



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

CURSO DE ESPECIALIDAD EN CIRUGIA ONCOLÓGICA

**CORRELACIÓN ENTRE ECUACIONES MODIFICADAS DE MAGEE Y LA  
PUNTACIÓN DE MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS (IHC-4) CON EL  
PUNTAJE DE RECURRENCIA DE ONCOTYPE DX EN PACIENTES CON CÁNCER DE  
MAMA EN ETAPAS CLÍNICAS TEMPRANAS**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
SUBESPECIALISTA EN CIRUGIA ONCOLOGICA

PRESENTA:

**DR. RODRIGO JASSO BARRANCO**

DR JUAN ENRIQUE BARGALLO ROCHA  
DIRECTOR DE TESIS



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AUTORIZACION DE TESIS

**CORRELACIÓN ENTRE ECUACIONES MODIFICADAS DE MAGEE Y LA PUNTACIÓN DE MARCADORES INMUNOHISTOQUIMICOS (IHC-4) CON EL PUNTAJE DE RECURRENCIA DE ONCOTYPE DX EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA EN ETAPAS CLÍNICAS TEMPRANAS**

---

**Dr. Juan Enrique Bargallo Rocha**

Director de Tesis  
Instituto Nacional De Cancerología

---

**Dra. Silvia Verónica Villavicencio Valencia**

Subdirectora de Educación Médica  
Instituto Nacional De Cancerología

---

**Dr. Rodrigo Jasso Barranco**

Médico Residente de Tercer Grado de Cirugía Oncológica  
Autor  
Instituto Nacional De Cancerología

## **DEDICATORIA**

A mi familia conformada por mis padres Arturo y Celia, de los cuales tuve siempre el ejemplo a seguir, por haberme enseñado el valor de la perseverancia y a hacer las cosas apasionadamente.

A mis hermanos Bere, Mari y Artur, por todo el apoyo brindado a lo largo de estos de estudio, por enseñarme que las distancias únicamente son físicas, pero no emocionales. Sin el apoyo de ellos hubiera sido imposible conseguir esta especialidad.

De manera especial a mis sobrinos Frida Sofía, Pía Valentina y Daniel, inspiración y razón de ser de muchos esfuerzos, por ser, con su dulzura y cariño, un motivo día a día para continuar en el sueño emprendido hace años.

A mis amigos que siempre me han apoyado para que yo culmine con mis sueños a Mariela, Gustavo, Celeste, Juanito, Tania, Lalo, por ser y siempre estar a mi lado.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis médicos maestros y maestras, que con paciencia y gran dedicación, invirtieron su valioso tiempo para contribuir, todos, de alguna manera, a mi formación como cirujano oncólogo.

De manera especial al Dr Enrique Bargallo Rocha, asesor de este trabajo, por haber sido guía en muchos procedimientos quirúrgicos y por haberme brindado su amistad.

A mis compañeros de la residencia y amigos de especialidad, por siempre estar ahí conmigo y brindarme palabras de apoyo y perseverancia.

Al Instituto Nacional de Cancerología, su personal y pacientes que me brindaron la oportunidad de realizar mi sueño de ser cirujano oncólogo.

## AUTORES

### TESISTA

**Dr. Rodrigo Jasso Barranco**

Médico Residente de Tercer Año  
Subespecialidad en Cirugía Oncológica  
Instituto Nacional de Cancerología

### DIRECTOR DE TESIS :

**Dr. Juan Enrique Bargallo Rocha**

Jefe del Servicio de Tumores Mamarios  
Instituto Nacional de Cancerología

### COLABORADORES

**Dr. David Cantú de León Hernández**

Subdirector de Investigación Clínica  
Instituto Nacional de Cancerología

**Dra. María Delia Pérez Montiel Gómez**

Médico Adscrito al Departamento de Patología Quirúrgica  
Instituto Nacional de Cancerología

## RESUMEN

**Introducción:** La prueba de 21 genes Oncotype DX® fue la primera prueba en demostrar impacto en las decisiones terapéuticas adyuvantes en el manejo de las pacientes en etapa temprana en cáncer de mama. Las ecuaciones de Magee y el Índice de 4 marcadores inmunohistoquímicos (IHC4) parecen proveer información pronóstica similar a la obtenida por la prueba de 21 genes.

**Objetivo:** Conocer cuál es la correlación que existe entre la información obtenida del Oncotype DX® con la información obtenida de las ecuaciones de Magee y el IHC4.

**Material y Método:** Se realizó un estudio observacional, descriptivo, transversal, retrospectivo de 288 pacientes del periodo comprendido del periodo comprendido de enero 2011 a mayo de 2016. Se incluyeron a todas aquellas pacientes con diagnóstico de cáncer de mama en estadio clínico temprano, con tratamiento quirúrgico, muestra y reporte de patología realizados en el INCAN y el reporte de la firma genómica Oncotype DX®. Se obtuvieron todas las variables necesarias para calcular los modelos predictivos (ecuaciones de Magee 1, 2 y 3 e índice IHC4) y estos fueron correlacionados linealmente por medio de la correlación de Pearson y categóricamente por medio de la prueba estadística de Kappa de Cohen.

**Resultados:** Los coeficientes de correlación de Pearson estimados entre el porcentaje actual de recurrencia obtenido mediante la prueba de Oncotype DX® fue similar al obtenido para cada uno de los modelos predictivos (0.744, 0.684, 0.702) para las ecuaciones modificadas de Magee 1, 2, 3. En el caso del IHC4 mostró un grado de concordancia bueno para clasificar en grupos de riesgo ( $\kappa = .530$  95% CI).

**Conclusión:** Existe una correlación buena entre los datos clínico-patológicos y los puntajes de riesgo obtenidos por la prueba Oncotype DX®. La aplicabilidad de estos modelos predictivos, podría optimizar la selección de los pacientes candidatos a realización de firmas genómicas sin intentar sustituir la utilidad o el valor de la prueba de Oncotype DX®. Se requiere contar con la elaboración de un informe de patología por un patólogo experto para mejorar resultados y la realización de estudios prospectivos para validar la prueba.

## ÍNDICE

<b>TÍTULO</b> .....	8
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	9
Oncotype DX® en la predicción del riesgo de recurrencia .....	10
Modelos Predictivos para estimar riesgo de recurrencia .....	11
Ecuaciones Modificadas de Magee .....	11
IHC4 Score .....	12
<b>DEFINICIÓN DEL PROBLEMA</b> .....	13
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	14
<b>HIPÓTESIS</b> .....	15
<b>OBJETIVOS</b> .....	16
Objetivo General .....	16
Objetivos Específicos .....	16
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	17
Tipo de Estudio .....	17
Definición del Universo.....	17
Universo de Estudio .....	17
Criterios de Inclusión .....	18
Criterios de Exclusión .....	18
Criterios de Eliminación .....	18
Variables .....	19
Cronograma ... ..	20
Metodología .....	21
Consideraciones Éticas .....	23
<b>RESULTADOS</b> .....	24
<b>DISCUSIÓN</b> .....	35
<b>CONCLUSIONES</b> .....	37
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	39

## **TÍTULO**

**CORRELACIÓN ENTRE ECUACIONES MODIFICADAS DE MAGEE Y LA PUNTACIÓN DE MARCADORES INMUNOHISTOQUIMICOS (IHC-4) CON EL PUNTAJE DE RECURRENCIA DE ONCOTYPE DX EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA EN ETAPAS CLÍNICAS TEMPRANAS**

## MARCO TEORICO

La incidencia de cáncer de mama se ha incrementado considerablemente en los últimos años, representando actualmente un problema de salud a nivel mundial.<sup>1</sup> Desde 2006, el cáncer de mama es la principal causa de mortalidad por cáncer en mujeres mexicanas, representando el 14% de las muertes asociadas a cáncer.<sup>2-3</sup>

Las pacientes diagnosticadas con cáncer de mama temprano, que corresponden a las etapas clínicas I-II B (que incluye T2N1M0) se asocian a un buen pronóstico posterior al tratamiento quirúrgico.<sup>4</sup> Éste consiste en mastectomía o cirugía conservadora con y/o sin patrón oncoplástico, mas disección ganglionar axilar y/o resección de ganglio centinela.

