

TESIS DOCTORAL



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Programa de Doctorado Ciencias de la Salud

Expresión de Fascina-1 y Topoisomerasa 2 alfa
en el carcinoma de mama: correlación con los
subtipos histológicos y otros marcadores pronósticos

Autor/a:

Alberto Sánchez Espinosa

Directores/as:

Dr. D. José García Solano

Murcia, abril de 2025

TESIS DOCTORAL



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Programa de Doctorado Ciencias de la Salud

Expresión de Fascina-1 y Topoisomerasa 2 alfa
en el carcinoma de mama: correlación con los
subtipos histológicos y otros marcadores pronósticos

Autor/a:

Alberto Sánchez Espinosa

Directores/as:

Dr. D. José García Solano

Murcia, abril de 2025



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

El Dr. D. José García Solano como Director de la Tesis Doctoral titulada “Expresión de Fascina-1 y Topoisomerasa 2 alfa en el carcinoma de mama: correlación los subtipos histológicos y otros marcadores pronósticos” realizada por D. Alberto Sánchez Espinosa en el Programa de Doctorado Ciencias de la Salud, **autoriza su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al, Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, modificado por el R.D. 576/2023, de 4 de julio, por el que se regulan las enseñanzas oficiales de doctorado.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'J. García Solano', written over a horizontal line.

En Murcia a 2 de abril de 2025

RESUMEN

Introducción:

El cáncer de mama continúa siendo la principal causa de muerte entre las mujeres adultas. A pesar de las mejoras en la supervivencia global, se siguen desarrollando ensayos clínicos con nuevos agentes anticancerígenos. La fascina-1 (FSCN1) es una proteína crucial en la formación de estructuras citoplasmáticas de anclaje celular, como los invadopodios, que participan en la invasión y motilidad celular. La topoisomerasa 2 alfa (TOP2A) es una proteína nuclear capaz de modificar la topología de las cadenas de ADN, participando en procesos de decatenación y desenrollamiento que facilitan la transcripción y la división celular. Ambas proteínas juegan un papel relevante en el desarrollo y evolución tumoral. Se están evaluando nuevos medicamentos, incluyendo la síntesis de nuevas antraciclinas con menor toxicidad y el desarrollo de fármacos anti-FSCN1, junto con la modificación de indicaciones de otros medicamentos, como terapias quimioterapéuticas en el cáncer de mama. En este estudio de investigación, evaluamos la expresión proteica de FSCN1 y ratio del gen *TOP2A* en las biopsias iniciales utilizadas para el diagnóstico del cáncer de mama. Además, incluimos otros datos clínicos de la enfermedad y las determinaciones habituales de inmunohistoquímica (IHQ).

Método:

Este es un estudio observacional descriptivo retrospectivo anonimizado que incluye 265 biopsias con aguja gruesa (BAG) parafinadas de pacientes con cáncer de mama del Área de Salud II del Complejo Hospitalario de Cartagena (Murcia). Se recopilan datos clínicos (edad, menopausia, recidiva, cirugía, tratamiento), anatomopatológicos (subtipo histológico, subtipo molecular, estadio tumoral y grado tumoral evaluado mediante la clasificación de Nottingham) y resultados de estudios IHQ: Ki67, p53, BCL2, receptor de estrógeno (RE) y progesterona (RP). Además, se lleva a cabo una determinación IHQ adicional de FSCN1 (55k-2; Agilent Dako, Santa Clara, CA, EE. UU.) cuantificada por un método semicuantitativo que evalúa tanto el grado de porcentaje de celularidad tumoral como el grado de intensidad de la expresión. También se realiza el recuento del ratio *TOP2A/CEP17* (CT-PAC008-OG; CytoTest® Rockville, MD, EE. UU.)

mediante estudio por inmunofluorescencia in situ (FISH) con posterior clasificación categórica.

Resultados:

La expresión IHQ de FSCN1, tanto en su forma agrupada como por categorías, no muestra asociación con la ratio o la clasificación de las alteraciones del gen *TOP2A*. FSCN1 se asocia estadísticamente con: subtipo histológico ($p<0,001$), subtipo molecular ($p<0,001$), receptores hormonales (RH) ($p<0,001$), BCL2 ($p=0,003$), Ki67 ($p=0,002$), y el grado histológico ($p<0,001$). *TOP2A* se asocia estadísticamente con: subtipo molecular ($p=0,041$), Ki67 ($p=0,048$) y grado histológico ($p=0,033$). En nuestro estudio, el subtipo molecular ($p=0,037$), se presenta como una variable independiente de la respuesta histológica completa al tratamiento neoadyuvante. El análisis multivariante relaciona respectivamente el estadio patológico ($p=0,002$) y RE ($p=0,004$) como variables independientes con la supervivencia global y el tiempo libre de enfermedad.

Conclusión:

No se evidencia relación estadística entre la expresión proteica de FSCN1 y el número de copias del gen de *TOP2A* sobre biopsias BAG iniciales en el diagnóstico del cáncer de mama. El método de evaluación y los puntos de corte para ambas determinaciones son variados y necesitan una unificación para facilitar y mejorar la comparabilidad en futuros estudios.

PALABRAS CLAVES: fascina, topoisomerasa, FISH, HER2, subtipo histológico, cancer de mama, supervivencia, biología molecular, Ki67, BCL2, triple negativo, histopatología

ABSTRACT

Introduction:

Breast cancer continues to be the leading cause of death among adult women. Despite improvements in overall survival, clinical trials with new anticancer agents are still being developed. Fascin-1 (FSCN1) is a crucial protein in the formation of cytoplasmic cell anchoring structures, such as invadopodia, which participate in cell invasion and motility. Topoisomerase 2 alpha (TOP2A) is a nuclear protein capable of modifying the topology of DNA chains, participating in decatenation and unwinding processes that facilitate transcription and cell division. Both proteins play a significant role in tumor development and evolution. New drugs are being evaluated, including the synthesis of new anthracyclines with less toxicity and the development of anti-FSCN1 drugs, along with the modification of indications for other drugs, as chemotherapeutic therapies in breast cancer. In this research study, we assessed the expression of FSCN1 and the *TOP2A* ratio in initial diagnostic breast cancer biopsies. Furthermore, additional clinical data and standard immunohistochemical markers were incorporated into the analysis

Method:

This is an anonymous retrospective descriptive observational study that includes 265 paraffin-embedded core needle biopsies from breast cancer patients from the Health Area of Complejo Hospitalario de Cartagena (Murcia). Clinical data (age, menopause, relapse, surgery, treatment), pathological data (histological subtype, molecular subtype, tumor stage and tumor grade evaluated using the Nottingham classification) and results of immunohistochemical studies: Ki67, p53, BCL2, estrogen and progesterone receptors are collected. In addition, an immunohistochemical determination of FSCN1 (55k-2; Agilent Dako, Santa Clara, CA, USA) is carried out, quantified by a semi-quantitative method that evaluates both the percentage of cellularity and the intensity of expression. The count of the *TOP2A/CEP17* ratio (CT-PAC008-OG; CytoTest® Rockville, MD, USA) is also performed through an fluorescence in situ hybridization (FISH), followed by categorical classification.

Results:

The immunohistochemical expression of FSCN1, both in its grouped form and by categories, does not show an association with the ratio or classification of alterations in the *TOP2A* gene. FSCN1 is statistically associated with: histological subtype ($p<0.001$), molecular subtype ($p<0.001$), hormonal receptors ($p<0.001$), BCL2 ($p=0.003$), Ki67 ($p=0.002$), and histological grade ($p<0.001$). *TOP2A* is statistically associated with: molecular subtype ($p=0.041$), Ki67 ($p=0.048$), and histological grade ($p=0.033$). In our study, the molecular subtype ($p=0.037$) is presented as an independent variable of the complete histological response to neoadjuvant treatment. The multivariate analysis respectively relates the pathological stage ($p=0.002$) and estrogen receptor ($p=0.004$) as independent variables with overall survival and disease-free time.

Conclusion:

No statistical relationship is evident between the immunohistochemical protein expression of FSCN1 and the number of *TOP2A* copies on initial BAG biopsies in the diagnosis of breast cancer. The evaluation methods and cut-off thresholds for both determinations are heterogeneous and require standardization to enhance comparability in future studies.

KEYWORDS: fascin, topoisomerase, FISH, HER2, histological subtypes breast cancer, survival, molecular biology, Ki67, BCL2, triple negative, histopathology

FINANCIACIÓN

El trabajo de investigación llevado a cabo en la presente memoria de Tesis Doctoral fue financiado por el siguiente proyecto:

- "Efectos histológicos y clínicos de la Imipramina en el tratamiento de pacientes con cáncer que sobre expresan Fascina1 (HITCLIF)" proyecto de investigación del Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB-HTF-2021-01) del Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB) otorgado al Dr. Pablo Conesa Zamora como investigador principal. Registro del ensayo clínico: <https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/trial/2021-001328-17/ES>



En Cartagena, a 14 de julio de 2024.

A mis padres y hermano, por su eterno amor y ayuda

A mi compañeros de trabajo, por su dedicación en el diagnóstico médico

AGRADECIMIENTOS

Estas páginas son las últimas en ser escritas. La razón principal es no olvidar a todas aquellas personas que colaboraron, aconsejaron y ayudaron en este proyecto científico y personal.

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento al doctor D. José García Solano, por ser mi director de tesis de manera altruista. Bajo su constante tutela, he podido llevar a cabo este trabajo de investigación. Aparte de la dirección de la tesis, ha sido mi compañero de despacho durante los últimos 4 años en el Hospital Santa Lucia de Cartagena. Durante todo este tiempo, he podido disfrutar y compartir más cercanamente la patología Digestiva, Pancreaticobiliar y Renal de las cuales es mi referente. Gracias por enseñarme, nunca lo olvidaré.

A José García Rodríguez, compañero técnico, cuya ayuda ha sido fundamental. Gracias por todo el trabajo de laboratorio que has realizado y disculpa por toda la algarabía de “rondas” que te he hecho sufrir. Gracias por tu tenaz trabajo y recuerda que estos resultados también son méritos tuyos. Mención especial para mi compañero el Dr. D. Ginés Luengo Gil, que me aconsejó siempre que lo requerí de forma amable y certera. Quiero destacar su ayuda fundamental en la elaboración de los resultados y en la redacción del artículo científico. Su ayuda ha sido clave. Gracias al Dr. Conesa Zamora y al resto de sus colaboradores por permitirme seguir vuestra línea de investigación de la cual estoy seguro de que nos deparará grandes resultados.

A mis estrellas y amigas, Ana Ortiz González y Sara Soto García, por haberme acompañado durante todo el tiempo desde que nos conocemos. Aún en la mayor sombra brillan lo suficiente, como para hacerme seguir la luz. Gracias por vuestra amistad, conocimientos compartidos y risas que nunca cesarán.

Especial agradecimiento al que considero un mentor y segundo padre, al Dr. Sebastián Ortiz Reina, por haberme enseñado a amar a esta especialidad médica durante mi formación en ella, y posteriormente como un compañero de trabajo tenaz y sabio, al que espero poder algún día alcanzar.

Eternos agradecimientos a Joaquín Moya Biosca y Victoria Pérez Parra por su constante ayuda, más allá de la que siempre me han brindado en lo personal, en lo relacionado con el procesamiento de muestra y el laboratorio en general. No quiero

olvidar a todos los técnicos superiores en Anatomía Patológica que representan el pilar fundamental de nuestros laboratorios, sin ellos nada de esta tesis pudiera haberse realizado. A todos vosotros, gracias.

Agradecimiento en conjunto hacia todos mis compañeros, facultativos, residentes y técnicos, con los que he trabajado durante estos años. La mayoría de ellos, sin querer de una u otra manera, han colaborado en esta tesis, al hacer aquello que me enseñaron: diagnosticar. Con vosotros aprendí a amar a la profesión médica y espero que esta tesis os haga sentir orgullosos.

Gracias a mis padres, Joaquín y Marisol, y a mi hermano, Alejandro, por haberme siempre apoyado y haberse alegrado de mis éxitos que hoy continúan con la elaboración de esta tesis. Quién diría que ese niño que era difícil de entender pudiera escribir tanto. Vuestro amor sustenta todas las palabras de esta tesis. Gracias por comprender y, aún mejor, por animarme en la ardua tarea de escribir esta tesis. Con vosotros mi vida ha sido más fácil.

A mi pareja, Virginia, porque tu impulso y soporte ha sido clave en la redacción de esta tesis. Tu tenacidad diaria por la profesión que amas y compartimos es contagiable. Porque juntos podemos alcanzar aquello que nos propongamos.

A todos esos sanitarios, que me tuvieron como paciente, vuestro trabajo y acierto han permitido la elaboración de esta tesis.

A todos aquellos que creyeron y no creyeron en mí, porque ambos me hicieron ser quién soy.

*“El genio se compone del dos por ciento de talento y del noventa y
ocho por ciento de perseverante aplicación”*
Ludwig van Beethoven (1770-1827)

“Cada tiempo, su arte. A cada arte, su libertad”
Gustav Klimt (1862-1918)

ÍNDICE GENERAL

AUTORIZACIÓN	5
RESUMEN	7
FINANCIACIÓN	11
AGRADECIMIENTOS	15
SIGLAS Y ABREVIATURAS.....	27
I - INTRODUCCIÓN.....	41
1.1. Anatomía y fisiología de la glándula mamaria	41
1.2. Embriología de la mama	43
1.3. Desarrollo de la mama.....	44
1.4. Histología de la mama.....	45
1.4.1. Lobulillo mamario.....	45
1.4.2. Ductos intermedios y terminales	46
1.4.3. Piel y complejo areola-pezones.....	46
1.5. Epidemiología del cáncer de mama	47
1.6. Carcinogénesis en el cáncer de mama	51
1.6.1. Factores de riesgo no modificables.....	51
1.6.2. Factores de riesgo modificables	51
1.7. Clasificación Histológica del cáncer de mama	53
1.7.1. Carcinoma infiltrante NOS	53
1.7.1.1. Carcinoma infiltrante NOS con patrón medular	54
1.7.2. Carcinoma lobulillar infiltrante.....	54
1.7.3. Carcinoma tubular	55
1.7.4. Carcinoma con diferenciación apocrina.....	55
1.7.5. Carcinoma cribiforme.....	56
1.7.6. Carcinoma micropapilar invasivo	56
1.7.7. Carcinoma mucinoso	57

1.7.8.	Carcinoma papilar infiltrante	58
1.7.9.	Carcinoma adenoideo quístico.....	58
1.8.	Clasificación Molecular del cáncer de mama.....	59
1.8.1.	Clasificación integral por agregados	59
1.8.2.	Clasificación intrínseca del subtipo	60
1.9.	Estadíaaje tumoral. TNM.....	60
1.10.	Cribado Radiológico y Toma de muestras en el cáncer de mama.....	64
1.10.1.	Cribado radiológico del cáncer de mama	64
1.10.2.	Toma de muestra citológica e incisional	66
1.10.2.1.	PAAF.....	66
1.10.2.2.	BAG.....	67
1.10.2.3.	BAV	69
1.10.3.	Pruebas de determinación de expresión genética	69
1.11.	Tratamiento del cáncer de mama.....	71
1.11.1.	Introducción.....	71
1.11.2.	Quimioterapia.....	73
1.11.3.	Hormonoterapia	74
1.11.4.	Inmunoterapia	76
1.11.5.	Radioterapia.....	77
1.11.6.	Cirugía	78
1.12.	Inmunohistoquímica básica de la mama	79
1.12.1.	CK19.....	80
1.12.2.	p53	80
1.12.3.	BCL2.....	80
1.12.4.	Receptores de estrógeno y progesterona	81
1.12.5.	HER2/erbB2.....	84
1.12.6.	Ki67.....	86

ÍNDICE GENERAL	21
1.13. Fascina	88
1.13.1. Descripción molecular, función y principales vías de interacción	88
1.13.2. Expresión de FSCN1 en el cáncer de mama	93
1.13.3. Opciones terapéuticas anti-FSCN1	100
1.13.3.1. Inhibidores específicos	100
1.13.3.2. Inhibidores indirectos/otros.....	101
1.14. Topoisomerasa	102
1.14.1. Descripción molecular, función y principales vías de interacción	102
1.14.2. Expresión de TOP2A en el cáncer de mama.....	105
1.14.3. Puntos de control de TOP2A en la división celular	109
1.14.4. Opciones terapéuticas clásicas anti-TOP2A	110
1.14.4.1. Tratamiento clásico/venenos anti-TOP2A	110
1.14.4.2. Inhibidores catalíticos clásicos anti-TOP2A	111
1.14.4.3. Nuevos inhibidores, desarrollo en un futuro y resistencia	111
II - JUSTIFICACIÓN	115
III - OBJETIVOS	119
3.1. Objetivos principales	119
3.2. Hipótesis principales de estudio	119
3.3. Hipótesis secundarias de estudio	120
IV - MATERIAL Y MÉTODO	125
4.1. Diseño, población y criterios de estudio	125
4.1.1. Criterios de inclusión.....	125
4.1.2. Criterios de exclusión	126
4.2. Variables histológicas, inmunohistoquímicas u otras determinaciones especiales-moleculares, clínicas y pronósticas	126
4.2.1. Variables histológicas	126
4.2.2. Variables inmunohistoquímicas u otras determinaciones especiales....	128

4.2.2.1.	Clones y sondas	130
4.2.3.	Variables moleculares.....	131
4.2.4.	Variables clínicas y pronósticas.....	132
4.2.5.	Variables no estudiadas.....	132
4.3.	Biopsia, Procesamiento y Diagnóstico	132
4.3.1.	Biopsia por aguja gruesa (BAG) y asistida por aspiración (BAV).....	133
4.3.2.	Biopsia por resección	133
4.3.3.	Procesamiento.....	133
4.3.4.	Diagnóstico.....	134
4.4.	Búsqueda de casos.....	134
4.5.	Preparaciones de determinaciones adicionales	135
4.6.	Técnica y descripción de Hematoxilina-Eosina.....	136
4.7.	Técnica y descripción IHQ de Fascina-1	137
4.8.	Técnica y descripción de sonda FISH topoisomerasa 2 alfa	138
4.9.	Análisis estadístico	140
4.10.	Consideraciones éticas	141
4.11.	Conflictos de interés	141
V -	RESULTADOS.....	145
5.1.	Análisis descriptivos de los resultados.....	145
5.1.1.	Edad, género y menopausia	145
5.1.2.	Subtipos histológicos del cáncer de mama	146
5.1.3.	Subtipos moleculares del cáncer de mama.....	147
5.1.4.	Variables IHQ habituales en el diagnóstico en el cáncer de mama	147
5.1.5.	Grado tumoral histológico SBR.....	149
5.1.6.	Estadio patológico, estadio clínico y tipo de cirugía.....	149
5.1.7.	Tratamientos oncológicos específicos	150
5.1.8.	Neoadyuvancia, tipo respuesta al tratamiento y recidiva.....	151

ÍNDICE GENERAL	23
<hr/>	
5.1.9. Estado vital de los pacientes al finalizar el estudio	152
5.1.10. Expresión conjunta por FISH de <i>HER2</i> y <i>TOP2A</i>	152
5.1.11. FSCN1	152
5.1.12. <i>TOP2A</i>	154
5.2. Análisis de inferencia.....	155
5.2.1. Análisis de la relación entre los grados de porcentaje e intensidad de expresión de FSCN1.....	155
5.2.2. Análisis de la relación entre las categorías de FSCN1 y la ratio de <i>TOP2A</i>	155
5.2.3. Análisis de relación entre los grados de expresión de la intensidad/porcentaje de FSCN1 y la ratio de <i>TOP2A</i>	156
5.2.4. Análisis de relación entre la edad y las categorías de FSCN1 y los grupos de <i>TOP2A</i>	157
5.2.5. Análisis de relación entre los subtipos histológicos del cáncer de mama y las categorías de FSCN1	158
5.2.6. Análisis de relación entre la expresión entre los subtipos moleculares del cáncer de mama y las categorías de FSCN1	159
5.2.7. Análisis de relación entre los subtipos histológicos del cáncer de mama y la ratio de <i>TOP2A</i>	160
5.2.8. Análisis de relación entre los subtipos moleculares del cáncer de mama y los grupos de <i>TOP2A</i>	161
5.2.9. Análisis de relación entre el grado histológico y las categorías FSCN1 y los grupos de <i>TOP2A</i>	162
5.2.10. Análisis de relación entre el sexo del paciente y las categorías de FSCN1 y los grupos de <i>TOP2A</i>	163
5.2.11. Análisis de relación entre la menopausia y las categorías de FSCN1 y los grupos de <i>TOP2A</i>	163
5.2.12. Análisis de relación entre el estadio tumoral patológico-clínico y las categorías de FSCN1 y los grupos de <i>TOP2A</i>	164

5.2.13.	Análisis de relación entre los descriptivos T, N, M patológicos/clínicos y las categorías de FSCN1 y los grupos de <i>TOP2A</i>	165
5.2.14.	Análisis de relación entre marcadores IHQ de rutina para el cáncer de mama y las categorías de FSCN1 y los grupos de <i>TOP2A</i>	167
5.2.15.	Análisis de relación entre la expresión IHQ de CK19, E-Cadherina y HER2 y las categorías de FSCN1 y los grupos de <i>TOP2A</i>	172
5.2.16.	Análisis de relación entre la expresión de FSCN1 y la ratio <i>TOP2A</i> con la recidiva y su tipo.....	174
5.2.17.	Análisis de la correlación entre las variables continuas	179
5.2.18.	Análisis curvas ROC de las técnicas IHQ habituales	180
5.2.19.	Análisis de la respuesta completa patológica tras tratamiento neoadyuvante	182
5.2.19.1.	Análisis de relación entre la RCP y la expresión de FSCN1 y <i>TOP2A</i>	182
5.2.19.2.	Análisis de relación entre la expresión otros marcadores IHQ y otros variables clínica con la RCP	183
5.2.20.	Análisis de supervivencia y tiempo libre de enfermedad.....	185
5.2.20.1.	Supervivencia global según las variables a estudio	185
5.2.20.2.	Supervivencia libre de enfermedad según las variables a estudio	191
VI -	DISCUSIÓN.....	199
6.1.	Análisis descriptivo	199
6.2.	Fascina 1	200
6.3.	Topoisomerasa 2 alfa	204
6.4.	Respuesta al tratamiento adyuvante, supervivencia global y tiempo libre de enfermedad.....	208
6.5.	BCL2.....	210
6.6.	Relación de FSCN1 con otras proteínas	210
6.7.	Relación de TOP2A con otras proteínas	210

ÍNDICE GENERAL	25
6.8. Valoración conjunta de FSCN1 y TOP2A.....	211
6.9. Consideraciones finales.....	211
VII - CONCLUSIONES.....	215
VIII - LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN.....	219
IX - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	225
X - ANEXOS.....	265

SIGLAS Y ABREVIATURAS

ADN, ácido desoxirribonucleico

AJCC, *American Joint Committee on Cancer*

APBI, irradiación parcial acelerada de mama

ARN, ácido ribonucleico

ARNm, ácido ribonucleico mensajero

ASCO/CAP, Sociedad Americana de Oncología Clínica y Colegio de Patólogos Americanos

ATP, trifosfato de adenosina

BAG, biopsia por aguja gruesa

BAV, biopsia asistida por vacío

BIRADS, *breast Imaging-Reporting and Data System*

BRCA, *breast cancer gene*

BRCA1, *breast cancer gene 1*

BRCA2, *breast cancer gene 2*

BRMS1, *breast cancer metastasis suppressor 1*

CAP, complejo areola-pezón

CDK4/6, quinasa dependiente de la ciclina 4 y 6

CEP17, *centromere Probe 17*

Chr, cromosoma

CHUC, Complejo Hospitalario Universitario de Cartagena

CISH, hibridación in situ cromogénica

CK, citoqueratina/s

CTA, *cancer testis antigens*

CTLA-4, *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*

DAB, diaminobencidina

DAPI, 2-(4-amidinofenil)-1H -indol-6-carboxamida

DDR, vía de respuesta al daño de ADN

- EGFR**, receptor del factor de crecimiento epidérmico
- FAK**, quinasa de adhesión focal
- FDA**, *Food and Drug Administration*
- FISH**, hibridación in situ por fluorescencia
- FSCN**, fascina
- FSCN1**, fascina-1
- FSCN2**, fascina-2
- FSCN3**, fascina-3
- GEC-ESTRO**, *The Groupe Européen de Curiethérapie (GEC) and the European Society for Radiotherapy & Oncology (ESTRO)*
- Gn-RH**, hormona liberadora de gonadotropina
- HE**, hematoxilina-eosina
- IARC**, *International Agency for Research on Cancer*
- IGF-1**, factor de crecimiento similar a la insulina 1
- IHQ**, inmunohistoquímica/o/s
- I κ B**, complejo inhibidor
- ISH**, hibridación in situ
- ITGB1**, integrina beta 1
- IVD**, *in vitro diagnostic*
- LH-RH**, hormona liberadora de hormona luteinizante
- MAPK**, proteína quinasa activada por mitógenos
- MAP-tau**, proteína tau asociada a microtúbulos
- MEK**, proteína quinasa quinasa activada por mitógenos
- Mg**, magnesio
- MINDACT**, *Microarray in Node-Negative Disease May Avoid Chemotherapy*
- NF- κ B**, factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
- NIH**, *National Cancer Institute*
- NOS**, *No Other Subtype*
- OR**, *Odds Ratio*

OSNA, *One Step Nucleic Acid Amplification*

PAAF, punción aspiración con aguja fina

PARP-1, poli (ADP-ribosa) polimerasa 1

PCR, *polymerase chain reaction*

PD-1, *Programmed Death 1*

PD-L1, *Programmed Death-ligand 1*

PI3K, fosfoinositol 3-cinasa

PICK3CA, fosfoinositol 3-cinasa polipéptido catalítico alfa

PKC, proteína quinasa C

q-PCR, PCR cuantitativa

qRT-PCR, PCR cuantitativa con retrotranscriptasa

RA, receptor de andrógeno

RacGAP1, proteína 1 activadora de Rac GTPasa

RCP, respuesta completa patológica

RE, receptor de estrógeno

REDECAN, Red Española de Registros de Cáncer

RH, receptores hormonales

RHEMA, radioterapia hipofraccionada externa

RIO, radioterapia intraoperatoria

RMN, resonancia magnética nuclear

ROC, *receiver operating characteristic curve*

RP, receptor de progesterona

SBR, Scarff-Bloom-Richardson modificado en Nottingham, utilizado como abreviatura de "grado histológico valorado por el sistema de Scarff-Bloom-Richardson modificado en Nottingham"

SBRT, radioterapia corporal estereotáctica

SEOM, Sociedad Española de Oncología Médica

SERD, reguladores a la baja selectivos del receptor de estrógeno

SERM, modulador selectivo del receptor de estrógenos

SISH, hibridación in situ con plata

SMS, Sistema Murciano de Salud

TBS, *tris-buffered saline*

TGF- α , factor de crecimiento transformante alfa

TGF- β , factor de crecimiento transformante beta

TILS, *Tumor-infiltrating Lymphocytes*

TL4R, receptor tipo peaje 4

TN, triple/s negativo/s

TOP, topoisomerasa

TOP2A, topoisomerasa 2 alfa

TOP2B, topoisomerasa 2 beta

TOP3A, topoisomerasa 1 alfa

TOP3B, topoisomerasa 1 beta

UCAM, Universidad Católica San Antonio de Murcia

VIH, virus de la inmunodeficiencia humana

WHO, *World Health Organization*

ÍNDICE DE FIGURAS, DE TABLAS Y DE ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la ramificación del sistema ductal en relación con los lobulillos secretores.....	41
Figura 2. Fases del desarrollo del sistema ductal	44
Figura 3. Histología del lobulillo mamario	45
Figura 4. Histología del CAP.....	47
Figura 5. Estimación de la incidencia y mortalidad en hombres y mujeres de todas las edades excluyendo tumores cutáneos no melánicos en 2020 en España	48
Figura 6. Estimación de la prevalencia del cáncer de mama a 5 años (2020-2025) en España en ambos géneros	48
Figura 7. Estimación de la incidencia y mortalidad en mujeres españolas de todas las edades excluyendo los tumores cutáneos no melánicos.....	49
Figura 8. Incidencia y mortalidad estimada por grupo de edad estandarizado por regiones geográficas.....	50
Figura 9. Carcinoma micropapilar infiltrante	58
Figura 10. Esquema de las fases del ciclo celular	87
Figura 11. Esquema de la estructura de filopodios	89
Figura 12. Mecanismo de acción de TOP2A.....	103
Figura 13. Diferentes grados de expresión de FSCN1	129
Figura 14. Valoración de la ratio de TOP2A.....	131
Figura 15. Criterios de búsqueda de casos en el software PAT-Win.....	134
Figura 16. Diagrama de realización de portaobjetos para posteriores estudios. .	136
Figura 17. Teñidor y montador Tissue-Tek Prisma Plus & Tissue-Tek Film.....	137
Figura 18. Equipo de tinción IHQ automático BenchMark.....	138
Figura 19. Esquema de la localización del gen TOP2A en el chr 17.....	139
Figura 20. Hibridador MD-Stainer de Vitro.....	140

Figura 21. Gráfico de distribución de frecuencias de los subtipos histológicos del cáncer de mama.....	146
Figura 22. Diagramas de cajas para las variables IHQ de rutina en el diagnóstico del cáncer de mama respecto a las categorías de FSCN1	168
Figura 23. Diagramas de cajas para las variables IHQ de rutina en el diagnóstico del cáncer de mama respecto a los grupos de <i>TOP2A</i>	170
Figura 24. Curvas ROC para Ki67, RE, RP, BCL2, p53 y <i>TOP2A</i>	181
Figura 25. Forest plot para el Odds Ratio (OR) de FSCN1.....	182
Figura 26. Forest plot para el OR de determinaciones IHQ habituales y de otros datos clínicos relevantes.....	184
Figura 27. Gráficas de supervivencia global (Kaplan-Mier) de la serie a estudio y en relación con las distintas variables a estudio.	187
Figura 28. Gráficas de supervivencia libre de enfermedad (Kaplan-Mier) de la serie a estudio en relación con las distintas variables a estudio	192

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación TNM 8ª Edición para el apartado de Tumor primario (T).	62
Tabla 2. Clasificación TNM 8ª Edición para el apartado de metástasis ganglionares regionales (pN).....	63
Tabla 3. Clasificación TNM 8ª Edición para el apartado de metástasis a distancia (pM).....	64
Tabla 4. Estadio del cáncer de mama.....	64
Tabla 5. Categorías BI-RADS 5ª Edición.....	66
Tabla 6. Sistema de puntaje Allred para la valoración IHQ de RE y RP	83
Tabla 7. Valoración por inmunohistoquímica de la proteína HER2/erbB2 según las recomendaciones de las guías ASCO/CAP.....	85
Tabla 8. Resultados tras interpretación de ISH en los casos 2+ basado en las guías ASCO/CAP	86
Tabla 9. Subtipos histológicos infiltrantes de mama incluidos en nuestro estudio.	127
Tabla 10. Clones y sondas utilizados en el estudio de BAG de mama	130
Tabla 11. Descriptivo estadístico para edad, sexo y estado de menopausia	145
Tabla 12. Distribución de los subtipos histológicos del cáncer de mama.....	146
Tabla 13. Distribución de los subtipos molecular del cáncer de mama	147
Tabla 14. Distribución de marcadores IHQ y moleculares habituales del cáncer de mama: CK19, E-Cadherina, HER2, FISH/ISH HER2.....	148
Tabla 15. Descriptivo de variables continuas del panel básico en el diagnóstico de cáncer de mama determinadas por IHQ: RE, RP, Ki67, p53 y BCL2	148
Tabla 16. Tabla de frecuencias del grado histológico SBR y SBR agrupado	149
Tabla 17. Distribución de estadio patológico y clínico del cáncer de mama.....	149
Tabla 18. Distribución del tipo de cirugía	150
Tabla 19. Distribución dicotómica de tratamiento oncológicos específicos	150
Tabla 20. Distribución dicotómica de los pacientes con propuesta de neoadyuvancia y su tipo de respuesta	151

Tabla 21. Distribución de las recidivas y sus tipos	151
Tabla 22. Distribución del estado vital de los pacientes a cierre del estudio 31/12/2023	152
Tabla 23. Tabla de distribución del grado de intensidad de la expresión de FSCN1 en cuatro variables	153
Tabla 24. Tabla de distribución del grado de porcentaje de expresión de FSCN1 en cuatro variables	153
Tabla 25. Distribución de expresión de FSCN1 en dos categorías: Baja y Alta Expresión.....	153
Tabla 26. Análisis descriptivo y distribución por categorías de la ratio y grupos de <i>TOP2A</i>	154
Tabla 27. Tabla de contingencia entre los grados de porcentaje e intensidad de expresión de FSCN1.....	155
Tabla 28. Tabla de contingencia entre las categorías de FSCN1 y la ratio de <i>TOP2A</i>	155
Tabla 29. Tabla de contingencia de las categorías de FSCN1 frente a los grupos de <i>TOP2A</i>	156
Tabla 30. Tabla de contingencia entre el grado de intensidad de FSCN1 y la ratio de <i>TOP2A</i>	156
Tabla 31. Tabla de contingencia entre el grado de porcentaje de FSCN1 y la ratio de <i>TOP2A</i>	157
Tabla 32. Tabla de contingencia de las categorías de FSCN1 frente a la edad.....	157
Tabla 33. Tabla de contingencia de los grupos de <i>TOP2A</i> frente a la edad	158
Tabla 34. Tabla de contingencia entre los subtipos histológicos y las categorías de FSCN1	158
Tabla 35. Tabla de contingencia entre los subtipos moleculares y las categorías de FSCN1	159
Tabla 36. Tabla de contingencia entre los subtipos histológicos frente a la ratio de <i>TOP2A</i>	160
Tabla 37. Tabla de contingencia entre los subtipos histológicos frente a los grupos de <i>TOP2A</i>	161

Tabla 38. Tabla de contingencia entre los subtipos moleculares y los grupos de <i>TOP2A</i>	161
Tabla 39. Tabla de contingencia combinada entre el grado histológico SBR y las categorías de FSCN1 y los grupos de <i>TOP2A</i>	162
Tabla 40. Tabla de contingencia combinada entre el grado histológico SBR agrupados por grados y las categorías de FSCN1 y los grupos de <i>TOP2A</i>	162
Tabla 41. Tabla de contingencia combinada del sexo frente a las categorías de FSCN1 y los grupos de <i>TOP2A</i>	163
Tabla 42. Tabla de contingencia combinada de la menopausia frente a las categorías de FSCN1 y los grupos de <i>TOP2A</i>	163
Tabla 43. Tablas de contingencias combinadas del estadio tumoral patológico y clínico frente a las categorías de FSCN1 y los grupos de <i>TOP2A</i>	164
Tabla 44. Tablas de contingencias combinadas de los descriptivos patológicos (pTNM) y las categorías de FSCN1 y los grupos de <i>TOP2A</i>	165
Tabla 45. Tablas de contingencias combinadas de los descriptivos clínicos (cTNM) y las categorías de FSCN1 y los grupos de <i>TOP2A</i>	166
Tabla 46. Pruebas T de Student para valorar correlación entre RE/RP/Ki67/p53/BCL2 y las categorías de FSCN1.....	167
Tabla 47. Pruebas T de Student para valorar correlación entre RE/RP/Ki67/p53/BCL2 y los grupos de <i>TOP2A</i>	169
Tabla 48. Tablas de contingencias combinadas de RE, RP, BCL2, p53, edad y Ki67 frente a las categorías de FSCN1 y los grupos de <i>TOP2A</i>	171
Tabla 49. Tablas de contingencias combinadas de E-Cadherina, CK19 y HER2 frente las categorías de FSCN1 y los grupos de <i>TOP2A</i>	173
Tabla 50. Tabla de contingencia de tipo de recidiva frente a las categorías de FSCN1	174
Tabla 51. Tabla de contingencia de tipo de recidiva frente a los grupos de <i>TOP2A</i>	174
Tabla 52. Tabla resumen de contingencias de FSCN1 y <i>TOP2A</i> con las diferentes variables a estudio.....	175
Tabla 53. Coeficientes de Correlación de Pearson para las variables continuas .	179

Tabla 54. Áreas bajo la curva obtenidas mediante curvas ROC de marcadores IHQ y FISH <i>TOP2A</i>	180
Tabla 55. Regresiones logísticas binarias de determinaciones IHQ habituales ...	183
Tabla 56. Regresiones logísticas binarias de otros datos clínicos relevantes.....	183
Tabla 57. Análisis multivariante mediante regresión logística binaria en la RCP.	185
Tabla 58. Resultados de los análisis univariantes de la supervivencia global de enfermedad (Mantel-Cox) de nuestra serie en relación con las distintas variables a estudio	186
Tabla 59. Resultados regresión de Cox para la supervivencia global	190
Tabla 60. Resultados de los análisis univariantes de la supervivencia libre de enfermedad (Mantel-Cox) de nuestra serie en relación con las distintas variables a estudio	191
Tabla 61. Resultados regresión de Cox para la supervivencia libre de enfermedad	195

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Resolución del Comité ético de investigación del CHUC para la realización de esta tesis265

Anexo 2. Resolución del Comité ético de investigación de la UCAM para la realización de esta tesis267

I – INTRODUCCIÓN

I - INTRODUCCIÓN

1.1. ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DE LA GLÁNDULA MAMARIA

La mama es una glándula de secreción apocrina modificada presente en seres humanos adultos tanto en hombres como en mujeres. Es un órgano doble situado en la región anterior del tórax, compuesto por: tejido mamario, tejido fibroso y grasa. La mayoría del órgano se sitúa sobre el músculo pectoral mayor en relación con la superficie de su fascia y lateralmente al hueso esternón. Una pequeña porción se extiende hacia la axila. Otros músculos en relación con la mama son: el serrato anterior, el oblicuo externo y la vaina del recto anterior. En su superficie muestra un revestimiento por piel similar al resto de tórax y abdomen a excepción del complejo areola-pezones. La morfología y el de las mamas varían significativamente entre individuos.

El tejido mamario está conformado por un sistema secretor compuesto por los ductos mamarios y la porción glandular de los lobulillos mamarios, que en los hombres adultos suelen estar atróficos. Los conductos de secreción se organizan de forman convergente a través de un sistema de ductos confluyentes y ramificados, similar a las ramas de un árbol, que parten de una unidad terminal ductolobulillar hasta progresar a ductos de mayor tamaño (de menor a mayor tamaño, figura 1): ductos terminales, ductos mayores, ductos galactóforos, senos galactóforos y por último el ducto colector previo paso a la salida a piel de la secreción. La mama se

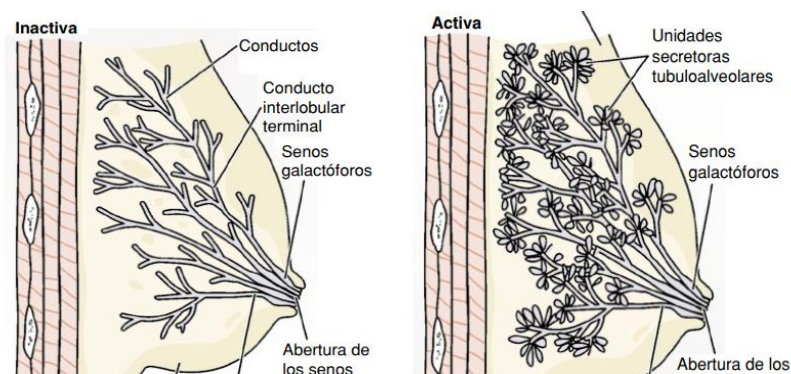


Figura 1. Esquema de la ramificación del sistema ductal en relación con los lobulillos secretores. (Junqueira y Carneiro: Histología básica, 2005)

divide en lóbulos, cuya cantidad en el adulto varía entre 15 y 25 unidades. Estos lóbulos presentan una considerable variabilidad anatómica y carecen de límites bien definidos. Sin embargo, existe cierta organización dependiente de los diferentes conductos galactóforos.

La irrigación arterial principal es llevada a cabo por: la arteria interna torácica (también conocida como arteria mamaria interna), las arterias intercostales (ramas de la arteria aorta) y la arteria axilar. El patrón de distribución de vasos y regiones anatómicas de vascularización de estos muestra una gran variabilidad, incluso en las mamas contralaterales del mismo individuo.

El drenaje venoso es también fluctuante y depende principalmente de un drenaje profundo a cargo de las venas torácicas internas. Otros posibles drenajes menos caudalosos corren a cargo de la vena axilar, de las venas intercostales y de las venas superficiales del cuello.

La inervación de la mama es realizada por los nervios intercostales, desde el segundo hasta el sexto, los cuales son ramas de los nervios espinales torácicos y tienen naturaleza motora, sensitiva y vegetativa.

El drenaje linfático resulta en este órgano fundamental para el estudio de la metástasis. Aunque variante, la mayoría del drenaje se realiza a través de la axila (linfáticos de la región subclavia, axilar y subescapular). De manera más escasa, parte de linfa es drenada en la fascia interpectoral, nódulos de Rotter o más raramente al espacio retromamario. El drenaje a mama contralateral (intermamario) es extraordinario y se describe principalmente cuando el sistema principal de drenaje está obstruido, aunque puede ocurrir de forma espontánea.

Para el manejo quirúrgico los ganglios mamaros se han dividido según su relación con el músculo pectoral menor en tres niveles (niveles de Berg):

- Nivel I: Los ganglios situados lateralmente al pectoral menor.
- Nivel II: Los ganglios situados entre los bordes del pectoral menor.
- Nivel III: Los ganglios situados medialmente al pectoral menor.

La mama es un órgano hormonodependiente cuya finalidad es la secreción de leche que permita la alimentación básica a través de la succión del recién nacido. La leche está compuesta principalmente por agua, sales, anticuerpos y proteínas que aseguran una nutrición básica en los primeros meses. La mama en la niñez y en la infancia en ambos sexos no presenta muchas diferencias. Es a partir de la

pubertad, con el aumento de secreción del estrógeno, donde se desarrolla por completo las unidades lobulillares. En lo que respecta al ciclo menstrual, la mama es un órgano variable. La primera quincena se muestra básicamente inactiva mientras que la segunda mitad del ciclo tras la fase lúteo se produce una hipertrofia e hiperplasia con presencia de mitosis. Esta fase termina si el nivel de estrógenos y progesterona decae tras la menstruación. Si ocurre el embarazo los estrógenos promueven la movilización de tejido adiposo y la proliferación de acinos. La progesterona favorece el rebrote y la maduración de los mismos. La prolactina es la hormona fundamental en la síntesis de leche.

La mama lactante se caracteriza por acinos totalmente distendidos, con luces ampliamente visibles y con secreción eosinófila, cuando se tiñen con Hematoxilina-Eosina (HE), y pequeñas vacuolas blanquecinas que se corresponden con lípidos. La retirada de la succión, base del reflejo neurohormonal oxitocina-prolactina, ocasiona una regresión de la mama hacia su morfología habitual entre menstruaciones.

1.2. EMBRIOLOGÍA DE LA MAMA

La mama se desarrolla sobre crestas mamarias que aparecen alrededor de la quinta semana del desarrollo fetal. Se sitúan a lo largo de la región ventral, desde la axila hasta los muslos. Con el desarrollo la mayoría de este tejido embrionario involuciona (si no lo hiciese del todo podría desarrollarse un tejido mamario ectópico) dejando como remanente la porción más superior. Alrededor de la decimocuarta o decimoquinta semana ocurre un condensamiento de la yema mamaria con aparición de abundante tejido epitelial en forma de cordones primitivos que darán lugar a los lóbulos de la mama. La expresión del factor transformante de crecimiento alfa (TGF- α) [1] resulta vital en la diferenciación y desarrollo en etapas iniciales (figura 2). En etapas posteriores del desarrollo aparecen las células mioepiteliales [2] procedentes de células basales siendo fundamentales en la secreción de los componentes de la membrana basal (principalmente colágeno IV y fibronectina). Procedente de la dermis un tejido más laxo envuelve el desarrollo del tejido mamario primitivo formando los ligamentos suspensorios de Cooper [3]. Al final de desarrollo fetal, ocurre el desarrollo del sistema glandular ramificado y la formación del orificio de secreción para los conductos galactóforos terminales.

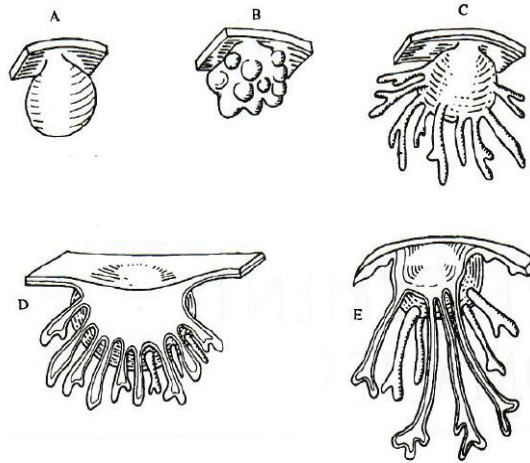


Figura 2. Fases del desarrollo del sistema ductal. En letra A y B fases iniciales. C. Fase de formación ductal primitivo. D y E. Desarrollo de areola y maduración del sistema ductal. (extraído de Pathology of the Breast, Fattaneh A. Tavassoli, 1999)

1.3. DESARROLLO DE LA MAMA

Aunque el desarrollo no ocurre hasta la etapa de la pubertad, en mamas de recién nacidos puede apreciarse una galactorrea del recién nacido (popularmente conocida como “leche de bruja”) debido al paso transplacentario de hormonas maternas que produce un tejido mamario de aspecto hiperplásico y secretor. A excepción de este hallazgo, el desarrollo queda prácticamente detenido hasta el aumento de hormonas producidas por el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal. Cuando aparece, se inicia la ramificación de los ductos acompañándose del desarrollo del tejido conectivo propio y de los acinos mamarios. En los hombres, tanto durante la pubertad como en la adultez, puede ocurrir una ginecomastia fisiológica (normalmente bilateral) o de naturaleza tumoral, debido al aumento de los niveles de estrógeno y progesterona, principalmente a expensas del desarrollo del sistema ductal y no de los lobulillos.

1.4. HISTOLOGÍA DE LA MAMA

1.4.1. Lobulillo mamario

El lobulillo está formado por acinos revestidos por una doble capa celular. Las externas, llamadas células luminales, presentan una morfología cúbica y son las encargadas de la secreción del órgano. Las internas, las células mioepiteliales, son de morfología aplanada con citoplasmas claros, núcleos redondeados y bien definidos, cuya función principal consiste en la compresión del acino para el drenaje de su secreción. Esta capa mioepitelial se encuentra respetada en las lesiones benignas, y como regla general, su pérdida orienta a lesiones infiltrantes malignas. Los acinos drenan a un ducto terminal con una luz central revestida por un epitelio luminal de aspecto más cilíndrico. Rodeando a la unidad ductolobulillar se aprecia un estroma propio (tejido fibroso interlobulillar), algo más laxo y claro en HE, formado por fibroblastos que se distingue de forma fácil a campos de mediano aumento del resto del estroma de la mama (figura 3). Este estroma muestra una sensibilidad a las hormonas similar a la del resto del lobulillo, lo que explica su positividad para los receptores hormonales en las lesiones fibroepiteliales mamarias.

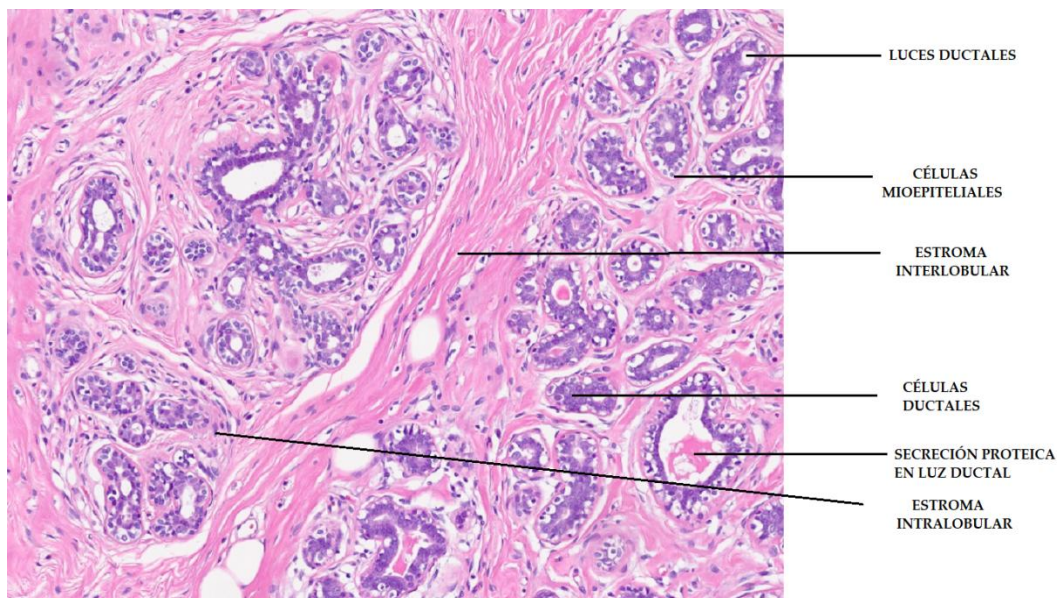


Figura 3. Histología del lobulillo mamario. (Imagen propia)

1.4.2. Ductos intermedios y terminales

Presentan un revestimiento doble similar al del lobulillo, con luces de mayor diámetro, secreciones más visibles y de coloración rosada con HE. Los ductos de mayor diámetro tienen una luz de contorno ondulante característico, rodeado de un estroma denso.

1.4.3. Piel y complejo areola-pezón

La piel está revestida por un epitelio plano estratificado queratinizado con ortoqueratina y un número habitual de capas de queratinocitos. Los queratinocitos son las células fundamentales de la epidermis y son altamente especializadas. Poseen una morfología variante poliédrica de bordes citoplasmáticos bien definidos y proyecciones citoplasmáticas como pequeñas espículas, los llamados desmosomas, que permiten una unión estrecha entre ellas. Tanto la queratinización como su íntima relación crean una capa aislante y resistente a la fricción. Por debajo se encuentran la dermis y la hipodermis, con una morfología similar a la del resto del organismo. Por fuera de la zona del complejo areola-pezón (CAP) se aprecian anejos cutáneos similares al resto del organismo: unidades pilosebáceas y secretoras ecrinas (figura 4). Otras células presentes son células inflamatorias como linfocitos maduros, aislados mastocitos, células presentadoras de antígenos y macrófagos. En la zona de transición entre el epitelio doble del conductor secretor y el epitelio estratificado cutáneo, suele ocurrir un cambio brusco, a menudo acompañado de metaplasia escamosa (transformación de un tipo de epitelio en otro debido a causas adaptativas). Aunque la enfermedad de Paget podría originarse en esta transición [4], existen teorías que orientan a una llegada de células tumorales a través de la luz del seno galactóforo [5].

El pezón es una zona prominente ubicada en la región central de la mama, donde desembocan los ductos galactóforos en pequeñas dilataciones bajo la piel, comunicándose directamente con el exterior. Alrededor se aprecian fascículos entrecruzados de musculatura lisa en relación con los ductos galactóforos y abundantes haces de nervios sensitivos. La areola muestra en la capa basal epidérmica un aumento de la pigmentación basal.

Sobre la areola se distinguen macroscópicamente otras protrusiones, los llamados tubérculos de Montgomery, que consisten en glándulas sebáceas que drenan directamente a la epidermis y cuya función principal es la lubricación de la zona, así como actuar de agente bactericida.

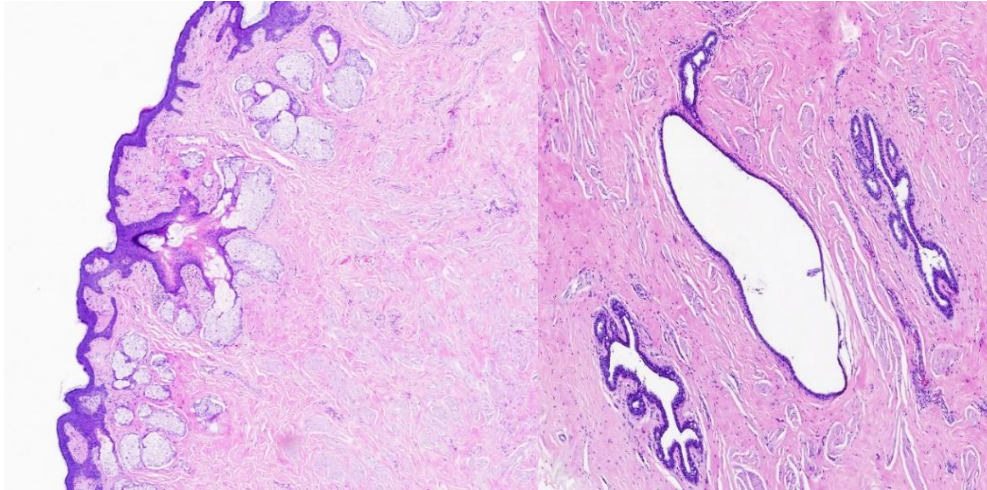


Figura 4. Histología del CAP. A la izquierda histología con piel, glándulas sebáceas prominentes y haces de musculatura lisa. A la derecha, dilatación y contornos irregulares de ductos galactóforos. (Imágenes propias)

1.5. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es el tercer tumor más frecuente en España en los datos de GLOBOCAN 2020. Según las estadísticas publicadas en 2023 por la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) a tenor de la base a los datos de la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN) en el año 2020 hubo una incidencia mundial del 125% y una prevalencia del 17,7% del total de tumores excluyendo los cutáneos no melánicos (figura 5).

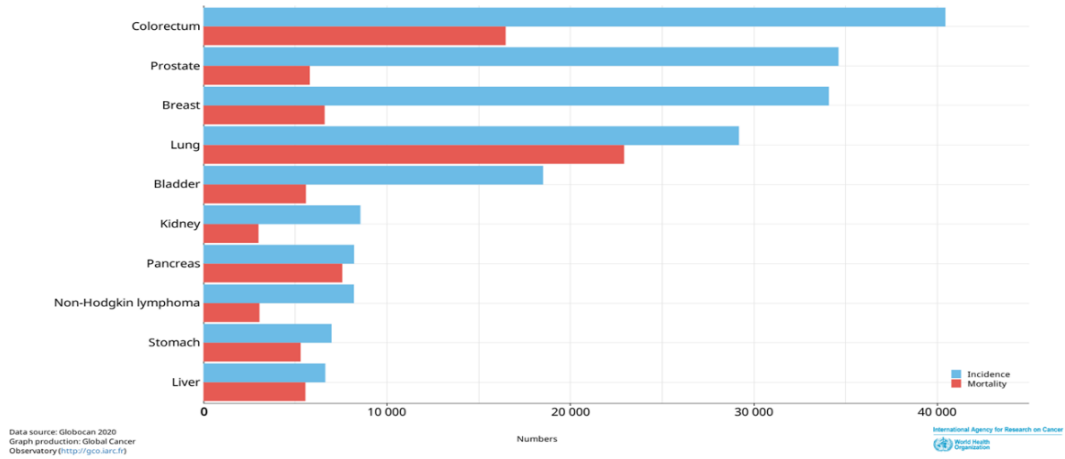


Figura 5. Estimación de la incidencia y mortalidad en hombres y mujeres de todas las edades excluyendo tumores cutáneos no melánicos en 2020 en España. Fuente GLOBOCAN <https://gco.iarc.fr/today> Acceso: febrero 2023

En lo que respecta a España, considerando hombres y mujeres, la incidencia es del 12,1% con un total de 34.088 casos con una mortalidad de 6.606 casos. La estimación de prevalencia a 5 años es de 137.270 casos, lo que supone un 16%, cifra muy similar al cáncer de próstata (figura 6). En la figura 7 se aprecia la mortalidad e incidencia en mujeres excluyendo tumores no melánicos.

