Ki-67 < o $\geq$ 24%.....	157
<b>Figura 24.</b> Curva de Kaplan-Meier de supervivencia por cáncer de mama en el grupo sin macrometástasis ganglionares.....	160
<b>Figura 25.</b> Curva de Kaplan-Meier de supervivencia por cáncer de mama con la variable Ki-67 < o $\geq$ 24%, en el grupo de pacientes sin macrometástasis ganglionares.....	161
<b>Figura 26.</b> Curva de Kaplan-Meier de supervivencia por cáncer de mama en el grupo con macrometástasis ganglionares.....	164
<b>Figura 27.</b> Curva de Kaplan-Meier de supervivencia por cáncer de mama con la variable Ki-67 < o $\geq$ 24%, en el grupo de pacientes con macrometástasis ganglionares.....	165
<b>Figura 28.</b> Resumen de los resultados obtenidos al analizar el valor predictivo de supervivencia por cáncer de mama del índice de proliferación Ki-67, en el total de la muestra y según la presencia o no de macrometástasis en los ganglios axilares.....	169

## Abreviaturas

ASCO - American Society of Clinical Oncology.

BAG - Biopsia con aguja gruesa.

BAV - Biopsia asistida por vacío.

BED - Biopsia escisional diferida.

BI-RADS - Breast Imaging Reporting and Data System.

BSGC - Biopsia selectiva del ganglio centinela.

CAP- Colegio Americano de Patología.

Carcinoma ductal infiltrante NOS - Carcinoma ductal infiltrante not otherwise specified.

Carcinoma invasivo NST - Carcinoma invasivo of no special type.

CGA - Campos de gran aumento.

CISH - Hibridación in situ con sonda cromógena.

CT - Tomografía computerizada.

FDG PET - Tomografía con emisión de positrones, con fluorodesoxiglucosa.

FISH - Hibridación in situ con sonda fluorescente.

GnRH - Gonadotropin-releasing hormone.

Gy - Gray.

IMC - Índice de masa corporal.

IPN - Índice pronóstico de Nottingham.

NCCN - National Comprehensive Cancer Network.

OMS - Organización Mundial de la Salud.

OSNA - One step nucleic acid amplification.

PAAF - Punción aspirativa con aguja fina.

PCR - Reacción en cadena de la polimerasa.

RE - Receptor de estrógenos.

RP - Receptor de progesterona.

SESPM - Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria.

SG - Supervivencia global.

SLE - Supervivencia libre de enfermedad.

SPSS - Statistical Package for the Social Sciences.

TAC - Tomografía axial computerizada.

VPP - Valor predictivo positivo.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Epidemiología del cáncer de mama

### *Incidencia en España:*

El cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente entre las mujeres de todo el mundo y también en España. En nuestro país se diagnostican cada año aproximadamente 26.000 casos de cáncer de mama, que suponen cerca del 30% de todos los tumores del sexo femenino<sup>1</sup>.

La incidencia aumenta lentamente, probablemente debido al envejecimiento de la población y a un diagnóstico cada vez más precoz, pero en los próximos años se estima que se producirá una estabilización en el número de casos diagnosticados por año.

### *Incidencia en Aragón:*

Los casos nuevos de cáncer de mama diagnosticados por año, incluidos a partir del 1 de enero de 2009 en el Registro Hospitalario de Cáncer de Aragón, se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla 1.** Casos de cáncer de mama diagnosticados en Aragón por año, según los datos del Registro Hospitalario de cáncer de Aragón\*.

Año de diagnóstico	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Número de casos**	173	683	815	811	830	876	855

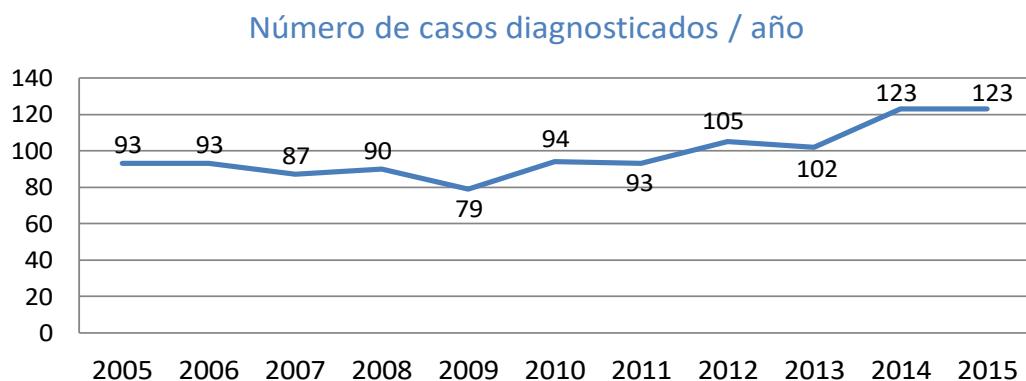
\* Datos cedidos por el Registro Hospitalario de cáncer de Aragón.

\*\* Para su valoración se debe tener en cuenta que durante los dos primeros años, todavía no se habían incorporado los datos de todos los hospitales de la Comunidad Autónoma.

El cáncer de mama supone el 28,8% del total de cánceres en la mujer y menos del 0,5% en los hombres. La evolución de las tasas manifiesta una tendencia al aumento desde 1983 con una estabilización en el último quinquenio<sup>1</sup>.

En la siguiente gráfica se muestra la evolución de la incidencia de cáncer de mama en el Hospital Nuestra Señora de Gracia de Zaragoza, durante los últimos once años, donde se puede observar un ligero incremento de la misma, pasando de 93 casos en 2005 a 123 casos en el año 2015:

**Figura 1.** Evolución de la incidencia de cáncer de mama en el Hospital Nuestra Señora de Gracia de Zaragoza desde 2005 a 2015.



#### *Supervivencia del cáncer de mama:*

La supervivencia media en España por cáncer de mama se sitúa en torno al 81- 82% a los 5 años. Esta cifra está a la par que la de los países más desarrollados, según los datos del estudio EUROCARE-5, que analiza la supervivencia a cinco años de los pacientes diagnosticados de cáncer de mama entre 2000 y 2007<sup>2</sup>.

## 1.2. Clasificación del cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad muy heterogénea, con diferentes variantes histológicas, hallazgos biológicos, diferente pronóstico y respuesta a los tratamientos aplicados. Por ello, no existe una única clasificación de cáncer de mama, capaz de englobar todos estos aspectos de la enfermedad.

Las tres clasificaciones del cáncer de mama más empleadas en la práctica clínica son la histológica, la molecular y la inmunohistoquímica.

### 1.2.1. Clasificación histológica del cáncer de mama

La clasificación histológica se fundamenta en la descripción morfológica de los tumores. La más aceptada y utilizada a nivel mundial y también en nuestro medio, es la elaborada por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

En este estudio se incluyeron los casos de cáncer de mama diagnosticados desde el año 2005 hasta el año 2014. Por este motivo se utilizó la 3<sup>a</sup> edición de la clasificación histológica de la OMS, publicada en el año 2003<sup>3</sup> (cuadro 1).

Existe otra clasificación de la OMS más reciente, la 4<sup>a</sup> edición, publicada en el año 2012<sup>4</sup>. Ésta última incluye, entre otros, un cambio importante <sup>5</sup>: El grupo de "carcinoma ductal infiltrante de tipo no específico" (*not otherwise specified*, NOS) pasa a denominarse "carcinoma invasivo de tipo no especial" (*of no special type*, NST), eliminándose el término "ductal", clásicamente utilizado. Este cambio se debe, por una parte a que dicho término implicaba hechos no demostrados, como el origen de esos tumores a partir del sistema ductal. Y por otra, a que éste agrupaba a una serie no uniforme de tumores.

Con la nueva clasificación, el diagnóstico de carcinoma invasivo NST se obtiene tras la exclusión de otros tipos específicos de tumores (cuadro 2).

Cuando se utiliza la clasificación histológica, el 70-80% de los cánceres de mama quedan incluidos en dos grandes grupos: carcinomas ductales invasivos de tipo no específico (NOS) y carcinomas lobulillares invasivos.

Este aspecto le resta utilidad en la práctica, ya que agrupa bajo el mismo nombre a tumores muy diferentes desde el punto de vista biológico y clínico.

No está claro que los carcinomas invasivos ductales y lobulillares presenten diferencias clínicas y pronósticas, aunque clásicamente se ha afirmado que los carcinomas lobulillares infiltrantes se asocian a un comportamiento menos agresivo.

A pesar de haber perdido importancia en los últimos años frente a otras clasificaciones más actuales como las moleculares o biológicas, la clasificación histológica todavía es útil en algunos tipos específicos de cáncer de mama como el carcinoma tubular, cribiforme, mucinoso y secretor, que suelen asociarse a un excelente pronóstico; y los carcinomas metaplásicos, que habitualmente presentan un comportamiento más agresivo.

### 1.2.2. Clasificación molecular del cáncer de mama

La clasificación molecular se basa en el análisis de perfiles de expresión génica, obtenidos a partir de técnicas de microarrays de ADN.

Charles M. Perou publicó en el año 2000 la clasificación genómica del cáncer de mama, identificando cuatro subtipos intrínsecos asociados a cuatro patrones diferentes de expresión génica<sup>6</sup>: los subtipos Luminal (A y B), HER-2 *enriched*, *basal-like* y normal *breast-like*. El subtipo *normal breast-like* fue posteriormente excluido, al deberse a la contaminación de la muestra por células mamarias normales.

Los principales subtipos moleculares de cáncer de mama y sus características son:

Cuadro 1. 3<sup>a</sup> edición de la clasificación histológica del carcinoma invasivo de mama de la Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>3</sup>.

**3<sup>a</sup> edición de la clasificación de carcinoma invasivo de mama de la OMS (2003):  
(excluyendo el carcinoma microinvasivo y las lesiones papilares invasivas):**

- Carcinoma ductal infiltrante de tipo no específico (NOS) (*not otherwise specified*)
  - Carcinoma de tipo mixto
  - Carcinoma pleomórfico
  - Carcinoma con células gigantes del estroma tipo osteoclasto-like
  - Carcinoma con diferenciación coriocarcinomatosa
  - Carcinoma con diferenciación melanocítica
- Carcinoma lobulillar infiltrante
- Carcinoma tubular
- Carcinoma cribiforme invasivo
- Carcinoma medular
- Carcinoma mucinoso y otros tumores con abundante mucina
  - Carcinoma mucinoso
  - Cistoadenocarcinoma y carcinoma mucinoso de células columnares
  - Carcinoma de células en anillo de sella
- Tumores neuroendocrinos
  - Carcinoma neuroendocrino sólido
  - Tumor carcinoide atípico
  - Carcinoma de células pequeñas / oat cell
  - Carcinoma neuroendocrino de células grandes
- Carcinoma invasivo micropapilar
- Carcinoma apocrino
- Carcinoma metaplásico
  - Carcinomas metaplásicos epiteliales puros
    - Carcinoma de células escamosas
    - Adenocarcinoma con metaplasia de células fusiformes
    - Carcinoma adenoescamoso
    - Carcinoma mucoepidermoide
  - Carcinomas metaplásicos mixtos epitelial / mesenquimal
- Carcinoma rico en lípidos
- Carcinoma secretor
- Carcinoma oncocítico
- Carcinoma adenoide quístico
- Carcinoma de células acinares
- Carcinoma de células claras ricas en glucógeno
- Carcinoma sebáceo
- Carcinoma inflamatorio

Cuadro 2. 4<sup>a</sup> edición de la clasificación histológica del carcinoma invasivo de mama de la Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>4</sup>.

**4<sup>a</sup> edición de la clasificación de carcinoma invasivo de mama de la OMS (2012):**

**(excluyendo el carcinoma microinvasivo y las lesiones papilares invasivas):**

Carcinoma infiltrante de tipo no especial (NST) (*of no special type*)

Carcinoma pleomórfico

Carcinoma con células gigantes del estroma tipo osteoclasto-like

Carcinoma con diferenciación coriocarcinomata

Carcinoma con diferenciación melanocítica

Carcinoma lobulillar infiltrante

Carcinoma lobulillar clásico

Carcinoma lobulillar sólido

Carcinoma lobulillar alveolar

Carcinoma lobulillar pleomórfico

Carcinoma tubulolobulillar

Carcinoma lobulillar mixto

Carcinoma tubular

Carcinoma cribiforme

Carcinoma mucinoso

Carcinoma con diferenciación medular

Carcinoma medular

Carcinoma medular atípico

Carcinoma infiltrante NST con diferenciación medular

Carcinoma con diferenciación apocrina

Carcinoma con diferenciación en células en anillo de sella

Carcinoma invasivo micropapilar

Carcinoma metaplásico de tipo no especial

Carcinoma adenoescamoso de bajo grado

Carcinoma metaplásico fibromatosis-like

Carcinoma de células escamosas

Carcinoma de células fusiformes

Carcinoma metaplásico con diferenciación mesenquimal

Diferenciación condroide

Diferenciación ósea

Otros tipos de diferenciación mesenquimal

Carcinoma metaplásico mixto

Carcinoma mioepitelial

Tumores epitelial-mioepiteliales

Adenomioepitelioma con carcinoma

Carcinoma adenoide quístico

Tipos raros

Carcinoma con rasgos neuroendocrinos

Tumor neuroendocrino, bien diferenciado

Carcinoma neuroendocrino pobemente diferenciado

(carcinoma de células pequeñas)

Carcinoma con diferenciación neuroendocrina

Carcinoma secretor

Carcinoma invasivo papilar

Carcinoma de células acinares

Carcinoma mucoepidermoide

Carcinoma polimorfo

Carcinoma oncocítico

Carcinoma rico en lípidos

Carcinoma de células claras ricas en glucógeno

Carcinoma sebáceo

### *1. Subtipo Luminal:*

Supone alrededor del 70% de los cánceres de mama y se caracteriza por la expresión de receptores hormonales. Tiene un perfil de expresión génica similar al del epitelio luminal, formado por citoqueratinas 8 y 18, receptores de estrógenos, gen de ciclina D1 y menos del 20 % tienen mutaciones de p53. A menudo son tumores de bajo grado histológico .

Se distinguen dos tipos de tumores de subtipo Luminal:

- *Luminal A*: con mejor pronóstico, mayor expresión de receptores hormonales y menor expresión de genes de proliferación<sup>7</sup>.
- *Luminal B*: con peor pronóstico, menor expresión de receptores hormonales y mayor de genes de proliferación.

### *2. Subtipo HER-2 enriched:*

Constituye el 15-20% de los cánceres de mama y se caracteriza por la amplificación de C-erb-2. Suelen ser tumores de alto grado histológico, con mayor riesgo de afectación ganglionar y el 40-80% tienen mutación de p53.

Se asocian a una mayor sensibilidad al tratamiento quimioterápico con taxanos y a las dosis densas.

### *3. Subtipo Basal-like:*

Suponen el 10-15% de cánceres de mama y se caracterizan por la ausencia de expresión de receptores hormonales. Se asocian habitualmente a un alto grado histológico.

Su perfil de expresión es similar al de las células basales de otros epitelios y a las células mioepiteliales de la mama: no hay expresión de receptores de estrógenos, baja expresión de HER2, expresan citoqueratinas 5/6 y 17 y genes relacionados con la proliferación. Es frecuente la mutación de p53 e importante la expresión de EGFR.

Suelen presentar una buena respuesta a la quimioterapia, pero a pesar de ello, el porcentaje de recaídas es muy elevado durante los 2-3 primeros años.

La clasificación molecular inicial se ha ido mejorando y completando en los últimos años, identificándose en la actualidad hasta diez subtipos genéticos de cáncer de mama<sup>8</sup>.

La importancia de esta clasificación radica en su valor pronóstico y predictivo, ayudando a identificar subtipos específicos de cáncer de mama que presentarán una diferente evolución y respuesta a los tratamientos aplicados.

#### Plataformas génicas:

Existen diversas plataformas de expresión génica basadas en este concepto. Estas plataformas analizan el perfil de expresión génica de cada tumor de manera individualizada y en función de éste, proporcionan información respecto al comportamiento del mismo.

Algunas realizan el análisis genético utilizando microarrays de ADN y otras mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las plataformas génicas informan del riesgo de recurrencia y ayudan a decidir qué tumores se beneficiarán de un tratamiento con quimioterapia. En la práctica clínica son utilizadas principalmente en el manejo de tumores de tipo Luminal con un riesgo intermedio de recidiva, en los que no está clara de inicio la aplicación de quimioterapia, además de hormonoterapia.

Actualmente hay dos grandes estudios en marcha: TailorX y Mindact, que analizan el papel de los test multigénicos respecto al beneficio de añadir quimioterapia en tumores con receptores hormonales positivos y ganglios negativos<sup>9</sup>.

Los genes relacionados con la proliferación tiene un sustancial impacto en la predicción del riesgo de recurrencia y la mayoría de plataformas incluyen genes de este tipo como Ki-67<sup>10,11</sup>. Algunas han demostrado tener también valor pronóstico y valor predictivo de respuesta.

### 1.2.3. Clasificación inmunohistoquímica del cáncer de mama

La principal limitación de las plataformas de expresión génica es su elevado coste, lo que las convierte en herramientas poco accesibles en algunos medios.

Para solucionar esto, se creó una clasificación molecular del cáncer de mama con marcadores subrogados, obtenidos mediante inmunohistoquímica<sup>12</sup>. La inmunohistoquímica detecta la expresión de antígenos en tejidos, mediante el uso de anticuerpos específicos.

La clasificación inmunohistoquímica del cáncer de mama se basa en la combinación de los receptores de estrógeno, los receptores de progesterona, HER2 y Ki-67.

La clasificación molecular y la obtenida por inmunohistoquímica no son totalmente superponibles, aunque sí muy similares<sup>13</sup>. Al aplicarla, se debe tener en cuenta que algunos tumores *basal-like* no muestran el inmunofenotipo de triple negativo. Y por ejemplo, tampoco todos los tumores HER-2 por inmunohistoquímica pertenecen al subtipo HER-2 + *enriched*.

Los documentos de consenso de la Conferencia de Saint Gallen, que se resumen a continuación, establecen que la identificación de los subtipos intrínsecos es más precisa cuando se realiza a partir de técnicas moleculares, pero cuando éstas no están disponibles, se puede obtener una clasificación subrogada mediante inmunohistoquímica determinando el receptor de estrógenos (RE), receptor de progesterona (RP) , Ki-67 y HER2, confirmado éste último mediante hibridación in situ.

La evolución de la clasificación subrogada de los subtipos intrínsecos de cáncer de mama, consensuada en las últimas Conferencias de Saint Gallen, ha sido la siguiente:

- *Consenso de Saint Gallen del año 2009*<sup>14</sup>:

Se aconsejó el uso de la clasificación subrogada del cáncer de mama y se recomendó el uso de marcadores de proliferación como Ki-67, para determinar el tratamiento óptimo en el cáncer de mama en estadio inicial, sin definir un punto de corte para este fin. Se reconoció el valor pronóstico y predictivo de respuesta de Ki-67.

- *Consenso de Saint Gallen del año 2011*<sup>15</sup>:

Se incluyó el punto de corte de Ki-67 < 14% para distinguir los tumores Luminal A y B-like, basándose en los resultados obtenidos por Cheang et al<sup>16</sup>, que establecían el punto de corte en 13,25%. El objetivo de este estudio fue encontrar un punto de corte óptimo de Ki-67 para distinguir los tumores Luminal A y B-like HER-2 negativos mediante inmunohistoquímica, equivalente a los perfiles de expresión génica. El mejor punto de corte de Ki-67 fue 13,25%, con una sensibilidad del 72% y especificidad del 77%.

Los tumores Luminal B se asocian a un riesgo 1,5 veces mayor de recidiva o muerte por cáncer de mama que los tipos Luminal A, independientemente de la afectación axilar, de ahí la importancia de diferenciar ambos grupos<sup>16</sup>.

- *Consenso de Saint Gallen del año 2013*<sup>17</sup>:

Se incluyó el punto de corte de  $\geq 20\%$  del receptor de progesterona para diferenciar los tipos Luminal A y B-like, basándose en los resultados obtenidos en el estudio de Prat et al<sup>18</sup>. Según este estudio, los tumores Luminal B-like, asociados a un peor pronóstico que los Luminal A, se relacionan con una menor expresión del receptor de progesterona.

También se reafirmó la importancia de Ki-67 para decidir la administración o no de quimioterapia, de manera individualizada, pero respecto al punto de corte para distinguir entre los tumores Luminal A y B, quedó manifiesta la controversia existente<sup>19</sup>. La mayoría de expertos votaron esta vez un valor de Ki-67  $> 20\%$  como alto, para distinguir entre luminal A y B-like<sup>20,21</sup>, mientras que otros votaron puntos de corte más bajos de Ki-67, a causa del riesgo de infratratar a los pacientes con tumores de tipo Luminal. A pesar de ello, la clasificación no se modificó y se mantuvo el punto de corte del 14% establecido en 2011.

- *Consenso de Saint Gallen del año 2015*<sup>11</sup>:

La mayoría de expertos votaron un punto de corte comprendido entre 20 - 29% para considerar Ki-67 alto y distinguir los tumores Luminal A y B-like, pero a pesar de ello, no se modificó la clasificación previa.

Cuadro 3. Clasificación inmunohistoquímica del cáncer de mama consensuada en las conferencias de Saint Gallen de 2011 y 2013.

Clasificación de Saint Gallen 2011 <sup>15</sup>	Clasificación de Saint Gallen 2013 <sup>17</sup>
<u>Luminal A -like:</u> RE y/o RP + HER2 - Ki-67 < 14%	<u>Luminal A -like:</u> RE + RP + ≥ 20% HER2 - Ki-67 < 14%
<u>Luminal B -like:</u> <u>HER2-</u> RE y/o RP + HER2- Ki-67 ≥ 14%	<u>Luminal B -like:</u> <u>HER2-</u> RE + HER2- Al menos uno de ellos: Ki-67 ≥ 14% RP - o + < 20%
<u>HER2+</u> RE y/o RP + HER2+	<u>HER2+</u> RE + HER2+ Cualquier Ki-67 y RP
<u>HER2 positivo:</u> RE y RP - HER2+	<u>HER2 positivo:</u> RE y RP - HER2+
<u>Triple negativo:</u> RE, RP y HER2 -	<u>Triple negativo:</u> RE, RP y HER2 -

### 1.3. Estadaje del cáncer de mama

El sistema TNM es el principal método de estadificación del cáncer de mama y ha sido aceptado por la *Union for International Cancer Control* (UICC) y por el *American Joint Committee on Cancer* (AJCC).

Se basa en la valoración de tres parámetros: el tamaño del tumor primario (T), el grado de diseminación a los ganglios linfáticos regionales (N) y la presencia de metástasis a distancia (M).

Desde el año 2009 se utiliza la 7<sup>a</sup> edición de la clasificación TNM, que se resume en los siguientes cuadros<sup>22</sup>:

Cuadro 4. Clasificación clínica TNM (séptima edición)<sup>22</sup>.

<b>T- Tumor primario:</b>	<b>N- Ganglios linfáticos regionales:</b>	<b>M- Metástasis a distancia:</b>
<p><b>Tx:</b> No puede ser valorado.</p> <p><b>T0:</b> No evidencia de tumor primario.</p> <p><b>Tis:</b> Carcinoma in situ.</p> <p>    Tis (DCIS): Carcinoma ductal in situ.</p> <p>    Tis (LCIS): Carcinoma lobulillar in situ.</p> <p>    Tis (Paget): Enfermedad de Paget en pezón.</p> <p><b>T1:</b> <math>\leq 2</math> cm.</p> <p>    T1mi: Microinvasión <math>\leq 0,1</math> cm.</p> <p>    T1a: <math>&gt; 0,1</math> y <math>\leq 0,5</math> cm.</p> <p>    T1b: <math>&gt; 0,5</math> y <math>\leq 1</math> cm.</p> <p>    T1c: <math>&gt; 1</math> y <math>\leq 2</math> cm.</p> <p><b>T2:</b> <math>&gt; 2</math> y <math>\leq 5</math> cm.</p> <p><b>T3:</b> <math>&gt; 5</math> cm.</p> <p><b>T4:</b> Infiltración de pared costal o piel.</p> <p>    T4a: Pared costal.</p> <p>    T4b: Ulceración, nódulos satélite o edema de piel.</p> <p>    T4c: 4a + 4b.</p> <p>    T4d: Carcinoma inflamatorio.</p>	<p><b>Nx:</b> Ganglios no valorables.</p> <p><b>N0:</b> No metástasis ganglionares.</p> <p><b>N1:</b> Metástasis móviles ipsilaterales en niveles I y II axilar.</p> <p><b>N2:</b> Metástasis fijas ipsilaterales en niveles I y II axilar o metástasis en mamaria interna en ausencia de metástasis axilares.</p> <p>    N2a: Metástasis axilares fijas.</p> <p>    N2b: Metástasis en mamaria interna.</p> <p><b>N3:</b></p> <p>        N3a: Metástasis en ganglios infraclaviculares.</p> <p>        N3b: Metástasis en ganglios de mamaria interna y niveles I y II axilares.</p> <p>        N3c: Metástasis en ganglios supraclaviciares.</p>	<p><b>M0:</b> No metástasis a distancia.</p> <p><b>M1:</b> Metástasis a distancia.</p>

Cuadro 5. Clasificación patológica TNM (séptima edición)<sup>22</sup>.

**pT- Tumor primario:**

Las categorías pT equivalen a las categorías T de la clasificación clínica.

**pN- Ganglios linfáticos regionales:**

pNx: Ganglios no valorables.

pN0: No metástasis ganglionares.

pN1: pN1mi: Micrometástasis.

pN1a: Metástasis en 1-3 ganglios axilares.

pN1b: Metástasis en ganglios de mama interna detectadas mediante biopsia de ganglio centinela.

pN1c: Metástasis en 1-3 ganglios axilares + metástasis en mama interna.

pN2: pN2a: Metástasis en 4-9 ganglios axilares.

pN2b: Metástasis en ganglios de mama interna detectadas clínicamente, en ausencia de metástasis axilares.

pN3: pN3a: Metástasis en 10 o más ganglios axilares o metástasis infraclaviculares.

pN3b: Metástasis en mama interna detectadas clínicamente + metástasis axilares o metástasis en 3 o más ganglios axilares + en mama interna detectadas con biopsia de ganglio centinela.

pN3c: Metástasis en ganglios supraclaviculares ipsilaterales.

Cuadro 6. Estadios según la clasificación TNM (séptima edición)<sup>22</sup>.

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

## 1.4. Índice de proliferación Ki-67

### 1.4.1. Historia

En 1983 Gerdes et al<sup>23</sup>, describieron un anticuerpo monoclonal que se unía a un antígeno nuclear de una línea celular derivada del linfoma de Hodgkin, la línea L428, al cual denominaron anticuerpo Ki-67. El nombre derivaba de la ciudad donde se descubrió (Kiel) y el número original de la clona. El mismo autor identificó en 1991 el antígeno al que se unía éste anticuerpo monoclonal, como una proteína nuclear no formadora de histonas, y le otorgó el nombre de antígeno Ki-67.

En 1993 Schlüter et al<sup>24</sup>, lograron secuenciar el antígeno nuclear Ki-67 por completo, describiendo dos isoformas de la proteína, de 345 y 395 kD de peso molecular respectivamente. En la actualidad, hay evidencia de que pueden existir más isoformas de Ki-67, además de las dos descritas inicialmente.

Posteriormente, en 1996 se secuenció el locus del gen que codifica esta proteína, situado en el brazo largo del cromosoma 10 (10q25)<sup>24</sup>.

### 1.4.2. Función de Ki-67 en el tejido mamario normal y patológico

El antígeno Ki-67 está presente en el núcleo celular durante las fases G1, S, G2 y mitosis del ciclo celular. Las células en fase G0 no lo expresan.

Además, la intensidad de su expresión varía a lo largo del ciclo celular: Los niveles de Ki-67 son bajos en G1 y la fase precoz S y van aumentando progresivamente hasta alcanzar su nivel máximo durante la fase de mitosis.

Por ello desde su descubrimiento, su expresión se ha correlacionado con la fracción celular en fase de proliferación, utilizándose como un marcador de ésta. A pesar de ello, actualmente todavía se desconoce cuál es el papel exacto que desempeña Ki-67 durante dicha proliferación celular.

Se estima que la vida media de la proteína Ki-67 es de 60 - 90 minutos y la pueden expresar tanto las células normales como las tumorales. En las células del tejido

mamario normal, se expresa en porcentajes muy bajos, inferiores al 3% y un hallazgo interesante es la ausencia de expresión de Ki-67 en las células no tumorales con receptores de estrógeno positivo<sup>24,25</sup>. Esta distinción respecto a los receptores hormonales no ocurre en las células tumorales. También se ha descrito correlación entre el aumento de expresión de Ki-67 y una mayor densidad mamaria<sup>9</sup>.

Recientemente se han relacionado los niveles de Ki-67 con la fase del ciclo menstrual y se cree que estos podrían aumentar durante la fase lútea en tumores que expresan receptores hormonales<sup>26</sup>. En esta fase del ciclo se produce un pico de estrógenos y progesterona y en el tejido mamario normal se produce un aumento de los fenómenos proliferativos. Este aspecto podría suponer una limitación para la estandarización de puntos de corte de Ki-67 en pacientes premenopáusicas.

#### 1. 4. 3. Técnicas para la determinación de Ki-67

La técnica más extendida para la determinación del índice de proliferación Ki-67 es la inmunohistoquímica y su valor vendrá dado por el porcentaje de células tumorales marcadas por el anticuerpo específico a nivel nuclear.

Durante los primeros años, se empleaba para su detección el anticuerpo monoclonal Ki-67, que podía utilizarse únicamente en muestras de tejidos congelados y no en tejidos fijados en parafina.

Debido a ello, el anticuerpo Ki-67 ha sido progresivamente sustituido por otros anticuerpos que sí pueden utilizarse en tejidos fijados en parafina como MIB1, SP6, MM1, 30-9 y IR/IS626. El anticuerpo empleado con más frecuencia en los estudios publicados en los últimos años es MIB1.

En la mayoría de centros, es el anatomo-patólogo quien lleva a cabo el recuento del número de células tumorales que expresan Ki-67, marcadas con el anticuerpo monoclonal. Existen también sistemas que realizan esta lectura de manera automática, desarrollados con el objetivo de estandarizar el proceso, pero no están exentos de potenciales errores, como la inclusión en el conteo de células no tumorales.

Una de las principales ventajas de la determinación de Ki-67 mediante técnicas de inmunohistoquímica es su bajo coste, lo que la convierte en una prueba asequible para la mayoría de centros.

#### 1. 4. 4. Valor pronóstico de Ki-67 en cáncer de mama

La proliferación tumoral es uno de los principales factores pronósticos en cáncer de mama y una de las formas más comunes de medirla en la práctica clínica es mediante la determinación por inmunohistoquímica de Ki-67.

Pero además de Ki-67, existen otros parámetros relacionados con la proliferación tumoral como el índice de actividad mitótica, la fracción celular en fase S, el índice de timidina y el antígeno nuclear de células proliferativas (PCNA). Todos ellos tienen valor pronóstico y no se han encontrado grandes diferencias al compararlos<sup>27,28</sup>.

La mayoría de estudios realizados con el objetivo de analizar el valor pronóstico de Ki-67 son retrospectivos e incluyen grupos heterogéneos de pacientes. A pesar de estas limitaciones muchos de éstos han demostrado que valores altos de Ki-67 se correlacionan con una peor supervivencia libre de enfermedad<sup>9,24,29</sup> y dos metaanálisis publicados en 2008 y 2015 concluyeron que Ki-67 es un factor pronóstico independiente de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global en cáncer de mama, tanto en pacientes con ganglios positivos como negativos<sup>28,30</sup>.

Los tumores con mayor expresión de Ki-67, presentan una mayor incidencia de recurrencias locales y en los casos en los que se produzca una recidiva local ipsilateral, un valor alto de Ki-67 en la recidiva también se ha asociado con una menor supervivencia libre de metástasis a distancia<sup>31,32,33</sup>.

Los valores elevados de Ki-67 se han asociado no solamente con una peor supervivencia libre de enfermedad, sino también con un menor tiempo hasta la recidiva, incrementando el riesgo de metástasis a distancia en los dos primeros años tras la cirugía<sup>34,35,36</sup>.

En pacientes metastásicos, un índice de proliferación Ki-67 elevado en el tumor primario, disminuye el tiempo de supervivencia global tras la recurrencia<sup>37,38,39</sup>. Algunos estudios, relacionan los valores iniciales altos de Ki-67 con una mayor prevalencia de metástasis viscerales (cerebrales o hepáticas) en lugar de óseas<sup>38,40</sup>.

- *Valor predictivo y pronóstico en quimioterapia neoadyuvante:*

La presencia de porcentajes altos del índice de proliferación Ki-67 se asocia claramente a una mejor respuesta a quimioterapia neoadyuvante y una mayor probabilidad de obtener una respuesta patológica completa en la mayoría de publicaciones<sup>24,41,42,43,44</sup>. Queda por definir en qué subgrupos de pacientes actúa Ki-67 como factor predictivo independiente de respuesta ya que, mientras que algunos estudios afirman que Ki-67 tiene un mayor valor predictivo en tumores que expresan receptores hormonales<sup>45</sup>, otros afirman lo contrario<sup>46</sup>; y algo similar ocurre al analizar su valor predictivo respecto a la sobreexpresión o no de HER2<sup>41,46</sup>.

Por otra parte, los cambios tempranos que experimenta Ki-67 durante la terapia primaria, también se han asociado con la probabilidad de respuesta al tratamiento. A lo largo de los ciclos de quimioterapia se suele producir una disminución del índice tumoral Ki-67, debida principalmente a la apoptosis de las células con proliferación activa. Al aplicar hormonoterapia primaria, la disminución de Ki-67 a las dos semanas de tratamiento, se correlaciona con una mayor tasa de respuesta y a su vez con una mejor supervivencia en ese grupo según los resultados obtenidos en el ensayo IMPACT. Esto podría ser de utilidad para comparar la eficacia de diferentes fármacos de manera precoz y seleccionar la terapia óptima en cada subgrupo de pacientes<sup>24,47</sup>. El porcentaje de reducción de Ki-67 en las fases iniciales, sería un parámetro útil para predecir el beneficio de un tratamiento.

Además, en aquellos casos en los que no se consigue una respuesta patológica completa, el valor de Ki-67 en el tumor residual se correlaciona con la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global. La obtención de valores bajos de Ki-67

en el tumor residual, tras quimioterapia neoadyuvante, se asocia a una mejor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global, a pesar de no haber obtenido una respuesta patológica completa<sup>48,24</sup>. Y por otra parte, el aumento de Ki-67 al final del tratamiento, se asocia a una peor supervivencia libre de enfermedad<sup>48</sup>.

No está claro a partir de qué valor de Ki-67 en el tumor residual existiría beneficio respecto a la supervivencia. Algunas publicaciones encuentran significación estadística con porcentajes de Ki-67 inferiores al 20%<sup>48,49</sup> y otras con porcentajes menores al 10% y/o con una disminución de su valor superior al 25%<sup>24</sup>.

Algunos estudios afirman que en los casos en que no se obtiene una respuesta patológica completa, la expresión de Ki-67 en el tumor residual predice mejor la supervivencia libre de enfermedad, que el valor de Ki-67 previo al inicio de la quimioterapia primaria, sobre todo en tumores con receptores hormonales positivos. En estos, un Ki-67 residual menor o igual al 15% equivaldría a la obtención de una respuesta patológica completa<sup>50,51</sup>.

#### *- Utilidad clínica de Ki-67 como factor pronóstico:*

La Conferencia de Consenso de Saint Gallen en 2015 concluyó que actualmente no existen dudas respecto al valor pronóstico de Ki-67 en cáncer de mama y de su utilidad para predecir el beneficio de añadir tratamiento con quimioterapia u hormonoterapia<sup>11</sup>. Ki-67 puede ser utilizado como factor pronóstico en subgrupos definidos de cáncer de mama o formando parte de un panel en combinación con otros biomarcadores como los receptores hormonales o HER2<sup>47</sup>.

Sin embargo, las guías de la *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) y la *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) no aconsejan su determinación rutinaria como marcador pronóstico, probablemente debido a la falta de estandarización en su determinación, interpretación y punto de corte<sup>52,53</sup>.

A pesar de ello, Ki-67 es determinado de manera casi sistemática en muchos centros, ante el diagnóstico de carcinoma infiltrante de mama<sup>10</sup>.

#### 1. 4. 5. Limitaciones de Ki-67 como factor pronóstico

Los principales aspectos que limitan el uso de Ki-67 como factor pronóstico en la práctica clínica son:

##### 1. Ausencia de estandarización de la técnica empleada para su determinación:

Cuando se utilizan las técnicas de inmunohistoquímica, existen una serie de variables preanalíticas y analíticas que pueden afectar al resultado obtenido, como son<sup>54</sup>:

- Tiempo de isquemia y de fijación.
- Tipo de fijación.
- Tratamiento del tejido (decalcificación,...).
- Controles internos y externos.
- Adecuación de la muestra obtenida para ser valorada.
- Tipo de anticuerpo utilizado.
- Tipo de control interno y externo.

Cada laboratorio utiliza un tipo diferente de anticuerpo, diferentes técnicas y distintos protocolos de recuento, lo que conlleva una baja reproductibilidad entre centros y dificulta la comparación de los resultados obtenidos. No hay consenso respecto al número mínimo de células a contar, ni respecto a la zona del tumor donde debe evaluarse. Algunos laboratorios miden Ki-67 en las zonas de máxima concentración (los denominados *hot spots*), mientras que otros combinan campos con diferentes intensidades<sup>55</sup>.

##### 2. Ausencia de un punto de corte óptimo:

Una de las principales limitaciones de Ki-67 es la imposibilidad de encontrar un punto de corte adecuado desde el punto de vista pronóstico, debido a que sigue una distribución continua. Además, las limitaciones preanalíticas y analíticas para estandarizar su determinación, hacen que sólo se puedan adoptar puntos de corte, conociendo los valores del laboratorio local<sup>11</sup>.

La elección del punto de corte dependerá del objetivo clínico<sup>29</sup>:

- Si se busca un punto de corte que discrimine a aquellos pacientes que no se beneficiarían de quimioterapia adyuvante, elegiremos puntos de corte bajos, entorno al 10% para evitar el sobretratamiento. Sin embargo, si queremos saber qué pacientes serían quimiosensibles, será de mayor utilidad un punto más elevado, entorno al 25%<sup>29,56</sup>.
- Para distinguir los tumores Luminal A y Luminal B HER2 negativo, la Conferencia de Saint Gallen de 2011 propuso utilizar un punto de corte de Ki-67 del 14%, pero la variabilidad interobservador puede llegar a ser hasta del 7%, pudiendo llevar a infratratar o sobretratar pacientes<sup>57</sup>. Para solucionar esto, en aquellos casos en los que el valor de Ki-67 se sitúe entorno al 14%, algunos autores proponen tener en cuenta también el índice mitótico, con el objetivo de discernir aquellos pacientes con alta o baja tasa de proliferación<sup>57</sup>.

Convertir una variable continua en dicotómica, puede llevar a una pérdida de poder del biomarcador. Los puntos de corte de Ki-67 como factor pronóstico, más utilizados en los estudios publicados son 10 y 20%<sup>44</sup>, pero otros estudios encuentran resultados significativos con valores muy diferentes<sup>30,58</sup>.

Una alternativa a la elección de un único punto de corte, sería escoger un "área gris" comprendida entre dos puntos. De esta manera, los tumores con valores de Ki-67 comprendidos en el área gris, precisarían de la valoración de otros parámetros para decidir si se aplica o no quimioterapia. En Saint Gallen se consensuó administrar quimioterapia y hormonoterapia a aquellos tumores con receptores hormonales positivos y Ki-67 alto (superior al 30%) y no dar quimioterapia en caso de Ki-67 bajo ( $\leq 15\%$ ). Los valores intermedios de Ki-67, comprendidos entre 16 y 30%, no serían decisivos en la elección del tipo de terapia adyuvante<sup>44</sup>.

#### **1. 4. 6. Recomendaciones del Grupo Internacional de Ki-67 en cáncer de mama**

En Marzo de 2010 se creó en Londres el "Grupo Internacional de Ki-67 en cáncer de mama", constituido por un panel de investigadores internacionales, con el objetivo de elaborar una serie de recomendaciones respecto al manejo de Ki-67.

Este grupo enfatizó el potencial pronóstico de Ki-67 y también su papel como predictor de respuesta a quimioterapia y como biomarcador dinámico de respuesta al tratamiento.

Además, elaboraron una serie de recomendaciones para unificar los criterios de su determinación, intentando reducir de este modo la variabilidad entre laboratorios, que constituye una de las principales limitaciones para su uso como marcador pronóstico.

[Las recomendaciones para la validación analítica de Ki-67 publicadas por el Grupo Internacional de Ki-67 son las siguientes<sup>47</sup>:](#)

##### **1. Preanalíticas:**

- Muestra: son aceptables tanto las biopsias con aguja gruesa como las secciones de biopsias escisionales. Si se van a comparar, utilizar el mismo tipo de muestra.
- El uso de micro-arrays tisulares es aceptable en el contexto de ensayos o estudios epidemiológicos.
- La fijación en formol debería seguir las mismas guías que las publicadas para los receptores esteroideos.
- Una vez preparadas, las secciones tisulares no deben ser almacenadas a temperatura ambiente durante más de 14 días.

##### **2. Analíticas:**

- Se deberían incluir controles positivos y negativos.
- Se requiere la recuperación del antígeno. El método más frecuente es mediante microondas.
- El anticuerpo validado con más frecuencia en los estudios es MIB1.

### *3. Interpretación y puntuación:*

- Seleccionar al menos tres campos de gran aumento (x40 objetivos) como representación de la muestra.
- Para evaluar el valor pronóstico, el margen invasivo del tumor debería ser valorado.
- Para comparar la respuesta a fármacos entre muestras de biopsia y de escisión quirúrgica, la valoración de ésta última debería realizarse a lo largo de todo el tumor.
- Los datos de los "puntos calientes" deberían ser incluidos en la puntuación total
- Sólo la tinción nuclear se considera positiva. La intensidad de dicha tinción no es relevante.
- El conteo debería incluir como mínimo 500 células malignas invasivas (y preferiblemente al menos 1000 células).
- Existen métodos de análisis de Ki-67 por imagen, que están pendientes de validar en la práctica clínica.

### *4. Manejo de los datos:*

- El índice Ki-67 debería expresar el porcentaje de células con tinción positiva entre el total de células invasivas valoradas.
- El análisis estadístico debería tener en cuenta la distribución normal que sigue habitualmente Ki-67.
- El parámetro más apropiado para comparar estudios de eficacia de tratamientos, es el porcentaje de disminución de células que expresan Ki-67.
- El parámetro más apropiado para valorar riesgo de recurrencia es la proporción de células con Ki-67 positivo durante el tratamiento.
- Los puntos de corte como factor pronóstico, predictivo o de monitorización sólo deberán ser aplicados si los resultados de nuestra práctica local han sido validados respecto a aquellos estudios publicados al respecto.

## 1.5. Factores pronósticos en cáncer de mama no metastásico y su relación con Ki-67

### 1.5.1. Definición de factor pronóstico

Se consideran factores pronósticos a todos aquellos factores que proporcionan información sobre la evolución del paciente, sobre todo respecto a la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global, independientemente del tipo de intervención o tratamiento recibido<sup>59,29</sup>.

La situación ideal para aplicar este concepto, sería la de una población que no recibiera tratamiento sistémico. Pero actualmente es casi imposible realizar estudios que incluyan exclusivamente a pacientes con cáncer de mama sin terapia sistémica.

Se considera que un factor pronóstico es útil desde el punto de vista clínico, cuando puede ser medido de manera reproducible y proporciona información independiente que no puede ser obtenida más fácilmente utilizando otro factor.

Estos factores deben tener valor pronóstico independiente, demostrado por ejemplo a través del análisis estadístico multivariante.

Los factores pronósticos en cáncer de mama son fundamentales en la toma de decisiones respecto al tipo de terapia adyuvante y la agresividad de la misma<sup>29</sup>.

### 1.5.2. Edad

La edad del paciente con cáncer de mama se ha relacionado con la agresividad tumoral y el pronóstico del mismo, sobre todo en los grupos de edades extremas.

#### - Cáncer de mama en pacientes jóvenes:

El 2,5 - 4,8% de los cánceres de mama se dan en pacientes con una edad inferior a 35 años y el 6,5 - 7% en menores de 40 años<sup>60,61,62</sup>. El cáncer de mama en pacientes jóvenes (menos de 35-40 años), suele presentar una menor expresión de receptores hormonales, mayor grado histológico y mayor expresión de Ki-67 y HER-2<sup>60,61,62,63,64,65</sup>. Estas características hacen que se comporten como tumores más agresivos, con mayor

tamaño y afectación ganglionar en el momento del diagnóstico. Además, la edad inferior a 35-40 años se considera un factor predictivo independiente de recidiva local cuando se realiza una cirugía conservadora.

Algunos estudios encuentran asociación con una peor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global, aunque existe controversia al respecto<sup>61,62,65,66</sup>.

- *Cáncer de mama en pacientes ancianas:*

La incidencia de cáncer de mama en pacientes ancianas está aumentando debido al envejecimiento progresivo de la población. Se estima que en el año 2030, el 20% de la población en los países desarrollados tendrá más de 75 años<sup>67</sup>. En la actualidad, más del 30% de los cánceres de mama diagnosticados en nuestro país se dan en pacientes mayores de 70 años.

Clásicamente se ha asociado la edad avanzada ( $\geq 70$  - 75 años) con formas tumorales menos agresivas desde el punto de vista molecular, presentando una mayor expresión de receptores hormonales y menor de HER-2 y Ki-67<sup>63,68</sup>.

Sin embargo, en la práctica diaria, no es extraño encontrar casos con un gran tamaño tumoral, afectación ganglionar e incluso metástasis a distancia, debido a un retraso en la consulta por este problema.

### 1.5.3. Historia reproductiva

- *Paridad:*

Clasicamente se ha considerado la paridad como un factor protector frente al cáncer de mama, sobre todo de tipo Luminal, debido a que durante el embarazo las células epiteliales indiferenciadas mamarias se convierten en células epiteliales maduras, más resistente a la carcinogénesis<sup>69</sup>.

La relación entre la paridad y los diferentes subtipos moleculares de cáncer, no está clara<sup>70</sup>. Se cree que la gestación protege frente a aquellos tumores que expresan receptores hormonales y se ha relacionado con un aumento en la proporción de tumores triple negativos, aunque su asociación con la expresión de HER-2 no está clara. Además, según algunos estudios, parece que la paridad podría proteger de los

tumores con Ki-67 elevado: la nuliparidad se asociaría a una mayor frecuencia de tumores de tipo Luminal B con HER-2 negativo<sup>70</sup>.

- *Premenopausia:*

Al comparar los cánceres de mama en pacientes premenopáusicas y postmenopáusicas, algunos estudios han encontrado asociación estadística entre la premenopausia y una menor expresión de receptores hormonales, mayor Ki-67 y peor supervivencia<sup>71</sup>.

#### 1.5.4. Índice de masa corporal

El índice de masa corporal (IMC) se calcula dividiendo el peso en kilos por el cuadrado de la talla en metros ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera sobrepeso un IMC igual o superior a  $25 \text{ Kg}/\text{m}^2$  y obesidad un IMC igual o superior a  $30 \text{ Kg}/\text{m}^2$ .

La prevalencia mundial de la obesidad se ha multiplicado por más de dos desde 1980 hasta 2014. Según los datos de la OMS, en el año 2014 el 39% de los adultos (un 38% de los hombres y un 40% de las mujeres) tenían sobrepeso<sup>72</sup>.

En España, los datos obtenidos por la Encuesta Nacional de Salud publicada en 2013 por el Instituto Nacional de Estadística, fueron los siguientes: Un 18% de los hombres y un 16% de las mujeres adultas padecían obesidad. El sobrepeso también afectaba más a los hombres, presentándolo un 45,1% de los hombres y un 28,1% de las mujeres<sup>73</sup>.

Diversos estudios han demostrado un incremento de la incidencia de cáncer de mama en relación con el índice de masa corporal, sobre todo durante la postmenopausia<sup>74,75</sup>.

Además, las pacientes postmenopáusicas con obesidad presentan un mayor riesgo de recurrencia y menor supervivencia por cáncer de mama. Esto podría deberse por un lado, al aumento de los estrógenos circulantes en sangre y por otro a la posible asociación entre la obesidad y subtipos tumorales de comportamiento más agresivo<sup>76</sup>.

Algunos estudios encuentran asociación entre el aumento de IMC y carcinomas con una mayor expresión de Ki-67, siendo más frecuentes los tumores de tipo Luminal B (Ki-67  $\geq 14\%$ ), en lugar de luminal A<sup>77,78</sup>.

Y un metaanálisis publicado en el año 2013, concluyó que el índice de masa corporal es un factor de riesgo independiente de tumores triple negativos, sobre todo en mujeres premenopáusicas<sup>79</sup>.

### 1.5.5. Tipo histológico

Como se ha expuesto en el apartado de la clasificación histológica del cáncer de mama, los dos principales tipos de cáncer de mama (carcinomas ductales invasivos y carcinomas lobulillares invasivos), pueden presentar una serie de diferencias que repercutirán en el pronóstico.

El carcinoma lobulillar invasivo supone el 10-15% de los cánceres de mama diagnosticados. Al compararlo con el carcinoma ductal, algunos estudios refieren que el carcinoma lobulillar presenta un comportamiento menos agresivo<sup>80</sup>, estadio más bajo en el momento del diagnóstico, mayor incidencia de multicentricidad y en caso de metástasis, éstas aparecen con más frecuencia en meninges, gastrointestinales, pleura, peritoneo y tracto genital femenino<sup>81</sup>. Además, el carcinoma lobulillar se ha asociado a valores más bajos de Ki-67<sup>9,34</sup>.

A pesar de que en la actualidad, desde el punto de vista pronóstico, la clasificación histológica del cáncer de mama ha perdido relevancia, todavía es importante en algunos tipos poco frecuentes de tumores, permitiéndonos distinguir:

- *Carcinomas asociados a mejor pronóstico*: carcinoma tubular, mucinoso, medular y adenoide quístico.
- *Carcinomas asociados a peor pronóstico*: carcinoma con células en anillo de sello, medular atípico, metaplásicos.

### 1.5.6. Tamaño tumoral

Se trata de uno de los factores pronóstico clásicos en el cáncer de mama.

En el sistema de estadiaje TNM, el tamaño tumoral de los carcinomas multifocales o multicéntricos corresponde al diámetro máximo del foco tumoral invasivo de mayor tamaño.

Un mayor tamaño tumoral se ha correlacionado con un peor pronóstico, perfil molecular más agresivo y una mayor expresión de Ki-67<sup>10,24,34,82,83,84,85,86</sup>.

### Índice pronóstico de Nottingham (IPN):

Utilizado por primera vez en 1982, combina los tres factores pronósticos clásicos en cáncer de mama: tamaño tumoral, afectación ganglionar y grado histológico, utilizando la siguiente fórmula<sup>87</sup>:

$$\text{IPN} = \text{Afectación ganglionar}^*(1-3) + \text{Grado histológico (1-3)} + \text{tamaño tumoral (cm)} \times 0,2.$$

(Afectación ganglionar\*: 1 = no ganglios positivos, 2 = 1 a 3 ganglios positivos, 3 = 4 ó más ganglios positivos)

### 1.5.7. Afectación ganglionar

La afectación ganglionar está considerada como el principal factor pronóstico en el cáncer de mama<sup>85</sup>.

El estudio inicial de la afectación ganglionar en el cáncer de mama se realiza mediante la exploración física, que debe incluir la palpación de los territorios axilares y supra e infraclaviculares; y se complementa con la realización de una ecografía axilar.