La irradiación a mama se recomienda en pacientes que son llevadas a cirugía conservadora, mientras que la irradiación a pared torácica y ganglios linfáticos regionales se sugiere después de realizar mastectomía en pacientes seleccionadas.

Aproximadamente 80% de los casos de cáncer de mama son receptor de estrógeno positivos.<sup>5-6</sup> por lo que la mayoría de estos pacientes recibirán terapia endocrina, la cual substancialmente mejorará el pronóstico. Sin embargo, existe un porcentaje de recurrencia superior al 20% a 10 años, porcentaje que disminuye con el uso de quimioterapia adyuvante.<sup>7</sup>

Posterior a la cirugía, la decisión en cuanto al uso de terapia sistémica en cáncer de mama generalmente se establece en base a la presencia y combinación de ciertos factores de riesgo histopatológicos entre los que se incluyen índice de proliferación,<sup>8</sup> tamaño tumoral,<sup>9</sup> grado histológico,<sup>10</sup> así como estado ganglionar.<sup>10</sup> Aunado a la expresión de biomarcadores, entre los que se incluyen receptor de estrógenos (RE), receptores de progesterona (RP) y el receptor-2 de factor humano de crecimiento epidérmico (HER-2); generalmente determinados para proveer mayor información pronóstica, así como para ayudar a identificar el subgrupo de pacientes que son candidatos para terapias específicas dirigidas.<sup>12-14</sup> Este tipo de marcadores resultan bastante útiles identificando pacientes de alto riesgo triple negativos y/o casos HER-2 positivos.

El uso de quimioterapia adyuvante reduce el riesgo de recurrencia en un promedio de 30%. Sin embargo, el rango del beneficio es variable dependiendo del subgrupo de riesgo de acuerdo a los factores pronósticos: puede aumentarse a más del 30% en pacientes de alto riesgo, como son pacientes con cáncer de mama triple negativo con afección ganglionar y disminuyendo a tan solo 1% de beneficio en mujeres con bajo riesgo de recurrencia como aquellas con RE positivos y ganglios negativos.<sup>15</sup> Estimar este riesgo ayuda a definir qué pacientes se beneficiarán de tratamiento adyuvante con quimioterapia y cuáles no, limitando los efectos adversos del manejo solo a aquellas mujeres que se beneficien realmente del mismo. Si el riesgo de recurrencia excede de 5-10% a pesar de tratamiento hormonal a pacientes con RE positivos, se recomienda quimioterapia para pacientes en condiciones clínicas adecuadas.<sup>16</sup>

En las últimas décadas, avances moleculares, en los que se incluyen análisis multigenes para predecir pronóstico y respuesta a tratamiento, se han introducen en el cuidado de las pacientes con cáncer de mama.<sup>17-18</sup>

## Oncotype DX® en la predicción del riesgo de recurrencia

Oncotype DX® (Genomic Health, Redwood City, CA, USA) es una prueba comercial basada en la determinación cuantitativa de la reacción en cadena de polimerasa de 21 genes que cuantifica la expresión de 16 genes relacionados al cáncer. Los cinco genes restantes se utilizan para checar la integridad del ARN y normalizar los niveles de expresión.<sup>19</sup> La prueba de Oncotype DX® ha demostrado ser pronóstica<sup>19</sup> y predecir el beneficio de la quimioterapia<sup>20</sup> en pacientes con RE positivos y ganglios linfáticos negativos en pacientes con cáncer de mama. Existe evidencia que sugiere que el uso de Oncotype DX® también puede proveer información adicional y predecir recurrencia en mujeres con ganglios positivos.

Oncotype DX® emplea la reacción en cadena de polimerasa y un algoritmo para calcular el índice de recurrencia, dando mayor peso al índice de proliferación (Ki67), seguido del HER-2, RE y RP.

El uso de Oncotype DX® se analizó en pacientes con cáncer de mama temprano, ganglios negativos, receptores estrogénicos positivos, en dos estudios (NSABP B-14 y B20), mostrando que esta herramienta estima las tasas de recurrencia a distancia. Este puntaje clasifica a los pacientes en riesgo bajo (<18 puntos), intermedio (18-30 puntos) o alto riesgo (>31 puntos) de recurrencia. Oncotype DX® estima el riesgo de recurrencia a 10 años correspondiente a cada grupo de riesgo: (bajo riesgo: 6.8%, 95% CI: 4.0-9.6; riesgo intermedio 14.3%, 95% CI: 8.3-20.3; alto riesgo: 30.5%, 95% CI: 23.6-37.4). Además se ha encontrado que este puntaje es independiente de la edad, tamaño y grado tumoral en el análisis multivariado.<sup>19</sup>

Dos estudios han mostrado que la adición de quimioterapia a tamoxifeno mejora la supervivencia libre de enfermedad, solo en pacientes con puntaje de alto riesgo, incluye dos pacientes con ganglios negativos tratadas con ciclofosfamida, metrotexate y 5-fluorouracilo<sup>21</sup>, así como en mujeres postmepopausicas con ganglios positivos tratadas con 5-fluorouracilo, adriamicina y ciclofosfamida.<sup>22</sup>

No solo se ha demostrado su utilidad en la predicción de recurrencias sistémicas, sino también en el riesgo de recurrencia locoregional. En un análisis de los estudios de NSABP B 14 y B20, enfocado a la relación de entre Oncotype DX y la recurrencia locoregional, el puntaje de recurrencia se asoció de forma significativa ( $p < 0.001$ ) con el riesgo de recurrencia a 10 años (bajo riesgo: 4.0%; 95% IC: 2.3-6.3; riesgo intermedio: 7.2%; 95% IC: 3.4-11; alto riesgo: 15.8%; 95% IC: 10.4-21.2).<sup>23-24</sup>

Las guías NCCN (National Comprehensive Cancer Network)<sup>4</sup> recomiendan el uso de Oncotype DX® en pacientes seleccionadas. Los resultados de diferentes estudios han mostrado que el uso de esta herramienta puede cambiar la recomendación de quimioterapia + hormonoterapia a hormonoterapia sola en aproximadamente 25% de las pacientes.<sup>20</sup> De hecho, un estudio retrospectivo reciente compara el uso de Oncotype DX® con criterios clínico patológicos (NCCN, St Gallen, Adjuvant), y reportó un cambio en la recomendación de terapia adyuvante en el 27% de los casos.<sup>25</sup> De forma similar, un estudio de 135 pacientes con cáncer de mamá temprano, con RE positivos reportó que la recomendación en el uso de quimioterapia cambio en 25.2% de las pacientes después de realizarse Oncotype DX®; siendo 70.6% de estos cambios quimioterapia a no quimioterapia.<sup>26</sup> Mientras tanto, en Latinoamérica, se reportó un estudio de cambio de decisión terapéutica de acuerdo con el resultado del puntaje de Oncotype DX® realizado en el Instituto Nacional de Cancerología, con resultados similares a los ya reportados sobre la proporción de cambio.<sup>27</sup> Se incluyeron 98 pacientes en las cuales se aplicó esta prueba, encontrando un cambio

en las recomendaciones de tratamiento en 32% de las pacientes, concluyendo que los resultados de Oncotype DX® impacta en la toma de decisiones en la población Mexicana estudiada reduciendo la proporción del uso de quimioterapia adyuvante.

### **Modelos Predictivos para estimar riesgo de recurrencia**

Debido al alto costo actual de las pruebas moleculares para estimar el riesgo de recurrencia, diferentes grupos han intentado determinar si es posible predecir este riesgo mediante modelos que incluyan factores pronósticos ya conocidos, y que no impliquen costos tan elevados.

Existen diversos modelos de predicción de riesgo, uno de ellos es el índice de Nottingham, el cual se desarrolló en 1982 para pacientes con cáncer de mama operable. Este índice se basó en un análisis multivariado. Este índice fue validado en un estudio prospectivo de 320 pacientes, dividiendo a las pacientes en 3 grupos pronósticos.