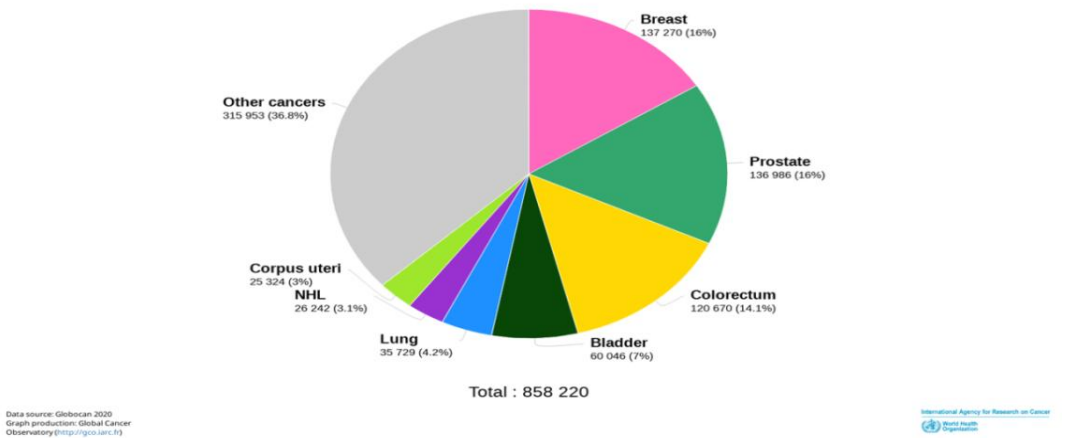


Figura 6. Estimación de la prevalencia del cáncer de mama a 5 años (2020-2025) en España en ambos géneros. Fuente GLOBOCAN <https://gco.iarc.fr/today> Acceso: febrero 2023

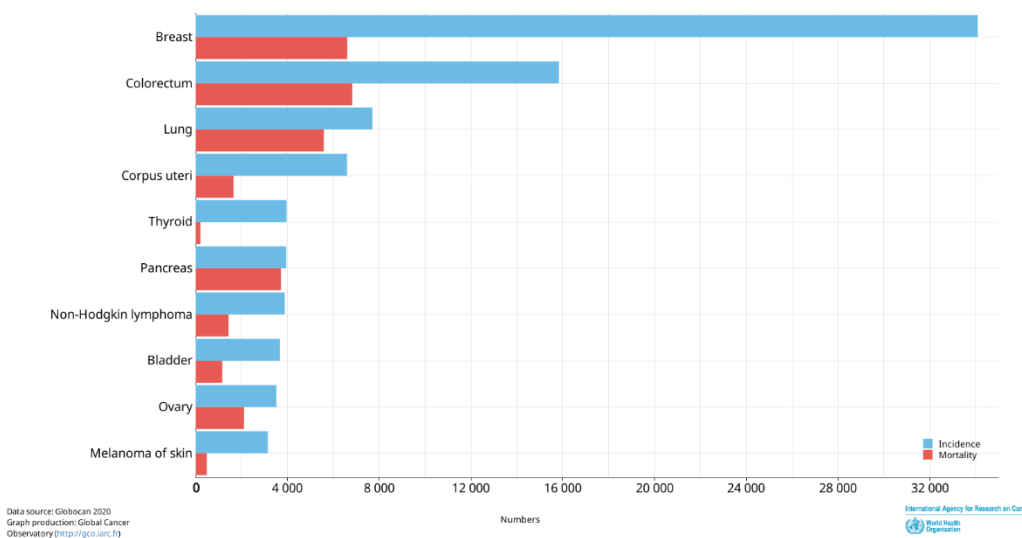


Figura 7. Estimación de la incidencia y mortalidad en mujeres españolas de todas las edades excluyendo los tumores cutáneos no melánicos. Fuente GLOBOCAN <https://gco.iarc.fr/today> Acceso: febrero 2023.

La estimación para 2023 es de 35.001 nuevos casos ocupando el segundo lugar tras el cáncer colorrectal. El número de casos prevalentes totales en 2020 es de 516.827. Por género, sigue siendo el tumor más frecuente en mujeres con una tasa de incidencia de 110 por cada 100.000 mujeres en el año 2023. Respecto a la población mundial, las cifras tanto de incidencia como de mortalidad son algo más dispares. En países desarrollados, como por ejemplo en Australia y Nueva Zelanda, la incidencia se sitúa en 95,5 por 100.000 casos estandarizada por edad, lo que denota incidencias mayores en relación con las campañas de cribado, concienciación y facilidad de acceso al sistema sanitario. En cambio, regiones del este de África y del centro sur asiático, con un 26,2 por 100.000 casos estandarizada por edad, refleja el polo opuesto (figura 8). La mortalidad también se modifica según el área geográfica, aunque ésta no es tan dispar. Las campañas de cribado a través de mamografías en la población objetivo [6], junto con una mayor concienciación de la población, han incrementado la prevalencia de la enfermedad en los últimos años [7]. La adherencia a estos programas de cribado es desigual, con influencias regionales más marcadas. Los principales factores son: el nivel socioeconómico, el desconocimiento de la enfermedad y las restricciones de acceso a los sistemas de salud [8]. La mortalidad en 2020 fue de 6.572, lo que representa el

15,1% de las defunciones por cáncer en mujeres. De estas defunciones, el 58% correspondió a mujeres de 70 años o más. En el último medio siglo se ha visto en España un descenso de la tasa de mortalidad a partir del año 2006 [9].

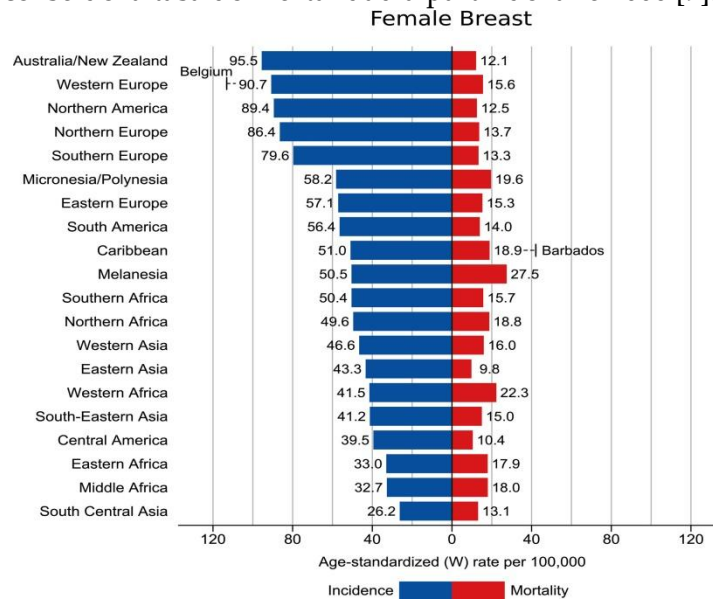


Figura 8. Incidencia y mortalidad estimada por grupo de edad estandarizado por regiones geográficas. GLOBOCAN 2020.

1.6. CARCINOGENESIS EN EL CÁNCER DE MAMA

1.6.1. Factores de riesgo no modificables

El principal factor de riesgo, aparte del sexo, es la edad. La incidencia del cáncer de mama aumenta con la edad. Por esta razón, la práctica mayoría de países poseen un primer pico de incidencia del cáncer mamario situada en mujeres mayores de 40 años [10]. El riesgo de cáncer de mama varía según la zona geográfica, siendo mayor en poblaciones de Europa, Australia y Norte América, aunque el factor ambiental sigue siendo relevante al evidenciarse que las primeras y segundas generaciones de poblaciones emigrantes adquieren similares valores de riesgo que la población local. La etnicidad es un factor independiente de riesgo [11].

El poseer antecedentes familiares de cáncer de mama, teniendo en cuenta tanto el grado de parentesco como la edad de presentación, es otro factor primordial en el cáncer de mama. *Brewer et al* [12], en un estudio de cohorte británico, demostraron que el número de familiares afectados era importante, con un incremento de tasa de 1,75 a 2,5 veces de padecer cáncer cuando se tenían dos o más familiares afectados en vez de uno.

La menarquia tardía (retrasos de 1 año en la menarquia reduce el riesgo de cáncer de mama en un 5%), la menopausia temprana y la ooforectomía reducen el tiempo de exposición estrogénica lo que se traduce en un menor riesgo del cáncer de mama [13].

En lo que respecta a los hombres, una edad avanzada, un desequilibrio hormonal, la exposición a radiación previa y poseer antecedentes familiares de cáncer de mama, especialmente en familias portadoras del gen *breast cancer gen 2*, (BRCA2), se ha asociado a un mayor riesgo de cáncer de mama [14].

1.6.2. Factores de riesgo modificables

La presencia de estrógenos sobre la mama, tanto endógenos como exógenos, es uno de los principales factores de riesgo. En la actualidad, el aumento de mujeres nulíparas, el mayor retraso del primer parto, el menor tiempo de lactancia, el uso de anticonceptivos y las terapias hormonales sustitutivas suponen una mayor exposición al estrógeno durante toda la vida fértil y no fértil de la mujer [15].

El consumo de alcohol puede elevar los niveles en suero de estrógeno con la consecuente activación hormonal con mayor relación de los cánceres con RH positivos. La relación entre fumar y cáncer de mama es discutida, a pesar de cada vez existe mayor evidencia de un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama cuando más temprana es la edad de fumar y también en mujeres que fuman y beben simultáneamente [16]. La asociación entre la diabetes mellitus y el cáncer de mama ha sido estudiado mediante metaanálisis, con un resultado de asociación positiva como factor de riesgo [17].

El consumo de isoflavonas tiene un efecto protector contra el cáncer de mama en poblaciones asiáticas [18]. El establecimiento de las dietas ricas en grasa saturadas del mundo occidental se ha relacionado con un incremento de mayor mortalidad y peor pronóstico. En la literatura se describe una relación entre el índice masa corporal y riesgo de cáncer de mama (el aumento de grasa produce liberación de estrógenos débiles como el estradiol) en casos de cánceres con RH positivos [19].

El ejercicio físico mantenido está asociado con una reducción en el riesgo del cáncer de mama, hecho que parece ser independiente de su efecto sobre el panículo adiposo [20]. No se ha demostrado un efecto del estrés auto percibido sobre la incidencia del cáncer de mama [21], aunque un estudio sobre una cohorte de enfermeras con turnos nocturnos sí apreció un aumento de riesgo en relación con las alteraciones de secreción de melatonina [22]. La mayor paridad, y sobre todo cada nacimiento adicional, reduce el riesgo de cáncer en un 10% [13].

En un metaanálisis de valoración radiológica basado en el sistema de clasificación *Breast Imaging-Reporting and Data System* (BIRADS), ha reflejado que tener masas densas (tejido mamario denso) está significativamente asociado con un mayor riesgo de padecer cáncer de mama, hasta dos veces más, en comparación con tener tejido mamario disperso. Por ello, el estudio de resonancia magnética nuclear (RMN) de rutina se está sugiriendo en este tipo de mama [23].

La microbiota cutánea de la mama muestra resultados preliminares de ser un factor de riesgo modificable en el cáncer de mama [24]. La radiación ionizante es otro factor de riesgo, con un mayor riesgo observado en niñas expuestas antes de los 20 años y un riesgo nulo o mínimo en mujeres expuestas después de la menopausia. Este hecho es difícil de medir y valorar en la población real [25].

1.7. CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DEL CÁNCER DE MAMA

El sistema de clasificación de la 5ª Edición de “*WHO Classification of tumors*” de los tumores epiteliales malignos de mama publicado por la *World Health Organization* (WHO) se basa en tumores: que no muestran un subtipo específico, en inglés “*no other subtype*” (NOS), y otros que son clasificados con un subtipo particular. En el caso de los primeros, sí pueden mostrar algún patrón morfológico especial, algunos de ellos incluso se han considerado subtipos hasta la 4ª edición.

Los patrones histológicos del carcinoma NOS encontramos: patrón medular, carcinoma infiltrante con diferenciación neuroendocrina, carcinoma con células estromales gigantes tipo osteoclasto, patrón pleomórfico, patrón sebáceo, patrón melanocítico, patrón oncócico, patrón coriocarcinomatoso, patrón rico en lípidos y patrón claro rico en glucógeno.

Como subtipos reconocidos en la última edición encontramos: carcinoma lobulillar infiltrante, carcinoma tubular, carcinoma mucinoso, cistoadenocarcinoma mucinoso, carcinoma micropapilar infiltrante, carcinoma con diferenciación apocrina y carcinoma metaplásico. La mayoría de ellos requiere que los hallazgos observados supongan más del 90% de la lesión, permitiéndose el uso de “carcinoma mixto” si este porcentaje no alcanza dicha cifra.

Otros tumores mamarios más raros muestran una similitud con los tumores salivares y se clasifican en un grupo aparte, entre ellos: carcinoma de células acinares, carcinoma secretor, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoide quístico, carcinoma con polaridad inversa de célula alta y adenocarcinoma polimorfo.

1.7.1. Carcinoma infiltrante NOS

El término “*no other subtype*” (NOS) es el utilizado según recomendaciones de la WHO [26] para dar cabida la gran mayoría de cánceres primarios mamarios de origen epitelial que no muestran unas características histológicas definitorias en un más de 90% de su extensión. En ocasiones, si otro subtipo específico, que habitualmente representa entre el 10% y el 90% de la muestra, se presenta junto al NOS, se puede utilizar el término carcinoma mixto. En el carcinoma NOS habitualmente se visualizan focos de carcinoma ductal in situ.

Histológicamente, muestra una proliferación de estirpe epitelial que, en tumores de bajo grado, se caracteriza por un patrón de crecimiento en cordones, trabéculas o ductos con luces visibles y células con leve atipia. En tumores de alto grado, presenta un patrón de crecimiento más sólido, con escasa formación de luces y una atipia celular marcada. Alrededor del componente epitelial, el mesénquima se dispone en ocasiones con un aspecto desmoplásico y en otras fibroso-colagenizado [26]. El carcinoma NOS puede presentar patrones morfológicos especiales como fue comentado anteriormente.

1.7.1.1. *Carcinoma infiltrante NOS con patrón medular*

Este patrón, con una tasa de reproductividad entre observador baja, se caracteriza por un crecimiento difuso con bordes pujantes de células con escaso citoplasma que tienden a fusionarse dando un aspecto de sincitios. Se acompaña de una población inflamatoria crónica consistente en linfocitos maduros sin atipia, fenómeno que podría estar en relación con un mejor pronóstico de éste respecto a otros carcinomas de alto grado [27,28]. La presencia de abundantes linfocitos hace necesario descartar un linfoma como principal diagnóstico diferencial. Muestra habitualmente RH negativos y HER2 negativo lo que lo asemeja a otros carcinomas triples negativos (TN). Estudios han relacionado una cierta relación con mutaciones en el *breast cancer gen 1* (BRCA1) [29,30] aunque existe hoy en día una discrepancia al respecto [31]. Se ha observado una expresión elevada de *programmed Death-ligand 1* (PDL1) en comparación con otros tumores TN, lo que podría explicar su mejor pronóstico [32].

1.7.2. **Carcinoma lobulillar infiltrante**

Este subtipo representa alrededor de un 5-15% del total del cáncer de mama [33]. Se caracteriza por una proliferación tumoral con un patrón de cordones de una célula de grosor o sueltas en un estroma de aspecto fibroso y desmoplásico, apoyado por la pérdida de expresión de E-cadherina [34,35] visto en ocasiones. Las células tumorales suelen disponerse con cierta frecuencia de forma concéntrica en forma de “diana” alrededor de ductos sin alteraciones [36,37]. El ratio núcleo/citoplasma es equilibrado con núcleos alargados y habitualmente hipercromáticos en ocasiones con vacuola citoplasmática [38]. Muestra una positividad marcada para RE [39] y escasa sobreexpresión para HER2 [40].

Patrones sólidos y alveolares son menos frecuentes. El llamado carcinoma lobulillar pleomórfico exhibe un grado mayor de pleomorfismo con núcleos de cuatro veces mayor que el de un linfocito y con aumento de la tasa mitótica [41].

Por último, el patrón túbulo-lobulillar se define como una mezcla de áreas de aspecto tubulares clásicas y células uniformes en un patrón lineal [42].

1.7.3. Carcinoma tubular

Es un subtipo de buen pronóstico [43] que representa apenas un 1-2% del total de los casos del cáncer de mama [44]. Muestra una infiltración por túbulos, que debe representar más del 90% del tumor [26], con luces contorneadas-anguladas y revestidas por una única capa de epitelio, sin presencia de mioepiteliales, de núcleos con nula o escasa atipia. Su patrón tubular ha sido cuestionado en estudios posteriores, ya que los análisis tridimensionales sugieren que éstos representan más una morfología en “collar de cuentas” [45]. Su tendencia a la formación de glándulas, escasa atipia y reducida cantidad de mitosis, lo define como un tumor grado 1 *per se*. Su expresividad para RE es frecuente [46] y rara vez se evidencia amplificación de HER2 [47]. Su diagnóstico suele ser sencillo, excepto en el caso de dos lesiones que muestran túbulos con hallazgos similares pero con mioepiteliales o al menos presencia parcheada de las mismas: la adenosis esclerosante y la cicatriz radial.

1.7.4. Carcinoma con diferenciación apocrina

Muestra una incidencia en pacientes más mayores y con una prevalencia escasa del 1% [48]. Histológicamente se distingue por ser una neoplasia sólida de células de moderado-gran tamaño con un citoplasma amplio y bien definido eosinófilo que se corresponden con mitocondrias [49]. Estos hallazgos deben representar al menos el 90% de la neoplasia. Los núcleos tienen escasa atipia, con binucleación ocasionalmente e índice mitótico moderado. Su alta frecuencia de expresión para receptores de andrógenos (RA) es característico de su panel IHQ [50,51] que se acompaña de la pérdida de la expresión para el resto de RH. El diagnóstico diferencial principal es con las neoplasias histiocitarias o derivadas de células de Schwann que son CD68 positivas pero negativas para cóctel de citoqueratinas (CK).

1.7.5. Carcinoma cribiforme

Este subtipo se caracteriza por la presencia de un componente epitelial invasivo con una morfología de islas tumorales (>90% de la lesión) que muestran luces en su interior, hecho que asemeja a una criba (“cribiforme”). Si el porcentaje es menor, habitualmente asociado a un carcinoma tubular, se recomienda notificar como un componente mixto [52]. Las células son monomorfas de morfología cúbico-cilíndricas que se disponen alrededor de luces secundarias. Éstas muestran un contenido mucinoso en el interior de la luz. No se evidencian hallazgos macroscópicos distinguibles. Se considera un tumor de bajo grado [52].

Muestra un alto índice expresión para RE y RP con un HER2 negativo, típicamente con una subclasificación molecular de luminal A en la mayoría de las series consultadas [53,54]. Su pronóstico es bueno, similar al de otros cánceres de bajo grado, hecho que se ve más favorecido cuando se presenta de forma pura [52].

Los diagnósticos diferenciales principales que se plantean son: el carcinoma adenoide quístico [53] que muestra una expresión habitual para CD117 [55]; y la esferulosis colágena, lesión benigna, que se distingue por una población única de mioepiteliales en un patrón no infiltrativo que poseen una tinción IHQ para células mioepiteliales: S100, calponina y actina de músculo liso [56].

1.7.6. Carcinoma micropapilar invasivo

Este tumor posee una escasa incidencia, menor del 2%, y suele presentarse en juntos a otros tipos de cáncer de mama [57]. Respecto a otros carcinomas de similar tamaño se notifica un peor pronóstico y una invasión linfovascular más frecuente [58].

Histológicamente se caracteriza por mostrar, en al menos un 90% de la muestra, un patrón sólido de pequeños grupos llamados mórulas, sin luces centrales ni presencia de ejes vasculares. Se disponen en pequeñas lagunas producidas por un artefacto de retracción respecto al estroma adyacente. Estas mórulas muestran siempre su cara apical hacia el estroma que las rodea, lo que se denomina patrón de crecimiento “de dentro hacia fuera”, que se aprecia mejor con la expresión IHQ de MUC1. Las células tumorales son de tipo cúbico-cilíndricas con una atipia nuclear moderada-intensa y con un citoplasma denso eosinófilo. El subtipo mucinoso de este cáncer consiste en la presencia de células tumorales en

mórulas rodeadas por lagos mucinosos. Una alta expresión de RH es lo más habitual lo que permite su subclasificación molecular como luminal A o luminal B. La expresión de HER2 oscila entre un 10-30% [59].

1.7.7. Carcinoma mucinoso

La principal característica histológica es la presencia de células tumorales en pequeños grupos flotando en material de naturaleza mucinosa extracelular, en forma de grandes piscinas con un estroma fibroso interpuesto entre ellos con vasos sanguíneos. Macroscópicamente también muestran hallazgos que difieren del resto debido a la habitual y característica presencia de nódulos quísticos con contenido untuoso-mucinoso [60], lo que explica sus características ecográficas y radiológicas diferenciales.

Clásicamente conocido como carcinoma coloide, en la actualidad se consideran dos grandes subtipos [61], aunque sin diferencia pronóstica:

- Puro o tipo A: lesiones hipocelulares consistentes en grandes lagos de mucina con agregados sólidos celulares.
- Mixto o tipo B: lesiones más hiper celulares con diferenciación neuroendocrina.

Aunque se considera un tipo de cáncer de bajo grado y el patrón IHQ habitual es el subtipo molecular luminal A, se ha demostrado que el patrón transcriptómico de este subtipo difiere del NOS [62], lo que se traduce en ausencia de ganancias de 1q o pérdida de 16q ni mutaciones en la fosfoinositol 3-cinasa polipéptido catalítico alfa (PIK3CA), sí presentes en el resto de carcinomas de bajo grado [63]. La presencia de mucina plantea el diagnóstico diferencial con lesiones de tipo mucocele [64] las cuales se diferencian por: presencia de células epiteliales aplanadas en la periferia de la lesión, ausencia de atipia y conservación de la capa mioepitelial. La mucina puede apreciarse en casos de carcinoma lobulillar infiltrante con abundante mucina extracelular [65]. La metástasis de otro carcinoma mucinoso debe ser descartada. La morfología en anillo de sello no asocia la presencia de mucina extracelular. Respecto al adenocarcinoma mucinoso debemos presenciar en este último un revestimiento epitelial en la pared y una expresión IHQ más frecuente del subtipo molecular luminal B [66].

1.7.8. Carcinoma papilar infiltrante

Neoplasia maligna caracterizada por la presencia de células tumorales que crecen en pequeñas estructuras papilares, rodeadas de células con atipia moderada y una clara ausencia total de capa mioepitelial tanto en los ejes de las papilas como en la periferia de la lesión (figura 9). Deben ser diferenciadas de otras lesiones papilares de la mama como: el carcinoma intraductal papilar, el carcinoma papilar sólido o el carcinoma papilar encapsulado. A pesar de compartir hallazgos similares, la correcta valoración del borde invasivo, IHQ típica de células mioepiteliales, valoración de capsulación y disposición sólida extensa de la lesión permite el diagnóstico diferencial en la mayoría de las ocasiones [67]. Metástasis de otros órganos deben ser descartadas en primer lugar debido a la baja incidencia de este tumor primario mamario.

Molecularmente presentar alta expresividad para RE, alta prevalencia de mutaciones PIK3CA, bajo ratio en alteraciones de p53 y menor aberración en el número de copias de genes [68].

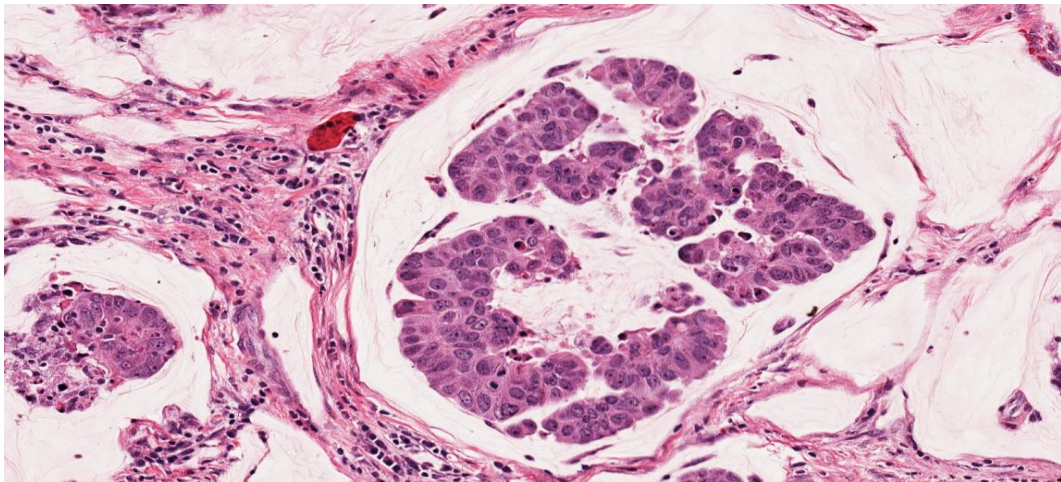


Figura 9. Carcinoma micropapilar infiltrante. Se aprecian nidos tumorales flotando en material de aspecto mucinoso. Los nidos no muestran un eje vascular. (Imagen propia)

1.7.9. Carcinoma adenoideo quístico

Es una neoplasia maligna bifásica formada por un componente epitelial luminal con diferenciación glandular, sebácea o escamosa con positividad para CK7 con formación de pseudoluces; y otra mioepitelial con un inmunofenotipo

basal (p40+, S100+ y calponina+). Además, con HE se aprecia un material tipo membrana basal eosinófilo y matricial más basófilo habitualmente alrededor y dentro de las pseudoluces glandulares. Este tumor es raro [69], y es similar a los de glándula salival.

La fusión de los genes *MYB-NFIB* es la más frecuente [70]. Se subclasifican en: el tipo clásico, el subtipo basaloide quístico [71] y el subtipo con transformación a alto grado. En este último, la atipia celular es más pronunciada, y se observan signos de mal pronóstico, como la invasión perineural [72]. Esta diferenciación se asocia con un pronóstico más favorable en el tipo clásico y menor en el de transformación a alto grado sin clara significancia actual por la escasez de casos reportados [73].

El tipo clásico muestra un inmunofenotipo TN con una expresión para CD117 en sus células luminales [74].

1.8. CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA

En la actualidad, el avance y la mayor accesibilidad a los estudios moleculares han permitido una clasificación clínica más precisa del cáncer de mama. La expresividad de patrones genéticos diferentes ha facilitado la integración de la biología molecular en los planes de tratamiento oncológicos [75], al proporcionar información de respuesta al tratamiento y pronóstico de los pacientes.

1.8.1. Clasificación integral por agregados

El cáncer de mama es un tumor poco homogéneo [76], con muchas variantes genéticas implicadas. Se han desarrollado estudios transcriptómicos debido a la necesidad de unificar grupos que reflejen un pronóstico y tratamiento similares.

A través del número de copias genómicas y de la expresión genética, mediante la secuenciación del ácido desoxirribonucleico (ADN) y la secuenciación del ácido ribonucleico (ARN), se clasificaron en 10 subgrupos diferentes, llamados “*Intclusters*” [77] que reflejaron una supervivencia y respuesta al tratamiento diferente.

El estudio de genes de los cánceres de mama TN ha permitido clasificarlos en 4 subtipos “*TNBCtype-4*” [78]: tipo basal 1, tipo basal 2, mesenquimal y luminal con RA.

1.8.2. Clasificación intrínseca del subtipo

Aunque la realización de paneles de genes que proporcionan información sobre el riesgo de recidiva es algo que en la actualidad sigue en auge, en ST. Gallen en 2013, se propuso una clasificación molecular subrogada por IHQ, con mucha semejanza a la obtenida por estudios moleculares. Se planteó en casos donde el acceso a estudios de biología molecular es inexistente o costoso. Con los valores de RE, RP, estado de HER2 y Ki67 se subdivide el cáncer de mama en: Luminal A, Luminal B HER2 negativo, Luminal B HER2 positivo, HER2 enriquecido y triple negativo [79].

- Luminal A.
 - Todos los siguientes: RE positivo, RP positivo, HER2 negativo y Ki67 bajo (<14% o 20% según otras series).
- Luminal B HER2 negativo.
 - Todos los siguientes: RE positivo y HER2 negativo.
 - Al menos uno de los siguientes: Ki67 elevado, RP bajo o negativo y alto riesgo de recidiva por estudios moleculares.
- Luminal B HER2 positivo.
 - Todos los siguientes: RE positivo, HER2 positivo, cualquier Ki67 elevado y cualquier expresión para RP bajo o negativo.
- HER2 enriquecido.
 - Todos los siguientes: RE negativo, RP negativo y HER2 positivo.
- Triple Negativo (TN).
 - Todos los siguientes: RE negativo, RP negativo y HER2 negativo.

1.9. ESTADIAJE TUMORAL. TNM

El estadiaje tumoral es un sistema que permite una codificación del tumor en unos grados, llamados estadios, fundamentales para el tratamiento y pronóstico

tumoral, a través de un sistema internacionalmente establecido que permite extrapolar los datos. El sistema más utilizado es el TNM de la AJCC (*American Joint Committee on Cancer*), cuya última versión es la 8ª, publicada en 2017. El estadiaje patológico, que queda reflejado por el sufijo pTNM, se basa en los hallazgos macroscópicos y microscópicos de las piezas de resección. La letra T se refiere al tamaño tumoral, la N a la afectación ganglionar metastásica regional y la M a la existencia de metástasis a distancia. La clasificación TNM tanto clínica como patológica coincide en T pero difiere en el resto, mostrándose a continuación los específicos para pN y pM (ver tabla 1, tabla 2 y tabla 3). Con la combinación de estas tres clasificaciones el cáncer de mama se divide en diferentes estadios (tabla 4).

Tabla 1. Clasificación TNM 8ª Edición para el apartado de Tumor primario (T).

TUMOR PRIMARIO (T)		
T0	No evidencia de tumor primario.	
Tis	Carcinoma in situ.	
T1	Tumor de 2 cm o menos de mayor extensión.	
	T1mi	Microinvasión de extensión máxima 0,1 cm o menos.
	T1a	Más de 0,1 cm de invasión, pero no más de 0,5 cm de extensión máxima.
	T1b	Más de 0,5 cm pero menos de 1 cm de extensión máxima.
	T1c	Más de 1 cm pero menos de 2 cm de extensión máxima.
T2	Tumor de más de 2 cm pero menos de 5 cm de extensión máxima.	
T3	Tumor con más de 5 cm de extensión máxima.	
T4	Tumor de cualquier tamaño con afectación de la pared torácica y/o ulceración de la piel.	
	T4a	Invasión a pared torácica (no incluye la invasión única del músculo pectoral).
	T4b	Ulceración, nódulo cutáneos satélites ipsilaterales o edema de piel (incluida la llamada "piel de naranja").
	T4c	Combinación de T4a+T4b.
	T4d	Carcinoma inflamatorio.

Tabla 2. Clasificación TNM 8ª Edición para el apartado de metástasis ganglionares regionales (pN).

GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES (N)		
pN0	Sin metástasis en ganglios linfáticos regionales.	
pN1	Micrometástasis; o metástasis de 1 a 3 ganglios axilares ipsilaterales; y/o ganglios de la mamaria interna con metástasis detectada por biopsia pero no clínica.	
	pN1mi	Micrometástasis (mayor de 0,2 mm y/o 200 células pero no mayor de 2 mm).
	pN1a	Metástasis de 1 a 3 ganglio/s axilar/es incluyendo al menos 1 con una metástasis de más de 2 mm de extensión mayor.
	pN1b	Ganglios mamarios internos con metástasis sin evidencia clínica de afectación.
	pN1c	Combinación pN1a (sin restricción de tamaño) y pN1b.
pN2	Metástasis de 4-9 ganglios axilares ipsilaterales; ganglios mamarios internos clínicamente detectados en ausencia de metástasis en ganglios axilares.	
	pN2a	Metástasis de 4-9 ganglios incluyendo al menos un depósito mayor de 2 mm de extensión máxima.
	pN2b	Metástasis en ganglios mamarios internos clínicamente detectados en ausencia de metástasis de ganglios axilares.
pN3	pN3a	Metástasis en 10 o más ganglios axilares ipsilaterales (al menos uno con un depósito mayor de 2 mm de extensión máxima) o metástasis en ganglios infraclaviculares o nivel III.
	pN3b	Metástasis clínica en ganglios mamarios internos ipsilaterales con ganglios axilares positivos; metástasis en más de 3 ganglios axilares con ganglios mamarios internos con micro o macrometástasis detectada por ganglio centinela pero no clínicamente.
	pN3c	Metástasis en ganglios supraclaviculares ipsilaterales.

Tabla 3. Clasificación TNM 8ª Edición para el apartado de metástasis a distancia (pM).

METÁSTASIS (M)	
pM0	No metástasis a distancia.
pM1	Metástasis a distancia confirmadas microscópicamente.

Tabla 4. Estadio del cáncer de mama.

ESTADIO			
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio IA	T1(T1mi incluido)	N0	M0
Estadio IB	T0, T1	N1mi	M0
Estadio IIA	T0, T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Estadio IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estadio IIIA	T0, T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
Estadio IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
Estadio IIIC	Cualquier T	N3	M0
Estadio IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

1.10. CRIBADO RADIOLÓGICO Y TOMA DE MUESTRAS EN EL CÁNCER DE MAMA

1.10.1. Cribado radiológico del cáncer de mama

La evolución relativamente lenta del cáncer de mama ha permitido desarrollar sistemas de cribado bastante unificados internacionalmente. En España se instauró en el año 2006 a través de un cribado poblacional de mujeres con una edad comprendida entre 50 y 69 años mediante una mamografía cada 2 años. En el año de 2024 en el Sistema Murciano de Salud (SMS) el cribado incluirá a mujeres entre 47 y 70 años. Actualmente se dispone de un alcance teórico del 100% de la

población. Estudios retrospectivos estiman que la presencia de un cribado puede llegar a reducir la mortalidad alrededor de al menos un 20% [80]. En la actualidad, aún existen discrepancias sobre cuál es la técnica que mejor se ajusta a la mayoría de las mujeres. Además, la creciente visión de sistemas de cribado más personalizados permite ofrecer la técnica con mayor capacidad de detección, dependiendo de la fisiología y las características propias de cada mama. A pesar de parecer poco relevante, el sobrediagnóstico y sus consecuencias económicas, estéticas y físicas, que pueden atribuirse a la actitud posterior a una técnica de cribado, son cuestiones importantes. La presencia de falsos positivos y el aumento de la incidencia de cánceres radioinducidos son también algunos de las mayores incertidumbres. Por ello, es necesario encontrar un equilibrio entre las estrategias preventivas para mujeres con alto riesgo de padecer cáncer de mama y aquellas con menor riesgo [81].

La mamografía digital, mamografía de contraste, tomosíntesis, ecografía y RMN son las técnicas radiológicas más frecuentes. La mamografía digital es la técnica de cribado habitual [82].

La RMN muestra una mayor sensibilidad por lo que es habitual emplearla, en conjunto con el resto de las técnicas, para el cribado de mujeres de alto riesgo, por ejemplo, en pacientes portadoras de mutaciones del gen *breast cancer gene* (BRCA) [83]. La tomosíntesis, capaz de crear imágenes tridimensionales de la mama en comparación con imágenes bidimensionales de la mamografía clásica, ha ido complementando y desplazando en los últimos años a esta última, a pesar de que muestra algunos inconvenientes: mayor tiempo de interpretación, mayor dosis de radiación, mayor coste y sobrediagnóstico [82]. La tomosíntesis sí ha mostrado cierta mejora en la detección del cáncer de intervalo (el que se origina entre dos pruebas de cribado) [84]. La mamografía de contraste valora la neovascularización tumoral a través de un contraste basado en yodo y la atenuación de los rayos X respecto al yodo y a los tejidos blandos mamarios [85]. Muestra valores estadísticos similares a los de RMN [84], por lo que es considerada por algunos autores como una candidata a ser la técnica inicial de cribado. Aunque su incidencia es menor, el cribado de cáncer de mama en hombres no existe en nuestro medio.

Para clasificar los resultados radiológicos se desarrolló el sistema BI-RADS por el American *College of Radiology*. Se expone en la tabla 5 las categorías recogidas en su 5ª Edición:

Tabla 5. Categorías BI-RADS 5ª Edición.

BI-RADS	Significado	Riesgo de malignidad
0	Estudio no satisfactorio, se aconseja repetir.	No procede
1	Mama normal.	0%
2	Benigna, probabilidad de cáncer similar a la población general.	0%
3	Hallazgos probablemente benignos.	0-2%
4	Probablemente maligna (requieren biopsias). <ul style="list-style-type: none"> • Categoría 4A: Baja sospecha de malignidad. • Categoría 4B: Sospecha intermedia de malignidad. • Categoría 4C: Sospecha elevada de malignidad. 	>2-10% >10-50% >50%-95%
5	Altamente sugerente de malignidad.	>95%
6	Malignidad confirmada histológicamente.	100%

1.10.2. Toma de muestra citológica e incisional

La obtención de material para estudio anatomopatológico puede realizarse a través de: punción aspiración con aguja fina (PAAF), biopsia gruesa (BAG) o biopsia asistida por vacío (BAV).

1.10.2.1. PAAF

La PAAF es una técnica de obtención de muestra citológica rápida, fácil de ejecutar, sin complicaciones relevantes, rápida de ver y de coste muy reducido. Tiene una sensibilidad superior al 80% y una especificidad de más del 95% [86]. Ganglios axilares o lesiones metastásicas pueden ser estudiadas con esta técnica. Sin embargo, posee una curva de aprendizaje elevada y requiere la necesidad de una correcta correlación con los datos radiológicos. Es de índole terapéutica en lesiones quísticas benignas. Aunque en la práctica diaria se puede realizar sin necesidad de ecografía en lesiones bien delimitadas y superficiales, se aconseja

llevarse a cabo en conjunto con una prueba de imagen, habitualmente la ecografía, para lesiones mal delimitadas, pequeñas y de difícil acceso [87]. Es necesario la presencia de un adaptador (por ejemplo, una pistola de Cameco) que facilite la ejecución de la técnica con una mano mientras la contraria permite limitar el área a puncionar. Una jeringa y aguja (habitualmente entre un calibre 18G-25G) sobre el adaptador, permite succionar células mientras se ejecutan movimiento circulares que aumenten el desprendimiento celular. Tras la extensión del material en portaobjetos, las muestras se tiñen habitualmente con la tinción de Papanicolaou o una tinción de Romanowsky (derivado de la tinción de Giemsa, con nombre comercial Diff-Quick). Fijar material directamente sin extender, lo que se conoce como citología líquida, posibilita llevar a cabo citología en monocapa o bloque celular y con ello efectuar estudios inmunocitoquímicos o moleculares [87].

Similar a la clasificación BI-RADS, existen categorías diagnósticas citológicas: no apto para diagnóstico, negativo para malignidad, atipia, sospechoso de malignidad y positivo para malignidad. La PAAF es una técnica de aproximación diagnóstica que, cuando es sospechosa o positiva para malignidad, requiere técnicas adicionales como la BAG para obtener material que permita la confirmación histológica y la realización de estudios adicionales. Entre las limitaciones de la PAAF encontramos: incapacidad de distinguir entre displasia de alto grado intraductales y lesiones realmente infiltrantes, no permitir la clasificación de lesiones papilares y mucinosas, dificultad para el diagnóstico de lesiones benignas que simulan malignidad (por ejemplo, adenosis esclerosante) y dificultad para diferenciar entre las lesiones benignas.

1.10.2.2. BAG

La BAG, o en inglés conocida como “*core needle biopsy*”, es una prueba diagnóstica incisional en la que se utiliza un dispositivo cargado con un aguja (que actúa en algunos modelos como reservorio) de 12G-14G para la obtención de una muestra anatomopatológica, con una intención principalmente diagnóstica sobre lesiones palpables o no palpables, tanto superficiales como profundas. Debe introducirse el dispositivo cada vez que se toma una muestra. Permite la realización de estudios histoquímicos, IHQ y moleculares (incluyendo estudios de *microarrays*), siendo una herramienta básica en determinación de biomarcadores

previos a neoadyuvancia [88]. Si la PAAF es una técnica de aproximación, la BAG es considerada como la técnica principal de diagnóstico en la patología mamaria.

Similar a la clasificación citológica y BI-RADS existe un sistema de categorías diagnóstica modificado por *Rahka et al* [89]: mama normal (B1), lesión benigna (B2), lesión de incierto potencial maligno sin atipia (B3a), lesión de incierto potencial maligno con atipia (B3b), lesión sospechosa de malignidad (B4), carcinoma in situ (B5a), carcinoma invasivo (B5b) y carcinoma sin poder discernir in situ-infiltrante (B5c).

Muestra mayor sensibilidad y especificidad sobre lesiones formadoras de masa y cierta limitación en lesiones calcificadas, así como, en lesiones de significado de incierto potencial maligno (como lesiones papilares, cicatrices radiales o mucinosas) que requieren mayor cantidad de datos histológicos probablemente no presentes en una biopsia tan pequeña. Algunos autores sostienen que la representatividad de marcadores IHQ puede no ser extrapolables a los de la lesión en totalidad [90]. La biopsia puede ser guiada por: estereoscopia, ecografía y RMN. Las muestras obtenidas, habitualmente entre 2-4 cilindros de 1,5-2 cm, son fijadas en medio formólico y procesadas como biopsias. Al contrario de la PAAF, permite en la mayoría de las ocasiones un diagnóstico definitivo tanto de lesiones benignas como de lesiones in situ o infiltrantes. La especificidad de esta técnica para lesiones fibroepiteliales o atípicas es mayor en comparación a la PAAF. La BAG muestra un coste por biopsia más elevado que una PAAF, pero menor si nos referimos al coste para obtener un diagnóstico final. Posee una tasa de éxito de >95% [91]. La realización de una impronta citológica con el cilindro de la BAG permite obtener resultados rápidos el mismo día de la toma, similar a los de una PAAF.

Entre las complicaciones encontramos: hematomas, infecciones, síncope vasovagal y neumotórax (el más peligroso siendo más frecuente en biopsias de región posterior). La anticoagulación no es una contraindicación absoluta, sin embargo, se prefiere reducir su dosis, días antes de realizar la biopsia. La compresión posterior del área biopsiada reduce la cantidad de hemorragia [90]. En la evaluación posterior de la pieza, es importante considerar el trayecto y lugar de la biopsia previa, así como las zonas de neoangiogénesis o fibrosis estromal, para evitar errores diagnósticos graves, especialmente relacionados con células aisladas que sugieran infiltración o invasión linfática/ganglionar, fenómeno conocido como “desplazamiento epitelial” [88].

1.10.2.3. BAV

La BAV ocupa un papel alternativo a las biopsias quirúrgicas o con arpón en lesiones mamarias no palpables habitualmente con microcalcificaciones [92]. Similar a la PAAF, mediante el vacío como fuerza de extracción y agujas de calibre entre 9G-11G se obtiene muestras incisionales que son fijadas en medio formólico y procesadas como biopsias lo que posibilita estudios IHQ y moleculares.

A lo largo de los años se han desarrollado diferentes equipos de extracción BAV que difieren en: método de recogida de la muestra, en la necesidad de recolocación del dispositivo tras cada disparo o en el diferente grosor de las agujas [93]. El uso de BAV requiere de la asistencia por imagen (estereoscopia, ecografía o RMN) lo que plantea diferentes aproximaciones. Al extraer más material que BAG y PAAF, sobre todo en lesiones blandas, la tasa de falsos negativos se asemeja a las biopsias quirúrgica guiadas con arpón [94]. Puede emplearse como método de resección de lesiones benignas de hasta 12 mm de tamaño y hasta 20 mm de diámetro [95].

Similar a la BAG encontramos riesgos de sangrado, infección y dolor. Un inconveniente importante es su mayor precio en comparación con una técnica de similar capacidad diagnóstica, como la BAG. Sin embargo, si consideramos su coste-efectividad global, algunos dispositivos BAV resultan ser más eficientes [96]. Entre sus ventajas respecto a la cirugía guiada por arpón encontramos: menor tiempo de respuesta, reducción de defectos estéticos y mayor tolerabilidad por las pacientes.

1.10.3. Pruebas de determinación de expresión genética

En países occidentales el uso de las llamadas “pruebas de perfil de expresión genética” se ha ido consolidando desde su aparición en la primera década de siglo. Su importancia radica en ser una herramienta previa al inicio del tratamiento, especialmente en el subgrupo mayoritario del cáncer de mama: RE+ y HER2-. Estas pruebas evalúan el riesgo de recurrencia de metástasis mediante una puntuación final, a través de un análisis genético de diversos genes relacionados con la cancerogénesis, principalmente genes de proliferación y metástasis. Dentro del ámbito actual de la medicina personalizada, pueden implicar cambios en la indicación de tratamientos neoadyuvantes o adyuvantes. Existen numerosas

pruebas disponibles con una gran variabilidad en los genes estudiados [97]. La mayoría de ellas permiten el uso en muestras parafinadas. En la clínica diaria se disponen de las siguientes pruebas: MamaPrint™, OncotypeDx, Prosigna, EndoPredict, Breast Cancer InDex y Genomica Grade Index. En nuestro medio los más utilizados son: OncotypeDx y Mamaprint™.

Mamaprint™ (*Agendia, Países Bajos*) es una herramienta de evaluación de riesgo de recurrencia a 10 años basado en el estudio de 70 genes [98] mediante técnicas de micromatriz de ADN o *microarrays* (en muestras parafinadas y en fresco) validado con el ensayo aleatorizado prospectivo *Microarray in Node-Negative Disease May Avoid Chemotherapy* (MINDACT), con un nivel de evidencia 1a [99]. Se puede obtener un resultado dicotómico de “alto riesgo” o “bajo riesgo”, que actúa como un factor independiente para la metástasis a distancia. Se utiliza tanto antes del tratamiento, como herramienta para evaluar una desescalada terapéutica en pacientes con: RE+, HER2-, tamaño tumoral <5 cm, ganglios linfáticos negativos o entre 1-3 ganglios linfáticos positivos. Cabe mencionar que la utilidad de la prueba en casos de diagnóstico de metástasis regional es algo discutido en la literatura. También se aplica en el cáncer de mama temprano. Un resultado “bajo riesgo”, a tenor de otras variables clínicas o tumorales, apoyaría el no uso de quimioterapia sistémica como se refleja en los resultados MINDACT, al obtener una tasa de supervivencia libre de metástasis a distancia a 5 años del 95,1%, a pesar de que clínicamente todos los pacientes a estudio poseían datos de alto riesgo [99]. Análisis estadísticos permitieron obtener una categoría “ultra bajo riesgo” donde la supervivencia libre de metástasis a los 8 años alcanzaba el 95-98% [100].

Desarrollado originalmente para evaluar el riesgo en pacientes con menos de 55 años, en la actualidad otros estudios clínicos se están llevando a cabo para la validación en otras edades o con ciertas características particulares [101]. Cabe recordar que esta prueba parece carecer prácticamente de valor para otros tipos de carcinoma y/o tumores RE negativos y HER2 positivos, aunque existe evidencia que la prueba Mamaprint™, muestra una capacidad pronóstica en pacientes con carcinoma infiltrante independientemente de: expresión de RH, estado de HER2 y afectación ganglionar [102]. Ante un resultado “alto riesgo” se aconseja considerar un tratamiento neoadyuvante [103].

OncotypeDx® (*Genomic Health, Redwood City, CA, EEUU*) es una prueba basada en tecnología PCR (*polymerase chain reaction*) en tiempo real, donde se

examinan 21 genes (16 asociados a proliferación, invasión, estrógenos, HER2 y otros 5 genes de referencia) a través de tejidos parafinados originalmente en mujeres que habían recibido tratamiento con tamoxifeno. Evalúa el riesgo de recurrencia a distancia a los 10 años en pacientes con: RE+, HER2-, cáncer mamario temprano, ganglios linfáticos negativos o positivos si son entre 1-3. También se considera un factor pronóstico independiente en pacientes con RE+ y ganglios linfáticos negativos que reciben tratamiento con hormonoterapia. Se ha validado con el ensayo clínico TAILORx [104], y sigue siendo estudiado con el ensayo clínico RxPonder. Este último notificó que el tratamiento con quimioterapia más hormonoterapia era beneficiosa en mujeres premenopáusicas independientemente de la puntuación final.

El resultado final de esta prueba se da con un puntuación que varía entre 0-100 puntos y se clasifica en: “riesgo bajo” entre 0-17 puntos, “riesgo intermedio” entre 18-30 puntos y “alto riesgo” ≥ 31 puntos. El riesgo asociado era del 7%, 14% y 30% respectivamente. Esta prueba tiene un nivel de evidencia 1a para estratificar el beneficio de la quimioterapia, combinando el puntaje de la prueba con la edad de la paciente [105].

Un resultado de “bajo riesgo” parece vincularse con un pronóstico similar a un estadio T1a-b N0 M0 [106]. Sea cual sea la plataforma elegida, la realización de pruebas de perfil genético se considera un pilar fundamental en la medicina de precisión actual, para evitar tratamientos potencialmente tóxicos en pacientes que no van a tener un beneficio potencial [107].

1.11. TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA

1.11.1. Introducción

El tratamiento del cáncer de mama es multidisciplinar. Tras un diagnóstico, habitualmente por imagen y confirmado con biopsia, se procede a calcular el riesgo considerando: edad, menarquia, número de partos, historia familiar de cáncer de mama, alteración del gen *BRCA1/BRCA2* y presencia de atipia de alto grado. En el presente existen webs que facilitan esta valoración, como por ejemplo: <https://bcrisktool.cancer.gov/calculator.html> desarrollada por el *National Cancer Institute* (NIH).

La realización de mastectomía bilateral profiláctica [108] puede ser planteada como medida preventiva en pacientes con alto riesgo y con mutaciones del gen *BRCA*. De similar manera, la utilización de moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM) e inhibidores de la aromatasa, pueden emplearse para reducir el riesgo en pacientes postmenopáusicas, y solo con tamoxifeno, en casos de premenopáusicas. Se estima necesario la determinación para una correcta estratificación y planificación del tratamiento de: RE, RP, HER2, tamaño tumoral, existencia de afectación ganglionar y metástasis. La determinación del subtipo molecular resulta imprescindible en la elección del tratamiento [109]. Se comentará a continuación de forma resumida las diferentes tratamiento según el estadio [110]:

- **Estadio 0.** Incluye al carcinoma ductal in situ. Se tratan habitualmente con tumorectomía más radioterapia dependiendo del grado histológico y márgenes, o con mastectomía. Posteriormente, si RE fuese positivo se valorará la administración de hormonoterapia durante 5 años.
- **Estadios I-III.** Comparten en común la ausencia de metástasis a distancia. Para calcular el riesgo, se utilizan ensayos moleculares que evalúan genes asociados a un peor pronóstico. Los tratamientos disponibles son: tratamiento neoadyuvante quimioterápico, cirugía, tratamiento adyuvante (tanto quimioterápico como radioterápico), hormonoterapia e inmunoterapia. La elección de uno u otro se modifica según el riesgo y estadio del paciente. En los estadios III se aplica esquemas de neoadyuvancia en aras de reducir el tamaño tumoral, sobre todo en los inicialmente inoperables, previo paso a una mastectomía posterior. En cuanto al tipo de cirugía, se considera principalmente el tamaño tumoral para adaptar la técnica y lograr una resección macroscópica total. Tras la cirugía, la radioterapia se suele emplear en pacientes con alto riesgo, ganglios positivos y aquellas tratadas con mastectomía simple. La hormonoterapia se reserva para tumores RE positivos, con una duración de 5 años y bloqueo ovárico simultáneo. Posteriormente se administrará según estado fértil durante otros 5 años. En los estadios I y II, conocidos como estadios con “cáncer invasivo temprano”, la realización de ganglio centinela es lo habitual. En el estadio III se efectúa una resección ganglionar axilar.
- **Estadio IV.** En este estadio la enfermedad ha dejado de estar localizada y presenta metástasis a distancia. La intención no es curativa sino la de

prolongar el tiempo de vida con la mejor calidad alcanzable. Por ello, el tratamiento quirúrgico o radioterápico sobre el tumor primario se limita a reducir la carga tumoral, tras la utilización previa de esquemas de quimioterapia complementados con hormonoterapia e inmunoterapia.

1.11.2. Quimioterapia

Dependiendo del estadio y riesgo específico del cáncer de mama la utilización de uno u otro antineoplásico varía. A continuación, se presentan las principales familias y mecanismos de los fármacos habitualmente utilizados:

- **Antraciclinas.** Son productos glicosilados derivados de las bacterias del género *Streptomyces*. Inhiben la replicación del ADN a través de varios mecanismos básicos: bloqueo de la topoisomerasa (TOP), desequilibrio del estrés oxidativo, la modificación de la interacción habitual de histona-ADN y la intercalación en el ADN. La cardiotoxicidad es el efecto secundario más temido que limita su uso.
- **Taxanos.** Los fármacos antineoplásicos obtenidos de plantas del género *Taxus*, como el tejo, actúan bloqueando la división celular al impedir la despolimerización de los microtúbulos de las subunidades beta-tubulina, lo que lleva a la acumulación de microtúbulos estables. Son capaces de unirse al receptor tipo peaje 4 (TLR-4) estimulando una cascada de señales. Además, han demostrado producir una reducción de la angiogénesis y una modificación del estrés oxidativo celular, fenómenos que potencian su efecto antineoplásico. Paclitaxel y docetaxel, son los dos fármacos más utilizados. La neuropatía periférica es un efecto secundario habitual. Otros efectos secundarios son: neutropenia, mucositis, alopecia y alteraciones de la presión arterial. Al igual que otros fármacos antineoplásicos, existen mecanismos de resistencia que reducen su eficacia tanto en el tratamiento actual como en futuros tratamientos con los mismos u otros fármacos [111].
- **Quelantes**
 - El cisplatino es una sustancia que, tras el desplazamiento de una molécula de cloro en un proceso intracelular llamado acuación, es capaz de reaccionar con sustancias nucleófilas formando puentes covalentes con las bases de purina. Esto produce daño sobre la cadena de ADN [112], bloquea la actividad y división celular, y

como resultado induce la apoptosis. Otros mecanismos de daño celular incluyen: alteración del sistema de regulación del estrés oxidativo y la disrupción de la homeostasis del calcio con afectación mitocondrial [113].

- La ciclofosfamida es un profármaco que requiere activación química y enzimática por parte de las fosfamidasa, enzimas que se encuentran en mayor proporción en las células tumorales. Una vez que la ciclofosfamida entra en el citoplasma celular, la fosfamidasa rompe un enlace fósforo-nitrógeno, liberando una mostaza nitrogenada responsable de la toxicidad del fármaco [114]. Las mostazas liberadas se unen entonces a las moléculas nucleófilas de las bases nitrogenadas del ADN. De manera similar al cisplatino, se formarán enlaces covalentes que crearán puentes intrahebra y con otras hebras de ADN, lo que finalmente impide la replicación celular. La aplasia medular es uno de sus efectos secundarios más frecuentes y es dependiente de la dosis. Otros órganos afectados son: el corazón (perimiocarditis necrotizante en empleos de dosis elevadas o supresión de la función cardiaca izquierda en dosis más bajas), las gónadas (amenorrea) y la vejiga (cistitis hemorrágica). Además, es importante saber que también es una sustancia cancerígena, asociada a una mayor incidencia de leucemia, cáncer de vejiga y cáncer de piel [114].

1.11.3. Hormonoterapia

Para la elección de este tratamiento es necesario la determinación de RE. Las vías que permiten el bloqueo estrogénico son:

- **Inhibidores de la aromatasa.** La aromatasa (CYP19) es una enzima del citocromo p450 localizada en el retículo endoplasmático liso con una función monoxoginonasa (aromatizar), que actúa sobre andrógenos precursores. Esta enzima está sobreexpresada en el cáncer de mama [115]. Su bloqueo impide el paso de androstenediona a estrona, y de testosterona a estradiol, lo que da como resultado una reducción efectiva de estrógenos. Anastrozol, exemestano y letrozol son los fármacos más utilizados.