La ecografía axilar es la técnica de imagen de elección para la valoración ganglionar. Algunos de los criterios ecográficos de sospecha de afectación ganglionar son<sup>88</sup>:

morfología redondeada o desestructurada, corteza engrosada o hipoecoica, centro obliterado (hipodenso), signos de rotura capsular y aumento de los vasos transcapsulares con Doppler.

Cuando existe sospecha ecográfica o clínica de afectación ganglionar, ésta es confirmada mediante la realización de una punción aspirativa con aguja fina (PAAF) o una biopsia con aguja gruesa (BAG). En aquellos casos con macrometástasis ganglionares axilares confirmadas, se lleva a cabo una linfadenectomía axilar, en el mismo tiempo quirúrgico que la cirugía mamaria, habitualmente tras terapia neoadyuvante.

Si no existe sospecha de afectación ganglionar o ésta no se confirma al realizar la punción, actualmente se realiza la técnica de la ***Biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC)***:

- La BSGC es la técnica de elección para el estadiaje de los ganglios regionales en aquellos cánceres de mama precoces, con axila clínicamente negativa.
- Se basa en la inyección de un radiotrazador (Tecnecio-99) en el intersticio, que migrará hasta los ganglios linfáticos y fue descrita por Giuliano en 1994<sup>89</sup>.

Existen fundamentalmente dos métodos para hacer el estudio anatomo - patológico de los ganglios centinela:

- *Método convencional*: Estudia los ganglios mediante la obtención de improntas y bloques teñidos con hematoxilina-eosina.
- *One Step Nucleic acid Amplification (OSNA)*: Método que detecta la cantidad de ARN-m de la citoqueratina 19 presente en los ganglios, mediante PCR. Actualmente se considera la técnica de elección, ya que permite distinguir entre macrometástasis, micrometástasis y células tumorales aisladas en el estudio intraoperatorio:
  - Macrometástasis:  $\geq 5000$  copias de ARN-m.
  - Micrometástasis:  $\geq 250$  a  $< 5000$  copias de ARN-m.
  - Células tumorales aisladas:  $>100$  a  $\leq 250$  copias de ARN-m.

Además, el método OSNA, permite utilizar la denominada *carga tumoral total* (suma del número de copias de ARN-m de citoqueratina 19 de todos los ganglios), que es considerada como uno de los factores predictivos más potentes de afectación tumoral axilar<sup>90</sup>.

El documento de consenso de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria de 2013, afirma que la biopsia selectiva de ganglio centinela en carcinoma infiltrante de mama, está indicada en todos aquellos tumores con estadios T1, T2 y T3 con axila clínica, ecográfica y patológicamente negativa. Y la contraindica en casos de carcinoma inflamatorio, verificación preoperatoria de afectación ganglionar o radioterapia axilar previa a dosis de 50 Gy<sup>91</sup>.

Hasta hace poco tiempo, ante el diagnóstico de metástasis en los ganglios centinela, se realizaba de manera rutinaria una linfadenectomía axilar, pero esto ha cambiado en los últimos años:

- A pesar de que la afectación ganglionar sigue siendo el principal factor pronóstico del cáncer de mama, no existe evidencia del valor terapéutico de la linfadenectomía axilar<sup>92</sup>. La principal utilidad de dicha linfadenectomía reside en la obtención de un estadioje ganglionar y su influencia en la planificación del tratamiento adyuvante. Pero la decisión terapéutica cada vez depende menos del estadio axilar y más de otros factores como las características biológicas del tumor.
- Además, gracias a las campañas de prevención y a la mejora de las técnicas de imagen, ha aumentado el porcentaje de cánceres de mama diagnosticados en estadios precoces, con menor probabilidad de afectación axilar. Hasta en el 50-60% de casos en que se realiza BSGC, los únicos ganglios afectados son los centinelas<sup>93</sup>. Cuando se realiza biopsia selectiva de ganglio centinela, la probabilidad de que haya más ganglios (no centinela) con afectación tumoral, además de los centinelas, oscila según los diferentes estudios entre un 43,4% y un 29%<sup>93,94,95</sup>.

- Tampoco se debe olvidar que la linfadenectomía se acompaña de una importante morbilidad asociada (linfedema, dolor, aumento del tiempo de recuperación).

Por ello, en la actualidad se está cuestionando la utilidad de la linfadenectomía axilar y algunos de los últimos estudios publicados y en curso, sobre cáncer de mama, tienen como principal objetivo encontrar aquellos criterios que nos permitirían omitir la realización de esta cirugía axilar, sin que ello repercuta negativamente sobre la supervivencia de los pacientes<sup>92,96</sup>.

#### **Manejo actual de la axila en caso de afectación tumoral del ganglio centinela (GC):**

En caso de *micrometástasis* en el ganglio centinela, no se recomienda la realización de linfadenectomía axilar, al no observarse beneficio respecto a la supervivencia libre de enfermedad ni la supervivencia global<sup>97</sup>.

En caso de *macrometástasis* en el ganglio centinela, estudios recientes sugieren que en algunos casos, la linfadenectomía axilar puede ser evitada:

- En 2011 se publicó el ensayo ACOSOG Z0011<sup>98</sup> (Giuliano et al) que incluía tumores en estadio T1 y T2 con uno o dos ganglios centinela axilares positivos a los que se realizó cirugía conservadora y radioterapia mamaria, irradiando con campos tangenciales el territorio axilar. Con un tiempo de seguimiento medio de 6,3 años, no se encontraron diferencias significativas en la supervivencia libre de enfermedad ni en las tasas de recurrencia axilar.
- El ensayo EORTC-AMAROS<sup>99</sup> incluye tumores en estadio T1 y T2 con ganglio centinela positivo, dividiendo la muestra en dos grupos: linfadenectomía versus radioterapia axilar. Los resultados publicados en 2014 concluyeron que las tasas de recidiva ganglionar eran similares en ambos, siendo mayor la tasa de linfedema en el grupo tratado con linfadenectomía.
- Otros estudios sugieren la utilización de nomogramas para predecir el riesgo de afectación tumoral del resto de ganglios axilares, no centinelas, cuando no

se completa la cirugía axilar con una linfadenectomía. Entre los factores que incluyen estos modelos predictivos destacan: el tamaño de la metástasis ganglionar, el número de ganglios afectos, la expresión de HER-2 y de receptores hormonales, la extensión extracapsular, invasión linfovascular y la carga tumoral total (valorada mediante el método OSNA)<sup>90,93,94,100,101</sup>.

### 1.5.8. Grado histológico combinado de Nottingham

También denominado Índice de Scarff-Bloom-Richardson modificado por Elston-Ellis, se trata de otro de los factores pronósticos clásicos en cáncer de mama<sup>102</sup>.

Se basa en la valoración del grado de diferenciación glandular o tubular, el pleomorfismo nuclear y el índice mitótico. A cada uno de estos parámetros se les otorga una puntuación cuya suma da como resultado el grado histológico.

Los tumores con alto grado histológico (grado 3) se relacionan con un comportamiento más agresivo y una menor supervivencia libre de enfermedad, al contrario que los tumores de grado 1.

Los cánceres de mama de grado histológico 2 suponen alrededor del 40-50% de los casos diagnosticados. El grado 2 incluye a un amplio grupo de tumores con diferente riesgo de recidiva y para su manejo será fundamental el uso de otros factores pronósticos adicionales como Ki-67, entre otros<sup>44,103,104</sup>.

Uno de los parámetros en los que se basa el cálculo del grado histológico es el índice mitótico, que valora la proliferación de las células tumorales. Probablemente debido a ello, el grado histológico es uno de los factores pronósticos que se ha relacionado con más frecuencia con la expresión de Ki-67<sup>24</sup>. Tanto es así que en la Conferencia de Saint Gallen del año 2011 se llegó a recomendar utilizar el grado histológico, como marcador subrogado de proliferación, cuando no se disponga de la determinación de Ki-67, para distinguir los tumores de tipo Luminal A y B<sup>15</sup>.

Sin embargo, en estudios posteriores se ha visto que no existe una equivalencia total entre ambos factores pronósticos y el grado histológico sólo sería equivalente a Ki-67 en los tumores de tipo luminal A y en tumores luminal B HER-2+ y G1. En los tumores triple negativos y HER-2, no se ha encontrado esta equivalencia<sup>105</sup>.

En la reunión de Saint Gallen del año 2013 la mayoría de expertos votaron que un grado histológico 3 no puede sustituir a un Ki-67 alto, para distinguir los carcinomas de mama Luminal A y B<sup>17</sup>.

**Cuadro 7.** Cálculo del Grado histológico combinado de Nottingham según las recomendaciones del Colegio Americano de Patología en 2016<sup>54</sup>.

**1. Diferenciación glandular (acinar) o tubular:**

- 1: >75% del tumor forma estructuras glandulares o tubulares.
- 2: 10-75% del tumor forma estructuras glandulares o tubulares.
- 3: < 10% del tumor forma estructuras glandulares o tubulares.

**2. Pleomorfismo nuclear:**

- 1: Núcleos pequeños ligeramente aumentados de tamaño y cromatina uniforme.
- 2: Células grandes con núcleo grande vesicular y prominente nucleolo y moderada variabilidad de tamaño y forma.
- 3: Núcleo vesiculoso, con prominente nucleolo y forma grande e irregular.

**3. Índice mitótico** (Número de mitosis en 10 campos de gran aumento consecutivos, en la parte con mayor actividad mitótica del tumor):

- 1:  $\leq 3$  mitosis por  $\text{mm}^2$
- 2: 4-7 mitosis por  $\text{mm}^2$
- 3:  $\geq 8$  mitosis por  $\text{mm}^2$

*Grado histológico de Nottingham:* Grado 1: Puntuaciones 3, 4 ó 5.

Grado 2: Puntuaciones 6 ó 7.

Grado 3: Puntuaciones 8 ó 9.

### 1.5.9. Receptores hormonales: Estrógeno y progesterona (RE y RP)

Aproximadamente el 60% de cánceres de mama expresan receptores hormonales.

La expresión de estos receptores es valorada habitualmente mediante técnicas de inmunohistoquímica, considerando como positivas las células que presentan tinción nuclear.

En la conferencia de Saint Gallen de 2009 se consensuó definir como receptor de estrógeno-positivo y receptor de progesterona-positivo a aquellos tumores con al menos un 1% de células inmunorreactivas<sup>14</sup>. Esta definición fue adoptada posteriormente también por las guías de la Asociación Americana de Oncología Clínica (ASCO) y el Colegio Americano de Patología (CAP)<sup>54</sup>.

En los casos con receptores hormonales positivos, es importante indicar el porcentaje de células neoplásicas que los expresan. Y también se puede valorar la intensidad media de dicha expresión (intensidad de la tinción nuclear): + débil, ++ moderada, +++ fuerte. Existen sistemas de puntuación como el Allred score y el H score, que combinan estos parámetros.

Según la clasificación molecular de cáncer de mama, sólo los tumores de tipo Luminal expresan receptores hormonales y éstos se beneficiarán del tratamiento con hormonoterapia, tanto neoadyuvante como tras cirugía, disminuyendo el riesgo de recidiva. La respuesta obtenida con la hormonoterapia será proporcional al porcentaje e intensidad de la expresión de estos receptores.

Los tumores que no expresan receptores hormonales , se suelen asociar a una menor supervivencia libre de enfermedad y un mayor porcentaje de Ki-67<sup>106</sup>.

### 1.5.10. HER-2

HER2 es un receptor de membrana de tipo tirosin-quinasa para el factor de crecimiento epidérmico humano, relacionado con la proliferación celular y codificado por el gen HER2/neu situado en el cromosoma 17. Existe amplificación de este gen y/o sobreexpresión del receptor en el 20 - 25% de tumores infiltrantes de mama. En

aproximadamente el 95% de casos la sobreexpresión de HER2 se correlaciona con una amplificación génica.

La sobreexpresión de HER2 se determina por técnicas de inmunohistoquímica, distinguiéndose cuatro posibles categorías según las recomendaciones de la ASCO y CAP:

**Cuadro 8.** Clasificación de la determinación de la sobreexpresión de HER2 mediante técnicas de inmunohistoquímica según las recomendaciones del Colegio Americano de Patología<sup>107</sup>.

- 0 :** Negativo. No tinción o incompleta o casi imperceptible en  $\leq 10\%$  de células tumorales invasivas
- 1+:** Negativo. Tinción incompleta o casi imperceptible en  $> 10\%$  de células tumorales invasivas.
- 2+:** Indeterminado. Tinción incompleta y/o débil - moderada en  $> 10\%$  de células tumorales invasivas o tinción completa, intensa en  $\leq 10\%$  de células.
- 3+:** Positivo. Tinción completa e intensa en  $> 10\%$  de células tumorales invasivas.

Cuando se obtiene un resultado indeterminado mediante inmunohistoquímica (2+), se aplican técnicas de hibridación in situ, que determinan la presencia o ausencia de amplificación génica. Existen diferentes técnicas de hibridación in situ, según el tipo de sonda empleada para unirse al cromosoma 17, siendo las más utilizadas:

- FISH: sonda inmunofluorescente
- SISH: sonda con un colorante plateado, no fluorescente.
- CISH: sonda cromogénica

La sobreexpresión de HER2 implica un incremento en la actividad biológica del tumor y una evolución desfavorable, asociándose a formas más agresivas, aunque no está clara su relación con Ki-67<sup>108</sup>.

Sin embargo, la existencia de tratamientos quimioterápicos específicos contra este receptor, ha provocado un aumento de la supervivencia de estas pacientes. El fármaco

anti-HER2 más utilizado en nuestro medio es trastuzumab, un anticuerpo monoclonal humanizado que se une al dominio extracelular del receptor HER2.

De acuerdo con las Agencias Reguladoras de Medicamentos, el tratamiento con trastuzumab se debe aplicar únicamente si existe sobreexpresión de HER2 en más del 10% de las células invasivas o existe amplificación génica de HER2/neu.

### 1.5.11. p53

En condiciones normales, p53 es una proteína supresora que regula la división celular, evitando en las células no tumorales la mitosis de células que contienen ADN dañado. Sin embargo, en las células tumorales se produce una mutación en el gen que la codifica y esto lleva una pérdida de su función y una sobreexpresión de p53, que se acumula en los núcleos celulares.

La mutación del gen p53 es la alteración genética más frecuente en el cáncer de mama y se relaciona con formas más agresivas de cáncer de mama, con peor pronóstico en algunos estudios y con mayores tasas de proliferación y Ki-67<sup>109</sup>.

La sobreexpresión de p53 se determina habitualmente mediante técnicas de inmunohistoquímica, indicando si existe o no y el porcentaje de células tumorales que la presentan.

### 1.5.12. Clasificación molecular de cáncer de mama

Los subtipos moleculares de cáncer de mama suelen asociarse a una diferente presentación, evolución, respuesta al tratamiento y patrón de recidiva:

#### *Subtipo Luminal:*

La expresión de receptores hormonales se ha relacionado clásicamente con formas de mejor pronóstico. Pero existen diferencias al comparar los tipos Luminal A y B: Los tumores de tipo Luminal A se asocian a una mayor supervivencia libre de enfermedad mientras que los de tipo Luminal B, que constituyen el grupo más prevalente de cáncer

de mama, suelen asociarse a un mayor tamaño tumoral, afectación ganglionar, grado histológico y sobreexpresión de p53<sup>7,16,64,110</sup>. Ambos tipos se beneficiarán del tratamiento con hormonoterapia.

*Subtipo HER2:*

El pronóstico de los tumores de tipo HER2 ha cambiado sustancialmente desde la introducción como fármaco quimioterápico de tratamientos diana como trastuzumab, reduciéndose de manera significativa el número de recidivas y mejorando también la tasa de respuesta patológica completa en los casos de quimioterapia neoadyuvante<sup>108</sup>.

*Subtipo Triple negativo:*

Los tumores triple negativos se presentan habitualmente como formas agresivas, con altos índices de proliferación celular y afectación ganglionar. A pesar de ser tumores quimiosensibles, con buenas tasas de respuesta a tratamiento, presentan una elevada incidencia de recidivas, sobre todo durante los dos primeros años tras la cirugía<sup>36</sup>.

*IHC4 score:*

El IHC4 score es un test predictor del riesgo de recurrencia en cáncer de mama, basado en un modelo multivariante que utiliza información semicuantitativa obtenida mediante la valoración por inmunohistoquímica de cuatro parámetros: receptor de estrógenos, receptor de progesterona, HER2 y Ki-67. A partir de estos valores, calcula el riesgo de recurrencia, utilizando un algoritmo matemático<sup>45,100</sup>.

Este sistema valora los mismos parámetros que la clasificación molecular subrogada de cáncer de mama, pero la principal diferencia respecto a ésta, es que no los combina de un modo binario (receptor hormonal negativo o positivo, Ki-67 alto o bajo,...), sino a través de una ecuación matemática. A pesar de ello, la sensibilidad de este test está limitada por la falta de estandarización de las técnicas de inmunohistoquímica empleadas en la determinación de cada variable.

### 1.5.13. Invasión linfovascular

Es la invasión de los vasos linfáticos y / o sanguíneos por émbolos tumorales en el área peritumoral.

Los criterios diagnósticos de la invasión linfovascular tumoral aceptados por Colegio Americano de Patología son los siguientes<sup>54,111</sup>:

- La invasión linfovascular puede diagnosticarse fuera de los límites del tumor.  
La localización más habitual es dentro de 1 mm de la periferia del mismo.
- Los émbolos tumorales no siguen exactamente el contorno del espacio donde están, a diferencia de los artefactos por retracción.
- Deben verse núcleos de células endoteliales revistiendo el espacio.
- Los vasos linfáticos se localizan a menudo adyacentes a los vasos sanguíneos, rodeándolos parcialmente.

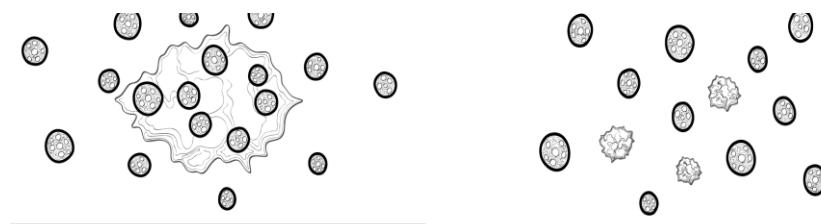
La presencia de invasión linfovascular, incrementa la posibilidad de recurrencia locorregional y de afectación ganglionar, asociándose a una peor supervivencia global y libre de enfermedad<sup>112,113</sup>. Su aparición se ha relacionado con formas tumorales más agresivas, con menor expresión de receptores hormonales y un mayor porcentaje de Ki-67<sup>10,86,114,115</sup>.

### 1.5.14. Carcinoma intraductal asociado

La importancia desde el punto de vista clínico del carcinoma *in situ*, dependerá de su extensión en relación con el tumor infiltrante.

Existen dos posibles definiciones de *componente intraductal extenso*:

- El carcinoma *in situ* supone el  $\geq 25\%$  del área invasiva y está presente también en la periferia del parénquima mamario.
- Hay un área extensa de carcinoma *in situ* asociada a una pequeña área de carcinoma invasivo ( $\leq 10\text{ mm}$ ).



**Figura 2.** Ilustración de las dos posibles definiciones de "componente intraductal extenso"<sup>54</sup>.

La asociación de carcinoma ductal *in situ* a un carcinoma infiltrante, aumenta el riesgo de recidiva local tras cirugía conservadora de mama e incrementa también la tasa de mastectomías<sup>116</sup>.

Los casos de carcinoma infiltrante de mama no asociados a carcinoma *in situ*, parecen originarse a partir del tejido mamario normal. Sin embargo, existe controversia respecto al origen de los casos de carcinoma infiltrante asociado a carcinoma *in situ*, ya que éstos podrían aparecer siguiendo una ruta evolutiva a partir de un carcinoma *in situ*<sup>(18, 216)</sup>.

En algunos estudios se ha observado que los carcinomas ductales infiltrantes asociados a carcinoma ductal *in situ*, presentan un perfil inmunohistoquímico más favorable, con mayor expresión de receptores hormonales, y menor expresión de Ki-67 y HER-2, además de un menor grado histológico, y como consecuencia de ello, se asocian a un mejor pronóstico<sup>116,117,118</sup>.

Por lo tanto, la asociación a carcinoma *in situ*, incrementa por un lado el riesgo de recidiva local, pero por otro parece asociarse a formas tumorales menos agresivas.

### 1.5.15. Multifocalidad y multicentricidad

Aproximadamente un tercio de los cánceres de mama tienen al menos otro foco de carcinoma infiltrante además del principal<sup>119</sup>.

Se denomina multifocalidad a la presencia de múltiples focos de carcinoma infiltrante en el mismo cuadrante y multicentricidad a la presencia de focos tumorales infiltrantes en diferentes cuadrantes de la mama.

Algunos estudios han comparado este tipo de tumores con los unifocales, encontrando sobre todo en los casos de carcinoma multicéntrico, una mayor incidencia de factores de mal pronóstico como la afectación ganglionar o la invasión linfovascular y un mayor tamaño tumoral. Sin embargo, no está clara su asociación a una mayor expresión de Ki-67<sup>120,121</sup>.

Además, la presencia de varios focos tumorales se ha relacionado clásicamente con un incremento del riesgo de recidiva local<sup>122</sup>, aunque éste es menos notable en la actualidad gracias a la mejora de las técnicas de diagnóstico por imagen, que nos permiten realizar una adecuada planificación del tipo de cirugía mamaria.

## 1. 6. Técnicas de diagnóstico por imagen en cáncer de mama

### 1. 6. 1. Mamografía

Es la única técnica recomendada para realizar el cribado poblacional de cáncer de mama, debido a su alta sensibilidad y especificidad, reproductibilidad y bajo coste. Habitualmente se realizan sistemáticamente dos proyecciones, craneocaudal (CC) y oblicuamediolateral (OML), aunque ocasionalmente se pueden añadir proyecciones adicionales para una mejor valoración de las zonas dudosas.

La mamografía presenta una alta sensibilidad de forma global (entorno al 85%), que varía en función de la densidad mamaria, siendo excelente en las mamas grasas<sup>123,124</sup>.

### 1. 6. 2. Ecografía

Se trata de una técnica complementaria a la mamografía y la resonancia. No debe utilizarse como técnica de cribado poblacional ni como técnica diagnóstica de manera aislada. Sin embargo, es la técnica de elección para valorar las adenopatías axilares y también puede ser de gran utilidad en el estudio de mujeres muy jóvenes o gestantes. También es clave como guía en las técnicas de intervencionismo mamario percutáneo. Las principales limitaciones de la ecografía mamaria son: con frecuencia no detecta las microcalcificaciones, es una técnica operador-dependiente y su sensibilidad disminuye en las mamas grasas.

Algunos estudios describen que existe asociación entre la imagen ecográfica y mamográfica de los cánceres de mama y sus características moleculares, afirmando que los tumores más agresivos, con mayores índices de proliferación Ki-67, presentan con mayor frecuencia: lesiones nodulares hiperdensas en la mamografía y lesiones redondeadas o lobulares, con márgenes ocultos o lobulados, refuerzo posterior, necrosis y una menor angiogénesis (punteado del flujo en Doppler) en la ecografía<sup>123,124,125</sup>.

Los nódulos espiculados parecen asociarse a factores biológicos de mejor pronóstico como la expresión de receptores hormonales, un menor porcentaje de Ki-67 y ausencia de sobreexpresión de HER2.

### 1. 6. 3. Resonancia

Es la técnica con mayor sensibilidad para la detección de las lesiones malignas mamarias, próxima al 100% en el carcinoma invasivo, aunque con especificidad variable. Se basa en la valoración de la angiogénesis tumoral y para ello se utiliza un contraste de gadolinio intravenoso.

Las indicaciones actuales de la resonancia en pacientes con cáncer de mama son<sup>126</sup>:

1. Estadificación locorregional previa a cirugía: Sobre todo en casos de carcinoma lobulillar infiltrante, cirugía conservadora de mama, mamas densas, enfermedad de Paget del pezón, pacientes de alto riesgo (BRCA), discrepancia

entre mamografía y resonancia o irradiación parcial de la mama. La resonancia mamaria aporta información respecto al tamaño tumoral, la presencia de multifocalidad o multicentricidad, de carcinoma de mama contralateral, del componente intraductal y de la afectación de pared torácica o pezón. Estos hallazgos pueden modificar la actitud a seguir con las pacientes.

La realización de resonancia en el estudio de extensión locorregional, disminuye la tasa de recidivas locales y de tumores contralaterales durante el seguimiento, pero no ha demostrado un beneficio significativo en términos de supervivencia.

2. Monitorización de la respuesta a quimioterapia neoadyuvante.
3. Estudio del carcinoma oculto de origen mamario.
4. Detección de recidiva local durante el seguimiento.

La resonancia realiza un estudio morfológico y dinámico de las lesiones.

El análisis dinámico se realiza a partir de las curvas de intensidad de señal / tiempo y el análisis visual del patrón de realce en las substracciones y en las imágenes paramétricas. Existen tres tipos de curvas de intensidad de señal / tiempo: curvas tipo 1 (continua), tipo 2 (en meseta) y tipo 3 (*wash-out*).

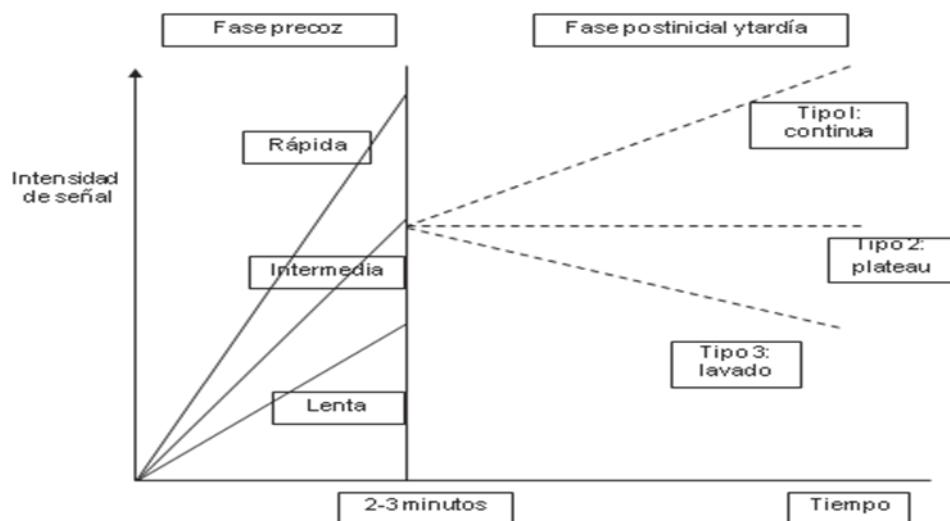


Figura 3. Tipos de curvas de intensidad de señal / tiempo en la resonancia mamaria<sup>126</sup>.

Los hallazgos dinámicos con mayor valor predictivo positivo (VPP) para malignidad en los realces tipo masa son: una fase precoz rápida y una fase tardía en meseta (*plateau*) o lavado rápido (*wash-out*).

Sin embargo, los datos dinámicos no deben constituir el único criterio diagnóstico empleado, sino que deben integrarse con otros criterios (los denominados morfológicos) para aumentar la especificidad al tipificar las lesiones<sup>126</sup>.

Los cánceres de mama con altos índices de proliferación celular (valores altos de Ki-67), presentan con mayor frecuencia las siguientes características en resonancia, según algunos estudios<sup>127</sup>:

- Realce en anillo, debido a la presencia de necrosis central, una mayor vascularización periférica y desmoplasia central<sup>128,129</sup>.
- Curvas de intensidad / tiempo de tipo III (*washout* y *early peak*), relacionadas con los cambios que experimentan los vasos tumorales, con un aumento de la vascularización y la permeabilidad, escaso espacio extracelular y formación de shunts arterio-venosos<sup>130</sup>.
- Márgenes circunscritos, debidos a su alta celularidad, una matriz extracelular rica en ácido hialurónico y reacción inflamatoria en el huesped. Los márgenes espiculados son más típicos de lesiones menos agresivas, con baja celularidad, matriz extracelular rica en colágeno y reacción desmoplásica en el tejido circundante<sup>128,129</sup>.

#### 1. 6. 4. Clasificación BI-RADS (*Breast Imaging Reporting and Data System*)

Se trata de una clasificación elaborada por el Colegio Americano de Radiología, aplicable a los hallazgos obtenidos mediante mamografía, ecografía y resonancia, con el objetivo de unificar la terminología y simplificar el manejo de las lesiones mamarias.

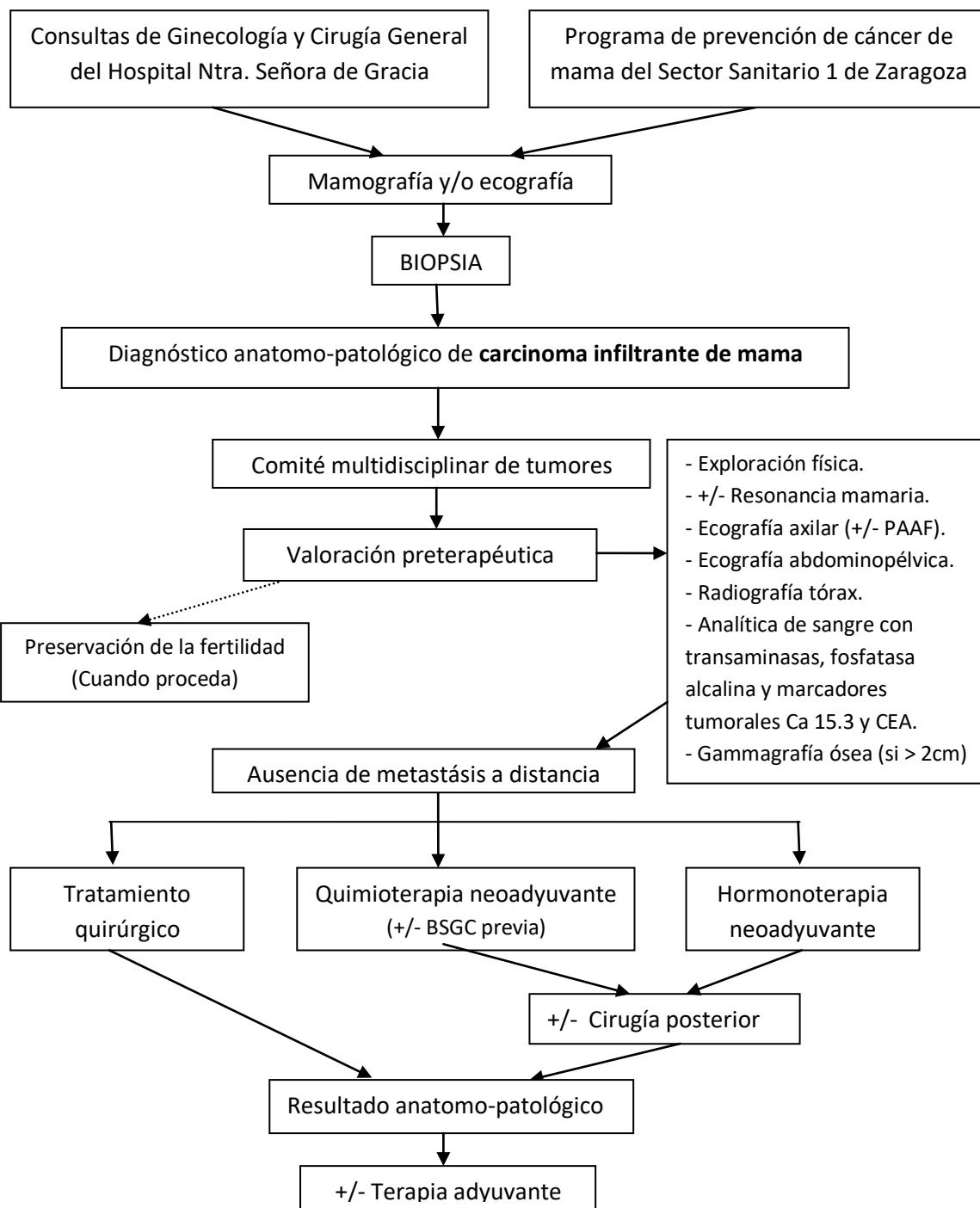
Actualmente se utiliza la 5<sup>a</sup> Edición<sup>131</sup>, publicada en el año 2013, que sustituyó a la anterior del año 2003.

Las categorías BI-RADS según la 5<sup>a</sup> edición de la clasificación son<sup>131</sup>:

- BI-RADS 0: Incompleta. Necesita valoración adicional mediante otras pruebas de imagen o comparación con las imágenes previas.
- BI-RADS 1: Negativa.
- BI-RADS 2: Hallazgos benignos.
- BI-RADS 3: Hallazgos probablemente benignos, con un VPP para cáncer inferior al 2%.
- BI-RADS 4: Hallazgos sospechosos de malignidad. El VPP para cáncer de este grupo oscila entre un 2 y un 95% y a su vez se subdivide en:
  - BI-RADS 4A: Baja sospecha de malignidad (VPP 2-10%).
  - BI-RADS 4B: Moderada sospecha de malignidad (VPP 11-40%).
  - BI-RADS 4C: Alta sospecha de malignidad (VPP 41-95%).
- BI-RADS 5: Hallazgos Altamente sugestivos de malignidad, con un VPP superior al 95%.
- BI-RADS 6: La malignidad de los hallazgos ha sido confirmada mediante biopsia.

1. 7. Protocolo de manejo del carcinoma infiltrante de mama en el Hospital Nuestra Señora de Gracia en el año 2014:

Figura 4. Diagrama que resume el manejo del cáncer de mama en el Hospital Nuestra Señora de Gracia durante el año 2014.



Ante cualquier sospecha clínica o radiológica de cáncer de mama, se debe obtener la confirmación anatomo-patológica mediante biopsia de la lesión. Se biopsian todas las lesiones radiológicas clasificadas como BI-RADS 4 ó 5 y excepcionalmente algunas catalogadas como BI-RADS 3. También se biopsian las lesiones palpables sospechosas, no visibles en las pruebas de imagen.

Las tres técnicas empleadas habitualmente para realizar la biopsia mamaria son:

- Biopsia con aguja gruesa (BAG), guiada por ecografía o por palpación: Es el método más habitual. Lo lleva a cabo el servicio de Radiología del hospital.
- Biopsia asistida por vacío (BAV), guiada por estereotaxia: Es la técnica empleada para biopsiar lesión no palpables y no visibles ecográficamente. Para su realización las pacientes son derivadas al servicio de Radiología del Hospital Miguel Servet , al no disponer de mamotomo en nuestro centro.
- Biopsia escisional diferida (BED) o exéresis de la lesión en quirófano: Se realiza cuando no se ha obtenido un diagnóstico concluyente con la BAG o BAV o en casos de discordancia anatomo - radiológica.

La biopsia aporta información de gran importancia desde el punto de vista pronóstico, como por ejemplo el tipo histológico de tumor, el grado histológico, la expresión de receptores hormonales, sobreexpresión de HER2, factores de proliferación celular como Ki-67 y citoqueratinas CK5/6 y CK19, entre otros.

Una vez obtenido el diagnóstico anatomo-patológico de carcinoma infiltrante de mama, cada caso es valorado de manera individual en el Comité multidisciplinar de tumores, que se reúne con una periodicidad semanal y cuenta con la participación de oncólogos, radiólogos, anatomo-patólogos, ginecólogos, cirujanos, radioterapeutas y geriatras. En el Comité se decide qué pruebas complementarias se incluirán en el estudio de extensión y si está indicado realizar una resonancia mamaria u otras técnicas adicionales.

El estudio de extensión comprende todas las pruebas complementarias necesarias para descartar la existencia de enfermedad metastásica. En los casos de carcinoma infiltrante de mama, el protocolo utilizado en nuestro Centro incluye la realización de: ecografía axilar, ecografía abdomino-pélvica, radiografía de tórax, analítica de sangre con transaminasas, fosfatasa alcalina y marcadores tumorales (Ca 15.3 y CEA). Además se realiza una gammagrafía ósea en tumores con tamaño superior a 2 cm o axila positiva para malignidad.

El riesgo de enfermedad metastásica es proporcional al tamaño tumoral y a la afectación ganglionar y por este motivo, algunas guías indican que en tumores pequeños (menores a 2 cm), sin afectación axilar, no estaría justificada la realización de un estudio de extensión exhaustivo.

La *guía del año 2015 de la NCCN* sobre cáncer de mama hace las siguientes recomendaciones respecto al estudio de extensión<sup>53</sup>:

- En todos los casos se realizará anamnesis, exploración física y analítica de sangre con función hepática y fosfatasa alcalina.
- Si estadio clínico I - IIB, se deben considerar estudios adicionales sólo si el paciente presenta signos o síntomas de sospecha:
  - Gammagrafía ósea si dolor óseo localizado o elevación de fosfatasa alcalina.
  - TAC o resonancia abdominopélvica si anomalías en la analítica de la función hepática o fosfatasa alcalina, síntomas abdominales o exploración anómala.
  - TAC torácico si síntomas pulmonares.
- Si estadio clínico IIIA (T3 N1 M0):
  - TAC torácico y TAC o resonancia abdominopélvica.
  - Gammagrafía ósea o FDG PET/CT.

Con el resultado del estudio de extensión, se decidirá si se opta por comenzar el tratamiento con la resección quirúrgica del tumor mamario o administrando primero quimioterapia u hormonoterapia neoadyuvante.

En aquellos casos en los que se comience el tratamiento con cirugía, también se decidirá en el Comité de Tumores el tipo de técnica, tanto mamaria como axilar, y si la paciente es candidata a realizar una reconstrucción mamaria inmediata.

Las pacientes son intervenidas habitualmente en el plazo máximo de un mes, desde la obtención del diagnóstico. Y posteriormente se evaluará si está indicada la aplicación de terapia adyuvante con quimioterapia, radioterapia y / o hormonoterapia.

## 1. 8. Seguimiento del paciente con cáncer de mama

El principal objetivo del seguimiento es la detección precoz de las posibles recaídas tanto locales como sistémicas, en una fase potencialmente curable. Además, también permite la detección de nuevos tumores primarios de mama y el tratamiento de los posibles efectos secundarios derivados de la cirugía y/o de las terapias adyuvantes sistémicas.

La realización de mamografías periódicas no ha demostrado un aumento en la supervivencia de estos pacientes<sup>132,133,134</sup>. Sin embargo, algunos estudios asocian la detección precoz de las recidivas locorregionales en pacientes asintomáticas a una mejor supervivencia global<sup>135</sup>.

Una posible pauta de seguimiento extraída de la guía de Consenso de la SESPM de 2013, sería<sup>136</sup>:

- Revisiones cada 3 - 6 meses durante los dos o tres primeros años.
- Después, cada 6 meses hasta el quinto año.
- Anual a partir del quinto año, sin límite de edad.

En algunos subgrupos de pacientes con elevado riesgo de recaída, podría estar justificada la realización de un seguimiento específico más intensivo, con revisiones más frecuentes. Este sería el caso, entre otros, de las pacientes jóvenes de menos de

40 años, los tumores triple negativos o HER2 positivos y las pacientes portadoras de mutaciones BRCA.

#### Pruebas a realizar durante el seguimiento:

Los controles se basan en la realización de anamnesis, exploración física y mamografía. El seguimiento con exploración física y mamografía anual es tan eficaz como los controles más intensivos en la detección de recidiva, sin encontrar diferencias respecto a la supervivencia global. La primera mamografía se suele realizar a los 6 meses de la intervención y después con periodicidad anual.

#### Utilización de pruebas complementarias<sup>136</sup>:

- Resonancia mamaria: Recomendable en el seguimiento de pacientes portadoras de prótesis mamarias o en los casos de cáncer de mama heredofamiliares. En este último supuesto se alternará con la realización de mamografía cada seis meses.
- Analítica general y marcadores tumorales: Los marcadores tumorales son útiles en la detección precoz de recidivas, pero no se ha demostrado que su utilización conlleve un beneficio en la supervivencia de estos pacientes. Su realización no está recomendada por la ASCO<sup>137</sup>.
- Otras pruebas de imagen como la ecografía abdominal, radiografía de tórax, gammagrafía ósea y TAC: No existe evidencia de que aporten beneficios en el seguimiento de las pacientes asintomáticas y por lo tanto no se recomienda su realización de manera rutinaria.

## 2. OBJETIVOS

### OBJETIVO PRINCIPAL:

Analizar el valor del índice de proliferación Ki-67 como factor pronóstico independiente en el carcinoma infiltrante de mama.

### OBJETIVOS SECUNDARIOS:

1. Determinar si existe asociación entre el índice de proliferación Ki-67 y los factores epidemiológicos: edad, índice de masa corporal, menopausia y paridad.
2. Analizar la relación del índice de proliferación Ki-67 con otros factores anatomo-patológicos.
3. Definir el papel de Ki-67 como factor predictivo de macrometástasis en los ganglios axilares.
4. Establecer el papel de Ki-67 como factor predictivo de macrometástasis en los ganglios axilares no centinelas, en los casos en que se realiza una biopsia selectiva del ganglio centinela.
5. Determinar si existe correlación entre el índice de proliferación Ki-67 y la supervivencia libre de enfermedad, identificando los puntos de corte con mayor valor pronóstico. Analizar también dicha correlación, dividiendo la muestra según la presencia o no de macrometástasis en los ganglios axilares.
6. Establecer si existe correlación entre el índice de proliferación Ki-67 y la supervivencia por cáncer de mama, identificando los puntos de corte con mayor valor pronóstico. Analizar también dicha correlación, dividiendo la muestra según la presencia o no de macrometástasis en los ganglios axilares.

### 3. HIPÓTESIS

#### HIPÓTESIS PRINCIPAL:

El índice de proliferación Ki-67 es un factor pronóstico independiente en el carcinoma infiltrante de mama.

#### HIPÓTESIS SECUNDARIAS:

1. Una mayor expresión de Ki-67 en el carcinoma infiltrante de mama se asocia a una menor edad de la paciente, mayor índice de masa corporal, premenopausia y menor paridad.
2. La expresión de Ki-67 en el carcinoma infiltrante de mama se correlaciona con la de otros factores anatomo-patológicos.
3. El índice de proliferación Ki-67 es un factor predictivo independiente de macrometástasis en los ganglios axilares.
4. El índice de proliferación Ki-67 es un factor predictivo independiente de macrometástasis en los ganglios axilares no centinela, cuando se realiza una biopsia selectiva del ganglio centinela.
5. Ki-67 es un factor pronóstico independiente de supervivencia libre de enfermedad en el carcinoma infiltrante de mama. Y también es un factor pronóstico de supervivencia libre de enfermedad cuando se divide la muestra según la presencia o no de macrometástasis ganglionares axilares.
6. Ki-67 es un factor pronóstico independiente de supervivencia por cáncer de mama. Y también es un factor pronóstico de supervivencia por cáncer de mama cuando se divide la muestra según la presencia o no de macrometástasis ganglionares axilares.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4. 1. Tipo de estudio

Se ha llevado a cabo un estudio analítico observacional retrospectivo, sobre 959 casos de carcinoma epitelial infiltrante de mama diagnosticados en el Hospital Nuestra Señora de Zaragoza entre el 1 de Enero de 2005 y el 31 de Diciembre de 2014.

El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón (ANEXO I).

### 4. 2. Criterios de inclusión

Se incluyeron todos los casos de carcinoma infiltrante de mama de tipo epitelial, tratados con cirugía mamaria, en los que se había realizado una determinación anatomo-patológica del factor de proliferación Ki-67 mediante técnicas de inmunohistoquímica.

### 4. 3. Criterios de exclusión

Se aplicaron los siguientes criterios de exclusión:

- Ausencia de determinación del índice de proliferación Ki-67 en el estudio anatomo-patológico del carcinoma de mama.
- Diagnóstico de carcinoma ductal *in situ* de mama, no asociado a infiltración.
- Tumores de mama de tipo mesenquimal: tumor phyllodes, sarcomas y tumores con diferenciación sarcomatoide.
- Carcinoma infiltrante bilateral de mama, tanto sincrónico como metacrónico.
- Diagnóstico de neoplasia maligna sincrónica en otro órgano.
- Metástasis a distancia en el momento del diagnóstico.

- Varón.
- Carcinoma oculto de mama: Definido como el diagnóstico de metástasis ganglionares por carcinoma de mama, en ausencia de lesión mamaria demostrable en el estudio anatomo-patológico.
- Administración de quimioterapia neoadyuvante.
- Administración de hormonoterapia primaria.
- Ausencia de cirugía mamaria.
- No administración de terapia adyuvante por patología concomitante.
- Cirugía mamaria y / o seguimiento realizados en otro hospital.

#### 4. 4. Diseño del estudio

La recogida de datos se realizó mediante la revisión retrospectiva de las historias clínicas de los Servicios de Ginecología, Cirugía General y Oncología, los informes radiológicos y los informes de Anatomía Patológica del Hospital Nuestra Señora de Gracia.

El tratamiento quimioterápico de las pacientes fue administrado en todos los casos en el Hospital Miguel Servet de Zaragoza. Por ello, con el objetivo de completar los datos referentes al esquema quimioterápico empleado, se revisaron también las historias clínicas del Servicio de Oncología de dicho hospital.

Se creó una base de datos informatizada, específica para el estudio, utilizando el programa estadístico SPSS versión 15.0.

No se registraron datos personales ni identificativos de las pacientes, empleando en la base de datos un sistema de codificación para mantener la confidencialidad.

#### 4. 5. Variables incluidas.

#### **4. 5. 1. Variables epidemiológicas:**

Los datos de las variables epidemiológicas se obtuvieron a partir de la revisión de la historia clínica y ginecológica.

##### *- Edad de la paciente:*

Se registró la edad de la paciente en el momento del diagnóstico expresada en años. Para analizar esta variable, se dividió la muestra en tres grupos: pacientes con edad menor o igual a 40 años, edad > 40 y < 70 años y edad igual o superior a 70 años.

##### *- Índice de masa corporal (IMC):*

Se obtuvo dividiendo el peso por el cuadrado de la altura (Kg / m<sup>2</sup>). Se utilizó la clasificación de la OMS, que establece cuatro categorías de IMC<sup>72</sup>:

- Bajo peso: IMC inferior a 18,50 Kg / m<sup>2</sup>.
- Normal: IMC entre 18,50 y 24,99 Kg / m<sup>2</sup>.
- Sobrepeso: IMC ≥ 25,0 y < 30 Kg / m<sup>2</sup>.
- Obesidad: IMC mayor o igual a 30,0 Kg / m<sup>2</sup>.

##### *- Menopausia:*

Se definió a las pacientes postmenopáusicas como aquellas con ausencia de menstruación durante un tiempo mínimo de un año antes del diagnóstico de cáncer de mama. Las pacientes se dividieron en dos grupos: premenopáusicas y postmenopáusicas.

##### *- Edad de la menopausia:*

En las pacientes postmenopáusicas, se registró la edad a la que tuvieron la última menstruación.

##### *- Paridad :*

Definida por el número de embarazos en los que la mujer ha dado a luz un feto o fetos más allá del estadio de aborto, independientemente de la vía de parto. Se agrupó a las

pacientes en: nulíparas, pacientes con un parto, pacientes con dos partos y pacientes con tres o más partos.

#### 4. 5. 2. Tipo de cirugía mamaria y axilar:

##### - *Tipo de cirugía mamaria:*

Todas las pacientes incluídas en el estudio habían sido tratadas con cirugía mamaria y se agruparon en dos categorías, según se hubiera realizado una cirugía conservadora de mama o una mastectomía. En todos los casos se registró también la fecha en la que se realizó dicha cirugía.

##### - *Tipo de cirugía axilar:*

Se distinguieron tres opciones de manejo quirúrgico de la axila:

- Pacientes sin cirugía axilar.
- Linfadenectomía axilar.
- BSGC, completándose con linfadenectomía axilar en los casos en los que se obtuvo un resultado de malignidad en los ganglios centinelas.

En el hospital Nuestra Señora de Gracia se realiza la técnica de BSGC desde Julio de 2007. Por ello, en los casos intervenidos desde Enero de 2005 a Junio de 2007 en los que se optó por hacer cirugía axilar, siempre se llevó a cabo una linfadenectomía.

Los criterios para indicar la BSGC se han modificado a lo largo del periodo a estudio:

- En los primeros años se incluían únicamente tumores pequeños, inferiores a 3 cm y se excluía su realización en casos relativamente frecuentes como los tumores multifocales o multicéntricos o las pacientes con una cirugía mamaria previa.
- A partir de Octubre de 2013 se aplicaron los criterios del Documento de Consenso de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria (SESPM), que contraindican la realización de BSGC únicamente en el carcinoma inflamatorio, en caso de verificación preoperatoria de afectación ganglionar o si previamente se ha administrado radioterapia axilar a dosis igual o superior a 50 Gy<sup>91</sup>.

Los criterios para indicar una linfadenectomía axilar después de la BSGC fueron:

- En todos los casos con macrometástasis en el ganglio centinela, se completó la cirugía con linfadenectomía axilar.
- En los casos con micrometástasis en el ganglio centinela, se realizó linfadenectomía axilar hasta Mayo de 2011, dejando de practicarse a partir de Junio de 2011.
- No se realizó linfadenectomía en los casos con células tumorales aisladas en el ganglio centinela.

#### 4. 5. 3. Datos anatomo-patológicos obtenidos en el estudio de la pieza de resección quirúrgica:

La información de estas variables fue obtenida a partir de la revisión del informe que realiza el Servicio de Anatomía Patológica en todos los casos de cáncer de mama intervenidos, siguiendo la plantilla que se presenta a continuación:

**Cuadro 9.** Plantilla del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Nuestra Señora de Gracia empleada para realizar los informes de los carcinomas de mama intervenidos, en la que se detallan las variables incluídas.

#### **PROTOCOLO DE CARCINOMA “IN SITU” E INVASIVO DE MAMA**

Pieza de ..... , mama (dcha/izda) (con/sin prolongación axilar) con CARCINOMA “ IN SITU” E INVASIVO:

- Tipo del componente invasivo:

\* Carcinoma ductal infiltrante:

Sin otra especificación/ tubular/ cribiforme/ mucinoso puro/ mucinoso mixto/ papilar/ medular/ micropapilar/ apocrino/ metaplásico.

\* Carcinoma lobulillar infiltrante:

Tipo clásico/ pleomórfico /histiocitoide/ sólido/ trabecular/ alveolar/ de células en anillo de sello/ túbulo-lobulillar.

- Tipo del componente “in situ”:

\* Carcinoma ductal “in situ”:

- Tipo cribiforme/ sólido/ sólido y cribiforme/ papilar/ micropapilar/ comedocarcinoma/ clinging /quístico-hipersecretor/“con extensión a lobulillos”.
- ALTO / MEDIO/ BAJO GRADO. CON / SIN NECROSIS.

- \* Carcinoma lobular "in situ":
  - Tipo clásico (tipo A)/ de célula grande (tipo B).
  - NL 1/ NL 2/ NL 3.
- Grado arquitectural del componente infiltrante:
  - \* Bien/ Moderadamente/ Poco diferenciado.
- Grado nuclear del componente infiltrante(sobre 3): 1 / 2 / 3
- Indice de actividad mitótica: mitosis/ 10 CGA.
- Indice de Scarf-Bloom: (....+....+....)
- Grado histológico combinado de Nottingham:
  - \* Grado I (SB 3,4,5)/ Grado II (SB 6,7)/ Grado III (SB 8,9).
- Dimensiones del tumor: ....x....x...
- Borde: circunscrito / infiltrativo
- Proporción del componente intraductal: (< ó = 25% / > ó = 25%)
- Necrosis tumoral (en el componente infiltrante):
  - \* No se identifica/ mínima/ extensa/ no valorable.
- Fibrosis:
  - \* Leve/ moderada/ intensa.
- Calcificación:
  - \* No se identifica/ mínima/ extensa... en componente in situ/ infiltrante.
- Localización del tumor:
- Multicentricidad tumoral: (describir tipo y localización).
- Invasión vascular:
  - \* No se identifica/ presente/ No valorable.
- Invasión perineural:
  - \* No se identifica/ presente/ no valorable.
- Pezón:
  - \* No afectación/ afectación por carcinoma invasivo/ CID en grandes conductos galactofóricos / Paget.
- Piel:
  - \* No afectación/ extensión directa/ émbolos en linfáticos dérmicos.
- Infiltración de músculo.
- Márgenes quirúrgicos: distancia a margen más cercano....
- Distancia a piel.
- Distancia a plano profundo.
- Tejido mamario no neoplásico:
- Ganglios linfáticos:
  - \* Nivel I: ganglios metastatizados ....(....con micrometástasis y .....con extensión extracapsular)/ ganglios aislados.
  - \* Nivel II: ganglios metastatizados ....(....con micrometástasis y .....con extensión extracapsular)/ ganglios aislados.
  - \* Nivel III: ganglios metastatizados ....(....con micrometástasis y .....con extensión extracapsular)/ ganglios aislados.
  - \* Diámetro del mayor ganglio metastatizado: ....cm
  - \* Otras lesiones en ganglios linfáticos:
- Estudio Inmunohistoquímico:
  - \* Receptor estrogénico (clon ER007):
  - \* Receptor de progesterona (clon 1A6):
  - \* c-erbB-2 (clon CB11):
  - \* p53 (clon DO-7):
  - \* Ki-67 (MM1):
  - \* PENDIENTE
- Clasificación pTNM: pT (....cm), pN (..../....), Mx.