Existen estudios que comparan modelos de predicción de riesgo, con variables histopatológicas y/o clínicas, en busca de una alternativa para determinar el riesgo de recurrencia en cáncer de mama temprano. Uno de estos estudios reporta, incluso, una mejor correlación con el pronóstico, cuando se utiliza el puntaje basado en variables histopatológicas, comparando el análisis molecular.<sup>28</sup> Por lo tanto, consideramos que el análisis de variables clínicas y de inmunohistoquímica, pueden ser potencialmente útiles en la determinación del pronóstico de este grupo de pacientes.

Se ha reconocido que ciertos marcadores de inmunohistoquímica (IHQ) bien establecidos proporcionan información pronóstica y predictiva adicional, además de la brindada por factores clínicos clásicos.<sup>29-30</sup>

### **Ecuaciones Modificadas de Magee**

Cuatro análisis de regresión lineal han sido publicadas<sup>33-34</sup> utilizando diferentes variables histopatológicas y los resultados semicuantitativos de cuatro marcadores inmunofenotípicos (RE, RP, HER-2 y Ki67). En estos estudios, <sup>33-34</sup> se demostró que el uso de parámetros estándar histopatológicos en combinación con el resultado semicuantitativo de RE, RP, HER-2 y Ki67 los cuales pueden ser utilizados en las ecuaciones de Magee para estimar el porcentaje de recurrencia mismo que podría correlacionarse con el índice del Oncotype DX® y proveer información similar a la encontrada por este mismo índice.

Basados en la información disponible, los análisis de regresión lineal en estudio, resultaron en tres nuevas ecuaciones las cuales se presentan a continuación:

**Ecuación 1:**  $RS = 15.31385 + Nottingham\ score * 1.4055 + RE(-0.01924) + RP(-0.02925) + (0\ para\ HER-2\ negativo, 0.77681\ para\ indeterminado, 11.58134\ para\ HER-2\ positivo) + Tama\~no\ del\ tumor * 0.78677 + Ki67 * 0.13269$

**Ecuación 2:**  $RS = 18.8042 + Nottingham\ score * 2.34123 + RE(-0.03749) + RP(-0.03065) + (0\ para\ HER-2\ negativo, 1.82921\ para\ indeterminado, 11.51378\ para\ HER-2\ positivo) + Tama\~no\ del\ tumor * 0.04267$

**Ecuación 3:**  $RS = 24.30812 + RE(-0.02177) + RP(-0.02884) + (0 \text{ para HER-2 negativo, } 1.46495 \text{ para indeterminado, } 12.75525 \text{ para HER-2 positivo}) + Ki67 * 0.18649.$

#### **IHC4 Score**

Se desarrolló un puntaje pronóstico basado en cuatro marcadores de IHQ –RE, RP, HER2 y Ki67- utilizando tejido tumoral de biopsias obtenidas en el estudio ATAC, para determinar la capacidad de estimación con los cuatro marcadores de IHQ comparada el puntaje de recurrencia determinando por Oncotype DX.<sup>31-32</sup>

La información obtenida de las variables de IHQ fue sometida a un análisis mediante la siguiente ecuación (IHC4 Score):

$$IHC4 = 94.7 \{-0.100 ER_{10} - 0.079 PgR_{10} + 0.586 HER2 + 0.240 \ln(1+10Ki67)\}$$

Donde  $ER_{10}$  es el valor H Score dividido entre 30 y  $PgR_{10}$  es el valor porcentual de la progesterona dividida entre 10.

Aunque el modelo fue validado con un número considerable de pacientes, el autor reporta una modesta correlación entre IHC4 y Oncotype DX® -“El puntaje de IHC4 Score se correlaciona de forma moderada con Oncotype DX® ( $r=0.72$ ), indicando una superposición en la información, pero también, una diferencia considerable”.

## DEFINICION DEL PROBLEMA

La prueba de 21 genes Oncotype DX® fue la primera prueba en demostrar impacto en las decisiones terapéuticas adyuvantes en el manejo de las pacientes en etapa temprana en cáncer de mama. Su mayor uso está demostrado en las pacientes con RE y RP positivos, HER2 negativo, ganglios negativos quienes pudieran recibir terapia endocrina y en quienes la decisión de recomendar el uso de quimioterapia citotóxica resulta más difícil. Las guías internacionales recomiendan el uso de esta prueba en ciertas circunstancias.<sup>35-36</sup>

Las ecuaciones de Magee y el Índice de 4 marcadores inmunohistoquímicos (IHC4) parecen proveer información pronóstica similar a la obtenida por la prueba de 21 genes.<sup>32</sup>

Por lo que el objetivo de este estudio es conocer cuál es la correlación que existe entre la información obtenida del Oncotype DX® con la información obtenida de las ecuaciones de Magee y el IHC4.

## JUSTIFICACIÓN

La implementación de variables histopatológicas y el uso de biomarcadores resultado del análisis histopatológico son reconocidos actualmente por las guías internacionales en el manejo del cáncer de mama. Han sido utilizados en diversos modelos predictivos de riesgo como St Gallen, Adjuvant Online y el Índice Pronóstico de Nottingham marcando las directrices en el manejo de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama. En fechas recientes el estudio de las pruebas genómicas entre las que se incluye el Oncotype DX®.

La decisión y el impacto del uso de la prueba de Oncotype DX® ha demostrado que un gran número de pacientes y clínicos han optado por evitar el uso de quimioterapia citotóxica cuando el riesgo de recurrencia es bajo.<sup>26</sup> Sin embargo, esta prueba, es procesada en un solo laboratorio central, al mismo tiempo resulta relativamente cara; por lo que en algunos sistemas de salud, puede no ser accesible. Constituyéndose este factor como su principal limitante.

Oncotype DX® cuantifica la expresión de 16 genes agrupados en grupo hormonal (incluye expresión de RE y RP), grupo de proliferación, grupo HER2, grupo de invasión y otros.<sup>19</sup>

Se han propuesto dos modelos predictivos originados a partir del uso variables clínico -patológicas generalmente analizadas en el reporte histopatológico ordinario<sup>32-34</sup>: el IHC4 es un modelo que mide la expresión proteínica de los cuatro biomarcadores más informativos: RE, RP, HER2 y Ki67.<sup>24</sup> El segundo tiene su origen en el Magee-Women's Hospital of University of Pittsburgh Medical Center (Ecuaciones de Magee) en este modelo el porcentaje de recurrencia puede predecirse mediante el uso de ecuaciones de regresión utilizando el grado histológico, H-SCORE de los receptores hormonales y el estado del HER2-Neu.<sup>33</sup>

Ambos modelos han sido probado en diversos estudios y han demostrado proveer información similar a la obtenida en la prueba de Oncotype DX®, por lo que se proponen como una prueba económica alternativa con valor pronóstico y predictivo de recurrencia que permitan identificar, aquel grupo de mujeres de bajo riesgo de recurrencia que no se beneficiarán del uso de quimioterapia sistémica y aquellas en quienes resulta ponderante el uso de la misma.

## **HIPÓTESIS**

El uso de las ecuaciones modificadas de Magee y el uso del índice de marcadores de inmunohistoquímica (IHC4) brindan información predictiva y pronóstica similar a la obtenida por la prueba genómica de Oncotype DX® en pacientes con diagnóstico de cáncer de mama en etapas tempranas.

## OBJETIVOS

### Objetivo General:

- Conocer cuál es el coeficiente de correlación obtenido mediante el uso de ecuaciones de Magee y uso del índice de marcadores de inmunohistoquímica (IHC4) ; comparados con los resultados del puntaje de recurrencia obtenido a través de la prueba de Oncotype DX® en pacientes en etapas clínicas tempranas con diagnóstico de cáncer de mama en el Instituto Nacional de Cancerología.