- **Moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERM).** Actúa uniéndose competitivamente al receptor de estrógenos, pudiendo actuar tanto como agonista como antagonista. El mecanismo de acción de SERM varía según: tipo de ligando, subtipo de RE, distribución en tejidos y otros factores de acoplamiento específico [116]. La unión del SERM provoca un cambio conformacional en el RE, diferente al inducido por la unión de la hormona endógena. Tamoxifeno y raloxifeno (menos utilizado) son los principales exponentes de este grupo. El tromboembolismo y el aumento de incidencia del cáncer de endometrio (debido a su efecto agonista en este tejido) son los dos efectos secundarios más temidos, lo que requiere un seguimiento durante y después del tratamiento [117].
- **Reguladores a la baja selectivos del receptor de estrógenos (SERD).** Su mecanismo de acción es similar al de los SERM, ya que también actúan de manera antagonista y competitiva sobre el receptor de estrógenos. Sin embargo, además, produce una desestabilización y degradación del receptor de membrana. El principal representante es el Fulvestrant, que ha demostrado tener un efecto de degradación proteosomal dependiente de la dosis, especialmente en cánceres con mutación en el gen *ESR1*, relacionado con la resistencia al tratamiento hormonal. Nuevas generaciones, como el Elacestrant, ya permiten una administración oral [118].
- **Otros.** Agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (Gn-RH) y agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LH-RH) bloquean la secreción ovárica de estrógenos [117]. La ooforectomía es una opción en desuso.

La resistencia de novo o adquirida en la terapia hormonal es recurrente. La activación de la vía mTor, quinasas dependientes de ciclina 4 y 6 (CDK4/6) y fosfoinositol 3-quinasas (PI3K) son los principales mecanismos de resistencia descritos. El cambio de grupo de hormonoterapia permite continuar con este tratamiento, aunque su efectividad se ve reducida, especialmente si ya existen mecanismos de resistencia previos [119]. El uso de inhibidores como everolimus, palbociclib y alpelisib ayuda a mantener la hormonoterapia [120].

1.11.4. Inmunoterapia

Estas terapias se fundamentan en la estrecha relación que existe entre el microambiente inmunológico y el tumor. Los principales herramientas de inmunoterapia utilizadas son [121]:

- **HER2.** La determinación de la sobreexpresión proteica HER2 es el principal requisito para la aplicación de este tratamiento. Los anticuerpos monoclonales contra HER2, como el pertuzumab y trastuzumab, son las principales terapias adyuvantes y más utilizadas en el subtipo molecular HER2+, aunque pueden ser utilizados en otros subgrupos [110]. Trastuzumab se une a homodímeros de HER2 y pertuzumab impide la formación de heterodímeros de HER2/HER3. Trastuzumab está actualmente aprobado en: cánceres metastásicos; en esquemas de neoadyuvancia en conjunto con taxanos y pertuzumab para enfermedad localmente avanzada o de alto riesgo; y en esquemas de adyuvancia en combinación con taxanos o en monoterapia si se alcanza la respuesta completa patológica (RCP). Pertuzumab está indicado en: cáncer metastásico como primera línea de tratamiento combinado con taxanos y mantenimiento con trastuzumab; en esquema de neoadyuvancia en combinación con taxano y trastuzumab; y en terapia adyuvante en combinación con trastuzumab en casos de ganglios regionales positivos o en pacientes con alto riesgo metastásico [122]. Otros fármacos, como el lapatinib y el neratinib, son inhibidores irreversibles de la tirosina quinasa que bloquean tanto HER2 como otros receptores de factores de crecimiento. Su principal empleo es en el tratamiento adyuvante en pacientes con HER2+ y RH+. Se siguen desarrollando nuevos anticuerpos HER2, como los biespecíficos, que son capaces de unirse a diferentes epítomos y dominios simultáneamente, optimizando así el bloqueo producido [122].
- **PD-1/PD-L1:** El receptor de muerte programada (PD-1) y su ligando (PD-L1) actúan como un mecanismo inmunológico capaz de controlar la proliferación celular. Su utilización es más relevante en tumores con aumento de linfocitos intraepiteliales (en inglés, *Tumor-infiltrating Lymphocytes*, TILs). PD-1 es una proteína expresada en la membrana celular de los linfocitos T estromales. La unión con su ligando, en nuestro contexto en las células tumorales, funciona como el “apagado de un interruptor”,

evitando así la apoptosis celular. Las células tumorales disponen de un incremento de este ligando en su superficie lo que provoca un descenso de la muerte celular programada. Tenemos dos enfoques para modificar esta vía: la activación directa de PD-1 con fármacos como pembrolizumab y nivolumab o el antagonismo de PD-L1 mediante atezolizumab o avelumab.

- **PARP-1.** La poli (ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP-1) actúa también sobre el microambiente inmune. Su principal función es la modificación de la arquitectura cromatínica y los mecanismos de reparación del ADN. Su bloqueo suele asociarse con la administración conjunta de fármacos anti-PD-L1 para lograr un efecto sinérgico [123].
- **Inhibidores MEK** (proteína quinasa quinasa activada por mitógenos). MEK forma parte de la ruta de señalización intracelular de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), que induce la apoptosis y la proliferación celular. La inhibición de MEK aumenta la expresión de los complejos mayores de histocompatibilidad clase I y II, así como de PD-L1 en tumores TN [121].
- **CTLA-4** (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*). Se une brevemente a CD80/86, proporcionando una retroalimentación negativa durante la primera fase de la respuesta inmune. Tremelimumab e ipilimumab son dos inhibidores de esta vía [121].
- **Inhibidores CDK4/6.**

1.11.5. Radioterapia

El papel actual de la radioterapia en el tratamiento del cáncer de mama se basa, en la mayoría de los casos, en la adyuvancia tras cirugía conservadora. A lo largo de las últimas décadas, los esquemas de tratamiento han tendido hacia un hipofraccionamiento extremo. Los dos esquemas de tratamiento más habituales son: irradiación parcial acelerada de mama (APBI) y la radioterapia hipofraccionada externa (RHEMA) con o sin sobreimpresión.

APBI alcanza una dosis total de 30 Gy en 5 fracciones a días alternos. Se recomienda su utilización según la *The Groupe Européen de Curiethérapie (GEC) and the European Society for Radiotherapy & Oncology (ESTRO)*, GEC-ESTRO, cuando: mujeres de >50 años sin mutación *BRCA*, en tumores NOS u otros subtipos, márgenes de resección negativos de al menos 2 mm, Tis o T1 <2 cm, subtipo

molecular TN, RE+, invasión linfática y vascular negativa, componente in situ pequeño con grado nuclear bajo o intermedio, unicéntrico y unifocal [124].

El esquema RHEMA administra una dosis total de 26 Gy en 5 sesiones a días consecutivos, con un incremento de hasta 29 Gy si es necesario una sobreimpresión. Con criterios menos exigentes que APBI, se plantea tras cirugía conservadora ante tumores: pT1-pT3, N0/M0. Se consideran como criterios de exclusión: el embarazo, la lactancia, presencia de márgenes positivos, estadio T4 o N+ [125].

Las guías actuales recomiendan la administración de un plan de tratamiento con una dosis total de 40,05 Gy, incluyendo tanto la mama como niveles axilares, en 15 fracciones. De forma residual, es aceptable alcanzar valores totales 48 Gy a través de la sobreimpresión.

El papel de la protonterapia en el cáncer de mama es más limitado y sin utilidad actual en la literatura. Su principal beneficio sería la reducción de la toxicidad a órganos adyacentes, como el corazón, o el tratamiento de lesiones de pequeño tamaño [126].

La radioterapia intraoperatoria de mama (RIO) consiste en la administración de una única dosis de entre 10-20 Gy sobre el lecho tumoral inmediatamente después del procedimiento quirúrgico, dependiendo del resultado intraoperatorio del ganglio centinela. Existen diferentes aplicadores disponibles en el mercado. Con RIO se alcanzan dosis efectivas mayores que las conseguidas mediante esquemas de radioterapia externa fraccionada. La escasa adherencia a otros tratamientos y la reducción del coste total del tratamiento al administrarse junto a la cirugía son las principales ventajas de esta técnica [127].

En la enfermedad oligometástasica se puede emplear la radioterapia corporal estereotáctica (SBRT). En la actualidad se están llevando ensayos clínicos que valoran la sinergia de esta técnica con la inmunoterapia. Por último, la SBRT puede ser utilizada como tratamiento paliativo sobre lesiones dolorosas, sangrantes o limitantes [126].

1.11.6. Cirugía

La mastectomía radical (Halsted, 1852-1922) consiste en la extirpación de toda la glándula mamaria, incluyendo los músculos pectorales mayores y menores, así como la piel y la grasa axilar completa (Nivel I-III Berg). Debido a su agresividad,

en la actualidad sólo se reserva para casos de cáncer avanzado con afectación de la musculatura pectoral. Posteriormente, se desarrolló una modificación de esta técnica, conocida como la mastectomía radical modificada, que se diferencia por el respeto del pectoral mayor. Sin embargo, otros autores, como Madden y Auchincloss, abogaron por respetar también el pectoral menor para facilitar la linfadenectomía. La supervivencia global se demostró no estar modificada por la resección del pectoral mayor.

La extirpación solamente de la glándula mamaria se conoce como mastectomía simple. Una modificación de ésta es la mastectomía ahorradora de piel [128], que con el objetivo de facilitar una reconstrucción, se aboga por conservar la piel y el surco submamario, aunque se reseca el CAP. La mastectomía ahorradora de piel total es similar a la anterior, pero se conserva la epidermis y la dermis del CAP, con resección de la porción distal de los galactóforos [129].

Respecto a la linfadenectomía axilar, siempre se incluyen los niveles I y II de Berg, sólo reseándose el nivel III en caso de afectación macroscópica del nivel II. El enfoque oncoplastico en la cirugía actual contribuye a una mejor recuperación psicológica de las mujeres. El tipo de cirugía variará según el tamaño y la localización exacta del tumor. Para una correcta planificación, se debe realizar una segmentación externa de la mama y considerar los siguientes elementos para lograr el mejor resultado estético: las áreas habitualmente expuestas, el aumento de la sensibilidad en el área del CAP después de la cirugía, la distribución heterogénea de la grasa y el contorno de la mama [129]. Una revisión sistemática sobre la cirugía de mama asistida por robot concluyó que esta técnica es factible y segura, con menores costes, menor tiempo quirúrgico y menos dolor en las primeras 24 horas [130].

1.12. INMUNOHISTOQUÍMICA BÁSICA DE LA MAMA

El panel básico tanto para diagnóstico como pronóstico realizado en nuestro centro consiste en las siguientes técnicas:

- CK19
- p53
- BCL2
- RE y RP

- HER2
- Ki67

1.12.1. CK19

La CK19 es una queratina de bajo peso molecular (40 kDa) expresada de forma citoplasmática en tejidos simples y complejos. Es una proteína con relativa importancia al asociarse con el dominio de unión de la distrofina y con otros filamentos intermedios, como la co-expresión conjunta con CK8 para la formación de filamentos [131]. En la patología mamaria, su expresión indica que estudios moleculares posteriores, como el análisis del ganglio centinela mediante *One Step Nucleic Acid Amplification* (OSNA), son técnicamente posibles.

1.12.2. p53

La proteína nuclear p53 pertenece a la familia de proteínas supresoras de tumores. Se encuentra localizada en el cromosoma (chr) 17p13. El funcionamiento habitual de esta proteína es promover la reparación de daños en el ADN antes de la división mitótica. Otras funciones son: el arresto celular, cambios en el metabolismo e incluso la inducción de la apoptosis celular. Su principal regulador es la proteína MDM2, que a través de mecanismos de ubiquitación promueve su degradación.

Su expresividad en tejidos normales no tumorales suele ser la de positividad parcial y focal de tipo nuclear. En cambio, en patología tumoral se aprecia tanto una expresión aumentada (rara vez en la totalidad de las células), una pérdida total de expresión ("*null type*") o una expresión habitual ("*wild-type*").

Es la proteína tumoral más frecuentemente alterada en el cáncer de mama [132]. Estudios recientes para nuevas dianas terapéuticas se centran tanto en p53 como de otras con influencia sobre ella, aunque han mostrado resultados limitados [133].

1.12.3. BCL2

BCL2 es una proteína de 25 kDa de peso molecular y de tipo proto-oncogénica, localizada en el chr 18q21.3. Se expresa en la membrana interna

mitocondrial, en el retículo endoplasmático y en la envoltura nuclear. En células normales, su principal función es prevenir la apoptosis, lo cual es vital en algunos tejidos, como en los centros germinales de los ganglios linfáticos, donde ocurre la exposición al antígeno y la diferenciación celular hacia células productoras de inmunoglobulinas, principalmente células B memoria.

Su mutación, frecuentemente asociada a la translocación t(14,18)(q32;q21) en relación con el gen *IgH*, produce su sobreexpresión en células tumorales proporcionando un mecanismo antiapoptótico fundamental en la carcinogénesis.

En la patología tumoral mamaria se ha determinado que BCL2 actúa como un marcador pronóstico independiente en carcinomas luminales A [134], así como, un factor de pronóstico desfavorables en cánceres TN o RH- y favorable en RH+ [135].

1.12.4. Receptores de estrógeno y progesterona

Existen dos RE, el receptor alfa de 67 KDa (chr 6q25.1) y el receptor beta de 59 kDa (chr 14q23.2). La principal diferencia entre ellos radica en que el receptor beta tiene un dominio amino terminal más corto. Ambos muestran tres dominios: el dominio NH₂-terminal, el dominio de unión al ADN y el dominio de unión al ligando terminal COOH. El dominio de unión al ADN, principal ejecutor de la función muestra una similitud muy elevada entre ambos tipos de receptores, con una semejanza de aminoácidos superior al 95% [136]. El receptor predominante en la mayoría de los tejidos es el receptor alfa. Ambos se localizan en el núcleo y muestran diversos dominios funcionales.

Los estrógenos, u hormonas femeninas primarias, incluyen a cuatro hormonas naturales: estradiol, estrona, estriol y estretol. Todas ellas son esteroides liposolubles, lo que les permite atravesar libremente la membrana celular y alcanzar los receptores, que se encuentran principalmente en el núcleo celular. Su unión provoca la formación de un dímero del receptor, que se une a secuencias específicas llamadas “elementos de respuesta a hormonas”, situadas cerca del promotor de un gen, regulando así su expresión. Su estimulación promueve el desarrollo del tejido mamario, pero su activación continua promueve la génesis tumoral y progresión hacia al cáncer de mama [136]. Fuera del tejido mamario, su

función es variada, desde estimular la formación y la resorción ósea, hasta modificar el metabolismo de la glucosa y los lípidos.

En el tejido mamario, se expresan en células luminales con una variabilidad en su expresión típicamente baja (10-20%), pero nunca negativa ni del 100%. Ambos extremos pueden observarse en patología tumoral, y su expresión generalizada también se utiliza para diferenciar lesiones in situ (hiperplasia ductal sin atipia versus hiperplasia ductal con atipia). Su expresión se correlaciona con una mejor respuesta al tratamiento hormonal y, en su mayoría, con tumores de menor grado que aparecen en mujeres de mayor edad.

El RP posee dos isoformas, A y B, ambas codificadas en el chr 11q22. Similar a lo descrito en el receptor de estrógeno, muestra también: un dominio de unión al ADN, un dominio de unión al ligando C-terminal y un dominio amino-terminal compuesto. El RP es regulado por el propio RE, por lo que es necesario la presencia de estrógenos. Entre algunas de sus dianas, produce un aumento de la expresión de RANKL, lo que permite activaciones de cascadas enzimáticas que intervienen en la proliferación, expansión y supervivencia celular [137]. Además, se ha visto relación con una regulación negativa de la expresión de *STAT1* mediante su fosforilación, hecho que se ha relacionado como un método de escape inmunológico tumoral [138]. En términos generales en la patología mamaria, su expresión está estrechamente relacionada con la expresión de estrógenos.

En la actualidad, existen análisis de imágenes computarizadas, validadas por la FDA (la Administración de Alimentos y Medicamentos, en inglés *Food and Drug Administration*), para el conteo automatizado de RE, RP y estudio de HER2. La implementación de estos sistemas, que dependen de la patología digital, está lejos de ser una realidad en la mayoría de los centros. Los estudios al respecto han demostrado una reducción en el error interobservador y una mayor rapidez en el conteo. Sin embargo, siguen señalando la necesidad de control por parte del patólogo en los casos más complejos [139].

En cuanto a su valoración en la patología mamaria, puede determinarse mediante la medición semicuantitativa de la expresión del marcador nuclear en células tumorales, añadiendo su grado de intensidad en tres posibles categorías: débil, moderada o intensa. La guía proporcionada por la Sociedad Americana de Oncología Clínica y Colegio de Patólogos Americanos (ASCO/CAP, en inglés), para interpretación de las técnicas de estrógeno y progesterona, aconseja que las

muestras tengan una fijación entre 6-72 horas. Los RH, se consideran positivos si están en un rango de 1%-100%, y negativos si la expresión es menor al 1%. Cuando la expresión está entre el 1% y el 10%, se recomienda utilizar el término “positivo débil” [140].

En los últimos años se han desarrollado otros sistemas de cuantificación de expresión de RH. El sistema de puntaje Allred [141] combina tanto el porcentaje de expresión como la intensidad de la misma. Mediante un puntaje para cada una de estas dos categorías, se obtiene una puntuación final basada en rangos. Con una puntuación entre 0-2 puntos, se considera que la expresión de RH es negativa. En cambio, puntuaciones de entre 3-8 puntos determinan una expresión RH positiva (ver tabla 6).

Tabla 6. Sistema de puntaje Allred para la valoración IHQ de RE y RP.

Puntaje de proporción	Rangos de % de expresión	Puntaje de intensidad	Tipo de intensidad de expresión
0	0	0	Ninguna
1	<1	1	Débil
2	1-10	2	Intermedia
3	11-33	3	Fuerte
4	34-66		
5	67-100		

Otros sistemas son menos utilizados. Destaca el puntaje H-Score que se calcula multiplicando el porcentaje de células por su grado de intensidad (calificadas de 0 a 3). Esto permite obtener hasta 300 posibles resultados (entre 0 y 300 puntos), lo que complica su aplicación en la práctica clínica diaria, ya que no facilita la transmisión rápida de la información. Se han desarrollado tablas de equivalencias entre ambos sistemas que permitan emitir informes más comprensibles [142].

Debido a su importancia en la progresión tumoral, se han desarrollado diversas dianas terapéuticas, previamente explicadas, dirigidas a contrarrestar su función. Los principales son: SERM, SERD e inhibidores de la aromatasa [136].

1.12.5. HER2/erbB2

HER2/erbB2 es un receptor del factor de crecimiento epidérmico humano con un peso molecular de 185 kDa. Se presenta como una glicoproteína transmembrana con actividad quinasa. Este oncogén se localiza en el chr 17q12 y pertenece a la familia de factores de crecimiento epidérmico junto a: HER1 (receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR/erbB-1), HER3 (erbB3) y HER4 (erbB4) [143]. Todos ellos muestran un ligando de unión extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular con actividad catalítica para la tirosina quinasa. Si la dimerización ocurre con otro HER2, se denomina homodimerización. Sin embargo, si se realiza con otro miembro de su familia (HER1, HER3 o HER4), se denomina heterodimerización. Una vez dimerizado, y dependiendo del tipo de dimerización y del compañero con el que se realice [144], se produce una cascada de activación aguas abajo que implica la fosforilación de numerosas rutas de señalización intracelular, entre las que se incluyen: la vía Ras/RAF, PI3K y fosfolipasa C. Todo esto da lugar a la generación de señales que participan en la división, adhesión y regulación celular. Se estima que existen más de 100 veces la cantidad normal de copias de este receptor cuando hay una amplificación en células tumorales. El aumento en la cantidad total del receptor, junto con su dimerización, desencadena los pasos fundamentales hacia el crecimiento y la división celular descontrolada.

La interpretación de su sobreexpresión es algo más compleja que el resto de los marcadores descritos anteriormente. Para su interpretación se utilizan las guías ASCO/CAP [145], que están totalmente implementadas en los servicios de Anatomía Patológica. De forma inicial, siguiendo las recomendaciones ASCO/CAP, se debe valorar HER2 mediante IHQ con 4 posibilidades (tabla 7).

La obtención de un resultado equívoco, 2+, hace necesaria la realización de pruebas adicionales. Si no se dispone de otra muestra, se recomienda realizar hibridación in situ (ISH) sobre la misma, o una nueva determinación IHQ o ISH en otra muestra diferente.

Tabla 7. Valoración por inmunohistoquímica de la proteína HER2/erbB2 según las recomendaciones de las guías ASCO/CAP.

Resultado	Criterio
Negativo (0)	No se observa tinción, o sí, pero debe ser una tinción de membrana incompleta de tipo débil o casi imperceptible en menos o igual al 10% de las células tumorales.
Negativo (1+)	Tinción incompleta de membrana que es débil o casi imperceptible en más del 10% de las células tumorales.
Equívoco (2+)	Tinción débil/moderada completa de membrana en más del 10% de las células tumorales o tinción completa de membrana que es intensa, pero en menos del 10% de las células tumorales.
Positivo (3+)	Tinción de membrana completa en más del 10% de las células tumorales.

Para estudio ISH se puede valorar mediante hibridación in situ con plata (SISH) o FISH, empleando una sonda doble, una de ellas que marca una región estable de localización centromérica (habitualmente el centrómero del cromosoma 17, CEP17) y la otra marca el gen *HER2/erbB2* localizado en chr 17q21.1. Se evalúan 20 núcleos tumorales no solapados y se cuantifica el ratio *HER2/CEP17* y el número de copias del gen *HER2* por célula. Las posibles interpretaciones son las siguientes:

- Grupo 1 = ratio *HER2/CEP17* $\geq 2,0$; $\geq 4,0$ señales *HER2/célula*.
- Grupo 2 = ratio *HER2/CEP17* $\geq 2,0$; $< 4,0$ señales *HER2/célula*.
- Grupo 3 = ratio *HER2/CEP17* $< 2,0$; $\geq 6,0$ señales *HER2/célula*.
- Grupo 4 = ratio *HER2/CEP17* $< 2,0$; $\geq 4,0$ y $< 6,0$ señales *HER2/célula*.
- Grupo 5 = ratio *HER2/CEP17* $< 2,0$; $< 4,0$ señales *HER2/célula*.

Una vez asignado un grupo, se debe clasificar finalmente como positivo o negativo, teniendo en cuenta los criterios recogidos en la tabla 8.

Tabla 8. Resultados tras interpretación de ISH en los casos 2+ basado en las guías ASCO/CAP.

RESULTADO FINAL	GRUPO
Negativo	Grupo 5
Negativo con necesidad de revisión de IHQ	<ul style="list-style-type: none"> • Grupo 2 e IHQ 0-1+ o 2+ • Grupo 3 e IHQ 0-1+ • Grupo 4 e IHQ 0-1+ o 2+
Positivo con necesidad de revisión de IHQ	<ul style="list-style-type: none"> • Grupo 2 e IHQ 3+ • Grupo 3 e IHQ 2+ o 3+ • Grupo 4 e IHQ 3+
Positivo	Grupo 1

Los estudios de IHQ, y especialmente los de ISH, pueden fallar debido a que es necesario un cierto grado de conservación del material genético sin una degradación significativa que impida la hibridación de sondas. Por ello, se consideran causas probables de material poco apto cuando: se presentan periodos largos de fijación en formol (más de una semana), se utiliza una fijación basada en medios no formólicos, se emplea descalcificante o el tiempo de incubación con proteasa es insuficiente.

Se estima que HER2 está sobre expresado en un 20-30% de los cánceres de mama y con un peor pronóstico [146]. Por todo lo comentado anteriormente, es normal considerar el bloqueo de este receptor de membrana como una de las líneas terapéuticas en el cáncer de mama, sobre todo en los casos de cáncer de mama con RH-. La utilización de anticuerpos monoclonales, como el trastuzumab, permiten un bloqueo del receptor tanto por daño directo a los dominios extracelulares como por la inhibición del anclaje en la membrana celular [147]. En la actualidad, también existe la posibilidad de bloquear la actividad quinasa con el empleo de lapatinib.

1.12.6. Ki67

Ki67 se considera una de las mejores proteínas para la valoración de la proliferación celular. Su expresión es nuclear y su síntesis ocurre en todas las fases del ciclo celular (figura 10): G1, S, G2 y M, a excepción de la fase G0 (fase de reposo). Esto indica su gran sensibilidad para denotar de forma sencilla y económica la

cantidad de células fuera de la fase de reposo y que, en cierto grado, están disponibles para entrar en la fase de mitosis.

En cuanto a su valoración, en la mayoría de los tejidos siempre se aprecia un cierto porcentaje de expresión, siendo más frecuente y fisiológica en algunos, como en el fondo de las criptas de la mucosa del intestino grueso o en la médula ósea hematopoyética, debido a su alto reemplazo celular. En tejidos maduros, su expresión se circunscribe a las capas basales y proliferativas, con pérdida de expresión en las células maduras.

En la patología tumoral, Ki67 se asocia con una mayor agresividad y crecimiento. En Anatomía Patológica, se cuantifica de forma porcentual, habitualmente en las zonas de mayor expresión. Aunque también se puede valorar la cantidad de mitosis (solo veríamos la fase M del ciclo), ambos conteos se complementan. La proliferación celular se contrapone a la quiescencia celular. En ambos procesos intervienen rutas enzimáticas que mantienen un equilibrio, el cual puede romperse hacia uno de los dos lados. Las proteínas MEKi y CDK4/6 promueven un estado quiescente, mientras que otras proteínas como c-Myc pueden inducir a las células a entrar en fase de mitosis [148].

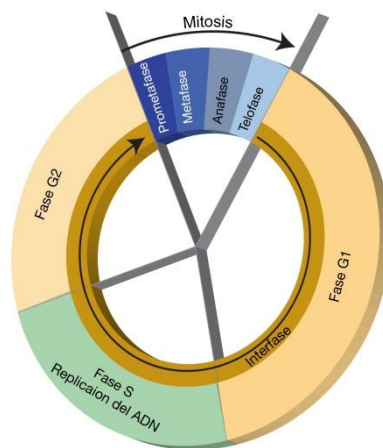


Figura 10. Esquema de las fases del ciclo celular (imagen disponible gratuitamente en <https://www.genome.gov>)

En patología mamaria, este marcador es fundamental para diferenciar entre el tipo luminal A del luminal B, utilizando un punto de corte clásico para Ki67 del 14% [149,150], aunque recientemente se ha estipulado incrementarlo hasta el 20-30% [151,152]. La interpretación, aunque teóricamente sencilla, se complica debido a la falta de una medición completamente estandarizada. Además, el conteo de otras células no tumorales presentes alrededor del tumor puede dificultar la valoración. A pesar de todo esto, es conocida una variabilidad interobservador que provoca que en la actualidad, se estén desarrollando e implementando algoritmos de inteligencia artificial [153], para una cuantificación más ágil y ajustada a la realidad. No se han establecido puntos de corte fuera de la distinción mencionada anteriormente, lo que dificulta su valoración en estudios de terapias neoadyuvantes o adyuvantes.

Además, su menor expresividad, se ha visto como un factor pronóstico de riesgo de recidivas, lo que puede de cierta manera orientar hacia tratamientos adyuvantes más personalizados [154].

1.13. FASCINA

1.13.1. Descripción molecular, función y principales vías de interacción

La fascina (FSCN), del latín *fasiculus*, es una proteína de unión a actina, con un peso molecular de 55 kDa. Pueden formar parte de un sistema poco dinámico, como mecanismos de estabilización sobre bandas de microfilamentos citoplasmáticos que mantienen la rigidez celular. Además, poseen una función más dinámica, localizada en la superficie celular, participando en la formación de proyecciones citoplasmáticas, como los filopodios, así como en otras estructuras citoesqueléticas celulares, tales como pequeñas espiculaciones, lamelipodios e invadopodios. Fue secuenciada por primera vez en la clase equinoideo [155] con un total de 496 aminoácidos. Su función radica en organizar la actina fibrilar a través de un empaquetamiento en haces paralelos con morfología hexagonal, manteniendo una distancia de 11 nm entre filamentos [156]. Con esta unión se consigue un paso fundamental para la creación de protuberancias celulares basadas en actina.

Los filopodios son proyecciones espiculadas citoplasmáticas con forma de “púas”, formadas por filamentos de actina en una disposición paralela y perpendicular a la membrana celular, junto con otras proteínas que permiten su estabilización y regulación. Es por ello, que los filopodios necesitan de una consistencia mínima, un anclaje, que permita que este tipo de tenue prolongación citoplasmática no colapse.

Los modelos existentes estiman la necesidad de al menos 10 filamentos de actina, que permitan vencer a la resistencia de la membrana celular, y que la longitud del filopodio está limitado a un máximo de 10-30 filamentos. La FSCN actúa como un pegamento, una proteína reguladora de este sistema, al conseguir un entrecruzamiento de filamentos de actina entre sí (al menos de 10 filamentos unidos) que consigue proporcionar una mayor rigidez al anclaje (figura 11). Esto permite que los filopodios no colapsen y con ellos todo el proceso de migración celular [157].

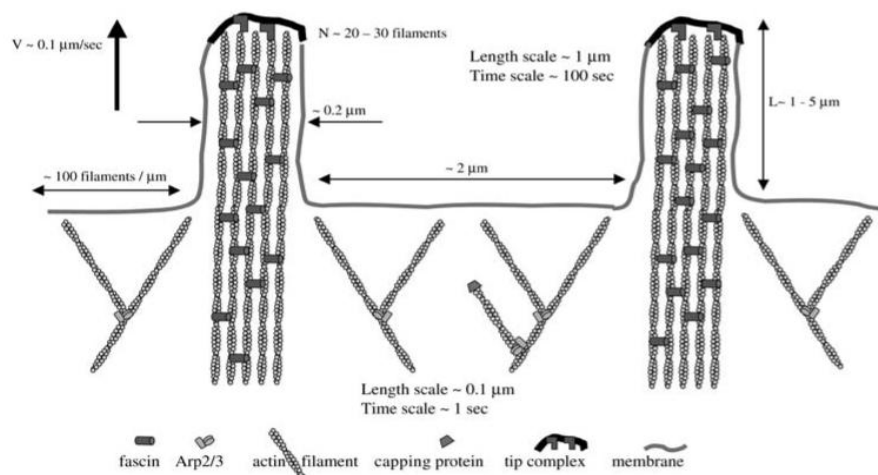


Figura 11. Esquema de la estructura de filopodios. Ilustración obtenida: Mogilner, A., & Rubinstein, B. (2005). The physics of filopodial protrusion. *Biophysical journal*, 89(2), 782–795.

La FSCN se expresa en diferentes tejidos del cuerpo humano, con predilección por células endoteliales y estromales, y en menor medida en células epiteliales. Se diferencian tres tipos de FSCN. La fascina-1 (FSCN1, chr 7p22.1) es la más frecuente, con mayor predilección en el tejido nervioso central y en células dendríticas, especialmente en sus proyecciones citoplasmáticas, que son cruciales para la presentación de antígenos. Esta proteína mantiene una secuencia interespecie bastante conservada, tanto en vertebrados como en invertebrados

[158]. La fascina-2 (FSCN2, chr 17q25), aunque menos común, se expresa con mayor frecuencia en el tejido retiniano. Por otro lado, la fascina-3 (FSCN3, chr 7q31.3) se describe en la literatura como exclusiva del tejido testicular. Las tres muestran una gran similitud en su cadena consenso, hélice y residuo modificado. La FSCN1 participa en procesos de embriogénesis, siendo fundamental para la migración embriológica, así como en la motilidad, inmunidad, reparación y carcinogénesis.

La FSCN1 es regulada mediante la fosforilación de la serina 39 a través de una proteína quinasa C (PKC) [159]. Contrario a lo que podría pensarse, su secuencia no está en relación con otras proteínas de movilidad o unión a actina, como la fimbrina o la alfa actinina. Su unión con la proteína beta-catenina es evidenciada en ensayos de ISH donde el complejo FSCN1-beta-catenina se localizaba en los bordes celulares y en las zonas de unión a célula-célula (sinapsis celular), lo que sugiere su papel conjunto en la movilidad celular. Por lo que existe una estrecha relación entre la vía de señalización de Wnt/ β -catenin y el aumento de expresión de la FSCN1 [160]. La FSCN1 sigue siendo en la actualidad la principal proteína reguladora de los filopodios implicada en la progresión tumoral.

Además de la movilidad, la expresión de FSCN1 muestra un papel clave en la inmunidad, facilitando la interacción entre células. Las células dendríticas, células fundamentales en la presentación antigénica a linfocitos T en ganglios linfáticos, presentan en sus prolongaciones celulares una gran cantidad de FSCN1, lo que favorece la sinapsis celular. Se ha visto que sólo este tipo de leucocito muestra una expresión de FSCN1 relevante, lo que promueve la idea de que la FSCN1 es quizás una proteína básica en la capacidad de presentación antigénica celular [161]. El contacto inmunológico entre ambas células promueve una mayor densidad de FSCN1 en la zona de sinapsis celular inmunológica, así como, en su correcta maduración [161].

La presencia de FSCN1, ocurre en células sanas, pero también se ha demostrado su mayor expresividad en las células tumorales [156,162], por lo que se ha llegado a considerar como un biomarcador de metástasis. Los invadopodios se basan en la estructura básica del filopodio y, por ende, requieren de la capacidad de formación y estabilización de la FSCN1 para generar estas estructuras terciarias celulares [163]. Posteriormente, microtúbulos o filamentos de vimentina hacen aún más estable estas prolongaciones citoplasmáticas. Además, estas prolongaciones citoplasmáticas permiten interactuar con otras estructuras intercelulares como

cadherinas y desmosomas lo que facilita la migración celular [164]. La metástasis ocurre cuando células tumorales son capaces de emigrar de su sitio de origen hacia órganos o tejidos alejados. Por ello, su capacidad de adhesión, movilidad y capacidad de penetración vascular es fundamental para la progresión de la enfermedad tumoral.

El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) es una citoquina que muestra diferentes papeles en la progresión tumoral. En etapas iniciales es un inhibidor del crecimiento tumoral, pero en etapas finales las células tumorales son capaces de evadir ese freno e incluso secretar más TGF- β , lo que favorece la metástasis. Ensayos *in vitro* han demostrado que TGF- β eleva la expresión de FSCN1 y la formación de filopodios en células de morfología fusiforme pero no en las células poligonales [165,166]. Además, la presencia de ARN mensajero (ARNm) de FSCN1 produce una retroalimentación positiva para la formación de novo de TGF- β .

La FSCN1 también muestra la capacidad de modular genes asociados a la metástasis. La regulación negativa del gen *Breast cancer metastasis suppressor 1* (BRMS1) y positiva del gen factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ b), favorece la supervivencia y la división celular [167].

NF- κ B es un conjunto proteico que regula la transcripción del ADN en una estrecha relación con las proteínas REL. De forma basal, se encuentra en el citoplasma en el llamado complejo inhibidor (I κ B). Su activación, ya sea por vía canónica o no canónica, que involucra la fosforilación y degradación proteica, produce la liberación del complejo NF- κ B, permitiendo su unión al ADN nuclear y la activación de genes [168].

BRMS1 (chr 11q13) es un regulador del remodelamiento cromatínico perteneciente a la familia de las histonas. Es un potente supresor tumoral porque interviene en las etapas de metástasis, angiogénesis, apoptosis, reordenamientos del citoesqueleto, reconocimiento inmune; con una relación con EGFR, NF- κ B y quinasas de adhesión focal (FAK). Respecto a estas últimas, ensayos en líneas celulares han notificado que la falta de FSCN1 sensibiliza al tratamiento con quimioterápicos, al aumentar la fosforilación de dichas proteínas respecto a líneas celulares FSCN1-, además de relacionarse estrechamente con un incremento de integrina beta 1 (ITGB1) [169]. La expresión de BRMS1 se asocia a tumores con una

mejor supervivencia global [170]. La vía Notch, identificada como protooncogén en el cáncer de mama, aumenta en situaciones de estrés celular como en hipoxia o ante la elevación de citoquinas inflamatorias. Las células con expresión de FSCN1 manifestaban un crecimiento tumoral más estable respecto a los que no expresaban FSCN1, demostrado al igualar el crecimiento entre ambas al administrar a las primeras un inhibidor (FLI-06) de la vía Notch. Este fenómeno parece responder a una activación sostenida mediante una renovación continua de señales en esta vía, especialmente en células con mayor expresión de FSCN1 [171].

Los invadopodios son capaces de secretar metaloproteasas contra la sustancia fundamental estromal, lo que permite la invasión celular al romper inicialmente la membrana basal. La interacción entre FSCN1 y las metaloproteasas en el frente tumoral se conoce a través de estudios que asocian ambas proteínas entre sí, junto a otros factores de mal pronóstico [172]. Respecto a esto último, se ha estudiado su relación con el ácido linoleico en cultivos celulares, donde se ha denotado una mayor producción de metaloproteasas 2 y 9 (capaces de degradar el colágeno tipo IV, abundante en las membranas celulares) ante la presencia en el medio de dicho ácido, y además una relación directa con la expresión celular de FSCN1 [173].

La relación de la FSCN1 con la progresión del cáncer también se debe, en parte, a su interacción con mecanismos de resistencia a los tratamientos quimioterápicos. En este sentido, se ha demostrado una modulación de la quimioresistencia, como la mayor sensibilidad al tratamiento con doxorubicina en líneas celulares FSCN- respecto a FSCN+, a través de una potenciación de la vía PI3K, lo que resulta en una mayor resistencia a la apoptosis mediante un aumento de la fosforilación de AKT y una menor expresión de PTEN. El aumento de la proteína inhibidora de apoptosis ligada al cromosoma X en líneas celulares FSCN+, sería otra vía de escape a la muerte celular programada [169].

Los receptores citoplasmáticos para trombospondinas y sindecanos permiten una regulación positiva de la FSCN1, en cambio, receptores de fibronectina o vitronectina produce una regulación negativa de dicha expresión. La hipoxia celular, más frecuente en el frente tumoral de tumores sólidos, se relaciona con una sobreexpresión FSCN1. HIF1-alfa tiene como diana a la FSCN1, lo que origina una regulación al alza de esta proteína, similar a la activación de otros genes que participan en la invasión y metástasis [174].

En los últimos años, el papel de la transición epitelio-mesénquima y la transición mesénquima-epitelio ha sido ampliamente estudiado para comprender estos procesos y todos los mecanismos y rutas moleculares involucrados, con el objetivo de encontrar dianas terapéuticas. En el cáncer de mama, el aumento de los niveles de FSCN1 se ha correlacionado con un incremento de los factores de transcripción de la transición epitelio-mesénquima, y viceversa, con factores típicos de la transición mesénquima-epitelio, como GATA3. [175]. GATA3 es un factor de transcripción con dedos de zinc necesario para el desarrollo, embriogénesis y mantenimiento del tejido mamario sobre todo de las células luminales [176]. Su expresión nuclear podría suprimir la actividad transcripcional de la ruta TGF- β -smad y anular la capacidad de SMAD4 para promover la formación de invadopodios, la migración y la invasión celular [175]. Esta anulación se cree que es por interacción entre SMAD4 y sus sitios de unión al ADN.

La expresión de FSCN1 se ha correlacionado con tumores más agresivos y de peor pronóstico y en el caso particular de carcinomas de mama con lo de fenotipo basal-like [177–179].

Se conocen otros papeles relevantes de la FSCN1, más allá de su principal relación con la formación de filamentos de actina. La unión a nesprina-2, una proteína de la envoltura nuclear es fundamental en la cancerogénesis, ya que permite la deformación y el movimiento nuclear [180]. Además, la FSCN1 participa de forma independiente en el mecanismo de liberación citoplasmática celular por vesículas. Su forma fosforilada, localizada en el núcleo, interactúa con diversas proteínas, como histonas y ARN polimerasas [181].

1.13.2. Expresión de FSCN1 en el cáncer de mama

En el año 2000, *Grothey et al* [182], estudiaron la correlación de expresión de FSCN1 con los RH. Para ello, utilizaron 58 muestras de mujeres que no hubiesen recibido quimioterapia ni radioterapia previa. Se clasificaron según subtipo histológico (según 5ª edición WHO) en: 38 carcinomas NOS, 7 carcinomas lobulillares, 7 carcinomas NOS con patrón medular, 2 carcinomas mucinosos y 4 carcinomas tubulares. Se consideró FSCN1+ cuando >5% de las células eran positivas. Si era >50% se le denominó “positivo difuso”. Sus resultados mostraron una correlación significativa de la expresión de FSCN1 con: RH- y tumores no

diploides. De forma contraria no se constató significancia estadística en: estadio tumoral, subtipo histológico, afectación ganglionar, presencia de metástasis, niveles de CEA y CA15.3. Por último, ya en este año estos autores sugirieron que la expresión citoplasmática era mayor en el frente tumoral.

En 2005, *Yoder et al* [183], valoraron la expresividad de HER2, RH, y FSCN1 con *tissue microarrays* en una población de 210 pacientes. El grado de intensidad de la FSCN1 se evaluó mediante una gradación en cuatro variables: 0, 1+, 2+ y 3+. Estas corresponden a: 0 expresión negativa, 1+ expresión débil citoplasmática y membrana, 2+ expresión moderada y 3+ expresión intensa. La forma de evaluar si un caso era positivo es que debía mostrar una expresión al menos 1+ y que afectara al 10% de uno de los dos cilindros valorados. Este estudio sí subdividió por subtipo histológico el cáncer de mama. Por ello, del total de 210 pacientes: 168 (80%) se correspondían con carcinomas NOS, 32 (15,2%) carcinomas lobulillares, 4 (1,9%) carcinomas mixtos, 3 (1,4%) carcinomas mucinosos y 3 (1,4%) carcinomas NOS con patrón medular. Respecto la expresividad de FSCN1 en relación con los RH fue: 11/159 en RE+, 29/51 en RE-, 12/125 en RP+ y 21/85 en RP-.

Sus resultados demostraron una correlación significativa entre la expresividad de FSCN1 con la negatividad para RE y RP, en cambio, para HER2 no hubo correlación. Para ahondar en esta relación, realizaron una doble tinción RE y FSCN1 demostrando una relación inversa de expresividad entre ambas proteínas, tal fue así que, todas las células con expresividad para RE no expresaban FSCN1, y viceversa.

En un seguimiento de 5 años, se observó una clara significación estadística en el periodo libre de enfermedad: los tumores FSCN1+ presentaron un periodo de 74 meses, en comparación con los 100 meses de los tumores FSCN1-. Esta relación también se trasladó a una mayor supervivencia global, así como en grados histológicos mayores. Por ende, la expresión de FSCN1 se reveló como un marcador pronóstico independiente de HER2, PR y el estadio tumoral, pero no para RE o grado tumoral. En este estudio no se reveló una correlación significativa de la expresión de FSCN1 con el tamaño tumoral, invasión linfática ni metástasis.

En 2006, *Rodríguez-Pinilla et al* [184], en un estudio centrado en el cáncer de mama TN sin metástasis ganglionar y expresión de FSCN1, notificó una positividad del 25,1% en este subgrupo específico, que se elevaba al 83,3% en los casos de *BRCA1* y de un 16,7% en casos *BRCA2*. Se demostró su asociación con:

mayor grado histológico, mayor Ki67, mayor expresión de CK5/6; e inversamente con: positividad para RH. No se observó relación con la recurrencia, metástasis, ni con la expresión de HER2 o EGFR.

En 2009, *Gülgün Erdogan et al* [185], valoraron la expresión de FSCN1 en el carcinoma ductal infiltrante de mama. Para ello dividieron su población a estudio en tres grandes grupos: “carcinoma infiltrante con ganglio linfático positivo”, “carcinoma infiltrante con ganglio linfático negativo” y “microinvasión con carcinoma infiltrante de mama con componente in situ extenso”. La expresión de FSCN1 fue de 13/16 (81%), 7/16 (43,7%) y 4/9 (44,4%) respectivamente, mostrando una diferencia estadística entre los diferentes grupos, así como con la invasión linfovascular y el mayor estadio. No se observó relación con el tamaño tumoral, RH ni con la sobreexpresión de HER2.

En 2010, *Xue et al* [186], en un estudio de diferentes tumores en una población asiática china revelaron una positividad de tan sólo el 13,3% para FSCN1 en el carcinoma infiltrante de mama.

En 2011, *Al-Alwan et al* [167], en un estudio in vitro del cáncer de mama revelaron una positividad de FSCN1 en un 40,84% del total de los casos, así como, una correlación estadística significativa de la expresión de la FSCN1 con: subtipo molecular TN, RH-, mayor tamaño tumoral, mayor grado histológico y un menor periodo libre de enfermedad. Además, se observó una inhibición de BRMS1, con una reducción de la expresividad nuclear de este gen supresor tumoral, en relación con una mayor expresión genómica del gen *FSCN1*.

En 2014, *Esnakula et al* [179], analizaron la expresión de FSCN1 en 202 mujeres afroamericanas con carcinomas infiltrantes de mama, sin especificar el subtipo histológico, pero sí el molecular, utilizando *tissue microarrays* y dos observadores independientes. Para cuantificar la intensidad, emplearon un sistema de gradación con las siguientes categorías: 0 para no tinción, 1+ para tinciones débiles de membrana o citoplasma, 2+ para tinción moderada-intensa y 3+ para tinción intensa. Además, en cada caso se anotó el porcentaje de células positivas de forma numérica. Se consideró FSCN1+ si había $\geq 10\%$ de células tumorales con cualquier tipo de tinción citoplasmática (es decir, mayor que la categoría 0). En el estudio, se notificó un 40,6% de positividad para FSCN1 (82/202).

Los análisis estadísticos también mostraron una correlación significativa entre la expresión de FSCN1 y la negatividad para RH, menor tiempo de supervivencia, mayor grado histológico y el subtipo molecular TN (55/77). Además, la FSCN1 se reveló como un factor independiente de pronóstico y diagnóstico. En contraste, la edad, el tamaño tumoral y el estado ganglionar al inicio del estudio no mostraron esta asociación. La relación con el periodo libre de enfermedad fue marginal y no del todo significativa.

En 2015, *Hiromichi Tsuchiya et al* [187], estudiaron la expresión de FSCN1 en una cohorte japonesa de 301 pacientes de tumores primarios mamarios que no habían recibido quimioterapia ni hormonoterapia previo a la cirugía. Para su valoración asignaron a la intensidad 4 variables: 0 para expresión nula, 1 para débil, 2 para moderada y 3 para intensa. En cuanto al porcentaje de expresión, lo hicieron por cuartos de la siguiente manera: 1 para una expresión entre 1-25%, 2 entre 26-50%, 3 entre 51-75% y 4 entre 76-100%. Ambas categorías eran sumadas y se consideró positivo si el *score* combinado era >3 . Bajo esta interpretación, se obtuvo una expresión de FSCN1 en el 56% de los luminales A, 14,3% de los luminales B HER2-, 52,9% de los luminales B HER2+, 31,3% de los HER2 enriquecido y un 81,3% de los TN. Respecto a otros datos analizados, se observó una correlación estadística con la expresión de KI67 y el subtipo molecular TN, pero no con la expresión de CK5/6, la expresión de EGFR, la edad ni el tamaño tumoral.

También en 2015, *Min et al* [188], realizaron un estudio retrospectivo de expresión de FSCN1 mediante *tissue microarrays* en un total de 194 pacientes. Se valoró su expresividad citoplasmática y no nuclear con una gradación en 4 variables siendo: 0 una expresión negativa, 1 débil, 2 moderada y 3 fuerte. A su vez clasificaron esta expresión dependiendo del porcentaje en otras cuatro categorías (0-3): 0-25%, 26-50%, 51-75%, 76-100%. Ambos valores fueron utilizados para realizar un puntaje "*score*" final donde curvas *receiver operating characteristic curve* (ROC) mostraron que el punto de corte de dicho valor se correspondía con un valor <1 para considerar la expresión FSCN1 como negativa, y ≥ 1 para considerarla como positiva. Además, la expresión combinada de FSCN1 fue comparada con p53, Ki67, expresión IHQ de RH y grado de necrosis tumoral.

Con este sistema, se notificó una positividad en 41 de 194 pacientes (21,1%) y una negatividad en 153 de 194 (78,9%). La positividad de FSCN1 se distribuyó según el subtipo molecular de la siguiente manera: 4% en luminal A, 14,3% en

luminal B HER2-, 18,2% en luminal B HER2+, 24,1% en HER2 enriquecido y 69,4% en TN. Se observó una clara significación de la expresión positiva de FSCN1 en los casos TN, pero no para la expresión de HER2 ni en los subtipos moleculares luminal A y B. Además, se correlacionó con una mayor expresividad de p53, mayor grado tumoral, mayor necrosis tumoral, mayor riesgo de recidiva, menor tiempo libre de enfermedad y peor supervivencia global, aunque esta última se limitó al subgrupo de pacientes con un estadio avanzado, especialmente con un mayor pT. Por último, la expresión de FSCN1 se asoció significativamente con la supervivencia global en pacientes con resistencia al tratamiento adyuvante.

En 2016, *Chao-Qun Wang et al* [189], analizaron la expresión de HER2 mediante FISH y de FSCN1 mediante IHQ en una población china de 457 pacientes con cáncer de mama, utilizando muestras de resecciones primarias en parafina y dividiéndolas según el subtipo molecular. La valoración de FSCN1 fue idéntica a la realizada por *Hiromichi Tsuchiya et al*. En cuanto al *score* final, se consideró “positiva para FSCN1” si era ≥ 3 y había al menos un 5% de células positivas, y “fuertemente positiva para FSCN1” si era ≥ 6 con una positividad de al menos 3.

La expresión de FSCN1 se observó en el 31,5% de los casos (144/457), siendo “fuertemente positiva” en el 16,8% (77/457). La distribución según los diferentes subtipos moleculares fue la siguiente: luminal A 12,4% (23/185), luminal B 16,5% (18/109), HER2 enriquecido 38,3% (31/81) y TN 87,8% (72/82). Considerando la categoría única de “fuertemente positiva”, se observó que el 78% de estos casos eran TN. Se comunicó una significancia estadística tanto para la “positividad fuerte” como para la “positividad”. Además, la alta sensibilidad (87,8%) y especificidad (80,8%) de FSCN1 en los casos TN justificaron su valoración como un marcador diagnóstico independiente del subtipo molecular TN, mostrando datos que mejoraron los reportados por *Esnakula et al* dos años antes. Por último, estos autores también sugieren la expresión de FSCN1 como un marcador predictor positivo en la expresión de HER2, especialmente en casos de HER2 2+ que requieren estudios FISH posteriores.

Además en 2016, *Min et al* [190], realizaron una subclasificación molecular del cáncer de mama en una población coreana y estudiaron la probable asociación entre el periodo libre de enfermedad y la supervivencia global con respecto a la expresión de GATA3 y FSCN1. Graduaron tanto la expresión como la intensidad de FSCN1 en 4 categorías, similar a lo realizado por los autores anteriormente

comentados. Estos autores además utilizaron una “puntuación de inmunoreacción” que consiste en multiplicar la categoría de grado de intensidad por la categoría de porcentaje de positividad.

La expresión de GATA3 se asoció con datos de buen pronóstico: ausencia de invasión vascular, ausencia de necrosis, ausencia de metástasis a distancia, menor grado histológico, RH+, ausencia de expresión en TN, menor expresión de p53 y negatividad para HER2. En cambio, la expresión de FSCN1 se relacionó con: mayor grado histológico, mayor necrosis, RH-, mayor expresión en el subgrupo TN y alta expresión de p53. La relación inversa entre la expresión de GATA3 y FSCN1 también fue demostrada estadísticamente, hecho que ya se sugirió en estudios *in vitro* [191].

En 2017, *S.J Yoo et al* [192] notificaron, mediante IHQ utilizando *tissue microarrays* en 107 mujeres, una correlación estadística de la expresión de FSCN1 con el subtipo molecular TN, el riesgo de metástasis linfáticas ganglionares y la relación inversa de la expresión de FSCN1 con RH. Otros parámetros estudiados, como la edad, el grado histológico, el tamaño tumoral y el estadio, no evidenciaron una relación estadística

También en 2017, *Hye Jin Lee et al* [193] estudiaron la expresión de FSCN1, las características histológicas y clínicas, así como la expresión del gen supresor BRMS1 en una población coreana de 183 pacientes. Su estudio reflejó una positividad para FSCN1 del 18% (33/183) y una asociación estadísticamente significativa con: mayor grado histológico, mayor grado nuclear medido por Scarff-Bloom-Richardson (SBR), RH-, ausencia de metástasis ganglionar, negatividad de HER2, menor periodo libre de enfermedad y subtipo molecular TN. En cuanto a la correlación con BRMS1, no se demostró una asociación estadística en este estudio, aunque se observó una tendencia a la expresión inversa de ambos, con una mayor predisposición a que los casos BRMS1 negativos mostraran una expresión positiva de FSCN1.

Otro estudio en 2017 a cargo de *Chao-Qun Wang et al* [194], en una población china de 316 pacientes con un grupo de control de 222 mujeres, analizó la prevalencia y el efecto sobre el riesgo de cáncer de mama de diversos polimorfismos de un solo nucleótido del gen *FSCN1*. Los portadores de los alelos AC+CC o AC de la variante rs56156320, en comparación con el tipo salvaje AA, tenían el doble de riesgo de desarrollar cáncer de mama. Tener un alelo G en la

variante rs3801004 o un alelo T en rs2966447 aumentaba más del doble el riesgo de estadio/metástasis linfáticas en el subtipo luminal A, o casi el doble el riesgo de poseer un mayor SBR en el subgrupo luminal B. Esto evidencia que las mutaciones puntuales en este gen pueden ser extremadamente relevantes para el pronóstico de los diferentes subgrupos. En cuanto a las variables demográficas del estudio, se asoció una mayor edad y el consumo de tabaco, pero no el consumo de alcohol, con un mayor riesgo de cáncer de mama.

En 2019, *Nonni et al* [195], publicaron una cohorte de 127 pacientes cuyos resultados mostraron una relación estadísticamente significativa entre la expresión de FSCN1 y un mayor grado histológico tumoral, una mayor tasa de Ki67, el subtipo molecular TN y un mayor riesgo de recurrencia o muerte. Este último fue más relevante en un periodo de estudio de progresión de enfermedad de 5 años. En cambio, no se halló significación estadística para el estadio tumoral o las metástasis ganglionares. Este mismo grupo investigador, *Tampaki et al* [196], valoró la expresión combinada de FSCN1 y MAP17 (proteína de membrana y en el aparato de Golgi, asociado con aumento de proliferación y menor apoptosis celular [197]). Los resultados asociaron la expresión de FSCN1 con los subtipos TN, un mayor grado histológico, una mayor expresión de Ki67, más recidivas, una mayor expresión de FSCN1 en células endoteliales de neovasos tumorales y una mayor expresión de MAP17 en células tumorales. La correlación de MAP17 fue similar: tumores de mayor grado histológico, mayor expresión de Ki67, mayor expresión en el subgrupo TN y en pacientes con una expresión de FSCN1 en neovasos tumorales. La expresión positiva combinada se correlacionó con un menor periodo libre de enfermedad a 5 años.

También en 2019, *Ata Abbasi et al* [178] en un estudio iraní de 61 pacientes con muestras parafinadas, obtuvieron una expresión de FSCN1 en un 26,2% (16/61). Se consideró positivo cualquier expresión citoplasmática. El estudio mostró una significación estadística de la expresión de FSCN1 con: grado histológico, tamaño tumoral, subtipo molecular y afectación ganglionar inicial; y de tipo inverso para RH. En cambio, no mostraron significación para: el subtipo histológico tumoral, lateralidad tumoral, invasión perineural o linfática, afectación de la piel o pezón, ni para la expresión de HER2 ni de Ki67.

En 2022, *Rani et al* [198], notificaron para una población de 130 pacientes una positividad para citoplasmática para FSCN1 del 69% de los casos. Un 31% del total

de los casos se correspondían con una tinción citoplasmática y de membrana. Además, apreciaron mayor expresión en casos TN con mayor frecuencia para los carcinomas metaplásicos y carcinoma NOS, así como, en los de mayor grado histológico y estadio.

1.13.3. Opciones terapéuticas anti-FSCN1

Las opciones terapéuticas anti-FSCN1 son actualmente considerables y presentan diferentes mecanismos de acción. Aunque algunas de ellas aún están en fase de expansión, otras más antiguas ya han demostrado su efectividad en modelos in vivo. Su principal finalidad como diana antitumoral es la capacidad de inhibir la movilidad y la capacidad metastásica de los tumores.