El análisis de las muestras anatomo-patológicas sigue habitualmente los siguientes pasos:

- Fase preanalítica: Las muestras obtenidas mediante biopsia se conservan en formol al 4%, mientras que las piezas quirúrgicas son remitidas en fresco (sin fijar) y se conservan en el frigorífico a 4ºC.
- Examen macroscópico de la muestra.
- Cortes e inclusión en parafina.
- Obtención de secciones con microtomo para su estudio microscópico, aplicando tinciones y técnicas de inmunohistoquímica.

**Las variables anatomo-patológicas analizadas fueron:**

**- *Tipo histológico de tumor epitelial infiltrante de mama:***

Se aplicó la clasificación histológica del cáncer de mama de la OMS en su tercera edición<sup>3</sup>, agrupando la muestra en los siguientes tipos de tumores: carcinoma ductal infiltrante, carcinoma lobulillar infiltrante, carcinoma mixto: ductal y lobulillar infiltrante, carcinoma mucinoso, carcinoma medular, carcinoma tubular, carcinoma adenoide quístico, carcinoma metaplásico y carcinoma de células claras.

**- *Tamaño tumoral:***

Definido por el diámetro máximo del foco de carcinoma infiltrante de mayor tamaño, medido en milímetros.

El protocolo del Servicio de Anatomía Patológica para la valoración del tamaño tumoral en la pieza quirúrgica es el siguiente:

- Se valora la pieza al menos en dos dimensiones.
- Se verifica por microscopía (ésta es preferente en caso de discrepancia).
- Sólo se tiene en cuenta el componente invasivo.
- Para lesiones pT1 con extenso in situ, la medida microscópica es más precisa.
- En caso de carcinoma infiltrante con extenso intraductal, se mide desde un extremo al otro (todo).
- En los casos de carcinoma multifocal o multicéntrico:

- Si hay componente intraductal entre los dos focos, se suman los tamaños (en realidad no sería multifocal).
- Si no hay componente intraductal entre los dos focos, se considera sólo el tamaño del mayor.
- Cuando la lesión alcanza los extremos no es posible valorar el tamaño.
- No debe sumarse el tamaño tumoral de la escisión primaria y la reescisión.

*- Estadio pT:*

Se clasificó el tamaño tumoral resultante tras la cirugía, utilizando el sistema de estadiaje TNM<sup>22</sup>, distinguiéndose las categorías: pT1, pT2, pT3 y pT4.

Cuadro 10. Estadio pT de la 7<sup>a</sup> edición de la clasificación TNM<sup>22</sup>.

pTx: No puede ser valorado.
pT0: No evidencia de tumor primario.
pTis: Carcinoma in situ.
pT1: $\leq 2$ cm: pT1mi: Microinvasión $\leq 0,1$ cm.
pT1a: $> 0,1$ y $\leq 0,5$ cm.
pT1b: $> 0,5$ y $\leq 1$ cm.
pT1c: $> 1$ y $\leq 2$ cm.
pT2: $> 2$ y $\leq 5$ cm.
pT3: $> 5$ cm.
pT4: Infiltración de pared costal o piel:
pT4a: Pared costal.
pT4b: Ulceración, nódulos satélite o edema de piel.
pT4c: 4a + 4b.
pT4d: Carcinoma inflamatorio.

*- Multifocalidad o multicentricidad:*

La muestra se dividió en tres tipos de tumores:

- Tumores unifocales: un único foco de carcinoma infiltrante.
- Tumores multifocales: dos o más focos de carcinoma infiltrante en el mismo cuadrante.
- Tumores multicéntricos: focos tumorales invasivos en diferentes cuadrantes de la mama.

*- Presencia de carcinoma intraductal asociado al carcinoma infiltrante:*

Se distinguieron tres tipos de carcinoma infiltrante, según su asociación o no a carcinoma ductal in situ:

- Ausencia de carcinoma intraductal asociado.
- Carcinoma intraductal asociado, no extenso.
- Presencia de carcinoma intraductal extenso: cuando el carcinoma in situ suponía el  $\geq 25\%$  del área invasiva y estaba presente también en la periferia del parénquima mamario o había un área extensa de carcinoma in situ asociada a una pequeña área de carcinoma invasivo ( $\leq 10\text{ mm}$ ).

*- Invasión linfovascular:*

Se registró la presencia o ausencia de invasión linfovascular, definida según los criterios diagnósticos del Colegio Americano de Patología, descritos en el apartado 1.5.13. del texto<sup>54,111</sup>.

*- Grado histológico combinado de Nottingham:*

Se determinó siguiendo las recomendaciones del Colegio Americano de Patología<sup>54</sup>, expuesta en el cuadro nº 7.

El grado histológico se calcula a partir de la combinación de tres variables: Diferenciación arquitectural, grado nuclear e índice mitótico. Cada una recibe una puntuación de 1 a 3, cuya suma define el grado histológico combinado de Nottingham:

- Grado 1: Puntuaciones 3, 4 ó 5.
- Grado 2: Puntuaciones 6 ó 7.
- Grado 3: Puntuaciones 8 ó 9.

#### 4. 5. 4. Perfil inmunohistoquímico del carcinoma infiltrante de mama:

Se utilizaron técnicas de inmunohistoquímica para determinar la expresión de las variables: receptor de estrógenos, receptor de progesterona, índice de proliferación Ki-67, p53 y HER2.

**Cuadro 11.** Anticuerpos empleados en las técnicas de inmunohistoquímica por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Nuestra Señora de Gracia.

1. Desde Enero de 2005 a Octubre de 2012:

Anticuerpo	Clon	Marca	Tiempo de incubación del Ac primario	Pretratamiento
Receptor Estrógeno	1D5	Biocare	15 minutos	pH 6
Receptor Progesterona	16	Novocastra	15 minutos	pH 6
p53	DO-7	Novocastra	15 minutos	pH 6
HER2	CB11	Novocastra	12 minutos	pH 6
Ki-67	MM1	Novocastra	12 minutos	pH 6

2. Desde Noviembre de 2012 hasta la actualidad:

Anticuerpo	Clon	Marca	Tiempo de incubación del Ac primario	Pretratamiento
Receptor Estrógeno	SP1	Roche Diagnostics	16 minutos	CC1, pH: 8 30 minutos
Receptor Progesterona	1E2	Roche Diagnostics	8 minutos	CC1, pH: 8 30 minutos
p53	Bp53-11	Roche Diagnostics	24 minutos	CC1. pH: 8 30 minutos
HER2	Rabbit anti-human HER2 protein HercepTest	Dako Diagnostics	30 minutos	Solución recuperadora de epitopos en equipo DakoLink
Ki-67	30-9	Roche Diagnostics	16 minutos	CC1, pH: 8 30 minutos

*- Receptor de estrógenos:*

Se valoró el porcentaje de células tumorales que presentaban positividad nuclear (%) y la intensidad media de la tinción con el anticuerpo (expresada como débil +, moderada ++ o fuerte +++). Se consideró que existía expresión tumoral positiva del receptor de estrógenos cuando al menos un 1 % de las células tumorales invasoras eran inmunorreactivas.

*- Receptor de progesterona:*

Se valoró el porcentaje de células tumorales que presentaban positividad nuclear (%) y la intensidad media de la tinción con el anticuerpo (expresada como débil +, moderada ++ o fuerte +++). Se consideró que existía expresión tumoral positiva del receptor de progesterona cuando al menos un 1 % de las células tumorales invasoras eran inmunorreactivas.

*- Índice de proliferación Ki-67:*

Definido por el porcentaje de células tumorales con tinción positiva entre el total de células invasivas valoradas (%).

La técnicas empleadas por el Servicio de Anatomía Patológica para su determinación fueron:

1. Anticuerpos:

- Desde Enero de 2005 a Octubre de 2012: Mouse Monoclonal Antibody Ki-67 (MM1) de Novocastra.
- Desde Noviembre de 2012 hasta la actualidad: CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) Rabbit Monoclonal Primary Antibody de Laboratorios Roche.

2. Técnica de recuento y cálculo del índice de proliferación Ki-67:

- El recuento visual de las células tumorales invasivas con tinción positiva fue realizado por un anatomo-patólogo del hospital Nuestra Señora de Gracia.
- El contaje incluye entre 2 y 4 campos de gran aumento, con un total de 100 células tumorales invasivas.

- Se lleva a cabo una valoración promedio entre las zonas con mayor expresión de Ki-67 (los llamados "hot spots") y las zonas con menos expresión: Si entre éstas existen diferencias importantes, se calcula una media aritmética.
- En caso de duda, se realiza una doble lectura, llevada a cabo por otro anatomo-patólogo del mismo Servicio.
- A partir de este recuento se calcula el porcentaje de Ki-67, que define el índice de proliferación.

*- Sobreexpresión de p53:*

Se determinó si existía o no sobreexpresión de p53 (negativo o positivo) y en caso de ser positivo, el porcentaje de células tumorales invasivas que lo expresan.

*- Sobreexpresión de HER2:*

Para determinar la existencia de sobreexpresión de HER2, se utilizaron técnicas de inmunohistoquímica, distinguiendo cuatro categorías, según las recomendaciones de ASCO y CAP<sup>52,221</sup>:

0 : Negativo. No tinción o incompleta o casi imperceptible en  $\leq 10\%$  de células tumorales invasivas.

1+: Negativo. Tinción incompleta o casi imperceptible en  $> 10\%$  de células tumorales invasivas.

2+: Indeterminado. Tinción incompleta y/o débil - moderada en  $> 10\%$  de células tumorales invasivas o tinción completa, intensa en  $\leq 10\%$  de células.

3+: Positivo. Tinción completa e intensa en  $> 10\%$  de células tumorales invasivas.

En los casos en que se obtuvo un resultado indeterminado mediante inmunohistoquímica (2+), se aplicaron técnicas de hibridación in situ, que determinan la presencia o ausencia de amplificación génica. Éstas fueron realizadas en un laboratorio externo al hospital, utilizándose diferentes tipos de sonda a lo largo del periodo a estudio:

- Desde Enero de 2005 a Abril de 2014: Técnica FISH (con sonda fluorescente)

- Desde Mayo 2014 hasta Diciembre de 2014: Técnica CISH (con sonda cromógena).

*- Subtipo molecular de cáncer de mama:*

Se utilizó la clasificación subrogada de cáncer de mama, consensuada en la Conferencia de Saint Gallen de 2013, basada en el perfil inmunohistoquímico del tumor (Cuadro 3), distinguiéndose cinco subtipos de cáncer de mama<sup>17</sup>:

- Luminal A-like: RE positivo, RP+  $\geq 20\%$ , HER2 negativo y Ki-67 < 14%
- Luminal B-like HER2 negativo: RE positivo, HER2 negativo y Ki-67  $\geq 14\%$  o RP+ < 20%.
- Luminal B-like HER2 positivo: RE positivo, HER2 positivo y cualquier Ki-67 y RP.
- HER2 positivo: RE negativo, RP negativo y HER2 positivo.
- Triple negativo: RE, RP y HER2 negativos.

#### 4. 5. 5. Afectación tumoral de los ganglios axilares:

El primer caso de BSGC en el Hospital Nuestra Señora de Gracia se llevó a cabo el 13 de Julio de 2007. Antes de esa fecha, todas las cirugías ganglionares axilares realizadas fueron linfadenectomías.

Actualmente, la biopsia intraoperatoria de los ganglios centinelas se puede realizar mediante dos técnicas : el método convencional y el método OSNA (one-step nucleic acid amplification).

El método OSNA comenzó a utilizarse en nuestro hospital en Febrero de 2015 (fuera del periodo a estudio).

Por ello, todos los ganglios centinelas incluidos en nuestra muestra fueron analizados intraoperatoriamente aplicando la llamada "técnica convencional", que consiste en la realización de cortes por congelación y / o improntas citológicas del ganglio con tinción rápida de hematoxilina - eosina. Mediante este método, la afectación tumoral ganglionar se clasifica en:

- Macrometástasis: > 2mm.

- Micrometástasis: entre 0,2 y 2 mm y/o más de 200 células.
- Células tumorales aisladas: < 0,2 mm y un máximo de 200 células.

Además del estudio intraoperatorio de los ganglios, se realizó posteriormente un estudio definitivo de los ganglios, obteniendo 10 secciones de cada bloque, con una separación aproximada de 150 - 200  $\mu\text{m}$ , que se analizaron aplicando tinciones con hematoxilina - eosina y técnicas de inmunohistoquímica (detección de citoqueratina - PAN).

Las variables analizadas en los ganglios axilares fueron:

- *Número total de ganglios axilares resecados.*

- *Afectación tumoral de los ganglios axilares:*

Según el grado de afectación ganglionar, se clasificó la muestra en las categorías:

- Afectación ganglionar no valorada.
- Ausencia de afectación de los ganglios axilares.
- Células tumorales aisladas.
- Micrometástasis.
- Macrometástasis. Se cuantificó el número de ganglios con macrometástasis, agrupándolos en: 1-3 ganglios, 4-9 ganglios y 10 o más ganglios.

- *Número de ganglios con afectación extracapsular.*

- Además, en el subgrupo de pacientes en las que se realizó BSGC y posterior linfadenectomía axilar, se analizaron las variables:

- Número total de ganglios axilares extraídos.
- Número de ganglios centinela axilares con macrometástasis.
- Número de ganglios no centinela axilares con macrometástasis.
- Afectación extracapsular en el ganglio centinela: Presente o ausente.

#### 4. 5. 6. Tipo de terapia adyuvante:

Se registró el tipo de terapia adyuvante administrada después de la cirugía mamaria, reflejando si las pacientes habían recibido terapia adyuvante con quimioterapia, radioterapia y/o hormonoterapia.

##### - *Tipo de esquema quimioterápico adyuvante:*

Las pautas de tratamiento quimioterápico adyuvante administradas se agruparon en:

- Terapias basadas en taxanos sin antraciclinas: esquema TC (taxano y ciclofosfamida).
- Terapias basadas en antraciclinas sin taxanos: esquema AC (adriamicina y ciclofosfamida), esquema FEC (5-fluoruracilo, epirrubicina y ciclofosfamida) y esquema EC (epirrubicina y ciclofosfamida).
- Terapias basadas en la combinación de antraciclinas y taxanos: esquema TAC (taxano, adriamicina y ciclofosfamida), esquema FEC asociado a taxano, esquema MT (doxorrubicina liposomal y taxano) y esquema EC asociado a taxano.
- Antraciclinas, taxanos y capecitabina.
- Esquema CMF: ciclofosfamida, metotrexate y 5-fluoruracilo.
- Taxano semanal.
- Esquema CT: carboplatino y taxano.
- Vinorelbina.

##### - *Quimioterapia anti-HER2 adyuvante:*

Las pacientes que presentaban sobreexpresión de HER2, diagnosticada mediante inmunohistoquímica o mediante hibridación in situ, fueron tratadas con un fármaco diana anti-HER2.

El fármaco anti-HER2 utilizado con más frecuencia fue trastuzumab, un anticuerpo monoclonal que se une al dominio extracelular del receptor de membrana HER2, inhibiendo su dimerización. Se administró trastuzumab por vía intravenosa cada tres semanas, durante un año o hasta la aparición de recaída de la enfermedad.

En algunos casos se utilizaron otros fármacos anti-HER2, como pertuzumab, principalmente en pacientes incluidas en ensayos clínicos. Pertuzumab es un anticuerpo monoclonal que, al igual que trastuzumab, se une al dominio extracelular del receptor HER2, bloqueando su dimerización dependiente de ligando.

- *Tipo de radioterapia:*

Se distinguieron tres tipos de irradiación:

- Radioterapia glandular: irradiación de la mama, indicada en caso de tratamiento quirúrgico conservador de la misma. Se acompaña de una sobreimpresión en el lecho tumoral (boost), cuando existen criterios que aumentan el riesgo de recidiva local.
- Radioterapia de pared torácica: indicada tras realizar una mastectomía, en casos de tumor localmente avanzado (T3 o T4) o afectación de 4 o más ganglios.
- Radioterapia de cadenas ganglionares: irradiación de la fosa supraclavicular homolateral en tumores localmente avanzados, afectación de 4 o más ganglios o linfadenectomía insuficiente. Irradiación axilar si enfermedad voluminosa o linfadenectomía insuficiente o no realizada. Irradiación de cadena mamaria interna cuando la técnica del ganglio centinela pone de manifiesto afectación a ese nivel.

La muestra se dividió según el tipo de radioterapia administrada en:

- No recibe tratamiento con radioterapia.
- Radioterapia glandular.
- Radioterapia sobre pared costal.
- Radioterapia en cadenas ganglionares.
- Radioterapia en pared costal y cadenas ganglionares.
- Radioterapia glandular y en cadenas ganglionares.

- *Tipo de hormonoterapia adyuvante:*

Todas las pacientes cuyo tumor expresaba receptores hormonales (estrógeno y progesterona), recibieron hormonoterapia adyuvante con tamoxifeno, inhibidores de la aromatasa y / o análogos de la GnRH.

#### 4. 5. 7. Datos del seguimiento de las pacientes:

##### Recidivas:

Se registró la localización de la primera recidiva acontecida después de la cirugía mamaria y la fecha en que se diagnosticó.

##### - *Tipo de recidiva:*

Dependiendo de la localización de la misma, se distinguieron tres tipos de recidiva:

- Recidiva local: recurrencia de la enfermedad en la mama o en la pared costal ipsilateral.
- Recidiva regional: recurrencia de la enfermedad en las cadenas ganglionares axilares, de mama interna o supraclaviculares ipsilaterales.
- Recidiva a distancia: recurrencia de la enfermedad fuera de las localizaciones locorregionales.

##### - *Localización de la primera recidiva a distancia:*

Según la ubicación de la primera recidiva a distancia diagnosticada tras la cirugía mamaria, las metástasis a distancia se clasificaron en: hígado, pulmón, hueso, sistema nervioso central u otras localizaciones.

##### Mortalidad:

##### -*Periodo de seguimiento:*

Intervalo de tiempo comprendido entre la fecha de la cirugía mamaria y la fecha en la que se tuvo el último contacto con la paciente (habitualmente la fecha de la última revisión), expresado en meses.

- *Éxitus:*

En las pacientes que habían fallecido durante el periodo de seguimiento, se registró la fecha del éxitus y la causa del mismo, distinguiendo si el fallecimiento se había producido a consecuencia de su enfermedad mamaria (en pacientes con metástasis a distancia) o por una causa ajena a la misma.

- *Supervivencia libre de enfermedad:*

Se definió como el periodo de tiempo transcurrido desde la fecha de la cirugía mamaria hasta la aparición de cualquier tipo de recidiva o la fecha del último contacto con la paciente en caso de no haberse producido ninguna recidiva.

- *Supervivencia global:*

Se definió como el periodo de tiempo comprendido desde la fecha de la cirugía mamaria hasta el éxitus de la paciente, independientemente de la causa, o la fecha del último contacto si la paciente no había fallecido.

- *Supervivencia específica por cáncer de mama:*

Se definió como el periodo de tiempo transcurrido desde la fecha de la cirugía mamaria hasta el éxitus de la paciente a causa de su enfermedad mamaria (en pacientes con metástasis a distancia) o la fecha del último contacto con la paciente si no había fallecido a causa del cáncer de mama.

#### 4. 6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se dividió en dos partes: análisis descriptivo y análisis inferencial.

El software utilizado para la realización de este estudio fue PASW Statistic v.18.0.0 (SPSS Inc.).

#### **4. 6. 1. Análisis descriptivo:**

Se realizó un estudio descriptivo de la muestra, analizando todas las variables incluidas en el mismo.

Las variables se describieron utilizando medidas descriptivas tales como frecuencias, porcentajes, mínimos, máximos, medianas, medias y gráficos (histogramas, de sectores y barras).

#### **4. 6. 2. Análisis inferencial:**

##### **Análisis bivariante:**

Se realizó un análisis bivariante entre el índice de proliferación Ki-67 y los factores epidemiológicos: edad ( $\leq$  40 años,  $>$  40 y  $<$  70 años y  $\geq$  70 años), menopausia (premenopáusicas y postmenopáusicas), edad de la menopausia, menopausia en el grupo con edad  $\geq$  45 y  $\leq$  55 años, paridad, tipo de IMC y tipo IMC para cada uno de los subtipos moleculares de cáncer de mama.

También se llevaron a cabo cruces del factor de proliferación Ki-67 con los factores anatomo-patológicos obtenidos en la cirugía mamaria: tipo histológico de cáncer de mama, tamaño del foco tumoral principal, estadio pT, asociación a multifocalidad o multicentricidad, asociación a carcinoma intraductal, diferenciación arquitectural, grado nuclear, índice mitótico, grado histológico combinado de Nottingham, expresión de los receptores de estrógenos y progesterona, p53, HER2, invasión linfovascular, subtipo molecular de cáncer de mama, número de ganglios axilares con macrometástasis, número de ganglios con afectación extracapsular, número de ganglios no centinela con macrometástasis y estadio pN.

Para analizar si Ki-67 es capaz de predecir el número de ganglios axilares con macrometástasis, se tomaron tres posibles puntos de corte de éste: Ki-67  $\geq 10\%$ ,  $\geq 14\%$  y  $\geq 20\%$ , basados en la bibliografía revisada.

También se analizó la correlación entre el número de ganglios axilares con macrometástasis y las variables: estadio pT, grado histológico combinado de Nottingham, p53  $\geq 15\%$ , HER2, invasión linfovascular, receptor de estrógenos y receptor de progesterona.

Así mismo, con el objetivo de ver si existe relación entre Ki-67 y el número de ganglios no centinela axilares con macrometástasis, se analizaron tres posibles puntos de corte: Ki-67  $\geq 10\%$ ,  $\geq 14\%$  y  $\geq 20\%$ .

Además, se estudió la asociación entre el número de ganglios axilares no centinela con macrometástasis y las variables: estadio pT, HER2, invasión linfovascular, receptor de estrógenos, receptor de progesterona, número de ganglios centinela con macrometástasis y afectación extracapsular en el ganglio centinela.

También se analizó la correlación entre Ki-67 y la aparición de recidiva, el tipo de recidiva a distancia y éxitus debido al cáncer de mama, durante el periodo de seguimiento.

- Metodología del análisis<sup>138,139,140,141</sup>:

El análisis de las variables que toman valores cuantitativos se realizó aplicando el test de t-Student para muestras independientes o el análisis de varianza, cuando se cumplían las hipótesis necesarias (normalidad e igualdad de varianzas). Cuando no se cumplían estas hipótesis se utilizaron las técnicas no paramétricas de la U de Mann-Whitney o el test de Kruskal-Wallis, dependiendo del número de categorías de la variable a estudio.

En aquellos casos en los que ANOVA o el test de Kruskal-Wallis resultó significativo, se realizaron comparaciones múltiples entre los grupos para ver cuáles de ellos son significativamente diferentes entre sí.

Para estudiar la asociación entre variables que toman valores cuantitativos se ha utilizado el coeficiente de correlación de Pearson o Spearman, que mide el grado de asociación entre las variables. Este coeficiente oscila entre -1 y 1. Un valor próximo a 1 indica una fuerte relación positiva entre ambas variables, es decir valores altos de una variable se corresponden con valores altos en la otra variable. Un valor próximo a -1 indica una fuerte relación negativa entre ambas variables, es decir valores altos de una variable se corresponden con valores bajos en la otra variable. Un valor próximo a 0 nos indica que no existe relación entre las dos variables.

Para las variables en estudio que tomaron valores cualitativos se aplicó el test de Chi-cuadrado de Pearson, con la corrección de Yates o la Prueba exacta de Fisher cuando fue necesario.

El nivel de confianza que se utilizó fue del 95%.

#### [\*\*Curvas ROC:\*\*](#)

Se han utilizado las curvas ROC, para detectar cuál es el mejor punto de corte de la variable continua Ki-67, que nos permite discriminar entre la presencia o ausencia de los eventos: recidiva y éxito por cáncer de mama.

Se ha calculado el área bajo la curva, la sensibilidad, 1-especificidad y la distancia al extremo superior, para cada uno de los puntos de corte.

#### [\*\*Análisis multivariante:\*\*](#)

##### [\*\*- Regresión logística:\*\*](#)

Se han llevado a cabo dos regresiones logísticas para evaluar el efecto de una serie de variables (cuantitativas o cualitativas en forma de variables dummy) sobre la presencia o ausencia de un suceso:

- Efecto de las variables estadio pT, grado histológico combinado de Nottingham, Ki-67  $\geq$  10%, Ki-67  $\geq$  14%, Ki-67  $\geq$  20%, p53  $\geq$  15%, HER2, invasión linfovascular, receptor de estrógenos y receptor de progesterona, sobre la presencia de macrometástasis en los ganglios axilares.
- Efecto de las variables pT, Ki-67  $\geq$  10%, Ki-67  $\geq$  14%, Ki-67  $\geq$  20%, HER2, invasión linfovascular, receptor de estrógenos, receptor de progesterona, número de ganglios centinela con macrometástasis y afectación extracapsular en el ganglio centinela, sobre la presencia de macrometástasis en los ganglios no centinela axilares.

En primer lugar se realizó un análisis bivariante para ver si estas variables resultaban significativas para introducirlas en el análisis de regresión.

El objetivo de esta técnica es calcular la probabilidad de ocurrencia de un suceso, en función de un conjunto de covariantes (independientes). El modelo de regresión logística estima la probabilidad de que suceda un evento dados los valores de algunas características en el individuo:

$$P(\text{Ocurra el suceso}) = \frac{e^Z}{1 + e^Z} = \frac{1}{1 + e^{-Z}}$$

$$\text{donde } Z = \beta_0 + \beta_1 \cdot X_1 + \beta_2 \cdot X_2 + \dots + \beta_p \cdot X_p$$

También se ha utilizado la regresión logística no tanto para estimar la probabilidad de ocurrencia de un suceso, sino por su habilidad para estimar la ventaja relativa (odds ratio) de que ocurra el suceso a que no ocurra dadas determinadas condiciones.

Para reconocer las variables con influencia significativa se ha utilizado un método de selección paso-a-paso hacia delante. El criterio de selección se basa en el *score statistic* a un nivel de significación de 0,05. Por otro lado, el criterio de eliminación se basa en la probabilidad del estadístico de razón de verosimilitud (likelihood ratio) basándose en las estimaciones de máxima verosimilitud parcial, exigiendo un nivel de significación superior a 0,10 para salir.

- Análisis de supervivencia:

El objetivo de los análisis de supervivencia fue determinar qué variables o factores influyen o modifican el riesgo de padecer una recidiva o un éxito por cáncer de mama, con sus tiempos asociados: tiempo hasta la recidiva o tiempo hasta la muerte por cáncer de mama.

Se realizaron seis análisis de supervivencia:

- Supervivencia libre de enfermedad (tiempo hasta la recaída).
- Supervivencia por cáncer de mama (tiempo hasta la muerte por cáncer de mama).
- Supervivencia libre de enfermedad en las pacientes con macrometástasis en los ganglios axilares (tiempo hasta la recaída).
- Supervivencia por cáncer de mama en las pacientes con macrometástasis en los ganglios axilares (tiempo hasta la muerte por cáncer de mama).
- Supervivencia libre de enfermedad en las pacientes sin macrometástasis en los ganglios axilares (tiempo hasta la recaída).
- Supervivencia por cáncer de mama en las pacientes sin macrometástasis en los ganglios axilares (tiempo hasta la muerte por cáncer de mama).

Las variables a estudio en los dos primeros análisis de supervivencia fueron: Ki-67 (con el mejor punto de corte según los eventos recidiva y muerte por cáncer de mama), edad, tipo de IMC, menopausia, paridad, tipo histológico de cáncer de mama, estadio pT, asociación a multifocalidad o multicentricidad, asociación a carcinoma intraductal, grado histológico combinado de Nottingham, p53, HER2, invasión linfovascular, receptor de estrógeno, receptor de progesterona y estadio pN.

En los cuatro últimos análisis de supervivencia, que dividían la muestra según la presencia o ausencia de macrometástasis en los ganglios axilares, se incluyeron las mismas variables a excepción del estadio pN.

Se emplearon un conjunto de técnicas estadísticas denominadas “análisis de supervivencia”, de tipo no paramétrico, cuyo objetivo es únicamente contrastar cómo se modifica el riesgo de fallo por efecto de variables externas. Estas técnicas no aportan información acerca de la distribución que sigue dicho riesgo sino que, de forma intuitiva, a través del análisis de los gráficos (función de supervivencia y función de riesgo acumulado estimados), proporcionan una idea aproximada de cómo evoluciona el riesgo en función del tiempo transcurrido desde que se inició el seguimiento<sup>138,141</sup>.

- *Estimador de Kaplan-Meier:*

Se analizó de una forma puramente descriptiva la función de supervivencia y la función de riesgo acumulado (estimador producto límite de Kaplan-Meier), contrastando si la función de riesgo es diferente en función de la presencia de ciertos factores. Para ello se utilizó el estimador producto límite de Kaplan-Meier, haciendo el contraste de Mantel-Haenszel (log-rank) por parejas de grupos para variables cualitativas y el de tendencia lineal para variables ordinales o continuas.

Anteriormente se había contrastado la hipótesis de riesgo proporcional que exige el contraste. Esta hipótesis exige que las curvas de supervivencia de los distintos grupos no se crucen, y que los logaritmos de los estimadores de la función de riesgo acumulado en los grupos sean líneas paralelas.

- *Regresión de Cox:*

Se ha llevado a cabo regresión de Cox de riesgo proporcional para contrastar el efecto simultáneo de las variables a estudio que resultaron significativas en el análisis de Kaplan-Meier.

El modelo de regresión de Cox que se pretendió ajustar fue el siguiente:

$$h(t) = [h_0(t)] \cdot e^{(B_1X_1 + B_2X_2 + \dots + B_pX_p)}$$

Este modelo implica que la función de riesgo  $h(t)$ , viene dada por una función de riesgo base  $h_0(t)$  (que depende del tiempo y es común a todos los individuos) y por un factor ( $\exp(B_1X_1 + \dots + B_pX_p)$ ) que depende del valor que tomen las covariables (y no del tiempo).

Las estimaciones de los coeficientes son los valores de B que hay que sustituir en el modelo. La interpretación, no obstante, se debe de llevar a cabo con  $\exp(B)$  que indica el ratio entre las funciones de riesgo de las personas que tienen la característica a aquellas que no la tienen (variables cualitativas) o el porcentaje de cambio de la función de riesgo por unidad de incremento en la covariable (variables cuantitativas).

Se probaron diferentes algoritmos de construcción del modelo de regresión de Cox multivariante (incluyendo más de una covariable): método introducir, paso a paso hacia delante de razón de verosimilitud, paso a paso hacia atrás de razón de verosimilitud, paso a paso hacia delante manual y paso a paso hacia atrás manual. Finalmente se seleccionó el método paso a paso hacia delante de razón de verosimilitud, por ser el que nos proporcionaba un mejor ajuste<sup>138,140</sup>.

Anteriormente a la estimación del modelo se contrastó la hipótesis de riesgo proporcional que requiere esta regresión. Esta hipótesis exige que el ratio entre los riesgos para dos casos debe ser constante a lo largo del tiempo.

## 5. RESULTADOS

Entre el 1 de Enero de 2005 y el 31 de Diciembre de 2014, se diagnosticaron 959 casos de carcinoma de mama en el Hospital Nuestra Señora de Gracia de Zaragoza.

Tras aplicar los criterios de exclusión, se eliminaron 357 casos del estudio, obteniendo un tamaño muestral definitivo de 602 pacientes.

**Tabla 2.** Criterios de exclusión y número de casos eliminados en cada apartado.

Criterios de exclusión	Número de casos
1. No realizada la determinación de Ki-67	4
2. Diagnóstico de carcinoma ductal in situ de mama	83
3. Tumores de mama de tipo mesenquimal (phyllodes, sarcoma, diferenciación sarcomatoide)	10
4. Metástasis a distancia en el momento del diagnóstico	41
5. Carcinoma infiltrante bilateral de mama	10
6. Carcinoma sincrónico en otro órgano	1
7. Varón	8
8. Hormonoterapia primaria	3
9. Ausencia de tratamiento quirúrgico	32
10. Cirugía en otro centro	40
11. Ausencia de seguimiento o de terapia adyuvante (por patología concomitante o traslado a otro Centro)	25
12. Carcinoma oculto de mama	2
13. Quimioterapia neoadyuvante	98

- *Expresión tumoral del índice de proliferación Ki-67:*

La expresión media del índice de proliferación Ki-67 en la población a estudio fue de 25,03%, como se refleja en la siguiente tabla:

**Tabla 3.** Expresión tumoral del índice de proliferación Ki-67 (%).

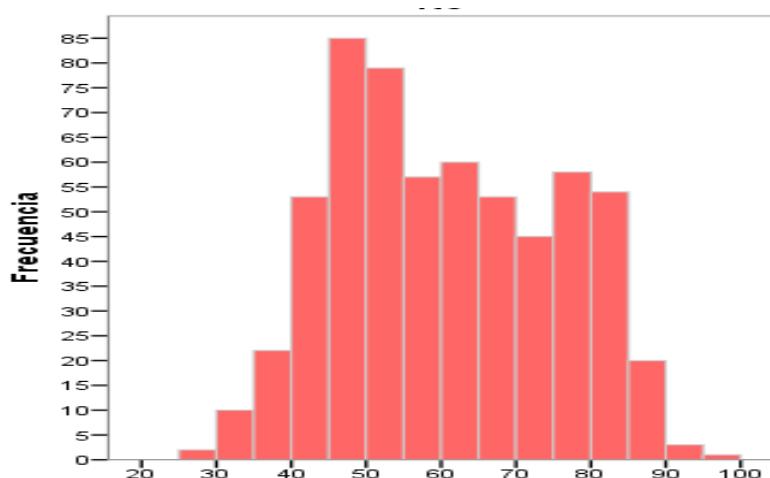
Ki-67 + %	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Media	Desviación típica
	602	0 %	95 %	20,00 %	25,03 %	23,73

## 5. 1. Correlación del índice de proliferación Ki-67 con los factores epidemiológicos en cáncer de mama.

- *Correlación de Ki-67 con la edad de la paciente en el momento del diagnóstico:*

La edad media de las pacientes fue de 60,18 años, con una desviación típica de 14,70 y un rango de 29 a 95 años.

**Figura 5.** Distribución de la población según la edad en el momento del diagnóstico.



Para realizar el análisis estadístico, la muestra se dividió en tres grupos: pacientes con edad  $\leq$  40 años, pacientes con edad > 40 y < 70 años y pacientes con edad  $\geq$  70 años.

**Tabla 4.** Distribución de la población en grupos de edad.

Grupos de edad		
	n	%
$\leq$ 40 años	49	8,1
> 40 - < 70 años	372	61,8
$\geq$ 70 años	181	30,1
Total	602	100,0

Al comparar el valor del índice de proliferación Ki-67 (%) en estos grupos de edad, se encontró que existían diferencias significativas entre las pacientes con edad  $\leq$  40 y las de edad > 40 y < 70 años, con un valor p de 0,041.

Las pacientes jóvenes, con edad igual o inferior a 40 años, presentaban valores más altos de Ki-67.

El resto de comparaciones entre grupos de edad no resultaron significativas.

**Tabla 5.** Índice de proliferación Ki-67 (%) según los grupos de edad.

Ki-67 (+%)	Grupos de edad								
	$\leq$ 40 años			> 40 y < 70 años			$\geq$ 70 años		
	N	Mediana	Media	N	Mediana	Media	N	Mediana	Media
Ki-67 (+%)	49	30,0%	31,0%	372	16,50%	25,52%	181	20,00%	22,41%

Significación Kruskal-Wallis	Comparaciones múltiples*		
	A-B	A-C	B-C
0,041	0,041	0,055	1,000

\*Grupos de edad: A:  $\leq$  40 años, B: > 40 y < 70 años y C:  $\geq$  70 años.

- *Correlación de Ki-67 con el estado menopáusico de la paciente en el momento del diagnóstico:*

El 66,1% de las pacientes eran postmenopáusicas en el momento del diagnóstico (n= 398). La edad media de menopausia se situó en los 49,31 años, con una desviación típica de 4,06 (rango 33 - 60 años).

Al comparar el valor del índice de proliferación Ki-67 (%) en las pacientes premenopáusicas y postmenopáusicas, no se encontraron diferencias significativas ( $p = 0,152$ ).

**Tabla 6.** Índice de proliferación Ki-67 (%) en las pacientes premenopáusicas y postmenopáusicas.

Menopausia	Ki-67 (+%)				Significación U Mann-Whitney
	N	Media	Desviación típica	Mediana	
No	204	26,82%	24,53	20,00%	0,152
Sí	398	24,11%	23,28	20,00%	

Posteriormente se repitió el análisis seleccionando únicamente el grupo de pacientes con una edad en el momento del diagnóstico comprendida entre 45 y 55 años (edad  $\geq 45$  y  $\leq 55$  años).

179 mujeres se situaban en esta franja de edad y de éstas, 61 eran postmenopáusicas (34%). En este grupo de edad, tampoco se encontraron diferencias significativas en el valor de Ki-67 al comparar a las pacientes premenopáusicas y postmenopáusicas.

**Tabla 7.** Índice de proliferación Ki-67 (%) en las pacientes premenopáusicas y postmenopáusicas, con edad comprendida entre 45 y 55 años.

Menopausia	Ki-67				Significación U Mann-Whitney
	N	Media	Desviación típica	Mediana	
No	118	24,97%	24,83	15,00%	0,826
Sí	61	27,00%	26,71	15,00%	

- *Correlación de Ki-67 con la paridad en el momento del diagnóstico:*

La población a estudio se dividió según la paridad en cuatro grupos: pacientes nulíparas, con un parto, con dos partos y con 3 o más partos.

**Tabla 8.** Distribución de la población según el tipo de paridad.

Paridad	n	%
Nulípara	76	12,6
1 parto	116	19,3
2 partos	263	43,7
3 o más partos	147	24,4
Total	602	100,0

Al analizar las diferencias en el índice de proliferación Ki-67 según el tipo de paridad, no se obtuvieron resultados significativos ( $p = 0,187$ ).

**Tabla 9.** Índice de proliferación Ki-67 (%) según la paridad.

	Paridad										Significación Kruskal-Wallis
	0 partos			1 ó 2 partos			3 o más partos				
	N	Mediana	Media	N	Mediana	Media	N	Mediana	Media		
<b>Ki-67 (+%)</b>	76	20,00%	28,72%	379	20,00%	24,43 %	147	15,00%	24,66 %	0,187	

- *Correlación de Ki-67 con el índice de masa corporal (IMC) en el momento del diagnóstico:*

La media del índice de masa corporal en nuestra muestra fue de 27,21 Kg/m<sup>2</sup>, con una desviación típica de 5,49. Aplicando la clasificación del IMC de la Organización Mundial de la Salud, el 37,0% de las pacientes presentaban sobrepeso y el 25,1% obesidad.

**Tabla 10.** Distribución de la población según el tipo de índice de masa corporal.

<i>Tipo de índice de masa corporal</i>		
	n	%
Bajo peso	8	1,3
Normal	220	36,5
Sobrepeso	223	37,0
Obesidad	151	25,1
<b>Total</b>	<b>602</b>	<b>100,0</b>

Al analizar el valor de Ki-67 según el tipo de índice de masa corporal, no se encontraron diferencias significativas ( $p= 0,140$ ). Para realizar este análisis, se agruparon las categorías de bajo peso y peso normal.

**Tabla 11.** Índice de proliferación Ki-67 según el tipo de índice de masa corporal.

	Tipo de índice de masa corporal										Significación Kruskal-Wallis	
	Bajo peso - Normal			Sobrepeso			Obesidad					
	N	Mediana	Media	N	Mediana	Media	N	Mediana	Media			
<b>Ki-67 (+%)</b>	228	20,00%	26,57 %	223	20,00%	25,43 %	151	10,00%	22,11 %	0,140		

Posteriormente se repitió el análisis estratificando la muestra según la clasificación molecular del cáncer de mama, dividiéndola en tumores de tipo Luminal A-like, Luminal B-like HER2 negativo, Luminal B-like HER2 positivo, HER2 y triple negativos. Al analizar la expresión de Ki-67 según el tipo de índice de masa corporal, no se obtuvieron diferencias significativas en ninguno de los subgrupos.

**Tabla 12.** Índice de proliferación Ki-67 según el tipo de índice de masa corporal, en los carcinomas de mama de tipo Luminal A- like:

	Tipo de índice de masa corporal										Significación Kruskal-Wallis	
	Bajo peso-Normal			Sobrepeso			Obesidad					
	N	Mediana	Media	N	Mediana	Media	N	Mediana	Media			
<b>Ki-67 (+%)</b>	59	5,00%	5,75%	67	5,00%	6,27%	53	5,00%	6,04%	0,950		

**Tabla 13.** Índice de proliferación Ki-67 según el tipo de índice de masa corporal, en los carcinomas de mama de tipo Luminal B- like HER2 negativo.

	Tipo de índice de masa corporal										Significación Kruskal-Wallis	
	Bajo peso-Normal			Sobrepeso			Obesidad					
	N	Mediana	Media	N	Mediana	Media	N	Mediana	Media			
<b>Ki-67 (+%)</b>	94	26,50%	29,60%	97	20,00%	27,45%	66	25,00%	30,33%	0,407		

**Tabla 14.** Índice de proliferación Ki-67 según el tipo de índice de masa corporal, en los carcinomas de mama de tipo Luminal B-like HER2 positivo.

	Tipo de índice de masa corporal									Significación Kruskal-Wallis	
	Bajo peso-Normal			Sobrepeso			Obesidad				
	N	Mediana	Media	N	Mediana	Media	N	Mediana	Media		
Ki-67 (+%)	42	30,00%	31,55%	24	25,00%	33,42%	16	12,00%	25,75%	0,412	

**Tabla 15.** Índice de proliferación Ki-67 según el tipo de índice de masa corporal, en los carcinomas de mama de tipo HER2 positivo.

	Tipo de índice de masa corporal									Significación Kruskal-Wallis	
	Bajo peso-Normal			Sobrepeso			Obesidad				
	N	Mediana	Media	N	Mediana	Media	N	Mediana	Media		
Ki-67 (+%)	12	35,00%	43,33%	10	25,00%	34,50%	6	32,50%	32,50%	0,488	

**Tabla 16.** Índice de proliferación Ki-67 según el tipo de índice de masa corporal, en los carcinomas de mama de tipo triple negativo.

	Tipo de índice de masa corporal									Significación Kruskal-Wallis	
	Bajo peso-Normal			Sobrepeso			Obesidad				
	N	Mediana	Media	N	Mediana	Media	N	Mediana	Media		
Ki-67 (+%)	21	50,00%	52,05%	25	70,00%	57,60%	10	35,00%	41,00%	0,391	

Por lo tanto, el único factor epidemiológico que parece asociarse con la expresión tumoral de Ki-67 en nuestro estudio, es la edad. Las pacientes con edad igual o inferior a 40 años, presentan valores más altos del índice de proliferación, que las pacientes con edades comprendidas entre 40 y 70 años.

Las comparaciones basadas en el resto de factores epidemiológicos (menopausia, edad de menopausia, paridad e IMC) no resultaron significativas.

## 5. 2. Correlación del índice de proliferación Ki-67 con otros factores anatomo-patológicos en cáncer de mama.

### - *Tipo de cirugía mamaria y axilar:*

#### Cirugía mamaria:

La distribución de la muestra según el tipo de cirugía mamaria realizada, se muestra en la siguiente tabla:

**Tabla 17.** Tipo de cirugía mamaria.

<i>Tipo de cirugía de mama</i>		
	<i>n</i>	<i>%</i>
Cirugía conservadora	354	58,8
Mastectomía	248	41,2
<b>Total</b>	<b>602</b>	<b>100,0</b>

#### Cirugía axilar:

El tipo de cirugía axilar más frecuente fue la linfadenectomía sin previa biopsia selectiva de ganglio centinela (BSGC), que supuso el 43,2% de la muestra.

Se realizó BSGC en 339 casos y en 87 de éstos se completó la cirugía con una linfadenectomía axilar (25,66% de las BSGC). En tres pacientes no se realizó cirugía axilar.

**Tabla 18.** Tipo de cirugía axilar.

<i>Tipo de cirugía axilar</i>		
	<i>n</i>	<i>%</i>
Sin cirugía axilar	3	0,5
Biopsia selectiva de ganglio centinela sin linfadenectomía posterior	252	41,9
Biopsia selectiva de ganglio centinela y posterior linfadenectomía	87	14,5
Linfadenectomía axilar	260	43,2
<b>Total</b>	<b>602</b>	<b>100,0</b>

- *Correlación de Ki-67 con el tipo histológico de cáncer de mama:*

El carcinoma ductal infiltrante supuso el 82,7% de los casos incluidos en el estudio, seguido por el carcinoma lobulillar infiltrante (11,5%) y el carcinoma mucinoso (3,2%).

**Tabla 19.** Tipo histológico de cáncer de mama.

<i>Tipo histológico de cáncer de mama</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
Cárcinoma ductal infiltrante	498	82,7
Cárcinoma lobulillar infiltrante	69	11,5
Cárcinoma mixto: ductal y lobulillar infiltrante	9	1,5
Cárcinoma mucinoso	19	3,2
Cárcinoma medular	2	0,3
Cárcinoma tubular	1	0,2
Cárcinoma adenoide quístico	1	0,2
Metaplásico	2	0,3
Cárcinoma de células claras	1	0,2
<b>Total</b>	<b>602</b>	<b>100,0</b>

**Tabla 20.** Índice de proliferación Ki-67 (%) según el tipo histológico de carcinoma de mama.

Tipo histológico de cáncer de mama	Ki-67 (+%)			Significación Kruskal-Wallis
	<i>N</i>	Mediana	Media	
Cárcinoma ductal infiltrante	498	20,00%	26,59%	0,022
Cárcinoma lobulillar infiltrante	69	15,00%	16,94%	
Mixto: ductal y lobulillar infiltrante	9	20,00%	27,22%	
Cárcinoma mucinoso	19	10,00%	11,53%	
Otros tipos	7	20,00%	27,57%	

Al analizar la expresión de Ki-67 según el tipo histológico de carcinoma de mama, se encontraron diferencias significativas ( $p= 0,022$ ). Sin embargo, ninguna de las comparaciones múltiples entre tipos histológicos resultó significativa. Esto podría deberse a que las diferencias entre grupos no eran muy extremas y al compararlos dos a dos, el valor crítico descendió considerablemente.

Los valores de  $p$  más cercanos a la significación estadística se obtuvieron al comparar el carcinoma ductal infiltrante con los carcinomas mucinoso y lobulillar infiltrante. El carcinoma ductal infiltrante presenta los valores más altos de Ki-67 y el carcinoma mucinoso es el que presenta los valores más bajos, seguido por el carcinoma lobulillar infiltrante.

**Tabla 21.** Resultado de las comparaciones múltiples del valor de Ki-67 (%) entre los tipos histológicos de carcinoma de mama.

Tipo histológico de cáncer de mama	Ki-67 (+%)			Comparaciones múltiples				
	N	Mediana	Media	Carcinoma ductal infiltrante	Carcinoma lobulillar infiltrante	Carcinoma mixto	Carcinoma mucinoso	Otros tipos
Carcinoma ductal infiltrante	498	20,00%	26,59%					
Carcinoma lobulillar infiltrante	69	15,00%	16,94%	0,197				
Mixto: ductal y lobulillar infiltrante	9	20,00%	27,22%	1,000	1,000			
Carcinoma mucinoso	19	10,00%	11,53%	0,134	1,000	0,823		
Otros tipos	7	20,00%	27,57%	1,000	1,000	1,000	0,896	

- *Correlación de Ki-67 con el tamaño tumoral en la pieza quirúrgica:*

El tamaño medio del foco tumoral principal fue de 2,73 cm, con una desviación típica de 2,73 y un rango de 0,10 - 20 cm.

**Tabla 22.** Distribución de la muestra según el tamaño tumoral, aplicando el sistema de estadiaje TNM (pT) .

TNM: pT	n	%
pT1	242	40,2
pT2	291	48,3
pT3	51	8,5
pT4	18	3,0
<b>Total</b>	<b>602</b>	<b>100,0</b>

Al clasificar la muestra según el estadio pT, se encontraron diferencias significativas en el valor del índice de proliferación Ki-67 ( $p= 0,015$ ).

Realizando el test de comparaciones múltiples se concluyó que las diferencias eran significativas entre los estadios pT1 y pT2, presentando los tumores con estadio pT1 los valores más bajos de Ki-67 ( $p= 0,030$ ).

**Tabla 23.** Índice de proliferación Ki-67 (%) según el estadio pT.

TNM: pT	Ki-67 (+%)			Significación Kruskal-Wallis	Comparaciones múltiples			
	N	Mediana	Media		pT1	pT2	pT3	pT4
pT1	242	12,00%	21,78%	0,015				
pT2	291	20,00%	27,21%		0,030			
pT3	51	20,00%	28,02%		0,265	1,000		
pT4	18	20,00%	26,00%		0,617	1,000	1,000	

- *Correlación de Ki-67 con la presencia de multifocalidad o multicentricidad tumoral en la pieza quirúrgica:*

La distribución de la muestra según la presencia o no de multifocalidad y multicentricidad, se refleja en la siguiente tabla:

**Tabla 24.** Tumores unifocales, multifocales y multicéntricos.

<b>Multifocalidad y multicentricidad</b>		
	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>Tumor unifocal</b>	442	73,4
<b>Tumor multifocal</b>	112	18,6
<b>Tumor multicéntrico</b>	48	8,0
<b>Total</b>	<b>602</b>	<b>100,0</b>

No se hallaron diferencias significativas al comparar el valor del índice de proliferación Ki-67 entre los tumores unifocales, multifocales y multicéntricos ( $p= 0,715$ ).

**Tabla 25.** Índice de proliferación Ki-67 (%) según la presencia de multifocalidad y multicentricidad.

	Multifocalidad y multicentricidad									Significación Kruskal-Wallis	
	Unifocal			Multifocal			Multicéntrico				
	N	Mediana	Media	N	Mediana	Media	N	Mediana	Media		
<b>Ki-67 (+%)</b>	442	20,00%	25,62 %	112	17,50%	23,42 %	48	20,00%	23,38 %	<b>0,715</b>	

- *Correlación de Ki-67 con la asociación a carcinoma ductal in situ en la pieza quirúrgica:*

En el 59,8% de casos el carcinoma infiltrante estaba asociado a carcinoma ductal in situ y en el 12% existía un carcinoma intraductal extenso asociado.

**Tabla 26.** Asociación a carcinoma ductal in situ.

<b>Asociación a carcinoma ductal in situ</b>	<i>n</i>	%
No asociación	170	28,2
Asociación a carcinoma ductal in situ	360	59,8
Asociación a carcinoma intraductal extenso	72	12,0
<b>Total</b>	<b>602</b>	<b>100,0</b>

No se encontraron diferencias significativas en el valor del índice de proliferación Ki-67 según la asociación o no del carcinoma infiltrante a carcinoma ductal in situ o a carcinoma intraductal extenso ( $p= 0,523$ ).