### Objetivos Específicos:

- Estratificar en grupos de riesgo (Bajo, Intermedio y Alto), en base a los resultados de la prueba de Oncotype DX®
- Saber en qué porcentaje se obtiene la correlación entre los diferentes grupos de riesgo establecido mediante el RS del Oncotype DX® con los resultados obtenidos mediante las ecuaciones de Magee y el IHC4.
- Identificar con cuál de las ecuaciones de Magee se correlaciona más el resultado del Oncotype DX®

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **TIPO DE ESTUDIO**

Estudio retrospectivo, descriptivo y analítico.

### **DEFINICION DEL UNIVERSO**

Se analizó la información obtenida a través de los expedientes electrónicos, así como a través de la revisión de muestras de patología de pacientes tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología de México, con diagnóstico de cáncer de mama temprano a quienes se les solicitó la prueba de Oncotype DX®, durante el periodo de enero de 2011 hasta Mayo de 2016.

### **UNIVERSO DE ESTUDIO:**

Mujeres mayores de 18 años de edad que acudieron a atención médica con diagnóstico de cáncer de mama, que se encontraran en etapas clínicas tempranas y que cumplieran con los criterios de inclusión.

## CRITERIOS

### Criterios de Inclusión

- Pacientes mayores de 18 años
- Sexo femenino
- Diagnóstico de Cáncer Mama en etapas clínicas I y II
- Receptores Estrógeno Positivo, Receptores Progesterona Positivo, Her 2 Neu Negativo
- Pacientes con resultado de Oncotype DX®

### Criterios de Exclusión

- Pacientes a quienes se les haya solicitado Oncotype DX® con muestra insuficiente para el procesamiento de la prueba.

### Criterios de Eliminación

- Todos aquellos pacientes que presenten expedientes clínicos incompletos
- Pacientes con Diagnóstico de Carcinoma In Situ

## DEFINICIÓN OPERACIONAL DE LAS VARIABLES

Variable	Definición Operacional	Tipo de Variable	Unidad de Medida
Edad	Edad cumplida en años al momento del diagnóstico	Cuantitativa Discreta	Años
Etapa Clínica	Tumor (T): Tamaño y localización del tumor. Ganglio (N): Evidencia de Enfermedad Metástasis (M): Diseminación a otras partes del cuerpo.	Cualitativa Nominal	0: Tis N0M0 IA: T1N0M0 IB: T0/T1N1miM0 IIA: T0N1M0/T1N1M0/T2N0M0 IIB: T2N1M0/ T3N0M0 IIIA: T1N2M0/T2N2M0/ T3N1M0 IIIB: T4N0,1,2 M0 IIIC: T*N3M0 IV: T*N* M1
<b>Tipo de procedimiento quirúrgico</b>	Procedimiento inicial empleado para el tratamiento y control local de la enfermedad	Cualitativa Nominal	1. Cirugía Conservadora 2. Mastectomía Total 3. Mastectomía Radical Modificada.
Tipo Histológico	Patrón característico morfológico de una enfermedad	Cualitativa Nominal	Ductal Lobulillar Mixto
Grado Tumoral	Grado de diferenciación celular, expresado mediante escala de Scarff Bloom Richardson	Cualitativa Nominal	G1 Bien Diferenciado: 3-5 G2 Moderadamente Diferenciado: 6-7 G3 Pobremente Diferenciado: 8-9
<b>Tamaño del tumor</b>	Medida principal del diámetro mayor del tumor en la pieza patológica	Cuantitativo	Milímetros
Estado Ganglionar	Presencia de nódulos linfáticos con evidencia enfermedad	Cualitativa Dicotómica	Presencia Ausencia de Enfermedad
Receptor de Estrógenos	Porcentaje de receptores semicuantitativos de	Cuantitativa Discreta	0-300
Receptor de Progesterona	inmunohistoquímica, comúnmente conocido como "H-Score"		
Her2-Neu	Expresión del receptor para el factor de crecimiento de tipo epidérmico humano	Cualitativa Dicotómica	Resultados inmunohistoquímicos de 0 a 1+ son considerados como resultados negativos y un resultado 3+ se consideró como positivo.
Ki67	Proteína Nuclear que se asocia con y puede ser necesaria para la proliferación celular	Cuantitativa Discreta	0-100
Porcentaje de Recurrencia Oncotype DX®	Porcentaje obtenido a través de la prueba genómica del análisis de 21 genes. Su valor va del 0-100.	Cuantitativa Categoría	Bajo Riesgo: < 18 Riesgo Intermedio 18-30 Alto Riesgo: > 18
Ecuaciones de Magee	Ecuaciones de regresión lineal obtenidas a través del reporte del tamaño tumoral, grado histológico, ki67 y receptores hormonales. Su valor va del 0-100.	Cuantitativa Categoría	Bajo Riesgo: < 18 Riesgo Intermedio 18-30 Alto Riesgo: > 18
IHC-4	Índice predictivo obtenido a través de cuatro parámetros obtenidos mediante inmunohistoquímica	Cuantitativa Categoría	Bajo Riesgo: < -29 Riesgo Intermedio: -29 -29 Alto Riesgo: > 29

## CRONOGRAMA

ACTIVIDAD	Feb 2016	Mar 2016	Abr 2016	May 2016	Jun 2016	Jul 2016
Identificación del Problema	X	X				
Consulta Bibliográfica	X	X	X			
Construcción del Marco Teórico		X	X			
Aprobación del Protocolo						
Recolección de Datos		X	X	X		
Procesamiento de Datos				X		
Análisis de Datos				X	X	
Presentación del Estudio					X	
Informe Final						X

## METODOLOGIA

Se realizó un estudio descriptivo, transversal y analítico; a partir de una recopilación de expedientes correspondientes al periodo comprendido de enero de 2011 al 30 de Mayo de 2016. Se identificaron todos los casos enviados a la prueba de Oncotype DX® en base a las peticiones clínicas recibidas por el departamento de patología, mismos que fueron incluidos para la realización del presente estudio.

Las variables demográficas fueron extraídas del expediente clínico. Se analizaron variables inmunohistopatológicas, mismas que fueron revisados por al menos dos patólogos certificados en mama. La información sobre grado tumoral (incluyendo Grado de Nottingham, puntuación, y componentes individuales del tumor), tamaño del tumor, resultados semicuantitativos de inmunohistoquímica para RE, RP, HER-2 y Ki-67 se encontraban disponibles en los reportes histopatológicos. En nuestra institución, los resultados de RE y RP son reportados usando un porcentaje semicuantitativo de inmunohistoquímica (comúnmente conocido como “H-Score”), el cual describe el porcentaje células positivas que muestran tinción débil, moderada o fuerte. La puntuación obtenida es el resultado de la suma del porcentaje obtenido multiplicado por un valor ordinario correspondiente al nivel de intensidad de tinción (0: ninguna; 1+: débil; 2: moderada; 3+: fuerte). El resultado obtenido tiene un rango que va de 0 (no evidencia de tinción) a 300 (tinción difusa a intensa). El resultado inmunohistoquímico semicuantitativo del HER2 se reportó de acuerdo a las guías establecidas por el Colegio Americano de Patología y la Sociedad Americana Clínica de Oncología (CAP/ASCO). Resultados inmunohistoquímicos de 0 a 1+ son considerados como resultados negativos y un resultado 3+ se consideró como positivo. El estado definitivo HER 2 2+ se determinó mediante el resultado de la Hibridación Fluorescente in Situ (FISH) y se clasificó de la siguiente manera (negativo para la amplificación, ie HER2:CEP17 radio <1.8), positivo (positivo para la amplificación inequívoca, HER2CEP17 radio >2.2) o equivoco (HER2:CEP17 radio 1.8-2.2).

Se construyeron cuatro modelos en base a diferentes hipótesis y disponibilidad de los datos. Los primero tres modelos incluyeron el uso de las ecuaciones de Magee en las que se realiza un análisis de regresión lineal múltiple. El primer modelo de regresión incluye todos los parámetros disponibles (Incluyendo el índice Ki-67) para la predicción de puntuación de recurrencia Oncotype DX®. El segundo modelo de regresión fue similar a la primera pero no incluye Ki-67. El tercer modelo de regresión incluye solamente el nivel de expresión semicuantitativo inmunohistoquímico de RE, RP, HER2, y Ki-67. El cuarto modelo utiliza las variables clínico patológicas para obtener el resultado del algoritmo descrito previamente por Cuzick et al.<sup>32</sup>

Una vez que la puntuación de recurrencia se estimó mediante cuatro ecuaciones en las hojas de cálculo de Microsoft Excel y el programa de SPSS en su versión 22.