En la actualidad, no existe ningún fármaco anti-FSCN1 aprobado por ninguna agencia de medicamento internacional como primera indicación terapéutica. Se clasifican según su mecanismo de inhibición [199].

1.13.3.1. *Inhibidores específicos*

Las macrocetonas, como los análogos de la migrastatina, han sido estudiadas por *Lin Chen et al* [200], como moléculas capaces de bloquear los dos sitios de unión de la actina a la FSCN (puesto de manifiesto por estos autores con técnicas de rayos X), impidiendo pues la formación de filamentos de actina. Se conoce que la mutación E391A y H475A, impide la unión de la macrocetona a los sitios de unión, lo que reduciría el futuro papel antitumoral de la misma [199].

Se ha evidenciado que los derivados del tiazol, en especial el denominado "5K", son capaces de reducir la cantidad de actina fibrilar celular, lo que conlleva la formación de filamentos de actina mal empaquetados. Esto, a su vez, reduciría la capacidad de migración celular [201].

Además, existen otros medicamentos ya comercializados con otra indicación terapéutica que están siendo investigados por su función inhibidora directa de FSCN1. El raltegravir, antiviral clásico para el tratamiento del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), ha sido estudiado por *Albuquerque-González et al* de forma in vitro mediante xenotrasplante en saco vitelino de pez cebra de células procedentes de carcinoma colorrectal. Se obtuvo una reducción del número de metástasis. La elección de raltegravir se realizó mediante cribado virtual por

inteligencia artificial, utilizando la base de datos de la FDA y un modelo tridimensional de la proteína FSCN1. Los estudios de dinámica molecular demostraron la estabilidad de este fármaco con la FSCN1 [202].

El inhibidor N-(1-(4-(Trifluorometil)bencil)-1H-indazol-3-il)furano-2-carboxamida, ha demostrado ser capaz de unirse al sitio de unión de actina de la FSCN1, produciendo una disminución del número de filopodios por célula en aproximadamente tres veces. Además, se observó la formación de nidos celulares más redondeados y aplanados, sin que se haya evidenciado una reducción en el total de células ni en la capacidad de producir apoptosis. Ensayos *in vivo* tras la implantación de células tumorales demostraron una reducción de hasta el 95% en las metástasis pulmonares en ratones tratados con este inhibidor, en comparación con los que no fueron tratados. Además, la sobredosificación de este inhibidor no mostró efectos adversos [203,204]. Esta línea de investigación derivó en [205] con la síntesis de los derivados: NP-G2-011 y NP-G2-044. Ambas moléculas evidenciaron una reducción en la formación de filamentos de actina, metástasis y migración celular e incluso, aunque de forma escasa, del tamaño tumoral.

En la actualidad otras moléculas como los derivados de la tetrahidropiridina y la imipramina han mostrado un papel inhibitorio de la FSCN1 [206]. Respecto a este último, un medicamento utilizado en clínica diaria para el tratamiento de la depresión fue estudiado por *Alburquerque-González et al*, utilizando el modelo de xenotrasplante de líneas tumorales en peces cebras, observaron un menor porcentaje de invasión de células tumorales de forma dosis dependiente, una disminución de las estructuras invasivas del citoesqueleto de actina con menor cantidad de FSCN1 y una reducción en la migración celular [207]. En la actualidad ya existen ensayos clínicos en pacientes con cáncer colorrectal.

1.13.3.2. *Inhibidores indirectos/otros*

La melatonina, una hormona natural del cuerpo humano, ha mostrado un papel antitumoral. Ensayos han demostrado que en células tratadas con melatonina, la FSCN1 se encontraba suelta en el citosol y no en la membrana celular, lo que conllevó una reducción en la formación de filopodios [208].

Productos naturales como la chalcona (cetona aromática), la curcumina (utilizado como colorante derivado de la cúrcuma) y el extracto de *Eleagnus angustifolia L.* han mostrado una modificación de la expresión de FSCN1. La última

de ellas produce una menor expresión de la FSCN1 actuando sobre su actividad en la transición epitelio mesénquima [209]. Las alteraciones del eje HER2 o vía JAK/STAT3 son las principales responsables de las otras. Otras vías de inhibición o reducción de expresión son: la reducción del citocromo CYP26A1 con el uso ácido transretinoico [210] y la utilización de derivados sintéticos como PQ401 como inhibidor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) que reduce la expresión de FSCN1 [211].

1.14. TOPOISOMERASA

1.14.1. Descripción molecular, función y principales vías de interacción

Las ADN topoisomerasas (TOP) son enzimas isomerasas capaces de cambiar la estructura tridimensional del material genético. Fueron aisladas durante las décadas de 1970 y 1980. Esta familia se divide en dos grandes subgrupos: la topoisomerasa I, que actúa sobre una única cadena de ADN a través de un mecanismo de rotura y posterior unión, sin requerimiento energético de trifosfato de adenosina (ATP); y la topoisomerasa II, que ejerce su acción sobre la doble cadena con requerimiento de ATP y magnesio (Mg^{2+}). La topoisomerasa I tiene dos isoformas, $I\alpha$ y $I\beta$, similar a la topoisomerasa II, que también presenta las isoformas $II\alpha$ (TOP2A) y $II\beta$ (TOP2B). La topoisomerasa $I\alpha$ (gen TOP3A) y la topoisomerasa $I\beta$ (gen TOP3B) permiten respectivamente el paso y la rotación de una única hebra del ADN. La localización de estas proteínas es de tipo nuclear, aunque en algunas de ellas, como el caso de la topoisomerasa $I\beta$, también es mitocondrial.

TOP2A es una proteína de 170 kDa de peso molecular, sintetizada a partir del gen TOP2A localizado en el chr 17q21.2. La polaridad de rotura del ADN es 5' con un número de enlace de 2. Su localización es nuclear y mitocondrial. Actúa como un homodímero (2 unidades iguales de la proteína) anclándose de forma simultánea sobre ambas hebras de ADN. Este hecho le permite modificar el plegamiento de la cromatina de un estado superenrollado a un estado parcialmente enrollado. TOP2A es dependiente del ciclo celular y su expresión alcanza máximos durante la fase G2/M.

Esta enzima es capaz de producir una rotura pasajera de la doble hebra del ADN en una de las hélices del ADN (conocido como segmento G), permitiendo el

paso de la segunda hélice a través de este defecto (denominado segmento T-transportado) y la posterior unión del segmento G para cerrar de nuevo el defecto originado (figura 12). Con este mecanismo se produce la decatenación y el desenrollamiento del material genético [212]. Estos cambios conformacionales son dependientes del consumo de ATP, lo que permite de manera “sincronizada” el cierre y apertura de las diferentes etapas [213]. La decatenación se inicia durante la replicación genética, donde el proceso de replicación produce por sí mismo un enrollamiento del material genético, que continúa hasta finalizar la mitosis. Además, la decatenación es requerida durante la fase S del ciclo celular, lo que facilita la síntesis proteica. La acción de la TOP2A ocurre sin ninguna modificación química sobre el ADN.

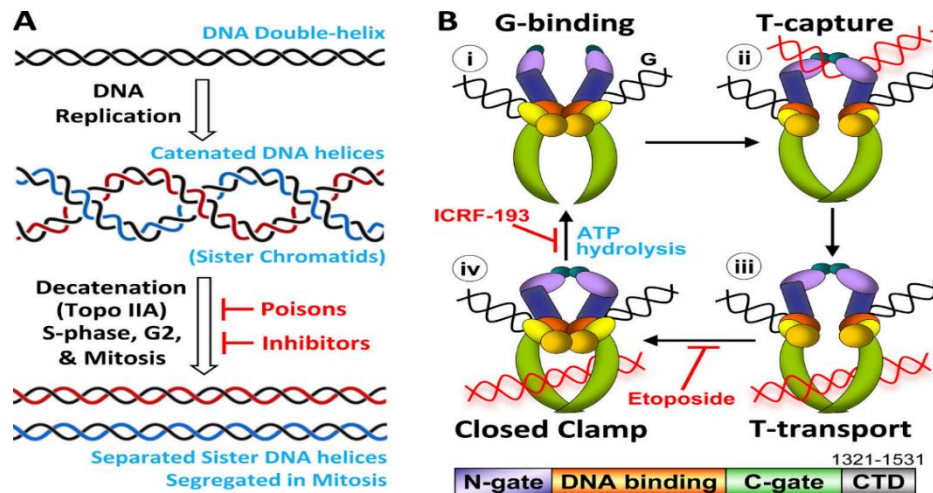


Figura 12. Mecanismo de acción de TOP2A (extraído de *Soliman et al.*).

Otras funciones son: unión al ADN, escisión/re-unión específica del ADN, y anudado/desanudado de sustratos de ácidos nucleicos, transferencia de hebras de ADN e hidrólisis de ATP [214]. El papel más relevante de TOP2A ocurre durante la mitosis, donde una decatenación completa previa a la anafase es necesaria para conseguir la separación de las cromátidas hermanas [215].

TOP2A se encuentra en una región genómica específica, pero cercana a otros genes relevantes como HER2. Algunas amplificaciones de HER2 incluyen, por proximidad, al gen TOP2A. Sin embargo, aunque esto sea frecuente, la amplificación o alteración de TOP2A no ocurre siempre en sintonía con la del gen

HER2, lo que hace necesaria una evaluación separada de ambos genes [216]. Su correlación con tumores de mayor índice proliferativo es ampliamente conocida debido a su papel fundamental en la replicación y división celular [217]. Respecto a esto último, los TN con índices mitóticos elevados no muestran aberraciones genéticas del gen TOP2A como se esperaría, pero sí presentan niveles elevados de expresión de ARN y de la proteína final. Esta expresión elevada ocurre por rutas independientes a la alteración genómica, incluyendo niveles transcripcionales, traduccionales y postranscripcionales [218].

Además, conocer su expresión junto a la de HER2 sería relevante previo al inicio de terapias de antraciclinas, ya que, la co-amplificación de ambos ha mostrado mejor tasa de respuesta libre de enfermedad en terapias basadas en antraciclinas [219]. En cambio, otros autores no apreciaron una significación en la amplificación de TOP2A, sino en la cantidad de expresión de este gen [220]. La literatura refleja que la asociación simultánea de ambas proteínas puede tener un papel relevante en predecir la respuesta a los esquemas basados en antraciclinas [221].

Un metaanálisis mostró una clara asociación entre un estado alterado de TOP2A o su sobreexpresión, y el potencial incremento del beneficio de la terapia con antraciclinas, tanto en esquemas de adyuvancia como en neoadyuvancia. Este beneficio también se observó en casos de enfermedad metastásica o avanzada [222]. Los pacientes con remisión completa mostraron niveles más elevados de ARN de TOP2A en comparación con aquellos cuya respuesta fue parcial o nula [223]. Este hecho hace sugerir la determinación de TOP2A como un probable marcador pronóstico.

La expresión de TOP2A en los diferentes subtipos histológicos y moleculares no está ampliamente documentado a diferencias de otras proteínas, como por ejemplo HER2 [224]. La ausencia de los genes reparadores BRCA1 y BRCA2 incrementa la sensibilidad a los tratamientos anti-TOP2A, ya que estos actúan sobre la rotura de la doble cadena de ADN, impidiendo una reparación homóloga [225].

Algunos tratamiento anti-TOP2A crean complejos TOP2A-ADN, cuya reparación celular se realiza por proteólisis o procesamiento nucleolítico posterior. La existencia de complejos TOP2A-ADN puede aumentar el riesgo de neoplasias secundarias, como la leucemia mieloide descrita tras utilización de terapias basadas

en etopósido y tenipósido [226]. Algunos autores asemejan TOP2A con un marcador de proliferación celular, similar a Ki67 [227].

La determinación de TOP2A sigue siendo muy discutida. Su valoración puede realizarse a través de diferentes técnicas: FISH, PCR cuantitativa (q-PCR), detección de ARNm TOP2A mediante PCR cuantitativa con retrotranscriptasa (qRT-PCR) y determinación de expresión proteica final mediante IHQ. Las técnicas más habituales son la IHQ y FISH [228]. Ambas técnicas poseen una correlación baja, hecho ampliamente expuesto en la literatura. La probable amplificación o aumento del número de copias no implica necesariamente una sobreexpresión a nivel proteico de la misma. La IHQ no permite un conteo del número de señales y ambos estudios muestran una concordancia baja ($k=0,134$) [229]. Estudios en paralelos FISH y IHQ para TOP2A mostraron una gran disparidad respecto a la valoración de HER2 [230]. En cambio, otros estudios han apreciado una mayor similitud al comparar técnicas de qRT-PCR y FISH ($p=0,047$) [223], y aún mayor cuando se comparaban qRT-PCR con la positividad e intensidad mediante IHQ ($p<0,001$) evidenciando una mejor correlación entre el ARN y la expresión final de la proteína. El método más habitual para analizar el estado de TOP2A es a través de FISH. Este método es menos subjetivo que la expresión IHQ y deja menos lugar a dudas sobre la intensidad de las señales, al basarse en un conteo de señales. A pesar de ello, durante la interpretación de FISH deben tenerse en cuenta varios factores: la localización exacta del componente infiltrante, la posibilidad de co-amplificación de HER2 o la utilización de diferentes sondas, es decir, de diferentes longitudes que puedan incluir la región HER2 y dar falsos positivos. Esto no ocurre con la delección, donde la elección de la sonda no es relevante. La heterogeneidad tumoral, con células amplificadas y otras no en la misma muestra, también es un problema en la interpretación. No existe todavía un punto de corte exacto estandarizado ni para estudios IHQ ni FISH, lo que dificulta la extrapolación de datos [231].

1.14.2. Expresión de TOP2A en el cáncer de mama

En 2004, *Kalogeraki et al* [232], observaron en un estudio IHQ sobre PAAF mamaria una mayor expresión de TOP2A cuanto mayor era el grado tumoral, así como, una mayor expresión en los casos con metástasis ganglionares. Además, fue

también estadísticamente significativa la relación entre una mayor expresión de HER2 y una mayor expresión de TOP2A.

En 2006, *Tinari et al* [233], estudiaron a 75 mujeres sometidas a tratamiento neoadyuvante basado en un esquema de antraciclinas, para evaluar el efecto del mismo en la expresión de TOP2A. Se observó, con significancia estadística, una reducción en el porcentaje de células que expresaban TOP2A. Estos autores destacaron TOP2A como un predictor independiente de una peor supervivencia libre de enfermedad.

Se realizaron estudios sobre la alteración conjunta de *HER2* y *TOP2A*, analizada mediante hibridación in situ cromogénica (CISH), como factores pronósticos en casos metastásicos en el año 2009 por *Todorovic-Rakovic et al* [234]. Este estudio no reflejó ninguna correlación con marcadores/datos clínicos ni con RH, tamaño tumoral, presencia de metástasis, tipo histológico ni estadio. No obstante, *TOP2A* se correlacionó en el análisis de supervivencia como un marcador pronóstico mejor que la alteración de *HER2*.

En 2009, *Tubbs et al* [235], en un estudio realizado mediante *microarrays* y análisis FISH de *HER2* y *TOP2A* en 2.123 mujeres tratadas con antraciclinas, no evidenciaron que las alteraciones en el número de copias de ambos genes mejoraran la supervivencia.

En 2010, *Mukherjee et al* [236], publicaron la existencia de una asociación predictiva, determinada mediante un análisis univariante, entre la expresión elevada de TOP2A, determinada por IHQ, antes del tratamiento neoadyuvante y la RCP.

En 2011, *Atocha Romero et al* [229], en un estudio comparativo entre métodos de determinación de TOP2A (FISH, IHQ y q-PCR) presentaron como significativamente estadístico la asociación de TOP2A con: mayor expresión de Ki67; y los subtipos moleculares luminal B, HER2 enriquecido y tipo basal. Por FISH, 13 de los casos estaban amplificados y 2 de los casos mostraron delección (21,3% y 3,3% respectivamente). En el mismo año, *Gómez et al* [237], evaluaron la asociación entre terapias basadas en antraciclinas y la expresión de TOP2A por IHQ. No hubo relación entre la expresión de TOP2A con la supervivencia global ni con el periodo libre de enfermedad. Además en este 2011, *Glynn et al* [238],

mediante q-PCR, evidenciaron que existían alteraciones en la sobreexpresión de TOP2A incluso cuando no se observaban alteraciones en HER2.

En 2012, *Engelstaedter et al* [239], valoraron mediante FISH la expresión de HER2 y TOP2A junto a otros marcadores IHQ y de pronóstico en una población de 245 casos. Con un punto de corte para la amplificación de ratio $TOP2A/CEP17 \geq 2$ y sin amplificación cuando la ratio < 2 , se notificó una amplificación en el 4,9% de los casos y 0% de delección. Solo el 3% de los casos mostraron una co-amplificación de HER2 y TOP2A. No se encontró significación estadística entre la amplificación de TOP2A y el grado tumoral, estadio tumoral, subtipo histológico, ganglios afectados ni la media de supervivencia.

La valoración de TOP2A en subtipos específicos de cáncer de mama, y más concretamente en TN, ha sido explorado por *Mrklic et al* [240]. Estos autores consiguieron en una población croata de 83 pacientes una correlación entre la expresión IHQ de TOP2A, con un punto de corte del 37%, con: subtipo histológico (clasificado como NOS y otros), mitosis, grado histológico y Ki67.

En 2015, *Qiao et al* [228], analizaron el estatus de TOP2A, RH y HER2 en 256 pacientes operables. El estudio FISH de TOP2A se consideró amplificación si el ratio $TOP2A/CEP17$ era > 2 y delección si el ratio era $< 0,8$, siendo normales los valores intermedios. El valor $k=0,160$ entre la valoración IHQ y FISH (64,5% y 12,1% de positivos respectivamente) indica la dificultad de considerarlas técnicas equivalentes. La positividad para TOP2A se asoció con RE, Ki67 y HER2. No se notificaron diferencias significativas entre la expresión FISH de TOP2A y la supervivencia de la serie.

La búsqueda de otras proteínas que puedan correlacionarse con la expresión de TOP2A ha sido explorada en la literatura. *Şahin et al* [241] en 2016 valoraron la proteína 1 activadora de Rac GTPasa (RacGAP1), una GTPasa cuyo papel en la citoquinesis es fundamental en la metafase mitótica, en conjunto con la expresión de TOP2A en 457 casos en Turquía. La expresión de TOP2A se relacionó con la expresión de: vimentina, RacGAP1 (con una correlación directa), Ki67 mayor, mitosis, mayor grado histológico, necrosis y afectación del CAP. Este estudio si mostró significancia estadística en los análisis de supervivencia, asociando una expresión elevada de TOP2A con un mayor periodo libre de enfermedad, menor presencia de metástasis a distancia y supervivencia global. En el estudio de *Milde-Langosch et al* [242] en 2013, mediante la expresión de ARN, manifestaron que

RacGAP1, Ki67 y TOP2A en estudios multivariantes eran marcadores pronósticos independientes. De similar manera en 2013, *Mrklic et al* [243], analizaron la expresión de diferentes antígenos tumorales de testículo (CTA, en inglés *cancer testis antigens*) en 124 casos de TN con otros datos clínicos y determinaciones en las cuales se incluía TOP2A. Se mostró una correlación estadística y una expresión en tejido conjunta y a posteriori entre MAGE-A10/NY-ESO-1 con TOP2A. En 2012 se valoró la expresión entre TOP2A y la proteína tau asociada a microtúbulos (MAP-tau) por parte de *Won et al* [244]. Tras regresión multivariante de Cox no se denotó un *p* significativa entre la expresión de ambos y la quimioterapia adyuvante basada en antraciclinas y taxanos.

En 2017, *Jim-Ray Chen et al* [245], mediante *microarrays* estudiaron la expresión de *HER2* y *TOP2A* en una población taiwanesa de 311 pacientes. Obtuvieron una media de ratio *TOP2A/CEP17* de 0,43. Se detectó amplificación en el 9,8% de los casos analizables (26/296) y delección en el 2,7% (8/296). Los casos de amplificación poseían una correlación estadística con una edad mayor de 50 años, así como, una amplificación de *HER2*, en cambio, no mostraba relación con otros datos clínicos, patológicos ni de supervivencia. En el mismo año, *Neama et al* [246], en una población iraquí evidenciarían una similar asociación estadística con la expresión de *HER2*, pero también con una correlación negativa para los RH.

En 2018, *Xin An et al* [247], analizaron la expresión de *TOP2A* en 434 mujeres sometidas a cirugía. Se consideró como sobreexpresado si la tinción nuclear era $\geq 30\%$ de las células tumorales a estudio, y negativo si era $< 30\%$. Se evidenció una significación estadística para mayor grado histológico tumoral y mayor media de Ki67 en tumores con expresión nuclear de *TOP2A*. El resto de los marcadores estudiados clínicos e histopatológicos no demostraron asociación. El análisis de supervivencia reveló que una alta expresión de *TOP2A* se asociaba a un menor periodo libre de enfermedad y a un menor tiempo libre de metástasis a distancia, con resultados más pronunciados si el seguimiento era de 5 años.

También en 2018, *Shigematsu et al* [248], estudiaron la sobreexpresión de *TOP2A*. Los datos reflejaron una correlación de su sobreexpresión con el subtipo molecular luminal B, así como una asociación con un mayor grado tumoral, negatividad para RH, positividad para *HER2* y mayor Ki67.

En 2019, *Guestini et al* [249], analizaron mediante IHQ la expresión entre otros de: *TOP2A*, *BCL2*, *p53*, *PTEN*, *Ki67*. En este estudio, se destaca la asociación

estadística significativa entre la respuesta patológica y la expresión de TOP2A y Ki67. Además, la elevación de ambas se relaciona con un aumento de la sensibilidad de los TN tratados con quimioterapia basada en antraciclinas. La delección de PTEN se asoció con una disminución de la expresión de TOP2A.

En 2020, *Ogino et al* [250], realizaron un análisis de expresión de ARNm de TOP2A y topoisomerasa I, tanto en tejido tumoral como sano, en un total de 60 pacientes japoneses. Aunque se apreció una expresión mayor para ambas proteínas en el tejido tumoral, ésta no tuvo correlación estadística con ningunas de las variables clínicas estudiadas. Como dato relevante en su serie, ningún paciente mostró recidiva cuando la expresión de estas proteínas era negativa.

1.14.3. Puntos de control de TOP2A en la división celular

La célula posee diferentes puntos de control, siendo el más relevante en nuestro contexto la vía de respuesta al daño de ADN (DDR), que ejerce su efecto principalmente durante la división celular. Los puntos principales de control de esta vía son: la correcta decatenación del ADN antes de la entrada en metafase, la valoración de los niveles de TOP2A previo a la anafase y la valoración de la abscisión celular.

El primer punto de control ocurre antes de la entrada en metafase. DDR detecta la ausencia de decatenación, lo que promueve la activación de los genes ATM, Chk1 y Chk2, y con ello el arresto celular en G2. El etopósido se une covalentemente antes del paso de re-fusión de la hebra de ADN, aumentando el grado de catenación [251].

En el segundo punto de control, la célula dispone de un mecanismo que asegura que los niveles de TOP2A libres de unión sean suficientes para garantizar una correcta anafase. El aumento de complejos TOP2A-ADN, principalmente debido al bloqueo de la hidrólisis de ATP en su región catalítica, ya sea de forma artificial con inhibidores como ICRF-193 (C₁₂H₁₈N₄O₄, o 4-[2-(3,5-Dioxo-1-piperazinil)-1-metilpropil]piperazina-2,6-diona) o por mutaciones genéticas, produce el reclutamiento de otros reguladores que paralizan el inicio de la anafase [252].

El último punto de control de esta vía ocurre durante la abscisión y se activa en caso de que no ocurra la disyunción completa de los cromosomas homólogos.

Esto conlleva a la activación de genes que retrasan la citocinesis hasta su resolución, como el gen ATM o AURKB [252].

1.14.4. Opciones terapéuticas clásicas anti-TOP2A

Para explicar las opciones terapéuticas, la literatura divide a los fármacos en dos grandes subgrupos: inhibidores clásicos/venenos y catalíticos [253].

1.14.4.1. Tratamiento clásico/venenos anti-TOP2A

Los tratamientos anti-TOP2A, empezaron su desarrollo durante la década de 1960 con dos derivados semisintéticos glucósidos a partir de la podofilotoxina, una sustancia presente en los rizomas de la especie *Podophyllum peltatum* (mandrágora): etopósido (C₂₉H₃₂O₁₃) y tenipósido (C₃₂H₃₂O₁₃S) [213]. Estos compuestos han demostrado tener un efecto quimioterápico sobre células tumorales al producir una unión covalente que bloquea el dominio catalítico de TOP2A encargado de la escisión y reparación de la rotura del ADN. Esto aumenta los complejos TOP2A-ADN y, como consecuencia de la utilización de estos fármacos, se desencadena un aumento de las roturas genómicas, lo que conlleva a una mayor activación de la apoptosis.

La otra gran familia clásica anti-TOP2A, son las antraciclinas, fármacos antibióticos obtenidos del hongo *Streptomyces* spp: daunorubicina (C₂₇H₂₉NO₁₀), idarrubicina (C₂₆H₂₇NO₉), adriamicina (C₂₇H₂₉NO₁₁) y epirubicina (C₂₇H₂₉NO₁₁) [213]. Las antraciclinas actúan intercalándose entre los puentes de hidrógeno de las bases del ADN, bloqueando así el mecanismo de acción de la TOP2A. El principal inconveniente de las antraciclinas de primera generación son sus efectos citotóxicos, que se asocian a cardiotoxicidad (debido a la generación de radicales de oxígeno libre y el efecto sobre la TOP2B en el tejido cardíaco), disfunción medular, síndromes mieloproliferativos y leucemias [254]. En un intento de reducir estos efectos secundarios, aunque no se ha conseguido del todo, la industria desarrolló una segunda generación con análogos como la doxorubicina (C₂₇H₂₉NO₁₁) y amrubicina (C₂₅H₂₅NO₉), con escasa aprobación internacional. La esorubicina (C₂₇H₂₉NO₁₁), con menor efecto adverso sobre el miocardio, mostro una incidencia elevada de aplasia medular. La introducción de nanopartículas unidas a las antraciclinas ha permitido dirigirlas de forma más

eficiente a órganos específicos como por ejemplo, la doxorubicina liposomal pegilada con glutatión para tumores del sistema nervioso central. Una tercera generación, siendo su principal exponente la mitoxantrona (C₂₂H₂₈N₄O₆), no produce una unión covalente con la TOP2A lo que reduce sus efectos adversos. Por último otros fármacos con poder anti-TOP2A relacionados son: la aclarubicina (inhibe la unión de fragmento G del ADN con la enzima) y merbarona [213].

Así mismo, el uso de antraciclinas es notificado como una sustancia “quimiosensibilizante” al ser capaz de generar proteínas asociadas al patrón molecular asociado al daño, también denominadas “alarminas”, que permiten el reconocimiento de células inmunitarias presentadoras de antígeno de proteínas inductoras de apoptosis inmunogénica como la calreticulina, proteína que se encuentra de forma fisiológica en el retículo endoplásmico [255].

1.14.4.2. *Inhibidores catalíticos clásicos anti-TOP2A*

Su mecanismo de acción se basa en el bloqueo de la principal actividad enzimática de la proteína, el dominio catalítico, sin generar un aumento de complejos unidos covalentemente con ADN (complejos TOP2A-ADN). Entre los más importantes se encuentran los derivados de la bisdioxopiperazina: ICRF-159, ICRF-187 y MST-16. Estos fármacos actúan como quelantes y también como bloqueadores de la hidrólisis de ATP del dominio catalítico después del paso de la hebra. Por ello, su “congelación” provoca que la enzima quede bloqueada sobre el ADN, afectando a la estructura del mismo y causando la citotoxicidad asociada [253].

1.14.4.3. *Nuevos inhibidores, desarrollo en un futuro y resistencia*

En la actualidad, la industria química y farmacéutica está desarrollando nuevas moléculas capaces de bloquear la acción de la TOP2A que reduzcan la aparición de neoplasias secundarias, la cardiotoxicidad y la resistencia al tratamiento.

Entre los llamados nuevos inhibidores bacterianos de la TOP con actividad anti-TOP2A encontramos: la gepotidacina y los análogos de quinolina pirimidina triona-1 [256,257]. La síntesis de derivados de β -carbolina enlazada con aril sulfonil piperazina desarrollados por Manasa et al [258], demostraron en ensayos de inhibición, una ausencia de decatenación similar a la observada con etopósido y un

aumento del arresto celular en G1 en ensayos de inducción de apoptosis. Otros grupos, *Manda et al* [259], también han trabajado recientemente sobre derivados de la β -carbolina a través de técnicas de amidación; o derivados de N-(carbobenciloxi)-L-fenilalanina con resultados de inhibición de TOP2A [260].

Otra aproximación es la utilización de derivados de la triptantrina, un alcaloide aislado de hongos ascomicetos, que actúa como un inhibidor catalítico y que ha mostrado una reducción celular en líneas celulares tumorales de mama, colon y leucemia [261], fenómeno similar a lo observado con derivados de isoquinolinas [262]. La crisoesplenetina es otra molécula con potencial antitumoral anti-TOP2A por un mecanismo de intercalación [263]. La wedelolactona, un cumestano, también muestra efecto in vitro anti TOP2A [264]. Fármacos con indicación dispar, como la pironaridina tetrafosfato, una quinolona sintética antimalárica [265], ha mostrado un efecto in vivo anti-TOP2A.

Los principales mecanismos de resistencia a la TOP2A son [266]: una reducción en su expresión y, por tanto, de la proteína total disponible [253], mutaciones del gen o mecanismos de desactivación (modificaciones postraduccionales como la fosforilación, glicosilación [267] o ubiquitación) que imposibilitan o reducen el efecto del fármaco; o mecanismos de expulsión celular mediada por glicoproteínas P, similar a otros fármacos antineoplásicos.

II – JUSTIFICACIÓN

II - JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama sigue siendo la principal causa de muerte entre las mujeres. La reducción de la mortalidad y su incremento en la incidencia en países desarrollados se ha visto mejorada por una mayor facilidad y rapidez en su diagnóstico. No menor, ha sido la evolución en el tratamiento del mismo, con el desarrollo de nuevos fármacos y dianas terapéuticas, como la hormonoterapia o inmunoterapia, lo que ha permitido tratar a subtipos de cánceres de mama que hasta entonces no disponían de un tratamiento específico o realmente efectivo. No obstante, los tratamientos clásicos, como las antraciclinas, siguen en uso.

El estudio histológico y sobre todo la llegada a la clínica diaria de la patología molecular han permitido subclasificar este tumor. La comprensión molecular de esta patología permite en nuestros días el seguimiento estrecho mediante consejo genético de alteraciones genéticas específicas. Los resultados de las determinaciones rutinarias inmunohistoquímicas y de HER2 también han favorecido planes de tratamiento específicos.

La valoración de proteínas asociadas al poder de invasión al estroma adyacente y al riesgo de metástasis ocupa un papel relevante en la literatura científica actual, ya que la reducción del riesgo de metástasis local y a distancia es clave para lograr periodos más prolongados libres de enfermedad, y con ello, “cronificar” la patología tumoral. La FSCN1, una proteína vital en la creación de proyecciones citoplasmáticas, como son los invadopodios, ha sido y sigue siendo estudiada tanto en la mama como en otros órganos. La TOP2A se relaciona con el ciclo celular y con la capacidad de mantener una tasa de proliferación tumoral elevada. La expresión conjunta de ambas no ha sido explorada según se refleja en la literatura científica.

Actualmente, existen fármacos de naturaleza antineoplásica dirigidos contra ambas proteínas, que continúan siendo actualizados y desarrollados. Aunque las nuevas generaciones han reducido su intensidad, los efectos secundarios de las antraciclinas persisten. Las determinaciones planteadas en este estudio representan un coste inferior en comparación a otras técnicas de biología molecular disponibles en el mercado.

Por todo ello, el objetivo es investigar la posible asociación y sinergia entre la expresión de FSCN1 y alteración del número de copias de TOP2A en los diferentes subtipos de cáncer de mama, con el fin de obtener datos que puedan llevar a reconsiderar la necesidad de nuevos esquemas de tratamiento para el cáncer de mama o la modificación de los tratamientos existentes.

III – OBJETIVOS

III - OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS PRINCIPALES

- Determinación fascina-1 (FSCN1) a través de técnica inmunohistoquímica (IHQ) y posterior gradación de su porcentaje e intensidad de expresión en los diferentes subtipos del cáncer de mama.
- Cuantificación de la ratio de copias del gen *TOP2A/CEP17* (topoisomerasa 2 alfa) por estudio de hibridación in situ por fluorescencia (FISH) y clasificación en una variante cualitativa de expresión (delección, normal, ganancia y amplificación).
- Elaboración de una base de datos que recoja los datos anteriores, así como otras determinaciones IHQ y pruebas adicionales ya realizadas junto a otros datos demográficos-clínicos-oncológicos de los pacientes que cumplan los criterios de inclusión.
- Estudio estadístico detallado de las variables recogidas y de las hipótesis a estudio (ver a continuación).

3.2. HIPÓTESIS PRINCIPALES DE ESTUDIO

1. Analizar si existe asociación entre la expresión conjunta de FSCN1 y alteración de la ratio de *TOP2A* que permita la estratificación de los pacientes para el desarrollo/modificación de tratamientos oncológicos individuales o combinados.
2. Analizar si existe valor pronóstico y asociación entre el subtipo histológico del cáncer de mama con la expresión de FSCN1 y la ratio de *TOP2A*.
3. Analizar si existe valor pronóstico y asociación entre el subtipo molecular del cáncer de mama con la expresión de FSCN1 y la ratio de *TOP2A*.

3.3. HIPÓTESIS SECUNDARIAS DE ESTUDIO

4. Analizar si existe una diferencia significativa entre la edad y estado fértil (en mujeres) con la expresión de FSCN1 y la ratio de *TOP2A*.
5. Analizar si existe una asociación entre la expresión de FSCN1 y la ratio de *TOP2A* con el estadio tumoral (TNM) y grado histológico (SBR).
6. Analizar si existe una asociación entre la expresión de FSCN1 con otros datos clínicos y con marcadores IHQ adicionales utilizados en el diagnóstico habitual del cáncer de mama: E-cadherina, CK19, p53, BCL2, receptores hormonales (RH), HER2/erbB2 y Ki67.
7. Analizar si existe una asociación entre la ratio de *TOP2A* con otros datos clínicos y con marcadores IHQ adicionales utilizados en el diagnóstico habitual del cáncer de mama: E-cadherina, CK19, p53, BCL2, RH, HER2/erbB2 y Ki67.
8. Analizar si existe asociación entre la supervivencia global con: expresión proteica FSCN1, ratio *TOP2A*, subtipo molecular, subtipo histológico, edad, menopausia, SBR, RH, BCL2, p53, estadio tumoral, CK19, E-cadherina, Ki67 y IHQ de HER2/erbB2.
9. Analizar si existe asociación entre la supervivencia libre de enfermedad con: expresión proteica FSCN1, ratio *TOP2A*, subtipo molecular, subtipo histológico, edad, menopausia, SBR, RH, BCL2, p53, estadio tumoral, CK19, E-cadherina, Ki67 y IHQ de HER2/erbB2.
10. Analizar si existe una asociación entre la respuesta completa al tratamiento neoadyuvante con la expresión de FSCN1 y la ratio *TOP2A*, con otros datos clínicos y con los marcadores inmunohistoquímicos adicionales utilizados en el diagnóstico habitual del cáncer de mama: E-cadherina, CK19, p53, BCL2, RH, HER2/erbB2 y Ki67.
11. Analizar si existe una asociación entre la expresión de FSCN1 y la ratio de *TOP2A* con la recidiva tumoral.
12. Analizar si existe una técnica predictora de respuesta al tratamiento neoadyuvante entre los marcadores IHQ adicionales utilizados en el diagnóstico habitual del cáncer de mama: E-cadherina, CK19, p53, BCL2, RH, HER2/erbB2 y Ki67.

13. Analizar si es posible la representatividad en nuestro centro de los subtipos histológicos del cáncer de mama siguiendo el criterio de la 5ª Edición de la clasificación de carcinomas de mama de la *World Health Organization* (WHO).

IV - MATERIAL Y MÉTODO

IV -MATERIAL Y MÉTODO

4.1. DISEÑO, POBLACIÓN Y CRITERIOS DE ESTUDIO

Esta tesis utiliza un modelo de estudio observacional descriptivo retrospectivo anonimizado sobre muestras con diagnóstico previo de carcinoma de mama. La población diana del área II de Salud (Cartagena) según el centro regional de estadística de Murcia en el año 2020, actualizado en febrero de 2021, es de 269.269 de un total 1.511.251 habitantes en la Región de Murcia. El área II es la única área del SMS que tiene dos hospitales de referencia, ambos situados en la ciudad española de Cartagena: el Hospital Santa María del Rosell y el Hospital Santa Lucía. En conjunto se les denomina Complejo Hospitalario Universitario de Cartagena (CHUC).

La población de nuestra investigación, son tanto hombres y mujeres, procedentes/derivados desde Atención Primaria como por los servicios de Ginecología y Obstetricia, Radiodiagnóstico o Cirugía General con unos criterios clínicos y/o radiológicos suficientes para la toma de una biopsia por sospecha de lesión tumoral. Esta biopsia se registra en nuestra base de datos después de verificar los datos de identificación y el tipo de muestra recibida.

4.1.1. Criterios de inclusión

- Pacientes de cualquier edad, raza y sexo.
- Pacientes con biopsias incisionales con diagnóstico de “carcinoma” de mama a partir del 1 enero de 2013, independientemente de su subtipo histológico, hasta el 30 de diciembre de 2023.
- Disponer de un número de registro inicial en el servicio de Anatomía Patológica del CHUC.
- Presencia física de los bloques parafinados dentro del archivo de muestras del servicio de Anatomía Patológica del CHUC.
- Suficientes datos clínicos y/o asistenciales a fecha máxima del día 31 de diciembre de 2023.

4.1.2. Criterios de exclusión

- Muestra mal conservada, con escaso o sin lesión residual tras estudio anatomopatológico asistencial (habitualmente en bloques parafinados con otros estudios moleculares que han agotado el material).
- Muestras de centros externos cuyos bloques parafinados no están disponibles para posteriores estudios.
- Casos consultas que no dispongan de datos clínicos suficientes.
- No disponer de un número de registro inicial en el servicio de Anatomía Patológica del CHUC.

4.2. VARIABLES HISTOLÓGICAS, INMUNOHISTOQUÍMICAS U OTRAS DETERMINACIONES ESPECIALES-MOLECULARES, CLÍNICAS Y PRONÓSTICAS

Las variables a estudio quedan reflejadas en una base de datos que se detallan a continuación.

4.2.1. Variables histológicas

Los datos histológicos recogidos son: el subtipo histológico del carcinoma de mama, ver tabla 9, siguiendo la clasificación propuesta en la página 10 de la 5ª edición del libro WHO Classification of Tumours: Breast Tumours publicado en 2019 por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC). Algunos subtipos y patrones morfológicos especiales muy poco frecuentes no fueron encontrados en nuestra base de dato o no pudo realizarse el estudio IHQ/molecular. Estos subtipos comprenden: carcinoma cribiforme, cistoadenocarcinoma mucinoso, carcinoma metaplásico, carcinoma sebáceo, patrón pleomórfico, patrón coriocarcinomatoso, patrón melanótico, patrón oncocítico, patrón rico en lípidos, patrón con células gigantes estromales de aspecto osteoclástico y patrón rico en glucógeno.

Tabla 9. Subtipos histológicos infiltrantes de mama incluidos en nuestro estudio.

Subtipos histológicos de carcinoma infiltrante de mama presentes en nuestro estudio		
Carcinoma NOS	Carcinoma lobulillar infiltrante	Carcinoma adenoide quístico
Carcinoma tubular	Carcinoma medular	Carcinoma mucinoso
Carcinoma micropapilar infiltrante	Adenocarcinoma apocrino	Carcinoma papilar infiltrante

Para la gradación tumoral se utiliza el sistema de Scarff-Bloom-Richardson (SBR) modificado por Elston-Ellis, también llamado grado histológico combinado de Nottingham [33]. Este sistema permite gradar los carcinomas de mama de manera cuantitativa, asignando puntos en función de tres aspectos histológicos:

- **Porcentaje de formación glandular.** Se asigna 1 punto si más del 75% del tumor está formado por glándulas y/o túbulos. Se asignan 2 puntos si el componente glandular y/o tubular está comprendido entre el 10% y el 75%. Se asignan 3 puntos si el componente glandular y/o tubular es inferior al 10%.
- **Pleomorfismo nuclear.** Se asigna 1 punto si el núcleo es pequeño, con escaso aumento respecto a las células epiteliales adyacentes, cromatina uniforme y contorno regular. Se asignan 2 puntos si las células son de mayor tamaño, con núcleo vesicular y nucléolo pequeño con moderada irregularidad nuclear. Se asignan 3 puntos si el nucléolo es prominente, el núcleo es vesicular y hay una marcada variabilidad en la forma y contorno nuclear, incluyendo formas aberrantes.
- **Número de mitosis de mitosis.** Se asignan 1, 2 o 3 puntos dependiendo del número de mitosis por mm², teniendo en cuenta el diámetro del campo observado.

Dependiendo del valor de esta suma, el grado histológico se clasifica en:

- Grado 1: Sumatorio de 3, 4 o 5 puntos.
- Grado 2: Sumatorio de 6 o 7 puntos.
- Grado 3: Sumatorio de 8 o 9 puntos.

4.2.2. Variables inmunohistoquímicas u otras determinaciones especiales

De cada una de las biopsias incisionales, se obtiene el valor para los siguientes marcadores:

- Expresividad IHQ para la proteína de citoplasma E-Cadherina: con valor dicotómico de sí/no expresión.
- Expresividad IHQ para los RE y RP: con valor numérico entre 0-100%.
- Expresividad IHQ para la proteína nuclear Ki67: con valor numérico entre 0-100%.
- Expresividad IHQ para la proteína nuclear p53: con valor numérico entre 0-100%.
- Expresividad IHQ para la proteína de membrana mitocondrial interna, retículo endoplásmico y envoltura nuclear BCL2: con valor numérico entre 0-100%.
- Expresividad IHQ para CK19: con valor dicotómico de sí/no expresión.
- Expresividad IHQ para la proteína de membrana HER2/erbB2: 0 (negativo), 1+ (negativo), 2+ (equivoco) y 3 (positivo) [268].
- Expresividad IHQ para la proteína de citoplasma FSCN1 determinando el **grado de porcentaje** de células teñidas en cuatro opciones distintas: A (<10% de células con tinción), B (11-50% de células con tinción), C (51-75% de células con expresión) y D (76-100% de células con tinción).
- Expresividad IHQ para la proteína de citoplasma FSCN1 determinando el **grado de intensidad** de la tinción en cuatro posibles opciones (figura 13): A (negativa, sin tinción), B (tinción débil), C (tinción moderada) y D (tinción intensa). Basado en el método de cuantificación de *Erdogan et al* [185].
- **Categoría** Expresividad Fascina: “Baja expresión” (si no contiene la letra C y/o D en alguno de los puntos previos: porcentaje de células teñidas e intensidad de la señal) y “Alta expresión” (si contiene las letras C y/o D en

alguno de los puntos previos: porcentaje de células teñidas e intensidad de la señal). Basado en el método de cuantificación de *Erdogan et al* [185].

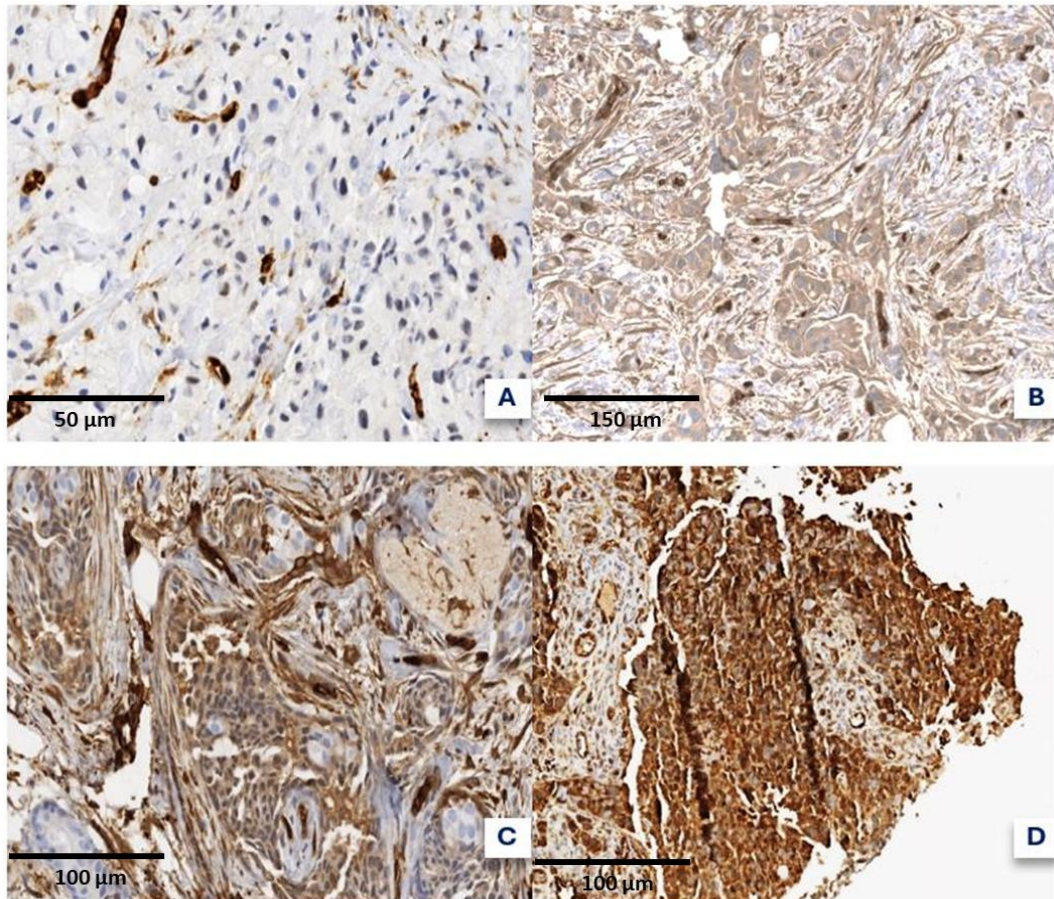


Figura 13. (A-D) Diferentes grados de intensidad de expresión para FSCN1. (A) Débil. (B) Leve. (C) Moderado. (D) Intenso.

4.2.2.1. Clones y sondas

En la tabla 10 se exponen las diferentes sondas y clones utilizados.

Tabla 10. Clones y sondas utilizados en el estudio de BAG de mama.

Proteína a estudio	Clon/Sonda	Proteína a estudio	Clon/sonda
E-Cadherina	EP700Y (<i>Cell Marque™, Rocklin, CA, EE. UU.</i>) 0,85 µg/ml	Receptor de estrógeno	SP1 (<i>Roche Ventana®, Basilea, Suiza</i>) 1 µg/ml
Receptor de Progesterona	1E2 (<i>Roche Ventana®, Basilea, Suiza</i>) 1 µg/ml	Ki67	30-9 (<i>Roche Ventana®, Basilea, Suiza</i>) 2 µg/ml
p53	DO-7 (<i>Roche Ventana®, Basilea, Suiza</i>) 0,5 µg/ml	BCL2	SP66 (<i>Roche Ventana®, Basilea, Suiza</i>) 0,2 µg/ml
CK19	A53-B/A2 (<i>Cell Marque™, Rocklin, CA, EE. UU.</i>) 0,23 µg/ml	HER2	4B5 (<i>Roche Ventana®, Basilea, Suiza</i>) 6 µg/ml
HER2 ISH	VENTANA HER2 Dual ISH (<i>Roche Ventana®, Basilea, Suiza</i>) 1 µg/ml	HER2 FISH	MAD-001FA (<i>Vitro Master Diagnostica®, Granada, España</i>)
Fascina-1	55K-2 (<i>Agilent Dako, Santa Clara, CA, EE. UU.</i>) 0,25 µg/ml	FISH Topoisomerasa 2	CT-PAC008-OG (<i>CytoTest® Rockville, MD, EE. UU.</i>)

4.2.3. Variables moleculares

- Si el resultado de HER2 por IHQ fuese 2 (equivoco), se anotará y se valorará el resultado de SISH-FISH. El grupo asignado dependiendo del número de copias y ratio HER2/CEP17 puede ser: Grupo 1, Grupo 2, Grupo 3, Grupo 4 y Grupo 5 [145].
- Determinación por FISH de *TOP2A* (figura 14) anotando el valor exacto del ratio del número de copias *TOP2A/CEP17* en 50 células tumorales con categorización posterior en: delección (ratio < 0,7 copias), normalidad (ratio $\geq 0,7-1,3$ copias), ganancia (ratio >1,3 y < 2 copias) y amplificación (ratio ≥ 2 copias). Basado en los puntos de corte del estudio de *Varga et al* [231]. Reagrupación posterior en “Grupo Normal” y “Grupo Alterado”, siendo el alterado cualquier ratio que no sea $\geq 0,7-1,3$ copias.

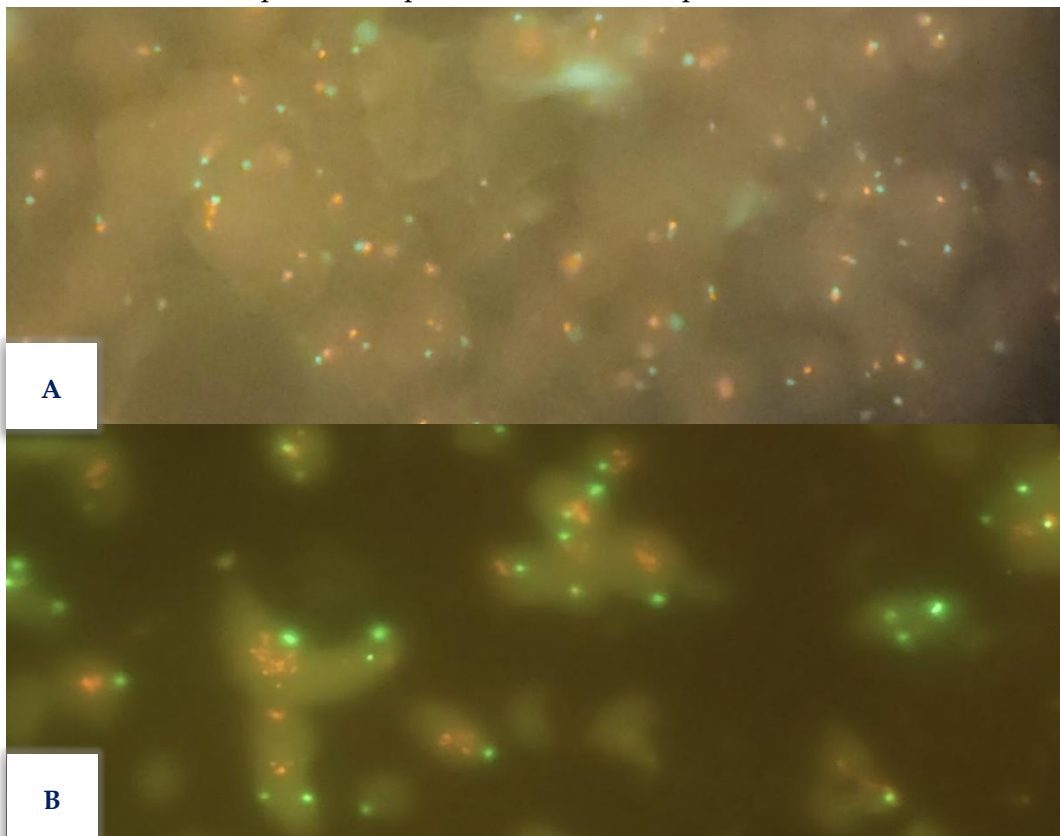


Figura 14. Valoración de la ratio de *TOP2A*. (A) No amplificación. (B) Amplificación.

4.2.4. Variables clínicas y pronósticas

Se obtendrán de la historia clínicas los siguientes datos: sexo, edad, menopausia, tratamiento neoadyuvante si procede, respuesta patológica al tratamiento neoadyuvantes si procede, tratamiento adyuvante si procede (hormonoterapia, radioterapia y quimioterapia con línea principal de tratamiento), tipo y fecha de cirugía si procede, días desde biopsia hasta la cirugía si procede, recidiva tumoral si procede con fecha y tipo (bioquímica, bioquímica + radiológica metastásica, radiológica ganglionar, radiológica local y radiológica metastásica), estadiaje TNM clínico y patológico basado en la 8ª Edición de la AJCC, estatus actual del paciente (vivo con enfermedad, vivo sin enfermedad, muerto con enfermedad o vivo sin enfermedad) y fecha de defunción si procede.

4.2.5. Variables no estudiadas

Las principales variables no estudiadas son:

- El tratamiento sobre lesiones metastásicas que difiera del adyuvante principal.
- El resultado OSNA si se hubiese realizado.
- Estudios moleculares adicionales como NGS para *BRCA1/BRCA2*.
- Invasión linfovascular/neural.

4.3. BIOPSIA, PROCESAMIENTO Y DIAGNÓSTICO

Los pacientes fueron sometido a una toma biopsia inicial en todos los casos seleccionados, a través de técnicas de BAG o BAV con emisión de su informe anatomopatológico correspondiente. Posteriormente, se realiza en algunos de ellos, una cirugía de mama que engloban diferentes grados de agresividad: desde nodulectomías o mastectomías simples hasta mastectomías radicales modificadas. Las biopsias BAG o BAV, se pueden clasificar como biopsias incisionales, en la que la intención no es de reseccabilidad de la lesión si no una intención diagnóstica. En cambio, las nodulectomías y mastectomías en todo su espectro suponen una biopsia de tipo escisional con intención curativa. En ocasiones se acompañan de vaciamientos ganglionares o estudio OSNA.

4.3.1. Biopsia por aguja gruesa (BAG) y asistida por aspiración (BAV)

Las muestras recibidas en el laboratorio de Anatomía Patológica consisten en el caso de BAG de cilindros de parénquima mamario en bote con medio fijador formólico al 4%. Muestran de manera generalizada una coloración amarillenta-blanquecina y una longitud habitual que oscila entre los 0,5 cm y los 2 cm. Las BAV se reciben en frascos transparentes con cierre antifugas con formol tamponado al 10% y dentro de un almacenaje de plástico que contiene múltiples fragmentos de morfología cilíndrica y coloración amarillenta-blanquecina. Sus características macroscópicas quedan reflejadas en el informe mediante el tallado por parte de un médico especialista en Anatomía Patológica o Técnico Superior en Anatomía Patológica y Citodiagnóstico.

4.3.2. Biopsia por resección

Se reciben en fresco principalmente como biopsias escisionales: nodulectomías, cuadrantectomías, mastectomías simples, mastectomías ahorradoras de piel y mastectomías radicales modificadas. Sus características macroscópicas, descripción inicial de márgenes y lesión/es, así como, la ejecución de cortes para una fijación adecuada queda a cargo de un residente o un facultativo especialista en Anatomía Patológica.

4.3.3. Procesamiento

Las biopsias incisionales, BAG y BAV, se dejan fijando en formol al 4%, no menos de 8 horas y no más de 48 horas. Después de este tiempo, se procesan para sustituir el agua que contienen por parafina, un hidrocarburo alcano. Se han utilizado los procesadores *Excelsior AS* (*Thermo Fisher Scientific*®, *Massachusetts, EE. UU.*) y *Logos One Evo* (*Milestone Medical*®, *Scano al Brembo, Italia*). Se sigue un protocolo estándar sumergiendo las muestras en alcoholes crecientes hasta el 100% para conseguir una deshidratación total de la muestra. Posteriormente se sumergen en xilol y por último se realizan bloques parafinados. Esto permite obtener una consistencia adecuada para realizar cortes histológicos con un microtomo estándar, logrando secciones de entre 2 y 5 micras (2-3 micras en el caso de FISH), que se colocan en un portaobjetos para su posterior tinción o realización de técnicas.