**Tabla 27.** Índice de proliferación Ki-67 (%) según la asociación a carcinoma ductal in situ o a carcinoma intraductal extenso.

	Asociación a carcinoma ductal in situ									Significación Kruskal-Wallis	
	No			Sí			Carcinoma intraductal extenso				
	<i>N</i>	Mediana	Media	<i>N</i>	Mediana	Media	<i>N</i>	Mediana	Media		
Ki-67 (+%)	170	20,00%	26,71 %	360	20,00%	24,62 %	72	15,00%	23,11 %	0,523	

- *Correlación de Ki-67 con el grado histológico combinado de Nottingham en la pieza quirúrgica:*

Se analizó el grado histológico combinado de Nottingham en 598 casos, al no constar este dato en el informe anatomo - patológico de 4 pacientes.

**Tabla 28.** Distribución del grado histológico combinado de Nottingham.

<i>Grado histológico combinado de Nottingham</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
<b>Grado 1</b>	144	24,1
<b>Grado 2</b>	294	49,2
<b>Grado 3</b>	160	26,8
<b>Total</b>	<b>598</b>	<b>100,0</b>

Se encontraron diferencias significativas en la expresión de Ki-67 según el grado histológico combinado de Nottingham ( $p= 0,000$ ). Realizando el test de comparaciones múltiples se concluyó que las diferencias eran significativas entre todos los grupos. Los tumores con grado histológico 3 presentan los valores de Ki-67 más altos y los de grado histológico 1 los más bajos.

**Tabla 29.** Índice de proliferación Ki-67 (%) según el grado histológico combinado de Nottingham.

	Grado histológico combinado de Nottingham								
	1			2			3		
	<i>N</i>	<i>Mediana</i>	<i>Media</i>	<i>N</i>	<i>Mediana</i>	<i>Media</i>	<i>N</i>	<i>Mediana</i>	<i>Media</i>
<b>Ki-67 (+%)</b>	144	5,00%	10,46%	294	15,00%	19,74%	160	40,00%	47,05%

Significación Kruskal-Wallis	Comparaciones múltiples		
	Grados 1 - 2	Grados 1 - 3	Grados 2 - 3
	0,000	0,000	0,000

- *Correlación de Ki-67 con la presencia de invasión linfovascular en la pieza quirúrgica:*

En 170 casos se objetivó la presencia de invasión linfovascular (28,2% de la muestra).

Los carcinomas de mama con invasión linfovascular presentaron valores significativamente más elevados de Ki-67 ( $p= 0,000$ ).

**Tabla 30.** Índice de proliferación Ki-67 (%) según la presencia o ausencia de invasión linfovascular.

Invasión linfovascular	Ki-67 (+%)				Significación U Mann-Whitney
	N	Media	Desviación típica	Mediana	
Ausente	432	22,95%	23,43	15,00%	0,000
Presente	170	30,31%	23,72	22,00%	

- *Determinación del perfil inmunohistoquímico del tumor:*

Las técnicas de inmunohistoquímica empleadas para determinar la expresión tumoral del receptor de estrógenos, receptor de progesterona, Ki-67, p53 y HER2, se realizaron en el 76,24% de casos (n= 459) en la biopsia del tumor previa a la cirugía mamaria, sin repetirse posteriormente.

Únicamente en 143 casos (23,75%) el perfil inmunohistoquímico se obtuvo a partir del estudio de la pieza de resección quirúrgica mamaria, distinguiéndose:

- 83 casos en los que no se habían realizado las técnicas de inmunohistoquímica antes de la cirugía mamaria debido a:
  - Obtención del diagnóstico de carcinoma de mama mediante punción aspirativa con aguja fina (PAAF).

- Obtención de muestra insuficiente para realizar las técnicas de IHQ en la biopsia tumoral.
- Ausencia de biopsia o PAAF previa a la cirugía mamaria.
- 60 casos en los que a pesar de haberse realizado las técnicas de IHQ en la biopsia tumoral, éstas se repitieron en la pieza de resección quirúrgica mamaria.

Por lo tanto, los datos procedentes del análisis inmunohistoquímico del tumor proceden del estudio de la biopsia tumoral preoperatoria en el 76,24% de casos y de la valoración de la pieza quirúrgica en el 23,75% restante.

*- Correlación de Ki-67 con la expresión tumoral del receptor de estrógeno:*

La mayoría de carcinomas presentaban expresión de receptores de estrógeno, estando ausente únicamente en el 15,1% de tumores.

**Tabla 31.** Expresión tumoral del receptor de estrógeno.

<i>Expresión del receptor de estrógenos</i>		
	<i>n</i>	%
Ausente (negativa)	91	15,1
Presente (positiva)	511	84,9
<b>Total</b>	<b>602</b>	<b>100,0</b>

El porcentaje medio de la expresión del receptor de estrógeno fue de 65,70% y de los 511 cánceres que lo expresaban, el 74,17% lo hacía con una intensidad fuerte (+++).

**Tabla 32.** Expresión tumoral del receptor de estrógeno: porcentaje e intensidad.

<i>Porcentaje del receptor de estrógenos (%)</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Mediana</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típica</i>
	602	0%	100%	80,00%	65,70%	33,98

<i>Intensidad del receptor de estrógenos</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
	<b>Negativo</b>	91
+	25	4,2
++	107	17,8
+++	379	63,0
<b>Total</b>	<b>602</b>	<b>100,0</b>

Al comparar el valor del índice de proliferación Ki-67 entre los tumores con o sin expresión del receptor de estrógeno, se encontraron diferencias significativas. Los cánceres de mama sin expresión del receptor de estrógenos presentan valores más altos de Ki-67 ( $p=0,000$ ).

**Tabla 33.** Índice de proliferación Ki-67 (%) según la expresión tumoral del receptor de estrógeno.

Expresión del receptor de estrógeno	Ki-67 (+%)				Significación U Mann-Whitney
	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desviación típica</i>	<i>Mediana</i>	
<b>Negativo</b>	91	48,33%	28,97	48,00%	<b>0,000</b>
<b>Positivo</b>	511	20,88%	20,03	15,00%	

- *Correlación de Ki-67 con la expresión tumoral del receptor de progesterona:*

El 75,4% de los carcinomas de mama resultaron ser positivos para la expresión de receptores de progesterona.

La media del porcentaje de expresión del receptor en las células tumorales fue del 41,21% y en el 44,5% de casos ésta se manifestaba con una intensidad fuerte (+++).

**Tabla 34.** Expresión tumoral del receptor de progesterona.

<i>Expresión del receptor de progesterona</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
Ausente (negativa)	148	24,6
Presente (positiva)	454	75,4
<b>Total</b>	<b>602</b>	<b>100,0</b>

**Tabla 35.** Expresión tumoral del receptor de progesterona: porcentaje e intensidad.

<i>Porcentaje del receptor de progesterona (%)</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Mediana</i>	<i>Media</i>	<i>Desviación típica</i>
	602	0%	100%	40,00%	41,21%	34,57

<i>Intensidad del receptor de progesterona</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
Negativo	148	24,6
+	46	7,6
++	140	23,3
+++	268	44,5
<b>Total</b>	<b>602</b>	<b>100,0</b>

Al analizar la asociación entre los valores del índice de proliferación Ki-67 y la expresión de receptores de progesterona, los resultados fueron similares a los obtenidos con los receptores de estrógenos, encontrando también diferencias

significativas ( $p= 0,000$ ). Los tumores que no expresan receptores de progesterona, presentan valores más altos de Ki-67.

**Tabla 36.** Índice de proliferación Ki-67 (%) según la expresión tumoral del receptor de progesterona.

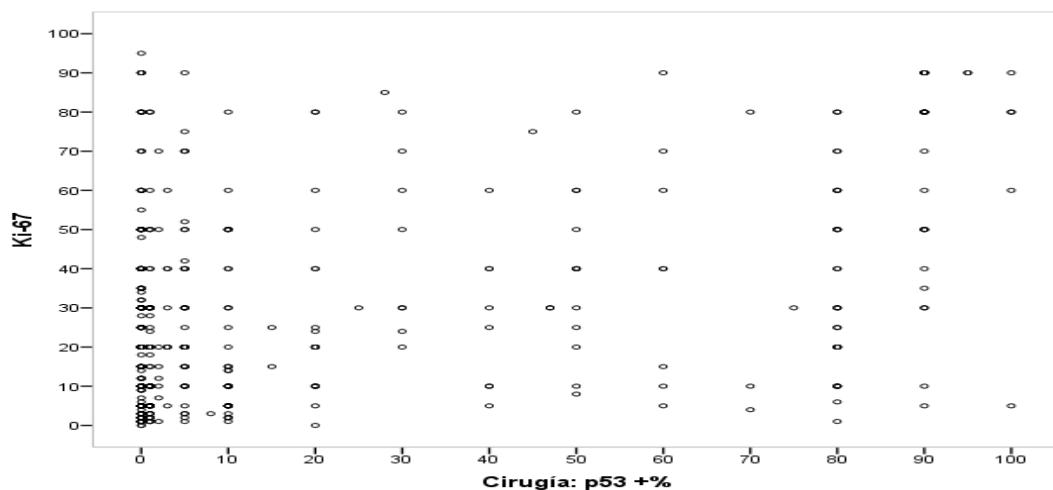
Expresión del receptor de progesterona	Ki-67 (+%)				Significación U Mann-Whitney
	N	Media	Desviación típica	Mediana	
<b>Negativo</b>	148	38,93%	29,25	30,00%	0,000
<b>Positivo</b>	454	20,50%	19,64	15,00%	

- *Correlación de Ki-67 con la expresión tumoral de p53:*

La determinación de p53 se realizó en 580 casos. La media de la expresión de p53 en nuestra muestra fue de 14,90%, con un rango comprendido entre 0 y 100%, mediana = 1% y desviación típica = 28,08.

Se observó asociación significativa entre los valores de Ki-67 y los de p53 (coeficiente de correlación de Spearman= 0,349 y  $p= 0,000$ ). Los valores altos de Ki-67 se asocian a valores altos de p53, aunque con una correlación baja, dado el coeficiente obtenido.

**Figura 6.** Índice de proliferación Ki-67 según la expresión tumoral de p53.



- *Correlación de Ki-67 con la expresión tumoral de HER2:*

El 18,3% de los carcinomas de mama (n= 110) presentaban sobreexpresión de HER2 detectada mediante inmunohistoquímica o amplificación génica detectada mediante técnicas de hibridación in situ.

Se encontraron diferencias significativas en el valor del índice de proliferación Ki-67 según la sobreexpresión o no de HER2 ( $p= 0,000$ ).

Los tumores que no presentaban sobreexpresión de HER2 (HER2 negativos), se asocian a valores más bajos de Ki-67.

**Tabla 37.** Índice de proliferación Ki-67 según la sobreexpresión de HER2.

HER2	Ki-67 (+%)				Significación U Mann-Whitney
	N	Media	Desviación típica	Mediana	
<b>Negativo</b>	492	23,31%	23,45	15,00%	<b>0,000</b>
<b>Positivo</b>	110	32,72%	23,53	30,00%	

- *Correlación de Ki-67 con el subtipo molecular de cáncer de mama, detectado mediante inmunohistoquímica:*

Al aplicar la clasificación molecular subrogada de cáncer de mama consensuada en la Conferencia de Saint Gallen 2013, a los resultados obtenidos del análisis inmunohistoquímico del tumor, se observó que el subtipo Luminal B-like HER2 negativo constituía el grupo mayoritario en nuestra población (42,7%), seguido por el subtipo Luminal A-like.

Solamente se registraron 28 casos (4,7%) de tumores de tipo HER2 positivo.

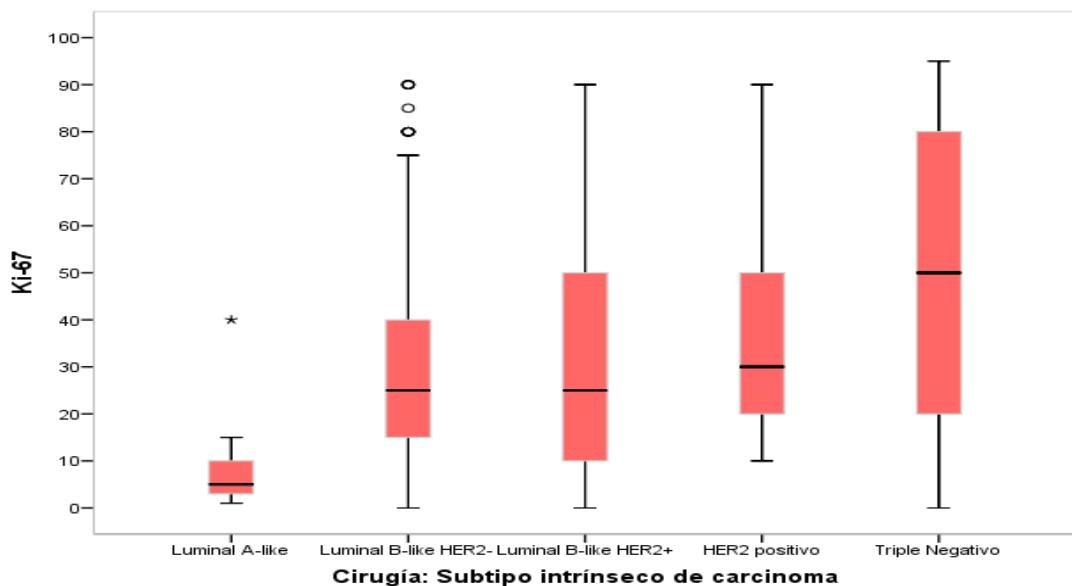
**Tabla 38.** Subtipos intrínsecos de cáncer de mama, obtenidos mediante inmunohistoquímica.

<i>Subtipos intrínsecos de carcinoma de mama</i>		
	<i>n</i>	%
Luminal A-like	179	29,7
Luminal B-like HER2 negativo	257	42,7
Luminal B-like HER2 positivo	82	13,6
HER2 positivo	28	4,7
Triple Negativo	56	9,3
<b>Total</b>	<b>602</b>	<b>100,0</b>

Al comparar el valor del índice de proliferación Ki-67 según el subtipo intrínseco de cáncer de mama, se observaron diferencias significativas ( $p=0,000$ ):

- Existen diferencias significativas entre el subtipo Luminal A-like y todos los demás subtipos de cáncer. Los tumores Luminal A-like presentan los valores más bajos de Ki-67.
- Existen diferencias significativas entre el subtipo triple negativo y los dos subtipos Luminal B-like (HER2 positivo y negativo). Los tumores triple negativos presentan los valores más altos de Ki-67.

**Figura 7.** Distribución de Ki-67 según los subtipos intrínsecos de cáncer de mama.



**Tabla 39.** Índice de proliferación Ki-67 (%) según los subtipos intrínsecos de cáncer de mama.

Subtipo intrínseco de carcinoma	Ki-67 (+%)			Significación Kruskal-Wallis
	N	Mediana	Media	
Luminal A-like	179	5,00%	6,03%	
Luminal B-like HER2 negativo	257	25,00%	28,98%	
Luminal B-like HER2 positivo	82	25,00%	30,96%	0,000
HER2 positivo	28	30,00%	37,86%	
Triple Negativo	56	50,00%	52,55%	

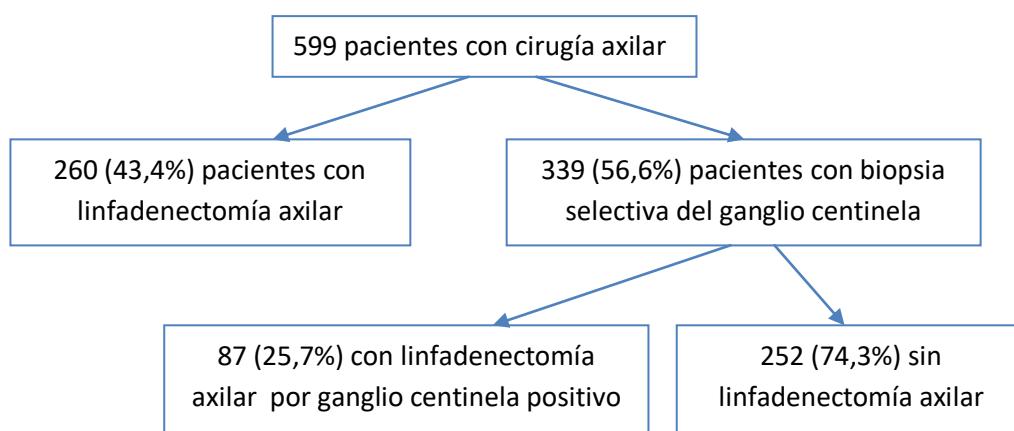
Subtipos intrínseco de carcinoma	Comparaciones múltiples				
	Luminal A	Luminal B HER2-	Luminal B HER2+	HER2 positivo	Triple Negativo
Luminal A-like					
Luminal B-like HER2 negativo	0,000				
Luminal B-like HER2 positivo	0,000	1,000			
HER2 positivo	0,000	0,522	0,605		
Triple Negativo	0,000	0,001	0,005	1,000	

### 5. 3. Correlación del índice de proliferación Ki-67 con la afectación ganglionar axilar

Se realizó cirugía axilar en todos los casos, excepto en tres pacientes con edades comprendidas entre los 83 y 93 años, en las que únicamente se llevó a cabo cirugía mamaria.

El tipo de cirugía axilar realizada en las 599 pacientes restantes, se muestra en el siguiente diagrama:

Figura 8. Tipo de cirugía axilar.



#### 5. 3. 1. Índice de proliferación Ki-67 como factor predictivo de macrometástasis en los ganglios axilares.

Los resultados anatomo - patológicos obtenidos al estudiar los ganglios axilares resecados en la totalidad de la muestra, se reflejan en la siguiente tabla:

**Tabla 40.** Afectación tumoral de los ganglios axilares.

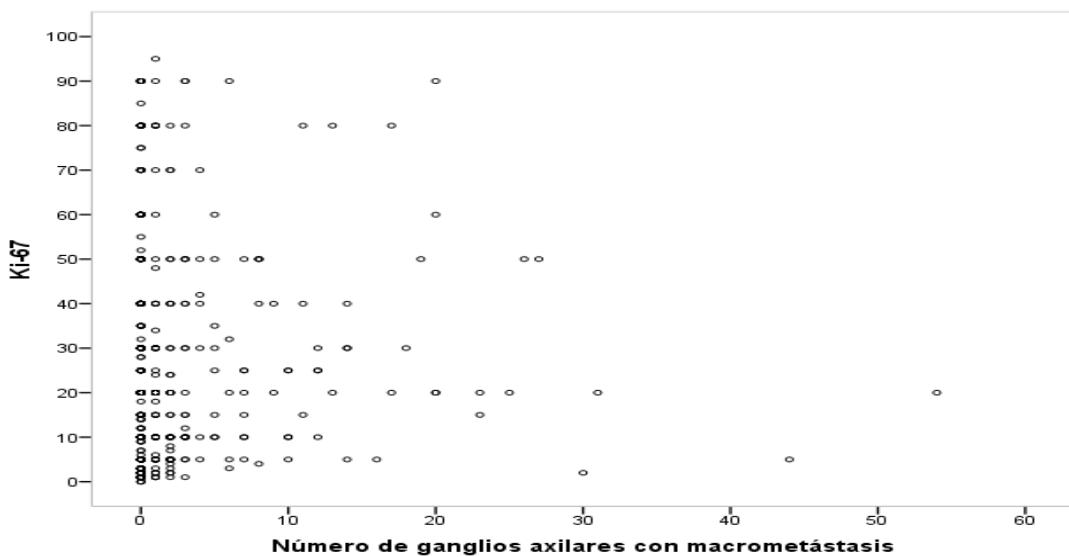
<b>Afectación ganglionar axilar</b>		
	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>Ganglios sin afectación tumoral</b>	323	53,9
<b>Células tumorales aisladas</b>	22	3,7
<b>Micrometástasis</b>	50	8,3
<b>Macrometástasis en 1-3 ganglios</b>	135	22,5
<b>Macrometástasis en 4-9 ganglios</b>	31	5,2
<b>Macrometástasis en 10 o más ganglios</b>	38	6,3
<b>Total</b>	<b>599</b>	<b>100,0</b>

204 pacientes (34,0%) tenían macrometástasis en los ganglios axilares y 50 pacientes (8,3%) presentaban micrometástasis. En el 53,9% de la población a estudio no se objetivó afectación tumoral ganglionar.

- La media del número total de ganglios axilares extraídos en cada caso fue de 14 ganglios (rango 0 - 58 ganglios), con una desviación típica de 11,93.
- La media del número de ganglios axilares con macrometástasis por caso fue de 1,82 ganglios (rango 0 - 54 ganglios), con una desviación típica de 5,05.
- La media del número de ganglios axilares con afectación tumoral extracapsular por caso fue de 0,73 ganglios (rango 0 - 44), con una desviación típica de 3,24.

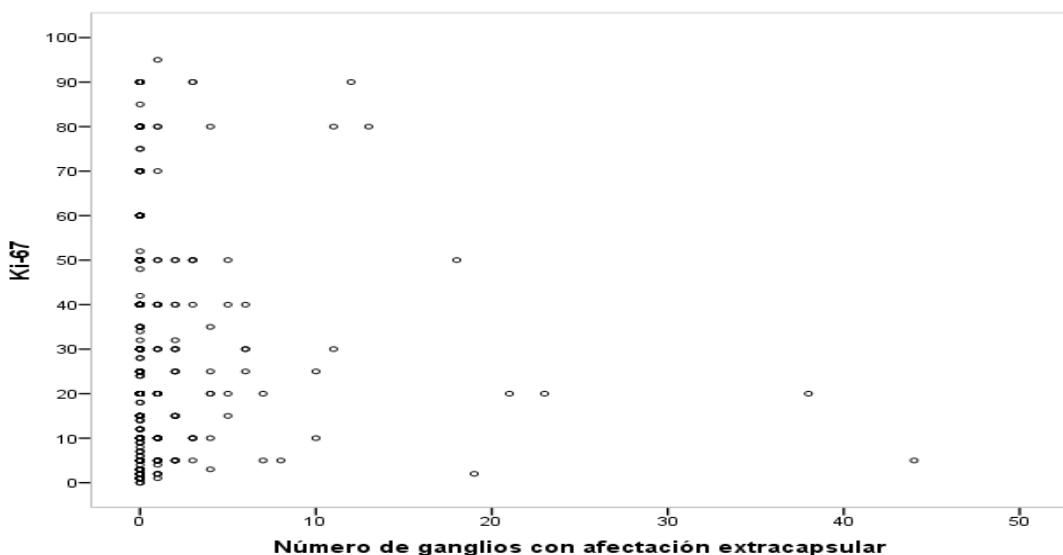
Al analizar la correlación entre el valor del índice de proliferación Ki-67 y el número total de ganglios axilares con macrometástasis extraídos, se encontró una asociación significativa, con un coeficiente de correlación de Spearman de 0,086 y  $p= 0,036$ . Valores altos de Ki-67 se asocian a un mayor número de ganglios axilares con macrometástasis, aunque dicha asociación es baja, dado el valor obtenido en el coeficiente.

**Figura 9.** Correlación entre el índice de proliferación Ki-67 (%) y el número de ganglios axilares con macrometástasis.



También se encontró asociación significativa entre la expresión de Ki-67 y el número de ganglios axilares con afectación tumoral extracapsular (coeficiente de correlación de Spearman de 0,086 y  $p= 0,036$ ). Los valores altos de Ki-67 se asocian a un mayor número de ganglios con afectación extracapsular, aunque al igual que ocurría con las macrometástasis, esta asociación es baja.

**Figura 10.** Correlación entre el índice de proliferación Ki-67 y el número de ganglios axilares con afectación extracapsular.



### Análisis bivariante:

Para determinar si el factor de proliferación Ki-67 es capaz de predecir de manera independiente la presencia de macrometástasis en los ganglios axilares, se realizó en primer lugar un análisis bivariante, dividiendo la variable afectación tumoral de los ganglios axilares en dos categorías: ausencia o presencia de macrometástasis.

Se analizaron tres posibles puntos de corte del índice de proliferación Ki-67, capaces de predecir el número de ganglios axilares con macrometástasis, basados en la bibliografía revisada: Ki-67  $\geq 10\%$ ,  $\geq 14\%$  y  $\geq 20\%$ .

Se obtuvieron resultados significativos con los puntos de corte de Ki-67  $\geq 10\%$  ( $p=0,003$ ) y Ki-67  $\geq 14\%$  ( $p=0,021$ ).

En el análisis del factor de proliferación Ki-67 se escogió el punto de corte de  $\geq 10\%$ , por ser el que había demostrado una mayor asociación estadística con la presencia de macrometástasis ganglionares.

**Tabla 41.** Punto de corte de Ki-67  $\geq 10\%$  como factor predictivo de macrometástasis en los ganglios axilares.

Ki-67(+%)	Número de ganglios axilares con macrometástasis				Significación U Mann-Whitney
	N	Media	Desviación típica	Mediana	
< 10%	173	1,15	4,48	0,00	0,003
$\geq 10\%$	427	2,09	5,25	0,00	

Como punto de corte de la variable p53 se utilizó el valor  $\geq 15\%$ , correspondiente a la media obtenida en la muestra.

Se aplicó el test de Chi-cuadrado de Pearson, con la corrección de Yates o la prueba exacta de Fisher en los casos en que fue necesario.

En el análisis bivariante, se concluyó que existe asociación estadística entre la presencia de macrometástasis en los ganglios axilares y las variables: tamaño tumoral ( $\geq$  pT2), grado histológico combinado de Nottingham (grado 3), Ki-67 ( $\geq 10\%$ ) y la presencia de invasión linfovascular (tabla 43).

No se pudo demostrar la relación entre las macrometástasis tumorales ganglionares y la expresión de p53, HER2 y los receptores de estrógeno y progesterona.

#### Análisis multivariante:

Se aplicó el análisis de regresión logística a las variables que habían resultado significativas en el análisis bivariante: tamaño tumoral (pT), grado histológico combinado de Nottingham, Ki-67  $\geq 10\%$  e invasión linfovascular.

Tras analizar diversos modelos de regresión, se concluyó que el que proporcionaba un mejor ajuste era el que incluía las variables: pT e invasión linfovascular (para 594 individuos):

$$P(\text{Sí}) = 1 / 1 + e^{-(1,940 + 1,138 \cdot \text{pT} + 1,690 \cdot \text{invasión linfovascular})}$$

El factor de proliferación Ki-67 se excluyó como factor de riesgo en el modelo de regresión logística.

**Tabla 42.** Factores de riesgo de macrometástasis en los ganglios axilares, según el modelo de regresión logística.

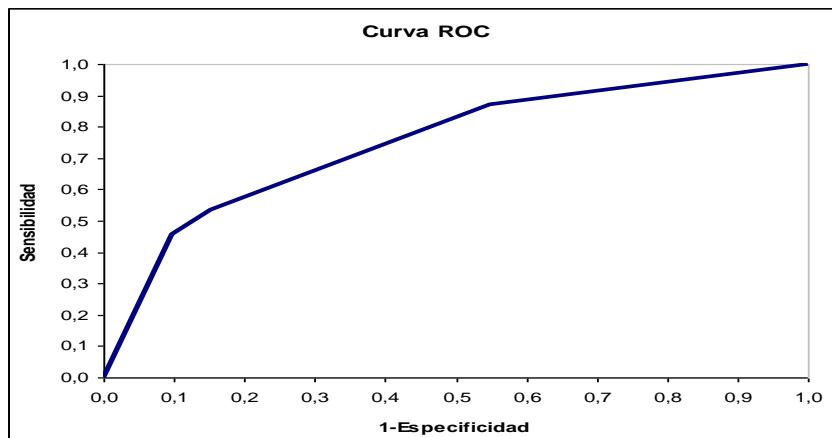
Factores de riesgo	Odds-ratio	Intervalo de confianza	p
pT : $\geq$ pT2	3,120	2,056 - 4,734	0,000
Invasión linfovascular presente	5,418	3,623 - 8,102	0,000

Según este modelo, la presencia de invasión linfovascular incrementa 5,418 veces el riesgo de macrometástasis ganglionares axilares y un estadio  $\geq$  pT2 lo aumenta 3,120 veces.

**Tabla 43.** Análisis bivariante de los factores predictivos de macrometástasis en los ganglios axilares.

Variable	Ausencia de macrometástasis en los ganglios axilares (n=395)	Presencia de macrometástasis en los ganglios axilares (n= 204)	p	Test utilizado
<b>TNM: pT</b>	395	204	<b>0,000</b>	Chi-cuadrado
<b>pT1</b>	200 (50,6%)	42 (20,6%)		
<b>≥ pT2</b>	195 (49,4%)	162 (79,4%)		
<b>Grado histológico combinado de Nottingham</b>	391	204	<b>0,021</b>	Chi-cuadrado
<b>1</b>	106 (27,1%)	36 (17,6%)		
<b>2</b>	190 (48,6%)	104 (51,0%)		
<b>3</b>	95 (24,3%)	64 (31,4%)		
<b>Ki-67</b>	395	205	<b>0,010</b>	Chi-cuadrado
<b>&lt; 10%</b>	128 (32,4%)	45 (22,0%)		
<b>≥ 10%</b>	267 (67,6%)	160 (78,0%)		
<b>p53</b>	383	195	0,107	Chi-cuadrado
<b>&lt; 15%</b>	305 (79,6%)	143 (73,3%)		
<b>≥ 15%</b>	78 (20,4%)	52 (26,7%)		
<b>HER2</b>	395	205	0,985	Chi-cuadrado
<b>Negativo</b>	322 (81,5%)	168 (82,0%)		
<b>Positivo</b>	73 (18,5%)	37 (18,0%)		
<b>Invasión linfovascular</b>	395	205	<b>0,000</b>	Chi-cuadrado
<b>Ausente</b>	335 (84,8%)	95 (46,3%)		
<b>Presente</b>	60 (15,2%)	110 (53,7%)		
<b>Receptor de estrógenos</b>	395	205	0,413	Chi-cuadrado
<b>Negativo</b>	56 (14,2%)	35 (17,1%)		
<b>Positivo</b>	339 (85,8%)	170 (82,9%)		
<b>Receptor de progesterona</b>	395	205	0,145	Chi-cuadrado
<b>Negativo</b>	89 (22,5%)	58 (28,3%)		
<b>Positivo</b>	306 (77,5%)	147 (71,7%)		

**Figura 11.** Curva ROC asociada al modelo de regresión logística para predecir la presencia de macrometástasis en los ganglios axilares.



El área bajo la curva ROC fue de 0,751 y la menor distancia desde el extremo superior izquierdo a la curva es la generada por la probabilidad 0,4.

Este modelo es capaz de predecir la presencia de macrometástasis ganglionares axilares con una especificidad de 84,9% y una sensibilidad de 53,2%.

### 5. 3. 2. Índice de proliferación Ki-67 como factor predictivo de macrometástasis en los ganglios axilares no centinelas, en caso de BSGC.

Para analizar el valor de Ki-67 como factor predictivo de macrometástasis en los ganglios no centinela, cuando se realiza una biopsia selectiva de ganglio centinela, se estudiaron los casos en los que se llevó a cabo una BSGC con posterior linfadenectomía axilar (n= 87 pacientes).

La media del número de ganglios centinela axilares analizados en cada caso fue de 2,06 ganglios (rango 1 - 5), con una desviación típica de 0,89.

La media del número de ganglios centinela axilares con macrometástasis por caso fue de 0,94 ganglios (rango 0 - 3), con una desviación típica de 0,74.

En 23 casos (26,7%) existía además afectación extracapsular en al menos uno de los ganglios centinela analizados.

Solamente en 20 de los 87 casos (23,0%) en que se realizó linfadenectomía axilar después de la BSGC, se detectaron macrometástasis en al menos uno de los ganglios no centinela.

La media del número de ganglios no centinela axilares con macrometástasis por caso fue de 1,53 ganglios (rango 0 - 52), con una desviación típica de 5,97.

#### Análisis bivariante:

Para determinar si el factor de proliferación Ki-67 es capaz de predecir de manera independiente la presencia de macrometástasis en los ganglios no centinela axilares , se realizó en primer lugar un análisis bivariante, dividiendo la variable macrometástasis en los ganglios no centinela axilares en dos categorías: ausencia o presencia de macrometástasis.

Se aplicó el test de Chi-cuadrado de Pearson, con la corrección de Yates o la Prueba exacta de Fisher en los casos en que fue necesario.

Para analizar el factor de proliferación Ki-67 se utilizaron los puntos de corte de  $\geq 10\%$ ,  $\geq 14\%$  y  $\geq 20\%$ , basándose en los datos revisados en la bibliografía, pero ninguno de ellos resultó significativo.

En el análisis bivariante, se concluyó que únicamente existe asociación estadística entre la presencia de macrometástasis en los ganglios no centinela axilares y la variable afectación extracapsular del ganglio centinela ( $p= 0,003$ ).

No se pudo demostrar la existencia de una relación entre la presencia de macrometástasis en los ganglios no centinela axilares y las variables: tamaño tumoral, Ki-67, HER2, invasión linfovascular, receptor de estrógenos, receptor de progesterona y número de ganglios centinelas con macrometástasis.

El tamaño tumoral (pT) y el número de ganglios centinela con macrometástasis, obtuvieron valores de p próximos al nivel de significación estadística ( $p= 0,063$  y  $0,059$  respectivamente) y es posible que con un mayor número de pacientes se hubiese obtenido un resultado más concluyente (tabla 44).

#### Análisis multivariante:

Se aplicó el análisis de regresión logística a las variables que habían resultado significativas en el análisis bivariante o muy próximas a la significación estadística: afectación extracapsular del ganglio centinela, pT y número de ganglios centinela con macrometástasis.

Tras analizar diversos modelos de regresión, se llegó a la conclusión de que el que proporcionaba un mejor ajuste era el que incluía únicamente la variable afectación extracapsular en el ganglio centinela (para 86 pacientes):

$$P(\text{Sí}) = \frac{1}{1 + e^{-(1,792 + 1,705 \text{Afectación Extracapsular GC})}}$$

**Tabla 44.** Factores de riesgo de macrometástasis en los ganglios no centinela axilares, según el modelo de regresión logística.

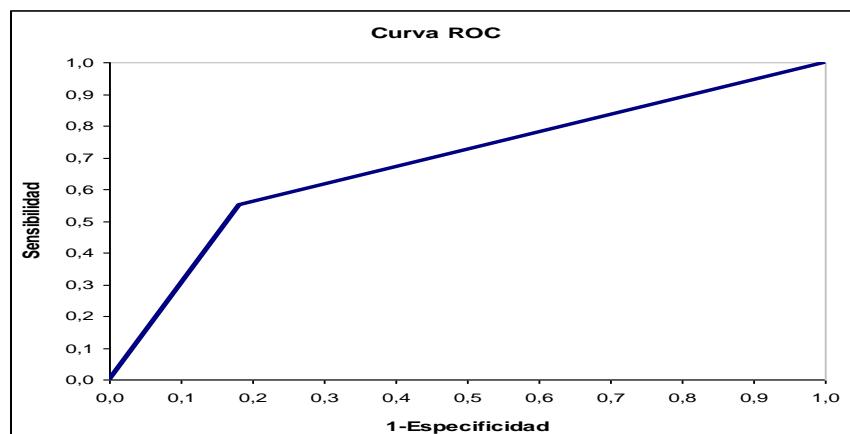
Factor de riesgo	Odds-ratio	Intervalo de confianza	p
Afectación extracapsular en el ganglio centinela	5,500	1,867 - 16,203	0,002

**Tabla 45.** Análisis bivariante de los factores predictivos de macrometástasis en los ganglios no centinela axilares.

Variable	Ausencia de macrometástasis en los ganglios no centinela axilares (n=67)	Presencia de macrometástasis en los ganglios no centinela axilares (n= 20)	p	Test utilizado
<b>TNM: pT</b>	66	20	0,063	Chi-cuadrado
<b>pT1</b>	25 (37,9%)	3 (15,0%)		
<b>≥ pT2</b>	41 (62,1%)	17 (85,0%)		
<b>Ki-67</b>	67	20	0,386	Chi-cuadrado
< 14%	33 (49,3%)	7 (35,0%)		
≥ 14%	34 (50,7%)	13 (65,0%)		
<b>HER2</b>	67	20	0,752	Fisher
<b>Negativo</b>	53 (79,1%)	17 (85,0%)		
<b>Positivo</b>	14 (20,9%)	3 (15,0%)		
<b>Invasión linfovascular</b>	67	20	0,290	Chi-cuadrado
<b>Ausente</b>	38 (56,7%)	8 (40,0%)		
<b>Presente</b>	29 (43,3%)	12 (60,0%)		
<b>Receptor de estrógenos</b>	67	20	1,000	Fisher
<b>Negativo</b>	8 (11,9%)	2 (10,0%)		
<b>Positivo</b>	59 (88,1%)	18 (90,0%)		
<b>Receptor de progesterona</b>	67	20	0,770	Fisher
<b>Negativo</b>	17 (25,4%)	4 (20,0%)		
<b>Positivo</b>	50 (74,6%)	16 (80,0%)		
<b>Número de ganglios centinela con macrometástasis</b>	67	20	0,059	Fisher
<b>&lt; 2 ganglios</b>	57 (85,1%)	13 (65,0%)		
<b>≥ 2 ganglios</b>	10 (14,9%)	7 (35,0%)		
<b>Afectación extracapsular en el ganglio centinela</b>	66	20	<b>0,003</b>	Chi-cuadrado
<b>Ausente</b>	54 (81,8%)	9 (45,0%)		
<b>Presente</b>	12 (18,2%)	11 (55,0%)		

Según este modelo, la presencia de afectación extracapsular en los ganglios centinela axilares, aumenta 5,500 veces el riesgo de presentar macrometástasis en los ganglios no centinela.

**Figura 12.** Curva ROC asociada al modelo de regresión logística para predecir la existencia de macrometástasis en los ganglios axilares no centinelas.



El área bajo la curva ROC fue de 0,684 y la menor distancia desde el extremo superior izquierdo a la curva es la que genera la probabilidad 0,2.

Este modelo es capaz de predecir la presencia de macrometástasis en los ganglios no centinela axilares con una especificidad de 81,8 % y una sensibilidad de 55,0%.

#### 5. 4. Evolución y supervivencia de las pacientes después de la cirugía mamaria.

##### *- Tratamiento adyuvante administrado después de la cirugía mamaria:*

Tras la cirugía mamaria el 98,3% de las pacientes recibieron algún tipo de tratamiento adyuvante con quimioterapia, radioterapia y / o hormonoterapia.

**Tabla 46.** Tipo de tratamiento adyuvante.

<i>Terapia adyuvante tras la cirugía mamaria</i>		
	<i>n</i>	<i>%</i>
No	10	1,7
Quimioterapia	24	4,0
Radioterapia	9	1,5
Hormonoterapia	97	16,1
Quimioterapia + radioterapia + hormonoterapia	238	39,5
Quimioterapia + radioterapia	46	7,6
Quimioterapia + hormonoterapia	56	9,3
Radioterapia + hormonoterapia	122	20,3
<b>Total</b>	<b>602</b>	<b>100,0</b>

#### Tratamiento quimioterápico adyuvante:

364 (60,4%) pacientes recibieron tratamiento quimioterápico después de la cirugía mamaria.

Los esquemas basados en la combinación de antraciclinas y taxanos fueron los más utilizados (51,6%), siendo el más habitual la combinación de docetaxel, adriamicina y ciclofosfamida (esquema TAC).

Otros esquemas empleados con frecuencia fueron los basados en antraciclinas sin taxanos (20,3%) y en taxanos sin antraciclinas (16,8%).

Además, todas las pacientes con sobreexpresión tumoral de HER2 (n= 110 casos), recibieron tratamiento adyuvante anti- HER2 con fármacos diana. En todos los casos el fármaco anti-HER2 empleado fue trastuzumab y en una paciente se administró la asociación de dos fármacos anti-HER2: pertuzumab y trastuzumab.

**Tabla 47.** Tipos de esquemas quimioterápicos adyuvantes.

<i>Tipo de quimioterapia adyuvante</i>		
	<i>n</i>	%
<b>Taxanos sin antraciclinas</b>	61	16,8
<b>Antraciclinas sin taxanos</b>	74	20,3
<b>Antraciclinas y taxanos</b>	188	51,6
<b>CMF (Ciclofosfamida + metotrexate + 5-fluororacilo)</b>	12	3,3
<b>Taxano semanal</b>	11	3,0
<b>Antraciclinas + taxanos + capecitabina</b>	11	3,0
<b>Vinorelbina</b>	4	1,1
<b>Carboplatino y taxano (esquema CT)</b>	3	0,8
<b>Total</b>		<b>364</b>
		<b>100,0</b>

#### Radioterapia:

429 (71,3%) pacientes recibieron algún tipo de radioterapia sobre la glándula mamaria, la pared costal y /o sobre las cadenas ganglionares.

Todas las pacientes tratadas con cirugía conservadora de mama (n= 354) recibieron radioterapia glandular acompañada en algunos casos de una sobreimpresión en el lecho tumoral (boost), excepto 3 pacientes ancianas con patología concomitante que no fueron radiadas.

Los tipos de tratamiento radioterápico aplicados se resumen en la siguiente tabla:

**Tabla 48.** Tipos de radioterapia.

<i>Tipos de radioterapia</i>		
	<i>n</i>	<i>%</i>
No radioterapia	173	28,7
Radioterapia glandular	328	55,5
Radioterapia en pared costal	23	3,8
Radioterapia en cadenas ganglionares	10	1,6
Radioterapia en pared costal + cadenas ganglionares	45	7,5
Radioterapia glandular + cadenas ganglionares	23	3,8
Total	602	100,0

#### Hormonoterapia:

Todas las pacientes cuyo tumor expresaba receptores hormonales (estrógeno y progesterona), recibieron hormonoterapia adyuvante con tamoxifeno, inhibidores de la aromatasa y / o análogos de la GnRH.

#### *- Periodo de seguimiento desde la fecha de la cirugía mamaria:*

La media del periodo de seguimiento de nuestra población a partir de la fecha de la cirugía mamaria fue de 64,90 meses (5,4 años), con un tiempo máximo de seguimiento de 132 meses (11 años) y mínimo de 1 mes.

## 5. 5. Correlación del índice de proliferación Ki-67 con la supervivencia libre de enfermedad en cáncer de mama.

Durante el periodo de seguimiento se registraron 63 casos de recidiva tumoral (10,46%): 8 recidivas locales, 3 recidivas regionales (axilares) y 52 casos de metástasis a distancia.

La supervivencia libre de enfermedad (SLE) media hasta la aparición de la recidiva en estas pacientes fue de 38,84 meses (3,24 años), con un rango de 4 a 108 meses (9 años).

Al analizar la correlación de Ki-67 con la aparición de recidivas tumorales, se encontró que el grupo con recidivas a distancia presentaba valores más altos de Ki-67, al compararlo con el grupo sin recidivas, en el test de comparaciones múltiples ( $p=0,035$ ).

Se repitió el análisis sin incluir la categoría recidiva regional (axilar) por la escasez de datos, obteniendo resultados similares.

**Tabla 49.** Índice de proliferación Ki-67 (%) según el tipo de recidiva.

Recidiva	Ki-67 (+%)			Significación Kruskal-Wallis
	N	Mediana	Media	
No recidiva	539	18,00%	24,47%	0,016
Recidiva local	8	12,50%	22,50%	
Recidiva regional (axilar)	3	50,00%	41,67%	
Recidiva a distancia	52	30,00%	30,23%	

Recidiva	Comparaciones múltiples				
	No recidiva	Local	Regional	A distancia	
No recidiva					
Recidiva local	1,000				
Recidiva regional (axilar)	0,523	0,747			
Recidiva a distancia	0,035	1,000	1,000		

También se encontraron diferencias significativas en el valor de Ki-67 según la localización de las recidivas a distancia ( $p= 0,044$ ), sin embargo las comparaciones múltiples no resultaron significativas. Esto puede ser debido a que las diferencias no eran muy extremas y al comparar grupos dos a dos, el valor crítico descendió considerablemente al tener que aplicar la corrección de Bonferroni.

A pesar de ello, se observó que el valor  $p$  más cercano al punto crítico es el que compara las recidivas en pulmón y en hueso. El grupo con metástasis en pulmón presenta valores más altos de Ki-67 y el grupo con metástasis óseas, valores más bajos.

**Tabla 50.** Índice de proliferación Ki-67 (%) según la localización de la recidiva a distancia.

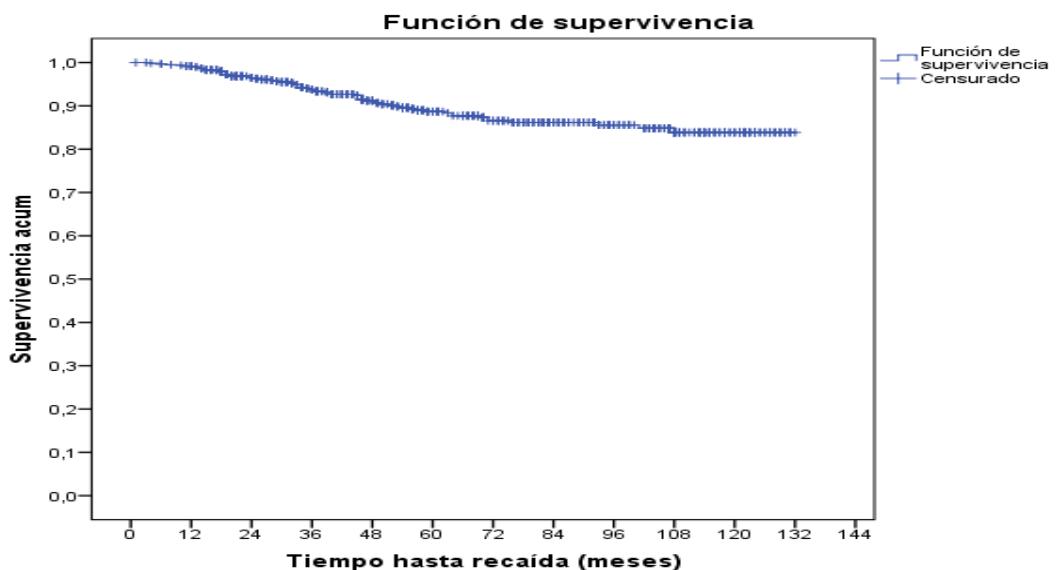
Tipo de recidiva a distancia	Ki-67 (+%)			Significación Kruskal-Wallis
	N	Mediana	Media	
Pulmón	15	40,00%	42,67%	<b>0,044</b>
Hígado	9	30,00%	27,22%	
Hueso	17	20,00%	25,71%	
Sistema nervioso central	4	20,00%	18,75%	
Otras localizaciones	7	30,00%	25,00%	

Tipo de recidiva a distancia	Comparaciones múltiples				
	Pulmón	Hígado	Hueso	Sistema nervioso central	Otras
Pulmón					
Hígado	0,884				
Hueso	0,056	1,000			
Sistema nervioso central	0,346	1,000	1,000		
Otras localizaciones	0,534	1,000	1,000	1,000	

### 5. 5. 1. Índice de proliferación Ki-67 como factor pronóstico de supervivencia libre de enfermedad en cáncer de mama.

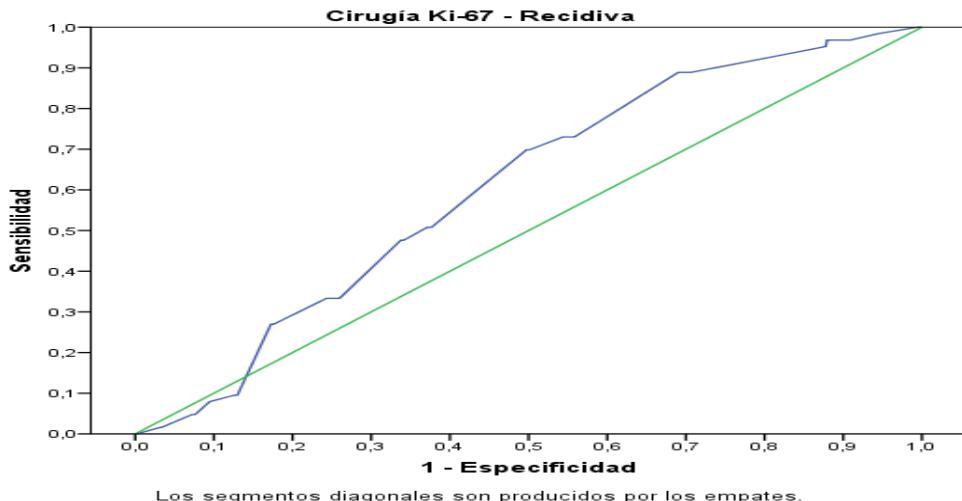
Se detectaron 63 casos (10,5%) de recidiva, con un tiempo máximo de seguimiento de 132 meses.

Figura 13. Curva de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad.



El punto de corte de del índice de proliferación Ki-67 capaz de predecir mejor la aparición de recidivas, se escogió analizando la curva ROC que se muestra en el gráfico nº 14.

Figura 14. Curva ROC de Ki-67 y la variable recidiva en cáncer de mama.



El área bajo la curva ROC es 0,607 y su valor p= 0,006, con lo que se concluye que Ki-67 tiene un moderado poder discriminatorio para la aparición de recidivas.

La menor distancia desde el extremo superior izquierdo a la curva resultó ser la generada por el valor de Ki-67= 19,00%. Éste valor de Ki-67  $\geq$  19,0 % predice la aparición de recidivas con una sensibilidad de 69,8% y una especificidad de 50,3%.

Otro posible punto de corte de Ki-67 sería 16,50%, con una sensibilidad de 69,8% y una especificidad de 49,9%.

**Tabla 51.** Sensibilidad y especificidad de los diferentes puntos de corte de Ki-67 para predecir la aparición de recidivas según la curva ROC.