Los casos fueron clasificados como bajo, intermedio y alto riesgo, utilizando los mismos puntos de corte como la puntuación real de recurrencia. Las concordancias estadísticas se realizaron para comparar la categoría real de puntuación de recurrencia Oncotype DX® a las puntuaciones

estimadas. Se realizó la correlación del puntaje de riesgo obtenido en la firma genómica y el calculado por las ecuaciones de Magee por medio de la correlación de Pearson. Además, se estimó el grado de concordancia para clasificar a los pacientes en un grupo de riesgo determinado entre la firma de riesgo genómico con cada uno de los diferentes modelos predictivos (ecuación de Magee 1, Magee 2, Magee 3 e IHC4), por medio de la prueba estadística Kappa de Cohen.

## **CONSIDERACIONES ETICAS**

Al tratarse de un estudio descriptivo, se realizó el mismo sin incurrir en violaciones al Código de Ética Internacional delineado en la declaración de Helsinki, revisado por la 58ª asamblea de la Asociación Médica Mundial en Edimburgo, Escocia en octubre de 2000.

Debido a que el presente trabajo es considerado sin riesgo para los pacientes, en acuerdo con el artículo 17 del reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud y por ser un estudio retrospectivo descriptivo, se considera un estudio sin riesgo para los pacientes.

## RESULTADOS

De la base de datos del Instituto Nacional de Cancerología de pacientes tratadas con diagnóstico de cáncer de mama a las cuales se les solicitó la prueba de Oncotype DX® se encontraron 306 solicitudes, llevándose a cabo una revisión del expediente clínico y patológico; fueron excluidas diecinueve pacientes de las cuales en ocho casos no se procesó la prueba por no completar el envío de la misma. En siete, se solicitó a pacientes con diagnóstico definitivo de carcinoma ductal in situ y en tres casos no hubo material suficiente para poder realizar la prueba, trabajándose con una muestra final de 288 pacientes, mismos que cumplieron con los criterios de inclusión en la realización del presente estudio. Se expresan las variables demográficas en la tabla 1.

**Tabla 1.** Características demográficas y tratamiento establecido en pacientes con diagnóstico de cáncer de mama a quienes se les realizó la prueba de Oncotype DX®

	(n)	%
<b>Edad</b>		
Promedio	54.32	±11.14
< 50 años	126	44
> 50 años	160	56
<b>Etapa Clínica</b>		
IA	49	17.13
IB	1	0.3
IIA	140	52.1
IIB	87	30.2
<b>Tratamiento Quirúrgico</b>		
<b>Cirugía Conservadora (CC)</b>	<b>126</b>	<b>43.75</b>
CC + GC*	91	72.2
CC + GC* + DRA**	22	17.4
CC + DRA**	13	10.3
<b>Mastectomía Total (MT)</b>	<b>114</b>	<b>39.58</b>
MT + GC*	76	26.6
MT + GC* + DRA**	38	13.3
<b>Mastectomía Radical Modificada</b>	<b>46</b>	<b>16.1</b>

\* GC: Ganglio Centinela

\*\* DRA: Disección Radical de Axila

Como podemos observar el promedio de las pacientes tratadas en el INCan tienen una edad promedio de 54.32 ± 11.14 años, siendo la etapa clínica IIA con 52.1% la etapa que concentra el mayor porcentaje de pacientes.

El manejo recibido por las pacientes fue con cirugía conservadora en el 43.75% (126/288), mastectomía total en el 39.58% (114/288) y solo en el 16.1% (46/288) de los casos las pacientes fueron llevadas a mastectomía radical modificada.

Analizando las variables histopatológicas reportadas, encontramos que en la mayoría de los casos el diagnóstico de carcinoma invasor el tipo histológico predominante fue el carcinoma ductal infiltrante con un 81.8%, siendo en el 84.7% de los casos bien y moderadamente diferenciado, solo un 15.3% de los casos indiferenciados. En cuanto al tamaño de la lesión, se encontró un tamaño promedio de 2.3 cm, presentando el 61.8% de los casos afección ganglionar (afección de 1-3 ganglios positivos. (Ver tabla 2).

**Tabla 2.** Características histopatológicas de las pacientes con diagnóstico de cáncer de mama a quienes se les realizó la prueba de Oncotype DX®

<b>Características Histopatológicas</b>	<b>(n)</b>	<b>%</b>
<b>Tipo Histológico</b>		
Carcinoma Ductal Infiltrante	234	81.8
Carcinoma Lobulillar	53	18.5
<b>Grado Tumoral</b>		
Bien Diferenciado	92	31.9
Moderadamente Diferenciado	152	52.8
Indiferenciado	44	15.3
<b>Tamaño Tumoral (cm)</b>		
Promedio	2.3	±1.1
≤ 2	145	50.3
2-5	138	47.9
≥ 5	5	1.7
<b>Estado Ganglionar</b>		
Ganglios Linfáticos Negativos	110	38.2
1-3 Ganglios Linfáticos Positivos	178	61.8

Se aplicaron los diferentes modelos predictivos de riesgo (ecuaciones de Magee e IHC4) al total de casos incluidos para estimar el riesgo de recurrencia. Con esta información se obtuvo una media en la escala en el riesgo de recurrencia para la prueba de Oncotype DX® de 18.92 comparada con una media de 21.18 para la ecuación 1 de Magee, 23.45 para la ecuación 2 de Magee, 19.29 para la ecuación 3 de Magee y de 12.05 para el IHC-4.

Se calcularon los valores medios, máximos y mínimos de los puntajes de riesgo obtenido por medio de la firma genómica, las ecuaciones modificadas de Magee y el índice de 4 parámetros de inmunohistoquímica (IHC4) los resultados se encuentran en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Comparación de los puntajes de recurrencia obtenidos en una muestra de 288 pacientes obtenidos mediante diferentes modelos predictivos de riesgo de recurrencia comparados con el resultado obtenido a través de la prueba de Oncotype DX®

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Edad	288	24	89	54.32	11.138
Magee_1	288	11	47	21.18	5.215
Magee_2	288	11	49	23.45	5.537
Magee_3	288	10	45	19.29	4.618
IHC4	288	-100	164	-13.78	41.311
ODX	288	0	65	18.92	11.410

A continuación se observan las tablas estadísticas por grupo de riesgo para cada modelo predictivo

**Tabla 4.** Frecuencia y Porcentaje de los diferentes grupos de riesgo establecidos mediante la Realización de la prueba de Oncotype DX en pacientes con cáncer de mama en etapas clínicas tempranas en el Instituto Nacional de Cancerología

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido Bajo Riesgo	176	61.1	61.1	61.1
Riesgo Intermedio	69	24.0	24.0	85.1
Alto Riesgo	43	14.9	14.9	100,0
Total	288	100,0	100,0	

Como podemos observar el 61.1% de la población estudiada se encuentra en riesgo bajo de recurrencia de la enfermedad a nivel local y a distancia determinado mediante la prueba genómica de Oncotype DX®. Disminuyendo a menos de la mitad de los casos (38.8%) la cantidad de pacientes en los que resulta beneficioso conocer la expresión genética del cáncer y establecer la mejor terapia adyuvante de tratamiento.