4.3.4. Diagnóstico

El diagnóstico histopatológico convencional es realizado por los facultativos especialistas en Anatomía Patológica del CHUC en plantilla entre el periodo 2013-2023. No se encontraron diagnósticos de casos consultas fuera del servicio mencionado.

METODOLOGÍA

4.4. BÚSQUEDA DE CASOS

Búsqueda en el programa de gestión PAT-Win V.4.13.9.0 (*Dedalus*®, Florencia, Italia) (figura 15) implantado en el servicio de Anatomía Patológica del CHUC como programa de gestión habitual en el diagnóstico anatomopatológico diario.

Se accede al apartado “*Estudios por literal*” y se selecciona: margen de fecha: “*fecha de informada*”, tipo de muestra: “*biopsia*”, fecha de búsqueda: “*entre 1 de enero de 2013 y 31 de diciembre de 2023*”, muestra: “*Patología mamaria*” y diagnóstico: “*carcinoma*”. El resto de las opciones de búsqueda se dejan vacías.

The screenshot displays the search criteria interface for the PAT-Win software. It includes several sections for filtering search results:

- Estudio:** Margen de fechas (F. DE INFORMADA), Tipo de Estudio (BIOPSIA), Prioridad (TODO), Patólogo Responsable (TODO).
- Procedencia:** Origen (TODO), Centro (TODO), Ámb. clínico (TODO), Servicio (TODO), Médico (TODO).
- Categorías:** Categoría (TODO), Etiquetas.
- Datos Clínicos:** Diagnóstico (CARCINOMA), Desc. Macro, Desc. Micro.
- Selección de Muestras:** A tree view showing categories like PATOLOGÍA DEL APARATO DIGESTIVO, PATOLOGÍA ENDOCRINA, PATOLOGÍA GINECOLÓGICA, and PATOLOGÍA MAMARIA (selected). Under PATOLOGÍA MAMARIA, 'Biopsia de mama' is selected.
- Muestras Seleccionadas:** A table showing 'PATOLOGÍA MAMARIA' with a 'Y' in the second column.
- Selección de SNOMED I (Por Raíces y Literales):** A search box for SNOMED I codes.
- Selección de SNOMED CT:** A search box for SNOMED CT codes.

Figura 15. Criterios de búsqueda de casos en el software PAT-Win.

Se obtiene un *listado completo* y se exporta como fichero .xml. En etapas posteriores, se procede a depurar y comprobar los criterios de inclusión de los casos obtenidos.

El primer paso de depuración de datos consiste en la eliminación de la patología no tumoral quedando un total de 3.605 biopsias. El segundo paso radica en la verificación de que el paciente disponga al menos de una muestra tipo incisional, BAG o BAV, que permita las siguientes etapas de la tesis. Entre la tercera y la quinta etapa, se verifica la existencia de material suficiente para el estudio, así como la disponibilidad de los marcadores inmunohistoquímicos y los datos clínicos requeridos. En las últimas etapas, se seleccionan los casos a estudiar mediante un sistema estratificado por subtipo histológico, tomando en consideración la viabilidad del tejido, especialmente para la realización de estudios por FISH. La relación entre el nombre del paciente y el número de historia clínica queda eliminada en el último paso para asegurar la anonimización del estudio.

4.5. PREPARACIONES DE DETERMINACIONES ADICIONALES

Tras la selección de los casos a estudio, se procede a extraer los bloques parafinados del archivo. Para facilitar la realización de técnicas adicionales y optimización de gastos se crean rondas de 2 casos. En cada portaobjetos se incluyen 2 rondas, o lo que es lo mismo 4 casos, denominándose al primero de cada ronda "A" y al segundo "B". Por ende, cada portaobjeto tendrá la siguiente rotulación: "Ronda X A, Ronda X B, Ronda X+1 A, Ronda X+1 B". Se realizan un total de tres portaobjetos iguales que se tiñen/hibridan con diferentes técnicas: 1º para HE, 2º para IHQ para FSCN1 (clon 55K-2, *Agilent Dako, Santa Clara, CA, EE. UU.*) y 3º para FISH para *TOP2A* (sonda CT-PAC008-OG, *CytoTest® Rockville, MD, EE. UU.*).

Para mejorar el rendimiento del FISH, la muestra se presenta en los dos tercios inferiores del portaobjetos. Los cortes parafinados se realizaron entre 24h-48h antes de su hibridación para una optimización de la técnica molecular. En algunas ocasiones algunas repeticiones fueron necesarias por fallo del aparataje. El esquema de este proceso queda reflejado en el siguiente diagrama (figura 16).

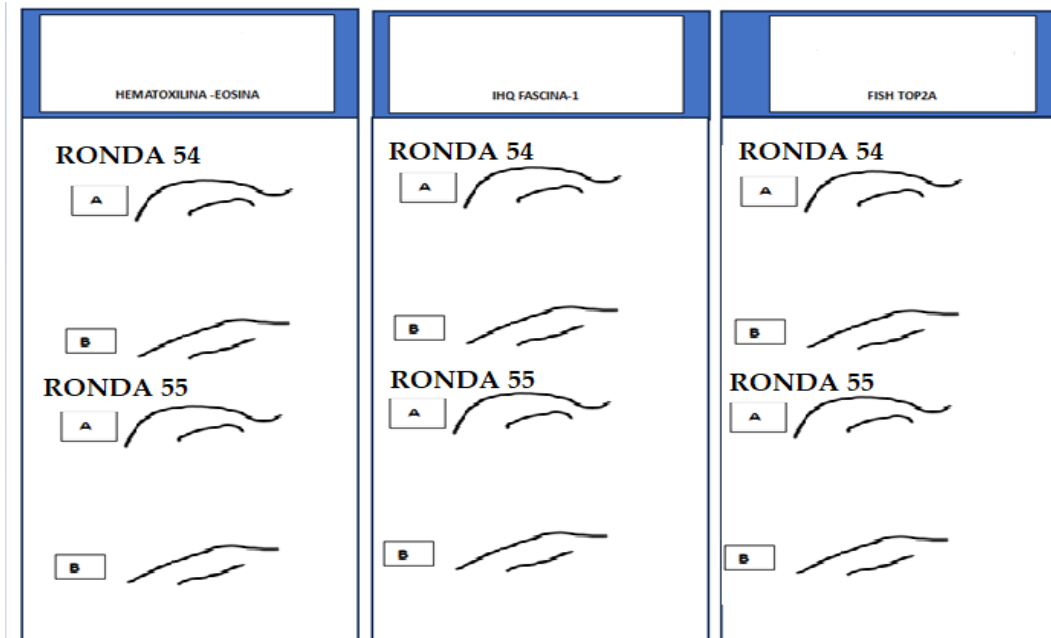


Figura 16. Diagrama de realización de portaobjetos para posteriores estudios.

4.6. TÉCNICA Y DESCRIPCIÓN DE HEMATOXILINA-EOSINA

Para la comprobación y método de apoyo para el resto de las técnicas se utiliza el primer cristal anteriormente comentado para una tinción clásica de HE con el equipo *Tissue-Tek Prisma Plus & Tissue-Tek Film* (Sakura®, Tokio, Japón) (figura 17). El protocolo utilizado es el siguiente:

- Xilol durante 7 minutos.
- Alcohol 100% durante 1:30 minutos.
- Alcohol 96% durante 1:30 minutos.
- Alcohol 70% durante 1:30 minutos.
- Agua destilada durante 1 minuto.
- Hematoxilina durante 4 minutos.
- Lavado con agua corriente durante 3 minutos.
- Eosina durante 3 minutos.
- Lavado con agua corriente durante 3 minutos.
- Alcohol 70% durante 1 minuto.

- Alcohol 96% durante 1 minuto.
- Alcohol 100% durante 3:30 minutos.
- Xilol durante 4 minutos.
- Colocación automática de cubreobjetos de tipo film.



Figura 17. Teñidor y montador Tissue-Tek Prisma Plus & Tissue-Tek Film.

La posterior visualización se realiza a través de un microscopio de campo claro *BX43* (*Olympus®*, Tokio, Japón).

4.7. TÉCNICA Y DESCRIPCIÓN IHQ DE FASCINA-1

La inmunotinción se realiza de forma automática en equipo *BenchMark Ultra* (*Roche Ventana®*, Basilea, Suiza) (figura 18) con el anticuerpo primario monoclonal IgG1 κ de conejo para diagnóstico in vitro (IVD). Con una presentación en forma de dispensador de la casa comercial *Cell Marque™* para muestras fijadas en formol y parafinadas. Se han utilizado los vasos sanguíneos como control interno, aunque existen otros controles, como las células de Reed-Sternberg de linfomas de Hodgkin clásico, que puede emplearse como control externo.

El protocolo utilizado es el siguiente:

- Horneado previo a 70°C durante 8 minutos.
- Desparafinado a 72°C durante 8 minutos.
- Dispensación de acondicionador celular, ULTRA Conditioner CC1 a 95°C durante 36 minutos para desenmascaramiento antigénico.

- Dispensación de gota de anticuerpo FSCN1 (clon 55K-2) en dispensador prediluido con amortiguador Tris, pH 7,3-7,7, con un 1% de BSA y <0,1% de azida de sodio a concentraciones comprendidas entre 0.019-0.022 $\mu\text{g}/\text{ml}$, con un intervalo de dilución recomendado entre 1:100-1:500. Posterior incubación durante 32 minutos.
- Dispensación de hematoxilina para contratinción durante 16 minutos.
- Dispensación de Bluing Reagent (utilizado para azular los núcleos previamente marcados con hematoxilina) durante 8 minutos.
- Marcaje de cromógeno de color marrón con kit ultraView Universal DAB Detection Kit basado en diaminobencidina (DAB) y la enzima peroxidasa de rábano picante durante 3 minutos.
- Montaje automático de cubreobjetos en equipo *Tissue-Tek Prisma Plus & Tissue-Tek Film* (Sakura®, Tokio, Japón).



Figura 18. Equipo de tinción IHQ automático BenchMark.

Los estudios inmunohistoquímicos son interpretados con un microscopio de campo claro *BX43* (Olympus®, Tokio, Japón).

4.8. TÉCNICA Y DESCRIPCIÓN DE SONDA FISH TOPOISOMERASA 2 ALFA

La sonda FISH *TOP2A* con N° de catálogo CT-PAC008-10-OG (Cytotest®, Granada, España) está diseñada para cubrir todo el gen *TOP2A* ubicado en el cromosoma 17q21.2 además de la región de CEP17, para el conteo de número de copias (figura 19). La sonda para *TOP2A* se visualiza en CytoOrange (fluorocromo con excitación entre 551-575 nm) y CEP17 en CytoGreen (fluorocromo con

excitación pico entre 495-518 nm). El patrón normal de sondas es la presencia de dos señales naranjas y de dos señales verdes en el mismo núcleo. Cualquier otro patrón se considera anómalo. El microscopio de fluorescencia utilizado ha sido un *BX53* (*Olympus*[®], *Tokio, Japón*) con tecnología LED de fluorescencia.

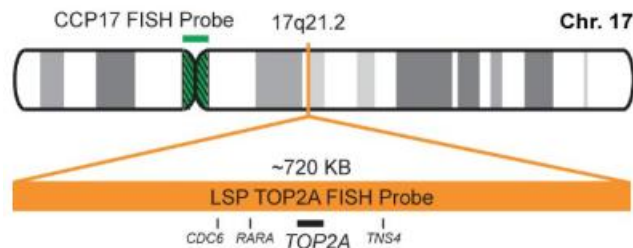


Figura 19. Esquema de la localización del gen *TOP2A* en el chr 17. Disponible en <https://www.cytotest.com/enn/tercshow.asp?ID=4001>

Se ha utilizado el hibridador *MD-Stainer* (*Vitro Master Diagnostica*[®], *Granada, España*) (figura 20). Se trata de un equipo con capacidad automática y semiautomática para la hibridación de sondas FISH e ISH.

El protocolo utiliza cortes histológicos de entre 2-3 micras colocados sobre los dos tercios inferiores de los portaobjetos, realizados preferentemente un día antes de la técnica y como máximo una semana antes. Previo paso al hibridador el portaobjeto debe calentarse a unos 60°C lo que permitirá el correcto desparafinado. La sonda *TOP2A* utiliza un protocolo semiautomático, cuya primera fase consiste en un pretratamiento con reactivos de hibridación habituales (DS7, DS8, Pepsina, Buffer de lavado y TR3) donde ocurre la digestión enzimática de la muestra. El siguiente paso es un lavado con agua destilada, seguido de la dispensación manual de la sonda antes de aumentar la temperatura para la desnaturalización del ADN y la hibridación, fase que dura 16 horas. Por último, se inician lavados post hibridación con *tris-buffered saline* (TBS) y agua destilada, para terminar con 2-(4-amidinofenil)-1H-indol-6-carboxamida (DAPI) y la colocación del cubreobjetos. A diferencia de otros equipos, en este hibridador es vital colocar un pozo sellador tras la dispensación de la sonda y añadir Fixogum (adhesivo de goma), lo que permite que el proceso de hibridación ocurra en un espacio sellado herméticamente.



Figura 20. Hibridador MD-Stainer de Vitro.

4.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico y la realización de gráficos, que incluye el estudio descriptivo e inferencial, se llevó a cabo tras la exportación de los datos con el software SPSS Statistics 21 (IBM, Armonk, NY, EE. UU.). El estudio de variables cuantitativas incluyó la determinación de las frecuencias absolutas y relativas. Para las variables cualitativas se obtuvo la media, mediana, rangos (valor mínimo y máximo) y desviación típica. El nivel de significación estadística para todos los estudios de inferencia e hipótesis se definió como significativo si $p < 0,05$ con utilización de contraste de dos colas (bilateral).

La comparación de medias de variables continuas se analizó mediante la prueba t de Student, de tipo paramétrico, al disponer de tamaños muestrales superiores a treinta. El cumplimiento de la homogeneidad y normalidad para variables paramétricas se comprobó con la prueba de Levene. La comparación entre FSCN1 intensidad/porcentaje con la ratio de *TOP2A* se realizó mediante ANOVA de un factor.

El grado de correlación entre dos variables nominales se realizó mediante: Chi-cuadrado de Pearson, corrección por continuidad (si eran tablas 2x2) y razón de verosimilitudes. La comparación de proporciones se realizó utilizando la prueba

Chi cuadrado. El grado de correlación entre variables continuas se analizó con el coeficiente de correlación de Spearman. Los estudios de supervivencia global y libre de enfermedad se estudiaron mediante la prueba no paramétrica de Kaplan-Meier y la comparación entre grupos con la prueba de Mantel-Cox (logrank). El análisis multivariante de la supervivencia se analizó a través de la Regresión de Cox. Se estudió mediante curvas ROC la capacidad discriminativa de probables pruebas diagnósticas dicotómicas respecto a la RCP.

4.10. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Esta tesis cuenta con el visto bueno del Comité de Ética del CHUC aprobado el 15 de diciembre de 2021 y del Comité de Ética de la Universidad Católica de San Antonio de Murcia (UCAM) aprobado el día 30 de mayo de 2022. En ambos casos, se constata que no se ha realizado experimentación clínica o no clínica en seres humanos, pero sí se ha utilizado material procedente de un banco de muestras o tejidos de seres humanos

No fue necesario obtener un consentimiento adicional por parte de los pacientes, ya que en el consentimiento firmado para la biopsia/resección se incluye la posibilidad de realizar determinaciones adicionales orientadas a un diagnóstico integral y la identificación de la mayor cantidad de marcadores que diluciden el pronóstico de su enfermedad.

Por último, se recoge el compromiso de respetar y hacer respetar los principales principios éticos en el ámbito de la investigación biomédica incluidos la confidencialidad, seguridad y el respeto a la dignidad humana incluyendo la Declaración de Helsinki (Finlandia, 1964) y su última revisión (Fortaleza, Brasil, 2013), así como, las normas de Buena Práctica Clínica propuestas de la Comisión Europea de Economía.

4.11. CONFLICTOS DE INTERÉS

El investigador principal, director e investigadores asociados no tuvieron ningún conflicto de interés.

V – RESULTADOS

V - RESULTADOS

5.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVOS DE LOS RESULTADOS

5.1.1. Edad, género y menopausia

Los datos de edad, género y menopausia están resumidos en la tabla 11.

Tabla 11. Descriptivo estadístico para edad, sexo y estado de menopausia (n=265; n=265; n=251).

	Edad		DT	Mediana	Rango
Media	64,69		15,13	65	25-99
	Sexo				
	Mujer	Hombre	Total		
n	261	4	265		
Porcentaje %	98,5	1,5	100		
	Menopausia				
	Sí	No	Total		
n	182	69	251		
Porcentaje %	72,5	27,5	100		

DT: desviación típica.

El número total de pacientes que se ha estudiado es de 265: 261 mujeres y 4 hombres. La edad media de los pacientes a estudio es de 64,69 ($\pm 15,13$) años, con una mediana de 65 años y un rango de 74 años, siendo el rango inferior una paciente de 25 años y el rango superior otra paciente de 99 años.

Del total de mujeres, 182 eran menopáusicas en el momento del diagnóstico y 69 fértiles, en 10 de ellas no se dispuso de dicho dato.

5.1.2. Subtipos histológicos del cáncer de mama

Los subtipos histológicos del cáncer de mama están desglosados en la figura 21 y tabla 12.

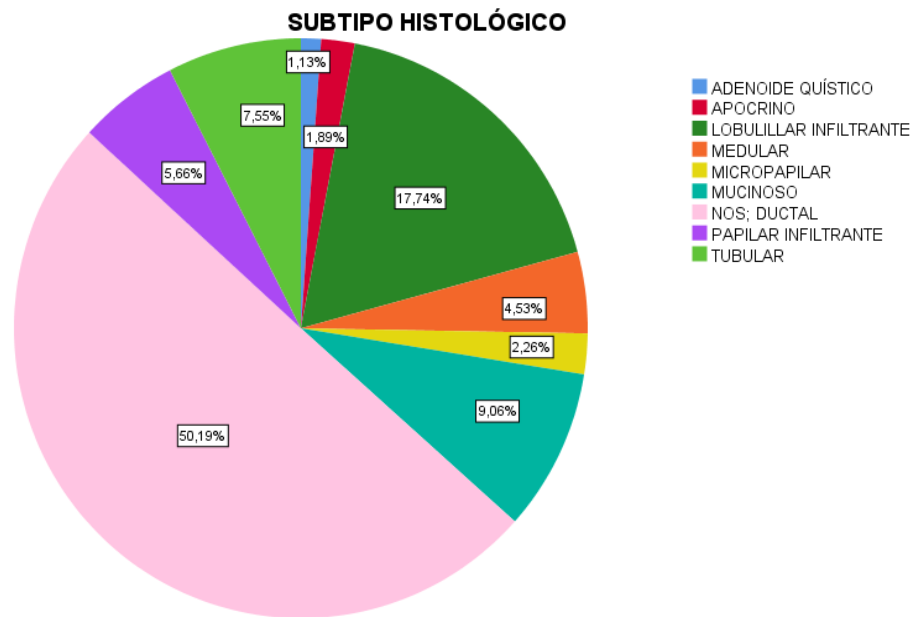


Figura 21. Gráfico de distribución de frecuencias de los subtipos histológicos del cáncer de mama.

Tabla 12. Distribución de los subtipos histológicos del cáncer de mama (n=265).

Subtipo Histológico	N	Porcentaje %
NOS; Ductal	133	50,2
Lobulillar infiltrante	47	17,7
Mucinoso	24	9,1
Tubular	20	7,5
Papilar infiltrante	15	5,7
Medular	12	4,5
Micropapilar	6	2,3
Apocrino	5	1,9
Adenoide quístico	3	1,1
Total	265	100

La amplia mayoría se corresponden con el subtipo carcinoma NOS con un total de 133 casos, que representan el 50,2% de la muestra. Además, se evidencia una escasa representatividad de subtipos histológicos menos frecuentes, donde destaca en segundo lugar, el carcinoma lobulillar infiltrante con 47 casos (17,7%). De forma residual, el tipo adenoide quístico y el tipo apocrino no representan juntos más del 4% del total. No se identifican todos los subtipos reflejados en la 5ª clasificación de la WHO para el cáncer de mama.

5.1.3. Subtipos moleculares del cáncer de mama

En la tabla 13 se dividen por el subtipo molecular los cánceres de mama de nuestra serie.

Tabla 13. Distribución de los subtipos molecular del cáncer de mama (n=253).

Subtipo molecular	N	Porcentaje %
Luminal A	84	31,7
Luminal B HER2-	109	41,1
Luminal B HER2+	19	7,2
HER2+	2	0,8
Triple Negativo	39	14,7
Total	253	100

La subclasificación molecular se pudo realizar en 253 pacientes a estudio. El subtipo molecular más frecuente en nuestro estudio fue el luminal B HER2- (n=109) y el menos frecuente el subgrupo HER2+ (n=2).

5.1.4. Variables IHQ habituales en el diagnóstico en el cáncer de mama

La distribución de los marcadores IHQ dicotómicos está reflejada en la tabla 14. Los análisis descriptivos del resto de marcadores IHQ quedan dispuestos en la tabla 15.

Tabla 14. Distribución de marcadores IHQ y moleculares habituales del cáncer de mama: CK19, E-Cadherina, HER2, FISH/ISH HER2 (n=264; n=259; n=265; n=75).

	CK19				Total		
	+		-				
n	261		3		264		
Porcentaje %	98,9		1,1		100		
	E-Cadherina				Total		
	+		-				
n	218		41		259		
Porcentaje %	84,2		15,8		100		
	HER2				Total		
	0	1+	2+	3+			
n	82	92	75	16	265		
Porcentaje %	30,9	34,7	28,3	6	100		
SISH/FISH SOBRE HER2 2+ (GRUPOS)							
	1	2	3	4	5	ND/P	Total
n	10	2	0	2	60	1	75
Porcentaje %	13,3	2,7	0	2,7	80	1,3	100

ND/P: No dato o pérdida de seguimiento

Tabla 15. Descriptivo de variables continuas del panel básico en el diagnóstico de cáncer de mama determinadas por IHQ: RE, RP, Ki67, p53 y BCL2 (n=265; n=265; n=265; n=256; n=256).

Subtipo Histológico	Media (DT)	Rango
RE	68,70 ($\pm 2,26$)	0-90
RP	46,80 ($\pm 2,44$)	0-90
Ki67	26,82 ($\pm 1,44$)	2-90
p53	19,52 ($\pm 1,82$)	0-90
BCL2	70,66 ($\pm 2,19$)	0-90

DT: desviación típica

La mayoría de los casos son CK19+ (98,9%) y 218 son E-Cadherina+, lo que representan más del 80% de los casos. Respecto a la valoración IHQ de HER2, se observa una distribución parecida entre los grupos 0-2+, pero menor para 3+. Dentro de los casos HER2 2+ (n=75), el resultado FISH/SISH los clasifica como grupo 5 (negativo) para la mayoría de ellos (n=60, 80%).

Respecto al resto de valores, se puede apreciar como dentro de los RH, la media de RE de 68,70 ($\pm 2,26$) es más elevada que la media de RP 46,80 ($\pm 2,44$). La media Ki67 en nuestro estudio se situó en un valor de 26,82% ($\pm 1,44$).

5.1.5. Grado tumoral histológico SBR

La tabla 16 refleja las frecuencias del grado tumoral histológico medido con SBR, tanto en categorías únicas como agrupadas por grados.

Tabla 16. Tabla de frecuencias del grado histológico SBR y SBR agrupado (n=259).

SBR	3	4	5	6	7	8	9	Total
n	9	28	43	77	53	42	7	259
Porcentaje %	3,5	10,8	16,6	29,7	20,5	16,2	2,7	100
SBR Agrupado	GRADO 1			GRADO 2		GRADO 3		
n	80			130		49		259
Porcentaje %	30,9			50,2		18,9		100

La mayoría de los tumores muestra un grado histológico en rangos intermedios, 6-7 SBR, lo que supone un porcentaje acumulado del 50,2%. El grado histológico sigue una distribución de aspecto gaussiana con valores extremos de SBR 3 de 3,5% y SBR 9 de 2,7%.

5.1.6. Estadio patológico, estadio clínico y tipo de cirugía

Los estadios tumorales y tipo de cirugía se muestran en la tabla 17 y tabla 18.

Tabla 17. Distribución de estadio patológico y clínico del cáncer de mama (n=186; n=51).

Estadio patológico	IA	IB	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IIIC	IV	Total
n	62	9	59	31	11	4	5	5	186
Porcentaje %	33,3	4,8	31,7	16,7	5,9	2,2	2,7	2,7	100
Estadio clínico	IA	IB	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IIIC	IV	
n	1	0	10	5	12	3	10	10	51
Porcentaje %	2	0	19,6	9,8	23,5	5,9	19,6	19,6	100

Tabla 18. Distribución del tipo de cirugía (n=237).

Tipo de Cirugía	N	Porcentaje %
Pendiente de cirugía	9	3,8
Conservadora/Local	118	49,8
Mastectomía simple	64	27
Mastectomía radical	46	19,4
Total	237	100

En nuestra serie, disponemos de todos los posibles estadios recogidos en la última clasificación de la AJCC. La mayoría de los casos se encuentran en los estadios IA y IIA en el estadio patológico, mientras que el estadio IIIA es el más frecuente en el estadio clínico (23,5%). La mastectomía conservadora de mama es la técnica quirúrgica de elección, con 118 casos (49,8%). En cambio, la mastectomía radical solo se utilizó en 46 operaciones (19,4%).

5.1.7. Tratamientos oncológicos específicos

La utilización de los tratamientos médicos oncológicos (hormonoterapia, radioterapia y quimioterapia) se detalla en la tabla 19.

Tabla 19. Distribución dicotómica de tratamiento oncológicos específicos (n=263; n=263; n=262).

	Hormonoterapia		Total
	Sí	No	
n	196	67	263
Porcentaje %	74,5	25,5	100
	Radioterapia		Total
	Sí	No	
n	173	90	263
Porcentaje %	65,8	34,2	100
	Quimioterapia		Total
	Sí	No	
n	94	168	262
Porcentaje %	64,1	35,9	100

Estos tipos de tratamiento fueron utilizados en más del 60% de los pacientes a estudio, con un predominio de la hormonoterapia (74,5%).

5.1.8. Neoadyuvancia, tipo respuesta al tratamiento y recidiva

Se dispone en la tabla 20 los análisis descriptivos de los pacientes sometidos a neoadyuvancia y el tipo de respuesta a la misma. En la tabla 21 se refleja la tasa de recidiva de nuestra serie.

Tabla 20. Distribución dicotómica de los pacientes con propuesta de neoadyuvancia (n=265) y su tipo de respuesta (n=48).

	Neoadyuvancia			Total
	Sí	No		
n	48	217		265
Porcentaje %	18,1	81,9		100
	Tipo de respuesta a neoadyuvancia			Total
	Total	Parcial/Ninguna	ND/P	
n	13	24	11	48
Porcentaje %	27	50	23	100

ND/P: No dato o pérdida de seguimiento

Tabla 21. Distribución de las recidivas y sus tipos (n=256).

Tipo de recidiva	n	Porcentaje %
Ninguna	239	93,4
Bioquímica	1	0,4
Bioquímica + Radiológica metastásica	1	0,4
Radiológica ganglionar	4	1,6
Radiológica local	4	1,6
Radiológica metastásica	7	2,7
Total	256	100

En nuestra población con n=265 la elección de un tratamiento neoadyuvante ocurrió en n=48, lo que supone el 18,1%. De éstos, la valoración de remisión sólo pudo obtenerse en n=37, siendo la remisión completa en n=13, mientras que fue parcial o nula en el restante de los casos.

La recidiva en nuestra serie fue escasa 6,6% (n=256), siendo la de tipo metastásica la más frecuente con un 2,7%.

5.1.9. Estado vital de los pacientes al finalizar el estudio

A continuación en la tabla 22, se reflejan el estado vital de los pacientes a fin de estudio (31/12/2023).

Tabla 22. Distribución del estado vital de los pacientes a cierre del estudio 31/12/2023 (n=257).

Estado vital al fin del estudio	n	Porcentaje %
Muerto con enfermedad	22	8,6
Muerto sin enfermedad	5	1,9
Vivo con enfermedad	29	11,3
Vivo sin enfermedad	201	78,2
Total	257	100

Se notificaron un 10,5% de fallecimientos, de ellos el 8,6% no estaban libres de enfermedad en el momento del éxitus. Un 78,2% de los pacientes se encontraban libres de enfermedad al finalizar el nuestro seguimiento.

5.1.10. Expresión conjunta por FISH de *HER2* y *TOP2A*

En nuestra serie de datos, no se registra ningún caso de amplificación simultánea de *HER2* y *TOP2A* mediante FISH. Además, no se han detectado casos de delección de *TOP2A* en presencia de una amplificación de *HER2*.

5.1.11. FSCN1

En la tabla 23 y tabla 24 quedan reflejado el **grado de porcentaje** de expresión y **grado de intensidad** de FSCN1 en cuatro variables (A-D). Además, en la tabla 25 se muestra la expresión de FSCN1 agrupada en dos **categorías** denominadas: “Baja expresión” y “Alta expresión”.

Tabla 23. Tabla de distribución del grado de intensidad de expresión de FSCN1 en cuatro variables (n=265).

Grado de intensidad de FSCN1	n	Porcentaje %
A (Negativa)	143	54
B (Débil)	88	33,2
C (Moderada)	19	7,2
D (Intensa)	15	5,6
Total	265	100

Tabla 24. Tabla de distribución del grado de porcentaje de expresión de FSCN1 en cuatro variables (n=265).

Grado de porcentaje de FSCN1	n	Porcentaje %
A (<10%)	162	61,1
B (10-50%)	46	17,4
C (51-75%)	24	9,1
D (76-100%)	33	12,4
Total	265	100

Tabla 25. Distribución de expresión de FSCN1 en dos categorías: Baja y Alta Expresión (n=265).

Categoría de FSCN1	n	Porcentaje %
Baja expresión	205	77,4
Alta expresión	60	22,6
Total	265	100

Tanto en intensidad como en porcentaje, se observa un predominio del grado A, con un 54% y 61,1% respectivamente. El menor porcentaje de valor de intensidad corresponde a la grado D (5,6%), mientras que, si consideramos el porcentaje de expresión, es el grado C (9,1%). Al considerar la expresión de manera dicotómica, se observa un predominio de la categoría “Baja expresión” (77,4%) en comparación con la de “Alta expresión” (22,6%).

5.1.12. TOP2A

En la tabla 26 queda constancia de la media de la ratio *TOP2A*, determinado por FISH, y su subclasificación en cuatros categorías y posterior agrupación en 2 grandes grupos: "Normal" y "Alterado". Se considera como grupo "Alterado" la agrupación del resto de categorías previas diferente a la "Normal".

Tabla 26. Análisis descriptivo y distribución por categorías de la ratio y grupos de *TOP2A* (n=175).

	Ratio <i>TOP2A</i>	DT	Rango
Media	1,28	0,86	0,28-7,39
Categoría FISH <i>TOP2A</i>	n	Porcentaje %	
Amplificación	12	6,9	
Ganancia	21	12	
Normal	136	77,7	
Delección	6	3,4	
Total	175	100	
Grupos FISH <i>TOP2A</i>	n	Porcentaje %	
Normal	136	77,7	
Alterado	39	33,3	
Total	175	100	

DT: desviación típica

El valor de la media de la ratio de *TOP2A* fue de 1,28, lo que la sitúa dentro del rango de lo que hemos definido como categoría "Normal". Se obtuvieron resultados en todas las categorías predominando la categoría normal (n=136). La ganancia (n=21) se identificó en más ocasiones que la suma de casos de delección y amplificación (n=6 y n=12 respectivamente). Respecto a los grupos, se clasifica hasta un tercio de nuestra serie en el grupo "Alterado".

5.2. ANÁLISIS DE INFERENCIA

5.2.1. Análisis de la relación entre los grados de porcentaje e intensidad de expresión de FSCN1

Para valorar esta asociación, se diseña una tabla de contingencia (tabla 27), considerando las cuatro categorías del grado de porcentaje de expresión y las cuatro categorías del grado intensidad de expresión de FSCN1 por IHQ.

Tabla 27. Tabla de contingencia entre los grados de porcentaje e intensidad de expresión de FSCN1 (n=265).

χ^2 de Pearson
 $p < 0,001$

		GRADO INTENSIDAD FSCN1				Total
		A	B	C	D	
GRADO PORCENTAJE FSCN1	A	141	21	0	0	162
	B	2	41	2	1	46
	C	0	11	11	2	24
	D	0	15	6	12	32
Total		143	88	19	15	265

El análisis denota una correlación estadística significativa entre un mayor porcentaje de expresividad con una mayor intensidad de FSCN1 ($p < 0,001$).

5.2.2. Análisis de la relación entre las categorías de FSCN1 y la ratio de TOP2A

Para valorar la diferencia entre las categorías de FSCN1 y la ratio de TOP2A se realiza una tabla de contingencia (tabla 28).

Tabla 28. Tabla de contingencia entre las categorías de FSCN1 y la ratio de TOP2A (n=175).

χ^2 de Pearson
 $p = 0,562$

		RATIO TOP2A				Total
		Amplificación	Ganancia	Normal	Delección	
CATEGORIA FSCN1	Baja	8	18	106	4	39
	Alta	4	3	30	2	136
Total		12	21	136	6	175

En esta primer tabla se evidencian cuatro casillas con un $n < 5$ lo que podría estar limitando el análisis estadístico. Por ello, en la tabla 29, se realiza similar análisis estadístico en otra tabla de contingencia, con los grupos de *TOP2A*: "Normal" y "Alterado".

Tabla 29. Tabla de contingencia de las categorías de FSCN1 frente a los grupos de *TOP2A* (n=175).

χ^2 de Pearson
 $p=0,893$

		GRUPO <i>TOP2A</i>		Total
		Normal	Alterado	
CATEGORIA FSCN1	Baja	106	30	136
	Alta	30	9	39
	Total	136	39	175

El análisis estadístico no demuestra diferencias significativas ($p=0,562$ y $p=0,893$).

5.2.3. Análisis de relación entre los grados de expresión de la intensidad/porcentaje de FSCN1 y la ratio de *TOP2A*

Para analizar si la intensidad y porcentaje de FSCN1 tiene asociación con la ratio de *TOP2A*, se realizan test de ANOVA de un factor (tabla 30 y tabla 31 respectivamente).

Tabla 30. Tabla de contingencia entre el grado de intensidad de FSCN1 y la ratio de *TOP2A*.

ANOVA de un factor $p=0,650$	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	Valor de F
Intergrupos	1,212	3	0,404	,548
Intragrupos	126,025	171	0,737	
Total	127,237	174		

Tabla 31. Tabla de contingencia entre el grado de porcentaje de FSCN1 y la ratio de TOP2A.

ANOVA de un factor
 $p=0,167$

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	Valor de F
Intergrupos	3,709	3	1,236	1,711
Intragrupos	123,529	171	0,722	
Total	127,237	174		

Con $p=0,650$ y $p=0,167$ no se obtiene relación significativa entre la expresión de FSCN1, tanto en su intensidad como porcentaje de células tumorales, con la ratio de TOP2A.

5.2.4. Análisis de relación entre la edad y las categorías de FSCN1 y los grupos de TOP2A

Para correlacionar la edad y el tipo de expresión de FSCN1 se acomete estudio estadístico en tabla 32. De similar manera, se analiza la relación con la ratio TOP2A en la tabla 33.

Tabla 32. Tabla de contingencia de las categorías de FSCN1 frente a la edad (n=265).

T-STUDENT
 $p=0,124$

	N	Media Edad	DT	SEM
CATEGORIA FSCN1				
Baja	205	65,46	15,023	1,049
Alta	60	62,05	15,314	1,977

DT: Desviación típica, SEM: Error estándar de la media

Tabla 33. Tabla de contingencia de los grupos de *TOP2A* frente a la edad (n=175).

		T-STUDENT			
		N	Media Edad	DT	SEM
GRUPO <i>TOP2A</i>	Normal	136	63,56	14,939	1,281
	Alterado	39	66,21	15,567	2,493

DT: Desviación típica, SEM: Error estándar de la media.

No se obtiene una correlación estadística entre edad y la expresión de FSCN1 ($p=0,124$), ni con la ratio de *TOP2A* ($p=0,335$).

5.2.5. Análisis de relación entre los subtipos histológicos del cáncer de mama y las categorías de FSCN1

Para valorar si existen diferencias entre los subtipos histológicos y la expresión de FSCN1, se diseña una tabla de contingencia (tabla 34).

Tabla 34. Tabla de contingencia entre los subtipos histológicos y las categorías de FSCN1 (n=265).

		CATEGORIA FSCN1		Total
		Baja	Alta	
SUBTIPO HISTOLÓGICO	Adenoide quístico	0	3	3
	Apocrino	3	2	5
	Lobulillar infiltrante	42	5	47
	Medular	6	6	12
	Micropapilar	5	1	6
	Mucinoso	23	1	24
	NOS	92	41	133
	Papilar infiltrante	15	0	15
	Tubular	19	1	20
Total		205	60	265

Con un $p<0,001$, se aprecia una significancia estadística entre el subtipo histológico y la expresión de FSCN1, dispuesta de forma categórica.

5.2.6. Análisis de relación entre la expresión entre los subtipos moleculares del cáncer de mama y las categorías de FSCN1

Para valorar si existen diferencias entre los subtipos moleculares y la expresión de FSCN1 se diseña una tabla de contingencia (tabla 35).

Tabla 35. Tabla de contingencia entre los subtipos moleculares y las categorías de FSCN1 (n=253).

χ^2 de Pearson
 $p < 0,001$

		CATEGORIA FSCN1		
		Baja	Alta	Total
SUBTIPO MOLECULAR	Luminal A	76	8	84
	Luminal B HER2-	93	16	109
	Luminal B HER2+	14	5	19
	HER2+	2	0	2
	Triple Negativo	12	27	39
Total		197	56	253

El estudio estadístico demuestra una asociación estadística significativa ($p < 0,001$) entre la expresión de FSCN1 y el subtipo molecular.

5.2.7. Análisis de relación entre los subtipos histológicos del cáncer de mama y la ratio de TOP2A

Para valorar si existen diferencia entre los subtipos histológicos y la ratio de TOP2A se diseña la siguiente tabla de contingencia (tabla 36).

Tabla 36. Tabla de contingencia entre los subtipos histológicos frente a la ratio de TOP2A (n=175).

		RATIO TOP2A				Total
		Amplif	Ganancia	Normal	Delección	
SUBTIPO HISTOLÓGICO	Adenoide quístico	0	0	2	0	2
	Apocrino	0	0	5	0	5
	Lobulillar infiltrante	3	2	15	0	20
	Medular	0	0	8	1	9
	Micropapilar	0	1	3	0	4
	Mucinoso	3	6	11	1	21
	NOS	6	8	72	4	90
	Papilar infiltrante	0	2	10	0	12
	Tubular	0	2	10	0	12
	Total	12	21	136	6	175

Amplif: Amplificación

No se demuestra asociación estadística entre las categorías de ratio de TOP2A y el subtipo histológico ($p=0,610$). Debido a que 28 casillas mostraban una frecuencia menor a 5, se decidió realizar un similar estudio utilizando los grupos de TOP2A: "Normal" y "Alterado" (tabla 37).

Tabla 37. Tabla de contingencia entre los subtipos histológicos frente a los grupos de *TOP2A* (n=175).

χ^2 de Pearson
 $p=0,188$

		GRUPO <i>TOP2A</i>		
		Normal	Alterado	Total
SUBTIPO HISTOLÓGICO	Adenoide quístico	2	0	2
	Apocrino	5	0	5
	Lobulillar infiltrante	15	5	20
	Medular	8	1	9
	Micropapilar	3	1	4
	Mucinoso	11	10	21
	NOS	72	18	90
	Papilar infiltrante	10	2	12
	Tubular	10	2	12
Total		136	39	175

Tampoco se apreció significancia estadística al agrupar los datos ($p=0,188$).

5.2.8. Análisis de relación entre los subtipos moleculares del cáncer de mama y los grupos de *TOP2A*

Para valorar si existen diferencias entre los subtipos histológicos del cáncer de mama frente a los grupos “Normal” o “Alterado” de *TOP2A*, se diseña la siguiente tabla de contingencia (tabla 38).

Tabla 38. Tabla de contingencia entre los subtipos moleculares y los grupos de *TOP2A* (n=165).

χ^2 de Pearson
 $p=0,041$

		GRUPO <i>TOP2A</i>		
		Normal	Alterado	Total
SUBTIPO MOLECULAR	Luminal A	42	6	48
	Luminal B HER2-	55	20	75
	Luminal B HER2+	9	8	17
	HER2+	1	0	1
	Triple Negativo	20	4	24
Total		127	38	165

Los datos notifican una significancia estadística ($p=0,041$) entre el subtipo molecular y el grupo de *TOP2A*.

5.2.9. Análisis de relación entre el grado histológico y las categorías FSCN1 y los grupos de *TOP2A*

En aras de estudiar la relación del grado histológico SBR con la expresión de FSCN1 y ratio *TOP2A*, se diseñan las siguientes tablas de contingencias combinadas (tabla 39 y tabla 40).

Tabla 39. Tabla de contingencia combinada entre el grado histológico SBR y las categorías de FSCN1 y los grupos de *TOP2A* ($n=259$; $n=170$).

χ^2 de Pearson
 $p<0,001$; $p=0,033$

GRADO HISTOLÓGICO SBR	CATEGORIA FSCN1			Total 1	GRUPO <i>TOP2A</i>		Total
	Baja	Alta	Normal		Alterado		
	3	9	0		9	3	
4	24	4	28	4	14	3	17
5	40	3	43	5	24	6	30
6	65	12	77	6	32	15	47
7	36	17	53	7	24	13	37
8	24	18	42	8	29	1	30
9	3	4	7	9	3	1	4
Total	201	58	259		131	39	170

Tabla 40. Tabla de contingencia combinada entre el grado histológico SBR agrupados por grados y las categorías de FSCN1 y los grupos de *TOP2A* ($n=259$; $n=170$).

χ^2 de Pearson
 $p<0,001$; $p=0,003$

SBR POR GRADO	CATEGORIA FSCN1			Total	GRUPO <i>TOP2A</i>		Total
	Baja	Alta	Normal		Alterado		
Grado 1	73	7	80	Grado 1	43	9	52
Grado 2	101	29	130	Grado 2	56	28	84
Grado 3	27	22	49	Grado 3	32	2	34
Total	130	58	259	Total	131	39	170

En ambos casos ($p<0,001$; $p=0,033$ y $p<0,001$; $p=0,003$), se demuestra una significación estadística de la expresión de FSCN1 y ratio *TOP2A* con los distintos grados histológicos SBR, tanto por categorías como agrupados por grados.

5.2.10. Análisis de relación entre el sexo del paciente y las categorías de FSCN1 y los grupos de TOP2A

A tenor de estudiar la relación del sexo con la expresión de FSCN1 y ratio TOP2A, se diseña la siguiente tabla de contingencia combinada (tabla 41).

Tabla 41. Tabla de contingencia combinada del sexo frente a las categorías de FSCN1 y los grupos de TOP2A (n=265; n=175).

χ^2 de Pearson $p=0,910$; $p=0,643$	CATEGORIA			GRUPO				
	FSCN1			TOP2A				
	Baja	Alta	Total	Normal	Alterado	Total		
SEXO	Mujer	202	59	261	Mujer	134	38	172
	Hombre	3	1	4	Hombre	2	1	3
	Total	205	60	265		136	39	175

El sexo, en nuestra serie, no influye estadísticamente en la expresión de FSCN1 y la ratio TOP2A. Los hombres representan un pequeño porcentaje en este estudio (n=4).

5.2.11. Análisis de relación entre la menopausia y las categorías de FSCN1 y los grupos de TOP2A

Se ha realizado una tabla de contingencia combinada para estudiar la relación entre la menopausia con la expresión de la FSCN1 y ratio TOP2A (tabla 42).

Tabla 42. Tabla de contingencia combinada de la menopausia frente a las categorías de FSCN1 y los grupos de TOP2A (n=251; n=165).

χ^2 de Pearson $p=0,144$; $p=0,923$	CATEGORIA			GRUPO				
	FSCN1			TOP2A				
	Baja	Alta	Total	Normal	Alterado	Total		
MENOPAUSIA	Sí	145	37	182	Sí	26	91	117
	No	49	20	69	No	11	37	48
	Total	194	57	251		37	128	165

Como el apartado anterior, tampoco existe una correlación estadística ($p=0,144$; $p=0,923$) con la menopausia.

5.2.12. Análisis de relación entre el estadio tumoral patológico-clínico y las categorías de FSCN1 y los grupos de TOP2A.

Para explorar la relación entre el estadio tumoral, tanto patológico en pacientes sin neoadyuvancia y clínico en pacientes que sí han recibido neoadyuvancia, y la expresión de FSCN1 y ratio TOP2A, se han realizado tablas de contingencias combinadas (tabla 43).

Tabla 43. Tablas de contingencias combinadas del estadio tumoral patológico y clínico frente a las categorías de FSCN1 y los grupos de TOP2A (n=186; n=51 FSCN1; n=124; n=36 TOP2A).

χ^2 de Pearson $p=0,382$; $p=0,620$	CATEGORIA FSCN1			GRUPO TOP2A				
	Baja	Alta	Total	Normal	Alterado	Total		
	ESTADIO TUMORAL PATOLÓGICO	I	II	III	IV	I	II	III
	59	12	71	8	43	51		
	74	16	90	14	44	58		
	14	6	20	3	10	13		
	5	0	5	0	2	2		
Total	152	34	186	25	99	124		

χ^2 de Pearson $p=0,830$; $p=0,329$	CATEGORIA FSCN1			GRUPO TOP2A				
	Baja	Alta	Total	Normal	Alterado	Total		
	ESTADIO TUMORAL CLÍNICO	I	II	III	IV	I	II	III
	1	0	1	0	1	1		
	8	7	15	3	7	10		
	14	11	25	2	18	20		
	6	4	10	2	3	5		
Total	29	22	51	7	29	36		

Con valores de $p=0,382$ y $p=0,620$; $p=0,830$ y $p=0,329$ respectivamente, no se aprecia significación estadística entre el estadio tumoral, tanto patológico como clínico, con la expresión de FSCN1 y la ratio de TOP2A.

5.2.13. Análisis de relación entre los descriptivos T, N, M patológicos/clínicos y las categorías de FSCN1 y los grupos de TOP2A

Para explorar la correlación entre los descriptivos que conforman el TNM y la expresión de FSCN1 y la ratio TOP2A, se lleva a cabo tablas de contingencias combinadas (tabla 44 y tabla 45).

Tabla 44. Tablas de contingencias combinadas de los descriptivos patológicos (pTNM) y las categorías de FSCN1 y los grupos de TOP2A (n=158; n=175; n=173 FSCN1; n=123; n=116; n=115 TOP2A).

		CATEGORIA			GRUPO		
		FSCN1			TOP2A		
		Baja	Alta	Total	Normal	Alterado	Total
T patológica	pTis	1	0	1	1	0	1
	pT1	73	15	88	52	11	63
	pT2	63	15	78	38	11	49
	pT3	10	4	14	6	2	8
	pT4	4	0	4	2	0	2
	Total	151	34	158	99	24	123
		CATEGORIA			GRUPO		
		FSCN1			TOP2A		
		Baja	Alta	Total	Normal	Alterado	Total
N patológica	pN0	84	17	101	55	16	71
	pN1	49	10	59	32	5	37
	pN2	6	3	9	4	1	5
	pN3	4	2	6	2	1	3
	Total	143	32	175	93	23	116
		CATEGORIA			GRUPO		
		FSCN1			TOP2A		
		Alta	Baja	Total	Normal	Alterado	Total
M patológica	pM0	137	31	168	90	23	113
	pM1	5	0	5	2	0	2
	Total	142	31	173	92	23	115

Tabla 45. Tablas de contingencias combinadas de los descriptivos clínicos (cTNM) y las categorías de FSCN1 y los grupos de TOP2A (n=51; n=51; n=51 FSCN1; n=36; n=36; n=36 TOP2A).

		CATEGORIA			GRUPO		
		FSCN1			TOP2A		
		Baja	Alta	Total	Normal	Alterado	Total
T clínica	χ^2 de Pearson						
	$p=0,716; p=0,722$						
	cTis	0	0	0	0	0	0
	cT1	2	2	4	3	0	3
	cT2	12	12	24	12	4	16
	cT3	8	5	13	7	2	9
Total	29	22	51	29	7	36	
		CATEGORIA			GRUPO		
		FSCN1			TOP2A		
		Baja	Alta	Total	Normal	Alterado	Total
N clínica	χ^2 de Pearson						
	$p=0,687; p=0,176$						
	cN0	8	6	14	6	4	10
	cN1	8	9	17	10	1	11
	cN2	4	3	7	6	0	6
cN3	9	4	13	7	2	9	
Total	29	22	51	29	7	36	
		CATEGORIA			GRUPO		
		FSCN1			TOP2A		
		Baja	Alta	Total	Normal	Alterado	Total
M clínica	χ^2 de Pearson						
	$p=0,823; p=0,211$						
	cM0	23	18	41	26	5	31
cM1	6	4	10	3	2	5	
Total	29	22	51	29	7	36	

No se ha apreciado ninguna relación para la ratio TOP2A y expresión de FSCN1 con los descriptivos TNM, tanto para pTNM como cTNM.

5.2.14. Análisis de relación entre marcadores IHQ de rutina para el cáncer de mama y las categorías de FSCN1 y los grupos de TOP2A

Se ha realiza un análisis estadístico para analizar si existe relación entre los marcadores IHQ de rutina en el cáncer de mama y la expresión alta y baja FSCN1 (tabla 46 y figura 22). De similar forma, se diseña estudio para valorar la correlación con el grupo normal o alterado de ratio de TOP2A (tabla 47 y figura 23).

Tabla 46. Pruebas T de Student para valorar correlación entre RE/RP/Ki67/p53/BCL2 y las categorías de FSCN1 (n=265; n=265; n=265; n=256; n=256).

T-STUDENT	CATEGORIA FSCN1	n	Media Variable	DT	SEM	p
RE	Baja	205	76,68	29,934	2,091	<0,001
	Alta	60	41,42	44,208	5,707	<0,001
RP	Baja	205	51,37	38,718	2,704	0,001
	Alta	60	31,17	39,299	5,073	<0,001
Ki67	Baja	205	23,30	20,384	1,424	<0,001
	Alta	60	38,83	29,116	3,759	<0,001
p53	Baja	199	16,60	25,619	1,816	0,016
	Alta	57	29,72	37,658	4,988	0,003
BCL2	Baja	199	74,67	32,114	2,277	0,003
	Alta	57	56,61	41,325	5,474	0,001

DT: Desviación típica; SEM: Error estándar de la media, p= valor de probabilidad.

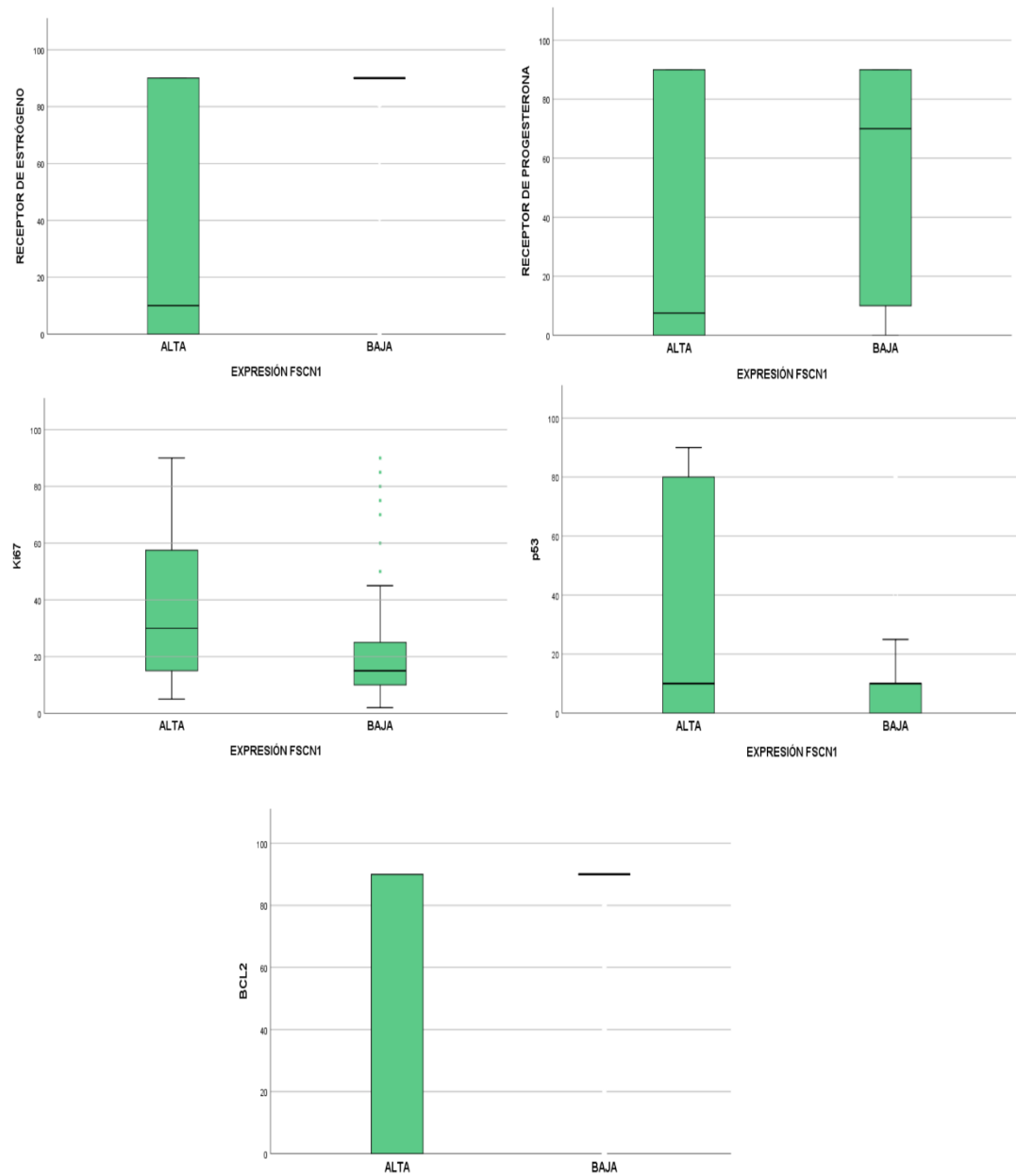
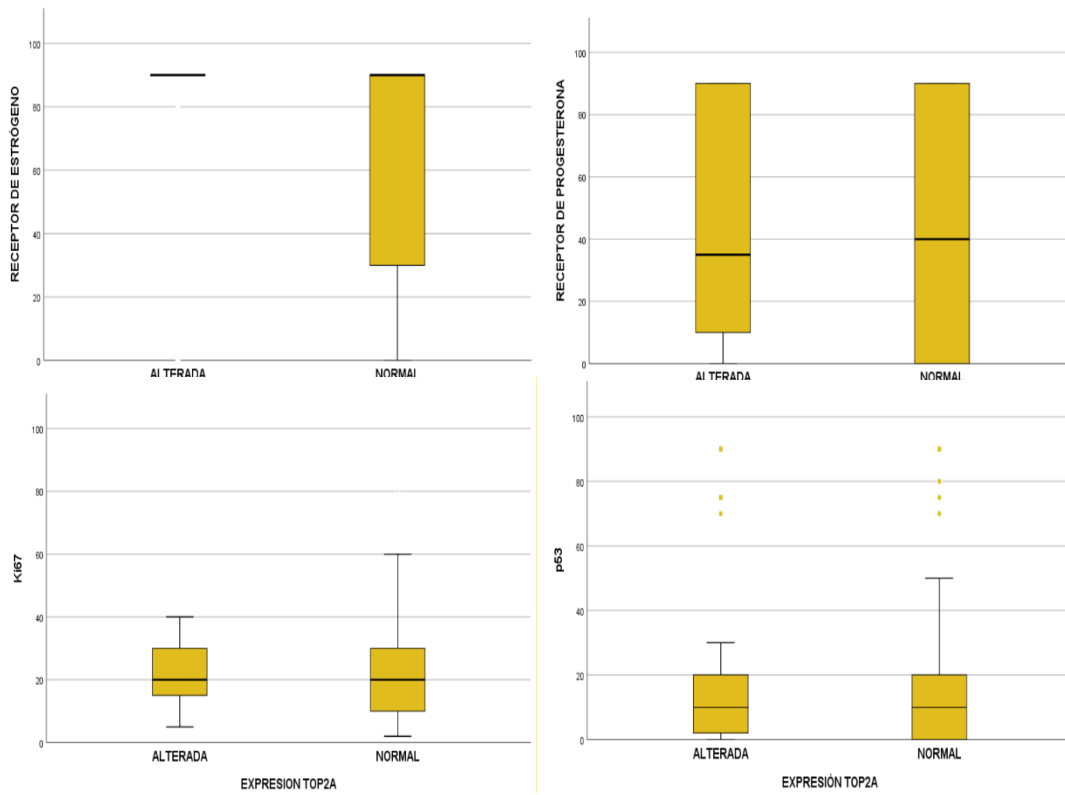


Figura 22. Diagramas de cajas para las variables IHQ de rutina en el diagnóstico del cáncer de mama respecto a las categorías de FSCN1.