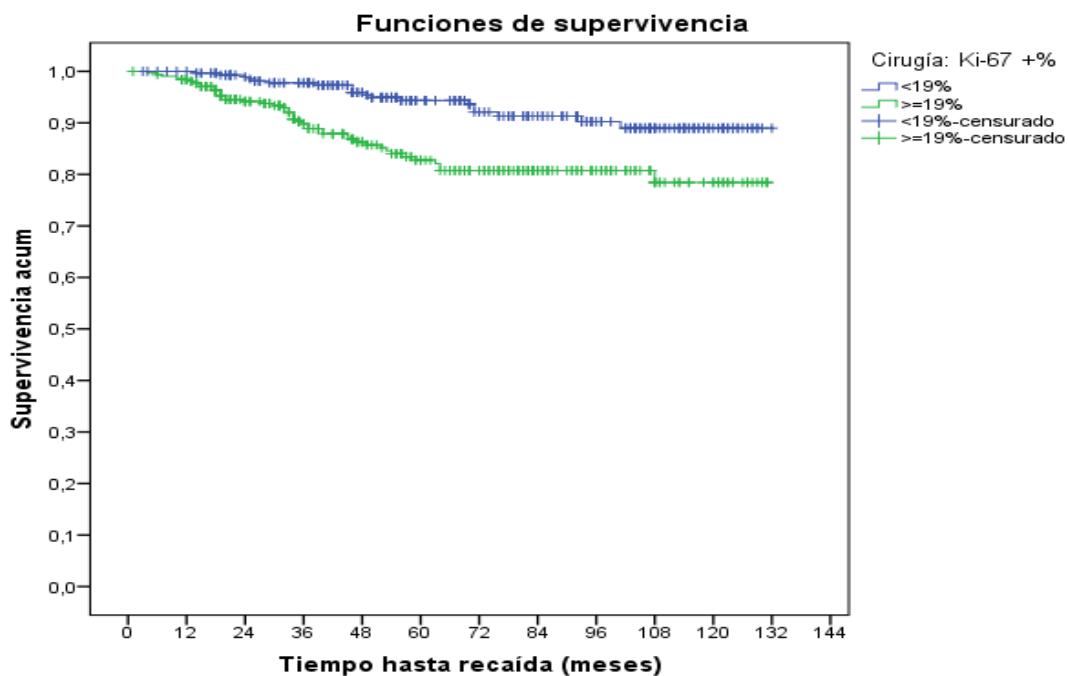
Positivo si Ki-67 (%) $\geq$	Sensibilidad	1-especificidad	Distancia al extremo
-1,00	1,000	1,000	1,000
0,50	1,000	0,994	0,994
1,50	0,984	0,944	0,944
2,50	0,968	0,909	0,910
3,50	0,968	0,879	0,880
4,50	0,952	0,878	0,879
5,50	0,889	0,707	0,716
6,50	0,889	0,703	0,712
7,50	0,889	0,698	0,706
8,50	0,889	0,696	0,705
9,50	0,889	0,690	0,699
11,00	0,730	0,558	0,620
13,00	0,730	0,549	0,612
14,50	0,730	0,544	0,607
16,50	0,698	0,501	0,585
<b>19,00</b>	<b>0,698</b>	<b>0,497</b>	<b>0,582</b>
22,00	0,508	0,377	0,620
24,50	0,508	0,371	0,616
26,50	0,476	0,341	0,625
29,00	0,476	0,338	0,623
31,00	0,333	0,260	0,715
33,00	0,333	0,256	0,714
34,50	0,333	0,254	0,713
37,50	0,333	0,243	0,710
41,00	0,270	0,176	0,751
45,00	0,270	0,174	0,751
49,00	0,270	0,173	0,750
51,00	0,095	0,130	0,914
53,50	0,095	0,128	0,914
57,50	0,095	0,126	0,914
65,00	0,079	0,095	0,925
72,50	0,048	0,076	0,955
77,50	0,048	0,072	0,955
82,50	0,016	0,033	0,985
87,50	0,016	0,032	0,985
92,50	0,000	0,002	1,000
96,00	0,000	0,000	1,000

### Curvas de Kaplan-Meier:

Al analizar las curvas de supervivencia libre de enfermedad, según el valor del índice de proliferación Ki-67 < 19% o  $\geq$  19%, se aprecia que entre ambos grupos existen diferencias en el tiempo hasta la recaída.

Utilizando el contraste de Mantel-Haenszel (log-rank) se concluyó que sí que existen diferencias significativas entre los dos grupos (estadístico= 13,393 y p= 0,000), siendo inferior la supervivencia libre de enfermedad en el grupo con Ki-67  $\geq$  19%.

**Figura 15.** Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad con la variable Ki-67 < o  $\geq$  19%.



También se analizaron las curvas de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad con las variables: edad, índice de masa corporal, menopausia, paridad, tipo histológico de cáncer de mama, estadio pT, multifocalidad - multicentricidad, asociación a carcinoma in situ, grado histológico combinado de Nottingham, p53, HER2, invasión linfovascular, receptor de estrógeno, receptor de progesterona y macrometástasis en los ganglios axilares.

Al aplicar el contraste de Mantel-Haenszel, se obtuvieron diferencias significativas de supervivencia libre de enfermedad en las variables: estadio pT, grado histológico combinado de Nottingham, invasión linfovascular, receptor de estrógeno, receptor de progesterona y macrometástasis en los ganglios axilares (tabla 52).

La supervivencia libre de enfermedad resultó ser inferior en los tumores con Ki-67  $\geq$  19%, estadio  $\geq$  pT2, grado histológico combinado de Nottingham  $\geq$  2, presencia de invasión linfovascular, receptor de estrógeno negativo, receptor de progesterona negativo y macrometástasis en los ganglios axilares.

#### Regresión de Cox:

Se utilizó el modelo de riesgo proporcional de Cox para identificar qué variables influyen en el tiempo de supervivencia libre de enfermedad, de forma conjunta.

Se estudiaron las variables que habían resultado significativas utilizando el estimador producto límite de Kaplan-Meier y el contraste de Mantel-Haenszel (log-rank) por parejas de grupos: Ki-67, estadio pT, grado histológico combinado de Nottingham, invasión linfovascular, receptor de estrógeno, receptor de progesterona y macrometástasis en los ganglios axilares.

La variable estadio pT se dividió en este caso en cuatro categorías: pT1, pT2, pT3 y pT4, por obtenerse de este modo un mejor modelo.

Se seleccionó un modelo de regresión de Cox multivariante con el método paso a paso hacia delante, por ser el que proporcionaba un mejor ajuste.

$$h(t) = [h_0(t)] \cdot e^{(B_1X_1 + B_2X_2 + \dots + B_pX_p)}$$

**Tabla 52.** Resumen de los resultados obtenidos en el análisis de la supervivencia libre de enfermedad con las curvas de Kaplan-Meier y el contraste de Mantel-Haenszel.

	Kaplan-Meier (análisis descriptivo)	Contraste de Mantel-Haenszel
<b>Ki-67 (&lt; 19% y ≥ 19%)</b>	Existen diferencias	Estadístico= 13,393 <b>p=0,000</b>
<b>Edad (≤ 40, &gt; 40 y &lt; 70, ≥ 70 años)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 0,064 p= 0,800
<b>Índice de masa corporal (bajo peso, normal, sobrepeso y obesidad)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 1,137 p= 0,286
<b>Menopausia (premenopausia y postmenopausia)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 0,010 p= 0,921
<b>Paridad (nulípara, 1 parto, 2 partos y 3 o más partos)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 0,957 p= 0,328
<b>Tipo histológico de cáncer de mama*</b>	No existen diferencias	Estadístico= 3,719 p= 0,445
<b>Estadio pT (pT1 y ≥ pT2)</b>	Existen diferencias	Estadístico= 53,679 <b>p= 0,000</b>
<b>Multifocalidad y multicentricidad**</b>	No existen diferencias	Estadístico= 0,051 p= 0,821
<b>Asociación a carcinoma intraductal</b>	No existen diferencias	Estadístico= 1,407 p= 0,495
<b>Grado histológico combinado de Nottingham (1, 2 y 3)</b>	Existen diferencias	Estadístico= 10,946 <b>p= 0,001</b>
<b>p53 (&lt; 15% y ≥ 15%)***</b>	No existen diferencias	Estadístico= 1,472 p= 0,225
<b>HER2 (positivo o negativo)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 0,097 p= 0,755
<b>Invasión linfovascular (presente o ausente)</b>	Existen diferencias	Estadístico= 44,001 <b>p= 0,000</b>
<b>Receptor de estrógeno (positivo o negativo)</b>	Existen diferencias	Estadístico= 12,015 <b>p= 0,001</b>
<b>Receptor de progesterona (positivo o negativo)</b>	Existen diferencias	Estadístico= 9,251 <b>p= 0,002</b>
<b>Macrometástasis en ganglios axilares (presentes o ausentes)</b>	Existen diferencias	Estadístico= 41,173 <b>p= 0,000</b>

\* La variable tipo histológico de cáncer de mama se dividió en: carcinoma ductal infiltrante, carcinoma lobulillar infiltrante, carcinoma mixto, carcinoma mucinoso y otros tipos de carcinoma.

\*\* La variable multifocalidad y multicentricidad se dividió en dos categorías: Tumores unifocales y tumores multifocales o multicéntricos.

\*\*\* Se escogió el punto de corte de p53  $\geq 15\%$ , por corresponder al valor de la media en la muestra.

Tras analizar diferentes posibilidades, se obtuvo el modelo de regresión de Cox para la supervivencia libre de enfermedad, que incluye las variables: estadio pT, Ki-67, invasión linfovascular y presencia de macrometástasis en los ganglios axilares.

**Tabla 53.** Modelo de regresión de Cox para la supervivencia libre de enfermedad por cáncer de mama.

Covariable	Estimación del coeficiente ( $B_i$ )	Significación estadística de la estimación	Significación	Exp( $B$ ) (Hazard ratio)	Intervalo de confianza (Hazard ratio) 95%
TNM: pT1			0,001		
TNM: pT2	1,192	0,452	0,008	3,295	1,360-7,985
TNM: pT3	1,728	0,512	0,001	5,630	2,065-15,351
TNM: pT4	2,139	0,569	0,000	8,493	2,784-25,907
Ki-67 %	0,593	0,282	0,036	1,809	1,041-3,145
Invasión linfovascular	0,776	0,296	0,009	2,172	1,215-3,882
Macrometástasis ganglionares	0,884	0,319	0,006	2,421	1,296-4,523

Según este modelo, las pacientes con un índice de proliferación Ki-67  $\geq 19\%$  tienen un riesgo de recidiva 1,809 veces superior al de las pacientes con Ki-67 < 19%, en cualquier unidad de tiempo.

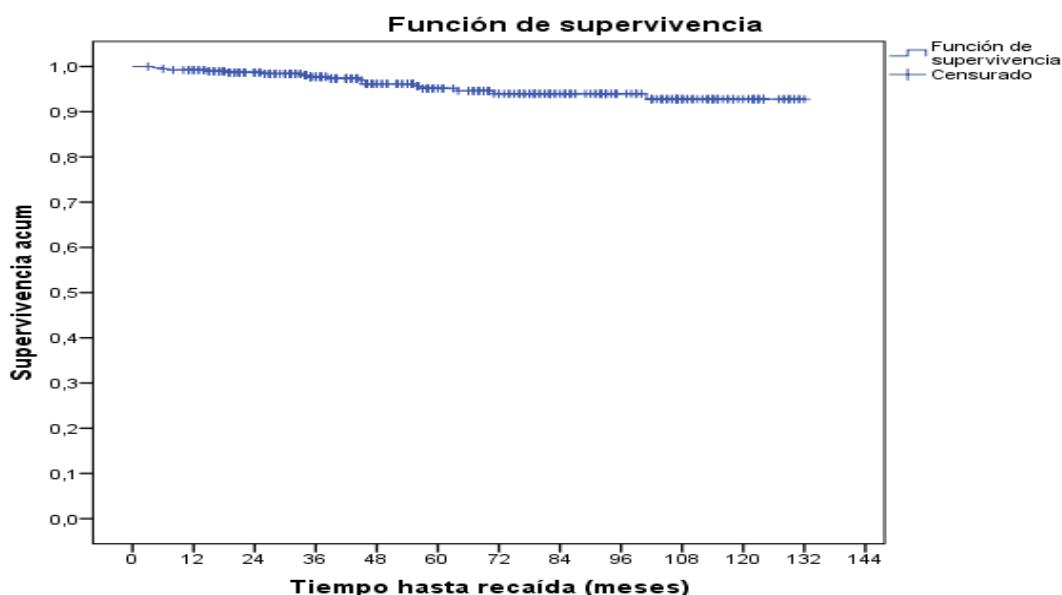
Las pacientes con estadio pT2 incrementan el riesgo de recaída 3,295 veces sobre las pacientes con tumores pT1. Los tumores pT3 lo incrementan 5,630 veces sobre pT1 y los tumores pT4 lo incrementan 8,493 veces.

Los carcinomas asociados a invasión linfovascular presentan un riesgo de recidiva 2,172 veces superior y la presencia de macrometástasis ganglionares lo incrementa 2,421 veces.

## 5. 5. 2. Índice de proliferación Ki-67 como factor pronóstico de supervivencia libre de enfermedad en las pacientes sin macrometástasis ganglionares axilares.

En el grupo de pacientes sin macrometástasis ganglionares ( $n= 395$ ) se detectaron 17 casos (4,30%) de recidiva, con un tiempo máximo de seguimiento de 132 meses.

**Figura 16.** Curva de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad en el grupo sin macrometástasis ganglionares axilares.



### Curvas de Kaplan-Meier:

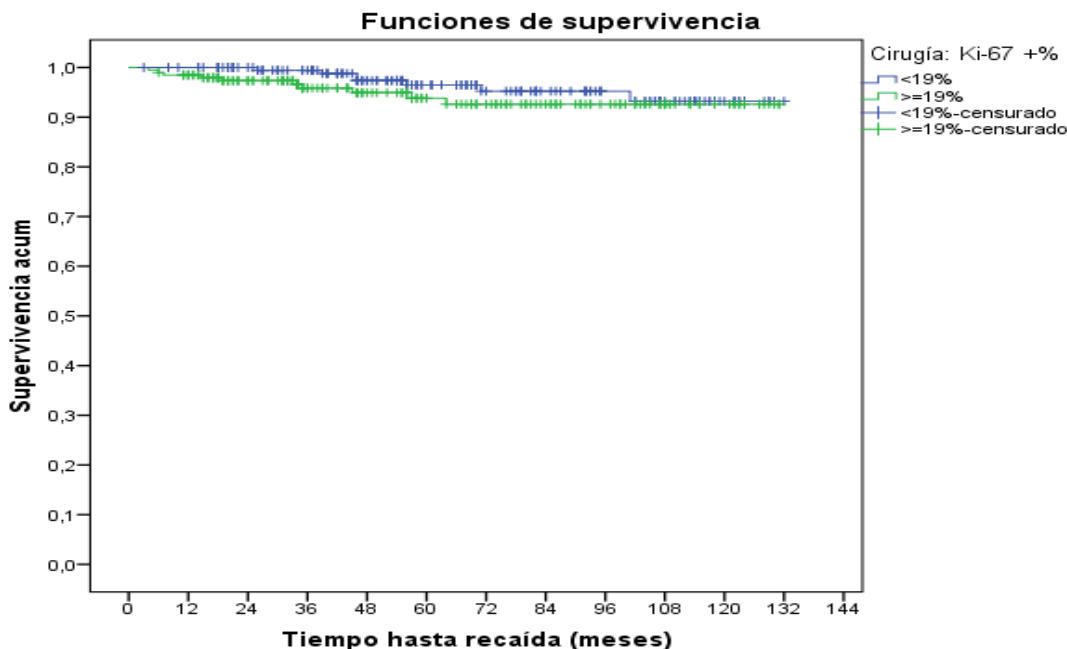
Para estudiar la relación del factor de proliferación Ki-67 con la supervivencia libre de enfermedad en las pacientes sin macrometástasis ganglionares, se escogió el mismo punto de corte que se había utilizado en el análisis de supervivencia sin tener en cuenta la afectación tumoral axilar:  $\text{Ki-67} < 0 \geq 19\%$ .

Al analizar las curvas de supervivencia libre de enfermedad según el valor de  $\text{Ki-67} < 19\% o \geq 19\%$ , se observó que entre ambos grupos no existen diferencias en el tiempo hasta la recaída.

Utilizando el contraste de Mantel-Haenszel (log-rank) se confirmó que no existen diferencias significativas entre los dos grupos (estadístico= 1,237 y  $p= 0,266$ ). Por lo

tanto, el índice de proliferación Ki-67 no se relaciona con la supervivencia libre de enfermedad en las pacientes sin macrometástasis ganglionares (utilizando como punto de corte  $\geq 19\%$ ).

**Figura 17.** Curva de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad con la variable Ki-67  $< o \geq 19\%$ , en el grupo de pacientes sin macrometástasis ganglionares axilares.



También se analizaron las curvas de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad en el grupo sin macrometástasis ganglionares, con las variables: edad, índice de masa corporal, menopausia, paridad, tipo histológico de cáncer de mama, estadio pT, multifocalidad - multicentricidad, asociación a carcinoma in situ, grado histológico combinado de Nottingham, p53, HER2, invasión linfovascular, receptor de estrógeno y receptor de progesterona.

Al aplicar el contraste de Mantel-Haenszel, se obtuvieron diferencias significativas en las variables: estadio pT, multifocalidad y multicentricidad, receptor de estrógeno y receptor de progesterona.

La supervivencia libre de enfermedad resultó ser inferior en los tumores sin macrometástasis ganglionares con: estadio pT  $\geq pT2$ , unifocales, receptor de estrógeno negativo y receptor de progesterona negativo (tabla 54).

**Tabla 54.** Resumen de los resultados obtenidos en el análisis de la supervivencia libre de enfermedad con las curvas de Kaplan-Meier y el contraste de Mantel-Haenszel en el grupo sin macrometástasis ganglionares.

	Kaplan-Meier (análisis descriptivo)	Contraste de Mantel-Haenszel
<b>Ki-67 (&lt; 19% y ≥ 19%)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 1,237 p= 0,266
<b>Edad (≤ 40, &gt; 40 y &lt; 70, ≥ 70 años)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 1,674 p= 0,196
<b>Índice de masa corporal (bajo peso, normal, sobrepeso y obesidad)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 1,130 p= 0,719
<b>Menopausia (premenopausia y postmenopausia)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 2,060 p= 0,151
<b>Paridad (nulípara, 1 parto, 2 partos y 3 o más partos)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 0,613 p= 0,434
<b>Tipo histológico de cáncer de mama*</b>	No existen diferencias	Estadístico= 2,640 p= 0,620
<b>Estadio pT (pT1 y ≥ pT2)</b>	Existen diferencias	Estadístico= 7,787 p= 0,005
<b>Multifocalidad y multicentricidad**</b>	Existen diferencias	Estadístico= 5,685 p= 0,017
<b>Asociación a carcinoma intraductal</b>	No existen diferencias	Estadístico= 3,084 p= 0,214
<b>Grado histológico combinado de Nottingham (1, 2 y 3)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 2,114 p= 0,146
<b>p53 (&lt; 15% y ≥ 15%)***</b>	No existen diferencias	Estadístico= 2,350 p= 0,125
<b>HER2 (positivo o negativo)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 0,194 p= 0,659
<b>Invasión linfovascular (presente o ausente)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 1,231 p= 0,267
<b>Receptor de estrógeno (positivo o negativo)</b>	Existen diferencias	Estadístico= 9,960 p= 0,002
<b>Receptor de progesterona (positivo o negativo)</b>	Existen diferencias	Estadístico= 6,825 p= 0,009

\* La variable tipo histológico de cáncer de mama se dividió en: Carcinoma ductal infiltrante, carcinoma lobulillar infiltrante, carcinoma mixto, carcinoma mucinoso y otros tipos de carcinoma.

\*\* La variable multifocalidad y multicentricidad se dividió en dos categorías: Tumores unifocales y tumores multifocales o multicéntricos.

\*\*\* Se escogió el punto de corte de p53 ≥ 15%, por corresponder al valor de la media en la muestra.

## Regresión de Cox:

Se utilizó el modelo de riesgo proporcional de Cox para identificar qué variables influyen en el tiempo de supervivencia libre de enfermedad en el grupo sin macrometástasis ganglionares, de forma conjunta.

Se estudiaron las variables que habían resultado significativas utilizando el estimador producto límite de Kaplan-Meier y el contraste de Mantel-Haenszel (log-rank) por parejas de grupos: estadio pT, multifocalidad - multicentricidad, receptor de estrógeno y receptor de progesterona.

La variable estadio pT se dividió en este caso en dos categorías: pT1 y  $\geq$  pT2, por obtenerse de este modo un mejor modelo.

Se seleccionó un modelo de regresión de Cox multivariante con el método paso a paso hacia delante, por ser el que proporcionaba un mejor ajuste.

$$h(t) = [h_0(t)] \cdot e^{(B_1X_1 + B_2X_2 + \dots + B_pX_p)}$$

Tras analizar diferentes posibilidades, se obtuvo el modelo de regresión de Cox para la supervivencia libre de enfermedad en los tumores sin macrometástasis ganglionares, que incluye las variables: estadio pT y receptor de estrógenos.

Se prescindió de la variable multifocalidad-multicentricidad, ya que al no presentar ningún evento en la categoría no unifocal, hace que el modelo no converja.

**Tabla 55.** Modelo de regresión de Cox para la supervivencia libre de enfermedad en las pacientes sin macrometástasis ganglionares.

<i>Covariable</i>	<i>Estimación del coeficiente (<math>B_i</math>)</i>	<i>Significación estadística de la estimación</i>	<i>Significación</i>	<i>Exp(<math>B</math>) (Hazard ratio)</i>	<i>Intervalo de confianza (Hazard ratio) 95%</i>
Estadio pT	1,463	0,640	0,022	4,319	1,231-15,151
Receptor de estrógenos	1,250	0,496	0,012	3,492	1,320-9,237

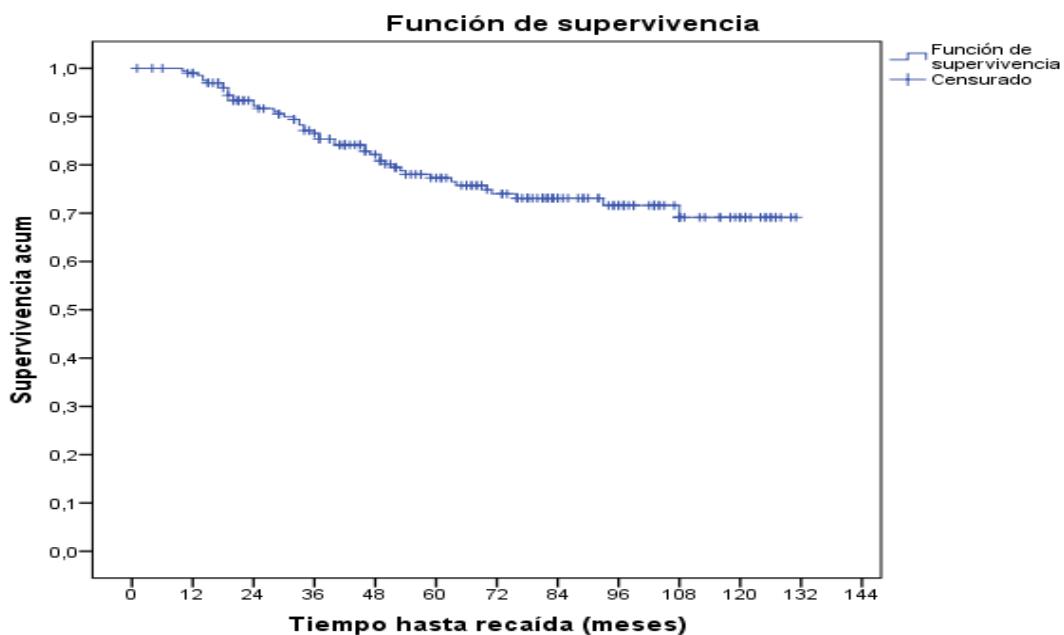
Según este modelo, las pacientes sin macrometástasis ganglionares, con un estadio pT  $\geq$  pT2, tienen un riesgo de recidiva 4,319 veces superior al de las pacientes con estadio pT1.

Y las pacientes sin macrometástasis ganglionares, con receptor de estrógeno negativo, incrementan su riesgo de recidiva 3,492 veces sobre las pacientes con receptor de estrógeno positivo, en cualquier unidad de tiempo.

### 5. 5. 3. Índice de proliferación Ki-67 como factor pronóstico de supervivencia libre de enfermedad en las pacientes con macrometástasis ganglionares axilares.

En el grupo de pacientes con macrometástasis ganglionares (n= 204) se detectaron 46 casos (22,54%) de recidiva, con un tiempo máximo de seguimiento de 132 meses.

Figura 18. Curva de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad en el grupo con macrometástasis ganglionares.



#### Curvas de Kaplan-Meier:

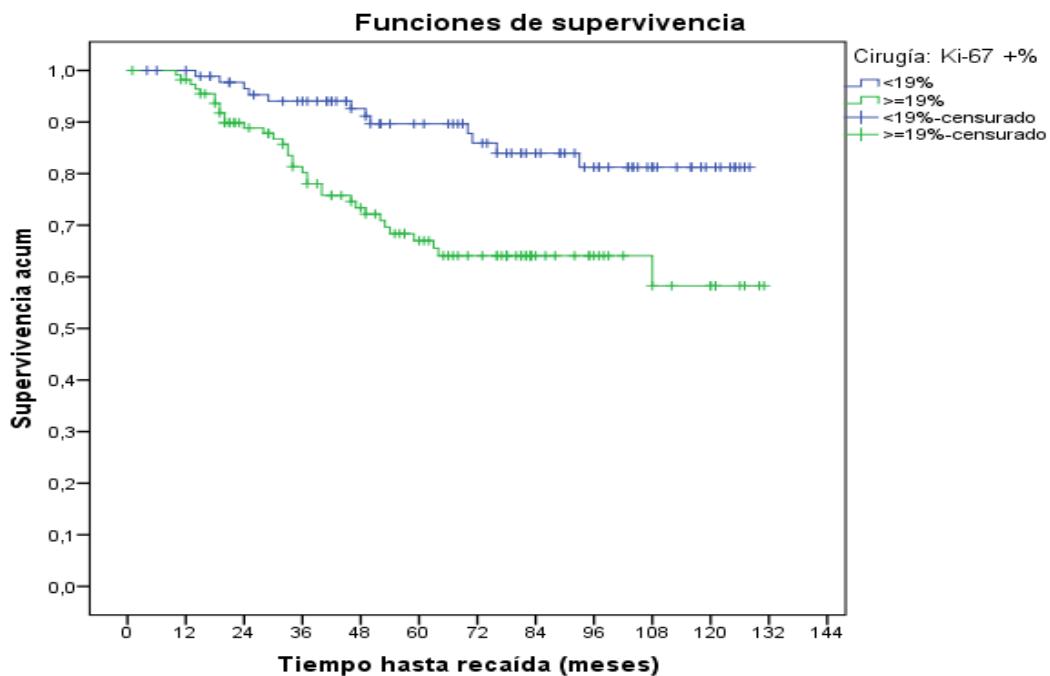
Para analizar la relación del factor de proliferación Ki-67 con la supervivencia libre de enfermedad en las pacientes con macrometástasis ganglionares axilares, se escogió el mismo punto de corte que se había utilizado en el análisis de la muestra sin tener en cuenta la afectación tumoral axilar:  $\text{Ki-67} < 0 \geq 19\%$ .

Al observar las curvas de supervivencia libre de enfermedad según el valor de  $\text{Ki-67} < 19\% \text{ o } \geq 19\%$ , se aprecia que entre ambos grupos existen diferencias en el tiempo hasta la recaída.

Utilizando el contraste de Mantel-Haenszel (log-rank) se concluyó que sí que existen diferencias significativas entre los dos grupos (estadístico= 10,232 y  $p= 0,001$ ).

Por lo tanto, el índice de proliferación Ki-67 se asocia con la supervivencia libre de enfermedad en las pacientes con macrometástasis ganglionares axilares (utilizando el punto de corte  $\geq 19\%$ ).

Figura 19. Curva de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad con la variable Ki-67 < o  $\geq$  19%, en el grupo de pacientes con macrometástasis ganglionares.



También se analizaron las curvas de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad con las variables: edad, índice de masa corporal, menopausia, paridad, tipo histológico de cáncer de mama, estadio pT, multifocalidad - multicentricidad, asociación a carcinoma in situ, grado histológico combinado de Nottingham, p53, HER2, invasión linfovascular, receptor de estrógeno y receptor de progesterona.

Al aplicar el contraste de Mantel-Haenszel en cada una de estas variables, se obtuvieron diferencias significativas en: estadio pT (pT1, pT2, pT3 y pT4), invasión linfovascular y grado histológico combinado de Nottingham (G1, G2 y G3). La supervivencia libre de enfermedad resultó ser inferior en los carcinomas con macrometástasis ganglionares, asociados a: Ki-67  $\geq 19\%$ , invasión linfovascular, mayor tamaño tumoral (pT) y mayor grado histológico de Nottingham (tabla 56).

La variable receptor de estrógeno (positivo o negativo), no obtuvo diferencias respecto al tiempo de supervivencia libre de enfermedad, aunque su valor  $p= 0,055$  está muy próximo a la significación estadística.

**Tabla 56.** Resumen de los resultados obtenidos en el análisis de la supervivencia libre de enfermedad con las curvas de Kaplan-Meier y el contraste de Mantel-Haenszel en el grupo con macrometástasis ganglionares.

	Kaplan-Meier (análisis descriptivo)	Contraste de Mantel-Haenszel
<b>Ki-67 (&lt; 19% y ≥ 19%)</b>	Existen diferencias	Estadístico= 10,232 <b>p= 0,001</b>
<b>Edad (≤ 40, &gt; 40 y &lt; 70, ≥ 70 años)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 0,184 p= 0,668
<b>Índice de masa corporal (bajo peso, normal, sobrepeso y obesidad)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 2,107 p= 0,147
<b>Menopausia (premenopausia y postmenopausia)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 0,326 p= 0,568
<b>Paridad (nulípara, 1 parto, 2 partos y 3 o más partos)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 0,306 p= 0,580
<b>Tipo histológico de cáncer de mama*</b>	No existen diferencias	Estadístico= 3,846 p= 0,427
<b>Estadio pT (pT1, pT2, pT3 y pT4)</b>	Existen diferencias	Estadístico= 21,329 <b>p= 0,000</b>
<b>Multifocalidad y multicentricidad**</b>	No existen diferencias	Estadístico= 0,562 p= 0,454
<b>Asociación a carcinoma intraductal</b>	No existen diferencias	Estadístico= 0,070 p= 0,966
<b>Grado histológico combinado de Nottingham (1, 2 y 3)</b>	Existen diferencias	Estadístico= 4,596 <b>p= 0,032</b>
<b>p53 (&lt; 15% y ≥ 15%)***</b>	No existen diferencias	Estadístico= 0,004 p= 0,949
<b>HER2 (positivo o negativo)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 0,014 p= 0,905
<b>Invasión linfovascular (presente o ausente)</b>	Existen diferencias	Estadístico= 14,575 <b>p= 0,000</b>
<b>Receptor de estrógeno (positivo o negativo)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 3,672 p= 0,055
<b>Receptor de progesterona (positivo o negativo)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 2,021 p= 0,155

\* La variable tipo histológico de cáncer de mama se dividió en: Carcinoma ductal infiltrante, carcinoma lobulillar infiltrante, carcinoma mixto, carcinoma mucinoso y otros tipos de carcinoma.

\*\* La variable multifocalidad y multicentricidad se dividió en dos categorías: Tumores unifocales y tumores multifocales o multicéntricos.

\*\*\* Se escogió el punto de corte de p53 ≥ 15%, por corresponder al valor de la media en la muestra.

## Regresión de Cox:

Se utilizó el modelo de riesgo proporcional de Cox para identificar qué variables influyen en el tiempo de supervivencia libre de enfermedad en los tumores con macrometástasis ganglionares, de forma conjunta.

Se estudiaron las variables que habían resultado significativas utilizando el estimador producto límite de Kaplan-Meier y el contraste de Mantel-Haenszel (log-rank): Ki-67, estadio pT, invasión linfovascular y grado histológico combinado de Nottingham.

La variable estadio pT se dividió en este caso en cuatro categorías (pT1, pT2, pT3 y pT4) por obtenerse de este modo un mejor modelo.

Se seleccionó un modelo de regresión de Cox multivariante con el método paso a paso hacia delante, por ser el que proporcionaba un mejor ajuste.

$$h(t) = [h_0(t)] \cdot e^{(B_1X_1 + B_2X_2 + \dots + B_pX_p)}$$

Tras analizar diferentes posibilidades, se obtuvo el modelo de regresión de Cox para la supervivencia libre de enfermedad en las pacientes con macrometástasis ganglionares axilares, que incluye las variables: invasión linfovascular, Ki-67 y estadio pT.

**Tabla 57.** Modelo de regresión de Cox para la supervivencia libre de enfermedad en las pacientes con macrometástasis ganglionares .

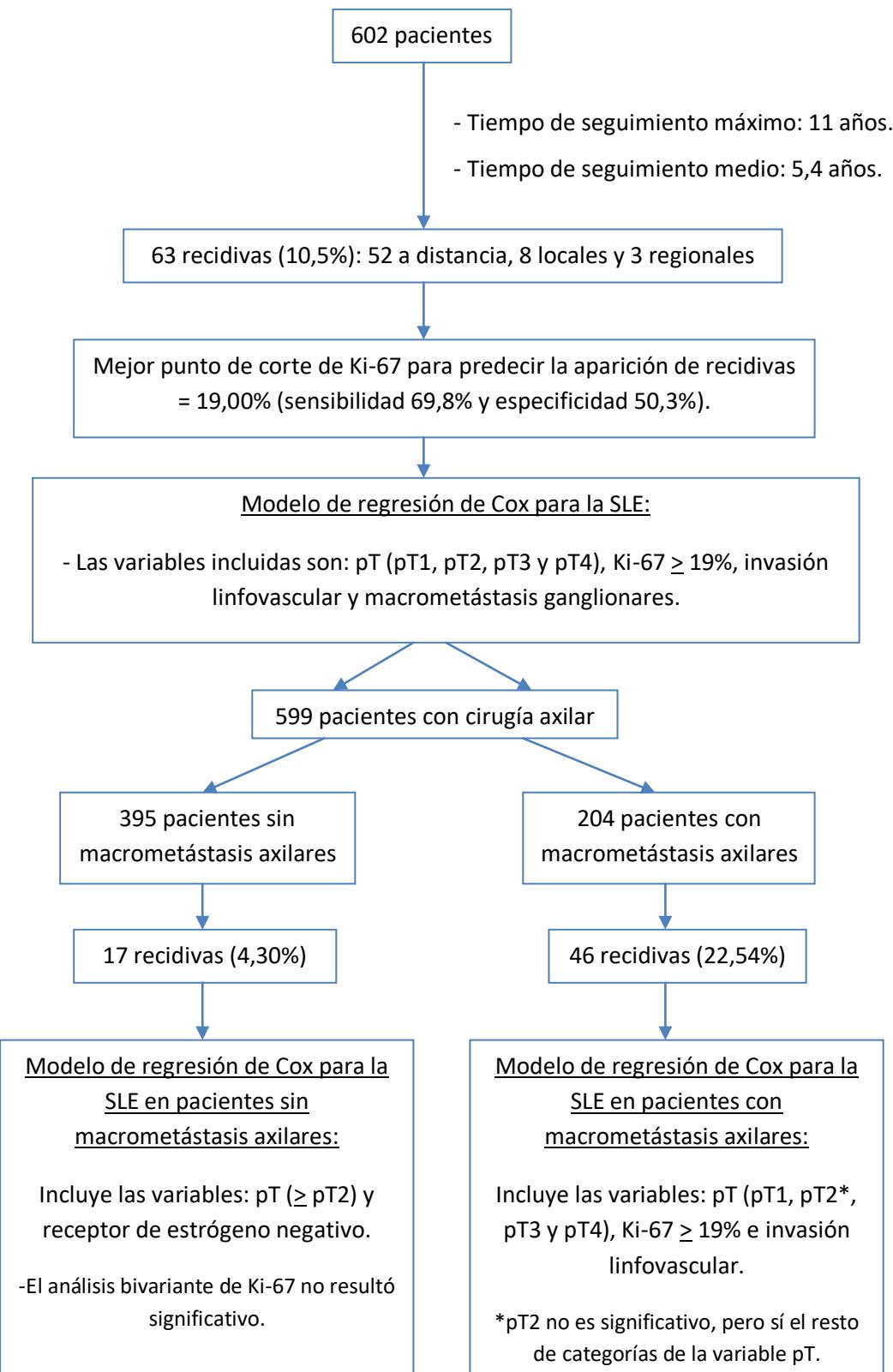
Covariable	Estimación del coeficiente ( $B_i$ )	Significación estadística de la estimación	Significación	Exp( $B$ ) (Hazard ratio)	Intervalo de confianza (Hazard ratio) 95%
Invasión linfovascular	0,907	0,372	0,015	2,478	1,196-5,133
Ki-67 ( $\geq 19\%$ )	0,679	0,346	0,050	1,972	1,001-3,887
pT1			0,007		
pT2	0,939	0,618	0,129	4,772	0,761-8,596
pT3	1,563	0,660	0,018	7,382	1,309-17,392
pT4	1,999	0,690	0,004	2,558	1,909-28,549

Según este modelo, las pacientes con ganglios axilares con macrometástasis e invasión linfovascular, tienen un riesgo de recidiva 2,478 veces superior al de las pacientes sin invasión linfovascular.

Las pacientes con ganglios axilares con macrometástasis y Ki-67  $\geq 19\%$ , incrementan su riesgo de recidiva 1,972 veces sobre las pacientes con Ki-67 < 19%, lo que equivale a un incremento en el riesgo de recidiva de un 97,2%.

Las pacientes con ganglios axilares con macrometástasis y estadio pT2 no presentan diferencias significativas respecto a las pacientes pT1. Las pacientes con estadio pT3 incrementan el riesgo de recaída 7,382 veces sobre el grupo pT1. Y las pacientes con estadio pT4 incrementan el riesgo de recaída 2,558 veces sobre las pacientes pT1, en cualquier unidad de tiempo.

**Figura 20.** Resumen de los resultados obtenidos al analizar el valor predictivo de supervivencia libre de enfermedad del índice de proliferación Ki-67, en el total de la muestra y según la presencia o no de macrometástasis en los ganglios axilares.



## 5. 6. Correlación del índice de proliferación Ki-67 con la supervivencia por cáncer de mama.

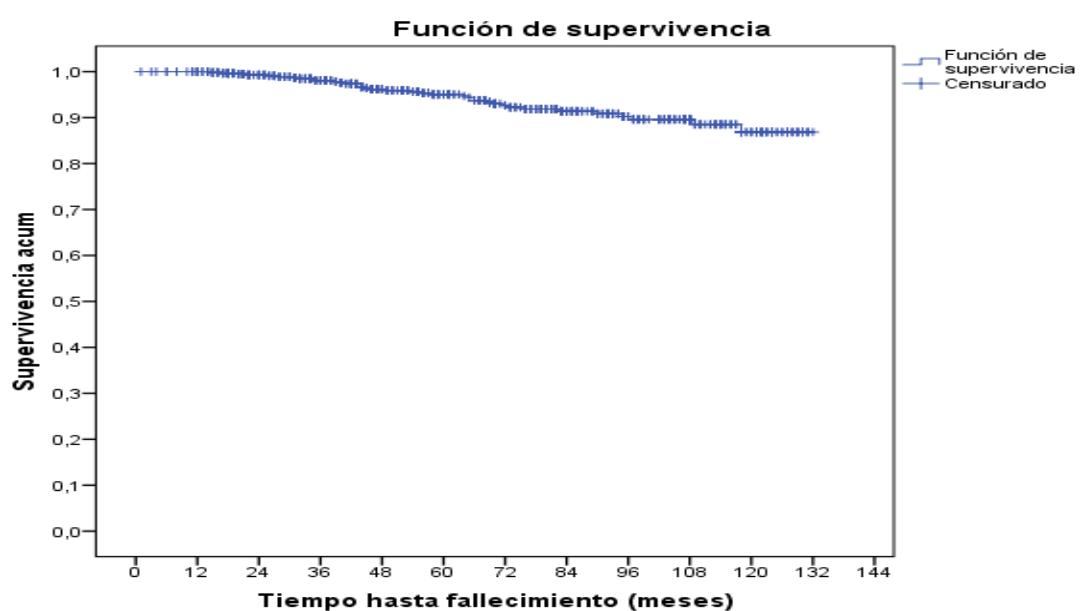
Durante el periodo de seguimiento se produjeron 78 éxitos (13%): 37 de los fallecimientos fueron debidos al carcinoma de mama (pacientes con metástasis a distancia todas ellas) y 41 se debieron a otras causas ajenas a su enfermedad.

Por lo tanto el 6,1% de la población falleció a causa de su carcinoma de mama (mortalidad específica por cáncer de mama).

### 5. 6. 1. Índice de proliferación Ki-67 como factor pronóstico de supervivencia por cáncer de mama.

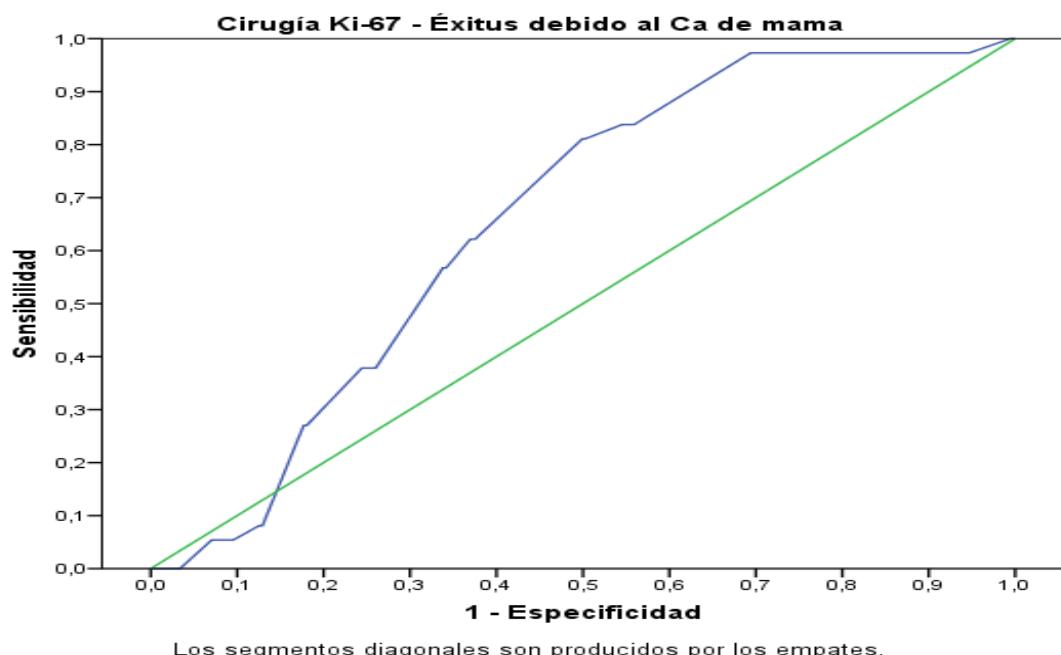
Se detectaron 37 éxitos por cáncer de mama (6,1%), con un tiempo máximo de seguimiento de 132 meses.

Figura 21. Curva de Kaplan-Meier de supervivencia por cáncer de mama.



El punto de corte de Ki-67 capaz de predecir mejor la mortalidad por cáncer de mama, se escogió analizando la curva ROC que se muestra en el gráfico nº 22.

Figura 22. Curva ROC de Ki-67 y la supervivencia por cáncer de mama.



El área bajo la curva es 0,659 y su valor  $p= 0,001$ , con lo que se concluye que Ki-67 tiene un regular poder discriminatorio para la mortalidad por cáncer de mama.

La menor distancia desde el extremo superior izquierdo a la curva resultó ser la generada por el valor de  $\text{Ki-67} = 24,50\%$ . El punto de corte de  $\text{Ki-67} \geq 24,50\%$  predice el éxitus por cáncer de mama con una sensibilidad de 62,2% y una especificidad de 63,0%.

Otros posibles puntos de corte fueron:  $\text{Ki-67} \geq 22,0\%$  con una sensibilidad de 62,2% y una especificidad de 62,5% y  $\text{Ki-67} \geq 19,0\%$  con una sensibilidad de 81,1% y una especificidad de 50,1%.

**Tabla 58.** Sensibilidad y especificidad de los diferentes puntos de corte de Ki-67 para predecir el éxitus por cáncer de mama según la curva ROC.

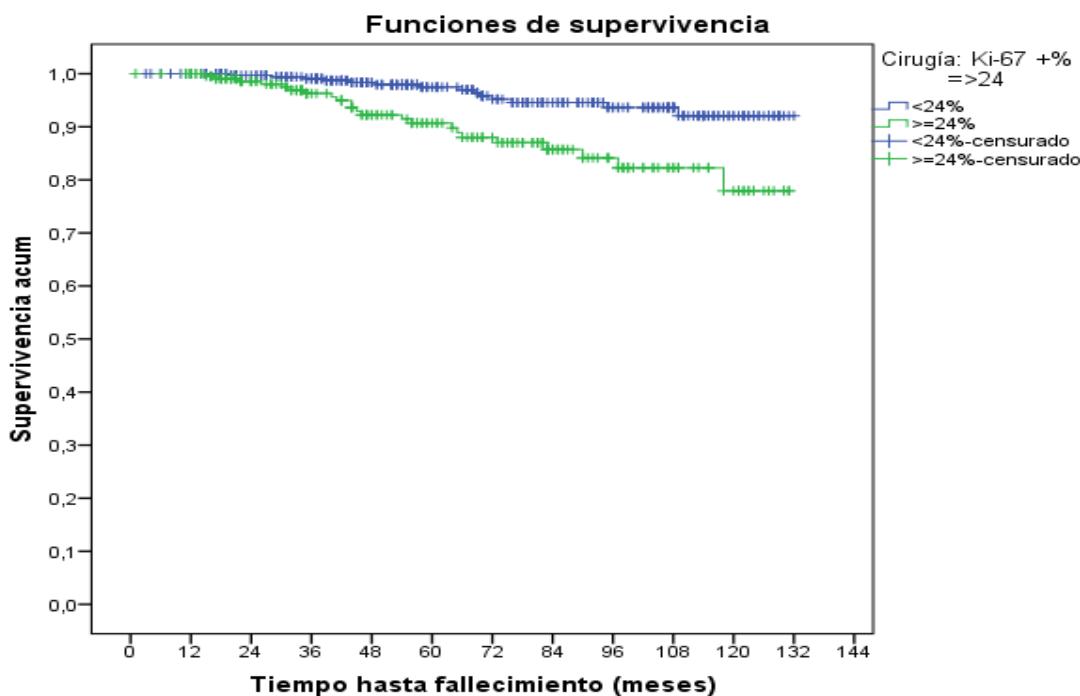
Positivo si Ki-67 (%) ≤	Sensibilidad	1-especificidad	Distancia al extremo
-1,00	1,000	1,000	1,000
0,50	1,000	0,995	0,995
1,50	0,973	0,947	0,947
2,50	0,973	0,912	0,912
3,50	0,973	0,883	0,884
4,50	0,973	0,880	0,880
5,50	0,973	0,710	0,710
6,50	0,973	0,706	0,707
7,50	0,973	0,701	0,701
8,50	0,973	0,699	0,700
9,50	0,973	0,694	0,694
11,00	0,838	0,559	0,582
13,00	0,838	0,550	0,574
14,50	0,838	0,545	0,569
16,50	0,811	0,503	0,537
19,00	0,811	0,499	0,534
22,00	0,622	0,375	0,533
<b>24,50</b>	<b>0,622</b>	<b>0,370</b>	<b>0,529</b>
26,50	0,568	0,342	0,551
29,00	0,568	0,338	0,549
31,00	0,378	0,260	0,674
33,00	0,378	0,257	0,673
34,50	0,378	0,255	0,672
37,50	0,378	0,244	0,668
41,00	0,270	0,181	0,752
45,00	0,270	0,179	0,751
49,00	0,270	0,177	0,751
51,00	0,081	0,129	0,928
53,50	0,081	0,127	0,928
57,50	0,081	0,126	0,927
65,00	0,054	0,096	0,951
72,50	0,054	0,074	0,949
77,50	0,054	0,071	0,949
82,50	0,000	0,034	1,000
87,50	0,000	0,032	1,000
92,50	0,000	0,002	1,000
96,00	0,000	0,000	1,000

#### Curvas de Kaplan-Meier:

Al analizar las curvas de supervivencia específica por cáncer de mama, según el valor de Ki-67 < 24% o ≥ 24%, se observó que entre ambos grupos existen diferencias en el tiempo hasta el éxitus.

Utilizando el contraste de Mantel-Haenszel (log-rank) se concluyó que sí que existen diferencias significativas entre los dos grupos (estadístico= 12,207 y p= 0,000), siendo inferior la supervivencia por cáncer de mama en el grupo con Ki-67 ≥ 24%.

Figura 23. Curva de Kaplan-Meier de supervivencia por cáncer de mama con la variable Ki-67 < o  $\geq$  24%.



También se analizaron las curvas de Kaplan-Meier de supervivencia por cáncer de mama con las variables: edad, índice de masa corporal, menopausia, paridad, tipo histológico de cáncer de mama, estadio pT, multifocalidad - multicentricidad, asociación a carcinoma in situ, grado histológico combinado de Nottingham, p53, HER2, invasión linfovascular, receptor de estrógeno, receptor de progesterona y macrometástasis en los ganglios axilares.

Al aplicar el contraste de Mantel-Haenszel en cada una de estas variables, se obtuvieron diferencias significativas en: estadio pT, grado histológico combinado de Nottingham, invasión linfovascular, receptor de estrógeno, receptor de progesterona y macrometástasis en los ganglios axilares (tabla 59).

Los tumores con Ki-67  $\geq 24\%$ , estadio  $\geq$  pT2, grado histológico combinado de Nottingham  $\geq 2$ , presencia de invasión linfovascular, receptor de estrógeno y progesterona negativo y macrometástasis ganglionares, presentan una peor supervivencia por cáncer de mama.

**Tabla 59.** Resumen de los resultados obtenidos en el análisis de la supervivencia por cáncer de mama con las curvas de Kaplan-Meier y el contraste de Mantel-Haenszel.

	Kaplan-Meier (análisis descriptivo)	Contraste de Mantel-Haenszel
<b>Ki-67 (&lt; 24% y ≥ 24%)</b>	Existen diferencias	Estadístico= 12,207 <b>p=0,000</b>
<b>Edad (≤ 40, &gt; 40 y &lt; 70, ≥ 70 años)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 0,239 p= 0,625
<b>Índice de masa corporal (Bajo peso, normal, sobrepeso y obesidad)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 0,038 p= 0,846
<b>Menopausia (Premenopausia y postmenopausia)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 0,079 p= 0,779
<b>Paridad (Nulípara, 1 parto, 2 partos y 3 o más partos)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 0,980 p= 0,322
<b>Tipo histológico de cáncer de mama*</b>	No existen diferencias	Estadístico= 3,887 p= 0,422
<b>Estadio pT (pT1 y ≥ pT2)</b>	Existen diferencias	Estadístico= 15,738 <b>p= 0,000</b>
<b>Multifocalidad y multicentricidad**</b>	No existen diferencias	Estadístico= 0,390 p= 0,532
<b>Asociación a carcinoma intraductal</b>	No existen diferencias	Estadístico= 0,588 p= 0,745
<b>Grado histológico combinado de Nottingham (1, 2 y 3)</b>	Existen diferencias	Estadístico= 12,103 <b>p= 0,001</b>
<b>p53 (&lt; 15% y ≥ 15%)***</b>	No existen diferencias	Estadístico= 0,018 p= 0,893
<b>HER2 (Positivo o negativo)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 0,321 p= 0,571
<b>Invasión linfovascular (Presente o ausente)</b>	Existen diferencias	Estadístico= 34,101 <b>p= 0,000</b>
<b>Receptor de estrógeno (Positivo o negativo)</b>	Existen diferencias	Estadístico= 5,541 <b>p= 0,019</b>
<b>Receptor de progesterona (Positivo o negativo)</b>	Existen diferencias	Estadístico= 5,731 <b>p= 0,017</b>
<b>Macrometástasis en ganglios axilares (Presentes o ausentes)</b>	Existen diferencias	Estadístico= 23,718 <b>p= 0,000</b>

\* La variable tipo histológico de cáncer de mama se dividió en: Carcinoma ductal infiltrante, carcinoma lobulillar infiltrante, carcinoma mixto, carcinoma mucinoso y otros tipos de carcinoma.

\*\* La variable multifocalidad y multicentricidad se dividió en dos categorías: Tumores unifocales y tumores multifocales o multicéntricos.

\*\*\* Se escogió el punto de corte de p53 ≥ 15%, por corresponder al valor de la media en la muestra.

## Regresión de Cox:

Se utilizó el modelo de riesgo proporcional de Cox para identificar qué variables influyen en el tiempo hasta el éxodo por cáncer de mama, de forma conjunta.

Se estudiaron las variables que habían resultado significativas utilizando el estimador producto límite de Kaplan-Meier y el contraste de Mantel-Haenszel (log-rank) por parejas de grupos: Ki-67, estadio pT, grado histológico combinado de Nottingham, invasión linfovascular, receptor de estrógeno, receptor de progesterona y macrometástasis en los ganglios axilares.

En estos casos la variable estadio pT se dividió en dos categorías: pT1 y  $\geq$  pT2, por obtenerse de este modo un mejor modelo.