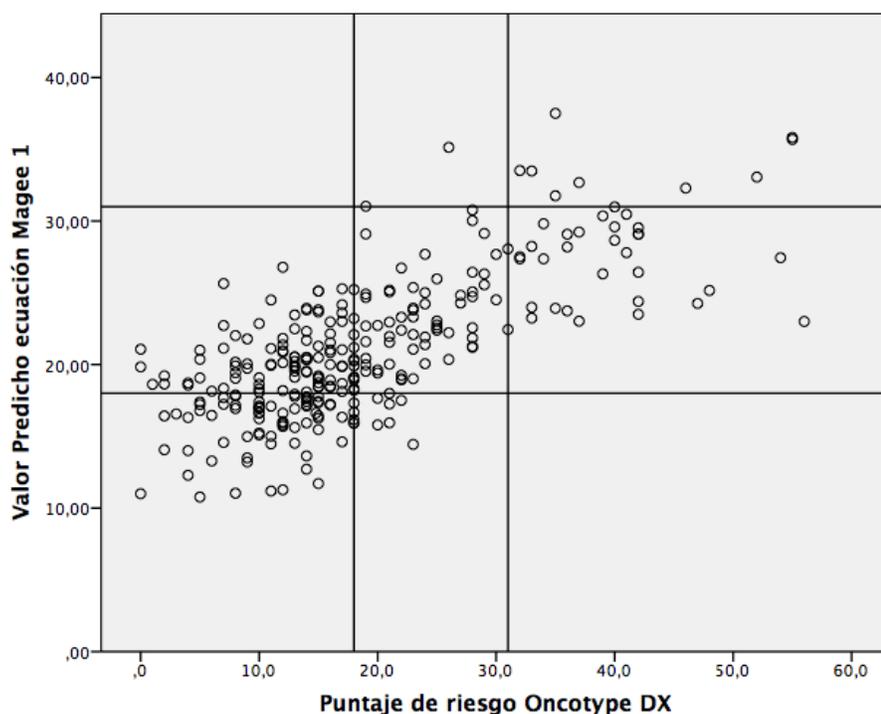
La concordancia entre el puntaje de recurrencia obtenido a través de la prueba de Oncotype DX® y el resultado a través de las ecuaciones modificadas de Magee y el IHC4 fue estimado, obteniendo un rango de categorización de 44.4 a 72.2 % (Tablas 5-8). Los coeficientes de correlación de Pearson estimados entre el porcentaje actual de recurrencia obtenido mediante la prueba de Oncotype DX® fue similar al obtenido para cada uno de los modelos predictivos (0.744, 0.684, 0.702 para las ecuaciones modificadas de Magee 1, 2, 3).

**Tabla 5.** Tabulación Cruzada de los Grupos de Riesgo según Ecuación Modificada Magee 1 con los grupos de Riesgo según RS Oncotype DX®

		Puntaje de Riesgo Estimado Oncotype DX®			Total
		Bajo	Intermedio	Alto	
<b>Bajo</b>	Recuento	84	7	0	91
	% dentro Puntaje de Riesgo Oncotype DX	92.3%	7.7%	0.0%	100.0%
<b>Intermedio</b>	Recuento	92	59	31	182
	% dentro Puntaje de Riesgo Oncotype DX	50.8%	32.6%	17.2%	100.0%
<b>Alto</b>	Recuento	0	3	12	15
	% dentro Puntaje de Riesgo Oncotype DX	0.0%	20.0%	80.0%	100.0%
<b>Total</b>	Recuento	176	69	43	288
	% dentro Puntaje de Riesgo Oncotype DX	61.1%	24.0%	14.9%	100.0%

Resultados de 288 casos. Concordancia: 155/288 (53.81%). Primer paso de discordancia: 133/288 (46.18%). Segundo paso de discordancia 0/288 (0%). Coeficiente de correlación de Pearson: 0.741.

**Figura 1.** Representación gráfica estimada utilizando el puntaje de recurrencia estimado a través de la Ecuación Modificada Magee 1 (eje Y) comparada con el resultado actual de la prueba de Oncotype DX® (eje X). Coeficiente de correlación de Pearson 0.744



### Correlaciones

		Puntaje de riesgo Oncotype DX	Valor Predicho ecuación Magee 1
Puntaje de riesgo Oncotype DX	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	1	,744**
	N	288	288
Valor Predicho ecuación Magee 1	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	,744**	1
	N	288	288

\*\* . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (2 colas).

Cuando observamos el diagrama de dispersión dispuesto en la figura 1 y lo evaluamos con los resultados obtenidos a través de la tabla 4 en los que evaluamos los resultados del puntaje de riesgo de recurrencia obtenidos a través de la ecuación modificada de Magee 1, podemos observar que los grupo de pacientes que tienen más concordancia son los subgrupos de pacientes en las categoría de riesgo alto y bajo, encontrando una concordancia de 80.0% y 92.3% respectivamente para cada grupo. Siendo el grupo categorizado como riesgo intermedio donde se aprecia la mayor variabilidad de distribución entre los diferentes grupos de riesgo, con un porcentaje de concordancia de 32.4% para este subgrupo.

Cuando analizamos los resultados de la ecuación modificada de Magee 2 con los resultados del puntaje de recurrencia del Oncotype DX®, encontramos los siguientes resultados. (Ver tabla 6 y figura 2)

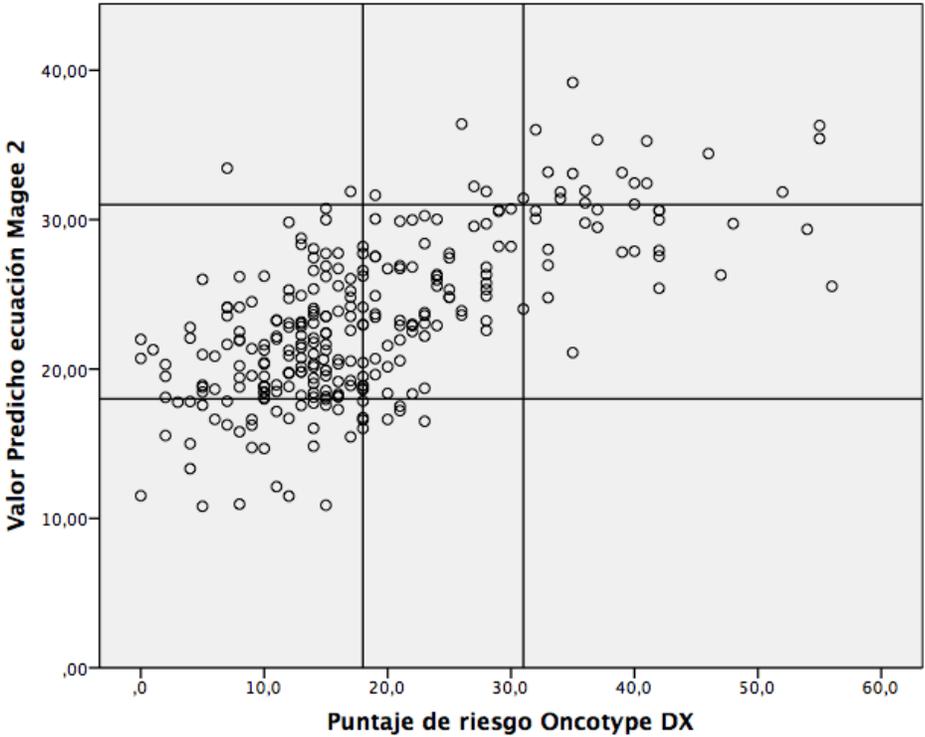
**Tabla 6.** Tabulación Cruzada de los Grupos de Riesgo según Ecuación Modificada Magee 2 con los grupos de Riesgo según RS Oncotype DX®

		Puntaje de Riesgo Estimado Oncotype DX®			
Puntaje de Riesgo Ecua Modif Magee 2		Bajo	Intermedio	Alto	Total
<b>Bajo</b>	Recuento	47	6	0	53
	% dentro Puntaje de Riesgo Oncotype DX	88.7%	11.3%	0%	100.0%
<b>Intermedio</b>	Recuento	126	56	18	200
	% dentro Puntaje de Riesgo Oncotype DX	63.0%	28.0%	9.0%	100.0%
<b>Alto</b>	Recuento	3	7	25	35
	% dentro Puntaje de Riesgo Oncotype DX	8.6%	20.0%	71.4%	100.0%
<b>Total</b>	Recuento	43	69	176	288
	% dentro Puntaje de				

Riesgo Oncotype DX	61.1%	24.0%	14.9%	100.0%
--------------------	-------	-------	-------	--------

Resultados de 288 casos. Concordancia: 128/288 (44.44%). Primer paso de discordancia: 157/288 (54.51%). Segundo paso de discordancia 3/288 (1.04%). Coeficiente de correlación de Pearson: 0.683

**Figura 2.** Representación gráfica estimada utilizando el puntaje de recurrencia estimado a través de la Ecuación Modificada Magee 2 (eje Y) comparada con el resultado actual de la prueba de Oncotype DX® (eje X). Coeficiente de correlación de Pearson 0.684



**Correlaciones**

		Puntaje de riesgo Oncotype DX	Valor Predicho ecuación Magee 2
Puntaje de riesgo Oncotype DX	Correlación de Pearson	1	,684**
	Sig. (bilateral)		,000
	N	288	288
Valor Predicho ecuación Magee 2	Correlación de Pearson	,684**	1
	Sig. (bilateral)	,000	
	N	288	288

\*\* . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (2 colas).