Tabla 47. Pruebas T de Student para valorar correlación entre RE/RP/Ki67/p53/BCL2 y los grupos de TOP2A (n=175; n=175; n=175; n=167; n=168).

T-STUDENT	Grupo TOP2A	n	Media Variable	DT	SEM	p
RE	Normal	39	76,28	31,135	4,986	0,143
	Alterado	136	66,58	37,677	3,231	0,107
RP	Normal	39	47,18	38,265	6,127	0,833
	Alterado	136	45,66	39,827	3,415	0,829
Ki67	Normal	39	25,38	17,486	2,800	0,728
	Alterado	136	26,82	23,879	2,048	0,681
p53	Normal	37	18,84	26,848	4,414	0,597
	Alterado	130	21,75	30,136	2,643	0,574
BCL2	Normal	37	75,14	32,966	5,420	0,265
	Alterado	131	67,75	36,142	3,158	0,243

DT: Desviación típica; SEM: Error estándar de la media, p= valor de probabilidad;



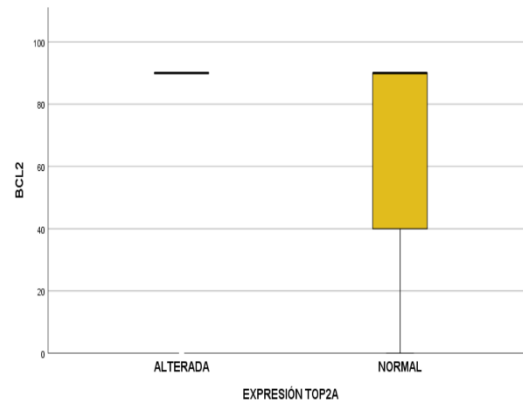


Figura 23. Diagramas de cajas para las variables IHQ de rutina en el diagnóstico del cáncer de mama respecto a los grupos de *TOP2A*.

Con el diagrama de cajas, se puede observar visualmente la asociación entre una baja expresión de FSCN1 y niveles elevados de RE. De manera similar, el grupo alterado de ratio de *TOP2A* se presenta en biopsias con niveles elevados de RE.

Se ha decidido agrupar las variables continuas en dos grandes grupos, lo que permite un análisis mediante tablas de contingencia. De esta manera, para RE, RP, p53 y BCL2 se han considerado dos posibilidades: expresión del 0% (negativo) o $\geq 1\%$ (positivo). Para Ki67, se ha utilizado un punto de corte del 14% ($<14\%$ y $\geq 14\%$), y para la edad, un punto de corte de 65 años (<65 y ≥ 65 años). Ver tabla 48.

Tabla 48. Tablas de contingencias combinadas de RE, RP, BCL2, p53, edad y Ki67 frente a las categorías de FSCN1 y los grupos de TOP2A (n=265; n=265; n=256; n=256 FSCN1; n=175; n=175; n=168; n=167 TOP2A).

χ^2 de Pearson
 $p < 0,001$; $p = 0,166$

	CATEGORIA FSCN1				GRUPO TOP2A		
	Baja	Alta	Total		Normal	Alterado	Total
	RE						
+	185	31	216	+	109	35	144
-	20	29	49	-	27	4	31
Total	205	60	265		136	39	175

χ^2 de Pearson
 $p < 0,001$; $p = 0,240$

	CATEGORIA FSCN1				GRUPO TOP2A		
	Baja	Alta	Total		Normal	Alterado	Total
	RP						
+	164	31	195	+	99	32	131
-	41	29	70	-	37	7	44
Total	205	60	265		136	39	175

χ^2 de Pearson
 $p = 0,003$; $p = 0,494$

	CATEGORIA FSCN1				GRUPO TOP2A		
	Baja	Alta	Total		Normal	Alterado	Total
	BCL2						
+	173	40	213	+	107	32	139
-	26	17	43	-	24	5	29
Total	199	57	256		131	37	168

χ^2 de Pearson
 $p = 0,962$; $p = 0,822$

	CATEGORIA FSCN1				GRUPO TOP2A		
	Baja	Alta	Total		Normal	Alterado	Total
	p53						
+	139	40	179	+	96	28	124
-	60	17	77	-	34	9	43
Total	199	57	256		130	37	167

χ^2 de Pearson
 $p=0,694$; $p=0,919$

	CATEGORIA FSCN1			GRUPO TOP2A				
	Baja	Alta	Total	Normal	Alterado	Total		
Edad								
	≥65	105	29	134	≥65	65	19	84
	<65	100	31	131	<65	71	20	91
	Total	205	60	265		136	39	175

χ^2 de Pearson
 $p=0,002$; $p=0,048$

	CATEGORIA FSCN1			GRUPO TOP2A				
	Baja	Alta	Total	Normal	Alterado	Total		
Ki67 (%)								
	≥14	123	49	172	≥14	89	32	121
	<14	82	11	93	<14	47	7	54
	Total	205	69	265		136	39	175

Los datos obtenidos con las pruebas T-Student muestran una significancia estadística entre el tipo de expresión de FSCN1 y los marcadores IHQ. Queda reflejado con un $p=0,016$ en el caso de p53 siendo en el resto inferiores a esta cifra. En cambio, TOP2A no se relaciona estadísticamente con ningún marcador IHQ estudiado.

Con la agrupación de los valores en las tablas de contingencia, se observa una significación estadística para un Ki67 $\geq 14\%$ tanto para FSCN1 como para TOP2A. Además, se aprecia relación con significancia estadística de FSCN1 cuando realizamos una agrupación de “positivo y negativo” para las variables de RE, RP y BCL2 pero no para p53 ni la edad. En lo que respecta TOP2A no se aprecia significancia.

5.2.15. Análisis de relación entre la expresión IHQ de CK19, E-Cadherina y HER2 y las categorías de FSCN1 y los grupos de TOP2A

Para explorar la relación entre técnicas habituales de IHQ y la expresión de FSCN1 y ratio TOP2A se ha realizado tablas de contingencias combinadas (tabla 49).

Tabla 49. Tablas de contingencias combinadas de E-Cadherina, CK19 y HER2 frente las categorías de FSCN1 y los grupos de TOP2A (n=259; n=264; n=265 FSCN1; n=170; n=174; n=175 TOP2A).

	CATEGORIA FSCN1				GRUPO TOP2A			
		Baja	Alta	Total		Normal	Alterado	Total
	χ^2 de Pearson $p=0,194$; $p=0,989$							
E-Cadherina	+	166	52	218	+	118	34	152
	-	35	6	41	-	14	4	18
	Total	201	58	259		132	38	170

	CATEGORIA FSCN1				GRUPO TOP2A			
		Baja	Alta	Total		Normal	Alterado	Total
	χ^2 de Pearson $p=0,783$; $p=0,109$							
CK19	+	202	59	261	+	135	37	172
	-	2	1	3	-	1	1	2
	Total	204	60	264		136	38	174

	CATEGORIA FSCN1				GRUPO TOP2A			
		Baja	Alta	Total		Normal	Alterado	Total
	χ^2 de Pearson $p=0,050$; $p=0,817$							
IHQ HER2	0	55	27	82	0	37	10	47
	1+	75	17	92	1+	49	13	62
	2+	63	12	75	2+	42	12	54
	3+	12	4	16	3+	8	4	12
	Total	205	60	265		136	39	175

Como se observa en ninguna de las pruebas IHQ realizadas se asocia estadísticamente con la expresión de FSCN1 y la ratio de TOP2A. La más cercana es la asociación entre IHQ HER2-FSCN1 con $p=0,050$, lo que supone una ausencia de significación en nuestro estudio.

5.2.16. Análisis de relación entre la expresión de FSCN1 y la ratio TOP2A con la recidiva y su tipo

Se realizan tablas de contingencia para analizar la relación entre la recidiva y su tipo y la expresión de FSCN1 y ratio de *TOP2A* (tabla 50 y tabla 51).

Tabla 50. Tabla de contingencia de tipo de recidiva frente a las categorías de FSCN1 (n=256).

		CATEGORIA FSCN1		
		Baja	Alta	Total
RECIDIVA	Ninguna	187	52	239
	Bioquímica	1	0	1
	Bioquímica + Radiológica metastásica	1	0	1
	Radiológica ganglionar	2	2	4
	Radiológica local	2	2	4
	Radiológica metastásica	5	2	7
Total		198	58	256

χ^2 de Pearson

$p=0,514$

Tabla 51. Tabla de contingencia de tipo de recidiva frente a los grupos de *TOP2A* (n=171).

		GRUPO TOP2A		
		Normal	Alterado	Total
RECIDIVA	Ninguna	122	36	158
	Bioquímica	1	0	1
	Radiológica ganglionar	3	1	4
	Radiológica local	1	1	2
	Radiológica metastásica	6	0	6
Total		133	38	171

χ^2 de Pearson

$p=0,568$

Con relación a FSCN1 no existe asociación estadística ($p=0,514$). De similar forma ocurre con *TOP2A* ($p=0,568$).

En la tabla 52, se recompila de forma resumida los resultados de las tablas de contingencias anteriormente expuestas.

Tabla 52. Tabla resumen de contingencias de FSCN1 y TOP2A con las diferentes variables a estudio

CARACTERÍSTICA	FSCN1		<i>p</i>	TOP2A		<i>p</i>
	BAJA	ALTA		NORMAL	ALTERADO	
<u>Sexo</u>			0,910			0,643
Hombres	3	1		38	1	
Mujeres	202	59		134	38	
<u>Menopausia</u>			0,144			0,923
Sí	145	37		91	26	
No	49	20		37	11	
<u>Edad</u>			0,694			0,919
<65	100	31		71	20	
≥65	105	29		65	19	
<u>CK19</u>			0,783			0,109
Positivo	202	59		135	37	
Negativo	2	1		1	1	
<u>IHO HER2</u>			0,050			0,817
0	55	27		37	10	
1+	75	17		49	13	
2+	63	12		42	12	
3+	12	4		8	4	
<u>Estadio tumoral patol^a</u>			0,382			0,620
I	59	12		43	8	
II	74	16		44	14	
III	14	6		10	3	
IV	5	0		2	0	
<u>Estadio tumoral clin^b</u>			0,830			0,329
I	1	0		1	0	
II	8	7		7	3	
III	14	11		18	2	
IV	6	4		3	2	

CARACTERÍSTICA	FSCN1		<i>p</i>	TOP2A		<i>p</i>
	BAJA	ALTA		NORMAL	ALTERADO	
<u>T patológico^a</u>			0,692			0,858
pTis	1	0		1	0	
pT1	73	15		52	11	
pT2	63	15		38	11	
pT3	10	4		6	2	
pT4	4	0		2	0	
<u>N patológico^a</u>			0,478			0,659
pN0	84	17		55	16	
pN1	49	10		32	5	
pN2	6	3		4	1	
pN3	4	2		2	1	
<u>M patológico^a</u>			0,289			0,476
pM0	137	31		90	23	
pM1	5	0		2	0	
<u>T clínico^b</u>			0,716			0,722
cTis	0	0		0	0	
cT1	2	2		3	0	
cT2	12	12		12	4	
cT3	8	5		7	2	
cT4	7	3		7	1	
<u>N clínico^b</u>			0,687			0,176
cN0	8	6		6	4	
cN1	8	9		10	1	
cN2	4	3		6	0	
cN3	9	4		7	2	
<u>M clínico^b</u>			0,823			0,211
cM0	23	18		26	5	
cM1	6	4		3	2	

CARACTERÍSTICA	FSCN1		<i>p</i>	TOP2A		<i>p</i>
	BAJA	ALTA		NORMAL	ALTERADO	
<u>Subtipo molecular</u>			<0,001			0,041
Luminal A	78	8		42	6	
Luminal B HER2-	93	16		55	20	
Luminal B HER2+	14	5		9	8	
HER2+	2	0		1	0	
Triple negativo	12	27		20	4	
<u>Subtipo histológico</u>			<0,001			0,188
Adenoide quístico	0	3		2	0	
Apocrino	3	2		5	0	
Lobulillar infiltrante	42	5		15	5	
Medular	6	6		8	1	
Micropapilar	5	1		3	1	
Mucinoso	23	1		11	10	
NOS	92	41		72	18	
Papilar infiltrante	15	0		10	2	
Tubular	19	1		10	2	
<u>RE</u>			<0,001			0,166
Positivo	185	31		109	35	
Negativo	20	29		27	4	
<u>RP</u>			<0,001			0,240
Positivo	164	31		99	32	
Negativo	41	29		37	7	
<u>BCL2</u>			0,003			0,494
Positivo	173	40		107	32	
Negativo	26	17		24	5	

CARACTERÍSTICAS	FSCN1		p	TOP2A		p
	BAJA	ALTA		NORMAL	ALTERADO	
<u>p53</u>			0,962			0,822
Positivo	139	40		96	28	
Negativo	60	17		34	9	
<u>Ki67</u>			0,002			0,048
≥14	123	49		89	32	
<14	82	11		47	7	
<u>E-Cadherina</u>			0,194			0,989
Positivo	166	52		118	34	
Negativo	35	6		14	4	
<u>FSCN1</u>						0,893
Baja	-	-		106	30	
Alta	-	-		30	9	
<u>TOP2A</u>			0,893			
Normal	106	30		-	-	
Alterado	30	9		-	-	
<u>SBR^c</u>			<0,001			0,033
3	9	0		5	0	
4	24	4		14	3	
5	40	3		24	6	
6	65	12		32	15	
7	36	17		24	13	
8	24	18		29	1	
9	3	4		3	1	
<u>SBR^c por grados</u>			<0,001			0,003
Grado 1	73	7		43	9	
Grado 2	101	29		56	28	
Grado 3	27	22		32	2	

RE: Receptor de estrógeno; RP: Receptor de progesterona; FSCN1: fascina-1; TOP2A: topoisomerasa 2.

RE, RP, BCL2, p53: se consideran negativos cuando 0 y positivo ≥1.

^aEstadio tumoral patológico, T patológico, N patológico, M patológico: Pacientes sin neoadyuvancia.

^bEstadio tumoral clínico, T clínico, N clínico, M clínico: Pacientes con neoadyuvancia.

^cSBR Escala Scarff-Bloom-Richardson para el grado tumoral histológico.

5.2.17. Análisis de la correlación entre las variables continuas

Para analizar si existe correlación y en qué sentido, se realizan correlaciones de Pearson, reflejados en la tabla 53, de las variables continuas analizadas: RE, RP, Ki67, p53, BCL2 y ratio de *TOP2A*.

Tabla 53. Coeficientes de Correlación de Pearson para las variables continuas (n=265; n=265; n=265; n=256; n=256; n=175).

		RE	RP	Ki67	p53	BCL2	TOP2A
RE	Correlación de Pearson	1	0,590	-0,550	-0,550	0,692	0,081
	<i>p</i>		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,287
	<i>n</i>	265	265	265	256	256	175
RP	Correlación de Pearson	0,590	1	-0,366	-0,329	0,477	-0,109
	<i>p</i>	<0,001		<0,001	<0,001	<0,001	0,150
	<i>n</i>	265	265	265	256	256	175
Ki67	Correlación de Pearson	-0,550	-0,366	1	0,398	-0,469	-0,060
	<i>p</i>	<0,001	<0,001		<0,001	<0,001	0,432
	<i>n</i>	265	265	265	256	256	175
p53	Correlación de Pearson	-0,550	-0,329	0,398	1	-0,434	-0,085
	<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001		<0,001	0,277
	<i>n</i>	256	256	256	256	255	167
BCL2	Correlación de Pearson	0,692	0,477	-0,469	-0,434	1	0,009
	<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001		0,910
	<i>n</i>	256	256	256	255	256	168
TOP2A	Correlación de Pearson	0,081	-0,109	-0,060	-0,085	0,009	1
	<i>p</i>	0,287	0,150	0,432	0,277	0,910	
	<i>n</i>	175	175	175	167	168	175

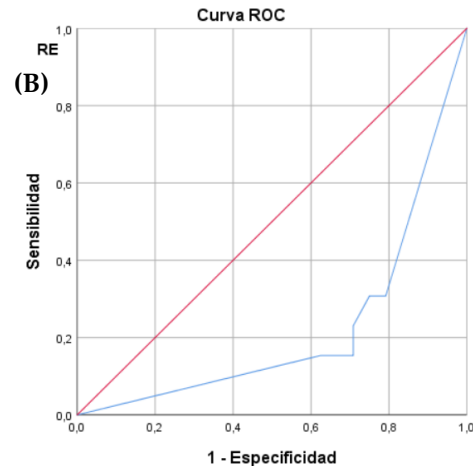
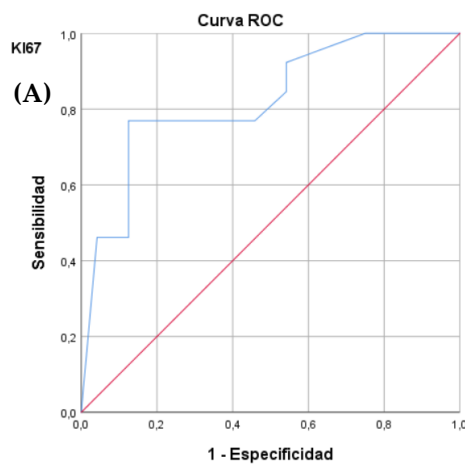
Como puede apreciarse, existe una relación significativa entre RE, RP y p53 y BCL2 con $p < 0,001$. No ocurre así con TOP2A, que no muestra relación significativa con ninguno del resto de marcadores. La correlación de RE, RP y BCL2 es de sentido positivo, mientras que se relacionan en sentido inverso con p53 y Ki67. Por último, p53 y Ki67 se correlacionan positivamente entre sí.

5.2.18. Análisis curvas ROC de las técnicas IHQ habituales

Para la valoración de si RE, RP, BCL2, Ki67, TOP2A serían pruebas discriminativas en predecir la respuesta al tratamiento neoadyuvante, se realizaron curvas ROC. Ver tabla 54 y figura 24.

Tabla 54. Áreas bajo la curva obtenidas mediante curvas ROC de marcadores IHQ y FISH TOP2A.

Técnica	Área bajo la curva	Interpretación
Ki67	0,822	Test bueno
RE	0,221	Test inadecuado
RP	0,284	Test inadecuado
p53	0,564	Test malo
BCL2	0,271	Test inadecuado
Ratio TOP2A	0,586	Test malo



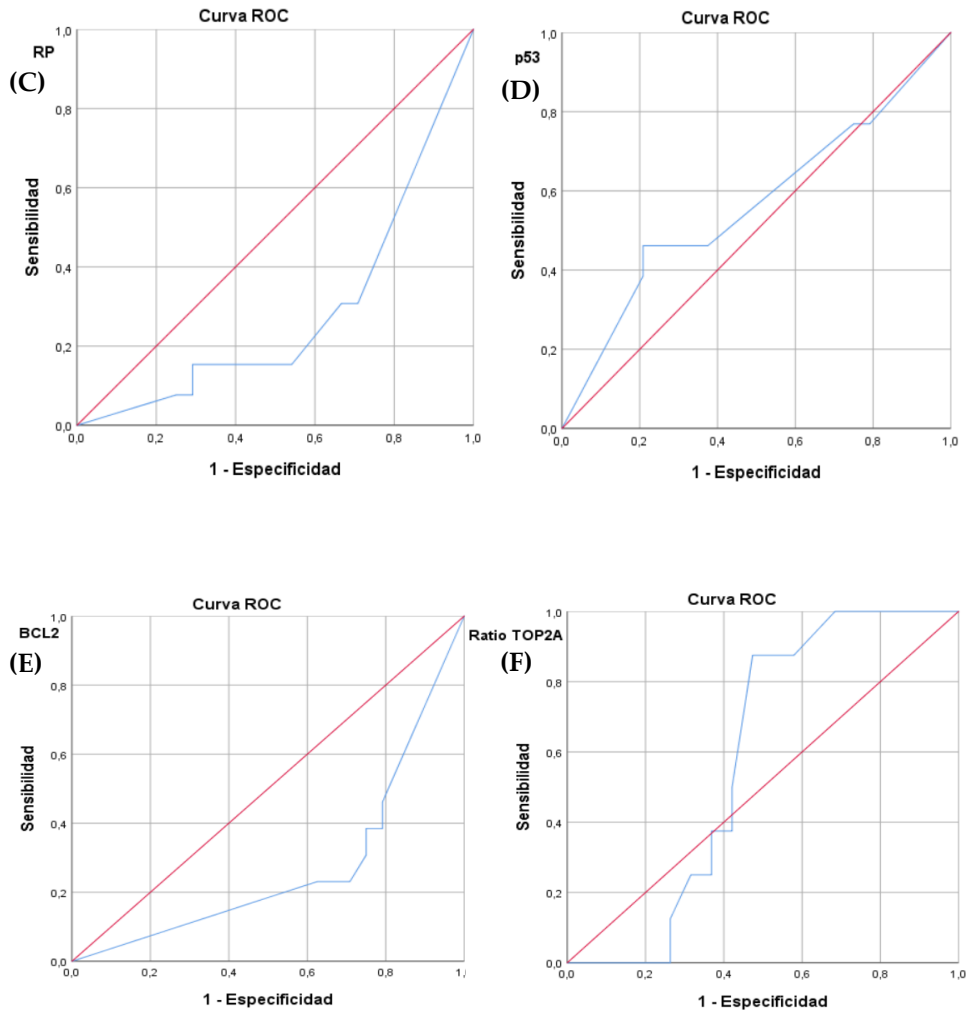


Figura 24. (A-F) Curvas ROC para Ki67, RE, RP, BCL2, p53 y TOP2A.

El punto de corte para Ki67, obtenido mediante el índice de Youden es cercano a un 72% de expresión.

5.2.19. Análisis de la respuesta completa patológica tras tratamiento neoadyuvante

5.2.19.1. Análisis de relación entre la RCP y la expresión de FSCN1 y TOP2A

Se ha realizado una regresión logística binaria para la valoración entre la expresión FSCN1 y la RCP al tratamiento neoadyuvante (ver figura 25).

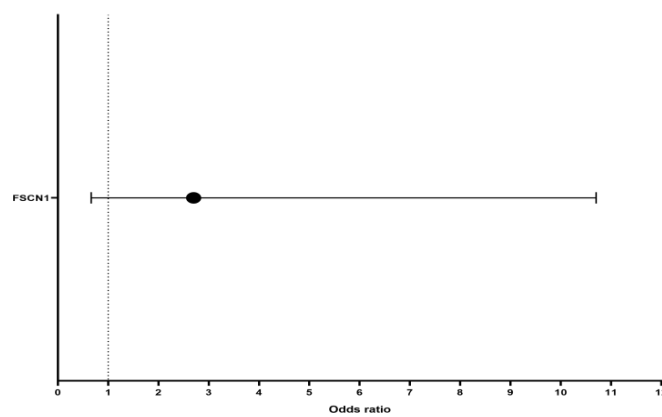


Figura 25. Forest plot para el Odds Ratio (OR) de FSCN1.

El resultado obtenido (OR: 2,7; IC95%=0,664-10,704; $p=0,167$) no muestra una relación estadística. La valoración similar considerando *TOP2A* no pudo realizarse, ya que los pacientes con RCP no disponían de suficiente cantidad de determinación FISH de *TOP2A* para realizar el análisis estadístico.

5.2.19.2. *Análisis de relación entre la expresión otros marcadores IHQ y otros variables clínica con la RCP*

Se realizan las correspondientes regresiones logísticas binarias univariantes para valorar la RCP tras tratamiento neoadyuvante con: Ki67, RE, RP, p53, BCL2, Ki67, E-Cadherina, grado histológico SBR, menopausia, edad, estadio tumoral agrupado, subtipo histológico, subtipo molecular y si son TN o no (ver tabla 55 y figura 26).

Tabla 55. Regresiones logísticas binarias de determinaciones IHQ habituales.
IC 95%: Intervalo de confianza del 95%.

Regresión logística binaria	OR	IC 95%	<i>p</i>
RE	1,029	1,009-1,050	0,005
RP	1,020	0,996-1,044	0,098
p53	0,989	0,972-1,007	0,239
BCL2	1,024	1,006-1,043	0,010
Ki67	0,957	0,930-0,986	0,003
E-Cadherina	1,917	0,110-33,412	0,656

Tabla 56. Regresiones logísticas binarias de otros datos clínicos relevantes.
IC 95%: Intervalo de confianza del 95%.

Regresión logística binaria	OR	IC 95%	<i>p</i>
Grado Histológico SBR	0,434	0,196-0,963	0,040
Menopausia	1,731	0,411-7,288	0,455
Edad	1,022	0,941-1,067	0,956
Estadio Clínico	3,680	1,026-13,197	0,046
Subtipo Histológico	0,871	0,528-1,436	0,588
Subtipo Molecular	0,169	0,045-0,641	0,009
TN/NO TN	7	1,350-36,306	0,021

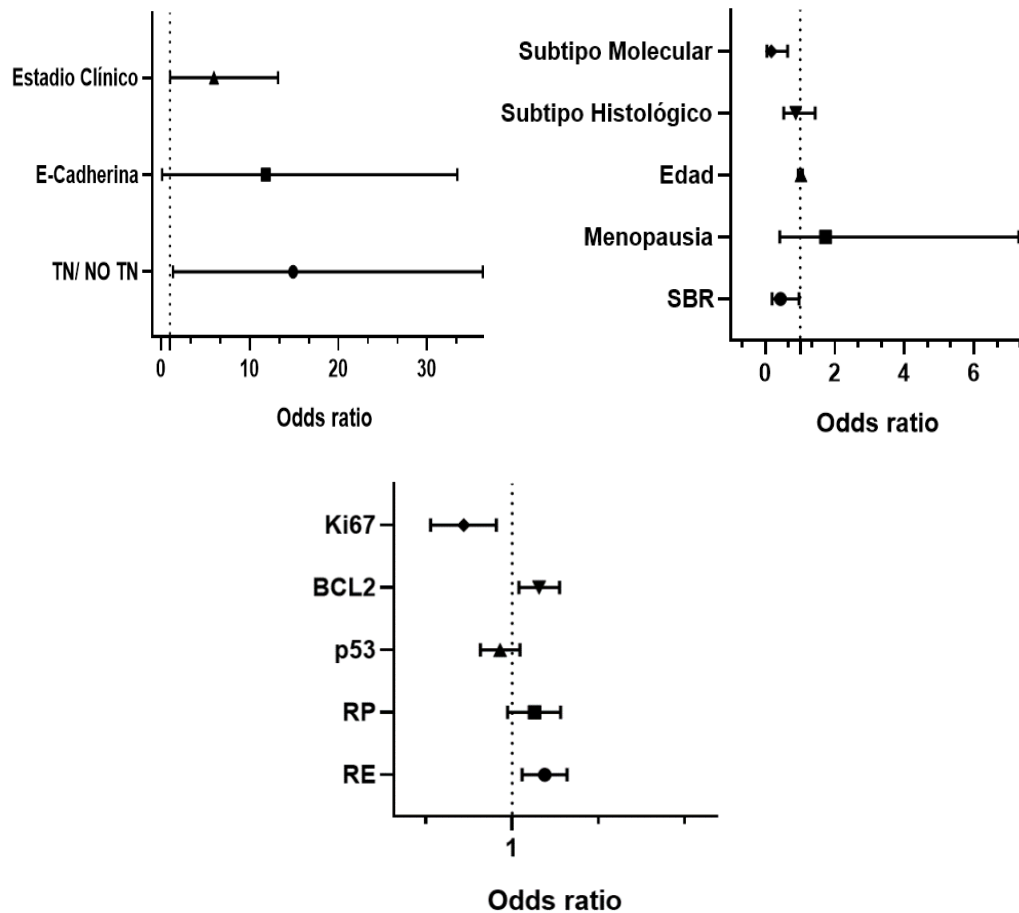


Figura 26. Forest plot para el OR de determinaciones IHQ habituales y de otros datos clínicos relevantes.

Se observa una significación estadística para: RE, BCL2, Ki67, grado histológico SBR, estadio tumoral agrupado, subtipo molecular y agrupamiento por ser TN o no. Para RE, estadio tumoral agrupado, TN y BCL2 el OR es superior a 1; en cambio para grado histológico SBR, Ki67 y subtipo molecular OR es menor de 1.

Se decide realizar un análisis multivariante, ver tabla 57, con las variables significativas: estadio clínico, grado histológico SBR y subtipo molecular. No se incluyeron: RE, Ki67 y BCL2, por haber mostrado una correlación significativa en la correlación de Pearson anteriormente realizada.

Tabla 57. Análisis multivariante mediante regresión logística binaria en la RCP.

Regresión logística binaria	OR	IC 95%	<i>p</i>
Estadio clínico	9,066	0,875-93,880	0,065
Grado Histológico SBR	2,576	0,477-13,925	0,272
Subtipo molecular	0,037	0,002-0,819	0,037

Tras esto, sólo el subtipo molecular permanece como un variable independiente de pronóstico de la respuesta completa patológica ($p=0,037$).

5.2.20. Análisis de supervivencia y tiempo libre de enfermedad

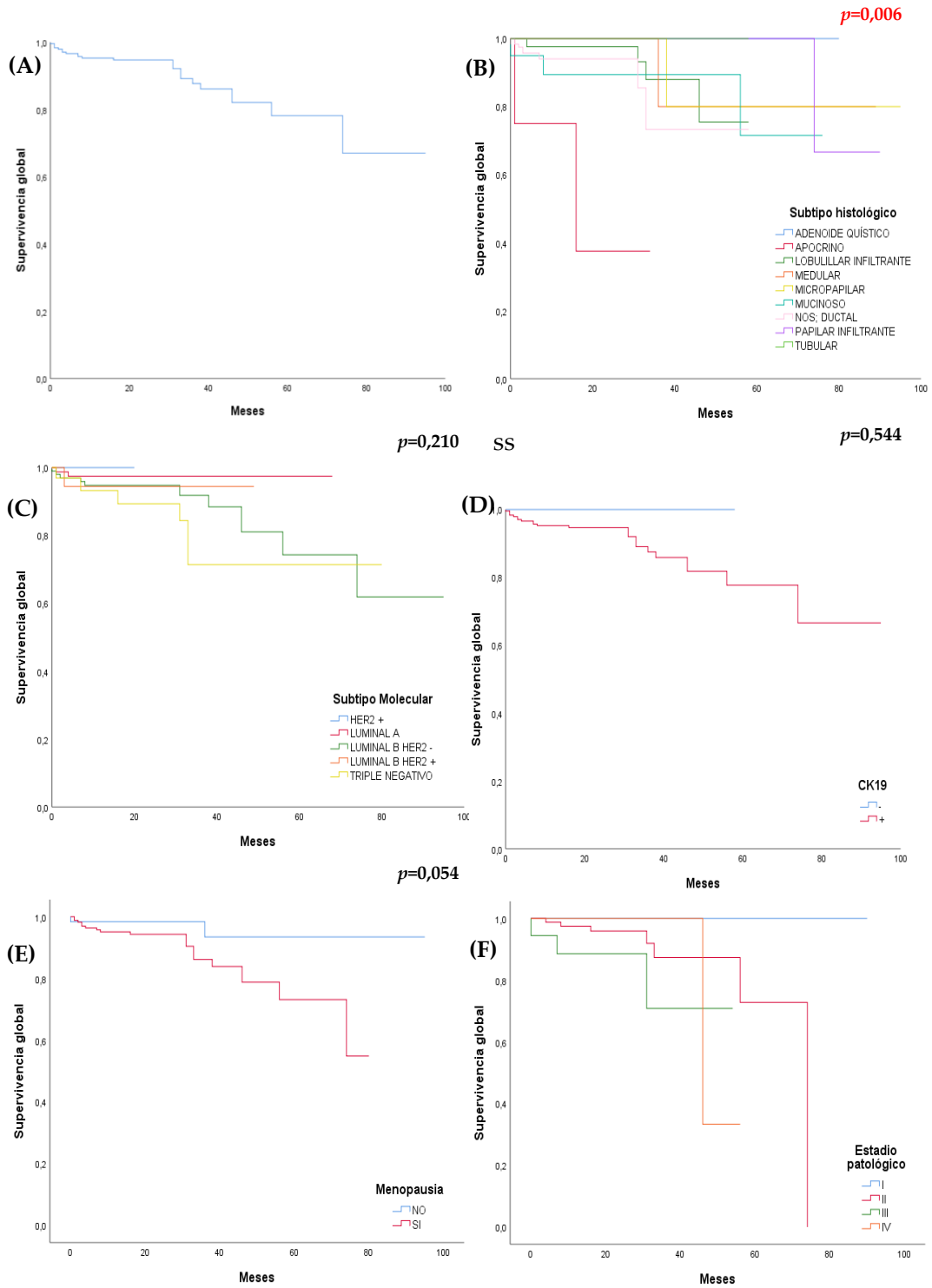
5.2.20.1. Supervivencia global según las variables a estudio

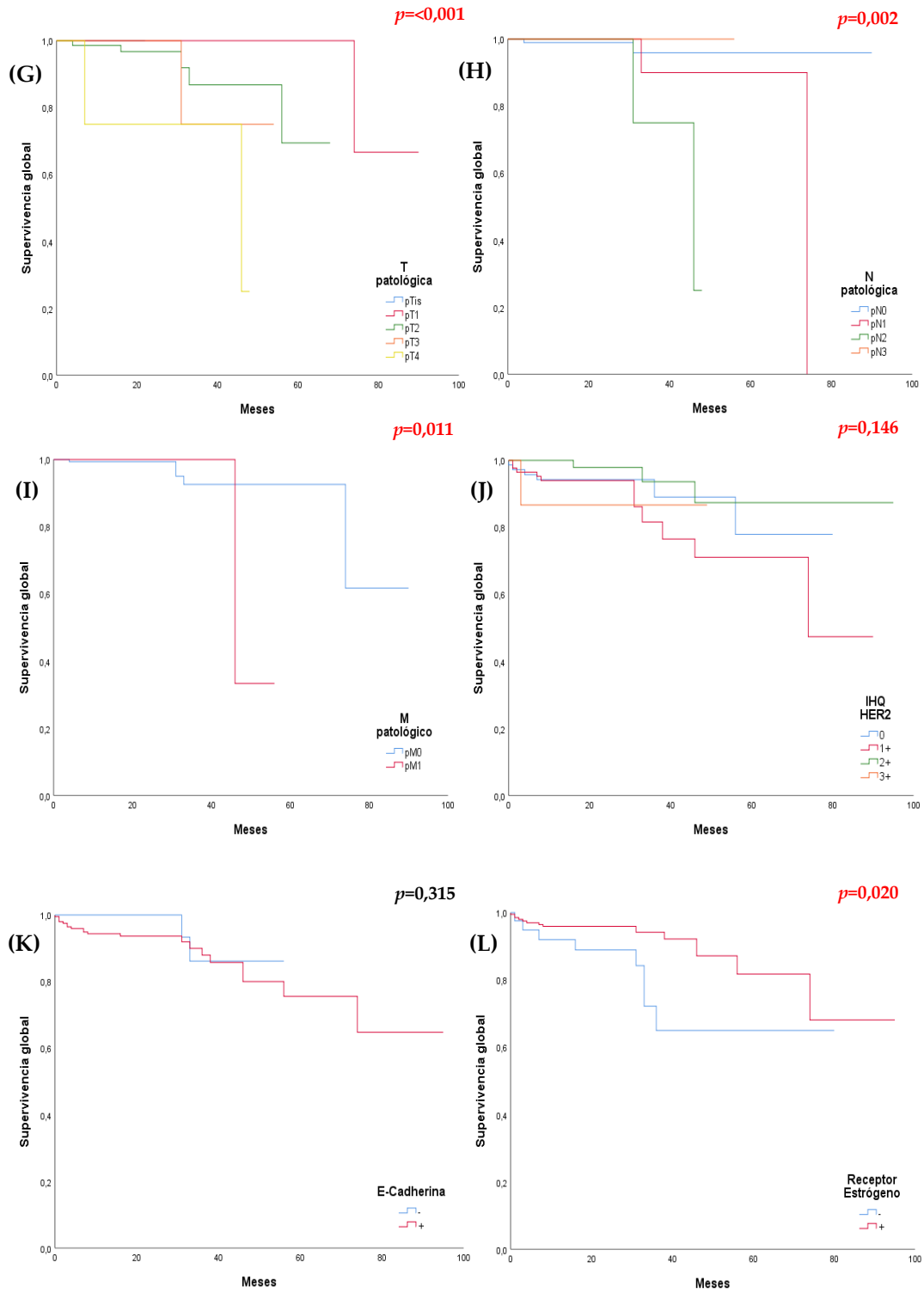
En la tabla 58 y figura 27 (B-S), se expone la supervivencia global respecto a distintas variables: subtipo histológico, subtipo molecular, CK19, menopausia, estadio tumoral clínico, tamaño tumoral clínico, ganglios afectos clínicos, metástasis clínica, IHQ HER2, E-Cadherina, RE, RP, p53, BCL2, Ki67 (con punto de corte del 14%), edad (con punto de corte de 65 años), grado histológico SBR (agrupado en grados), *TOP2A* y *FSCN1*. En la misma figura 27 (A) también se representa la supervivencia global.

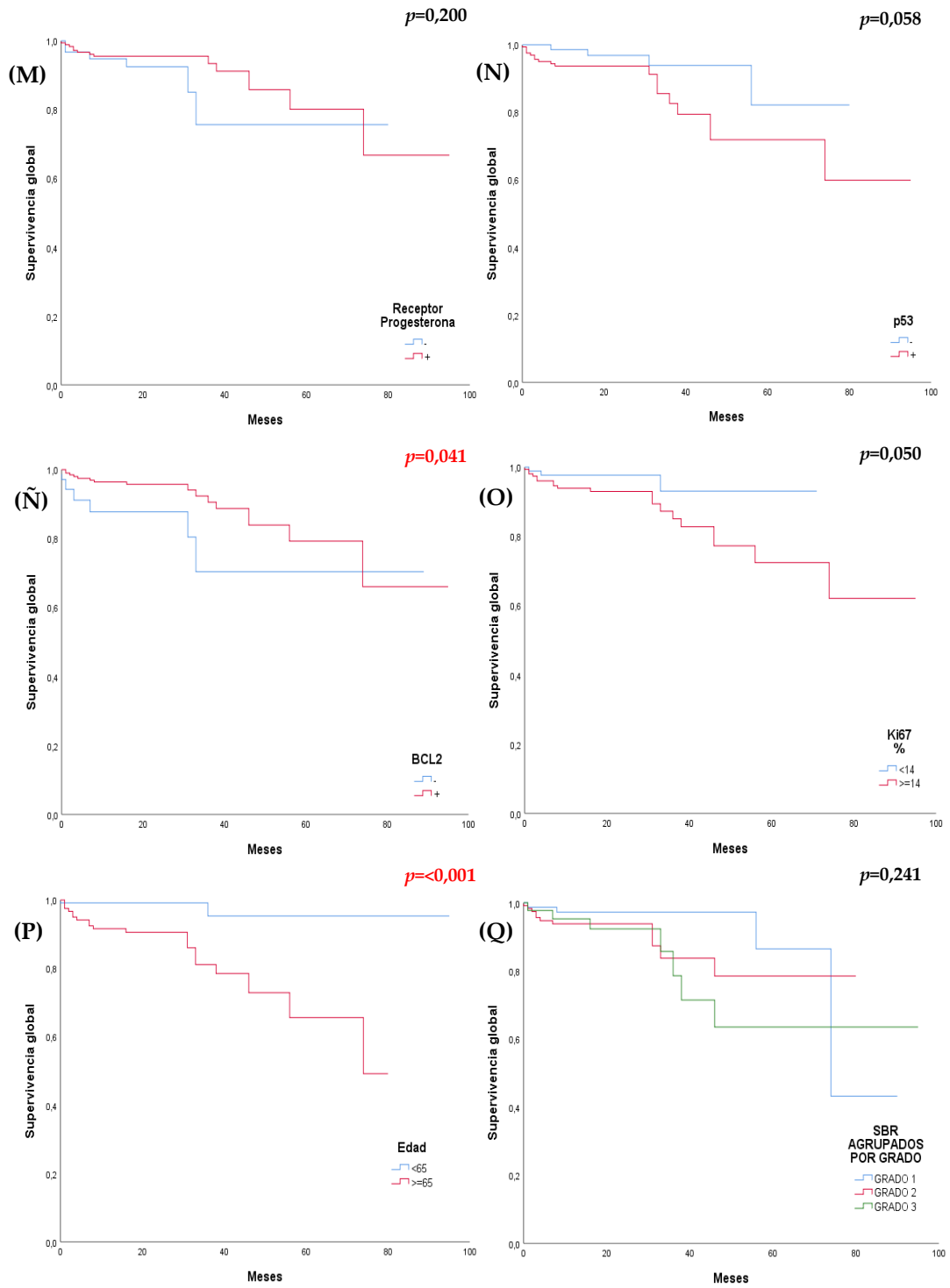
Tabla 58. Resultados de los análisis univariantes de la supervivencia global de enfermedad (Mantel-Cox) de nuestra serie en relación con las distintas variables a estudio.

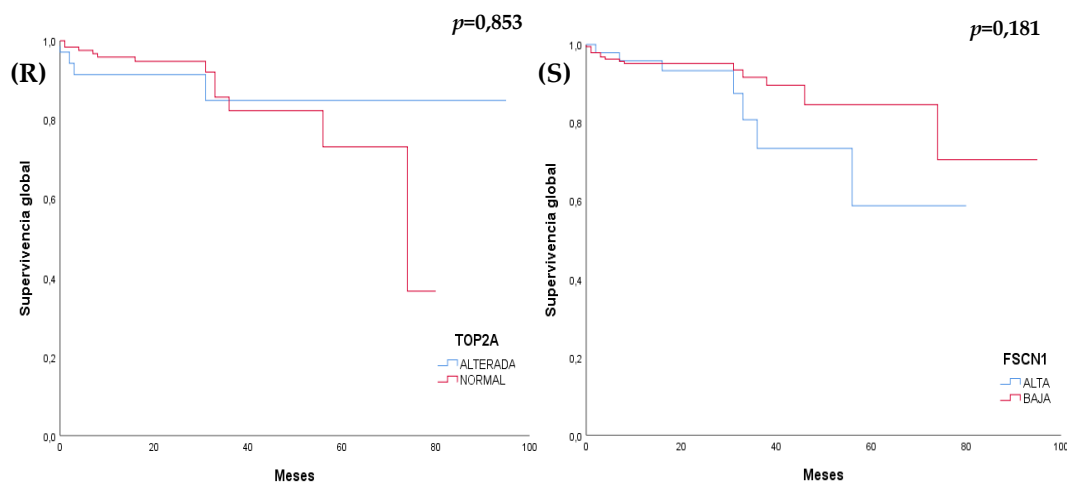
Log Rank (Mantel-Cox)	Chi-cuadrado	Grados de libertad	<i>p</i>
Subtipo histológico	21,642	8	0,006
Subtipo molecular	5,857	4	0,210
CK19 (+/-)	0,368	1	0,544
Menopausia (Sí/No)	3,727	1	0,054
Estadio tumoral patológico	14,805	3	0,002
Tamaño tumoral (T patológica)	21,895	4	<0,001
Ganglios afectos (N patológica)	15,377	3	0,002
Metástasis (M patológica)	6,477	1	0,011
IHQ HER2	5,382	3	0,146
E-Cadherina (+/-)	1,009	1	0,315
Receptor estrógeno (+/-)	5,456	1	0,020
Receptor progesterona (+/-)	1,646	1	0,200
p53(+/-)	3,585	1	0,058
BCL2(+/-)	4,192	1	0,041
Ki67(<14%/≥14%)	3,836	1	0,050
Edad(<65/≥65)	12,657	1	<0,001
Grado Histológico SBR (agrupado)	2,844	2	0,241
TOP2A	0,034	1	0,853
FSCN1	1,783	1	0,181

Figura 27. (A-S) Gráficas de supervivencia global (Kaplan-Mier) de la serie a estudio y en relación con las distintas variables a estudio.









Posteriormente se realizó una regresión de Cox, ver tabla 59, con las variables que fueron estadísticamente significativas en el análisis univariante anterior: subtipo histológico, estadio patológico, RE, BCL2 y edad. No se analizan al estar implícito dentro del estadio patológico: T patológica, N patológica y M patológica.

Tabla 59. Resultados regresión de Cox para la supervivencia global.

Variable	Cociente de Riesgo	Intervalo confianza 95%	<i>p</i>
Subtipo histológico	2,437	0,648-9,162	0,187
Estadio patológico	2,803	1,467-5,356	0,002
Receptor Estrógeno (+/-)	3,120	0,157-61,854	0,455
BCL2(+/-)	0,349	0,056-2,190	0,261
Edad(<65/≥65)	5,098	0,627-41,410	0,128

Después de todos estos resultados, sólo el estadio patológico ($p=0,002$) se muestra como una variable independiente en el análisis multivariante de la supervivencia global.

5.2.20.2. Supervivencia libre de enfermedad según las variables a estudio

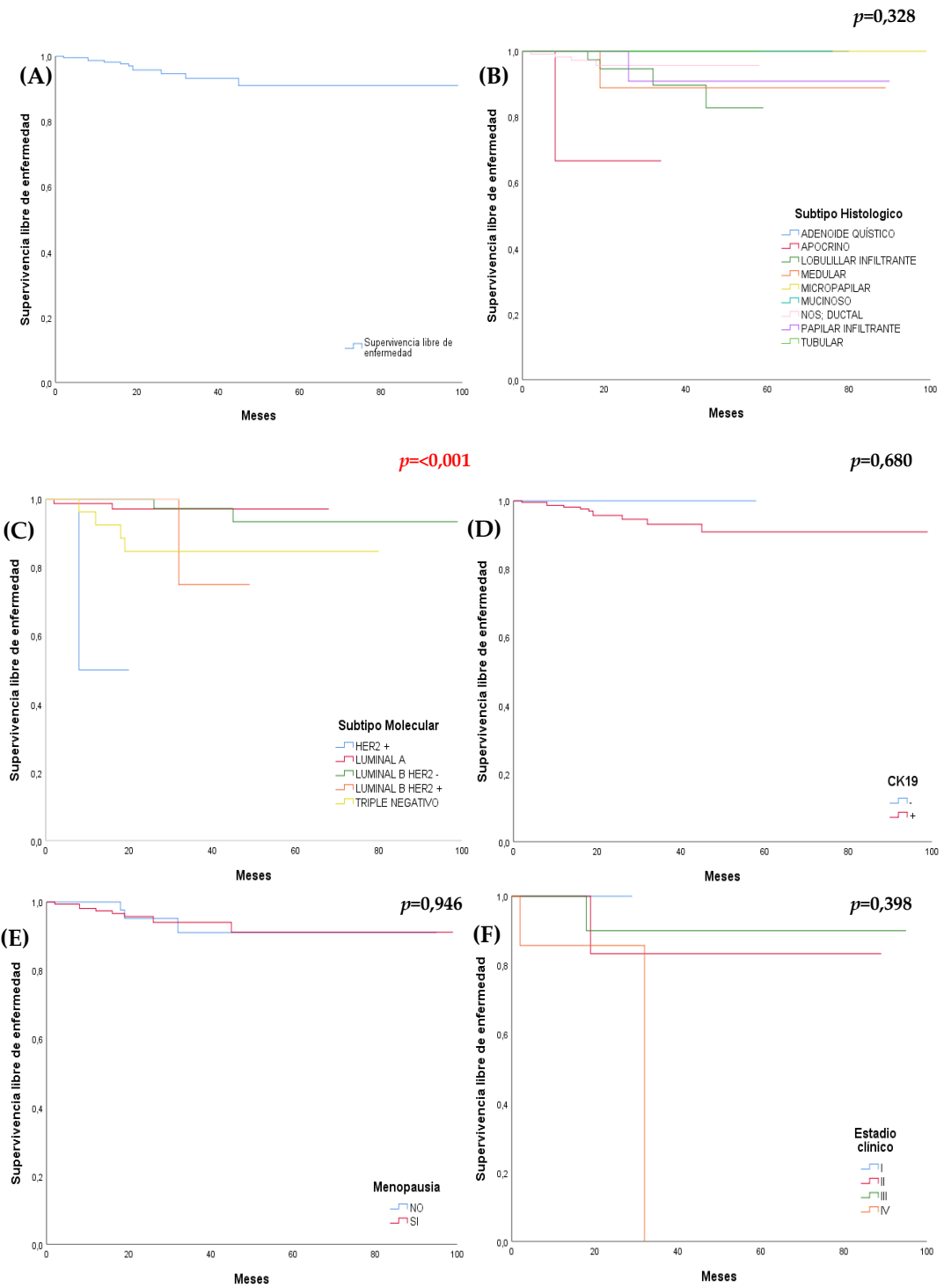
En la tabla 60 y figura 28 (B-S), supervivencia libre de enfermedad respecto a las variables: subtipo histológico, subtipo molecular, CK19, menopausia, estadio tumoral clínico, tamaño tumoral clínico, ganglios afectos clínicos, metástasis clínica, IHQ HER2, E-Cadherina, RE, RP, p53, BCL2, Ki67(con punto corte 14%), edad (punto de corte 65 años), SBR (grados), TOP2A y FSCN1. En la misma figura 28 (A) puede apreciarse la supervivencia libre de enfermedad de la serie.

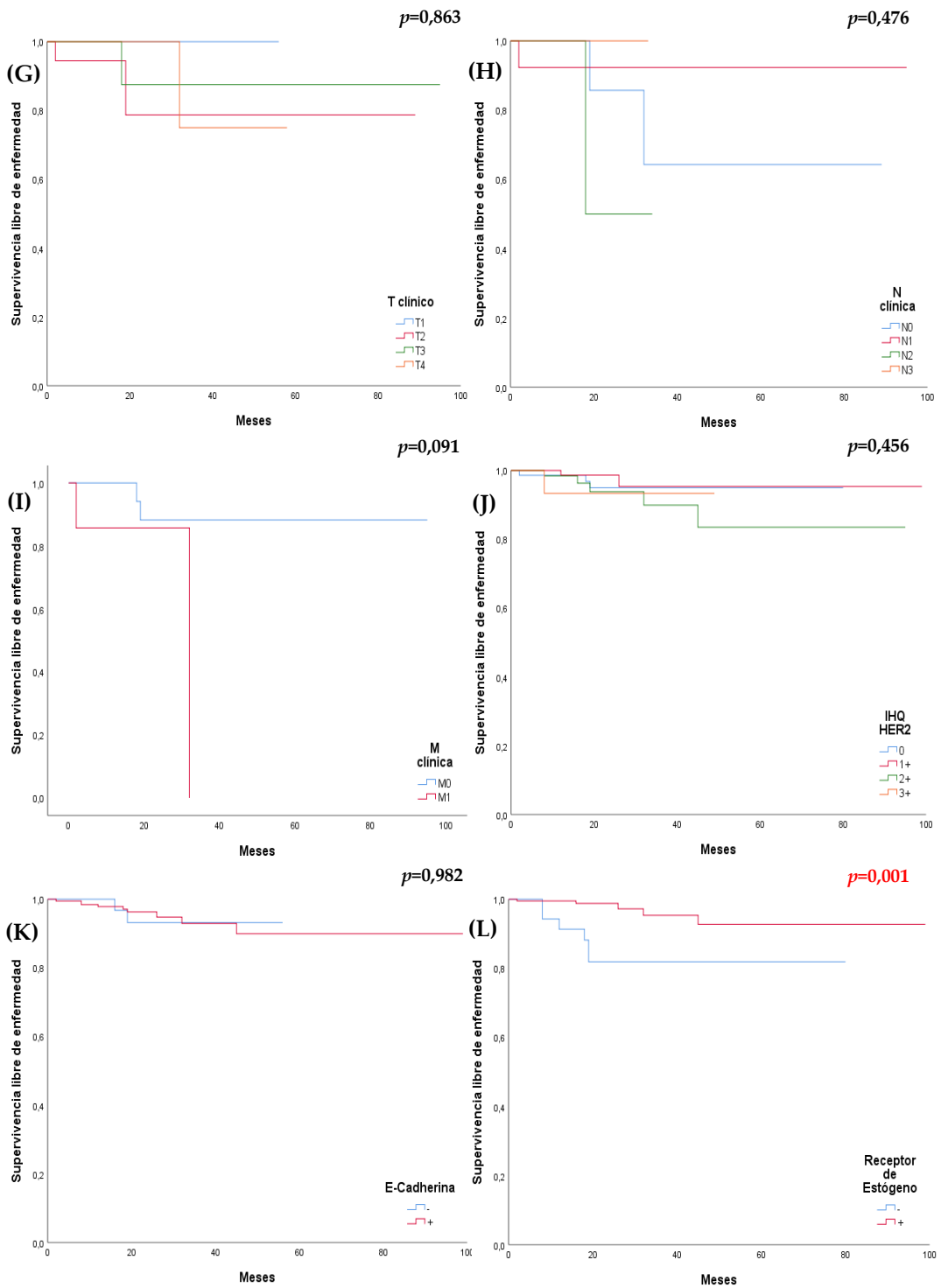
Tabla 60. Resultados de los análisis univariantes de la supervivencia libre de enfermedad (Mantel-

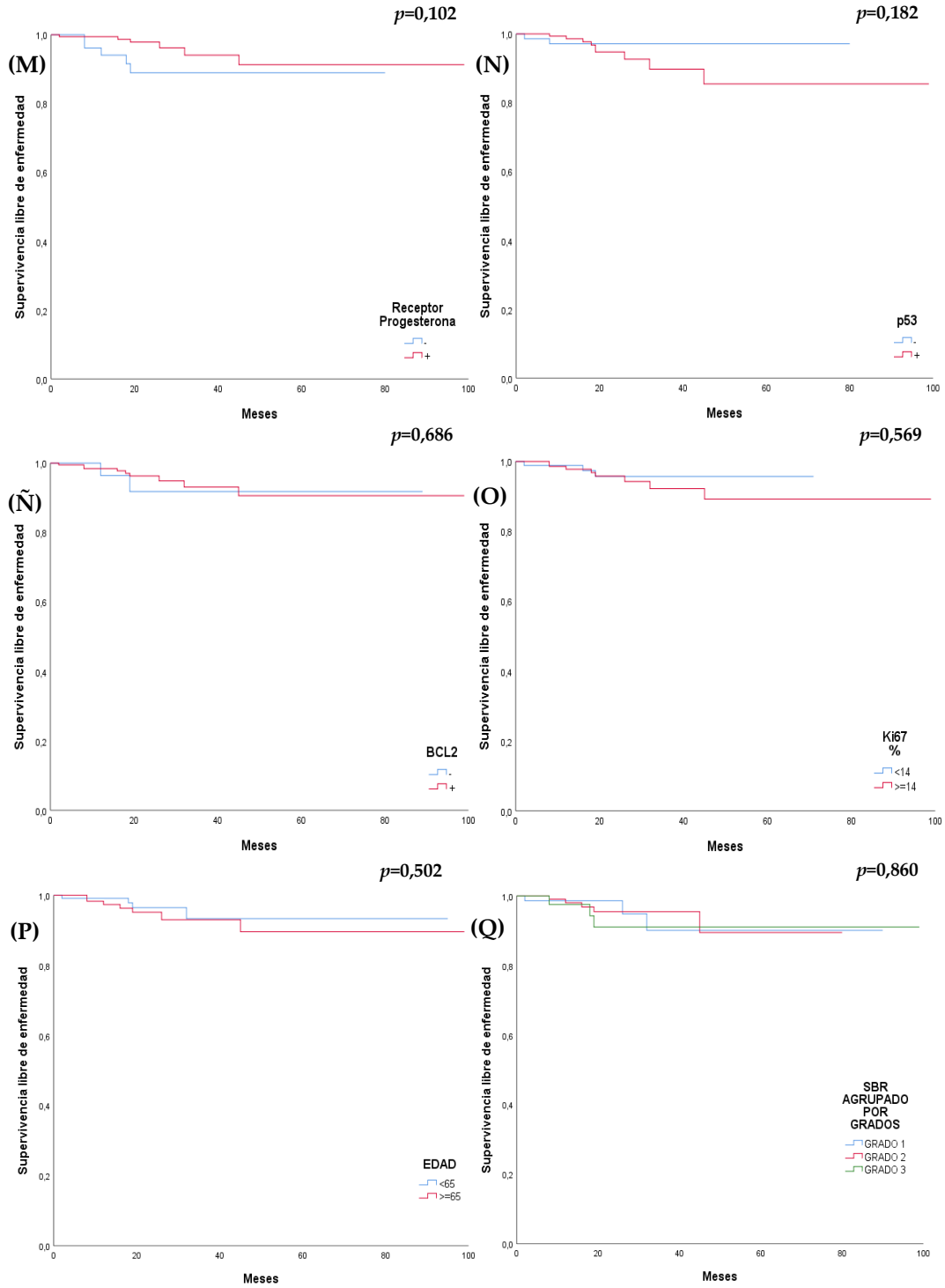
Log Rank (Mantel-Cox)	Chi-cuadrado	Grados de libertad	p
Subtipo histológico	9,177	8	0,328
Subtipo molecular	23,375	4	<0,001
CK19 (+/-)	0,170	1	0,680
Menopausia (Sí/No)	0,005	1	0,946
Estadio tumoral clínico	2,961	3	0,398
Tamaño tumoral (T clínica)	0,742	3	0,863
Ganglios afectos (N clínica)	2,498	3	0,476
Metástasis (M clínica)	2,852	1	0,091
IHQ HER2	2,606	3	0,456
E-Cadherina (+/-)	0	1	0,982
Receptor estrógeno (+/-)	10,265	1	0,001
Receptor progesterona (+/-)	2,680	1	0,102
p53(+/-)	1,783	1	0,182
BCL2(+/-)	0,164	1	0,686
Ki67(<14%/≥14%)	0,324	1	0,569
Edad(<65/≥65)	0,451	1	0,502
Grado Histológico SBR (agrupado)	0,301	2	0,860
TOP2A	0,003	1	0,954
FSCN1	1,735	1	0,188

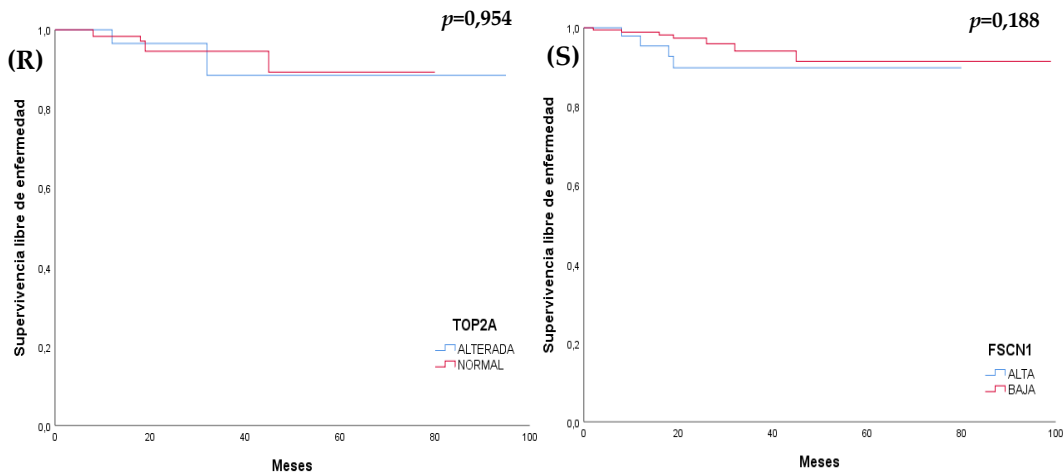
Cox) de nuestra serie en relación con las distintas variables a estudio.