Se seleccionó un modelo de regresión de Cox multivariante con el método paso a paso hacia delante, por ser el que proporcionaba un mejor ajuste.

$$h(t) = [h_0(t)] \cdot e^{(B_1 X_1 + B_2 X_2 + \dots + B_p X_p)}$$

Tras analizar diferentes posibilidades, se obtuvo el modelo de regresión de Cox para la supervivencia por cáncer de mama, que incluye las variables: estadio pT, Ki-67, invasión linfovascular y presencia de macrometástasis (tabla 60).

**Tabla 60.** Modelo de regresión de Cox para la supervivencia específica por cáncer de mama.

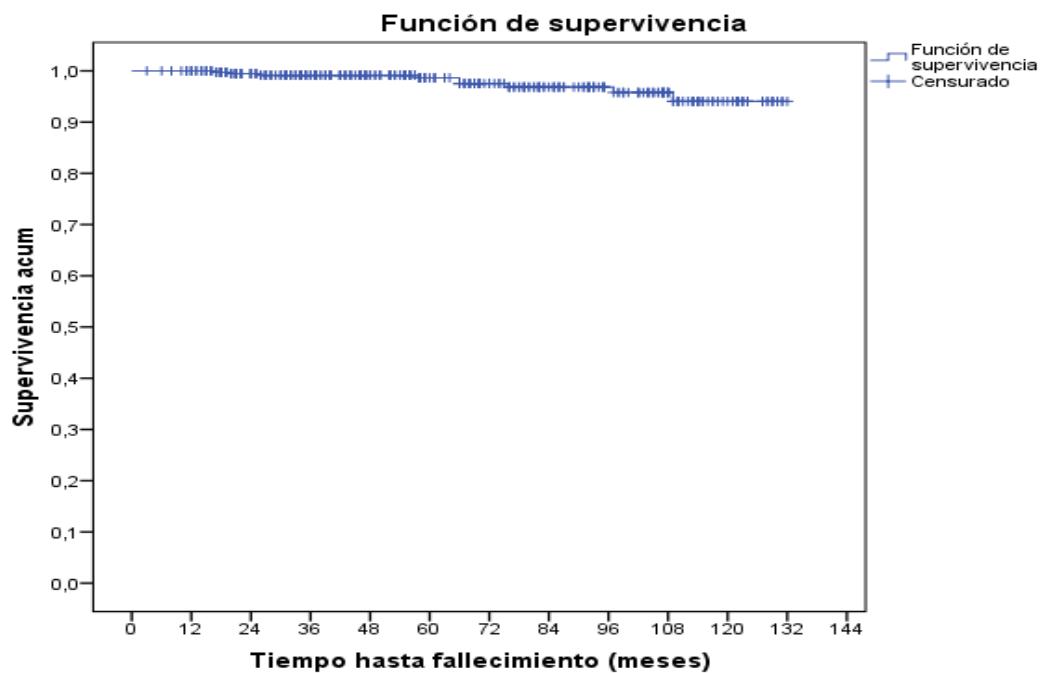
Covariable	Estimación del coeficiente ( $B_i$ )	Significación estadística de la estimación	Significación	$Exp(B)$ (Hazard ratio)	Intervalo de confianza (Hazard ratio) 95%
Ki-67 ( $\geq 24\%$ )	0,802	0,345	0,020	2,230	1,133-4,386
Invasión linfovascular	1,099	0,404	0,007	3,000	1,360-6,621
Macrometástasis ganglionares	0,890	0,424	0,036	2,434	1,061-5,587
Estadio pT ( $\geq$ pT2)	1,342	0,621	0,031	3,828	1,133-12,933

Según este modelo, las pacientes con un índice de proliferación Ki-67  $\geq 24\%$  tienen un riesgo de éxodo por cáncer de mama 2,230 veces superior al de las pacientes con Ki-67  $< 24\%$ , en cualquier unidad de tiempo.

#### 5. 6. 2. Índice de proliferación Ki-67 como factor pronóstico de supervivencia por cáncer de mama en las pacientes sin macrometástasis ganglionares axilares.

En el grupo de pacientes sin macrometástasis ganglionares ( $n= 395$ ) se detectaron 9 casos (2,27%) de muerte por cáncer de mama, con un tiempo máximo de seguimiento de 132 meses.

Figura 24. Curva de Kaplan-Meier de supervivencia por cáncer de mama en el grupo sin macrometástasis ganglionares.



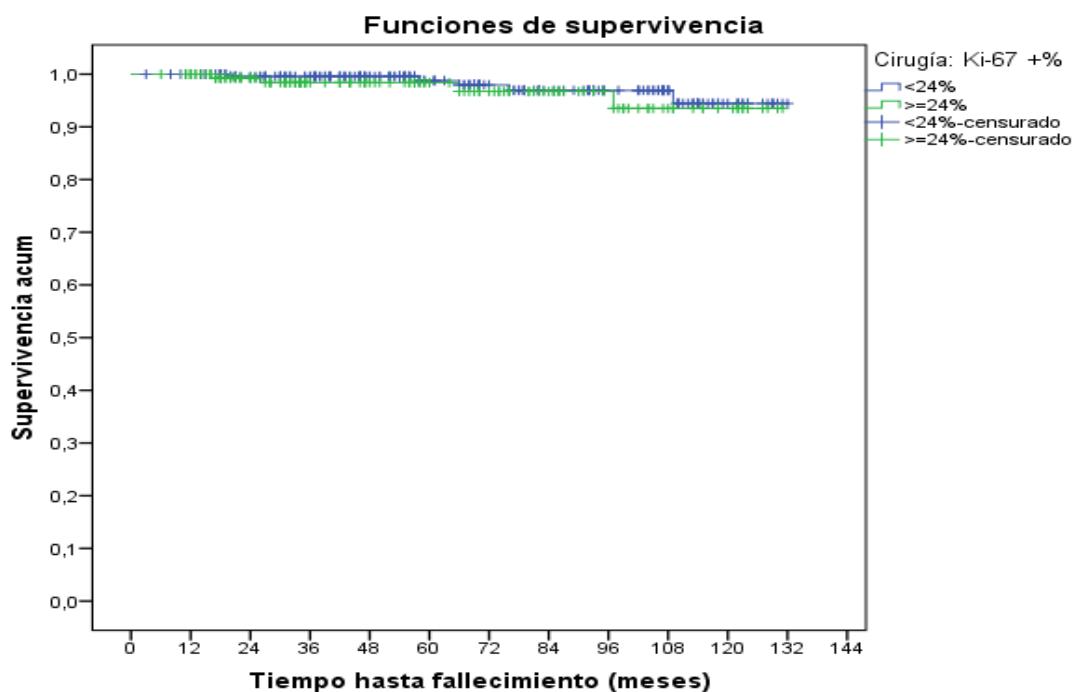
### Curvas de Kaplan-Meier:

Para analizar la relación del factor de proliferación Ki-67 con la supervivencia por cáncer de mama en las pacientes sin macrometástasis ganglionares, se escogió el mismo punto de corte que se había utilizado en el análisis de la muestra sin tener en cuenta la afectación tumoral axilar: Ki-67  $\geq 24\%$ .

Al observar las curvas de supervivencia según el valor de Ki-67  $< 24\%$  o  $\geq 24\%$ , se aprecia que entre ambos grupos no existen diferencias en el tiempo hasta el fallecimiento por cáncer de mama.

Utilizando el contraste de Mantel-Haenszel (log-rank) se concluyó que no existen diferencias significativas entre los dos grupos (estadístico= 0,469 y p= 0,494).

**Figura 25.** Curva de Kaplan-Meier de supervivencia por cáncer de mama con la variable Ki-67 < o  $\geq 24\%$ , en el grupo de pacientes sin macrometástasis ganglionares.



También se analizaron las curvas de Kaplan-Meier de supervivencia por cáncer de mama con las variables: edad, índice de masa corporal, menopausia, paridad, tipo histológico de cáncer de mama, estadio pT, multifocalidad - multicentricidad,

asociación a carcinoma in situ, grado histológico combinado de Nottingham, p53, HER2, invasión linfovascular, receptor de estrógeno y receptor de progesterona.

Al aplicar el contraste de Mantel-Haenszel, se obtuvieron diferencias significativas en las variables: estadio pT, receptor de estrógeno y receptor de progesterona. La supervivencia por cáncer de mama resultó ser inferior en los tumores sin macrometástasis ganglionares axilares y estadio  $\geq$  pT2, receptor de estrógeno negativo y receptor de progesterona negativo (tabla 61).

#### Regresión de Cox:

Se utilizó el modelo de riesgo proporcional de Cox para identificar qué variables influyen en el tiempo de supervivencia por cáncer de mama, de forma conjunta.

Se estudiaron las variables que habían resultado significativas utilizando el estimador producto límite de Kaplan-Meier y el contraste de Mantel-Haenszel (log-rank) por parejas de grupos: estadio pT, receptor de estrógeno y receptor de progesterona.

La variable estadio pT se dividió en este caso en dos categorías: pT1 y  $\geq$  pT2, por obtenerse de este modo un mejor modelo.

Se seleccionó un modelo de regresión de Cox multivariante con el método paso a paso hacia delante, por ser el que proporcionaba un mejor ajuste.

$$h(t) = [h_0(t)] \cdot e^{(B_1X_1 + B_2X_2 + \dots + B_pX_p)}$$

Tras analizar diferentes posibilidades, se obtuvo el modelo de regresión de Cox para la supervivencia por cáncer de mama en las pacientes sin macrometástasis ganglionares , que incluye únicamente la variable receptor de estrógeno (negativo o positivo).

**Tabla 61.** Resumen de los resultados obtenidos en el análisis de la supervivencia por cáncer de mama con las curvas de Kaplan-Meier y el contraste de Mantel-Haenszel en el grupo sin macrometástasis ganglionares.

	Kaplan-Meier (análisis descriptivo)	Contraste de Mantel-Haenszel
<b>Ki-67 (&lt; 24% y ≥ 24%)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 0,469 p= 0,494
<b>Edad (≤ 40, &gt; 40 y &lt; 70, ≥ 70 años)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 2,377 p= 0,123
<b>Índice de masa corporal (bajo peso, normal, sobrepeso y obesidad)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 0,034 p= 0,855
<b>Menopausia (premenopausia y postmenopausia)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 3,410 p= 0,065
<b>Paridad (nulípara, 1 parto, 2 partos y 3 o más partos)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 1,486 p= 0,223
<b>Tipo histológico de cáncer de mama*</b>	No existen diferencias	Estadístico= 4,697 p= 0,320
<b>Estadio pT (pT1 y ≥ pT2)</b>	Existen diferencias	Estadístico= 4,990 <b>p= 0,025</b>
<b>Multifocalidad y multicentricidad**</b>	No existen diferencias	Estadístico= 3,062 p= 0,080
<b>Asociación a carcinoma intraductal</b>	No existen diferencias	Estadístico= 1,317 p= 0,518
<b>Grado histológico combinado de Nottingham (1, 2 y 3)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 1,488 p= 0,223
<b>p53 (&lt; 15% y ≥ 15%)***</b>	No existen diferencias	Estadístico= 3,152 p= 0,076
<b>HER2 (positivo o negativo)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 0,010 p= 0,922
<b>Invasión linfovascular (presente o ausente)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 0,509 p= 0,476
<b>Receptor de estrógeno (positivo o negativo)</b>	Existen diferencias	Estadístico= 11,527 <b>p= 0,001</b>
<b>Receptor de progesterona (positivo o negativo)</b>	Existen diferencias	Estadístico= 6,090 <b>p= 0,014</b>

\* La variable tipo histológico de cáncer de mama se dividió en: Carcinoma ductal infiltrante, carcinoma lobulillar infiltrante, carcinoma mixto, carcinoma mucinoso y otros tipos de carcinoma.

\*\* La variable multifocalidad y multicentricidad se dividió en dos categorías: Tumores unifocales y tumores multifocales o multicéntricos.

\*\*\* Se escogió el punto de corte de p53 ≥ 15%, por corresponder al valor de la media en la muestra.

**Tabla 62.** Modelo de regresión de Cox para la supervivencia por cáncer de mama en las pacientes sin macrometástasis ganglionares.

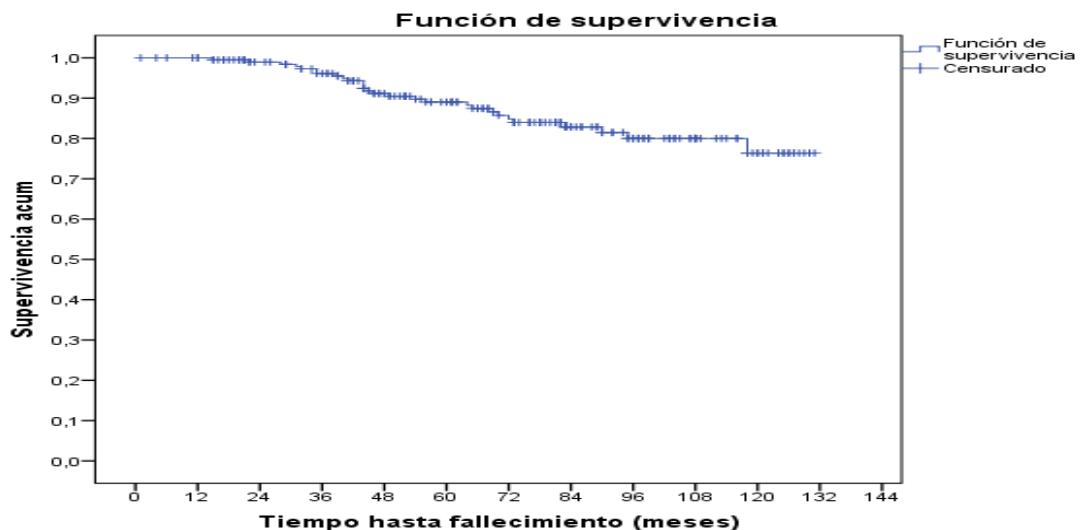
Covariable	Estimación del coeficiente ( $B_j$ )	Significación estadística de la estimación	Significación	Exp( $B_j$ ) (Hazard ratio)	Intervalo de confianza (Hazard ratio) 95%
Receptor de estrógeno	1,955	0,672	0,004	7,061	1,893-26,337

Según este modelo las pacientes con ganglios axilares sin macrometástasis y receptor de estrógeno negativo, incrementan su riesgo de muerte por cáncer de mama 7,061 veces sobre las pacientes con receptor de estrógeno positivo, en cualquier unidad de tiempo.

#### 5. 6. 3. Índice de proliferación Ki-67 como factor pronóstico de supervivencia por cáncer de mama en las pacientes con macrometástasis ganglionares axilares

En el grupo de pacientes con macrometástasis ganglionares (n= 204) se detectaron 28 casos (13,72%) de muerte por cáncer de mama, con un tiempo máximo de seguimiento de 132 meses.

**Figura 26.** Curva de Kaplan-Meier de supervivencia por cáncer de mama en el grupo con macrometástasis ganglionares.



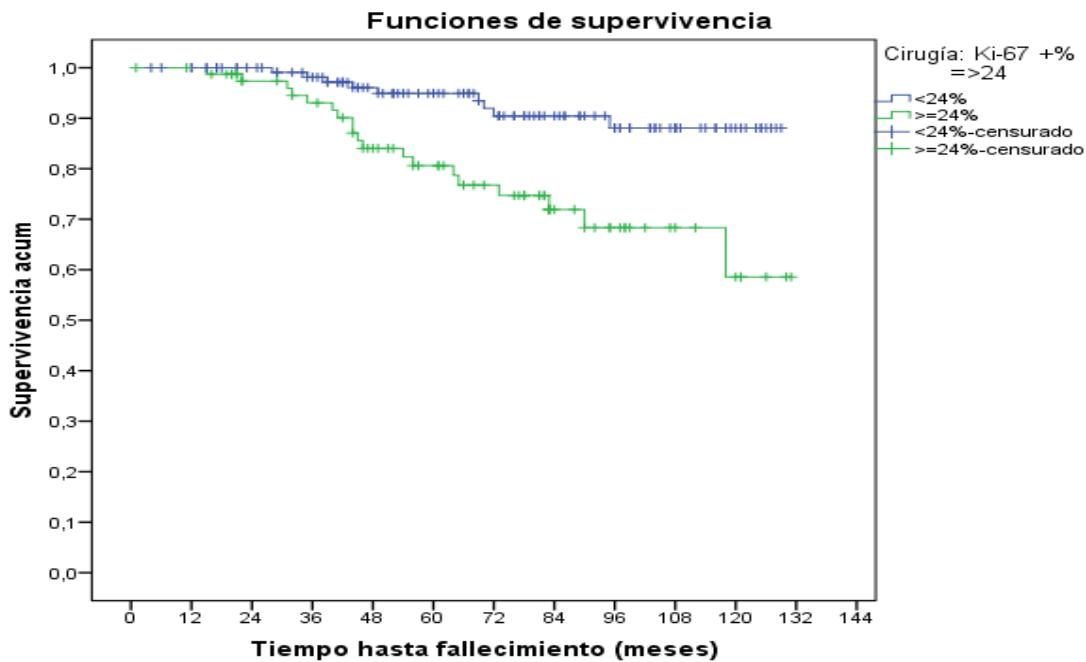
### Curvas de Kaplan-Meier:

Para analizar la relación del factor de proliferación Ki-67 con la supervivencia por cáncer de mama en las pacientes con macrometástasis ganglionares, se escogió el mismo punto de corte que se había utilizado en el análisis de la muestra sin tener en cuenta la afectación tumoral axilar:  $\text{Ki-67} \geq 24\%$ .

Al observar las curvas de supervivencia según el valor de  $\text{Ki-67} < 24\%$  o  $\geq 24\%$ , se observó que entre ambos grupos existen diferencias en el tiempo hasta el fallecimiento por cáncer de mama.

Utilizando el contraste de Mantel-Haenszel (log-rank) se concluyó que sí que existen diferencias significativas entre los dos grupos (estadístico= 10,686 y  $p= 0,001$ ).

**Figura 27.** Curva de Kaplan-Meier de supervivencia por cáncer de mama con la variable  $\text{Ki-67} < 24\%$  o  $\geq 24\%$ , en el grupo de pacientes con macrometástasis ganglionares.



También se analizaron las curvas de Kaplan-Meier de supervivencia por cáncer de mama con las variables: edad, índice de masa corporal, menopausia, paridad, tipo histológico de cáncer de mama, estadio pT, multifocalidad - multicentricidad,

asociación a carcinoma in situ, grado histológico combinado de Nottingham, p53, HER2, invasión linfovascular, receptor de estrógeno y receptor de progesterona.

Al aplicar el contraste de Mantel-Haenszel, se obtuvieron diferencias significativas en las variables: estadio pT, invasión linfovascular y grado histológico combinado de Nottingham.

La supervivencia por cáncer de mama resultó ser inferior en los tumores con macrometástasis ganglionares axilares y Ki-67  $\geq 24\%$ , mayor estadio pT, presencia de invasión linfovascular y mayor grado histológico combinado de Nottingham (tabla 63).

#### Regresión de Cox:

Se utilizó el modelo de riesgo proporcional de Cox para identificar qué variables influyen en el tiempo de supervivencia por cáncer de mama en las pacientes con macrometástasis ganglionares, de forma conjunta.

Se estudiaron las variables que habían resultado significativas utilizando el estimador producto límite de Kaplan-Meier y el contraste de Mantel-Haenszel (log-rank): Ki-67  $\geq 24\%$ , estadio pT, invasión linfovascular y grado histológico combinado de Nottingham. La variable estadio pT se dividió en este caso en cuatro categorías: pT1, pT2, pT3 y pT4, ya que de este modo resultaba más significativa en el análisis de Kaplan-Meier y aportaba más información, sin modificar el resultado final.

Se seleccionó un modelo de regresión de Cox multivariante con el método paso a paso hacia delante, por ser el que proporcionaba un mejor ajuste.

Tras analizar diferentes posibilidades, se obtuvo el modelo de regresión de Cox para la supervivencia por cáncer de mama en las pacientes con macrometástasis ganglionares, que incluye las variables: invasión linfovascular y Ki-67.

**Tabla 63.** Resumen de los resultados obtenidos en el análisis de la supervivencia por cáncer de mama con las curvas de Kaplan-Meier y el contraste de Mantel-Haenszel en el grupo con macrometástasis ganglionares.

	Kaplan-Meier (análisis descriptivo)	Contraste de Mantel-Haenszel
<b>Ki-67 (&lt; 24% y ≥ 24%)</b>	Existen diferencias	Estadístico= 10,686 <b>p= 0,001</b>
<b>Edad (≤ 40, &gt; 40 y &lt; 70, ≥ 70 años)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 0,845 p= 0,358
<b>Índice de masa corporal (bajo peso, normal, sobrepeso y obesidad)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 0,345 p= 0,557
<b>Menopausia (premenopausia y postmenopausia)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 1,088 p= 0,297
<b>Paridad (nulípara, 1 parto, 2 partos y 3 o más partos)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 0,115 p= 0,735
<b>Tipo histológico de cáncer de mama*</b>	No existen diferencias	Estadístico= 1,882 p= 0,758
<b>Estadio pT (pT1, pT2, pT3 y pT4)</b>	Existen diferencias	Estadístico= 5,265 <b>p= 0,022</b>
<b>Multifocalidad y multicentricidad**</b>	No existen diferencias	Estadístico= 0,005 p= 0,943
<b>Asociación a carcinoma intraductal</b>	No existen diferencias	Estadístico= 0,066 p= 0,967
<b>Grado histológico combinado de Nottingham (1, 2 y 3)</b>	Existen diferencias	Estadístico= 7,107 <b>p= 0,008</b>
<b>p53 (&lt; 15% y ≥ 15%)***</b>	No existen diferencias	Estadístico= 1,337 p= 0,248
<b>HER2 (positivo o negativo)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 0,442 p= 0,506
<b>Invasión linfovascular (presente o ausente)</b>	Existen diferencias	Estadístico= 13,691 <b>p= 0,000</b>
<b>Receptor de estrógeno (positivo o negativo)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 0,468 p= 0,494
<b>Receptor de progesterona (positivo o negativo)</b>	No existen diferencias	Estadístico= 0,935 p= 0,333

\* La variable tipo histológico de cáncer de mama se dividió en: Carcinoma ductal infiltrante, carcinoma lobulillar infiltrante, carcinoma mixto, carcinoma mucinoso y otros tipos de carcinoma.

\*\* La variable multifocalidad y multicentricidad se dividió en dos categorías: Tumores unifocales y tumores multifocales o multicéntricos.

\*\*\* Se escogió el punto de corte de p53  $\geq 15\%$ , por corresponder al valor de la media en la muestra.

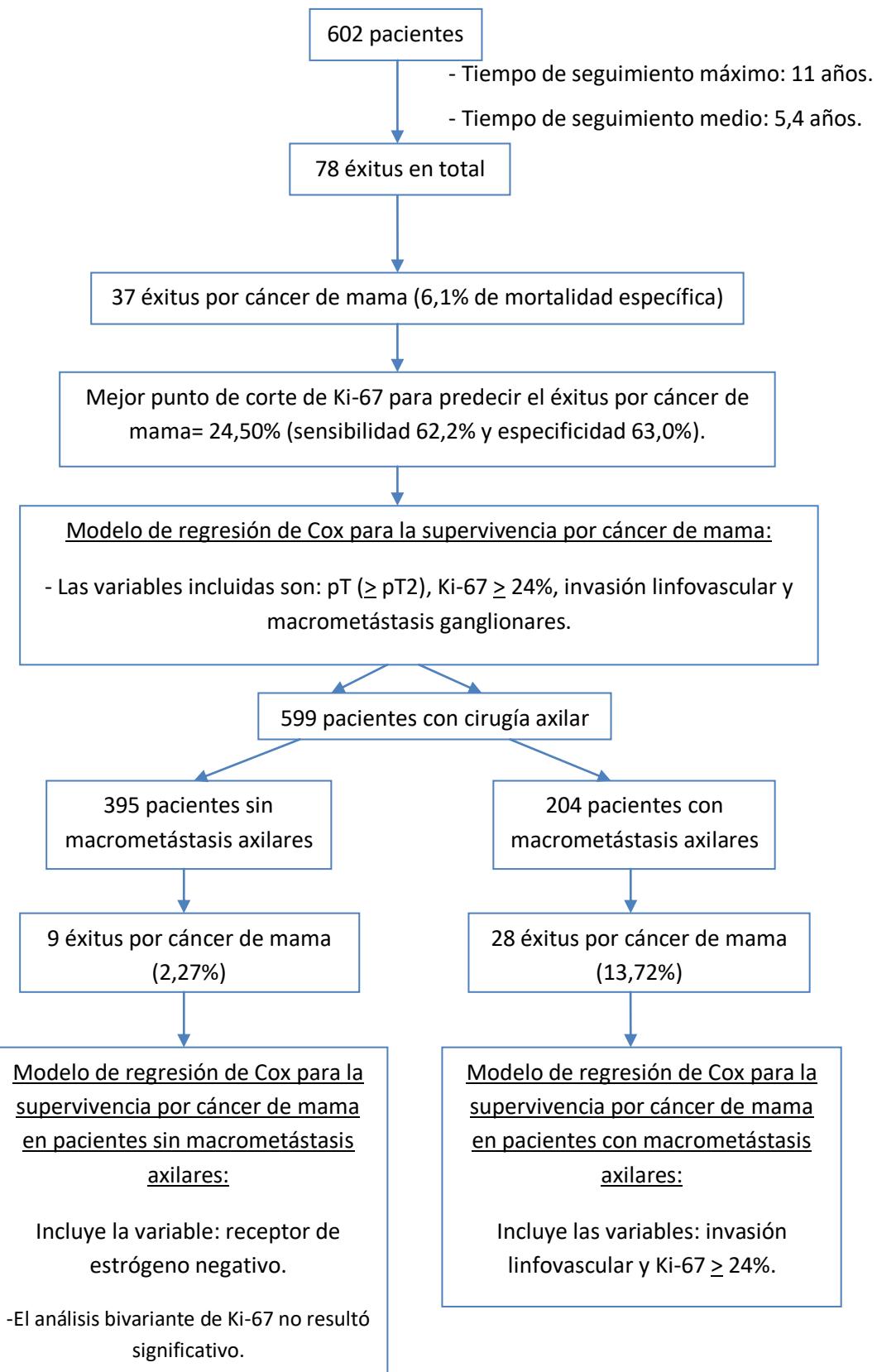
**Tabla 64.** Modelo de regresión de Cox para la supervivencia por cáncer de mama en las pacientes con macrometástasis ganglionares.

<i>Covariable</i>	<i>Estimación del coeficiente (<math>B_i</math>)</i>	<i>Significación estadística de la estimación</i>	<i>Significación</i>	<i>Exp(<math>B</math>) (Hazard ratio)</i>	<i>Intervalo de confianza (Hazard ratio) 95%</i>
Invasión linfovascular	1,601	0,549	0,004	4,958	1,691-14,537
Ki-67 $\geq 24\%$	1,009	0,409	0,014	2,743	1,230-6,117

Según este modelo las pacientes con ganglios axilares con macrometástasis e invasión linfovascular, incrementan su riesgo de muerte por cáncer de mama 4,958 veces sobre las pacientes sin invasión linfovascular.

Y las pacientes con ganglios con macrometástasis y Ki-67  $\geq 24\%$ , incrementan el riesgo de muerte por cáncer de mama 2,743 veces respecto al grupo con Ki-67 < 24%, en cualquier unidad de tiempo.

**Figura 28.** Resumen de los resultados obtenidos al analizar el valor predictivo de supervivencia por cáncer de mama del índice de proliferación Ki-67, en el total de la muestra y según la presencia o no de macrometástasis en los ganglios axilares.



## 6. DISCUSIÓN

La evolución de los tumores malignos de cualquier estirpe depende, entre otras características, del grado de actividad y división de sus células, cuantificado mediante los marcadores de proliferación celular.

El índice de proliferación Ki-67 es uno de los marcadores más estudiados en el cáncer de mama y su relación con la evolución de los pacientes ha sido ampliamente demostrada. La presencia de una alta expresión de Ki-67, refleja un comportamiento tumoral más agresivo y se asocia habitualmente a la de otros factores de mal pronóstico.

Actualmente una de las principales aplicaciones de este marcador en el cáncer de mama se basa en su uso como "punto de corte" en la toma de decisiones terapéuticas. Es uno de los factores que se tienen en cuenta a la hora de decidir la administración o no de quimioterapia adyuvante en tumores que expresan receptores hormonales y también se emplea para decidir si se opta o no por realizar una linfadenectomía axilar en casos concretos.

Pero su uso como punto de corte está limitado por la ausencia de estandarización en las técnicas empleadas para su determinación y este aspecto ha hecho que algunas sociedades científicas duden de su utilidad en la práctica clínica.

### 6. 1. Correlación del índice de proliferación Ki-67 con los factores epidemiológicos.

El único factor epidemiológico en el que se logró demostrar una asociación estadística con la expresión de Ki-67, fue la edad de la paciente en el momento del diagnóstico.

Las pacientes con edad menor o igual a 40 años supusieron el 8,1% de la muestra y en ellas, la expresión de Ki-67 fue significativamente superior a la del grupo con edades comprendidas entre 40 y 70 años.

Los estudios que han analizado la relación de Ki-67 con la edad en el cáncer de mama, han obtenido resultados similares, concluyendo que las pacientes jóvenes presentan porcentajes más elevados de este índice de proliferación.

En la tabla nº 65 se resumen las características de los principales estudios que han analizado la expresión de Ki-67 en las pacientes jóvenes, encontrando todos ellos una asociación estadísticamente significativa. No está claro el límite de edad para hablar de paciente joven con cáncer de mama y las publicaciones ponen el límite por debajo de 35, 40 e incluso 50 años.

Sin embargo, al analizar la expresión de Ki-67 en los tumores de mama de las pacientes de más edad ( $\geq 70$  años), no se encontraron diferencias significativas respecto a los demás grupos.

Clásicamente se ha afirmado que los tumores en las pacientes ancianas presentan un comportamiento menos agresivo, asociado a un mejor pronóstico y esto ha sido corroborado por estudios con un tamaño muestral superior al nuestro como los de Wiesner et al<sup>142</sup> y Zavagno et al<sup>63</sup>, con 1232 y 1226 casos respectivamente, que observan una menor expresión tumoral de Ki-67 en las pacientes de  $> 70$  y  $\geq 75$  años, respecto a las pacientes más jóvenes.

Oestreicher et al<sup>76</sup>, con 484 casos, también concluyó que la expresión tumoral de Ki-67 es inversamente proporcional a la edad, en los grupos de 60 a 69, 70 a 79 y  $\geq 80$  años.

Por otra parte, al igual que en nuestro trabajo, Pappo et al<sup>67</sup>, no encuentra diferencias significativas respecto a la expresión de Ki-67, al comparar 187 casos con más de 70 años y 609 casos con  $\leq 70$  años.

Tampoco se pudo demostrar la asociación entre Ki-67 y la menopausia, la edad de menopausia y la paridad. Existen trabajos que al igual que el nuestro no han encontrado diferencias significativas en la expresión de Ki-67 entre las pacientes premenopáusicas y postmenopáusicas<sup>76,143,144</sup>. Sin embargo en otros, sí se ha observado una mayor expresión de Ki-67 en las pacientes premenopáusicas<sup>71,86,145</sup>. Entre éstos destaca el de Inwald et al<sup>10</sup>, con 3658 pacientes, que concluyó que la premenopausia se asociaba a valores más elevados del índice de proliferación Ki-67.

**Tabla 65.** Resumen de los estudios que han analizado la expresión tumoral de Ki-67 en las pacientes jóvenes con cáncer de mama.

Autor principal	Año de publicación	Número de casos	Grupos de edad	Significación estadística*	Observaciones **
Querzoli P <sup>143</sup>	1996	871	$\leq$ o > 40 años	Sí	
Seshadri R <sup>146</sup>	1996	919	< o > 50 años	Sí	Punto de corte de Ki-67 $\geq$ 10%
Zavagno G <sup>63</sup>	2000	1226	$\leq$ o > 40 años	Sí	Punto de corte de Ki-67 $\geq$ 7%. Combina edad y menopausia
Hartley MC <sup>61</sup>	2006	306	$\leq$ o > 40 años	Sí	
Wiesner FG <sup>142</sup>	2009	1232	$\leq$ o > 50 años	Sí	
Bachi LM <sup>108</sup>	2010	330	$\leq$ 35 o > 60 años	Sí	Punto de corte de Ki-67 $\geq$ 25%. Sólo incluye tumores con receptores hormonales positivos.
Nishimura R <sup>34</sup>	2010	2638	$\leq$ 35 o > 35 - $\leq$ 50 años	Sí	Puntos de corte de Ki-67: < 20%, 20-50% y $\geq$ 50%.
Han JG <sup>62</sup>	2011	1478	$\leq$ 35 o > 35 - 50 años	Sí	Punto de corte de Ki-67 $\geq$ 20%
Morrison DH <sup>64</sup>	2012	262	$\leq$ 40 o $\geq$ 50 años	Sí	Punto de corte de Ki-67 $\geq$ 14%
Vasseur F <sup>60</sup>	2013	402	$\leq$ 35 o > 35 años	Sí	Punto de corte de Ki-67 $\geq$ 30%
Inwald EC <sup>10</sup>	2013	3658	Cuartiles	Sí	Varios puntos de corte de Ki-67, según cuartiles
Alco G <sup>86</sup>	2015	462	$\leq$ 40 o > 40 años	Sí	Varios puntos de corte de Ki-67 (cuartiles)
Pathmanathan N <sup>147</sup>	2015	203	$\leq$ 35 o > 35 años	Sí	Punto de corte de Ki-67 $\geq$ 10%. Sólo incluye tumores con ganglios negativos.
Yao Y <sup>65</sup>	2015	1406	$\leq$ 30 o 31-50 años	Sí	Punto de corte de Ki-67 $\geq$ 20%

\* Todos los estudios obtuvieron resultados significativos, observando una mayor expresión de Ki-67 en los grupos de pacientes más jóvenes.

\*\* En los estudios en que se realizó el análisis estadístico utilizando un punto de corte de Ki-67, se indica el valor de dicho punto.

Respecto a la paridad, ésta ha sido clásicamente considerada como un factor protector frente al cáncer de mama y también frente a las formas tumorales más agresivas, aunque pocos estudios han podido demostrar esta relación.

Lee et al<sup>70</sup>, con una muestra de 3095 pacientes y un 9,14 % de nulíparas, encontró que la nuliparidad se relacionaba con una mayor frecuencia de tumores de tipo Luminal B HER 2 según la clasificación de Saint Gallen 2011, siendo los tumores de tipo Luminal A (con Ki-67 < 14%) más frecuentes en las pacientes con partos previos.

Pero por otra parte, otros estudios, al igual que el nuestro, no han observado diferencias en la expresión de Ki-67 según el número de partos previos<sup>69,148</sup>.

Daling et al<sup>149</sup>, con una muestra de 1174 casos obtuvo un resultado no esperado, al encontrar los valores de Ki-67 más bajos en las pacientes sin gestaciones a término y una peor supervivencia en aquellas con un parto a término en los dos años previos al diagnóstico.

Por lo tanto, la existencia de una asociación entre paridad y Ki-67 no está clara.

Otro factor epidemiológico estudiado fue el índice de masa corporal, calculado según los criterios de la OMS. Nuestras pacientes presentan porcentajes elevados de sobrepeso (37%) y obesidad (15%). Según los datos de la Encuesta Nacional de Salud de 2011-2012, en España el 16% de las mujeres adultas presentaban obesidad y el 28,1% sobrepeso, observándose un incremento de ambas cifras respecto a años anteriores<sup>73</sup>.

Al comparar el valor de Ki-67 según el IMC, no se obtuvieron diferencias significativas y tampoco se obtuvieron al clasificar la muestra según los subtipos inmunohistoquímicos de cáncer de mama. Las pacientes obesas presentaron la media más baja de Ki-67 (22,11%) y las pacientes con IMC normal y / o bajo peso, la media de Ki-67 más alta (26,57%).

Este resultado contrasta con algunas de las publicaciones revisadas, que encuentran una relación directamente proporcional entre el IMC y la expresión de Ki-67, siendo ésta mayor en las pacientes con sobrepeso y obesidad.

Los estudios de Oestreicher et al<sup>76</sup> y Kaminemi et al<sup>77</sup>, con un tamaño muestral inferior al nuestro y utilizando también la clasificación del IMC de la OMS, encuentran mayores cifras de Ki-67 en las pacientes obesas.

Rauh C. al dividir la muestra de 2587 casos según grupos de edad e IMC, encuentra que las pacientes entre 42 y 49,6 años con  $\text{IMC} \leq 32,4 \text{ kg/m}^2$ , presentan más tumores de

tipo Luminal A (con Ki-67 < 14%), mientras que si el IMC es > 32,4 kg/m<sup>2</sup>, presentan más tumores triple negativos<sup>78</sup>.

Se cree que la presencia de un mayor IMC y principalmente la existencia de obesidad, se relaciona con formas tumorales más agresivas, con una mayor proliferación celular y con una supervivencia, pero en nuestro estudio no se ha podido demostrar que estas pacientes presenten una mayor expresión tumoral de Ki-67. Contrariamente a lo esperado, en las pacientes con obesidad se observaron los valores más bajos de Ki-67, aunque sin obtener ningún tipo de asociación significativa entre ambos factores pronósticos.

## 6. 2. Correlación del índice de proliferación Ki-67 con otros factores anatomo-patológicos.

### - Asociación con el tipo histológico de cáncer de mama:

Al analizar los tipos histológicos de cáncer de mama, se observó que el carcinoma ductal infiltrante presentaba valores más altos de Ki-67 que el carcinoma lobulillar infiltrante, mientras que en el carcinoma mucinoso se encontraron los porcentajes más bajos del índice de proliferación, aunque estas diferencias no resultaron significativas.

Los estudios de Nishimura et al<sup>34</sup> y Inwald et al<sup>10</sup>, con un tamaño muestral muy superior al nuestro (2638 y 3658 casos respectivamente), han demostrado la asociación del carcinoma ductal infiltrante a una mayor expresión de Ki-67, al compararlo con el carcinoma lobulillar infiltrante.

Y resultados similares obtuvieron Engels et al<sup>81</sup>, con una muestra de 704 casos y Honma et al<sup>55</sup> con 442 casos, encontrando que los carcinomas lobulillares infiltrantes presentan una menor expresión tumoral de Ki-67 y mayor tamaño tumoral en el momento del diagnóstico.

Sin embargo, otros estudios con un tamaño muestral inferior, no han logrado demostrar estas diferencias<sup>80</sup>.

*- Asociación con el tamaño tumoral:*

Diversas publicaciones han analizado la expresión de Ki-67 según el tamaño tumoral y la mayoría han concluido que existe una relación directamente proporcional entre ambos, encontrando valores más altos del índice de proliferación en los tumores de mayor tamaño.

En nuestro trabajo, se agrupó el tamaño tumoral según el estadio pT y al realizar las comparaciones múltiples entre categorías, solamente resultó significativa la diferencia de expresión de Ki-67 entre los tumores con estadio pT1 y pT2.

Otras muchas publicaciones también han concluido que los tumores con estadio pT2 presentan una mayor expresión de Ki-67 respecto al estadio pT1 e incluso algunas también han observado diferencias entre el resto de estadios (pT3 y pT4). Los principales estudios revisados al respecto se resumen en la tabla nº 66.

*- Asociación con la multifocalidad y multicentricidad tumoral:*

En nuestro análisis, no se demostró la existencia de diferencias en la expresión de Ki-67, según la focalidad tumoral.

Algunos artículos sugieren que los tumores multifocales y multicéntricos, podrían asociarse a una mayor agresividad, con mayor afectación ganglionar y mayores tasas de recurrencia locoregional, por lo que podría pensarse que éstos también presentarían una mayor proliferación celular<sup>120,122</sup>. Sin embargo, ninguno ha podido demostrar que la presencia de multifocalidad o multicentricidad se asocie a valores más altos de Ki-67.

Yerushalmi et al<sup>150</sup>, con una serie de 25320 concluye que los tumores multifocales y multicéntricos se asocian a una peor supervivencia por cáncer de mama y Weissenbacher et al<sup>151</sup>, con 5691 casos, encontró que los tumores con más de un foco presentaban una peor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global. Sin embargo, ninguno de estos autores analizó la relación entre el índice de proliferación Ki-67 y la focalidad tumoral.

El estudio de Neri et al<sup>121</sup>, con una serie de 1158 casos, también concluyó que los tumores multifocales y multicéntricos se asocian a una peor supervivencia, pero al

**Tabla 66.** Resumen de los estudios que han analizado la relación entre la expresión del índice de proliferación Ki-67 y el tamaño tumoral en el cáncer de mama.

Autor principal	Año de publicación	Número de casos	Grupos de tamaño tumoral*	Significación estadística	Observaciones **
Veronese S M <sup>145</sup>	1990	203	pT1, pT2 y pT3	Sí	Punto de corte de Ki-67 $\geq 10\%$
Locker AP <sup>152</sup>	1992	67	No especifica	No	Puntos de corte de Ki-67: 0-9%, > 9% y > 18%
Querzoli P <sup>143</sup>	1996	871	$\leq 1$ , 1-2, 2-5 y > 5 cm	Sí	Punto de corte de Ki-67 $\geq 13\%$ .
Aranda FI <sup>153</sup>	1997	110		No	Correlación de Pearson
Mindulla C <sup>83</sup>	1999	71	pT1, pT2 y pT3	Sí	Puntos de corte de Ki-67: < 5%, 5-10% y > 10%.
Martínez-Arribas F <sup>84</sup>	2006	280	pT1, pT2 y pT3	Sí	Punto de corte de Ki-67 $\geq 20\%$
Viale G <sup>115</sup>	2008	2658	$\leq 2$ o > 2 cm	Sí	Punto de corte de Ki-67 $\geq 11\%$ . Sólo incluye pacientes menopáusicas
Jung S-Y <sup>85</sup>	2009	1080	$\leq 2$ o > 2 cm	Sí	Punto de corte de Ki-67 $\geq 10\%$
Wiesner F G <sup>142</sup>	2009	1232	pT1, pT2, pT3 y pT4	Sí	Punto de corte de Ki-67 $\geq 20\%$
Nishimura R <sup>34</sup>	2010	2638		Sí	Puntos de corte de Ki-67: < 20%, 20-50% y $\geq 50\%$ .
Olsson A <sup>154</sup>	2011	466	$\leq 2$ o > 2 cm	Sí	Punto de corte de Ki-67 $\geq 10\%$
Kim H-S <sup>7</sup>	2012	159	pT1 y pT2	Sí	Compara tumores Luminal A y Luminal B (Ki-67 $\geq 14\%$ )
Inwald E C <sup>10</sup>	2013	3658	pT1, pT2, pT3 y pT4	Sí	Varios puntos de corte de ki-67 (cuartiles)
Kilickap S <sup>114</sup>	2014	163	pT1, pT2, pT3 y pT4	Sí	Punto de corte de Ki-67 $\geq 20\%$
Alco G <sup>86</sup>	2015	462	pT1 y pT2-pT3	Sí	Varios puntos de corte de Ki-67 (cuartiles)
Pathmanathan N <sup>147</sup>	2015	193	$\leq 10$ , 11-15, 16-20 y > 20 mm	Sí	Punto de corte de Ki-67 $\geq 10\%$ . Sólo incluye tumores con ganglios negativos.

\* Se indican los grupos de tamaño tumoral que se compararon en cada estudio.

\*\* En los estudios en que se realizó el análisis estadístico utilizando un punto de corte de Ki-67, se indica el valor de dicho punto.

comparar estos tumores con los unifocales, no encontró diferencias en la expresión de Ki-67, utilizando un punto de corte del 15%.

- *Asociación a carcinoma ductal in situ:*

Tampoco se encontraron diferencias en la expresión de Ki-67 según la presencia o no de carcinoma ductal in situ, ni siquiera cuando existía asociación a carcinoma intraductal extenso.

Existen pocos trabajos publicados en los que se estudie esta relación, pero Mylonas et al<sup>117</sup> y Wong et al<sup>118</sup>, observaron una mayor expresión de Ki-67 en los carcinomas ductales infiltrantes no asociados a CID, acompañada de una peor supervivencia.

El grupo de Wong H. publicó posteriormente un segundo estudio con la misma serie de casos (n= 1355), en el que concluyó que los tumores de tipo Luminal A y B asociados a CID, presentan valores inferiores del índice de proliferación Ki-67 que los no asociados; mientras que estas diferencias no se observaron en los tumores de tipo HER2 y triple negativo<sup>116</sup>.

Estas diferencias entre los carcinomas infiltrantes según su asociación o no a carcinoma ductal in situ, podrían ser explicadas por un diferente origen del componente infiltrante. Los carcinomas infiltrantes asociados a CID, se originarían en algunos casos a partir de un inicial carcinoma in situ que iría progresando hasta convertirse en infiltrante y por tanto serían tumores menos agresivos, con una evolución más lenta y menor proliferación celular.

- *Asociación al grado histológico combinado de Nottingham:*

La expresión tumoral de Ki-67 aumenta al incrementarse el grado histológico combinado de Nottingham de manera llamativa según nuestros resultados. La media de Ki-67 en los tumores con grado histológico 1 fue de 10,46%, mientras que la media en los de grado histológico 3 fue de 47,05%.

Todos los artículos incluidos en la revisión bibliográfica obtuvieron resultados concordantes con el nuestro, demostrando la asociación entre Ki-67 y el grado histológico<sup>10,34,84,85,86,115,142,147,155</sup>.

El grado histológico combinado de Nottingham se calcula a partir de la suma de los parámetros: diferenciación arquitectural, grado nuclear e índice mitótico. El índice mitótico (número de mitosis por mm<sup>2</sup>), al igual que Ki-67, es un marcador de proliferación tumoral y probablemente debido a ello el grado histológico es uno de los factores pronóstico que se ha relacionado con más frecuencia con la expresión de Ki-67.

Tanto es así que en la Conferencia de Saint Gallen del año 2011 se llegó a recomendar utilizar el grado histológico como marcador subrogado de proliferación, cuando no se disponga de la determinación de Ki-67, para distinguir los tumores de tipo Luminal A y B<sup>15</sup>. Sin embargo, en la reunión de Saint Gallen del año 2013, la mayoría de expertos votaron que un grado histológico 3 no puede sustituir a un Ki-67 alto, para distinguir los carcinomas de mama Luminal A y B<sup>17</sup>.

El estudio de Hayashi et al<sup>105</sup>, publicado en 2014, analizó la equivalencia entre el grado histológico y Ki-67 en 259 pacientes, concluyendo que únicamente existía correlación entre el grado histológico y la expresión de Ki-67 en los tumores de tipo Luminal A y en tumores Luminal B HER2 positivo y G1. En el resto de tumores de tipo Luminal B y en los subtipos HER2 y triple negativo, no se pudo demostrar esta equivalencia.

- *Asociación con la presencia de invasión linfovascular:*

La presencia de invasión linfovascular se ha relacionado con un incremento en el riesgo de afectación tumoral ganglionar y una peor supervivencia<sup>10,112,113</sup>; y actualmente está considerada como un factor pronóstico muy importante en el cáncer de mama.

La invasión linfovascular estaba presente en el 28,2% de los casos analizados y resultó estar asociada a una mayor expresión tumoral de Ki-67, lo cual concuerda con los datos referidos por otros autores<sup>10,86,114,115</sup>.

- *Asociación al perfil inmunohistoquímico del tumor:*

Una de las principales limitaciones de nuestro estudio se debe a que el análisis inmunohistoquímico para la determinación de los receptores de estrógeno y progesterona y de Ki-67, p53 y HER2, se llevó a cabo en dos tipos de muestra

diferentes: en 459 casos (76,24%) se determinó a partir de la biopsia tumoral previa a la cirugía y en 143 (23,75%) casos se obtuvo a partir de la pieza quirúrgica de resección mamaria.

Algunas publicaciones han encontrado valores superiores de Ki-67 y también del número de mitosis en la pieza quirúrgica, al compararlos con los de la biopsia tumoral inicial. Estas diferencias se han relacionado con la obtención de muestras demasiado pequeñas en la biopsia, con la toma de la misma en localizaciones distintas a la periferia del tumor (zona con mayor proliferación) y también con retrasos en la fijación de la muestra<sup>156</sup>.

Gandini et al<sup>157</sup>, con 269 casos encontró valores de Ki-67 más elevados en la pieza quirúrgica, con un cambio medio de  $2,2 \pm 9,2\%$  en un intervalo de 41 días desde la biopsia tumoral. Pero este cambio era significativo únicamente en los tumores de tipo HER2 y triple negativos.

Ough et al<sup>158</sup> encontró una buena concordancia en los receptores de estrógeno, moderada en el grado histológico, los receptores de progesterona y p53 y más baja en Ki-67 (concordancia del 59%), al comparar la biopsia y la pieza quirúrgica.

Sin embargo, otros muchos estudios han demostrado la existencia de una buena concordancia entre el perfil inmunohistoquímico de ambas muestras<sup>159,160,161,162</sup>.

El Grupo Internacional de trabajo sobre Ki-67, concluyó en su revisión del año 2011 que cuando fuera posible sería preferible hacer la evaluación de Ki-67 en la pieza quirúrgica en lugar de en la biopsia tumoral. Y cuando haya que comparar ambas muestras, recomiendan que la lectura de Ki-67 de la pieza quirúrgica se haga tanto en la periferia como en otras áreas tumorales<sup>47</sup>.

#### *- Asociación con los receptores hormonales:*

La asociación entre una mayor expresión tumoral de Ki-67 y la ausencia de receptores de estrógeno y progesterona, es un hallazgo casi constante en la literatura, como se refleja en la tabla nº 67 y concuerda con los resultados obtenidos en nuestro estudio. Además, en caso de expresar dichos receptores, el índice de proliferación Ki-67 es inversamente proporcional a la intensidad de dicha expresión y al porcentaje de células que los expresan.

**Tabla 67.** Resumen de los estudios que han analizado la relación entre la expresión del índice de proliferación Ki-67 y la de los receptores de estrógeno y progesterona.

Autor principal	Año de publicación	Número de casos	Tipo de receptor hormonal estudiado	Significación estadística	Observaciones **
<b>Veronese S M</b> <sup>145</sup>	1990	203	RE y RP	Sí	Punto de corte de Ki-67 $\geq 10\%$
<b>Querzoli P</b> <sup>143</sup>	1996	871	RE y RP	Sí	Punto de corte de Ki-67 $\geq 13\%$ .
<b>Seshadri R</b> <sup>146</sup>	1996	919	RE y RP	Sí	Punto de corte de Ki-67 $\geq 10\%$
<b>Railo M</b> <sup>163</sup>	1997	212	RE-	Sí	Punto de corte de Ki-67 $\geq 10\%$ . Sólo incluye tumores pT1 No.
<b>Mindulla C</b> <sup>83</sup>	1999	71	RE-	Sí	Puntos de corte de Ki-67: < 5%, 5-10% y > 10%.
<b>Martínez-Arribas F</b> <sup>84</sup>	2006	280	RE y RP	Sí	Punto de corte de Ki-67 $\geq 20\%$
<b>Neri A</b> <sup>164</sup>	2008	432	RE y RP	Sí	Punto de corte de Ki-67 $\geq 15\%$ . Sólo incluye tumores con ganglios negativos.
<b>Wiesner F G</b> <sup>142</sup>	2009	1232	RE y RP	Sí	Punto de corte de Ki-67 $\geq 20\%$
<b>Nishimura R</b> <sup>34</sup>	2010	2638	RE y RP	Sí	Puntos de corte de Ki-67: < 20%, 20-50% y $\geq 50\%$ .
<b>Pathmanathan N</b> <sup>147</sup>	2013	193	RE	Sí	Punto de corte de Ki-67 $\geq 10\%$
<b>Inwald E C</b> <sup>10</sup>	2013	3658	RE y RP	Sí	Varios puntos de corte de ki-67 (cuartiles)
<b>Alco G</b> <sup>86</sup>	2015	462	RE y RP	Sí	Varios puntos de corte de Ki-67 (cuartiles)
<b>Ruibal A</b> <sup>165</sup>	2015	119	RE	Sí	Punto de corte de Ki-67 $\geq 15\%$ . Sólo incluye tumores con tamaño < 1 cm.
<b>Honma N</b> <sup>55</sup>	2015	442	RE y RP	Sí	Punto de corte de ki-67 $\geq 15\%$ , valorado en los "puntos calientes"

\* RE= receptor de estrógenos. RP= receptor de progesterona.