De manera similar a lo observado en la ecuación modificada de Magee 1, podemos ver que al aplicar la ecuación modificada de Magee 2 encontramos una correlación de Pearson de 0.684 donde encontramos una mayor concordancia en los grupos de riesgo alto y bajo con un porcentaje de 71.4% para el primer grupo y de 88.7% para el segundo. Encontrando de la misma forma mayor dispersión en el grupo intermedio con un porcentaje de concordancia de 28.0% para este grupo.

Ahora bien para analizar los resultados obtenidos mediante la aplicación de la ecuación modificada de Magee 3 con los resultados obtenidos a través del puntaje de recurrencia del Oncotype DX®, encontramos los siguientes resultados. (Ver tabla 7 y figura 3)

**Tabla 7.** Tabulación Cruzada de los Grupos de Riesgo según Ecuación Modificada Magee 3 con los grupos de Riesgo según RS Oncotype DX®

		Puntaje de Riesgo Estimado Oncotype DX®			
		Bajo	Intermedio	Alto	Total
<b>Bajo</b>	Recuento	120	9	1	130
	% dentro Puntaje de Riesgo Oncotype DX	92.3%	6.7%	0.0%	100.0%
<b>Intermedio</b>	Recuento	56	51	35	142
	% dentro Puntaje de Riesgo Oncotype DX	28.0%	25.5%	17.5%	100.0%
<b>Alto</b>	Recuento	0	9	7	16
	% dentro Puntaje de Riesgo Oncotype DX	0.0%	56.2%	43.8%	100.0%
<b>Total</b>	Recuento	176	69	43	288
	% dentro Puntaje de Riesgo Oncotype DX	61.1%	24.0%	14.9%	100.0%

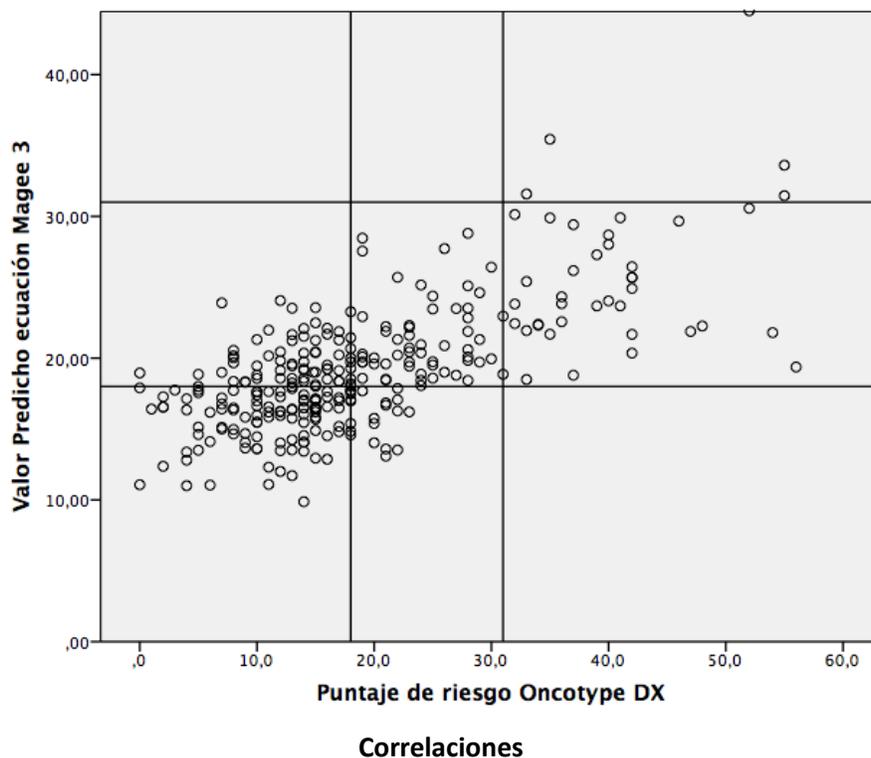
Resultados de 288 casos. Concordancia: 178/288 (61.8%). Primer paso de discordancia: 109/288 (37.84%). Segundo paso de discordancia 1/288 (0.34%). Coeficiente de correlación de Pearson: 0.702

De acuerdo a la tabla anterior, encontramos que el grupo en el que se aprecia mayor porcentaje de concordancia entre los dos resultados es el grupo de riesgo bajo (92.3%), no siendo así para los grupos de riesgo bajo (43.8%) y para el grupo de riesgo intermedio (25.5%), donde al igual que en los resultados obtenidos en las ecuaciones modificadas de Magee 1 y 2 encontramos mayor

dispersión en los resultados de los puntajes del grupo de riesgo intermedio. Lo cual lo podemos observar en la figura 3, donde se realiza el análisis gráfico de los resultados.

Para los resultados obtenidos mediante la aplicación de esta ecuación encontramos un coeficiente de correlación de Pearson de 0.702.

**Figura 3.** Representación gráfica estimada utilizando el puntaje de recurrencia estimado a través de la Ecuación Modificada Magee 3 (eje Y) comparada con el resultado actual de la prueba de Oncotype DX® (eje X). Coeficiente de correlación de Pearson 0.702

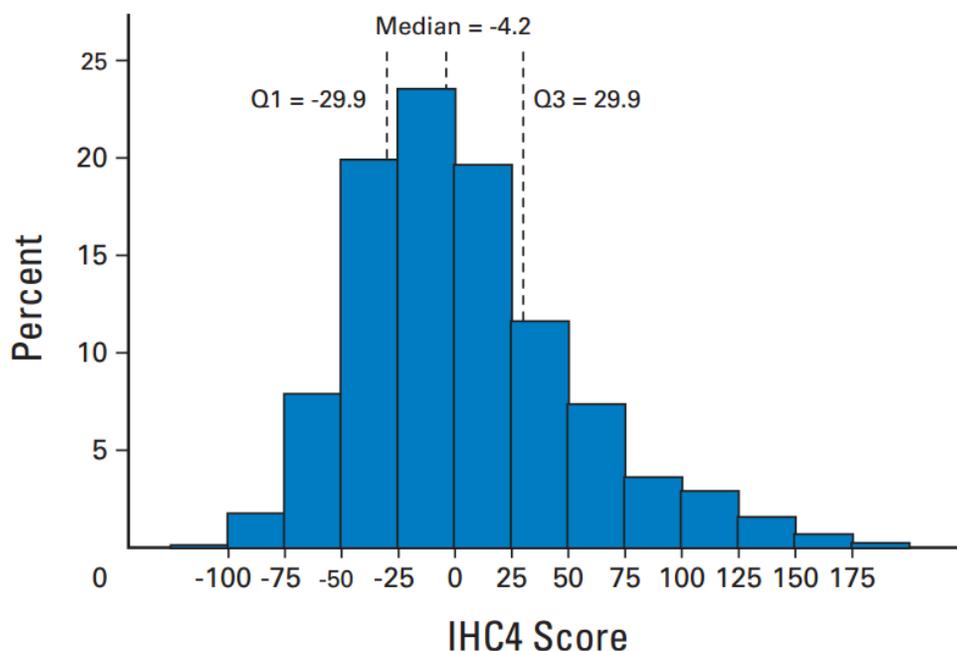


		Puntaje de riesgo Oncotype DX	Valor Predicho ecuación Magee 3
Puntaje de riesgo Oncotype DX	Correlación de Pearson	1	,702**
	Sig. (bilateral)		,000
	N	288	288
Valor Predicho ecuación Magee 3	Correlación de Pearson	,702**	1
	Sig. (bilateral)	,000	
	N	288	288

\*\* . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (2 colas).