Figura 28. (A-S) Gráficas de supervivencia libre de enfermedad (Kaplan-Mier) de la serie a estudio en relación con las distintas variables a estudio.









Posteriormente se realizó una regresión de Cox, ver tabla 61, con las variables que fueron estadísticamente significativas en el análisis univariante anterior: RE y subtipo molecular.

Tabla 61. Resultados regresión de Cox para la supervivencia libre de enfermedad.

Variable	Cociente de Riesgo	Intervalo de confianza (95%)	<i>p</i>
RE	0,084	0,016-0,456	0,004
Subtipo molecular	0,681	0,373-1,243	0,221

Después de todos estos resultados, sólo RE ($p=0,004$). se comporta como una variable independiente en el análisis multivariante de la supervivencia libre de enfermedad.

VI – DISCUSIÓN

VI -DISCUSIÓN

6.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO

La edad media de nuestros pacientes, que es de 64,69 años, es considerablemente más alta, probablemente en el contexto del mayor envejecimiento de nuestra población, en comparación con los estudios realizados sobre FSCN1 en otros países, como Irán, Corea y Turquía, donde las edades medias fueron de 48,4, 48,2 y 53,73 años respectivamente [178,185,188]. Similar ocurre con estudios sobre TOP2A, con media de edad de 45 años y 52,92 años [239,247]. Nuestra subclasificación molecular del cáncer de mama muestra diferencias con algunas series. Se aprecia menor cantidad de HER2+ que los reflejado en [178], con cifras que alcanza el 31,1% respecto al 0,8% de nuestra serie. La agrupación de los luminal B, en una única categoría en otros estudios, no difiere significativamente de nuestra serie, ya que al sumar tanto los luminal B HER2+ como los luminal B HER2-, obtenemos valores similares. No existe restricción alguna en la raza de los pacientes ni de género en nuestro estudio, al incluirse tanto mujeres como hombres. Algunos autores centran sus estudios en subgrupos raciales, como por ejemplo, en pacientes de raza negra con mayor incidencia de TN [179]. En cuanto al género, nuestra limitada representación de hombres (n=4), aunque parece estar en línea con la prevalencia del 1% del cáncer de mama en hombres, podría dejar sin determinar si la expresión de FSCN1 y ratio TOP2A varía en este subgrupo.

Ninguno de los estudios consideró el tipo de cirugía, tipo de tratamiento adyuvante o tipo de recidiva como variable. Solo se mencionó el tipo de cirugía como una característica de la población estudiada. No se encontraron datos en la literatura consultada que relacionen la recidiva tumoral con la expresión de FSCN1 y ratio TOP2A. Sin embargo, en cuanto al tratamiento, sí se observa una valoración de TOP2A y el uso de terapias con o sin antraciclinas. El porcentaje de mastectomías radicales de 19,4% fue similar al de otros estudios [188].

6.2. FASCINA 1

La FSCN1 es una proteína que se expresa en estructuras celulares asociadas con la motilidad celular, como los invadopodios. La presencia de estas estructuras facilita la invasión al estroma circundante y potencia la capacidad metastásica de los tumores. Es importante destacar, que la expresión de FSCN1 es mayor en células tumorales que en células sanas, y esta expresión tiende a incrementarse a medida que aumenta el grado histológico del tumor.

La edad, tanto en la series analizadas [187] como en la nuestra, a pesar de utilizar diferentes puntos de corte, no demuestra una relación con la expresión de FSCN1. La menopausia también carece de significancia estadística, tanto en nuestra serie como en las consultadas [182,184]. Dado que disponemos de los resultados de CK19 en nuestra serie, que es el marcador previo a la valoración del estudio de ganglio centinela por OSNA, así como, de la positividad o negatividad de E-Cadherina, se analizó de forma exploratoria su relación con FSCN1. No se evidenció ninguna relación, lo cual era previsible al tratarse de una CK común entre todos los tipos de cáncer de mama, y de una proteína de membrana utilizada exclusivamente para distinguir entre el carcinoma NOS y el carcinoma lobulillar.

La positividad del 26,2% de FSCN1 en [178], es similar a la "Alta expresión" en nuestra serie del 22,6%, y difiere del 16% de otra [183]. Sin embargo, en una serie japonesa [187], impresiona el valor de 56% y 26% de FSCN1 positiva en el subtipo luminal A y luminal B HER2+. Esto contrasta con el 14,2% y el 8,9% si consideramos la categoría "Alta expresión" respectivamente en estos grupos en nuestra serie, que asemeja más a otros estudios [188]. Por otro lado, se notifican expresiones de FSCN1 del 72,3% de total de 130 tumores de una población paquistaní [198]. Estos valores de expresividad tan dispares podrían explicarse por la presencia de variantes específicas en la población estudiada que aún no se conocen. Sin embargo, esto nos genera dudas sobre la comparabilidad de los sistemas de cuantificación utilizados.

Esta discrepancia, en nuestra opinión, se acentúa debido a la existencia de varios métodos para cuantificar la expresión de FSCN1. Algunos autores no aclaran del todo si existe un mínimo de expresión para considerarlo positivo, otros en cambio, tienen en cuenta cualquier positividad citoplasmática [178]. En la literatura, existen estudios que valoran la expresión de una forma cuantitativa, a

través de puntos de cortes arbitrarios de positividad (sin valorar el nivel de intensidad). En [182] se establece un límite de positividad del 5% y se denomina "extensamente positivo" si supera el 50%. Otra serie americana [183], considera que los tumores son FSCN1 positivos si al menos un 10% de la celularidad tumoral expresa FSCN1, en 1 de los 2 cilindros valorados, independientemente del grado de intensidad. En [189] y [187] implementan un sistema de puntuación semicuantitativo similar al nuestro, utilizando una agrupación categórica de la expresión de FSCN1. Evalúan tanto el porcentaje como la intensidad citoplasmática de la expresión de FSCN1, asignándole una puntuación de 0 a 3 puntos. Sin embargo, para categorizar en lo que denominan subgrupo de "Expresión fuerte", el primer estudio sólo considera necesaria una expresión en intensidad y no en porcentaje, a diferencia de nuestro enfoque. Por otro lado, el segundo estudio sí considera ambas características, y califica como "fascina positiva" si se obtiene una puntuación >3 . En un estudio coreano [188], se calculó un puntaje IHQ combinado, obtenido al multiplicar el grado de intensidad por el porcentaje de expresión. Sin embargo, el valor del área bajo la curva resultó ser de poca significación, y finalmente se consideró una expresión positiva de FSCN1 si el grado de intensidad era >1 .

Sin embargo, consideramos que la expresión de FSCN1, aunque débil, si es moderada-extensa en porcentaje en la población tumoral, debería ser considerada como "Alta expresión". Creemos que el método de categorización de la expresión de FSCN1 que utilizamos en esta investigación, dividido en dos grandes categorías: "Baja expresión" y "Alta expresión", permite una comparación más amplia con otros estudios. Un desafío clave para la evaluación de FSCN1 es la débil tinción citoplasmática, que genera dudas entre una tinción de fondo y una verdadera tinción. Este problema se intensifica en los bordes de las muestras [182], especialmente en casos de *microarrays*. Estamos de acuerdo en que el control interno de expresión de FSCN1 en la vasculatura parece ser suficiente, eliminando así la necesidad de controles externos. Consideramos, en sintonía con otros autores [184], que debemos ser precavidos con los resultados de estudios que evalúan el ARNm, ya que podrían estar analizando otras células no tumorales que presentan una alta expresión de FSCN1 en el frente tumoral, como los fibroblastos o los endotelios.

La elección de un clon de ratón monoclonal (clone 55k-2; Agilent Dako, Santa Clara, CA, EE. UU) está en consonancia con la mayoría de los estudios consultados.

La elección de un anticuerpo policlonal, en nuestra experiencia, añade una tinción débil de fondo, lo que dificulta su implementación para la valoración de ensayos clínicos y hace que el diagnóstico resulte más complicado. Por lo tanto, parece que el uso de un clon monoclonal puede ser una opción más efectiva y precisa para estos propósitos.

Nuestro estudio no analizó la necrosis debido a la dificultad de valorar la tinción de FSCN1 cuando ésta ocurre, con el probable incremento de falsos positivos, aunque otros estudios sí lo hicieron [188].

Al evaluar la correlación con otras variantes IHQ, nuestros resultados muestran una similitud con la mayoría de los estudios, donde la expresión de FSCN1 se correlaciona de forma inversa con la expresión de RH [167,178,182–184,188,192,193,195]. Aunque de forma esporádica, otros estudios no reflejan una significancia estadística [185]. El marcador de proliferación celular, Ki67, muestra una significancia en series [195], algunas con un punto de corte del 30% [187] o del 15% [184], similar a la nuestra donde el punto de corte se fija en el 14%.

La proteína supresora tumoral p53, muestra una significancia en prueba de T-Student pero no en una correlación de Pearson (con p53 dicotomizado positivo/negativo), hecho similar a lo observado en [184]. Esto último sí ocurre con el resto de las variables continuas (RH, BCL2, Ki67), excepto con el grupo de *TOP2A*. Sí se evidenció relación de p53 con FSCN1 en un estudio coreano [188]. Sin embargo, es importante mencionar, que esta posible asociación no ha sido analizada en la mayoría de los estudios consultados.

Nuestros resultados muestran una correlación de FSCN1 tanto con el subtipo histológico como con el subtipo molecular, una relación que no se ha observado en todas las series [178]. A pesar de que algunos estudios sí reflejan la clasificación histológica de los tumores según WHO, su inclusión es poco común e incluso cuando se lleva a cabo, rara vez se realiza una evaluación estadística independiente de su posible relación con FSCN1 [182,183]. Al considerar el subtipo histológico, destaca la “Alta expresión” de FSCN1 en algunos subtipos histológicos menos frecuentes en la práctica clínica diaria, como el subtipo medular y el subtipo apocrino (en 6 de 12 casos analizados y en 2 de 5 casos analizados, respectivamente en nuestra serie). Este descubrimiento parece tener suficiente relevancia como para considerar la inclusión de estos subtipos en futuras investigaciones.

La expresión de FSCN1 ya ha sido documentada en los tumores de peor pronóstico, como son los TN, que han sido los más estudiados [184,185,187–189,195,269], y en menor medida en los hormonodependientes y en los de mejor pronóstico. Este resultado es coherente con nuestros hallazgos, donde sólo el 14,2% de la “Alta expresión” de FSCN1 se observa en subtipo Luminal A, alcanzando el 48,2% en TN. Nuestra restringida representación del subtipo HER2 limita la evaluación. Sin embargo, la literatura indica que el subtipo HER2 generalmente muestra una expresión negativa o muy escasa de FSCN1 [193].

Resulta razonable considerar a FSCN1 como un marcador predictivo de subtipos de cáncer de mama más agresivos, al ser una proteína del citoesqueleto y fundamental en la creación de invadopodios. En un estudio chino [189], consideraron valorar la expresión de FSCN1 como un herramienta de cribado de los TN, en aras de evitar el costo del estudio FISH en resultados de IHQ HER2 2+. Se informó de una alta sensibilidad y especificidad, del 78% y 92% respectivamente. Un estudio sobre una población de mujeres afroamericanas [179] obtuvo una sensibilidad y especificidad de FSCN1 para predecir TN del 82,1% y 80% respectivamente, con un área bajo la curva de 0,81. La relación entre las alteraciones de HER2 y FSCN1 no son significativas en nuestra serie, aunque si cercanas, con $p=0,050$, dato similar a [183] pero diferente al evidenciado en un estudio estadounidense in vitro, donde se apreció una relación entre el aumento de expresión de HER2 y la de ARNm de la FSCN1.

La relación estadística con estadio TNM, tanto clínico como patológico en nuestra serie no es significativa, similar a un estudio coreano [192]. Otros estudios asocian los descriptores del TNM de forma dispar. Se aprecia asociación con el tamaño tumoral [178] e invasión ganglionar [192,193] con la expresividad de FSCN1, así como, con la invasión linfática [167] o con la existencia de un componente in situ extenso [185]. Estos datos manifiestan una asociación de FSCN1 con aspectos histológicos de enfermedad avanzada. Otros estudios muestran una relación con el estadio tumoral pero no con el tamaño tumoral [189]. Por último, y en menor cuantía, existen estudios donde no se evidencia relación ni con el TNM ni con el grado histológico tumoral [182], quizás limitado por ser una serie de $n<100$ pacientes. Los tumores con un pronóstico desfavorable suelen presentar un grado tumoral más elevado, cuantificado por el sistema de SBR internacionalmente implantado. El resultado de $p<0,001$ de la FSCN1 respecto a SBR por separado y

agrupado por grados en nuestra serie, está en concordancia con lo evidenciado en otros estudios [183,184,188,193]. Los valores de nuestra serie reflejan un aumento correlativo de la expresión de *FSCN1* a medida que aumenta el SBR. Por lo tanto, dado que *FSCN1* es una proteína capaz de regular otras asociadas a la metástasis, resulta lógico suponer que pueda existir una asociación entre *FSCN1* y los factores de mal pronóstico y progresión tumoral.

El papel de los polimorfismos del gen *FSCN1* no se ha explorado en nuestro estudio. Sin embargo, creemos que podría ser un área de interés para futuras investigaciones, dado que el costo de esta técnica no es excesivamente alto y podría proporcionar datos relevantes sobre la evolución del cáncer de mama [194].

6.3. TOPOISOMERASA 2 ALFA

La TOP2A es una enzima crucial que juega un papel vital en varios procesos celulares, incluyendo la transcripción del genoma y la replicación celular. Esta enzima participa en la decatenación y desenrollamiento del ADN, lo que permite que las hebras de ADN se separen, se transcriban y se repliquen de manera efectiva. Por esta razón, la TOP2A desempeña un papel crucial en la cancerogénesis.

En nuestro estudio planteamos una valoración por FISH mediante cuantificación del ratio de copias de este gen respecto a CEP17, en un total de 175 pacientes. La media de ratio obtenida es de 1,28, que se sitúa dentro de la normalidad según la categorización elegida [231]. En nuestra serie de 265 pacientes, no fue posible realizar una evaluación adecuada de *TOP2A* en 90 de ellos, ya sea debido a la mínima cantidad de células presentes, la falta de hibridación, o la indisponibilidad de material por ser la última técnica ejecutada. Para la mayoría de los estudios inferenciales, se optó posteriormente por una clasificación dicotómica/agrupada en dos grupos: "Normal" y "Alterado". Esta decisión busca simplificar los resultados e incrementar la posibilidad de comparar nuestros hallazgos con los de otras investigaciones. Un estudio egipcio consideró tanto el ratio, como la relación entre el número de copias de CEP17 y *TOP2A*. El mismo estudio apreció una significación entre la polisomía de CEP17 y las alteraciones en el número de copias del gen de *TOP2A* [270].

En cuanto a la evaluación, existe una notable variabilidad, aunque se destacan cinco mecanismos principales para valorar la TOP2A: mediante uso de

IHQ [232], expresión ARNm en *microarrays*, RT-PCR, CISH y FISH *TOP2A/CEP17* (este último es el utilizado en nuestra investigación, con un punto de corte para amplificación de >2 similar a la literatura consultada). La presencia de diferentes mecanismos de medición da lugar a datos que pueden ser difíciles de comparar. En un estudio español [229] se compararon diferentes técnicas de determinación, encontrando similitudes entre los resultados obtenidos por IHQ (con puntos de cortes entre 5-30% [247,271]) y los de expresión de ARN o RT-PCR. Sin embargo, los resultados obtenidos por FISH no mostraron correlación con los obtenidos mediante el estudio de: ARNm, RT-PCR o IHQ. Difiere de la sí relación estadística comunicada en un estudio japonés entre la expresión de IHQ con FISH dicotomizado (“Amplificado” y “No amplificado”) [248]. En otra investigación con RT-PCR y análisis de ARNm notificaron la existencia de sobreexpresión de *TOP2A* en ausencia de alteraciones en *HER2* [272]. Como los autores del estudio español sugieren, el comportamiento dispar puede deberse a alteraciones biológicas diferentes. Por lo tanto, dado que hay señales celulares que pueden aumentar la expresión de la proteína independientemente del número de copias, y su asociación con otros marcadores de proliferación celular, la amplificación de *TOP2A* y la sobreexpresión de *TOP2A* no deben considerarse sinónimos.

Nuestra amplificación y delección se sitúa en el casi 7% y 3,4% de las muestras valorables. Una serie canadiense [273], con una muestra de 438 pacientes obtienen valores algo más elevados, del 12% y 6% respectivamente. Otros estudios realizados en España, Estados Unidos y Taiwán reportan respectivamente cifras similares, con un 8,6% de amplificación en una muestra de 232 casos [274], 9,4% en 153 pacientes [235], o 9,8% en 296 casos [245]. Valores de delección del 2,7% en el caso del estudio taiwanés [245], 5,4% en el estudio americano [235] y 2,1% en un estudio coreano [275]. El gran desafío surge cuando debemos comparar con otros estudios de la literatura, que utilizan la valoración por IHQ para *TOP2A*. En estos casos se observa una mayor positividad, con un 29,3% de los casos mostrando sobreexpresión de *TOP2A* [247], e incluso del 55,8% en un estudio japonés [248].

Otro aspecto relevante es la cercanía en el cromosoma 17q12-21 del gen *TOP2A* y el gen *HER2*. Estudios por FISH han evidenciado una tendencia elevada a la co-amplificación con valores del 8,4% [245], aunque también existen estudios con cifras inferiores del 3,7% [239]. En la literatura se describen casos de delección de *TOP2A* con amplificación de *HER2* [245]. En un estudio con 245 pacientes no se

detectó ninguna deleción [239]. Nuestros resultados no manifiestan ningún caso de co-amplificación, ni de deleción de *TOP2A* con amplificación de *HER2*. Aunque la amplificación conjunta de ambos genes ha generado controversia en la literatura científica, la tendencia predominante sugiere que la amplificación de uno no necesariamente implica la amplificación o modificación del otro, a pesar de su proximidad cromosómica [234].

Nuestros hallazgos vinculan el incremento de las copias del gen *TOP2A* con un mayor porcentaje de Ki67, similar al estudio [274], o a otros que realizan la valoración de *TOP2A* por IHQ [240,241,247,248] e incluso con CISH [246,276]. El grupo de *TOP2A* muestra relación con el grado histológico SBR, principalmente en nuestro estudio con el grado 2, donde se observan alteraciones en el 50% de los casos (28/56). SBR se asocia estadísticamente con *TOP2A* en otros estudios con medición por IHQ [240,247,277] y por FISH [275]. El papel de Ki67 como un indicador de proliferación celular y la necesidad de la proteína *TOP2A* para facilitar este proceso, podría sugerir una correlación entre ambos en tumores de rápido crecimiento. Como dato relevante, tanto Ki67 como SBR, también resultaron ser significativos para FSCN1. Respecto a la valoración con correlación de Pearson con otros marcadores IHQ continuos (RE, RP, Ki67, p53 y BCL2) no se evidenció ninguna relación.

Otros estudios reflejan una relación estadística con mayor expresividad por IHQ/alteración del número de copias de *HER2* [229,232,245,248,273,274], ausencia o disminución de expresión de RH [241,246,274], estadio tumoral [229] o tamaño tumoral [241,249,273], mayor grado tumoral [232] y presencia de ganglios linfáticos positivos [232]. Respecto a esta última asociación existen resultados contradictorios [273] o donde se asocian niveles de *TOP2A* más bajos [249].

Respecto al subtipo molecular, se demostró relación significativa en nuestro análisis ($p=0,041$), donde destaca el 52,6% de alteración de *TOP2A* en el subtipo luminal B HER-. Estos datos son similares en estudios por IHQ [248] con valores del 56% en el subtipo luminal B agrupado. Este mismo estudio difiere drásticamente cuando se valora *TOP2A* por FISH, obteniendo una alteración de *TOP2A* en el subtipo luminal B en un 0,3%. Los valores respecto al subtipo HER2+ no fueron tan dispares en este estudio. Otro estudio portugués mostró significancia con el subtipo molecular con medición de *TOP2A* por CISH [276]. A causa de nuestra limitada representatividad del subtipo HER2+, no pudimos realizar una

evaluación tan exhaustiva como hubiéramos deseado. Sin embargo, es notable que un estudio español reportó una significancia estadística con una amplificación del 66% en el subgrupo HER2+ [274] evaluado tanto por IHQ como por FISH.

En la literatura se han identificado escasos estudios que realicen un análisis inferencial basado en el subtipo histológico del cáncer de mama. Uno de ellos no evidenció relación y sólo incluyó los subtipos: NOS, lobulillar y mixto [274]. Otro estudio croata decide, a pesar de disponer de los subtipos por separado, reunificarlos en 2 grandes grupos histológicos para el análisis estadístico: “NOS” y “OTROS”, obteniendo resultados significativos mediante una valoración por IHQ de TOP2A con punto de corte del 37% [240]. Similar, pero sin significancia estadística, un estudio portugués agrupó también de forma dicotómica el subtipo histológico [276]. A pesar de que rara vez se considera el subtipo histológico, un estudio alemán [239] y otro turco [241], sí realizaron la subdivisión histológica. El estudio alemán los dividió en: NOS, lobulillar infiltrante, mixto, mucinoso y adenoide quístico (n=1 en los últimos tres subtipos). El estudio turco notificó: carcinoma NOS, carcinoma lobulillar infiltrante, carcinoma mixto, mucinoso, metaplásico, medular, tubular, papilar, apocrino, micropapilar, anillo de sello, pleomórfico y cribiforme. Ninguno de estos dos estudios realizó posteriormente ningún análisis inferencial específico con el subtipo histológico. Cabe destacar que esta variable no ha sido estudiada en la mayoría de las investigaciones y que en nuestra serie, con parcial representatividad de los diferentes subtipos histológicos, tampoco se evidencian resultados significativos. Sin embargo, es importante mencionar que *TOP2A* se altera en nuestra serie en el 47,6% de los carcinomas mucinosos e inesperadamente en el 25% de los carcinomas lobulillares.

A pesar de no haber sido examinado en nuestro estudio, una serie japonesa [249] evaluó los niveles de TOP2A antes y después del tratamiento en respuestas parciales. Los resultados mostraron un aumento en la expresión de TOP2A en las muestras tomadas después del tratamiento.

La evaluación de la necrosis geográfica y de la afectación del pezón fue considerada en un estudio turco, con valoración TOP2A medida por IHQ. Se encontró una asociación estadísticamente significativa y de sentido positivo entre ambas variables [241]. El análisis exploratorio, similar al realizado con FSCN1, de la relación de la ratio de TOP2A con CK19 y E-Cadherina en nuestro estudio, no mostró correlación alguna.

La relación de *TOP2A* valorado por FISH con: edad [248,273] (con excepción de un estudio Taiwanés con punto de corte en 50 años [245]), menopausia [247] y sexo no mostraron significancia estadística. p53 no mostró significación en nuestra serie pero sí en otras [244,274]. La comparación del grado histológico entre los diferentes estudios disponibles es complicada, ya que algunos de ellos solo consideran el grado nuclear.

6.4. RESPUESTA AL TRATAMIENTO ADYUVANTE, SUPERVIVENCIA GLOBAL Y TIEMPO LIBRE DE ENFERMEDAD

Respecto a la supervivencia en nuestra investigación la expresión FSCN1, no mostró relación alguna con la supervivencia global ni libre de enfermedad. Un estudio de 210 pacientes con un seguimiento de 5 años [183], mostró una relación entre la expresión de FSCN1 con la supervivencia global y tiempo libre de enfermedad mediante un análisis univariante. Otras investigaciones relacionan la FSCN1 con una menor supervivencia global [179,188,193], menor tiempo libre de enfermedad [167,188,193,277] y mayor resistencia al tratamiento adyuvante [188]. Es importante destacar que, aunque algunos estudios no realizan análisis multivariante, otros sí lo hacen [188,193]. En un estudio griego [195], obtienen una asociación con la FSCN1 con una peor supervivencia libre de progresión a los 5 años. Nuestros resultados podrían verse limitados debido a un seguimiento más corto, en comparación con otros estudios que evalúan un seguimiento de entre 5 a 10 años.

Al considerar *TOP2A*, nuestros hallazgos no muestran una asociación con la supervivencia global ni el periodo libre de enfermedad similar a [245]. Sin embargo, es importante mencionar que en la literatura científica existen estudios con resultados similares al nuestro [235,273], y otros que sí han documentado tal asociación tanto para supervivencia global [241,274], como para el periodo libre de enfermedad [241]. Este hecho se potencia, y de manera más significativa tras dicotomizar la ratio de *TOP2A* en "Normal" y "Alterado", si se estratifican respecto al uso o no de antraciclinas en el tratamiento neoadyuvante [234,273]. Además, se reflejó cierto efecto aditivo de estos resultados cuando existía la co-amplificación de *HER2* [273,274]. Un grupo japonés encontró una significancia en la supervivencia global en el subtipo luminal B en relación con una sobreexpresión de *TOP2A* valorada por IHQ [248]. Aunque el bajo número de casos en que ocurre

la co-amplificación de ambos genes dificultaría la comprobación o desarrollo de ensayos clínicos. Algunos autores sostienen que, según la literatura disponible, la mejor respuesta al tratamiento con antraciclinas en pacientes con amplificación de *HER2*, no se explica completamente por la presencia simultánea de alteraciones en *TOP2A* [235]. Esto se debe a que la mayoría de los casos con *HER2* amplificado presentan *TOP2A* sin alteraciones. En los estudios con valoración por IHQ, también se destaca una mayor tasa de recurrencia entre los 5 y 8 años, así como un menor tiempo libre de enfermedad y un menor tiempo libre de metástasis, con mayor trascendencia en pacientes con cánceres de subtipo luminal B y en estadios I [247]. El análisis multivariante de este estudio también notificó a *TOP2A* como un marcador independiente para el tiempo libre de metástasis. La distinción entre valorar la ratio *TOP2A/CEP17* y el número de copias de *TOP2A* [235] resultó ser irrelevante en un estudio, ya que no se encontró una asociación con la supervivencia en ninguno de los dos casos. En este mismo estudio, se evaluó la relevancia de la polisomía, analizada mediante el número de copias de *CEP17*, para la supervivencia global y el tiempo libre de enfermedad. Se encontró una relación con la supervivencia libre de enfermedad cuando el número de copias de *CEP17* era >3 en más de un tercio de la población tumoral.

Asimismo, se apreció en nuestro estudio una correlación en el análisis univariante de la supervivencia global con: subtipo histológico, estadio tumoral, *BCL2* y edad (con un punto de corte de 65 años). A pesar de ello, en el análisis multivariante sólo el estadio tumoral se manifiesta como una variable independiente. Al evaluar la supervivencia libre de enfermedad, nuestros datos identifican únicamente a RE como una variable independiente.

En cambio en la literatura, los análisis de supervivencia del cáncer de mama muestran una asociación con el grado histológico y estadio tumoral [188], así como, con la positividad o negatividad para RE y *HER2* [183].

En nuestra serie, la respuesta completa al tratamiento neoadyuvante se observa en 13 de los 48 casos, lo que representa el 27%. Nuestra investigación identifica el subtipo molecular del cáncer de mama como una variable independiente de pronóstico de RCP tras el análisis univariante y multivariante. En un estudio por IHQ de *TOP2A* se evidenció que la expresión de *TOP2A* podría sugerirse como un factor de agresividad en relación con la respuesta al tratamiento neoadyuvante [237]. La respuesta a la neoadyuvancia se asoció a la expresión de

FSCN1 y a las líneas de tratamiento con taxanos en un estudio japonés de mujeres con tumores TN [249].

6.5. BCL2

En nuestro estudio, hemos observado una correlación positiva entre la expresión de BCL2 y los RE, un hallazgo que coincide con lo reportado por un estudio japonés [135]. La expresión de BCL2 se considera un marcador pronóstico independiente que indica un mal pronóstico cuando se asocia con RH negativos. Sin embargo, los tumores que son positivos para BCL2 tienden a tener un mejor pronóstico, lo cual se puede explicar por el hecho de que los tumores con RE positivos generalmente presentan un mejor pronóstico.

6.6. RELACIÓN DE FSCN1 CON OTRAS PROTEÍNAS

El estudio de la expresión de FSCN1 en combinación con otras proteínas, como BRMS1 y GATA3, es un enfoque actual en la literatura y similar a lo que hemos realizado en nuestra investigación con *TOP2A*. GATA3 es una proteína nuclear que puede modificar la transcripción genómica y su expresión es conocida en los cánceres de mama y uroteliales. El gen BRMS actúa como un supresor tumoral. Los tumores con una expresión FSCN1+/BRMS1- mostraron una asociación estadística con un mayor grado histológico, negatividad para RH y menor metástasis ganglionar [193]. GATA3 se asoció con factores de buen pronóstico, sin embargo, la presencia de una expresión FSCN1+/GATA3- indicó una peor supervivencia global y un menor periodo libre de enfermedad [190].

6.7. RELACIÓN DE TOP2A CON OTRAS PROTEÍNAS

Similar a la FSCN1, la expresión conjunta de TOP2A con otras proteínas ha sido estudiada. Queremos destacar la asociación con CTA en un estudio croata [243], mediante la valoración por IHQ de TOP2A con un punto de corte del 36%. En este estudio se apreció la relación entre una mayor expresión de TOP2A con los CTA: MAGE-A10 y NY-ESO, en una población TN. Este hallazgo sugiere la necesidad de futuras investigaciones sobre el papel de estas proteínas en la inducción inmune.

La evaluación inmunohistoquímica simultánea de las proteínas MAP-tau y TOP2A en pacientes con ganglios linfáticos positivos, no demostró ser un indicador predictivo de una mejor respuesta a las antraciclinas o taxanos [244]. Se observó una asociación entre los niveles de TOP2A y la delección del gen *PTEN* en una serie de casos de TN [249]. La asociación en sentido positivo y estadísticamente con RacGAP1, proteína relacionada con la proliferación y diferenciación celular, ha sido evidenciada en un estudio realizado en Turquía [241].

6.8. VALORACIÓN CONJUNTA DE FSCN1 Y TOP2A

No se han encontrado en la literatura estudios que correlacionen la expresividad IHQ de FSCN1 y la ratio del gen TOP2A. La expresión de ambas, sobre la misma muestra BAG y con el método de cuantificación empleado en nuestro estudio, no muestra una relación con significancia estadística. Deberían plantearse otros trabajos de investigación, donde se aconseja que se utilicen diferentes métodos de cuantificación de TOP2A, que permitan corroborar o refutar nuestros resultados.

6.9. CONSIDERACIONES FINALES

La relación entre el ratio de TOP2A y expresión proteica de FSCN1 en el cáncer de mama no había sido explorada hasta la realización de este trabajo de investigación. Nuestros resultados no indican que exista una relación entre la expresión IHQ de FSCN1 y las alteraciones en la ratio TOP2A/CEP17 cuantificado por FISH.

Si consideramos FSCN1 por separado, se destaca la asociación estadísticamente significativa de FSCN1 con la ausencia o reducción de la expresión de RH, un Ki67 elevado, una mayor tendencia a valores bajos de BCL2, un mayor grado histológico, así como una relación con los subtipos moleculares de peor pronóstico, como los TN. También se observa una relación con el subtipo histológico, aspecto que se recomienda investigar en futuros trabajos. Por otro lado, TOP2A se relaciona con el subtipo molecular, grado histológico y un mayor Ki67. Estos resultados están en concordancia con la mayoría de las series consultadas. Creemos que en el caso de ambas, la existencia de diversos métodos de cuantificación en la literatura dificulta la comparación entre los estudios.

Nuestro seguimiento limitado no permite un análisis exhaustivo de la supervivencia global ni del tiempo libre de enfermedad. A pesar de esto, y aunque *FSCN1* y *TOP2A* no muestran ninguna relación, los análisis multivariantes en nuestra serie asocian significativamente el estadio patológico con la supervivencia global, y el RE con el tiempo libre de enfermedad. Además, el análisis de la RCP al tratamiento neoadyuvante refleja que el subtipo molecular en nuestra serie es un marcador independiente de respuesta.

VII – CONCLUSIONES

VII - CONCLUSIONES

1. No existe relación entre la intensidad de la proteína fascina-1 (FSCN1), medida por inmunohistoquímica (IHQ), y la ratio de *Topoisomerasa 2 alfa* (TOP2A)/CEP17, evaluada por hibridación in situ por fluorescencia (FISH).
2. El subtipo histológico del cáncer de mama muestra una relación con la expresión de FSCN1 pero no con la ratio de TOP2A
3. El subtipo molecular del cáncer de mama muestra una relación tanto para la expresión de FSCN1 como para la ratio de TOP2A.
4. La expresión de FSCN1 y la ratio de TOP2A no tienen relación con el estado fértil, en caso de ser mujer, ni con la edad de los pacientes.
5. Se ha encontrado asociación entre la expresión de FSCN1 y la ratio de TOP2A con el grado tumoral histológico (SBR). Respecto al estadio tumoral no se evidenció correlación.
6. La expresión de FSCN1 se relaciona con la expresión de receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), BCL2 y Ki67.
7. La ratio de TOP2A se relaciona con la expresión de Ki67.
8. La supervivencia global de enfermedad se asocia en el análisis univariante con: el subtipo histológico, el estadio patológico, RE, BCL2 y la edad (<65/≥65). En el análisis multivariante sólo el estadio patológico permanece como una variable independiente.
9. La supervivencia libre de enfermedad se asocia en el análisis univariante con: el subtipo molecular y RE. En el análisis multivariante sólo RE permanece como una variable independiente.
10. La respuesta completa patológica (RCP) al tratamiento neoadyuvante se asocia en el análisis univariante con: RE, BCL2, Ki67, grado histológico (SBR), estadio clínico, subtipo molecular y si es triple negativo o no. En el análisis multivariante sólo el subtipo molecular permanece como una variable independiente.

11. La recidiva no muestra asociación con la expresión de FSCN1 ni con la ratio de *TOP2A*.
12. Ki67 es la única técnica que muestra un área bajo la curva relevante (0,822) en análisis de curvas ROC como posible predictor de la respuesta completa al tratamiento neoadyuvante.
13. Los subtipos histológicos presentaron una notable variabilidad en su frecuencia con subtipos poco frecuentes o ausentes.

VIII - LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

VIII - LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

LIMITACIONES

1. Estudio retrospectivo que introduce sesgos inherentes, como el sesgo de selección que aumenta la heterogeneidad de la cohorte.
2. Escaso tamaño muestral de los subtipos histológicos poco frecuentes en nuestra serie.
3. Escaso tamaño muestral del subtipo molecular HER2+ (con valores en la población estimada del 10-20%). Estudio *post-hoc* confirmó que no se alcanzó un poder suficiente (<80%).
4. No valoración de la relación de fascinina-1 (FSCN1) y topoisomerasa 2 alfa (TOP2A) con la invasión linfovascular, invasión perineural, necrosis, afectación del CAP o piel.
5. Agotamiento de muestras parafinadas tras el estudio anatomopatológico habitual que impide la determinación de FSCN1 y/o TOP2A en algunos pacientes.
6. Limitada representación de varones en el estudio para estudio estadístico.
7. Reducida viabilidad del material parafinado de más de 5 años para la realización de estudios de hibridación in situ por fluorescencia (FISH).
8. No valoración del infiltrado inflamatorio peritumoral y/o celularidad mesenquimal acompañante.
9. No valoración de la población tumoral metastásica.
10. No valoración, en los casos que hubiese procedido, del estado FSCN1 y/o TOP2A tras el tratamiento neoadyuvante.
11. No valoración de la expresión proteica de TOP2A.
12. No realización de modelos estadísticos con variables relacionadas con el tratamiento (quimioterapia neoadyuvante, terapia hormonal o enfoque quirúrgico), que podrían influir en la expresión de biomarcadores tumorales.

FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

La investigación de la FSCN1 en tejidos tumorales es una línea de estudio actual con un futuro prometedor. Es importante continuar analizando las diferencias de expresión en los subtipos histológicos, especialmente en los menos frecuentes, así como en los subtipos moleculares. Ahondar también en la valoración de la celularidad peritumoral y si existe una modificación de la expresión de FSCN1 dependiendo de ella. Aconsejamos profundizar mediante un estudio prospectivo si existe variabilidad de la expresión de FSCN1 tras tratamiento neoadyuvante, así como, la diferencia exacta de su expresión cuando ocurre la metástasis.

Consideramos necesario aunar un criterio claro e internacional consensuado de límite o “*cut off*” de expresión baja/alta de FSCN1. Analizar la implantación de su determinación de rutina en laboratorios de Anatomía Patológica como un factor independiente de mal pronóstico.

El cambio cada vez más rápido del tratamiento oncológico hace necesario el auge de ensayos clínicos multicéntricos sobre los fármacos anti-FSCN1, ya sea mediante principios farmacológicos aprobados para otra indicación o con inhibidores directos. Debería valorarse el estudio inmunohistoquímico (IHQ), de coste reducido y asequible, como mecanismo de selección en pacientes con biopsia incisionales positivas para carcinoma de mama independientemente del subtipo histológico o molecular. Todo esto con el objetivo de recopilar más información que nos permita evaluar la viabilidad de la terapia anti-FSCN1 como un tratamiento antineoplásico real, al mismo tiempo que se estudia su toxicidad en humanos.

En lo que respecta a la TOP2A, se aconseja un estudio con un número alto de pacientes que permita conocer, la expresión o la alteración en el número de copias del gen, en los diferentes subtipos moleculares/histológicos. Valorar incluir otros datos de mal pronóstico como invasión vascular o linfática en futuras investigaciones. Aunque en nuestro estudio no se denota una asociación con la expresión de FSCN1, se aconseja debido al potencial de tratamiento antineoplásico contra TOP2A buscar algún otro biomarcador que permita dilucidar un tratamiento conjunto. Similar a FSCN1, un sistema de gradación internacional ya sea por IHQ o por FISH debería ser establecido para permitir comparaciones más reales entre los diferentes estudios. Por haber sido descrito como un factor

pronóstico en pacientes con terapia basadas en antraciclinas, sería necesario la realización de estudios que permitan dilucidar un método común de medición y cuantificación de las alteraciones del gen *TOP2A* previo al inicio al tratamiento quimioterápico.

En conclusión, estudios prospectivos multicéntricos con cohortes balanceadas y experimentos biológicos son necesarios para evaluar el valor pronóstico de *FSCN1* y *TOP2A* en cáncer de mama. Abordar estas limitaciones será crucial para fortalecer la aplicabilidad clínica de los hallazgos y orientar investigaciones futuras en este campo.

IX - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

IX -REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Osin PP, Anbazhagan R, Bartkova J, Nathan B, Gusterson BA. Breast development gives insights into breast disease. *Histopathology*. 1998;33:275–83.
2. Anbazhagan R, Osin PP, Bartkova J, Nathan B, Lane EB, Gusterson BA. The development of epithelial phenotypes in the human fetal and infant breast. *J Pathol*. 1998;184:197–206.
3. Ham AW CD. The breast. In: *Histology*. 8th ed. JB Lippincott; 1979.
4. Kanitakis J. Mammary and extramammary Paget's disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2007;21:581–90.
5. Jay R. Harris, Marc E. Lippman, Monica Morrow CKO. *Disease of the Breast*. 5ª. Wolters Kluwer Health; 2014.
6. Carmona-Torres JM, Cobo-Cuenca AI, Martín-Espinosa NM, Piriz-Campos RM, Laredo-Aguilera JA, Rodríguez-Borrego MA. [Prevalence in the performance of mammographies in Spain: Analysis by Communities 2006-2014 and influencing factors]. *Aten Primaria*. 2018;50:228–37.
7. Ponce-Chazarri L, Ponce-Blandón JA, Immordino P, Giordano A, Morales F. Barriers to Breast Cancer-Screening Adherence in Vulnerable Populations. *Cancers (Basel)*. 2023;15.
8. Wu Z, Liu Y, Li X, Song B, Ni C, Lin F. Factors associated with breast cancer screening participation among women in mainland China: a systematic review. *BMJ Open*. 2019;9:e028705.

9. Cabanes A, Pérez-Gómez B, Aragonés N, Pollán M L-AG. La situación del cáncer en España 1975-2006. Madrid: Centro Nacional de Epidemiología ISCIII; 2009.
10. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017;67:7–30.
11. GLOBOCAN. World Health Organization (WHO). International Agency for Research on Cancer (IARC). GLOBOCAN [Internet]. 2020: New Global Cancer Data [Internet]. 2020.
12. Brewer HR, Jones ME, Schoemaker MJ, Ashworth A, Swerdlow AJ. Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. *Breast Cancer Res Treat*. 2017;165:193–200.
13. Washbrook E. Risk factors and epidemiology of breast cancer. *Women's Health Medicine* [Internet]. 2006;3:8–14. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S174418700600117X>
14. Abdelwahab Yousef AJ. Male Breast Cancer: Epidemiology and Risk Factors. *Semin Oncol*. 2017;44:267–72.
15. Sun Y-S, Zhao Z, Yang Z-N, Xu F, Lu H-J, Zhu Z-Y, et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci* [Internet]. 2017;13:1387–97. Available from: <https://www.ijbs.com/v13p1387.htm>
16. Hamajima N, Hirose K, Tajima K, Rohan T, Calle EE, Heath CWJ, et al. Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br J Cancer*. 2002;87:1234–45.

17. Association between Diabetes Mellitus and Breast Cancer Risk: a Meta-analysis of the Literature. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* [Internet]. 2011;12:1061–5. Available from: https://journal.waocp.org/article_25658.html
18. Iwasaki M, Tsugane S. Risk factors for breast cancer: epidemiological evidence from Japanese studies. *Cancer Sci.* 2011;102:1607–14.
19. Makarem N, Chandran U, Bandera E V, Parekh N. Dietary fat in breast cancer survival. *Annu Rev Nutr.* 2013;33:319–48.
20. Dall GV, Britt KL. Estrogen Effects on the Mammary Gland in Early and Late Life and Breast Cancer Risk. *Front Oncol.* 2017;7:110.
21. Lee S-M, Park J-H, Park H-J. Breast cancer risk factors in Korean women: a literature review. *Int Nurs Rev.* 2008;55:355–9.
22. Franzese E, Nigri G. [Night work as a possible risk factor for breast cancer in nurses. Correlation between the onset of tumors and alterations in blood melatonin levels]. *Prof Inferm.* 2007;60:89–93.
23. Bodewes FTH, van Asselt AA, Dorrius MD, Greuter MJW, de Bock GH. Mammographic breast density and the risk of breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Breast.* 2022;66:62–8.
24. Wang K, Nakano K, Naderi N, Bajaj-Elliott M, Mosahebi A. Is the skin microbiota a modifiable risk factor for breast disease?: A systematic review. *Breast.* 2021;59:279–85.
25. Ronckers CM, Erdmann CA, Land CE. Radiation and breast cancer: a review of current evidence. *Breast Cancer Res.* 2005;7:21–32.

26. International Agency for Research on Cancer. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Breast tumours. 5th ed. Lyon (France): World Health Organization; 2019.

27. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol.* 2015;26:259–71.

28. Rakha EA, Aleskandarany M, El-Sayed ME, Blamey RW, Elston CW, Ellis IO, et al. The prognostic significance of inflammation and medullary histological type in invasive carcinoma of the breast. *Eur J Cancer.* 2009;45:1780–7.

29. Rechsteiner M, Dedes K, Fink D, Pestalozzi B, Sobottka B, Moch H, et al. Somatic BRCA1 mutations in clinically sporadic breast cancer with medullary histological features. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2018;144:865–74.

30. Lakhani SR, Jacquemier J, Sloane JP, Gusterson BA, Anderson TJ, van de Vijver MJ, et al. Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancers involving BRCA1 and BRCA2 mutations. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90:1138–45.

31. Iau PTC, Marafie M, Ali A, Sng JH, Macmillan RD, Pinder S, et al. Are medullary breast cancers an indication for BRCA1 mutation screening? A mutation analysis of 42 cases of medullary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2004;85:81–8.

32. Doğukan R, Uçak R, Doğukan FM, Tanık C, Çitgez B, Kabukcuoğlu F. Correlation between the Expression of PD-L1 and Clinicopathological Parameters in Triple Negative Breast Cancer Patients. *Eur J Breast Health.* 2019;15:235–41.

33. 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;19:403–10.

34. Rakha EA, Patel A, Powe DG, Benhasouna A, Green AR, Lambros MB, et al. Clinical and biological significance of E-cadherin protein expression in invasive lobular carcinoma of the breast. *Am J Surg Pathol*. 2010;34:1472–9.

35. Rasbridge SA, Gillett CE, Sampson SA, Walsh FS, Millis RR. Epithelial (E-) and placental (P-) cadherin cell adhesion molecule expression in breast carcinoma. *J Pathol [Internet]*. 1993 [cited 2024 Jul 19];169:245–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8383197/>

36. McCart Reed AE, Kutasovic JR, Lakhani SR, Simpson PT. Invasive lobular carcinoma of the breast: morphology, biomarkers and 'omics. *Breast Cancer Res*. 2015;17:12.

37. Bane AL, Tjan S, Parkes RK, Andrulis I, O'Malley FP. Invasive lobular carcinoma: to grade or not to grade. *Mod Pathol [Internet]*. 2005 [cited 2024 Jul 19];18:621–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15605082/>

38. Quincey C, Raitt N, Bell J, Ellis IO. Intracytoplasmic lumina--a useful diagnostic feature of adenocarcinomas. *Histopathology*. 1991;19:83–7.

39. Sastre-Garau X, Jouve M, Asselain B, Vincent-Salomon A, Beuzeboc P, Dorval T, et al. Infiltrating lobular carcinoma of the breast. Clinicopathologic analysis of 975 cases with reference to data on conservative therapy and metastatic patterns. *Cancer*. 1996;77:113–20.

40. Rakha EA, El-Sayed ME, Powe DG, Green AR, Habashy H, Grainge MJ, et al. Invasive lobular carcinoma of the breast: response to hormonal therapy and outcomes. *Eur J Cancer*. 2008;44:73–83.

41. Sneige N, Wang J, Baker BA, Krishnamurthy S, Middleton LP. Clinical, histopathologic, and biologic features of pleomorphic lobular (ductal-lobular) carcinoma in situ of the breast: a report of 24 cases. *Mod Pathol*. 2002;15:1044–50.
42. Fisher ER, Gregorio RM, Redmond C, Fisher B. Tubulolobular invasive breast cancer: a variant of lobular invasive cancer. *Hum Pathol*. 1977;8:679–83.
43. Diab SG, Clark GM, Osborne CK, Libby A, Allred DC, Elledge RM. Tumor characteristics and clinical outcome of tubular and mucinous breast carcinomas. *J Clin Oncol*. 1999;17:1442–8.
44. McBoyle MF, Razek HA, Carter JL, Helmer SD. Tubular carcinoma of the breast: an institutional review. *Am Surg*. 1997;63:635–9.
45. Marchiò C, Sapino A, Arisio R, Bussolati G. A new vision of tubular and tubulo-lobular carcinomas of the breast, as revealed by 3-D modelling. *Histopathology*. 2006;48:556–62.
46. Penkert J, Schmidt G, Hofmann W, Schubert S, Schieck M, Auber B, et al. Breast cancer patients suggestive of Li-Fraumeni syndrome: mutational spectrum, candidate genes, and unexplained heredity. *Breast Cancer Res*. 2018;20:87.
47. Rakha EA, Lee AHS, Evans AJ, Menon S, Assad NY, Hodi Z, et al. Tubular carcinoma of the breast: further evidence to support its excellent prognosis. *J Clin Oncol*. 2010;28:99–104.
48. Mills AM, E Gottlieb C, M Wendroth S, M Brenin C, Atkins KA. Pure Apocrine Carcinomas Represent a Clinicopathologically Distinct Androgen Receptor-Positive Subset of Triple-Negative Breast Cancers. *Am J Surg Pathol*. 2016;40:1109–16.

49. Vranic S, Schmitt F, Sapino A, Costa JL, Reddy S, Castro M, et al. Apocrine carcinoma of the breast: a comprehensive review. *Histol Histopathol.* 2013;28:1393–409.

50. Gatalica Z. Immunohistochemical analysis of apocrine breast lesions. Consistent over-expression of androgen receptor accompanied by the loss of estrogen and progesterone receptors in apocrine metaplasia and apocrine carcinoma in situ. *Pathol Res Pract.* 1997;193:753–8.

51. Dellapasqua S, Maisonneuve P, Viale G, Pruneri G, Mazzarol G, Ghisini R, et al. Immunohistochemically defined subtypes and outcome of apocrine breast cancer. *Clin Breast Cancer [Internet].* 2013 [cited 2024 Jul 19];13:95–102. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23245877/>

52. Page DL, Dixon JM, Anderson TJ, Lee D, Stewart HJ. Invasive cribriform carcinoma of the breast. *Histopathology.* 1983;7:525–36.

53. Cong Y, Qiao G, Zou H, Lin J, Wang X, Li X, et al. Invasive cribriform carcinoma of the breast: A report of nine cases and a review of the literature. *Oncol Lett.* 2015;9:1753–8.

54. Venable JG, Schwartz AM, Silverberg SG. Infiltrating cribriform carcinoma of the breast: a distinctive clinicopathologic entity. *Hum Pathol [Internet].* 1990 [cited 2024 Jul 19];21:333–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2312110/>

55. Azoulay S, Laé M, Fréneaux P, Merle S, Al Ghuzlan A, Chnecker C, et al. KIT is highly expressed in adenoid cystic carcinoma of the breast, a basal-like carcinoma associated with a favorable outcome. *Mod Pathol.* 2005;18:1623–31.

56. Rabban JT, Swain RS, Zaloudek CJ, Chase DR, Chen YY. Immunophenotypic overlap between adenoid cystic carcinoma and collagenous spherulosis of the breast: potential diagnostic pitfalls using myoepithelial markers. *Mod Pathol.* 2006;19:1351–7.
57. Chen AC, Paulino AC, Schwartz MR, Rodriguez AA, Bass BL, Chang JC, et al. Population-based comparison of prognostic factors in invasive micropapillary and invasive ductal carcinoma of the breast. *Br J Cancer.* 2014;111:619–22.
58. Gokce H, Durak MG, Akin MM, Canda T, Balci P, Ellidokuz H, et al. Invasive micropapillary carcinoma of the breast: a clinicopathologic study of 103 cases of an unusual and highly aggressive variant of breast carcinoma. *Breast J.* 2013;19:374–81.
59. Vingiani A, Maisonneuve P, Dell’orto P, Farante G, Rotmensz N, Lissidini G, et al. The clinical relevance of micropapillary carcinoma of the breast: a case-control study. *Histopathology.* 2013;63:217–24.
60. Di Saverio S, Gutierrez J, Avisar E. A retrospective review with long term follow up of 11,400 cases of pure mucinous breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;111:541–7.
61. Rasmussen BB, Rose C, Christensen IB. Prognostic factors in primary mucinous breast carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 1987;87:155–60.
62. Weigelt B, Geyer FC, Horlings HM, Kreike B, Halfwerk H, Reis-Filho JS. Mucinous and neuroendocrine breast carcinomas are transcriptionally distinct from invasive ductal carcinomas of no special type. *Mod Pathol.* 2009;22:1401–14.
63. Marrazzo E, Frusone F, Milana F, Sagona A, Gatzemeier W, Barbieri E, et al. Mucinous breast cancer: A narrative review of the literature and a retrospective tertiary single-centre analysis. *Breast.* 2020;49:87–92.