\*\* En los estudios en que se realizó el análisis estadístico utilizando un punto de corte de Ki-67, se indica el valor de dicho punto.

- *Asociación a p53:*

La mayoría de estudios que han analizado la relación entre la expresión Ki-67 y p53, lo han hecho estableciendo puntos de corte para ambas variables y casi todos han obtenido resultados significativos.

Las series más largas corresponden a Nishimura R.<sup>34</sup>, Jung S-Y.<sup>85</sup> y Seshadri R.<sup>146</sup> y en todas ellas se encontró asociación entre una mayor expresión de Ki-67 y valores altos de p53.

En nuestro caso esta relación se estudió comparando los valores de ambos a partir del coeficiente de correlación de Spearman y se concluyó que los tumores con valores más elevados de Ki-67 presentan valores altos de p53, aunque con una correlación baja.

- *Asociación a HER2:*

Los tumores que presentaban sobreexpresión de HER2 informada mediante inmunohistoquímica o una amplificación génica determinada mediante técnicas de hibridación *in situ*, fueron valorados de manera conjunta y resultaron presentar valores más altos del índice de proliferación Ki-67 que el resto de carcinomas. El índice de proliferación Ki-67 en los tumores HER2 negativos fue de 23,31%, mientras que en los tumores HER2 positivos fue de 32,72%.

Este resultado, al igual que ocurrió con p53, coincide totalmente con el obtenido en los artículos revisados<sup>10,34,55,84,85,86,114,115,142,147</sup>.

Por lo tanto la sobreexpresión de p53 y HER2 y la ausencia de expresión de receptores hormonales, se relacionan con una mayor proliferación tumoral valorada mediante el recuento de Ki-67.

- *Asociación a los subtipos intrínsecos de cáncer de mama determinados mediante inmunohistoquímica:*

Existen muy pocos estudios que utilicen la clasificación de los subtipos intrínsecos de cáncer de mama propuesta en la conferencia de Saint Gallen de 2013<sup>17</sup>. La principal

novedad de esta clasificación fue la inclusión del valor del receptor de progesterona (< o  $\geq$  20%) para distinguir los tumores Luminal A y B-like HER2 negativos.

El subtipo más frecuente de cáncer de mama en nuestras pacientes, según esta clasificación, fue el Luminal B-like HER2 negativo (42,7%).

Serra et al<sup>166</sup>, estudió los cambios que se producían al utilizar la clasificación de Saint Gallen de 2013, en lugar de la del año 2011 que no tenía en cuenta el receptor de progesterona. Observó que con la nueva clasificación disminuía en un 20% el número de tumores Luminal A y aumentaban los tumores Luminal B HER2 negativos.

Los tumores de tipo Luminal A-like presentaron los porcentajes más bajos de Ki-67 (media de 6,03%). Este dato era esperable, teniendo en cuenta que el grupo Luminal A-like incluye solamente tumores con Ki-67 < 14%, punto de corte consensuado a partir del estudio de Cheang et al<sup>16</sup>.

Los valores más altos de Ki-67 se observaron en los tumores triple negativos (52,55%), encontrando diferencias significativas al comparar este grupo con los tumores de tipo Luminal A y B.

Ferguson et al<sup>167</sup> obtuvo resultados similares al analizar la expresión de Ki-67 en los diferentes subtipos de carcinoma, aplicando la clasificación de Saint Gallen 2011.

Varios estudios han analizado la supervivencia en los tumores con receptores hormonales positivos, concluyendo que los tumores Luminal B-like, presentan una peor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global, respecto al subtipo Luminal A-like<sup>16,168</sup>.

Entre ellos destacamos el de Ahn et al<sup>110</sup>, por ser uno de los pocos que aplica la clasificación de Saint Gallen 2013. Éste concluye que los tumores Luminal B-like presentan una peor supervivencia libre de enfermedad, supervivencia global y una mayor afectación ganglionar, tamaño tumoral y grado histológico.

Por otra parte, los tumores pertenecientes al subtipo triple negativo, se han asociado clásicamente a un peor pronóstico, con mayor riesgo de recidivas y mayor mortalidad por cáncer de mama, lo cual podría estar relacionado con la presencia de una mayor proliferación celular<sup>169,170,171,172,173</sup>.

## 6. 3. Índice de proliferación Ki-67 como factor predictivo de afectación ganglionar axilar.

### - Ki-67 como factor predictivo de macrometástasis ganglionares:

Se han publicado múltiples trabajos cuyo fin era encontrar una combinación de factores capaces de predecir la existencia de afectación tumoral ganglionar en el cáncer de mama, pero la mayoría valoran de manera conjunta la presencia de micrometástasis y macrometástasis ganglionares.

El ensayo randomizado IBCSG 23-01<sup>97</sup>, que comparó la supervivencia libre de enfermedad al realizar o no linfadenectomía axilar en caso de micrometástasis en los ganglios centinelas, concluyó que no existían diferencias significativas entre ambos grupos (si bien la mayor parte de tumores incluídos tenían un tamaño inferior a 3 cm y habían sido tratados con cirugía conservadora y terapia adyuvante sistémica).

El actual protocolo de consenso de la Sociedad Española de Senología y Patología mamaria sobre BSGC, desaconseja realizar linfadenectomía axilar en caso de micrometástasis o células tumorales aisladas en el ganglio centinela, por considerar ambas categorías dentro del "perfil de bajo riesgo" y tampoco se aconseja aplicar radioterapia axilar ni terapia sistémica en estas situaciones<sup>91,174</sup>.

Actualmente la presencia de únicamente micrometástasis en los ganglios axilares en las pacientes con cáncer de mama, no supone ningún cambio en el manejo terapéutico ya que no es indicación de realizar una linfadenectomía axilar ni tampoco implica la administración de ningún tipo de terapia sistémica.

Por ello, se decidió excluir de nuestra valoración las micrometástasis y las células tumorales aisladas, convirtiendo a las macrometástasis ganglionares en el objetivo de nuestro estudio.

En nuestra población, el 34,0% de pacientes presentaban macrometástasis ganglionares axilares y el 8,3% micrometástasis. El índice de proliferación Ki-67 resultó

ser un factor predictivo de macrometástasis axilares en el análisis bivariante, utilizando como punto de corte un valor  $\geq 10\%$ . Sin embargo, quedó excluido como factor predictivo independiente en el análisis multivariante.

Al revisar la bibliografía disponible, encontramos algunos trabajos en los que no se pudo demostrar en el análisis bivariante, la asociación entre Ki-67 y la afectación tumoral ganglionar, utilizando también como punto de corte un 10%<sup>12, 13, 84</sup>.

Otros demostraron su valor predictivo de metástasis ganglionares en el análisis bivariante, utilizando diversos puntos de corte (10%, 20%, 50% y cuartiles), pero no realizaron un análisis multivariante de los datos<sup>10,34,83,114,143,175</sup>.

Entre las publicaciones que llevaron a cabo un análisis multivariante, con el fin de encontrar un modelo predictivo de afectación tumoral ganglionar axilar, destacan:

- Susini et al<sup>92</sup>, con 135 casos, que concluyó que la presencia de un índice de proliferación Ki-67  $\geq 10\%$ , la sospecha de afectación tumoral en la ecografía axilar y la localización del tumor en los cuadrantes externos, eran los tres factores predictivos independientes más potentes.
- Bader et al<sup>96</sup>, con 358 tumores estadio pT1, que afirmó que la combinación de un Ki-67  $\geq 18\%$ , un tamaño tumoral  $> 1\text{cm}$ , grado histológico 3 y la presencia de invasión linfovascular, se correlaciona con un 75% de afectación tumoral axilar.
- González-Vela et al<sup>176</sup>, con 102 casos, estableció como factores de riesgo independientes un tamaño tumoral  $> 2\text{ cm}$ , la presencia de invasión linfovascular, Ki-67 (con punto de corte escogido según percentiles) y la infiltración tumoral en el margen quirúrgico.
- Orucevic et al<sup>177</sup>, con 197 casos, concluyó que Ki-67  $\geq 10\%$  era el único factor predictivo independiente de afectación ganglionar axilar.
- Marrelli et al<sup>178</sup>, con 675 casos, que encontró como factores de riesgo independientes la invasión linfovascular, la multifocalidad y Ki-67  $> 10\%$ . Éste último influía sobre todo en los tumores con un riesgo intermedio (pT1 c y pT2 sin invasión linfovascular) y también en los tumores con grado histológico 2.

- Hack et al<sup>179</sup>, con 1831 casos, definió como factores de riesgo independientes la multifocalidad, el tamaño tumoral, Ki-67 y el grado histológico, manejando estos factores como variables continuas. No valoró como posible factor de riesgo la invasión linfovascular.

En nuestro análisis multivariante, el mejor modelo de regresión logística para predecir las macrometástasis axilares resultó ser el que incluía los factores estadio  $\geq$  pT2 y presencia de invasión linfovascular, excluyendo como factores de riesgo al grado histológico y a Ki-67, que habían resultado significativos en el análisis bivariante.

Estos resultados son similares a los de Bader A.A.<sup>96</sup>, Hack C.C.<sup>179</sup> y González-Vela M.C.<sup>176</sup>, pero a diferencia de ellos, en nuestro caso no se pudo demostrar la importancia de Ki-67 como factor predictivo independiente de metástasis axilares.

Todos los estudios revisados valoraron de manera conjunta la existencia de macrometástasis y micrometástasis axilares, mientras que en el nuestro únicamente se tuvieron en cuenta las macrometástasis. Este aspecto adapta nuestro análisis al manejo actual de los ganglios axilares en el cáncer de mama, aunque también dificulta la comparación de los resultados y podría ser uno de los motivos que explique las diferencias existentes.

Por otra parte, el tamaño muestral (n= 602) es superior al de la mayoría, excluyendo el trabajo de Hack et al<sup>179</sup> (n= 1831 casos), que analizó el índice de proliferación como una variable continua, en lugar de aplicar puntos de corte.

A pesar de ello, el modelo predictivo obtenido, cuenta con una buena especificidad (84,9%) pero una sensibilidad muy limitada (53,2%), con una elevada tasa de falsos negativos, que lo convierte en un modelo poco útil para su aplicación en la práctica clínica.

-Ki-67 como factor predictivo de macrometástasis en los ganglios no centinela axilares:

En los últimos años, existe un creciente interés por la búsqueda de factores de riesgo que permitan predecir el estado de los ganglios axilares en el cáncer de mama, con el fin de evitar la realización de linfadenectomías, en muchos casos innecesarias y no exentas de consecuencias para las pacientes.

Uno de los principales objetivos de algunos de los estudios más recientes, ha sido la definición de una serie de factores capaces de predecir el estado del resto de ganglios axilares (ganglios no centinela), cuando se extraen los ganglios centinelas al realizar una BSGC.

Para definir el papel del índice de proliferación Ki-67 como factor predictivo en los ganglios no centinela, se analizaron los 87 casos en los que se había realizado una BSGC seguida de linfadenectomía axilar, encontrando que sólo en 20 casos (23%) había macrometástasis en alguno de los ganglios axilares no centinela.

Al igual que en el apartado anterior, no se tuvo en cuenta la presencia de micrometástasis o células tumorales aisladas en los ganglios no centinela.

La única variable que resultó significativa en nuestro análisis bivariante, fue la presencia de afectación tumoral extracapsular en los ganglios centinelas.

Las variables tamaño tumoral  $\geq$  pT2 y presencia de  $\geq 2$  de ganglios centinelas con macrometástasis, obtuvieron resultados próximos a la significación ( $p= 0,063$  y  $0,059$ ) y probablemente si se hubiera dispuesto de un mayor tamaño muestral, se podría haber demostrado su asociación con la afectación de los ganglios no centinelas.

Se descartó el posible papel como factor predictivo de Ki-67 (utilizando los puntos de corte 10, 14 y 20%), lo cual concuerda con la bibliografía consultada.

En 2011 se publicó un meta-análisis<sup>75</sup> cuyo objetivo era revisar la evidencia disponible respecto a los factores relacionados con las metástasis en los ganglios no centinela. Éste concluyó que existen ocho características capaces de predecir la afectación tumoral de estos ganglios, con una odds ratio >2, que son: metástasis en el ganglio centinela >2mm (macrometástasis), extensión extracapsular en el GC, afectación de más de 1 GC,  $\leq 1$  GC negativo, proporción de GC positivos superior al 50% respecto al total de ganglios extraídos, tamaño tumoral >2cm, invasión linfovascular y el método de detección empleado (técnica convencional, con hematoxilina-eosina, para valorar el tamaño de las metástasis).

En este trabajo el índice de proliferación Ki-67 quedó excluido del listado de posibles factores predictivos y tampoco se ha encontrado ningún artículo que demuestre la existencia de una asociación estadística entre Ki-67 y la afectación tumoral de los ganglios no centinela.

En el mismo año, Kwon et al<sup>93</sup>, analizó una muestra de 205 casos, concluyendo que la presencia de  $\geq 2$  GC positivos, macrometástasis en los GC y la extensión extracapsular en el GC, son factores de riesgo de metástasis en los ganglios no centinelas, en el análisis multivariante. Analizó Ki-67 utilizando como punto de corte > 10%, pero éste no resultó significativo en el estudio bivariante.

En 2012 McGhan et al<sup>101</sup>, revisó 240 casos con BSGC y linfadenectomía axilar, encontrando metástasis en los ganglios no centinela en el 45%. En el análisis multivariante resultaron comportarse como factores predictivos el tamaño tumoral, la invasión linfovascular, la ausencia de receptores de estrógeno y el tamaño de las metástasis en el GC. En este estudio no se valoró Ki-67.

Posteriormente Canavese et al<sup>94</sup>, analizó una muestra de 397 casos, con un 35,5% de metástasis en los ganglios no centinelas, concluyendo que los factores predictivos de afectación tumoral de éstos eran: grado histológico, tamaño tumoral, HER2 positivo y el número de GC positivos. Ki-67 (con punto de corte  $\geq 20\%$ ) resultó significativo únicamente en el análisis bivariante.

En la actualidad, en muchos centros está disponible el método OSNA, para el estudio de los ganglios centinelas. Éste método calcula el número de copias de ARN-m de citoqueratina 19 que contienen cada uno de los ganglios analizados, cuya suma da como resultado la llamada "carga tumoral total".

Este concepto ha sido incluido en algunos de los estudios que valoran la afectación tumoral de los ganglios no centinelas. Peg et al<sup>90</sup>, analizó una muestra de 697 casos, con metástasis en los ganglios no centinelas en el 29%. Los factores predictivos en el análisis multivariante fueron: la carga tumoral total, el tamaño tumoral, el número de GC positivos, HER2 positivo y la invasión linfovascular. Una carga tumoral total > 15.000 copias/ $\mu$ l tiene un valor predictivo negativo de 85,5% y positivo de 41,1%, con una sensibilidad de 76,7% y especificidad de 55,2%. Ki-67 (con punto de corte  $\geq 15\%$ ) no resultó significativo y la afectación extracapsular tumoral del GC no fue incluida entre las variables a estudio.

En nuestro estudio, la única variable que quedó incluida en el análisis final de regresión logística fue la afectación tumoral extracapsular en los ganglios centinelas, dando lugar a un modelo con una adecuada especificidad (81,8%), pero una baja sensibilidad (55,0%).

Una de las principales limitaciones fue el tamaño muestral disponible (solamente 87 casos con BSGC y linfadenectomía), muy inferior al de los artículos revisados. Solamente el 23% de pacientes tenían macrometástasis en alguno de los ganglios no centinelas extraídos. Las tasas de afectación tumoral en los ganglios no centinelas de los trabajos revisados son superiores , al valorar de manera conjunta las micrometástasis y macrometástasis ganglionares.

## 6. 4. Índice de proliferación de Ki-67 como factor pronóstico de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia específica por cáncer de mama.

Se han publicado cuatro metaanálisis que estudian el valor pronóstico de Ki-67. Todos ellos han concluido que un valor alto de Ki-67 se asocia con una mayor probabilidad de recidiva y una peor supervivencia.

El primer metaanálisis<sup>29</sup> (Azambuja et al) se publicó en el año 2007 e incluía 46 trabajos: 38 que analizaban la relación de Ki-67 con la SLE y 35 que estudiaban la relación con la supervivencia global y/o la supervivencia específica por cáncer de mama, con un seguimiento que iba desde los 23,6 meses a 16,3 años. Algunas de las limitaciones que encontraron los autores para validar Ki-67 como factor pronóstico, fueron que la mayoría de estudios eran retrospectivos y basaban sus resultados en el análisis univariante de la muestra, con un hazard ratio promedio de Ki-67 para la SLE de 1,88 (IC: 1,75-2,02) y para la supervivencia global de 1,89 (IC: 1,74-2,06).

Por este motivo, aunque sí que concluyeron que un valor de Ki-67 por encima del punto de corte elegido en cada estudio se asociaba a una peor SLE y SG, no pudieron demostrar que éste se comportase como un factor pronóstico independiente de los factores clásicos.

Un año después se publicó el metaanálisis de Stuart-Harris R. et al<sup>28</sup>, que no sólo analizaba el valor pronóstico de Ki-67, sino también el de otros marcadores de proliferación como el índice mitótico, el antígeno de proliferación nuclear celular (PCNA), el índice de timidina y bromodeoxiuridina (LI). Éste incluía 85 estudios publicados en inglés con más de 100 casos, 43 de ellos para el análisis de Ki-67.

Concluyeron que Ki-67 es un factor pronóstico independiente para SLE (en 15 de 22 estudios) y para SG (en 11 de 24 estudios), aunque su valor es moderado, con un HR= 1,76 (IC: 1,56 - 1,98) para la SLE y un HR= 1,42 (IC: 1,14 - 1,77) para la SG. Pero no pudieron identificar cuál de los marcadores de proliferación analizados era más

importante o si su uso aportaba información adicional respecto a los factores pronósticos establecidos.

En 2013 se publicó un metaanálisis<sup>180</sup> que estudiaba el papel de Ki-67 para predecir la sensibilidad a quimioterapia adyuvante de los cánceres de mama con receptores hormonales positivos. Incluía 5 ensayos randomizados fase III y concluyó que los pacientes con receptores hormonales positivos y Ki-67 alto, mejoran su SLE al administrar quimioterapia adyuvante con un esquema basado en antraciclinas y taxanos. Los tumores con receptores hormonales positivos tratados con quimioterapia adyuvante que tienen un Ki-67 alto, presentan una peor SLE, independientemente del régimen administrado y son más sensibles a los esquemas que combinan antraciclinas y taxanos. Definen como mejor punto de corte de Ki-67 para distinguir qué pacientes con receptores hormonales positivos se beneficiarán de quimioterapia adyuvante, un valor  $\geq 19\%$ .

Recientemente, en el año 2015 Petrelli F. llevó a cabo otro metaanálisis<sup>30</sup> que analizaba el valor pronóstico de diferentes puntos de corte del índice de proliferación Ki-67. Incluía 41 estudios publicados en inglés, con un tiempo de seguimiento medio de 28 a 188 meses. Los autores concluyeron que Ki-67 es un factor pronóstico independiente de supervivencia libre de enfermedad (HR= 1,50. IC: 1,34-1,69) y supervivencia global (HR= 1,57. IC: 1,33-1,87). Un valor alto de Ki-67 (como mínimo del 10%), se asocia a un incremento del riesgo de muerte de más del 50% y del riesgo de recurrencia del 64%.

Encontraron que todos los puntos de corte de Ki-67 por encima del 10% se asociaban con un peor pronóstico, al comportarse como una variable continua, pero el punto más potente desde el punto de vista pronóstico para la SG era un Ki-67  $> 25\%$ . Aunque también remarcaban que este aspecto debería ser validado de manera prospectiva.

Respecto al punto de corte de Ki-67 utilizado para distinguir los tumores de tipo Luminal B-like HER2 negativos, afirman que se está lejos de alcanzar un consenso. La clasificación actual de Saint Gallen mantiene este punto en el 14%, a pesar de que en la última reunión de 2015 se votó como punto de corte un rango comprendido entre 20 y 29%<sup>11</sup>. Y las guías de práctica clínica de la ESMO proponen un punto de corte de Ki-67

del 20% para definir los tumores Luminal B-like HER2 negativos que se beneficiarían de quimioterapia adyuvante<sup>181</sup>.

En nuestro estudio, se confirmó el valor pronóstico del índice de proliferación Ki-67, para la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia específica por cáncer de mama. Ki-67 resultó ser un factor pronóstico independiente en el análisis multivariante para la SLE con un hazard ratio de 1,809 (IC 95%: 1,041-3,145) y para la supervivencia específica por cáncer de mama con un hazard ratio de 2,230 (IC 95%: 1,133- 4,386). Los hazard ratio obtenidos en ambos análisis de supervivencia, demuestran que Ki-67 es un factor pronóstico con un valor moderado y esto concuerda con las conclusiones de los metaanálisis publicados.

Los puntos de corte de Ki-67 se escogieron a partir del análisis de las curvas ROC, eligiendo aquellos que proporcionaban un mayor equilibrio entre la sensibilidad y especificidad para el evento a estudio. Dichos puntos fueron Ki-67  $\geq$  19% para el análisis de la SLE y Ki-67  $\geq$  24% para la supervivencia específica. El único metaanálisis publicado cuyo objetivo era analizar el valor pronóstico de los puntos de corte de Ki-67, definió como mejor punto para la supervivencia global un valor superior a 25%, cifra muy similar a la obtenida en nuestro trabajo<sup>30</sup>.

Sin embargo, a la hora de definir posibles puntos de corte de Ki-67, es importante recordar que éste sigue una distribución continua y es probable que si hubiéramos realizado el análisis de supervivencia utilizando otros valores de esta variable (por ejemplo 16,5% para la SLE o 22,0% para la supervivencia específica), éste habría resultado igualmente significativo.

Además de los metaanálisis, se han publicado varios artículos de revisión que han estudiado la utilidad clínica del índice de proliferación Ki-67.

El primer artículo de revisión data del año 2000 y fue escrito por Scholzen T. y Gerdes J.<sup>23</sup> (descubridor este último del anticuerpo Ki-67 en 1983). En él se revisó la evidencia disponible hasta la fecha respecto a su valor pronóstico, analizando los artículos publicados desde 1995, concluyendo que su expresión sí se correlaciona con la

evolución de los pacientes y los valores elevados de Ki-67 se asocian a una peor supervivencia.

Un año después se publicó otra revisión, llevada a cabo por el MD Anderson Cancer Center, que estudiaba los posibles factores pronósticos en el cáncer de mama sin afectación ganglionar, con el fin de discernir qué pacientes se beneficiarían de recibir quimioterapia adyuvante<sup>59</sup>. Ésta incluyó todos los trabajos con más de 200 casos y seguimiento mínimo de 5 años, publicados entre 1996 y 2000. Tras analizar 11 posibles factores, 7 de ellos demostraron una asociación significativa con la supervivencia: tamaño, grado tumoral, catepsina D, Ki-67, fracción celular S, índice mitótico e invasión linfovascular.

Ki-67 resultó ser un factor pronóstico independiente para la SLE y / o la supervivencia global en los tumores con ganglios negativos, en cuatro de los cinco estudios revisados, siendo el mejor punto de corte un 10%. Sin embargo, a pesar de su potencial, concluyeron que no se podía recomendar su determinación rutinaria en la práctica clínica hasta que las dificultades técnicas que acompañan a ésta fueran mejoradas.

Algo similar ocurrió en la revisión llevada a cabo por Colozza M. en 2005<sup>182</sup>. En ésta se analizó el valor pronóstico y predictivo de varios marcadores de proliferación en el cáncer de mama, incluido Ki-67; y la mayoría de estudios revisados encontraron una asociación estadística entre éstos y la SLE y / o supervivencia global. A pesar de ello, concluyeron que para poder recomendar el uso de estos marcadores en la práctica clínica, se deberían estandarizar los procedimientos implicados en su determinación y se deberían diseñar ensayos prospectivos que los comparasen con el fin de saber cuál es de mayor utilidad.

Ese mismo año se publicó una revisión centrada en el papel tanto pronóstico como predictivo, del índice de proliferación Ki-67 en el cáncer de mama, que analizó los resultados de 40 estudios con más de 200 casos cada uno<sup>24</sup>. La mayoría de trabajos eran retrospectivos y muy heterogéneos, con puntos de corte de Ki-67 que iban desde el 1% a 28,6%. Se concluyó que Ki-67 tiene un valor modesto como factor pronóstico independiente, que no justifica su determinación rutinaria en la mayoría de tumores. Por otra parte, consideraron que su determinación mediante inmunohistoquímica es

más fácil, económica y reproducible que la de otros marcadores de proliferación y que quizás sería más útil valorarlo como una variable continua, en lugar de buscar puntos de corte.

En 2010 se realizó una nueva revisión de la utilidad pronóstica y predictiva de Ki-67, en la que se destacó la existencia de una creciente evidencia de su valor pronóstico, pudiendo resultar su determinación coste-efectiva<sup>9</sup>. Y posteriormente se han publicado otras tres revisiones en las que se ha analizado el papel como factor pronóstico de Ki-67, obteniendo resultados similares<sup>44,103,183</sup>. En todas se demuestra su valor como factor pronóstico independiente, aunque se resalta la falta de estandarización en su determinación y en los puntos de corte empleados.

El Grupo Internacional de trabajo sobre Ki-67, con el fin de homogeneizar la metodología empleada en su determinación y facilitar la comparación de resultados entre laboratorios y estudios, emitió en 2011 una serie de recomendaciones<sup>47</sup> (resumidas en el apartado 1.4.6.). Este grupo señaló que a pesar de que existen una serie de factores que pueden influir en su valoración mediante inmunohistoquímica, Ki-67 es uno de los marcadores más robustos de los que se detectan mediante esta técnica.

Diversos estudios han analizado la variabilidad interlaboratorio en la determinación de Ki-67, destacando entre éstos un trabajo internacional multicéntrico publicado en 2013<sup>184</sup>. En éste se obtuvo una reproducibilidad interlaboratorio de Ki-67 alta (coeficiente de correlación= 0,94) e intralaboratorio moderada (coeficiente de correlación= 0,71), concluyendo que los puntos de corte no pueden ser transferidos entre laboratorios. El mismo grupo en 2015 llevó a cabo un estudio en el que logró mejorar esta concordancia, mediante la aplicación de un programa informático específico para la determinación de Ki-67, aunque sin lograr una completa correlación<sup>185</sup>.

Al comparar las recomendaciones emitidas por el Grupo Internacional para la determinación de Ki-67, con la metodología empleada para dicho fin en nuestro estudio, la diferencia más llamativa se encuentra en el número de células tumorales

incluidas en el conteo. Para calcular el índice de proliferación Ki-67 se llevó a cabo un recuento visual que incluía entre 2 y 4 campos de gran aumento, valorando las zonas con mayor y menor expresión de Ki-67 y también los márgenes invasivos, contando un total de 100 células tumorales invasivas; mientras que el Grupo Internacional recomienda seleccionar al menos tres campos de gran aumento e incluir como mínimo 500 células malignas invasivas<sup>47</sup>.

Por lo tanto, hasta que se produzca una estandarización en la metodología empleada para la determinación de Ki-67, que permita interpretar y aplicar los resultados obtenidos en los diferentes trabajos publicados a la práctica clínica, será fundamental conocer los valores de referencia (y puntos de corte) del laboratorio que la haya llevado a cabo dicha determinación.

En las tablas nº 68 - 71 se presenta un resumen de los artículos que han analizado el valor pronóstico de Ki-67 para la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global y / o específica por cáncer de mama. En la revisión bibliográfica sólo se incluyeron aquellos estudios con un tamaño mínimo de 100 casos que habían realizado un análisis multivariante de la muestra.

Como se puede observar, la gran mayoría de estudios concluyeron que Ki-67 es un factor pronóstico independiente para la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global y/o específica por cáncer de mama.

Algunos trabajos no obtuvieron resultados significativos respecto a Ki-67. Esto se observó fundamentalmente en aquellos con series cortas<sup>66,186,187,188</sup> y en los que realizaban el análisis en un subgrupo de pacientes con unas características muy concretas<sup>189,190</sup>.

**Tabla 68.** Estudios en los que Ki-67 resultó ser un factor pronóstico independiente para la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global (y/o específica) por cáncer de mama.

Autor principal y año de publicación	Número de casos	Periodo de seguimiento (media)	Punto de corte de Ki-67	Hazard ratio de Ki-67 (intervalo de confianza 95%)	Factores pronósticos independientes para SLE y SG
Seshadri R <sup>146</sup>  (1996)	740	66 meses (41-93)	≥ 10%	- SLE: RR= 1,8 (1,3-2,6).  - SG: RR= 2,2 (1,5-3,2).	- Para SLE: Ki-67, tamaño tumoral (>2cm) y nº de ganglios+ ( $\geq 4$ ).  - Para SG: Ki-67, tamaño, ganglios+ y RE-.
Rudolph P <sup>191</sup>  (1999)	942	149 meses (44,9-199,9)	> 25%	- SLE: RR= 1,58 (1,24-2,01).  - SG: RR= 1,75 (1,39-2,2).	- Para SLE: Ki-67, ganglios+, tamaño y RP-.  - Para SG: Ki-67, ganglios+, tamaño, RP- y edad > 50 años.
Jung S-Y <sup>85</sup>  (2009)	1080, en estadio I y II.	43,9 meses (13-117)	≥ 10%	- SLE: HR= 1,84 (1,17-2,90).  - SG: HR= 2,49 (1,19-5,20).	- Para SLE: Ki-67, ganglios + y edad ( $\geq 35$ años).  - Para SG: Ki-67 y ganglios+.
Nishimura R <sup>34</sup>  (2010)	2638	68,5 meses	≥ 20%	- SLE: HR en univariante: 3,2 (2,2-4,6).  - SG: No consta HR.	- Para SLE: Ki-67, tamaño (>2cm), ganglios+ y RH-.  - No hace análisis multivariante para SG, pero Ki-67 es significativo en el análisis univariante.
Botteri E <sup>32</sup>  (2010)	2784 con CC de mama y radioterapia	72 meses (2,4-108)	> 20%	- SLE locorregional: HR= 2,0 (1,2-3,4).  - SG: HR= 3,2 (2,2-4,6).	- Para SLE locorregional: Ki-67, edad < 50, tamaño (> 2cm), RE- y HER2+.  - Para SG y metástasis: Ki-67, ganglios+, edad < 50 años e ILV.
Aleskandarany M A <sup>104</sup>  (2011)	1550 (506 casos con grado histológico 2)	No consta	≥ 10%	- SLE en tumores G2: HR= 2,188 (1,364 - 3,509).  - SG en tumores G2: HR= 3,251 (1,796 - 5,886).	- Para SLE en tumores G2: Ki-67, tamaño, ganglios, subtipo luminal o HER2.  - Para SG en tumores G2: Ki-67, tamaño y ganglios+.

<b>Matsubara N</b> <sup>192</sup> <b>(2011)</b>	1166	61 meses (6-122)	$\geq 10\%$	- SLE: HR= 1,707 (1,152-2,528). - SG: HR= 1,83 (1,045-3,204).	- Para SLE: Ki-67, tamaño, ganglios+ y grado histológico . -Para SG: Ki-67, tamaño, ganglios, grado histológico y RP-.
<b>Inwald E C</b> <sup>10</sup> <b>(2013)</b>	3658	42 meses	- SLE: > 45%.  - SG: 26-35%, 36-45% y > 45%.	- SLE: HR= 1,96 (1,31-2,91).  - SG: HR= 2,06 (1,30-3,28).	- Para SLE: Ki-67, edad, menopausia, tamaño, ganglios+, grado histológico e ILV.  - Para SG: Ki-67, edad, tamaño, ganglios+, RE- y HER2+.
<b>Nishimiya H</b> <sup>193</sup> <b>(2014)</b>	253	120 meses	> 20%	- SLE: HR= 1,80 (1,36-2,34).  - SG: HR= 2,31 (1,67-3,19).	- Para SLE: Ki-67, CEA (> 2,5 ng/ml) y edad (< 50).  - Para SG: Ki-67, CEA, RH-, edad y tamaño (>2cm).
<b>Tamaki K</b> <sup>194</sup> <b>(2014)</b>	408	60 meses	20-25%	En tumores RE+ y HER2-:  - SLE: HR= 10,85.  - SG: HR= 39,12.	- También analiza: tamaño tumoral, ganglios, estadio y quimioterapia adyuvante (no indica cuales son significativos).
<b>Honma N</b> <sup>55</sup> <b>(2015)</b>	442 con tamoxifeno adyuvante.	133,2 meses (6-232,8)	> 15% (en los "hot spots")	En tumores RH+ y HER2-:  - SLE: HR= 1,950 (1,081-3,349).  - SG: HR= 2,178 (1,148-3,933).	- Para SLE: Ki-67, tamaño (>2cm) y ganglios+.  - Para SG: Ki-67, tamaño y ganglios+.
<b>Tashima R</b> <sup>58</sup> <b>(2015)</b>	3186	81 meses	$\geq 20\%$	- SG: HR= 1,880 (1,372-2,575).	- Para SLE: Ki-67 (como variable continua), tamaño, p53 y ganglios+.  - Para SG: Ki-67 ( $\geq 20\%$ ), tamaño, p53 y ganglios+.

SLE: supervivencia libre de enfermedad. SG: supervivencia global. RR: riesgo relativo. HR: hazard ratio. RE+: receptor de estrógenos negativo. RP-: receptor de progesterona negativo. RH: receptores hormonales. Ganglios+: ganglios positivos para malignidad. ILV: invasión linfovascular. G2: grado histológico combinado de Nottingham 2. CC: cirugía conservadora de mama.

**Tabla 69.** Estudios en los que Ki-67 resultó ser un factor independiente de supervivencia libre de enfermedad, pero no de supervivencia global (y/o específica) por cáncer de mama.

Autor principal y año de publicación	Número de casos	Periodo de seguimiento (media)	Punto de corte de Ki-67	Hazard ratio de Ki-67 (intervalo confianza 95%)	Factores pronósticos independientes para SLE y SG
Railo M <sup>186</sup> (1993)	327	32,4 meses (máximo de 48 meses)	> 10%	No consta	- Para SLE: Ki-67, RE-, tamaño y ganglios+.  - Para SG: Ki-67 no significativo en análisis univariante.
Jansen R L <sup>187</sup> (1998)	341	128 meses (61-170)	> 7%	No consta	- Para SLE: Ki-67 y ganglios+.  - Para SG: ganglios+, tamaño y edad (>50).
Tsutsui S <sup>109</sup> (2004)	250	76,8 meses	≥ 10%	No consta	- Para SLE: Ki-67 y ganglios+.  - No analiza SG.
Viale G <sup>115</sup> (2008)	2685 Ensayo BIG 1-98 (RH+ y letrozol o tamoxifeno adyuvante)	51 meses	> 11%	SLE: HR= 1,4 (1,1 - 1,9).	- Para SLE: Ki-67 ajustado por edad, RP, tamaño, grado, ganglios+, HER2 e ILV.  - No analiza SG.
Nishimura R <sup>195</sup> (2013)	4774	> 120 meses	≥ 50%	No consta	- Para SLE < 10 años y tumores con RE+: Ki-67, tamaño, ganglios+ y RP-.  - Para SLE ≥ 10 años: RP- y ganglios+.  - No analiza SG.
Niikura N <sup>196</sup> (2014)	1331	44,4 meses (19,2 - 138)	≥ 10%	- SLE en tumores RE+ y HER2-: HR= 0,462 (0,276-0,774)	- Para SLE en tumores RE+ y HER2-: Ki-67, pT(≥pT3) y ganglios+.  - Ki-67 no es significativo en otros tipos de tumores.  - No analiza SG.

SLE: supervivencia libre de enfermedad. SG: supervivencia global. HR: hazard ratio. RE-: receptor de estrógenos negativo. RP-: receptor de progesterona negativo. RH: receptores hormonales. Ganglios+: ganglios positivos para malignidad. ILV: invasión linfovascular. Grado: grado histológico combinado de Nottingham 2.

**Tabla 70.** Estudios en los que Ki-67 resultó ser un factor independiente de supervivencia global (y/o específica), pero no de supervivencia libre de enfermedad por cáncer de mama.

Autor principal y año de publicación	Número de casos	Periodo de seguimiento (media)	Punto de corte de Ki-67	Hazard ratio de Ki-67 (intervalo de confianza 95%)	Factores pronósticos independientes para SLE y SG
<b>Domagala W</b> <sup>197</sup> <b>(1996)</b>	186	60 meses	> 10%	SG: RR= 2,06.	- Para SG: Ki-67, ganglios+, tamaño y vimentina+. - No analiza SLE.
<b>Caly M</b> <sup>188</sup> <b>(2004)</b>	257	72 meses mínimo	≥ 32%	SG: HR= 1,83.	- Para SG: sólo Ki-67 (lo analiza junto a afectación ganglionar y RP). - Para SLE: fracción S celular.
<b>Lin CH</b> <sup>66</sup> <b>(2011)</b>	116	62,7 meses	≥ 20%	SG: HR= 3,93 (1,51-10,23).	- Para SG: Ki-67, tamaño, HER2+ y p53. - Para SLE: ganglios+ y p53.

SLE: supervivencia libre de enfermedad. SG: supervivencia global. HR: hazard ratio. RR: riesgo relativo. RP: receptor de progesterona. Ganglios+: ganglios positivos para malignidad.

**Tabla 71.** Estudios en los que Ki-67 no resultó ser un factor independiente de supervivencia libre de enfermedad ni de supervivencia global por cáncer de mama.

Autor principal y año de publicación	Número de casos	Periodo de seguimiento (media)	Punto de corte de Ki-67	Hazard ratio de Ki-67 (intervalo de confianza 95%)	Factores pronósticos independientes para SLE y SG
<b>Zurrida S</b> <sup>189</sup> <b>(2013)</b>	285  Ensayo GRISO 053: < 1,4 cm, > 45 años, CC de mama y radioterapia	133,2 meses	≥ 14%	- En análisis multivariante Ki-67 no influye sobre la SLE ni SG.	- Para SLE (metástasis): RE- y radioterapia axilar. - Para SG: RE- y edad ( $\leq 60$ años).
<b>Hafeez F</b> <sup>190</sup> <b>(2013)</b>	438 con CC de mama y radioterapia	87,6 meses	≥ 10%	- En análisis multivariante Ki-67 no influye sobre la SLE ni SG.	- Para SLE (metástasis): edad ( $\geq 50$ ), RE-, ganglios+ y tamaño ( $>2\text{cm}$ ). - Para SG: ganglios+ y tamaño.

SLE: supervivencia libre de enfermedad. SG: supervivencia global. RE-: receptor de estrógenos negativo. Ganglios+: ganglios positivos para malignidad. CC: cirugía conservadora de mama.

Al aplicar el análisis multivariante en nuestros trabajo, otras tres variables además de Ki-67, resultaron significativas tanto para la SLE como para la supervivencia específica: tamaño tumoral, invasión linfovascular y la presencia de macrometástasis en los ganglios axilares. Las variables grado histológico y receptores hormonales negativos, no quedaron incluidas en el modelo multivariante, aunque sí que resultaron significativas en el análisis bivariante.

Al observar los resultados obtenidos en otros estudios, vemos cómo las variables que se asocian con más frecuencia con la supervivencia de los pacientes con cáncer de mama, coinciden con las obtenidas en nuestro análisis. Por una parte, los factores pronósticos clásicos como el tamaño tumoral, grado histológico y afectación tumoral ganglionar (componentes del índice pronóstico de Nottingham) y por otra, factores como la invasión linfovascular y el índice de proliferación Ki-67.

Los puntos de corte de Ki-67 empleados con más frecuencia para analizar su valor como factor pronóstico en el cáncer de mama fueron 10%, 20% y 25%. Estos puntos son muy similares a los empleados en nuestro estudio (19% para supervivencia libre de enfermedad y 24% para la supervivencia específica).

Pero los trabajos de Inwald et al<sup>10</sup> y Nishimura et al<sup>195</sup>, con casuísticas importantes (3658 y 4774 casos respectivamente), definieron puntos de corte de Ki-67 más altos desde el punto de vista pronóstico. El primero concluyó que Ki-67 > 45% es un factor pronóstico independiente para la SLE y los puntos de corte de Ki-67  $\geq$  26% los son para la SG. Y el segundo definió Ki-67  $\geq$  50% como factor pronóstico independiente para la SLE en los primeros 10 años.

A la vista de estos resultados, es prácticamente imposible encontrar un único punto de corte, que defina el valor pronóstico de Ki-67, ya que éste dependerá, entre otros aspectos, de la metodología empleada para su determinación en cada laboratorio de Anatomía Patológica. Para poder aplicar los puntos de corte en nuestra práctica clínica diaria, será fundamental conocer los valores de referencia del índice de proliferación Ki-67 de cada centro.

Otras alternativas serían considerar Ki-67 como una variable continua, tal y como han propuesto algunos autores<sup>24,30</sup> o bien utilizar puntos de corte arbitrarios consensuados

por las sociedades científicas, siempre y cuando se logre estandarizar y universalizar la metodología de su determinación.

### Índice de proliferación Ki-67 como factor pronóstico según la presencia o no de afectación tumoral ganglionar:

Dos de los metaanálisis que estudiaron la relación de Ki-67 con la supervivencia de los pacientes con cáncer de mama, concluyeron que éste se comporta como un factor pronóstico, incluso cuando se analizan por separado los tumores con ganglios positivos y negativos<sup>29,30</sup>.

En nuestro trabajo, al dividir a las pacientes según la presencia o no de macrometástasis axilares, se obtuvieron resultados diferentes en ambos grupos:

- En el grupo sin macrometástasis ganglionares, Ki-67 no resultó ser un factor pronóstico para la SLE ni la supervivencia específica por cáncer de mama, ni siquiera en el análisis bivariante.
- Mientras que en el grupo con macrometástasis ganglionares, Ki-67 sí que resultó ser un factor pronóstico independiente tanto para la supervivencia libre de enfermedad (HR= 1,972, IC 95%: 1,001 - 3,887) como para la supervivencia específica por cáncer de mama (HR= 2,743, IC 95%: 1,230 - 6,117).

El resultado obtenido en las pacientes sin macrometástasis axilares contrasta con el obtenido por otros estudios.

En la revisión llevada a cabo en 2001 por Mirza et al<sup>59</sup>, como se ha mencionado anteriormente, se concluyó que los factores asociados de manera significativa a la supervivencia en los tumores con ganglios negativos eran el tamaño, grado histológico, catepsina D, Ki-67, fracción celular S, índice mitótico e invasión linfovascular.

Y en la revisión de Urruticoechea et al<sup>24</sup> de 2005, al analizar el valor pronóstico de Ki-67 según la presencia o no de ganglios positivos, se encontró una mayor evidencia de éste en los tumores con ganglios negativos. Mientras que en los estudios con ganglios

positivos o en los grupos mixtos, los resultados eran más heterogéneos aunque con predominio también de los significativos.

En la tabla nº 72 se resumen los estudios que han analizado el valor pronóstico del índice de proliferación Ki-67 en los carcinomas de mama con ganglios negativos.

En ninguno de los trabajos que estudiaron la evolución en los pacientes con cáncer de mama y ganglios negativos, Ki-67 resultó ser un factor pronóstico independiente para ambos tipos de supervivencia (SLE y SG), demostrado a través de un análisis multivariante.

El estudio de Nishimura et al<sup>34</sup>, con 1740 cánceres de mama con ganglios negativos, demostró que Ki-67 es un factor pronóstico independiente para la SLE, pero no hizo análisis multivariante para la SG.

Matsubara et al<sup>192</sup>, con 807 pacientes con ganglios negativos, concluyó que Ki-67 se asocia con la SLE en el análisis bivariante, pero no llevó a cabo un análisis multivariante de los resultados.

Y algunos de los estudios que obtuvieron resultados significativos, analizaron únicamente subgrupos de pacientes de muy buen pronóstico, con estadios iniciales<sup>163,198,199,200</sup> o con tumores con receptores hormonales positivos y HER2 negativo<sup>155</sup>.

En nuestro estudio las pacientes se clasificaron según la presencia o no de macrometástasis axilares, por lo que las 50 pacientes que presentaban únicamente micrometástasis axilares, fueron incluidas en el grupo con ganglios negativos, al igual que las pacientes con células tumorales aisladas.

Sin embargo en los trabajos revisados, los grupos se establecieron según la presencia de o no de ganglios positivos, incluyendo en la categoría de ganglios positivos también a las micrometástasis ganglionares.

Este aspecto hace que los resultados del trabajo que se presenta no sean totalmente comparables a los del resto de publicaciones. Aunque por otra parte también supone una adaptación al manejo actual de la afectación tumoral de los ganglios axilares, ya que como se ha expuesto anteriormente, la presencia exclusiva de micrometástasis

ganglionares axilares no implica ningún cambio en el manejo terapéutico de las pacientes con cáncer de mama.

En las pacientes sin macrometástasis axilares, las variables que resultaron comportarse como un factor pronóstico independiente para la SLE fueron el tamaño tumoral y el receptor de estrógeno negativo; y en el caso de la supervivencia específica por cáncer de mama, solamente la variable receptor de estrógeno negativo resultó ser significativa.

El grado histológico y la presencia de invasión linfovascular, son otras de las variables que con frecuencia se han asociado a la supervivencia de estas pacientes en la bibliografía revisada, pero en nuestro caso ninguno de estos factores resultó ser significativo en el análisis bivariante.

**Tabla 72.** Estudios que analizaron el valor pronóstico de Ki-67 para la supervivencia libre de enfermedad y/o la supervivencia global por cáncer de mama, en pacientes con ganglios axilares negativos para malignidad.

Autor principal y año de publicación	Número de casos	Periodo de seguimiento (media)	Punto de corte de Ki-67	Hazard ratio de Ki-67 (intervalo de confianza 95%)	Factores pronósticos independientes para SLE y SG si ganglios negativos
<b>Domagala W<sup>197</sup> (1996)</b>	186 (111 con ganglios negativos)	60 meses	> 10%	- En análisis multivariante Ki-67 no influye sobre la SG en tumores con ganglios-.	- Para SG: vimentina+. - No analiza SLE.
<b>Seshadri R<sup>146</sup> (1996)</b>	740 (424 con ganglios negativos)	66 meses (41-93)	≥ 10%	- SG: RR= 1,9 (1,1 - 3,2). - Ki-67 no es significativo en análisis multivariante para SLE.	- Para SLE: tamaño (>2cm) y RE-. - Para SG: Ki-67, tamaño y RE-.
<b>Haerslev T<sup>201</sup> (1996)</b>	487 (307 con ganglios negativos)	60 meses	> 1%	- Ki-67 no es significativo en el análisis multivariante	- Para SG: tamaño y grado histológico. - No analiza SLE.
<b>Railo M<sup>163</sup> (1997)</b>	212 estadio T1 N0	99,6 meses (2,4 - 224,4)	≥ 10%	- SLE: RR= 2,23 (1,21 - 4,08).	- Para SLE: Ki-67. - No analiza SG.
<b>Colleoni M<sup>199</sup> (2004)</b>	425 estadio pT1a-pT1b y ganglios negativos	43 meses (1,5-82,4)	≥ 20%	- SLE: HR= 12,9 (1,49-112,0).	- Para SLE: sólo Ki-67. - No analiza SG.
<b>Railo M<sup>198</sup> (2007)</b>	212 casos estadio T1N0	190,8 meses (2,4 - 326,4)	≥ 10%	- En análisis multivariante Ki-67 no influye sobre la SG. - No analiza la SLE.	- Para SG: ninguno de los factores estudiados (Ki-67, p53, RE, índice ADN, edad < 50, SPF). - No analiza SLE.

<b>Nishimura R</b> <sup>34</sup> <b>(2010)</b>	2638 (1740 con ganglios negativos)	68,5 meses	≥ 20%	No consta	- Para SLE: Ki-67 y tamaño (>2cm). - No hace análisis multivariante para SG, pero Ki-67 es significativo en el análisis univariante.
<b>Matsubara N</b> <sup>192</sup> <b>(2011)</b>	1166 (807 con ganglios negativos)	61 meses (6-122)	≥ 10%	- Sólo análisis bivariante	- Ki-67 es significativo para SLE en análisis bivariante, pero no para SG. - No análisis multivariante.
<b>Reyal F</b> <sup>200</sup> <b>(2013)</b>	456 estadio T1-T2 N0	151 meses (5 - 191)	> 20% (en los "hot spots")	SLE: RR= 3 (1,8 - 4,8).	- Para SLE (metástasis a distancia): Ki-67 y grado histológico. - No analiza SG.
<b>Ono M</b> <sup>155</sup> <b>(2013)</b>	369 tumores con RH+, HER2- y ganglios-.	120,1 meses (0,6 - 160,3)	≥ 10%	SLE: HR 2,31 (0,99 - 5,41).	- Para SLE: grado histológico y grado nuclear. (Ki-67 en el límite de la significación). - Para SG: grado histológico y grado nuclear.
<b>Pathmanathan N</b> <sup>147</sup> <b>(2014)</b>	193 con ganglios negativos y no tratamiento sistémico adyuvante	183 meses (156 - 277)	≥ 10%	SG: RR= 7,96 (1,69 - 37,48).	- Para SG: Ki-67 e ILV. - No analiza SLE.

SLE: supervivencia libre de enfermedad. SG: supervivencia global. RR: riesgo relativo. HR: hazard ratio. RE-: receptor de estrógenos negativo. RH+: receptores hormonales positivos. ILV: invasión linfovascular.

En la tabla nº 73 se resumen los artículos que analizaron el valor pronóstico del índice de proliferación Ki-67 en los cánceres de mama con ganglios positivos.

Solamente el estudio de Seshadri et al<sup>146</sup>, concluyó que Ki-67 es un factor pronóstico independiente para la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global en las pacientes con ganglios positivos, realizando un análisis multivariante de los resultados.

En otras publicaciones Ki-67 resultó ser un factor pronóstico independiente únicamente para la supervivencia libre de enfermedad o para la supervivencia global, en las pacientes con ganglios positivos<sup>34,197,202,203</sup>. Y en algunos trabajos no se pudo demostrar su papel como factor pronóstico<sup>201,204</sup>.

A pesar de que los resultados publicados en la bibliografía son heterogéneos, en nuestro estudio Ki-67 resultó ser un factor pronóstico independiente para la SLE y la supervivencia específica por cáncer de mama, en las pacientes con ganglios positivos, incluyendo en este grupo solamente a los tumores con macrometástasis axilares.

También resultaron ser factores pronósticos independientes para la SLE el tamaño tumoral y la presencia de invasión linfovascular; y en el caso de la supervivencia específica por cáncer de mama, solamente la invasión linfovascular resultó ser significativa.

El único factor pronóstico aplicable a ambos tipos de supervivencia en las pacientes con ganglios positivos fue la presencia de invasión linfovascular, con un HR= 2,478 (IC: 1,196 - 5,133) para la SLE y un HR= 4,958 (IC: 1,691 - 14,537) para la supervivencia específica. La influencia de la invasión linfovascular sobre la evolución de los pacientes con afectación tumoral ganglionar, ha sido demostrada también en otros estudios<sup>112,113</sup>.

**Tabla 73.** Estudios que analizaron el valor pronóstico de Ki-67 para la supervivencia libre de enfermedad y/o la supervivencia global por cáncer de mama, en pacientes con ganglios axilares positivos para malignidad.