64. Eddin AS, Hsieh SK, Policeni F. Breast Mucocele-like lesions (MLL): A case report and review of the literature. *Radiol Case Rep. Netherlands*; 2024. p. 1083–9.

65. Rosa M, Mohammadi A, Masood S. Lobular carcinoma of the breast with extracellular mucin: new variant of mucin-producing carcinomas? *Pathol Int.* 2009;59:405–9.

66. Jain E, Kumar A, Jain R, Sharma S. Primary Mucinous Cystadenocarcinoma of the Breast: A Rare Case Report With Review of Literature. *Int J Surg Pathol.* 2021;29:740–6.

67. Ni Y, Tse GM. Papillary lesions of the breast - review and practical issues. *Semin Diagn Pathol.* 2022;39:344–54.

68. Pal SK, Lau SK, Kruper L, Nwoye U, Garberoglio C, Gupta RK, et al. Papillary carcinoma of the breast: an overview. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;122:637–45.

69. Boujelbene N, Khabir A, Boujelbene N, Jeanneret Sozzi W, Mirimanoff RO, Khanfir K. Clinical review--breast adenoid cystic carcinoma. *Breast.* 2012;21:124–7.

70. Kim J, Geyer FC, Martelotto LG, Ng CK, Lim RS, Selenica P, et al. MYBL1 rearrangements and MYB amplification in breast adenoid cystic carcinomas lacking the MYB-NFIB fusion gene. *J Pathol.* 2018;244:143–50.

71. Shin SJ, Rosen PP. Solid variant of mammary adenoid cystic carcinoma with basaloid features: a study of nine cases. *Am J Surg Pathol.* 2002;26:413–20.

72. Seethala RR, Hunt JL, Baloch ZW, Livolsi VA, Leon Barnes E. Adenoid cystic carcinoma with high-grade transformation: a report of 11 cases and a review of the literature. *Am J Surg Pathol*. 2007;31:1683–94.

73. Gou W Bin, Yang YQ, Song BW, He P. Solid basal adenoid cystic carcinoma of the breast: A case report and literature review. *Medicine*. 2024;103:e37010.

74. Gordillo C, Chukus A. Adenoid cystic carcinoma: A case of rare breast cancer. *Radiol Case Rep. Netherlands*; 2022. p. 690–2.

75. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012;490:61–70.

76. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, Renshaw CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406:747–52.

77. Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*. 2012;486:346–52.

78. Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, Estrada M V, Johnson KN, Shyr Y, et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLoS One*. 2016;11:e0157368.

79. 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;24:2206–23.

80. Marmot MG, Altman DG, Cameron DA, Dewar JA, Thompson SG, Wilcox M. The benefits and harms of breast cancer screening: an independent review.

British Journal of Cancer 2013 108:11 [Internet]. 2013 [cited 2024 Jul 14];108:2205–40. Available from: <https://www.nature.com/articles/bjc2013177>

81. Pons-Rodriguez A, Marzo-Castillejo M, Cruz-Esteve I, Galindo-Ortego G, Hernández-Leal MJ, Rué M. Avances hacia el cribado personalizado del cáncer de mama: el papel de la Atención Primaria. *Aten Primaria* [Internet]. 2022 [cited 2024 Jul 14];54:102288. Available from: [/pmc/articles/PMC9061619/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39061619/)

82. Elizalde Pérez A, Rodríguez-Spiteri N. El papel de la tomosíntesis en el cribado del cáncer de mama. *Revista de Senología y Patología Mamaria - Journal of Senology and Breast Disease* [Internet]. 2016 [cited 2024 Jul 14];30:21–7. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-senologia-patologia-mamaria--131-articulo-el-papel-tomosintesis-el-cribado-S0214158216300573>

83. Saslow D, Boetes C, Burke W, Harms S, Leach MO, Lehman CD, et al. American Cancer Society Guidelines for Breast Screening with MRI as an Adjunct to Mammography. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2007 [cited 2024 Jul 14];57:75–89. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/canjclin.57.2.75>

84. McDonald ES, Oustimov A, Weinstein SP, Synnestvedt MB, Schnall M, Conant EF. Effectiveness of Digital Breast Tomosynthesis Compared With Digital Mammography: Outcomes Analysis From 3 Years of Breast Cancer Screening. *JAMA Oncol* [Internet]. 2016 [cited 2024 Jul 14];2:737–43. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamaoncology/fullarticle/2491465>

85. Travieso-Aja M del M, Pérez-Luzardo O. Utilidad clínica de la mamografía con contraste (CEM): una revisión de la literatura. *Revista de Senología y Patología Mamaria - Journal of Senology and Breast Disease* [Internet]. 2022 [cited 2024 Jul 14];35:293–304. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-senologia-patologia-mamaria--131-articulo-utilidad-clinica-mamografia-con-contraste-S0214158220301468>

86. Kooistra B, Wauters C, Wobbes T, Strobbe L. Conclusiveness of fine needle aspiration in 2419 histologically confirmed benign and malignant breast lesions. *The Breast*. 2011;20:229–32.

87. Combalia N. Diagnóstico citológico en patología mamaria. *Revista de Senología y Patología Mamaria - Journal of Senology and Breast Disease* [Internet]. 2014 [cited 2024 Jul 14];27:183–9. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-senologia-patologia-mamaria--131-articulo-diagnostico-citologico-patologia-mamaria-S021415821400053X>

88. Cadavid-Fernández N, Carretero-Barrio I, Moreno-Moreno E, Rodríguez-Villena A, Palacios J, Pérez-Mies B. The role of core needle biopsy in diagnostic breast pathology. *Revista de Senología y Patología Mamaria*. 2022;35:S3–12.

89. Rakha EA, Lee AHS, Jenkins JA, Murphy AE, Hamilton LJ, Ellis IO. Characterization and outcome of breast needle core biopsy diagnoses of lesions of uncertain malignant potential (B3) in abnormalities detected by mammographic screening. *Int J Cancer* [Internet]. 2011 [cited 2024 Jul 15];129:1417–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21128240/>

90. Bilous M. Breast core needle biopsy: issues and controversies. *Mod Pathol* [Internet]. 2010 [cited 2024 Jul 15];23 Suppl 2:S36–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20436501/>

91. Willems SM, Van Deurzen CHM, Van Diest PJ. Diagnosis of breast lesions: fine-needle aspiration cytology or core needle biopsy? A review. *J Clin Pathol* [Internet]. 2012 [cited 2024 Jul 15];65:287–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22039282/>

92. Plaza Loma S, Rodríguez de Diego Y, González Blanco I, Martín Medrano E, Del Villar Negro A, Torres Nieto Á. Biopsia mamaria asistida por vacío y guiada por estereotaxia. Correlación con la biopsia quirúrgica. *Progresos de Obstetricia y*

Ginecología [Internet]. 2012 [cited 2024 Jul 14];55:66–70. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-progresos-obstetricia-ginecologia-151-articulo-biopsia-mamaria-asistida-por-vacio-S0304501311004043>

93. Nakano S, Imawari Y, Mibu A, Otsuka MH, Oinuma T. Differentiating vacuum-assisted breast biopsy from core needle biopsy: Is it necessary? *Br J Radiol* [Internet]. 2018 [cited 2024 Jul 14];91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29975150/>

94. Jackman RJ, Marzoni FA, Rosenberg J. False-negative diagnoses at stereotactic vacuum-assisted needle breast biopsy: long-term follow-up of 1,280 lesions and review of the literature. *AJR Am J Roentgenol* [Internet]. 2009 [cited 2024 Jul 14];192:341–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19155393/>

95. Krainick-Strobel U, Majer I, Huber B, Gall C, Krämer B, Gruber I, et al. Development of a gel-simulation model and generation of standard tables for the complete extirpation of benign breast lesions with vacuum assisted biopsy under ultrasound guidance. *Ultrasound Med Biol*. 2006;32:1539–44.

96. Grady I, Vasquez T, Tawfik S, Grady S. Ultrasound-Guided Core-Needle Versus Vacuum-Assisted Breast Biopsy: A Cost Analysis Based on the American Society of Breast Surgeons' Mastery of Breast Surgery Registry. *Ann Surg Oncol* [Internet]. 2017 [cited 2024 Jul 14];24:676–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27714540/>

97. Varnier R, Sajous C, de Talhouet S, Smentek C, Péron J, You B, et al. Using Breast Cancer Gene Expression Signatures in Clinical Practice: Unsolved Issues, Ongoing Trials and Future Perspectives. *Cancers (Basel)*. 2021;13.

98. Haan JC, Bhaskaran R, Ellappalayam A, Bijl Y, Griffioen CJ, Lujinovic E, et al. MammaPrint and Blueprint comprehensively capture the cancer hallmarks in early-stage breast cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer*. 2022;61:148–60.

99. Audeh W, Blumencranz L, Kling H, Trivedi H, Srkalovic G. Prospective Validation of a Genomic Assay in Breast Cancer: The 70-gene MammaPrint Assay and the MINDACT Trial. *Acta Med Acad*. 2019;48:18–34.

100. Lopes Cardozo JMN, Drukker CA, Rutgers EJT, Schmidt MK, Glas AM, Witteveen A, et al. Outcome of Patients With an Ultralow-Risk 70-Gene Signature in the MINDACT Trial. *J Clin Oncol*. 2022;40:1335–45.

101. Noordhoek I, Bastiaannet E, de Glas NA, Scheepens J, Esserman LJ, Wesseling J, et al. Validation of the 70-gene signature test (MammaPrint) to identify patients with breast cancer aged ≥ 70 years with ultralow risk of distant recurrence: A population-based cohort study. *J Geriatr Oncol*. 2022;13:1172–7.

102. Cardoso F, van't Veer LJ, Bogaerts J, Slaets L, Viale G, Delaloge S, et al. 70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2016;375:717–29.

103. Straver ME, Glas AM, Hannemann J, Wesseling J, van de Vijver MJ, Rutgers EJT, et al. The 70-gene signature as a response predictor for neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;119:551–8.

104. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, et al. Adjuvant Chemotherapy Guided by a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2018;379:111–21.

105. McVeigh TP, Kerin MJ. Clinical use of the Oncotype DX genomic test to guide treatment decisions for patients with invasive breast cancer. *Breast Cancer* (Dove Med Press). 2017;9:393–400.

106. Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, Solin LJ, et al. Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017;67:290–303.

107. Sparano JA, Solin LJ. Defining the clinical utility of gene expression assays in breast cancer: the intersection of science and art in clinical decision making. *J Clin Oncol.* United States; 2010. p. 1625–7.

108. De Felice F, Marchetti C, Musella A, Palaia I, Perniola G, Musio D, et al. Bilateral risk-reduction mastectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a meta-analysis. *Ann Surg Oncol* [Internet]. 2015 [cited 2024 Jul 8];22:2876–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25808098/>

109. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment. *JAMA - Journal of the American Medical Association.* 2019;321:316.

110. Traves KP, Cokenakes SEH. Breast Cancer Treatment. *Am Fam Physician* [Internet]. 2021 [cited 2024 Jul 8];104:171–8. Available from: <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2021/0800/p171.html>

111. Mosca L, Ilari A, Fazi F, Assaraf YG, Colotti G. Taxanes in cancer treatment: Activity, chemoresistance and its overcoming. *Drug Resist Updat* [Internet]. 2021 [cited 2024 Jul 16];54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33429249/>

112. Yousef MI, Saad AA, El-Shennawy LK. Protective effect of grape seed proanthocyanidin extract against oxidative stress induced by cisplatin in rats. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2009 [cited 2024 Jul 9];47:1176–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19425235/>

113. Dasari S, Bernard Tchounwou P. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2014 [cited 2024 Jul 9];740:364. Available from: [/pmc/articles/PMC4146684/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24146684/)
114. Emadi A, Jones RJ, Brodsky RA. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2009 [cited 2024 Jul 16];6:638–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19786984/>
115. Chen S. Aromatase and breast cancer. *Front Biosci* [Internet]. 1998 [cited 2024 Jul 8];3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9696881/>
116. Pérez Edo L. Moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERM). *Revista Española de Reumatología* [Internet]. 2004;31:13–7. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-espanola-reumatologia-29-articulo-moduladores-selectivos-receptores-estrogenicos-serm--13057079>
117. Drăgănescu M, Carmocan C. Hormone Therapy in Breast Cancer. *Chirurgia (Bucur)*. 2017;112:413–7.
118. Neupane N, Bawek S, Gurusinghe S, Ghaffary EM, Mirmosayyeb O, Thapa S, et al. Oral SERD, a Novel Endocrine Therapy for Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2024 [cited 2024 Jul 8];16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38339371/>
119. Augereau P, Patsouris A, Bourbouloux E, Gourmelon C, Abadie Lacourtoisie S, Berton Rigaud D, et al. Hormonoresistance in advanced breast cancer: a new revolution in endocrine therapy. *Ther Adv Med Oncol* [Internet]. 2017 [cited 2024 Jul 8];9:335–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28529550/>
120. Browne IM, André F, Chandarlapaty S, Carey LA, Turner NC. Optimal targeting of PI3K-AKT and mTOR in advanced oestrogen receptor-positive breast

cancer. *Lancet Oncol* [Internet]. 2024 [cited 2024 Jul 8];25:e139–51. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S1470204523006769/fulltext>

121. Emens LA. Breast Cancer Immunotherapy: Facts and Hopes. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2018 [cited 2024 Jul 9];24:511. Available from: </pmc/articles/PMC5796849/>

122. Fernandes CL, Silva DJ, Mesquita A. Novel HER-2 Targeted Therapies in Breast Cancer. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2024 [cited 2024 Jul 9];16. Available from: </pmc/articles/PMC10778064/>

123. Lee JM, Cimino-Mathews A, Peer CJ, Zimmer A, Lipkowitz S, Annunziata CM, et al. Safety and Clinical Activity of the Programmed Death-Ligand 1 Inhibitor Durvalumab in Combination With Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor Olaparib or Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1-3 Inhibitor Cediranib in Women’s Cancers: A Dose-Escalation, Phase I Study. *J Clin Oncol* [Internet]. 2017 [cited 2024 Jul 9];35:2193–202. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28471727/>

124. Correa C, Harris EE, Leonardi MC, Smith BD, Taghian AG, Thompson AM, et al. Accelerated Partial Breast Irradiation: Executive summary for the update of an ASTRO Evidence-Based Consensus Statement. *Pract Radiat Oncol*. 2017;7:73–9.

125. Alonso-Aguirre V. Manejo del cáncer de mama desde la perspectiva del Oncólogo Radioterápico. 1ed ed. Marín, Diego; 2024.

126. Upadhyay R, Bazan JG. Advances in Radiotherapy for Breast Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2023;32:515–36.

127. Luis Meneses-Riascos, William Jiménez-Ramírez, Sara Mendoza-Díaz, Holman Ballesteros-Gómez, Alex Álvarez-Martínez, Luis Guzmán-Abi-Saab,

Ximena Briceño-Morales, Carlos Lehmann-Mosquera, Eduardo Guerrero-Lizcano, Luis Felipe Torres-Silva, Javier Ángel-Aris SED-C. Radioterapia intraoperatoria con electrones (RIOe) en pacientes con cáncer de mama: revisión de la evidencia y abordaje terapéutico en el Instituto Nacional de Cancerología, Colombia. *Revista Colombiana de Cancerología*. 2024;28:24–35.

128. Toth BA, Lappert P. Modified skin incisions for mastectomy: the need for plastic surgical input in preoperative planning. *Plast Reconstr Surg*. 1991;87:1048–53.

129. Cunchillos Domínguez Fernando, Blas Ballester Sapiña Juan, de Castro Barga Gonzalo. *Cirugía de mama*. 2nd ed. Madrid: Arán; 2017.

130. Maes-Carballo M, García-García M, Rodríguez-Janeiro I, Cámara-Martínez C, Alberca-Remigio C, Khan KS. A systematic review of robotic breast surgery versus open surgery. *J Robot Surg* [Internet]. 2023 [cited 2024 Jul 9];17:2583–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37624486/>

131. Stone MR, O'Neill A, Catino D, Bloch RJ. Specific interaction of the actin-binding domain of dystrophin with intermediate filaments containing keratin 19. *Mol Biol Cell*. 2005;16:4280–93.

132. Ungerleider NA, Rao SG, Shahbandi A, Yee D, Niu T, Frey WD, et al. Breast cancer survival predicted by TP53 mutation status differs markedly depending on treatment. *Breast Cancer Res*. 2018;20:115.

133. Kaur RP, Vasudeva K, Kumar R, Munshi A. Role of p53 Gene in Breast Cancer: Focus on Mutation Spectrum and Therapeutic Strategies. *Curr Pharm Des*. 2018;24:3566–75.

134. Eom YH, Kim HS, Lee A, Song BJ, Chae BJ. BCL2 as a Subtype-Specific Prognostic Marker for Breast Cancer. *J Breast Cancer*. 2016;19:252–60.

135. Honma N, Horii R, Ito Y, Saji S, Younes M, Iwase T, et al. Differences in clinical importance of Bcl-2 in breast cancer according to hormone receptors status or adjuvant endocrine therapy. *BMC Cancer* [Internet]. 2015 [cited 2024 Jul 16];15. Available from: /pmc/articles/PMC4607008/

136. Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson JÅ. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2015;29:557–68.

137. Li Z, Wei H, Li S, Wu P, Mao X. The Role of Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Drug Des Devel Ther*. 2022;16:305–14.

138. Khodarev NN, Roizman B, Weichselbaum RR. Molecular pathways: interferon/stat1 pathway: role in the tumor resistance to genotoxic stress and aggressive growth. *Clin Cancer Res*. 2012;18:3015–21.

139. Lloyd MC, Allam-Nandyala P, Purohit CN, Burke N, Coppola D, Bui MM. Using image analysis as a tool for assessment of prognostic and predictive biomarkers for breast cancer: How reliable is it? *J Pathol Inform*. 2010;1:29.

140. Allison KH, Hammond MEH, Dowsett M, McKernin SE, Carey LA, Fitzgibbons PL, et al. Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: ASCO/CAP Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2020;38:1346–66.

141. Allred DC. Problems and solutions in the evaluation of hormone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol*. United States; 2008. p. 2433–5.

142. Shousha S. Oestrogen receptor status of breast carcinoma: Allred/H score conversion table. *Histopathology*. England; 2008. p. 346–7.

143. Krishnamurti U, Silverman JF. HER2 in breast cancer: a review and update. *Adv Anat Pathol*. 2014;21:100–7.
144. Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Pusztai L, Ravdin PM, Hortobagyi GN. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist*. 2009;14:320–68.
145. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142:1364–82.
146. Luo L, Zhang Z, Qiu N, Ling L, Jia X, Song Y, et al. Disruption of FOXO3a-miRNA feedback inhibition of IGF2/IGF-1R/IRS1 signaling confers Herceptin resistance in HER2-positive breast cancer. *Nat Commun*. 2021;12:2699.
147. Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J, Baselga J. Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res*. 2001;61:4744–9.
148. Afifi MM, Crncec A, Cornwell JA, Cataisson C, Paul D, Ghorab LM, et al. Irreversible cell cycle exit associated with senescence is mediated by constitutive MYC degradation. *Cell Rep*. 2023;42:113079.
149. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn H-J. 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*. England; 2011. p. 1736–47.
150. Scott KL, Nogueira C, Heffernan TP, van Doorn R, Dhakal S, Hanna JA, et al. Proinvasion metastasis drivers in early-stage melanoma are oncogenes.

Cancer Cell [Internet]. 2011 [cited 2024 Jul 19];20:92–103. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21741599/>

151. Lombardi A, Lazzeroni R, Bersigotti L, Vitale V, Amanti C. The Proper Ki-67 Cut-Off in Hormone Responsive Breast Cancer: A Monoinstitutional Analysis with Long-Term Follow-Up. *Breast Cancer* (Dove Med Press). 2021;13:213–7.

152. Focke CM, van Diest PJ, Decker T. St Gallen 2015 subtyping of luminal breast cancers: impact of different Ki67-based proliferation assessment methods. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2016 [cited 2024 Jul 19];159:257–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27558625/>

153. Hacking SM, Wang Y. Practical Issues of Ki-67 Evaluation in Breast Cancer Clinical Practice . *Journal of Clinical and Translational Pathology*. 2:53–6.

154. Smith I, Robertson J, Kilburn L, Wilcox M, Evans A, Holcombe C, et al. Long-term outcome and prognostic value of Ki67 after perioperative endocrine therapy in postmenopausal women with hormone-sensitive early breast cancer (POETIC): an open-label, multicentre, parallel-group, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2020;21:1443–54.

155. Bryan J, Edwards R, Matsudaira P, Otto J, Wulfkühle J. Fascin, an echinoid actin-bundling protein, is a homolog of the *Drosophila* singed gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:9115–9.

156. Lin S, Taylor MD, Singh PK, Yang S. How does fascin promote cancer metastasis? *FEBS J*. 2021;288:1434–46.

157. Mogilner A, Rubinstein B. The physics of filopodial protrusion. *Biophys J*. 2005;89:782–95.

158. Holthuis, J. C., Schoonderwoert, V. T., & Martens GJ. A vertebrate homolog of the actin-bundling protein fascin. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1219:184–8.
159. Adams JC. Roles of fascin in cell adhesion and motility. *Curr Opin Cell Biol*. 2004;16:590–6.
160. Tao YS, Edwards RA, Tubb B, Wang S, Bryan J, McCrea PD. β -Catenin associates with the actin-bundling protein fascin in a noncadherin complex. *Journal of Cell Biology*. 1996;134:1271–81.
161. Al-Alwan MM, Rowden G, Lee TDG, West KA. Fascin Is Involved in the Antigen Presentation Activity of Mature Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*. 2001;166:338–45.
162. Hashimoto Y, Skacel M, Adams JC. Roles of fascin in human carcinoma motility and signaling: prospects for a novel biomarker? *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2005 [cited 2024 Jul 19];37:1787–804. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16002322/>
163. Schoumacher M, Goldman RD, Louvard D, Vignjevic DM. Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia. *Journal of Cell Biology*. 2010;189:541–56.
164. Arjonen A, Kaukonen R, Ivaska J. Filopodia and adhesion in cancer cell motility. *Cell Adh Migr*. 2011;5:421–30.
165. Sun J, He H, Xiong Y, Lu S, Shen J, Cheng A, et al. Fascin protein is critical for transforming growth factor β protein-induced invasion and filopodia formation in spindle-shaped tumor cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2011. p. 38865–75.

166. Kang Y. Pro-metastasis function of TGF β mediated by the Smad pathway. *J Cell Biochem.* 2006. p. 1380–90.
167. Al-Alwan M, Olabi S, Ghebeh H, Barhoush E, Tulbah A, Al-Tweigeri T, et al. Fascin is a key regulator of breast cancer invasion that acts via the modification of metastasis-associated molecules. *PLoS One.* 2011;6:e27339.
168. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene.* 2006;25:6680–4.
169. Ghebeh H, Al-Khaldi S, Olabi S, Al-Dhfyan A, Al-Mohanna F, Barnawi R, et al. Fascin is involved in the chemotherapeutic resistance of breast cancer cells predominantly via the PI3K/Akt pathway. *Br J Cancer.* 2014;111:1552–61.
170. Kodura MA, Souchelnytskyi S. Breast carcinoma metastasis suppressor gene 1 (BRMS1): update on its role as the suppressor of cancer metastases. *Cancer Metastasis Rev.* 2015;34:611–8.
171. Barnawi R, Al-Khaldi S, Majed Sleiman G, Sarkar A, Al-Dhfyan A, Al-Mohanna F, et al. Fascin Is Critical for the Maintenance of Breast Cancer Stem Cell Pool Predominantly via the Activation of the Notch Self-Renewal Pathway. *Stem Cells.* 2016;34:2799–813.
172. Youssef NS, Hakim SA. Association of Fascin and matrix metalloproteinase-9 expression with poor prognostic parameters in breast carcinoma of Egyptian women. *Diagn Pathol.* 2014;9:136.
173. Gonzalez-Reyes C, Marcial-Medina C, Cervantes-Anaya N, Cortes-Reynosa P, Salazar EP. Migration and invasion induced by linoleic acid are mediated through fascin in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Mol Cell Biochem.* 2018;443:1–10.

174. Zhao X, Gao S, Sun W, Zhang H, Sun J, Yang S, et al. Hypoxia-Inducible factor-1 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma invasion and metastasis by activating transcription of the actin-Bundling protein fascin. *Cancer Res.* 2014;74:2455–64.

175. Sun J, He H, Pillai S, Xiong Y, Challa S, Xu L, et al. GATA3 transcription factor abrogates Smad4 transcription factor-mediated fascin overexpression, invadopodium formation, and breast cancer cell invasion. *J Biol Chem.* 2013;288:36971–82.

176. Chou J, Provot S, Werb Z. GATA3 in development and cancer differentiation: cells GATA have it! *J Cell Physiol.* 2010;222:42–9.

177. Amat S, Penault-Llorca F, Cure H, Le Bouedec G, Achard J-L, Van Praagh I, et al. Scarff-Bloom-Richardson (SBR) grading: a pleiotropic marker of chemosensitivity in invasive ductal breast carcinomas treated by neoadjuvant chemotherapy. *Int J Oncol.* 2002;20:791–6.

178. Abbasi A, Noroozina F, Anvar S, Abbasi M, Hosseinzadeh S, Mokhtari S. Fascin overexpression is associated with higher grades of breast cancer. *Pol J Pathol.* 2019;70:264–8.

179. Esnakula AK, Ricks-Santi L, Kwagyan J, Kanaan YM, DeWitty RL, Wilson LL, et al. Strong association of fascin expression with triple negative breast cancer and basal-like phenotype in African-American women. *J Clin Pathol.* 2014;67:153–60.

180. Abdullah AR, Gamal El-Din AM, El-Mahdy HA, Ismail Y, El-Husseiny AA. The crucial role of fascin-1 in the pathogenesis, metastasis, and chemotherapeutic resistance of breast cancer. *Pathol Res Pract.* 2024;254:155079.

181. Saad A, Bijian K, Qiu D, da Silva SD, Marques M, Chang C-H, et al. Insights into a novel nuclear function for Fascin in the regulation of the amino-acid transporter SLC3A2. *Sci Rep.* 2016;6:36699.

182. Grothey A, Hashizume R, Sahin AA, McCrea PD. Fascin, an actin-bundling protein associated with cell motility, is upregulated in hormone receptor negative breast cancer. *Br J Cancer.* 2000;83:870–3.

183. Yoder BJ, Tso E, Skacel M, Pettay J, Tarr S, Budd T, et al. The expression of fascin, an actin-bundling motility protein, correlates with hormone receptor-negative breast cancer and a more aggressive clinical course. *Clin Cancer Res.* 2005;11:186–92.

184. Rodríguez-Pinilla SM, Sarrió D, Honrado E, Hardisson D, Calero F, Benitez J, et al. Prognostic significance of basal-like phenotype and fascin expression in node-negative invasive breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2006;12:1533–9.

185. Gülgün Erdogan, H. Elif Pesteleri, Taner Çolal, F. Şeyda Karaveli MA. Fascin Expression in Invasive Ductal Carcinoma of Breast. *Turkish Journal of Pathology.* 2010;6:130–5.

186. Xue L, Zou S, Zheng S, Xie Y, Wen P, Liu X, et al. [Expression of fascin and CK14 in different histological types of cancer and its differential diagnostic significance]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 2010;32:838–44.

187. Tsuchiya H, Sasaki A, Tsunoda Y, Takimoto M, Sawada T et al. Fascin is Expressed in Basal-Liketype Triple Negative Breast Cancer Associated with High Malignant Potential in Japanese Women. *Int J Cancer Clin Res.* 2015;2.

188. Min K-W, Chae SW, Kim D-H, DO S-I, Kim K, Lee HJ, et al. Fascin expression predicts an aggressive clinical course in patients with advanced breast cancer. *Oncol Lett.* 2015;10:121–30.

189. Wang C-Q, Tang C-H, Chang H-T, Li X-N, Zhao Y-M, Su C-M, et al. Fascin-1 as a novel diagnostic marker of triple-negative breast cancer. *Cancer Med.* 2016;5:1983–8.

190. Min K-W, Kim D-H, Do S-I, Chae SW, Kim K, Sohn JH, et al. Negative association between GATA3 and fascin could predict relapse-free and overall survival in patients with breast cancer. *Virchows Arch.* 2016;468:409–16.

191. Sun J, He H, Pillai S, Xiong Y, Challa S, Xu L, et al. GATA3 transcription factor abrogates Smad4 transcription factor-mediated fascin overexpression, invadopodium formation, and breast cancer cell invasion. *J Biol Chem.* 2013;288:36971–82.

192. Yoo SJ, Yoo JH. Immunohistochemical analysis of fascin, steroid receptors, and HER-2 overexpression in invasive ductal carcinoma of breast and its implications for prognosis. *VIRCHOWS ARCHIV.* 2017;471:S301–2.

193. Lee HJ, An HJ, Kim TH, Kim G, Kang H, Heo JH, et al. Fascin expression is inversely correlated with breast cancer metastasis suppressor 1 and predicts a worse survival outcome in node-negative breast cancer patients. *J Cancer.* 2017;8:3122–9.

194. Wang C-Q, Tang C-H, Wang Y, Jin L, Wang Q, Li X, et al. FSCN1 gene polymorphisms: biomarkers for the development and progression of breast cancer. *Sci Rep.* 2017;7:15887.

195. Nonni A, Tampaki EC, Tampakis A, Efstratios P, Kontzoglou K, Kouraklis G. Fascin-1 expression in breast cancer identifies patients with high risk

for disease recurrence. *VIRCHOWS ARCHIV. SPRINGER* 233 SPRING ST, NEW YORK, NY 10013 USA; 2019. p. S75–S75.

196. Tampakis A, Tampaki EC, Nonni A, Kontos M, Tsourouflis G, Posabella A, et al. MAP17 Expression in Colorectal Cancer Is a Prognostic Factor for Disease Recurrence and Dismal Prognosis Already in Early Stage Disease. *Oncology*. 2021;99:471–82.

197. Guijarro M V, Link W, Rosado A, Leal JFM, Carnero A. MAP17 inhibits Myc-induced apoptosis through PI3K/AKT pathway activation. *Carcinogenesis*. 2007;28:2443–50.

198. Rani A, Tariq U, Idrees R. Fascin-1 as a novel diagnostic marker of triple negative breast cancer in Pakistani women. *Journal of Diagnostic Pathology*. 2023;

199. Li C-H, Chan M-H, Liang S-M, Chang Y-C, Hsiao M. Fascin-1: Updated biological functions and therapeutic implications in cancer biology. *BBA advances*. 2022;2:100052.

200. Chen L, Yang S, Jakoncic J, Zhang JJ, Huang X-Y. Migrastatin analogues target fascin to block tumour metastasis. *Nature*. 2010;464:1062–6.

201. Zheng S, Zhong Q, Jiang Q, Mottamal M, Zhang Q, Zhu N, et al. Discovery of a Series of Thiazole Derivatives as Novel Inhibitors of Metastatic Cancer Cell Migration and Invasion. *ACS Med Chem Lett*. 2013;4:191–6.

202. Albuquerque-González B, Bernabé-García Á, Bernabé-García M, Ruiz-Sanz J, López-Calderón FF, Gonnelli L, et al. The FDA-Approved Antiviral Raltegravir Inhibits Fascin1-Dependent Invasion of Colorectal Tumor Cells In Vitro and In Vivo. *Cancers* . 2021.

203. Huang F-K, Han S, Xing B, Huang J, Liu B, Bordeleau F, et al. Targeted inhibition of fascin function blocks tumour invasion and metastatic colonization. *Nat Commun.* 2015;6:7465.
204. McGuire S, Kara B, Hart PC, Montag A, Wroblewski K, Fazal S, et al. Inhibition of fascin in cancer and stromal cells blocks ovarian cancer metastasis. *Gynecol Oncol.* 2019;153:405–15.
205. Han S, Huang J, Liu B, Xing B, Bordeleau F, Reinhart-King CA, et al. Improving fascin inhibitors to block tumor cell migration and metastasis. *Mol Oncol.* 2016;10:966–80.
206. Francis S, Croft D, Schüttelkopf AW, Parry C, Pugliese A, Cameron K, et al. Structure-based design, synthesis and biological evaluation of a novel series of isoquinolone and pyrazolo[4,3-c]pyridine inhibitors of fascin 1 as potential anti-metastatic agents. *Bioorg Med Chem Lett.* 2019;29:1023–9.
207. Albuquerque-González B, Bernabé-García M, Montoro-García S, Bernabé-García Á, Rodrigues PC, Ruiz Sanz J, et al. New role of the antidepressant imipramine as a Fascin1 inhibitor in colorectal cancer cells. *Exp Mol Med.* 2020;52:281–92.
208. Proietti S, Catizone A, Masiello MG, Dinicola S, Fabrizi G, Minini M, et al. Increase in motility and invasiveness of MCF7 cancer cells induced by nicotine is abolished by melatonin through inhibition of ERK phosphorylation. *J Pineal Res.* 2018;64:e12467.
209. Jabeen A, Sharma A, Gupta I, Kheraldine H, Vranic S, Al Moustafa A-E, et al. *Elaeagnus angustifolia* Plant Extract Inhibits Epithelial-Mesenchymal Transition and Induces Apoptosis via HER2 Inactivation and JNK Pathway in HER2-Positive Breast Cancer Cells. *Molecules.* 2020;25.

210. Osanai M, Lee G-H. The retinoic acid-metabolizing enzyme CYP26A1 upregulates fascin and promotes the malignant behavior of breast carcinoma cells. *Oncol Rep.* 2015;34:850–8.
211. Alyoussef A. The therapeutic effects of blocking IGF-R1 on mice model of skin cancer. *J Dermatolog Treat.* 2021;32:803–11.
212. Wang JC. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3:430–40.
213. Cuya SM, Bjornsti M-A, van Waardenburg RCAM. DNA topoisomerase-targeting chemotherapeutics: what's new? *Cancer Chemother Pharmacol.* 2017;80:1–14.
214. Osheroff N. Biochemical basis for the interactions of type I and type II topoisomerases with DNA. *Pharmacol Ther.* 1989;41:223–41.
215. Holm C, Goto T, Wang JC, Botstein D. DNA topoisomerase II is required at the time of mitosis in yeast. *Cell.* 1985;41:553–63.
216. Nielsen KV, Müller S, Møller S, Schønau A, Balslev E, Knoop AS, et al. Aberrations of ERBB2 and TOP2A genes in breast cancer. *Mol Oncol.* 2010;4:161–8.
217. Järvinen TA, Kononen J, Pelto-Huikko M, Isola J. Expression of topoisomerase IIalpha is associated with rapid cell proliferation, aneuploidy, and c-erbB2 overexpression in breast cancer. *Am J Pathol.* 1996;148:2073–82.
218. Mueller RE, Parkes RK, Andrulis I, O'Malley FP. Amplification of the TOP2A gene does not predict high levels of topoisomerase II alpha protein in human breast tumor samples. *Genes Chromosomes Cancer* [Internet]. 2004 [cited 2024 Jul 7];39:288–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14978790/>

219. Press MF, Sauter G, Buyse M, Bernstein L, Guzman R, Santiago A, et al. Alteration of topoisomerase II-alpha gene in human breast cancer: association with responsiveness to anthracycline-based chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2011;29:859–67.

220. Kiyomi Taniyama, Nao Morii KK, Akihisa Saito, Toshinao Nishimura JS, Mieko Harada, Miho Tanaka, Hiroyo Takahashi, Kato, Kazuaki Miyamoto HK. Topoisomerase II-Alpha Index Predicts the Efficacy of Anthracycline-Based Chemotherapy for Breast Cancers. In: Al SIW et, editor. *HER2 and Cancer*. Nova Science Publishers, Inc; 2011. p. 187–200.

221. Di Leo A, Larsimont D, Gancberg D, Jarvinen T, Beauduin M, Vindevoghel A, et al. HER-2 and topoisomerase IIalpha as predictive markers in a population of node-positive breast cancer patients randomly treated with adjuvant CMF or epirubicin plus cyclophosphamide. *Ann Oncol* [Internet]. 2001 [cited 2024 Jul 7];12:1081–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11583189/>

222. Du Y, Zhou Q, Yin W, Zhou L, Di G, Shen Z, et al. The role of topoisomerase II[alpha] in predicting sensitivity to anthracyclines in breast cancer patients: a meta-analysis of published literatures. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2011;129:839+. Available from: <https://link.gale.com/apps/doc/A356142797/AONE?u=anon~2a0d6c5f&sid=google Scholar&xid=c7b22be0>

223. Brase JC, Schmidt M, Fischbach T, Sültmann H, Bojar H, Koelbl H, et al. ERBB2 and TOP2A in breast cancer: a comprehensive analysis of gene amplification, RNA levels, and protein expression and their influence on prognosis and prediction. *Clin Cancer Res*. 2010;16:2391–401.

224. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2005;11:5678–85.

225. Treszezamsky AD, Kachnic LA, Feng Z, Zhang J, Tokadjian C, Powell SN. BRCA1- and BRCA2-deficient cells are sensitive to etoposide-induced DNA double-strand breaks via topoisomerase II. *Cancer Res.* 2007;67:7078–81.

226. Kudo K, Yoshida H, Kiyoi H, Numata S, Horibe K, Naoe T. Etoposide-related acute promyelocytic leukemia. *Leukemia.* 1998;12:1171–5.

227. Ali Y, Abd Hamid S. Human topoisomerase II alpha as a prognostic biomarker in cancer chemotherapy. *Tumour Biol.* 2016;37:47–55.

228. Qiao J-H, Jiao D-C, Lu Z-D, Yang S, Liu Z-Z. Clinical significance of topoisomerase 2A expression and gene change in operable invasive breast cancer. *Tumour Biol.* 2015;36:6833–8.

229. Romero A, Martín M, Cheang MCU, López García-Asenjo JA, Oliva B, He X, et al. Assessment of Topoisomerase II α status in breast cancer by quantitative PCR, gene expression microarrays, immunohistochemistry, and fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol.* 2011;178:1453–60.

230. Shuai P. [Expressions of HER2 and Topo II α in breast cancer and its clinical significance]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2016;41:1143–7.

231. Varga Z, Moelans CB, Zuerrer-Hardi U, Ramach C, Behnke S, Kristiansen G, et al. Topoisomerase 2A gene amplification in breast cancer. Critical evaluation of different FISH probes. *Breast Cancer Res Treat [Internet].* 2012 [cited 2024 Jul 16];133:929–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22083232/>

232. Kalogeraki A, Ieromonachou P, Kafousi M, Giannikaki E, Vrekoussis T, Zoras O, et al. Topoisomerase II alpha expression in breast ductal invasive

carcinomas and correlation with clinicopathological variables. *In Vivo*. 2005;19:837–40.

233. Tinari N, Lattanzio R, Natoli C, Cianchetti E, Angelucci D, Ricevuto E, et al. Changes of topoisomerase II α expression in breast tumors after neoadjuvant chemotherapy predicts relapse-free survival. *Clin Cancer Res*. 2006;12:1501–6.

234. Todorović-Raković N, Nesković-Konstantinović Z, Nikolić-Vukosavljević D. Metastatic breast cancer survival according to HER2 and Topo2a gene status. *Dis Markers*. 2009;26:171–80.

235. Tubbs R, Barlow WE, Budd GT, Swain E, Porter P, Gown A, et al. Outcome of patients with early-stage breast cancer treated with doxorubicin-based adjuvant chemotherapy as a function of HER2 and TOP2A status. *J Clin Oncol* [Internet]. 2009 [cited 2024 Jul 19];27:3881–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19620488/>

236. Mukherjee A, Shehata M, Moseley P, Rakha E, Ellis I, Chan S. Topo2 α protein expression predicts response to anthracycline combination neo-adjuvant chemotherapy in locally advanced primary breast cancer. *Br J Cancer* [Internet]. 2010 [cited 2024 Jul 16];103:1794. Available from: [/pmc/articles/PMC3008601/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2008601/)

237. Gómez HL, Pinto JA, Olivera M, Vidaurre T, Doimi FD, Vigil CE, et al. Topoisomerase II- α as a predictive factor of response to therapy with anthracyclines in locally advanced breast cancer. *Breast*. 2011;20:39–45.

238. Glynn RW, Mahon S, Curran C, Callagy G, Miller N, Kerin MJ. TOP2A amplification in the absence of that of HER-2/neu: toward individualization of chemotherapeutic practice in breast cancer. *Oncologist*. 2011;16:949–55.

239. Engelstaedter V, Schiffers J, Kahlert S, Mainka P, Engel J, Kirchner T, et al. Her-2/neu and topoisomerase II α in advanced breast cancer: a comprehensive FISH analysis of 245 cases. *Diagn Mol Pathol*. 2012;21:77–83.

240. Mrklič I, Pogorelič Z, Čapkun V, Tomić S. Expression of topoisomerase II- α in triple negative breast cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2014;22:182–7.

241. Şahin S, Işık Gönül İ, Çakır A, Seçkin S, Uluoğlu Ö. Clinicopathological Significance of the Proliferation Markers Ki67, RacGAP1, and Topoisomerase 2 Alpha in Breast Cancer. *Int J Surg Pathol*. 2016;24:607–13.

242. Milde-Langosch K, Karn T, Müller V, Witzel I, Rody A, Schmidt M, et al. Validity of the proliferation markers Ki67, TOP2A, and RacGAP1 in molecular subgroups of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2013 [cited 2024 Jul 7];137:57–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23135572/>

243. Mrklič I, Spagnoli GC, Juretić A, Pogorelič Z, Tomić S. Co-expression of cancer testis antigens and topoisomerase 2-alpha in triple negative breast carcinomas. *Acta Histochem*. 2014;116:740–6.

244. Won HS, Lee KE, Sung SH, Choi MY, Jo JY, Nam EM, et al. Topoisomerase II alpha and microtubule-associated protein-tau as a predictive marker in axillary lymph node positive breast cancer. *Tumori*. 2014;100:80–6.

245. Chen J-R, Chien H-P, Chen K-S, Hwang C-C, Chen H-Y, Yeh K-Y, et al. Amplification of HER2 and TOP2A and deletion of TOP2A genes in a series of Taiwanese breast cancer. *Medicine*. 2017;96:e5582.

246. Neama RAA, Habib MA, Ali SA, Al-Khafaji AH, Alqanbar MF. Assessment of topoisomerase II-alpha gene status by dual color chromogenic

in situ hybridization in a set of Iraqi patients with invasive breast carcinoma. *Indian J Pathol Microbiol.* 2017;60:475–80.

247. An X, Xu F, Luo R, Zheng Q, Lu J, Yang Y, et al. The prognostic significance of topoisomerase II alpha protein in early stage luminal breast cancer. *BMC Cancer.* 2018;18:331.

248. Shigematsu H, Ozaki S, Yasui D, Yamamoto H, Zaito J, Taniyama D, et al. Overexpression of topoisomerase II alpha protein is a factor for poor prognosis in patients with luminal B breast cancer. *Oncotarget.* 2018;9:26701–10.

249. Guestini F, Ono K, Miyashita M, Ishida T, Ohuchi N, Nakagawa S, et al. Impact of Topoisomerase II α , PTEN, ABCC1/MRP1, and KI67 on triple-negative breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2019;173:275–88.

250. Ogino M, Fujii T, Nakazawa Y, Higuchi T, Koibuchi Y, Oyama T, et al. Implications of Topoisomerase (TOP1 and TOP2 α) Expression in Patients With Breast Cancer. *In Vivo.* 2020;34:3483–7.

251. Nam C, Doi K, Nakayama H. Etoposide induces G2/M arrest and apoptosis in neural progenitor cells via DNA damage and an ATM/p53-related pathway. *Histol Histopathol.* 2010;25:485–93.

252. Soliman TN, Keifenheim D, Parker PJ, Clarke DJ. Cell cycle responses to Topoisomerase II inhibition: Molecular mechanisms and clinical implications. *J Cell Biol.* 2023;222.

253. Nitiss JL. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2009;9:338–50.

254. Diamandidou E, Buzdar AU, Smith TL, Frye D, Witjaksono M, Hortobagyi GN. Treatment-related leukemia in breast cancer patients treated with fluorouracil-doxorubicin-cyclophosphamide combination adjuvant chemotherapy: the University of Texas M.D. Anderson Cancer Center experience. *J Clin Oncol.* 1996;14:2722–30.

255. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2013 [cited 2024 Jul 7];31:51–72. Available from: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-immunol-032712-100008>

256. Jones RN, Fedler KA, Scangarella-Oman NE, Ross JE, Flamm RK. Multicenter Investigation of Gepotidacin (GSK2140944) Agar Dilution Quality Control Determinations for *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 49226. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2016 [cited 2024 Jul 29];60:4404. Available from: </pmc/articles/PMC4914643/>

257. Jacobsson S, Golparian D, Alm RA, Huband M, Mueller J, Jensen JS, et al. High In Vitro Activity of the Novel Spiropyrimidinetrione AZD0914, a DNA Gyrase Inhibitor, against Multidrug-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* Isolates Suggests a New Effective Option for Oral Treatment of Gonorrhea. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2014 [cited 2024 Jul 29];58:5585. Available from: </pmc/articles/PMC4135813/>

258. Lakshmi Manasa K, Thatikonda S, Sigalapalli DK, Sagar A, Kiranmai G, Kalle AM, et al. Design and synthesis of β -carboline linked aryl sulfonyl piperazine derivatives: DNA topoisomerase II inhibition with DNA binding and apoptosis inducing ability. *Bioorg Chem.* 2020;101:103983.

259. Sathish M, Kavitha B, Nayak VL, Tangella Y, Ajitha A, Nekkanti S, et al. Synthesis of podophyllotoxin linked β -carboline congeners as potential

anticancer agents and DNA topoisomerase II inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2018;144:557–71.

260. Han X, Zhong Y, Zhou G, Qi H, Li S, Ding Q, et al. Synthesis and biological evaluation of N-(carbobenzyloxy)-l-phenylalanine and N-(carbobenzyloxy)-l-aspartic acid- β -benzyl ester derivatives as potent topoisomerase II α inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 2017;25:3116–26.

261. Catanzaro E, Betari N, Arencibia JM, Montanari S, Sissi C, De Simone A, et al. Targeting topoisomerase II with tryptanthrin derivatives: Discovery of 7-((2-(dimethylamino)ethyl)amino)indolo[2,1-b]quinazoline-6,12-dione as an antiproliferative agent and to treat cancer. *Eur J Med Chem.* 2020;202:112504.

262. Wambang N, Schifano-Faux N, Aillerie A, Baldeyrou B, Jacquet C, Bal-Mahieu C, et al. Synthesis and biological activity of ferrocenyl indeno[1,2-c]isoquinolines as topoisomerase II inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 2016;24:651–60.

263. Şöhretoğlu D, Barut B, Sari S, Özel A, Arroo R. In vitro and in silico assessment of DNA interaction, topoisomerase I and II inhibition properties of chrysosplenetin. *Int J Biol Macromol.* 2020;163:1053–9.

264. Benes P, Knopfova L, Trcka F, Nemajerova A, Pinheiro D, Soucek K, et al. Inhibition of topoisomerase II α : novel function of wedelolactone. *Cancer Lett.* 2011;303:29–38.

265. Villanueva PJ, Gutierrez DA, Contreras L, Parra K, Segura-Cabrera A, Varela-Ramirez A, et al. The Antimalarial Drug Pyronaridine Inhibits Topoisomerase II in Breast Cancer Cells and Hinders Tumor Progression In Vivo. *Clin Cancer Drugs.* 2021;8:50–6.

266. Ganapathi RN, Ganapathi MK. Mechanisms regulating resistance to inhibitors of topoisomerase II. *Front Pharmacol* [Internet]. 2013 [cited 2024 Jul 16];4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23914174/>

267. Liu Y, Yu K, Zhang K, Niu M, Chen Q, Liu Y, et al. O-GlcNAcylation promotes topoisomerase II α catalytic activity in breast cancer chemoresistance. *EMBO Rep*. 2023;24:e56458.

268. Calhoun BC, Collins LC. Predictive markers in breast cancer: An update on ER and HER2 testing and reporting. *Semin Diagn Pathol*. 2015;32:362–9.

269. ClinMed International Library | Fascin is Expressed in Basal-Liketype Triple Negative Breast Cancer Associated with High Malignant Potential in Japanese Women | *International Journal of Cancer and Clinical Research* | [Internet]. [cited 2024 Jul 19]. Available from: <https://clinmedjournals.org/articles/ijccr/international-journal-of-cancer-and-clinical-research-ijccr-2-035.php?jid=ijccr>

270. Eltohamy MI, Badawy OM, El kinaai N, Loay I, Nassar HR, Allam RM, et al. Topoisomerase II α Gene alteration in Triple Negative Breast Cancer and Its Predictive Role for Anthracycline-Based Chemotherapy (Egyptian NCI Patients). *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018;19:3581–9.

271. Fountzilias G, Valavanis C, Kotoula V, Eleftheraki AG, Kalogeras KT, Tzaida O, et al. HER2 and TOP2A in high-risk early breast cancer patients treated with adjuvant epirubicin-based dose-dense sequential chemotherapy. *J Transl Med* [Internet]. 2012 [cited 2024 Jul 25];10:10. Available from: </pmc/articles/PMC3275536/>

272. Glynn RW, Miller N, Whelan MC, Kerin MJ. Topoisomerase 2 alpha and the case for individualized breast cancer therapy. *Ann Surg Oncol*. 2010;17:1392–7.

273. O'Malley FP, Chia S, Tu D, Shepherd LE, Levine MN, Bramwell VH, et al. Topoisomerase II alpha and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101:644–50.

274. Arriola E, Rodriguez-Pinilla SM, Lambros MBK, Jones RL, James M, Savage K, et al. Topoisomerase II alpha amplification may predict benefit from adjuvant anthracyclines in HER2 positive early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2007 [cited 2024 Jul 24];106:181–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17260090/>

275. Park K, Han S, Gwak G-H, Kim H-J, Kim J, Kim K-M. Topoisomerase II-alpha gene deletion is not frequent as its amplification in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2006;98:337–42.

276. Almeida D, Gerhard R, Leitão D, Davilla C, Damasceno M, Schmitt F. Topoisomerase II-alfa gene as a predictive marker of response to anthracyclines in breast cancer. *Pathol Res Pract.* 2014;210:675–9.

277. Tokiniwa H, Horiguchi J, Takata D, Kikuchi M, Rokutanda N, Nagaoka R, et al. Topoisomerase II alpha expression and the Ki-67 labeling index correlate with prognostic factors in estrogen receptor-positive and human epidermal growth factor type-2-negative breast cancer. *Breast Cancer.* 2012;19:309–14.

X – ANEXOS

X - ANEXOS

Anexo 1. Resolución del Comité Ético de Investigación del CHUC para la realización de esta tesis.

**DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA**

D^a Laly Gómez Sannicolás, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Sta. M^a del Rosell, Áreas II y VIII de Salud del Servicio Murciano de Salud

CERTIFICA QUE,

1º El CEI este CEI en reunión celebrada el 30/11/21 ha evaluado la propuesta del Promotor/investigador referida al estudio:

Tipo de estudio:

Cod. Protocolo	Nº EudraCT
No consta	No procede
Expresión de fascina y topa2 en el carcinoma de mama: correlación con los subtipos histológicos y con otros marcadores pronósticos.	
Versión Protocolo	Vs.02 de 10/07/20
Promotor:	Fondos Públicos

Evaluando los aspectos del estudio requeridos por la legislación vigente:

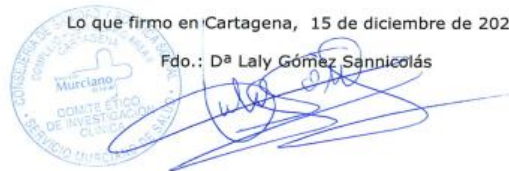
- La realización del estudio en el Área II/VIII de salud es pertinente.
- El estudio cumple con los requisitos reglamentarios correspondientes al tipo de estudio.
- El diseño del estudio es adecuado para obtener las conclusiones objetivo del mismo.
- Los criterios de selección y retirada de los sujetos están indicados y son adecuados.
- Requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación a los objetivos del estudio y justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- La capacidad de los investigadores y los medios disponibles apropiados para llevar a cabo el estudio.
- El grupo control ha sido adecuadamente elegido y es correcto.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiera con el respeto a los postulados éticos.

En base a lo expuesto este comité emite el siguiente dictamen:

INFORME FAVORABLE
Investigador y Centros: D. Alberto Sánchez Espinosa, Anatomía Patológica del HGUSL.

Lo que firmo en Cartagena, 15 de diciembre de 2021.

Fdo.: D^a Laly Gómez Sannicolás



1º Tras revisar y evaluar sujetos a las medidas de prevención ante la Covid-19, se decidió emitir el informe correspondiente al proyecto de Investigación anteriormente referido.

2º El CEIC "H. S. M. del Rosell", tanto en su composición, como en los PNT cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95)

4º La composición actual del CEIC que ha evaluado la propuesta fue la siguiente:

Presidente:	D. A. Javier Trujillo Santos	Médico Adjunto Medicina Interna/Infecciosa.
Vicepresidente:	D. José Valverde Molina.	Jefe Servicio, Sº Pediatría
Secretaria:	Dª Laly Gómez Sannicolás,	Secretaria Unidad Investigación.
Vocales:	D. José M. Bueno Ortiz,	Médico Adjunto Centro de Salud de Fuente Álamo.
	D. Francisco Sánchez Rodríguez	Responsable Farmacia, adscrito a la GAP Área II.
	D. Blas García Rojo	Médico Adjunto Servicio Anestesiología y Reanimación.
	D. Federico Soria Arcos	Médico Adjunto Servicio Cardiología.
	Dª Mª Teresa Roldan Chicano	Enfermera Diplomada.
	Dª Ruth L. Manrique Medina	Médico Adjunto Gerencia A. Primaria. Técnico de Salud
	D. Carlos F. Fernández Ferrer	Licenciado en Derecho
	D. Luis Escondrillas Gómez	Responsable Farmacia del HGUSL
	D. Eduardo Osuna Carrillo de	Catedrático Medicina Legal y Forense.
	Albornoz	Médico adjunto Sº Pediatría, Vocal C. Bioética, Hospital
	D. Manuel Jesús Cuenca Burgos	HULAMM.

En el caso de que se evaluara algún proyecto del que un miembro sea investigador/colaborador, éste se ausentará de la reunión durante la discusión del proyecto.



Anexo 2. Resolución del Comité Ético de Investigación de la UCAM para la realización de esta tesis.



COMITÉ DE ÉTICA DE LA UCAM

DATOS DEL PROYECTO

Título:	“Expresión de fascina y topa2 en el carcinoma de mama: correlación con los subtipos histológicos y con otros marcadores pronósticos”	
Investigador Principal	Nombre	Correo-e
Dr.	José García Solano	jgarcia652@ucam.edu

INFORME DEL COMITÉ

Fecha	27/05/2022	Código	CE052201
--------------	------------	---------------	----------

Tipo de Experimentación

Investigación experimental clínica con seres humanos	
Investigación experimental no clínica con seres humanos	
Utilización de tejidos humanos procedentes de pacientes, personas sanas, tejidos embrionarios o fetales	
Utilización de tejidos humanos, tejidos embrionarios o fetales procedentes de bancos de muestras o tejidos	X
Investigación observacional, psicológica o comportamental en humanos	X
Uso de datos personales, información genética, etc.	X
Experimentación animal	
Utilización de agentes biológicos de riesgo para la salud humana, animal o las plantas	
Uso de organismos modificados genéticamente (OMGs)	

Comentarios Respecto al Tipo de Experimentación

Nada Obsta

Comentarios Respecto a la Metodología de Experimentación

Nada Obsta





COMITÉ DE ÉTICA DE LA UCAM

Sugerencias al Investigador

A la vista de la solicitud de informe adjunto por el Investigador y de las recomendaciones anteriormente expuestas el dictamen del Comité es:

Emitir Informe Favorable	X
Emitir Informe Desfavorable	
Emitir Informe Favorable condicionado a Subsanación	

MOTIVACIÓN

Incrementará conocimientos en su área

Vº Bº El Presidente,

Fdo.: José Alberto Cánovas Sánchez



El Secretario,

Fdo.: José Alarcón Teruel