Autor principal y año de publicación	Número de casos	Periodo de seguimiento (media)	Punto de corte de Ki-67	Hazard ratio de Ki-67 (intervalo de confianza 95%)	Factores pronósticos independientes para SLE y SG si ganglios positivos
<b>Domagala W</b> <sup>197</sup> <b>(1996)</b>	186 (75 con ganglios positivos)	60 meses	> 10%	SG si ganglios+: RR= 2,43.	- Para SG: Ki-67. - No analiza SLE.
<b>Seshadri R</b> <sup>146</sup> <b>(1996)</b>	740 (303 con ganglios positivos)	66 meses (41-93)	≥ 10%	- SLE: RR= 2,1 (1,4 - 3,1). - SG: RR= 2,4 (1,5 - 3,7).	- Para SLE: Ki-67 y RE-. - Para SG: Ki-67 y RE-.
<b>Haerslev T</b> <sup>201</sup> <b>(1996)</b>	487 (180 con ganglios positivos)	60 meses	> 1%	- Ki-67 no es significativo en el análisis multivariante	- Para SG: tamaño, grado histológico y RP. - No analiza SLE.
<b>Crabb S J</b> <sup>202</sup> <b>(2008)</b>	227 con ≥ 4 ganglios positivos	120 meses	≥ 10%	SLE: HR= 1,99 (1,32 - 3,00).	- Para SLE: Ki-67, tamaño, % de ganglios+, RP- y anhidrasa carbónica (CA) IX. - No análisis multivariante de SG.
<b>Nishimura R</b> <sup>34</sup> <b>(2010)</b>	2638 (840 con ganglios positivos)	68,5 meses	≥ 20%	No consta	- Para SLE: Ki-67, tamaño (>2cm) p53 y RH-. - No hace análisis multivariante para SG, pero Ki-67 es significativo en el análisis univariante.
<b>Matsubara N</b> <sup>192</sup> <b>(2011)</b>	1166 (340 con ganglios positivos)	61 meses (6 - 122)	≥ 10%	- Sólo análisis bivariante	- Ki-67 es significativo para SLE y SG en análisis bivariante. - No análisis multivariante.

<b>Li F-Y<sup>203</sup> (2014)</b>	450 con ganglios positivos y terapia adyuvante	46 meses (5 - 76)	> 25%	- SG: HR= 2,07 (1,08 - 3,95). - Ki-67 no significativo para SLE en multivariante.	- Para SLE (metástasis a distancia): tamaño, número de ganglios+ (>3) y RE-. - Para SG: Ki-67. - Si 1-3 ganglios +: Ki-67 es significativo para SLE y SG. - Si $\geq 4$ ganglios: Ki-67 no es significativo.
<b>Biesaga B<sup>204</sup> (2015)</b>	172 T1-T2, ganglios positivos y esquema basado en antraciclinas	24 meses (1 - 70)	> 37%	- Ki-67 no significativo para SLE en multivariante.	- Para SLE: topoisomerasa II $\alpha$ , bcl-2 y densidad de microcirculación. - No analiza SG.

SLE: supervivencia libre de enfermedad. SG: supervivencia global. RR: riesgo relativo. HR: hazard ratio. RE-: receptor de estrógenos negativo. RP-: receptor de progesterona negativo. RH-: receptores hormonales negativos.

Por lo tanto, a la vista de los resultados podemos concluir que el índice de proliferación Ki-67 es un factor pronóstico independiente en el total de pacientes con cáncer de mama y también en aquellas que presentan macrometástasis ganglionares.

Pero para que Ki-67 pueda ser utilizado como un factor pronóstico en la práctica clínica, dos aspectos deben mejorarse:

- Es fundamental que se estandarice la técnica empleada por los laboratorios en cálculo del índice de proliferación, para reducir la variabilidad interobservador y facilitar la comparación de resultados entre centros.
- Las sociedades científicas deberían consensuar puntos de corte, a ser posible basados en estudios prospectivos.

## 7. CONCLUSIONES

1. El índice de proliferación Ki-67 es un factor pronóstico independiente de supervivencia libre de enfermedad y de supervivencia específica en el carcinoma infiltrante de mama.
2. El punto de corte de Ki-67  $\geq 19\%$  es el que mejor predice la supervivencia libre de enfermedad y el punto de corte de Ki-67  $\geq 24\%$  es el que mejor predice la supervivencia específica por cáncer de mama.
3. El índice de proliferación Ki-67 no es un factor pronóstico en el carcinoma infiltrante de mama sin macrometástasis tumorales en los ganglios axilares.
4. El índice de proliferación Ki-67 es un factor pronóstico independiente en el carcinoma infiltrante de mama con macrometástasis tumorales en los ganglios axilares.
5. El índice de proliferación Ki-67 no es un factor predictivo independiente de macrometástasis por cáncer de mama en los ganglios axilares. El mejor modelo predictivo de afectación tumoral axilar, resultó ser el que incluía las variables tamaño tumoral e invasión linfovascular.
6. El índice de proliferación Ki-67 no es un factor predictivo de macrometástasis en los ganglios axilares no centinelas, cuando se realiza una biopsia selectiva del ganglio centinela. El mejor modelo predictivo de afectación de los ganglios no centinelas, se basa en la variable afectación tumoral extracapsular en los ganglios centinelas.
7. El único factor epidemiológico que se relaciona con la expresión tumoral de Ki-67 en las pacientes con cáncer de mama, es la edad. Las pacientes con edad menor o igual a 40 años presentan una mayor expresión de Ki-67, respecto a las pacientes con edades comprendidas entre 40 y 70 años.

8. Los cánceres de mama con una elevada expresión de Ki-67, presentan con frecuencia un mayor tamaño tumoral, mayor grado histológico, presencia de invasión linfovascular, ausencia de receptores hormonales, mayor expresión de p53, mayor expresión de HER2 y más tumores de tipo triple negativo.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* [Internet]. 2015 Mar [citado 2 Sep 2016];136(5):E359-86. Disponible en:  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.29210/abstract;jsessionid=4543FD0C7E784446F498651822F014F4.f02t03>
2. Sant M, Chirlaque Lopez MD, Agresti R, Sánchez Pérez MJ, Holleczek B, Bielska-Lasota M, et al. Survival of women with cancers of breast and genital organs in Europe 1999-2007: results of the EUROCARE-5 study. *Eur J Cancer* [Internet]. 2015 sep [citado 3 Sep 2016];S0959-8049(15)00702-9. Disponible en:  
[http://www.ejancer.com/article/S0959-8049\(15\)00702-9/pdf](http://www.ejancer.com/article/S0959-8049(15)00702-9/pdf)
3. Tavassoli FA, Devilee P. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Lyon: IARC Press; 2003.
4. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. WHO Classification of Tumours of the Breast. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2012.
5. Sinn HP, Kreipe H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast Care (Basel)*. 2013;8(2):149-54.
6. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52.
7. Kim HS, Park I, Cho HJ, Gwak G, Yang K, Bae BN, et al. Analysis of the potent prognostic factors in luminal-type breast cancer. *J Breast Cancer*. 2012;15(4):401-6.
8. Dawson SJ, Rueda OM, Aparicio S, Caldas C. A new genome-driven integrated classification of breast cancer and its implications. *EMBO J*. 2013;32(5):617-28.

9. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol.* 2010;11(2):174-83.
10. Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, Zeman F, Koller M, Gerstenhauer M, et al. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;139(2):539-52.
11. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnant M, Piccart-Gebhart M, et al. Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol.* 2015;26(8):1533-46.
12. Viale G. The current state of breast cancer classification. *Ann Oncol.* 2012;23 Suppl 10:207-10.
13. Niikura N, Iwamoto T, Masuda S, Kumaki N, Xiaoyan T, Shirane M, et al. Immunohistochemical Ki67 labeling index has similar proliferation predictive power to various gene signatures in breast cancer. *Cancer Sci.* 2012;103(8):1508-12.
14. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ, et al. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol.* 2009;20(8):1319-29.
15. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ, et al. 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(8):1736-47.
16. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(10):736-50.

17. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol.* 2013;24(9):2206-23.
18. Prat A, Cheang MC, Martín M, Parker JS, Carrasco E, Caballero R, et al. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. *J Clin Oncol.* 2013;31(2):203-9.
19. Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. Diseases of the breast. 5<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2014.
20. Maisonneuve P, Disalvatore D, Rotmensz N, Curigliano G, Colleoni M, Dellapasqua S, et al. Proposed new clinicopathological surrogate definitions of luminal A and luminal B (HER2-negative) intrinsic breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res [Internet].* 2014 [citado 3 Sep 2016];16(3):R65. Disponible en:  
<http://breast-cancerresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr3679>
21. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(10):736-50.
22. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM Classification of Malignant Tumours, 7th Edition. Oxford:Wiley-Blackwell; 2009.
23. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000;182(3):311-22.
24. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23(28):7212-20.

25. Gerdes J, Lelle RJ, Pickartz H, Heidenreich W, Schwarting R, Kurtsiefer L, et al. Growth fractions in breast cancers determined in situ with monoclonal antibody Ki-67. *J Clin Pathol.* 1986;39(9):977-80.
26. Horimoto Y, Arakawa A, Tanabe M, Kuroda K, Matsuoka J, Igari F, et al. Menstrual cycle could affect Ki67 expression in estrogen receptor-positive breast cancer patients. *J Clin Pathol.* 2015;68(10):825-9.
27. Bertucci F, Finetti P, Roche H, Le Doussal JM, Marisa L, Martin AL, et al. Comparison of the prognostic value of genomic grade index, Ki67 expression and mitotic activity index in early node-positive breast cancer patients. *Ann Oncol.* 2013;24(3):625-32.
28. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast.* 2008;17(4):323-34.
29. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G Jr, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, 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(10):1504-13.
30. Petrelli F, Viale G, Cabiddu M, Barni S. Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;153(3):477-91.
31. Shin HC, Han W, Moon HG, Im SA, Moon WK, Park IA, et al. Breast-conserving surgery after tumor downstaging by neoadjuvant chemotherapy is oncologically safe for stage III breast cancer patients. *Ann Surg Oncol.* 2013;20(8):2582-9.
32. Botteri E, Bagnardi V, Rotmensz N, Gentilini O, Disalvatore D, Bazolli B, et al. Analysis of local and regional recurrences in breast cancer after conservative surgery. *Ann Oncol.* 2010;21(4):723-8.

33. Okumura Y, Nishimura R, Nakatsukasa K, Yoshida A, Masuda N, Tanabe M, et al. Change in estrogen receptor, HER2, and Ki-67 status between primary breast cancer and ipsilateral breast cancer tumor recurrence. *Eur J Surg Oncol.* 2015;41(4):548-52.
34. Nishimura R, Osako T, Okumura Y, Hayashi M, Toyozumi Y, Arima N. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer subtype and a predictor of recurrence time in primary breast cancer. *Exp Ther Med.* 2010;1(5):747- 754.
35. Song WJ, Kim KI, Park SH, Kwon MS, Lee TH, Park HK, et al. The Risk Factors Influencing between the Early and Late Recurrence in Systemic Recurrent Breast Cancer. *J Breast Cancer.* 2012;15(2):218-23.
36. Ribelles N, Perez-Villa L, Jerez JM, Pajares B, Vicioso L, Jimenez B, et al. Pattern of recurrence of early breast cancer is different according to intrinsic subtype and proliferation index. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2013 [citado 25 Jul 2016];15(5):R98. Disponible en:  
<http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr3559>
37. Loehberg CR, Almstedt K, Jud SM, Haeberle L, Fasching PA, Hack CC, et al. Prognostic relevance of Ki-67 in the primary tumor for survival after a diagnosis of distant metastasis. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;138(3):899-908.
38. Nishimura R, Osako T, Nishiyama Y, Tashima R, Nakano M, Fujisue M, et al. Prognostic significance of Ki-67 index value at the primary breast tumor in recurrent breast cancer. *Mol Clin Oncol.* 2014;2(6):1062-1068.
39. Nakano M, Fujisue M, Tashima R, Okumura Y, Nishiyama Y, Ohsako T, et al. Survival time according to the year of recurrence and subtype in recurrent breast cancer. *Breast.* 2015;24(5):588-93.
40. Metzger-Filho O, Sun Z, Viale G, Price KN, Crivellari D, Snyder RD, et al. Patterns of Recurrence and outcome according to breast cancer subtypes in lymph

- node-negative disease: results from international breast cancer study group trials VIII and IX. *J Clin Oncol.* 2013;31(25):3083-90.
41. Denkert C, Loibl S, Müller BM, Eidtmann H, Schmitt WD, Eiermann W, et al. Ki67 levels as predictive and prognostic parameters in pretherapeutic breast cancer core biopsies: a translational investigation in the neoadjuvant GeparTrio trial. *Ann Oncol.* 2013;24(11):2786-93.
  42. Fasching PA, Heusinger K, Haeberle L, Niklos M, Hein A, Bayer CM, et al. Ki67, chemotherapy response, and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment. *BMC Cancer* [Internet]. 2011 [citado 20 Sep 2016];11:486. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3262864/>
  43. Nishimura R, Osako T, Okumura Y, Hayashi M, Arima N. Clinical significance of Ki-67 in neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer as a predictor for chemosensitivity and for prognosis. *Breast Cancer*;17(4):269-75.
  44. Luporsi E, André F, Spyros F, Martin PM, Jacquemier J, Penault-Llorca F, et al. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;132(3):895-915.
  45. Győrffy B, Hatzis C, Sanft T, Hofstatter E, Aktas B, Pusztai L. Multigene prognostic tests in breast cancer: past, present, future. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2015 [citado 15 Sep 2016];17:11. Disponible en: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-015-0514-2>
  46. Alba E, Lluch A, Ribelles N, Anton-Torres A, Sanchez-Rovira P, Albanell J, et al. High Proliferation Predicts Pathological Complete Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Early Breast Cancer. *Oncologist* [Internet]. 2016 [citado 2 Jul 2016];21(6):778. Disponible en:  
<http://theoncologist.alphamedpress.org/content/21/6/778>

47. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(22):1656-64.
48. Montagna E, Bagnardi V, Viale G, Rotmensz N, Sporchia A, Cancello G, et al. Changes in PgR and Ki-67 in residual tumour and outcome of breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Ann Oncol.* 2015;26(2):307-13.
49. Yamazaki N, Wada N, Yamauchi C, Yoneyama K. High expression of post-treatment Ki-67 status is a risk factor for locoregional recurrence following breast-conserving surgery after neoadjuvant chemotherapy. *Eur J Surg Oncol.* 2015;41(5):617-24.
50. von Minckwitz G, Schmitt WD, Loibl S, Müller BM, Blohmer JU, Sinn BV, et al. Ki67 measured after neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2013;19(16):4521-31.
51. Bottini A, Berruti A, Bersiga A, Brizzi MP, Bruzzi P, Aguggini S et al. Relationship between tumour shrinkage and reduction in Ki67 expression after primary chemotherapy in human breast cancer. *Br J Cancer.* 2001;85(8):1106-12.
52. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, 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(33):5287-312.
53. National Comprehensive Cancer Network. Breast cancer. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology [Internet]. 2016 [citado 19 Sep 2016]. Disponible en: [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/breast.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf).
54. College of American Pathologist. Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Invasive Carcinoma of the Breast [Internet]. 2016 [citado 19 Sep 2016]. Disponible en: <http://www.cap.org>ShowProperty?nodePath=/UCMCon/Contribution%20Folders/WebContent/pdf/cp-breast-invasive-16protocol-3300.pdf>

55. Honma N, Horii R, Iwase T, Saji S, Younes M, Ito Y, et al. Ki-67 evaluation at the hottest spot predicts clinical outcome of patients with hormone receptor-positive/HER2-negative breast cancer treated with adjuvant tamoxifen monotherapy. *Breast Cancer*. 2015;22(1):71-8.
56. Spyratos F, Ferrero-Poüs M, Trassard M, Hacène K, Phillips E, Tubiana-Hulin M, et al. Correlation between MIB-1 and other proliferation markers: clinical implications of the MIB-1 cutoff value. *Cancer*. 2002;94(8):2151-9.
57. Pavlakis K, Vrekoussis T, Tsipoura A, Tsenga A, Arapantoni-Dadioti P, Gavresea T, et al. Her2 negative luminal breast carcinoma and Ki-67 evaluation. *Breast*. 2012;21(4):529-33.
58. Tashima R, Nishimura R, Osako T, Nishiyama Y, Okumura Y, Nakano M, et al. Evaluation of an Optimal Cut-Off Point for the Ki-67 Index as a Prognostic Factor in Primary Breast Cancer: A Retrospective Study. *PLoS One* [Internet]. 2015 Jul [citado 7 Sep 2016];10(7):e0119565. Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0119565>
59. Mirza AN, Mirza NQ, Vlastos G, Singletary SE. Prognostic factors in node-negative breast cancer: a review of studies with sample size more than 200 and follow-up more than 5 years. *Ann Surg*. 2002;235(1):10-26.
60. Vasseur F, Baranzelli MC, Fournier C, Bonneterre J. Ki67 in young patients with breast cancer. *Gynecol Obstet Fertil*. 2013;41(1):16-9.
61. Hartley MC, McKinley BP, Rogers EA, Kalbaugh CA, Messich HS, Blackhurst DW, 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(12):1189-94.
62. Han JG, Jiang YD, Zhang CH, Pang D, Zhang M, Wang YB, et al. Clinicopathologic characteristics and prognosis of young patients with breast cancer. *Breast*. 2011;20(4):370-2.

63. Zavagno G, Meggiolaro F, Pluchinotta A, Bozza F, Favretti F, Marconato R, et al. Influence of age and menopausal status on pathologic and biologic features of breast cancer. *Breast*. 2000;9(6):320-8.
64. Morrison DH, Rahardja D, King E, Peng Y, Sarode VR. Tumour biomarker expression relative to age and molecular subtypes of invasive breast cancer. *Br J Cancer*. 2012;107(2):382-7.
65. Yao Y, Cao M, Fang H, Xie J. Breast cancer in 30-year-old or younger patients: clinicopathologic characteristics and prognosis. *World J Surg Oncol [Internet]*. 2015 [citado 4 Sep 2016];13:38. Disponible en:  
<http://wjso.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12957-015-0462-4>
66. Lin CH, Lu YS, Huang CS, Kuo KT, Wang CC, You SL, et al. Prognostic molecular markers in women aged 35 years or younger with breast cancer: is there a difference from the older patients? *J Clin Pathol*. 2011;64(9):781-7.
67. Pappo I, Karni T, Sandbank J, Dinur I, Sella A, Stahl-Kent V, et al. Breast cancer in the elderly: histological, hormonal and surgical characteristics. *Breast*. 2007;16(1):60-7.
68. Holmes CE, Muss HB. Diagnosis and treatment of breast cancer in the elderly. *CA Cancer J Clin*. 2003;53(4):227-44.
69. Morimoto Y, Killeen J, Hernandez BY, Mark Cline J, Maskarinec G. Parity and expression of epithelial histopathologic markers in breast tissue. *Eur J Cancer Prev*. 2013;22(5):404-8.
70. Lee SK, Kim SW, Han SA, Kil WH, Lee JE, Nam SJ. The protective effect of parity in hormone receptor-positive, Ki-67 expressing breast cancer. *World J Surg*. 2014;38(5):1065-9.
71. Talley LI, Grizzle WE, Waterbor JW, Brown D, Weiss H, Frost AR. Hormone receptors and proliferation in breast carcinomas of equivalent histologic grades in pre- and postmenopausal women. *Int J Cancer*. 2002;98(1):118-27.

72. Who.int [Internet]. World Health Organization [actualizado Jun 2016; citado 22 Sep 2016]. Obesity and overweight. Disponible en:  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
73. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad [Internet]. Encuesta Nacional de Salud de España 2011/12; [citado 18 Sep 2016]. Disponible en: <https://www.msssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas/encuestaNacional/encuestaNac2011/NotaTecnica2011-12.pdf>
74. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet.* 2008;371(9612):569-78.
75. van la Parra RF, Peer PG, Ernst MF, Bosscha K. Meta-analysis of predictive factors for non-sentinel lymph node metastases in breast cancer patients with a positive SLN. *Eur J Surg Oncol.* 2011;37(4):290-9.
76. Oestreicher N, White E, Malone KE, Porter PL. Hormonal factors and breast tumor proliferation: do factors that affect cancer risk also affect tumor growth? *Breast Cancer Res Treat.* 2004;85(2):133-42.
77. Kamineni A, Anderson ML, White E, Taplin SH, Porter P, Ballard-Barbash R, et al. Body mass index, tumor characteristics, and prognosis following diagnosis of early-stage breast cancer in a mammographically screened population. *Cancer Causes Control.* 2013;24(2):305-12.
78. Rauh C, Gass P, Heusinger K, Haeberle L, Jud SM, Hein A, et al. Association of molecular subtypes with breast cancer risk factors: a case-only analysis. *Eur J Cancer Prev.* 2015;24(6):484-90.
79. Pierobon M, Frankenfeld CL. Obesity as a risk factor for triple-negative breast cancers: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2013 Jan;137(1):307-14.

80. Soslow RA, Carlson DL, Horenstein MG, Osborne MP. A comparison of cell cycle markers in well-differentiated lobular and ductal carcinomas. *Breast Cancer Res Treat.* 2000;61(2):161-70.
81. Engels CC, Fontein DB, Kuppen PJ, de Kruijf EM, Smit VT, Nortier JW, et al. Immunological subtypes in breast cancer are prognostic for invasive ductal but not for invasive lobular breast carcinoma. *Br J Cancer.* 2014;111(3):532-8.
82. González-Sistal A, Sánchez AB, Del Rio MC, Arias JI, Herranz M, Ruibal A. Association between tumor size and immunohistochemical expression of Ki-67, p53 and BCL2 in a node-negative breast cancer population selected from a breast cancer screening program. *Anticancer Res.* 2014;34(1):269-73.
83. Midulla C, De Iorio P, Nagar C, Pisani T, Cenci M, Valli C, et al. Immunohistochemical expression of p53, nm23-HI, Ki67 and DNA ploidy: correlation with lymph node status and other clinical pathologic parameters in breast cancer. *Anticancer Res.* 1999;19(5B):4033-7.
84. Martínez-Arribas F, Martín-Garabato E, Lafuente P, Tejerina A, Lucas R, Sánchez J, et al. Proliferation measurement in breast cancer by two different methods. *Anticancer Res.* 2006;26(1A):199-202.
85. Jung SY, Han W, Lee JW, Ko E, Kim E, Yu JH, et al. Ki-67 expression gives additional prognostic information on St. Gallen 2007 and Adjuvant! Online risk categories in early breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 2009;16(5):1112-21.
86. Alco G, Bozdogan A, Selamoglu D, Pilancı KN, Tuzlali S, Ordu C, et al. Clinical and histopathological factors associated with Ki-67 expression in breast cancer patients. *Oncol Lett.* 2015;9(3):1046-1054.
87. Todd JH, Dowle C, Williams MR, Elston CW, Ellis IO, Hinton CP, et al. Confirmation of a prognostic index in primary breast cancer. *Br J Cancer.* 1987;56(4):489-92.
88. Bedi DG, Krishnamurthy R, Krishnamurthy S, Edeiken BS, Le-Petross H, Fornage BD, et al. Cortical morphologic features of axillary lymph nodes as a predictor of

- metastasis in breast cancer: in vitro sonographic study. *AJR Am J Roentgenol.* 2008;191(3):646-52.
89. Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann Surg.* 1994;220(3):391-8.
90. Peg V, Espinosa-Bravo M, Vieites B, Vilardell F, Antúnez JR, de Salas MS, et al. Intraoperative molecular analysis of total tumor load in sentinel lymph node: a new predictor of axillary status in early breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;139(1):87-93.
91. Bernet L, Pinero A, Vidal-Sicart S, Peg V, Giménez J, Algaraf M, et al. Consenso sobre la biopsia selectiva del ganglio centinela en el cáncer de mama. Revisión 2013 de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria. *Rev Esp Patol [Internet].* 2014 [citado 20 Jul 2016]. Disponible en: [https://www.seap.es/documents/10157/287128/Consenso\\_Ganglio\\_Centinela REP\\_2014.pdf](https://www.seap.es/documents/10157/287128/Consenso_Ganglio_Centinela REP_2014.pdf)
92. Susini T, Nori J, Olivieri S, Molino C, Marini G, Bianchi S, et al. Predicting the status of axillary lymph nodes in breast cancer: a multiparameter approach including axillary ultrasound scanning. *Breast.* 2009;18(2):103-8.
93. Kwon Y, Ro J, Kang HS, Kim SK, Hong EK, Khang SK, et al. Clinicopathological parameters and biological markers predicting non-sentinel node metastasis in sentinel node-positive breast cancer patients. *Oncol Rep.* 2011 Apr;25(4):1063-71.
94. Canavese G, Bruzzi P, Catturich A, Vecchio C, Tomei D, Del Mastro L, et al. A risk score model predictive of the presence of additional disease in the axilla in early-breast cancer patients with one or two metastatic sentinel lymph nodes. *Eur J Surg Oncol.* 2014 Jul;40(7):835-42.
95. Espinosa-Bravo M, Sansano I, Pérez-Hoyos S, Ramos M, Sancho M, Xercavins J, et al. Prediction of non-sentinel lymph node metastasis in early breast cancer

- by assessing total tumoral load in the sentinel lymph node by molecular assay.  
*Eur J Surg Oncol.* 2013;39(7):766-73.
96. Bader AA, Tio J, Petru E, Bühner M, Pfahlberg A, Volkholz H, et al. T1 breast cancer: identification of patients at low risk of axillary lymph node metastases. *Breast Cancer Res Treat.* 2002;76(1):11-7.
97. Galimberti V, Cole BF, Zurruda S, Viale G, Luini A, Veronesi P, 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(4):297-305.
98. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, Beitsch PD, Whitworth PW, Blumencranz PW, et al. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2011;305(6):569-75.
99. Donker M, van Tienhoven G, Straver ME, Meijnen P, van de Velde CJ, Mansel RE, et al. Radiotherapy or surgery of the axilla after a positive sentinel node in breast cancer (EORTC 10981-22023 AMAROS): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(12):1303-10.
100. Cuzick J, Dowsett M, Pineda S, Wale C, Salter J, Quinn E, et al. Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67, and human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the Genomic Health recurrence score in early breast cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29(32):4273-8.
101. McGhan LJ, Dueck AC, Gray RJ, Wasif N, McCullough AE, Pockaj BA. The changing landscape of axillary surgery: which breast cancer patients may still benefit from complete axillary lymph node dissection? *J Surg Oncol.* 2012;106(3):254-9.

102. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991;19(5):403-10.
103. Kontzoglou K, Palla V, Karaolanis G, Karaiskos I, Alexiou I, Pateras I, et al. Correlation between Ki67 and breast cancer prognosis. *Oncology*. 2013;84(4):219-25.
104. Aleskandarany MA, Rakha EA, Macmillan RD, Powe DG, Ellis IO, Green AR. MIB1/Ki-67 labelling index can classify grade 2 breast cancer into two clinically distinct subgroups. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;127(3):591-9.
105. Hayashi S, Kitada M, Sato K, Matsuda Y, Ishibashi K, Oikawa K, et al. Histological grade as an alternative to the Ki67 labeling index is only available for luminal-type breast cancers. *Breast Cancer*. 2014;21(1):47-51.
106. Bhargava R, Striebel J, Beriwal S, Flickinger JC, Onisko A, Ahrendt G, et al. Prevalence, morphologic features and proliferation indices of breast carcinoma molecular classes using immunohistochemical surrogate markers. *Int J Clin Exp Pathol*. 2009;2(5):444-55.
107. College of American Pathologist. Template for Reporting Results of Biomarker Testing of Specimens From Patients With Carcinoma of the Breast [Internet]. 2014 [citado 19 Sep 2016]. Disponible en: <http://www.cap.org>ShowProperty?nodePath=/UCMCon/Contribution%20Folde ers/WebContent/pdf/cp-breast-biomarker-template-14.pdf>
108. Bacchi LM, Corpa M, Santos PP, Bacchi CE, Carvalho FM. Estrogen receptor-positive breast carcinomas in younger women are different from those of older women: a pathological and immunohistochemical study. *Breast*. 2010;19(2):137-41.

109. Tsutsui S, Yasuda K, Higashi H, Tahara K, Sugita S, Eguchi H, et al. Prognostic implication of p53 protein expression in relation to nuclear pleomorphism and the MIB-1 counts in breast cancer. *Breast Cancer*. 2004;11(2):160-8.
110. Ahn HJ, Jung SJ, Kim TH, Oh MK, Yoon HK. Differences in Clinical Outcomes between Luminal A and B Type Breast Cancers according to the St. Gallen Consensus 2013. *J Breast Cancer*. 2015;18(2):149-59.
111. Rosen PP. Tumor emboli in intramammary lymphatics in breast carcinoma: pathologic criteria for diagnosis and clinical significance. *Pathol Annu*. 1983;18(2):215-32.
112. Woo CS, Silberman H, Nakamura SK, Ye W, Sposto R, Colburn W, et al. Lymph node status combined with lymphovascular invasion creates a more powerful tool for predicting outcome in patients with invasive breast cancer. *Am J Surg*. 2002;184(4):337-40.
113. Song YJ, Shin SH, Cho JS, Park MH, Yoon JH, Jegal YJ. The role of lymphovascular invasion as a prognostic factor in patients with lymph node-positive operable invasive breast cancer. *J Breast Cancer*. 2011;14(3):198-203.
114. Kilickap S, Kaya Y, Yucel B, Tuncer E, Babacan NA, Elagoz S. Higher Ki67 expression is associates with unfavorable prognostic factors and shorter survival in breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(3):1381-5.
115. Viale G, Giobbie-Hurder A, Regan MM, Coates AS, Mastropasqua MG, Dell'Orto P, et al. Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki-67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from Breast International Group Trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole. *J Clin Oncol*. 2008;26(34):5569-75.
116. Wong H, Lau S, Leung R, Chiu J, Cheung P, Wong TT, et al. Coexisting ductal carcinoma in situ independently predicts lower tumor aggressiveness in node-positive luminal breast cancer. *Med Oncol*. 2012;29(3):1536-42.

117. Mylonas I, Makovitzky J, Jeschke U, Briese V, Friese K, Gerber B. Expression of Her2/neu, steroid receptors (ER and PR), Ki67 and p53 in invasive mammary ductal carcinoma associated with ductal carcinoma In Situ (DCIS) Versus invasive breast cancer alone. *Anticancer Res.* 2005;25(3A):1719-23.
118. Wong H, Lau S, Yau T, Cheung P, Epstein RJ. Presence of an in situ component is associated with reduced biological aggressiveness of size-matched invasive breast cancer. *Br J Cancer.* 2010;102(9):1391-6.
119. Pekmezci M, Szpaderska A, Osipo C, Erşahin Ç. Evaluation of biomarkers in multifocal/multicentric invasive breast carcinomas. *Int J Surg Pathol.* 2013;21(2):126-32.
120. Kanumuri P, Hayse B, Killelea BK, Chagpar AB, Horowitz NR, Lannin DR. Characteristics of Multifocal and Multicentric Breast Cancers. *Ann Surg Oncol.* 2015;22(8):2475-82.
121. Neri A, Marrelli D, Megha T, Bettarini F, Tacchini D, De Franco L, et al. "Clinical significance of multifocal and multicentric breast cancers and choice of surgical treatment: a retrospective study on a series of 1158 cases". *BMC Surg* [Internet]. 2015 [citado 2 Sep 2016];15:1. Disponible en:  
<http://bmcsurg.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2482-15-1>
122. Shaikh T, Tam TY, Li T, Hayes SB, Goldstein L, Bleicher R, et al. Multifocal and multicentric breast cancer is associated with increased local recurrence regardless of surgery type. *Breast J.* 2015;21(2):121-6.
123. Li B, Zhao X, Dai SC, Cheng W. Associations between mammography and ultrasound imaging features and molecular characteristics of triple-negative breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(8):3555-9.
124. Tamaki K, Ishida T, Miyashita M, Amari M, Ohuchi N, Tamaki N, et al. Correlation between mammographic findings and corresponding histopathology: potential predictors for biological characteristics of breast diseases. *Cancer Sci.* 2011;102(12):2179-85.

125. Jiang L, Ma T, Moran MS, Kong X, Li X, Haffty BG, et al. Mammographic features are associated with clinicopathological characteristics in invasive breast cancer. *Anticancer Res.* 2011;31(6):2327-34.
126. Camps Herrero J. Resonancia magnética de mama: estado actual y aplicación clínica. *Radiología*. 2011;53(1):27-38.
127. Szabó BK, Aspelin P, Kristoffersen Wiberg M, Tot T, Boné B. Invasive breast cancer: correlation of dynamic MR features with prognostic factors. *Eur Radiol*. 2003;13(11):2425-35.
128. Lee SH, Cho N, Kim SJ, Cha JH, Cho KS, Ko ES, et al. Correlation between high resolution dynamic MR features and prognostic factors in breast cancer. *Korean J Radiol*. 2008;9(1):10-8.
129. Kato F, Kudo K, Yamashita H, Wang J, Hosoda M, Hatanaka KC, et al. Differences in morphological features and minimum apparent diffusion coefficient values among breast cancer subtypes using 3-tesla MRI. *Eur J Radiol*. 2016;85(1):96-102.
130. Chang YW, Kwon KH, Choi DL, Lee DW, Lee MH, Lee HK, et al. Magnetic resonance imaging of breast cancer and correlation with prognostic factors. *Acta Radiol*. 2009;50(9):990-8.
131. Acr.org [Internet]. American College of Radiology [actualizado 2013; citado 4 Sep 2016]. ACR BI-RADS Atlas. Disponible en: <http://www.acr.org/Quality-Safety/Resources/BIRADS>
132. Grunfeld E, Noorani H, McGahan L, Paszat L, Coyle D, van Walraven C, et al. Surveillance mammography after treatment of primary breast cancer: a systematic review. *Breast*. 2002;11(3):228-35.

133. Temple LK, Wang EE, McLeod RS. Preventive health care, 1999 update: 3. Follow-up after breast cancer. Canadian Task Force on Preventive Health Care. CMAJ. 1999;161(8):1001-8.
134. Grunfeld E, Noorani H, McGahan L, Paszat L, Coyle D, van Walraven C et al. Surveillance mammography after treatment of primary breast cancer: a systematic review. Breast. 2002;11(3):228-35.
135. Shootman M, Jeffe DB, Lian M, Aft R, Gillanders WE. Surveillance mammography and the risk of death among elderly breast cancer patients. Breast Cancer Res Treat. 2008;111(3):489-96.
136. Algara M, Vicente F, Adrover E, Prats M, González M, Sabadell MD. Consenso de seguimiento de pacientes con cáncer de mama de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria. Rev Senol Patol Mamar. 2015; 28(1):24-33.
137. Khatcheressian JL, Hurley P, Bantug E, Esserman LJ, Grunfeld E, Halberg F, et al. Breast cancer follow-up and management after primary treatment: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. J Clin Oncol. 2013;31(7):961-5.
138. Siegel S. Estadística no paramétrica. 3<sup>a</sup> ed. México: Trillas; 1990.
139. Canavos GC. Probabilidad y estadística, aplicaciones y métodos. México: McGraw-Hill; 1988.
140. Peña Sánchez de Rivera D. Estadística, modelos y métodos 2. Modelos lineales y series temporales. Madrid: Alianza; 1989.
141. Dixon WJ. BMDP Statistical software manual. Los Ángeles: University of California press; 1992.

142. Wiesner FG, Magener A, Fasching PA, Wesse J, Bani MR, Rauh C, et al. Ki-67 as a prognostic molecular marker in routine clinical use in breast cancer patients. *Breast*. 2009;18(2):135-41.
143. Querzoli P, Albonico G, Ferretti S, Rinaldi R, Magri E, Indelli M, et al. MIB-1 proliferative activity in invasive breast cancer measured by image analysis. *J Clin Pathol*. 1996;49(11):926-30.
144. Hosoda M, Yamamoto M, Nakano K, Hatanaka KC, Takakuwa E, Hatanaka Y, et al. Differential expression of progesterone receptor, FOXA1, GATA3, and p53 between pre- and postmenopausal women with estrogen receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2014;144(2):249-61.
145. Veronese SM, Gambacorta M. Detection of Ki-67 proliferation rate in breast cancer. Correlation with clinical and pathologic features. *Am J Clin Pathol*. 1991;95(1):30-4.
146. Seshadri R, Leong AS, McCaul K, Firgaira FA, Setlur V, Horsfall DJ. Relationship between p53 gene abnormalities and other tumour characteristics in breast-cancer prognosis. *Int J Cancer*. 1996;69(2):135-41.
147. Pathmanathan N, Balleine RL, Jayasinghe UW, Bilinski KL, Provan PJ, Byth K, et al. The prognostic value of Ki67 in systemically untreated patients with node-negative breast cancer. *J Clin Pathol*. 2014;67(3):222-8.
148. Kroman N, Wohlfahrt J, Andersen KW, Mouridsen HT, Westergaard T, Melbye M. Parity, age at first childbirth and the prognosis of primary breast cancer. *Br J Cancer*. 1998;78(11):1529-33.
149. Daling JR, Malone KE, Doody DR, Anderson BO, Porter PL. The relation of reproductive factors to mortality from breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002;11(3):235-41.
150. Yerushalmi R, Kennecke H, Woods R, Olivotto IA, Speers C, Gelmon KA. Does multicentric/multifocal breast cancer differ from unifocal breast cancer? An

- analysis of survival and contralateral breast cancer incidence. *Breast Cancer Res Treat.* 2009 Sep;117(2):365-70.
151. Weissenbacher TM, Zschage M, Janni W, Jeschke U, Dimpf T, Mayr D, et al. Multicentric and multifocal versus unifocal breast cancer: is the tumor-node-metastasis classification justified? *Breast Cancer Res Treat.* 2010;122(1):27-34.
152. Locker AP, Birrell K, Bell JA, Nicholson RI, Elston CW, Blamey RW, et al. Ki67 immunoreactivity in breast carcinoma: relationships to prognostic variables and short term survival. *Eur J Surg Oncol.* 1992;18(3):224-9.
153. Aranda FI, Laforga JB. Cellular proliferation in breast ductal infiltrating carcinoma. Correlation with clinical and histopathological variables. *Pathol Res Pract.* 1997;193(10):683-8.
154. Olsson A, Borgquist S, Butt S, Zackrisson S, Landberg G, Manjer J. Tumour-related factors and prognosis in breast cancer detected by screening. *Br J Surg.* 2012;99(1):78-87.
155. Ono M, Tsuda H, Yunokawa M, Yonemori K, Shimizu C, Tamura K, et al. Prognostic impact of Ki-67 labeling indices with 3 different cutoff values, histological grade, and nuclear grade in hormone-receptor-positive, HER2-negative, node-negative invasive breast cancers. *Breast Cancer.* 2015;22(2):141-52.
156. Lehr HA, Rochat C, Schaper C, Nobile A, Shanouda S, Vijgen S, et al. Mitotic figure counts are significantly overestimated in resection specimens of invasive breast carcinomas. *Mod Pathol.* 2013;26(3):336-42.
157. Gandini S, Guerrieri-Gonzaga A, Pruneri G, Serrano D, Cazzaniga M, Lazzeroni M, et al. Association of molecular subtypes with Ki-67 changes in untreated breast cancer patients undergoing pre-surgical trials. *Ann Oncol.* 2014 Mar;25(3):618-23.

158. Ough M, Velasco J, Hieken TJ. A comparative analysis of core needle biopsy and final excision for breast cancer: histology and marker expression. *Am J Surg.* 2011;201(5):692-4.
159. Ricci MD, Calvano Filho CM, Oliveira Filho HR, Filassi JR, Pinotti JA, Baracat EC. Analysis of the concordance rates between core needle biopsy and surgical excision in patients with breast cancer. *Rev Assoc Med Bras.* 2012;58(5):532-6.
160. Jacobs TW, Siziopikou KP, Prioleau JE, Raza S, Baum JK, Hayes DF, et al. Do prognostic marker studies on core needle biopsy specimens of breast carcinoma accurately reflect the marker status of the tumor? *Mod Pathol.* 1998;11(3):259-64.
161. Arnedos M, Nerurkar A, Osin P, A'Hern R, Smith IE, Dowsett M. Discordance between core needle biopsy (CNB) and excisional biopsy (EB) for estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PgR) and HER2 status in early breast cancer (EBC). *Ann Oncol.* 2009;20(12):1948-52.
162. Wood B, Junckerstorff R, Sterrett G, Frost F, Harvey J, Robbins P. A comparison of immunohistochemical staining for oestrogen receptor, progesterone receptor and HER-2 in breast core biopsies and subsequent excisions. *Pathology.* 2007;39(4):391-5.
163. Railo M, Lundin J, Haglund C, von Smitten K, von Boguslawsky K, Nordling S. Ki-67, p53, Er-receptors, ploidy and S-phase as prognostic factors in T1 node negative breast cancer. *Acta Oncol.* 1997;36(4):369-74.
164. Neri A, Marrelli D, Pedrazzani C, Caruso S, De Stefano A, Mariani F, et al. Prognostic relevance of proliferative activity evaluated by Mib-1 immunostaining in node negative breast cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2008;34(12):1299-303
165. Ruibal Á, Aguiar P, Del Rio MC, Arias JI, Menéndez-Rodríguez P, Gude F, et al. Histological grade (HG) in invasive ductal carcinomas of the breast of less than 1 cm: clinical and biological associations during progression from HG1 to HG3. *Anticancer Res.* 2015;35(1):569-73.

166. Serra KP, Ramalho S, Torresan R, Vassallo J, Sarian LO, Silva GR, et al. The new classification of breast cancers: finding the luminal A. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2014;36(12):575-80.
167. Ferguson NL, Bell J, Heidel R, Lee S, Vanmeter S, Duncan L, et al. Prognostic value of breast cancer subtypes, Ki-67 proliferation index, age, and pathologic tumor characteristics on breast cancer survival in Caucasian women. *Breast J.* 2013;19(1):22-30.
168. Feeley LP, Mulligan AM, Pinnaduwage D, Bull SB, Andrusis IL. Distinguishing luminal breast cancer subtypes by Ki67, progesterone receptor or TP53 status provides prognostic information. *Mod Pathol.* 2014;27(4):554-61.
169. Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kenneke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol.* 2010;28(10):1684-91.
170. Inwald EC, Koller M, Klinkhammer-Schalke M, Zeman F, Hofstädter F, Gerstenhauer M, et al. 4-IHC classification of breast cancer subtypes in a large cohort of a clinical cancer registry: use in clinical routine for therapeutic decisions and its effect on survival. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;153(3):647-58.
171. Munzone E, Botteri E, Sciandivasci A, Curigliano G, Nolè F, Mastropasqua M, et al. Prognostic value of Ki-67 labeling index in patients with node-negative, triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;134(1):277-82.
172. Penault-Llorca F, Viale G. Pathological and molecular diagnosis of triple-negative breast cancer: a clinical perspective. *Ann Oncol.* 2012;23 Suppl 6:19-22.
173. Rhee J, Han SW, Oh DY, Kim JH, Im SA, Han W, et al. The clinicopathologic characteristics and prognostic significance of triple-negativity in node-negative breast cancer. *BMC Cancer [Internet].* 2008 [citado 4 Sep 2016];8:307.

Disponible en: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-8-307>

174. Haffty BG, Hunt KK, Harris JR, Buchholz TA. Positive sentinel nodes without axillary dissection: implications for the radiation oncologist. *J Clin Oncol.* 2011;29(34):4479-81.
175. Yin Y, Zeng K, Wu M, Ding Y, Zhao M, Chen Q. The levels of Ki-67 positive are positively associated with lymph node metastasis in invasive ductal breast cancer. *Cell Biochem Biophys.* 2014;70(2):1145-51.
176. González-Vela MC, Garijo MF, Fernández FA, Buelta L, Val-Bernal JF. Predictors of axillary lymph node metastases in patients with invasive breast carcinoma by a combination of classical and biological prognostic factors. *Pathol Res Pract.* 1999;195(9):611-8.
177. Orucevic A, Reddy VB, Bloom KJ, Bitterman P, Magi-Galluzzi C, Oleske DM, et al. Predictors of lymph node metastasis in T1 breast carcinoma, stratified by patient age. *Breast J.* 2002;8(6):349-55.
178. Marrelli D, Pinto E, Neri A, Megha T, Gioffrè W, Cioppa T, et al. Mib-1 proliferation index is an independent predictor of lymph node metastasis in invasive breast cancer: a prospective study on 675 patients. *Oncol Rep.* 2006;15(2):425-9.
179. Hack CC, Häberle L, Geisler K, Schulz-Wendtland R, Hartmann A, Fasching PA, et al. Mammographic Density and Prediction of Nodal Status in Breast Cancer Patients. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2013;73(2):136-141.
180. Liu Y, Yin W, Yan T, Du Y, Shao Z, Lu J. The clinical significance of Ki-67 as a marker of prognostic value and chemosensitivity prediction in hormone-receptor-positive breast cancer: a meta-analysis of the published literature. *Curr Med Res Opin.* 2013;29(11):1453-61.

181. Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rutgers E, et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* [Internet]. 2015 [citado 1 sep 2016];26 Suppl 5:v8-30. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdv298>.
182. Colozza M, Azambuja E, Cardoso F, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart MJ. Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now? *Ann Oncol*. 2005;16(11):1723-39.
183. Sheri A, Dowsett M. Developments in Ki67 and other biomarkers for treatment decision making in breast cancer. *Ann Oncol*. 2012;23 Suppl 10:S219-27.
184. Polley MY, Leung SC, McShane LM, Gao D, Hugh JC, Mastropasqua MG, et al. An international Ki67 reproducibility study. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(24):1897-906.
185. Polley MY, Leung SC, Gao D, Mastropasqua MG, Zabaglo LA, Bartlett JM, et al. An international study to increase concordance in Ki67 scoring. *Mod Pathol*. 2015;28(6):778-86.
186. Railo M, Nordling S, von Boguslawsky K, Leivonen M, Kyllönen L, von Smitten K. Prognostic value of Ki-67 immunolabelling in primary operable breast cancer. *Br J Cancer*. 1993;68(3):579-83.
187. Jansen RL, Hupperets PS, Arends JW, Joosten-Achjanie SR, Volovics A, Schouten HC, et al. MIB-1 labelling index is an independent prognostic marker in primary breast cancer. *Br J Cancer*. 1998;78(4):460-5.
188. Caly M, Genin P, Ghuzlan A A, Elie C, Fréneaux P, Klijanienko J, et al. Analysis of correlation between mitotic index, MIB1 score and S-phase fraction as proliferation markers in invasive breast carcinoma. Methodological aspects and prognostic value in a series of 257 cases. *Anticancer Res*. 2004;24(5B):3283-8.
189. Zurrida S, Bagnardi V, Curigliano G, Mastropasqua MG, Orecchia R, Disalvatore D, et al. High Ki67 predicts unfavourable outcomes in early breast cancer

- patients with a clinically clear axilla who do not receive axillary dissection or axillary radiotherapy. *Eur J Cancer*. 2013;49(15):3083-92.
190. Hafeez F, Neboori HJ, Harigopal M, Wu H, Haffty BG, Yang Q, et al. Is Ki-67 expression prognostic for local relapse in early-stage breast cancer patients treated with breast conservation therapy (BCT)? *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2013;87(2):344-8.
191. Rudolph P, MacGrogan G, Bonichon F, Frahm SO, de Mascarel I, Trojani M, et al. Prognostic significance of Ki-67 and topoisomerase IIalpha expression in infiltrating ductal carcinoma of the breast. A multivariate analysis of 863 cases. *Breast Cancer Res Treat*. 1999;55(1):61-71.
192. Matsubara N, Mukai H, Itoh K, Nagai S. Prognostic impact of Ki-67 overexpression in subgroups categorized according to St. Gallen with early stage breast cancer. *Oncology*. 2011;81(5-6):345-52.
193. Nishimiya H, Kosaka Y, Yamashita K, Minatani N, Kikuchi M, Ema A, et al. Prognostic significance of Ki-67 in chemotherapy-naive breast cancer patients with 10-year follow-up. *Anticancer Res*. 2014 Jan;34(1):259-68.
194. Tamaki K, Ishida T, Tamaki N, Kamada Y, Uehara K, Miyashita M, et al. Analysis of clinically relevant values of Ki-67 labeling index in Japanese breast cancer patients. *Breast Cancer*. 2014;21(3):325-33.
195. Nishimura R, Osako T, Nishiyama Y, Tashima R, Nakano M, Fujisue M, et al. Evaluation of factors related to late recurrence--later than 10 years after the initial treatment--in primary breast cancer. *Oncology*. 2013;85(2):100-10.
196. Niikura N, Masuda S, Kumaki N, Xiaoyan T, Terada M, Terao M, et al. Prognostic significance of the Ki67 scoring categories in breast cancer subgroups. *Clin Breast Cancer*. 2014;14(5):323-329.
197. Domagala W, Markiewski M, Harezga B, Dukowicz A, Osborn M. Prognostic significance of tumor cell proliferation rate as determined by the MIB-1

- antibody in breast carcinoma: its relationship with vimentin and p53 protein. Clin Cancer Res. 1996;2(1):147-54.
198. Railo M, Lundin J, Haglund C, von Smitten K, Nordling S. Ki-67, p53, ER receptors, ploidy and S phase as long-term prognostic factors in T1 node-negative breast cancer. Tumour Biol. 2007;28(1):45-51.
199. Colleoni M, Rotmensz N, Peruzzotti G, Maisonneuve P, Viale G, Renne G, et al. Minimal and small size invasive breast cancer with no axillary lymph node involvement: the need for tailored adjuvant therapies. Ann Oncol. 2004;15(11):1633-9.
200. Reyal F, Hajage D, Savignoni A, Feron JG, Bollet MA, Kirova Y, et al. Long-term prognostic performance of Ki67 rate in early stage, pT1-pT2, pN0, invasive breast carcinoma. PLoS One [Internet]. 2013 [citado 5 Sep 2016];8(3):e55901. Disponible en:  
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0055901>
201. Haerslev T, Jacobsen GK, Zedeler K. Correlation of growth fraction by Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry with histopathological parameters and prognosis in primary breast carcinomas. Breast Cancer Res Treat. 1996;37(2):101-13.
202. Crabb SJ, Bajdik CD, Leung S, Speers CH, Kennecke H, Huntsman DG, et al. Can clinically relevant prognostic subsets of breast cancer patients with four or more involved axillary lymph nodes be identified through immunohistochemical biomarkers? A tissue microarray feasibility study. Breast Cancer Res [Internet]. 2008 [citado 5 Sep 2016];10(1):R6. Disponible en:  
<http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr1847>
203. Li FY, Wu SG, Zhou J, Sun JY, Lin Q, Lin HX, et al. Prognostic value of Ki-67 in breast cancer patients with positive axillary lymph nodes: a retrospective cohort study. PLoS One [Internet]. 2014 Feb [citado 5 Sep 2016];9(2):e87264.

Disponible en:

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0087264>

204. Biesaga B, Niemiec J, Wysocka J, Słonina D, Ziobro M. The search for optimal cutoff points for apoptosis and proliferation rate in prognostification of early stage breast cancer patients treated with anthracyclines in adjuvant settings. *Tumour Biol.* 2016;37(6):7645-55.

## ANEXO I



### Informe Dictamen Favorable Proyecto Investigación Biomédica

C.P. - C.I. PI15/0267

21 de octubre de 2015

Dña. María González Hinjos, Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

#### CERTIFICA

**1º.** Que el CEIC Aragón (CEICA) en su reunión del día 21/10/2015, Acta N° CP16/2015 ha evaluado la propuesta del investigador referida al estudio:

**Título: Índice de proliferación Ki-67 en carcinoma infiltrante de mama, valor pronóstico y predictivo.**

**Investigador Principal: Beatriz Galve Agudo. H Ntra Sra de Gracia**

**Versión protocolo: octubre/2015**

**2º.** Considera que

- El proyecto se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Es adecuado el tratamiento de los datos.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

**3º.** Por lo que este CEIC emite **DICTAMEN FAVORABLE a la realización del proyecto.**

Lo que firmo en Zaragoza, a 21 de octubre de 2015

Fdo:



Página 1 de 1

Tel. 976 71 48 57 Fax. 976 71 55 54 Correo electrónico mgonzalezh.ceic@aragon.es