Para el análisis de los datos obtenidos a través de la aplicación del modelo predictivo que utiliza los cuatro biomarcadores de inmuno histoquímica (IHC4), se establecieron los grupos de riesgo en base al histograma de Score establecido por Cuzick y colaboradores para categorizar los resultados en cada grupo de riesgo (ver figura 4).

**Figura 4.** Histograma de Score de IHC4 (score establecido para los cuatro biomarcadores inmunohistoquímicos: receptores de estrógenos, receptores de progesterona, receptor 2 del factor de crecimiento humano epidérmico y el Ki67)



De acuerdo a este histograma de Score de IHC4 podemos categorizar como grupo de bajo riesgo aquellos pacientes que se encuentren dentro del cuartil 1 (Q1) con un puntaje  $< -29.9$ , como grupo intermedio a aquellos pacientes que se encuentren dentro de la mediana ( $-29.8 - 29.9$ ) y los pacientes pertenecientes al grupo de riesgo alto como aquellos pacientes que se encuentren dentro del cuartil 3 (Q3) con un score de riesgo  $> 29.9$ . En base a este histograma elaboramos los resultados obtenidos de la aplicación del IHC4 comparándolos con los resultados del puntaje de recurrencia obtenidos de la prueba de Oncotype DX<sup>®</sup>, mismos que se expresan en la tabla 8.

**Tabla 8.** Tabulación Cruzada de los Grupos de Riesgo según IHC4 con los grupos de Riesgo según RS Oncotype DX®

		Puntaje de Riesgo Estimado			
		IHC-4			
Puntaje de Riesgo ODX		Bajo	Intermedio	Alto	Total
<b>Bajo</b>	Recuento	128	12	1	141
	% dentro Puntaje de Riesgo Oncotype DX	90.8%	8.5%	0.7%	100.0%
<b>Intermedio</b>	Recuento	44	50	12	106
	% dentro Puntaje de Riesgo Oncotype DX	41.5%	47.2%	11.3%	100.0%
<b>Alto</b>	Recuento	4	7	30	41
	% dentro Puntaje de Riesgo Oncotype DX	9.8%	17.1%	73.2%	100.0%
<b>Total</b>	Recuento	176	69	43	288
	% dentro Puntaje de Riesgo Oncotype DX	61.1%	24.0%	14.9%	100.0%

Resultados de 288 casos. Concordancia: 208/288 (72.2%). Primer paso de discordancia: 75/288 (26.0%). Segundo paso de discordancia 5/288 (1.7%).

**Tabla 9.** Medidas simétricas

	Valor	Error estándar asintótico <sup>a</sup>	Aprox. S <sup>b</sup>	Aprox. Sig.
Medida de acuerdo Kappa N de casos válidos	,530 288	,043	12,323	,000

a. No se supone la hipótesis nula.

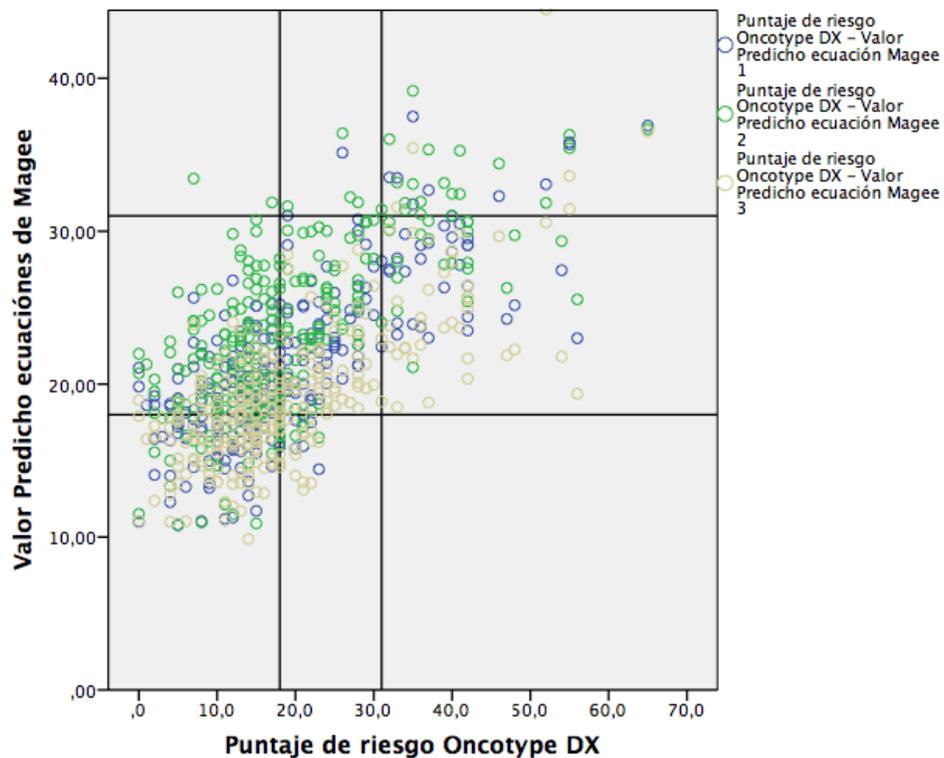
b. Utilización del error estándar asintótico que asume la hipótesis nula.

En base a los resultados obtenidos en esta tabla podemos decir que el grupo de pacientes en los que se aprecia mayor concordancia entre los resultados del Oncotype DX® con el IHC4 es el grupo de pacientes que se encuentran dentro de la categoría de riesgo bajo con un porcentaje de concordancia de 90.8%. Encontrando porcentajes menores para los grupos de riesgo intermedio de 47.2% y de 73.2% para el grupo de riesgo alto.

Cuando se realiza la exclusión de la categoría de riesgo intermedio obtenida a través de la prueba de Oncotype DX® y la recurrencia estimada a través de las ecuaciones modificadas de Magee y el IHC-4, la concordancia para cada uno de los modelos predictivos se incrementa en un 98.4%, reflejando una muy baja discordancia (concordancia 100% (96/96), 96% (72/75), 99.21% (127/128) y 92% (150/163) para cada uno respectivamente.

Cuando el riesgo de recurrencia estimado cae en la categoría de riesgo intermedio en cualquiera de las ecuaciones, el riesgo actual de recurrencia intermedio también se encontró en la categoría de riesgo intermedio y/o bajo en más del 84.5% de los casos analizados en cualquiera de las ecuaciones modificadas de Magee y en el IHC-4. De acuerdo a la tablas 5-8 los porcentajes de correlación para riesgo intermedio fueron los siguientes: 82.96% (151/182), 91% (182/200), 75.35% (107/142) (resultados que se expresan en la figura 5) y 88.7% (94/106) para el IHC-4 respectivamente.

**Figura 5.** Diagrama de dispersión de las Ecuaciones Modificadas de Magee 1, 2, 3 comparado con los resultados del porcentaje de recurrencia del Oncotype DX®



## DISCUSIÓN

Históricamente, la quimioterapia adyuvante se ofrecía a pacientes con cáncer de mama con ganglios positivos, ya que se consideraba incrementaba el riesgo de recurrencia.<sup>41</sup> Subsecuentemente, los estudios clínicos demostraron también beneficio en aquellos pacientes con ganglios negativos, con receptores hormonales negativo.<sup>43-45</sup> Existe un poco de debate sobre el uso de quimioterapia adyuvante en los pacientes con receptores negativos y ganglios negativos, ya que es el único tratamiento adyuvante eficaz probado con beneficio a largo plazo.<sup>46</sup> Sin embargo, este no es el caso de los pacientes con receptores hormonales positivos y ganglios negativos, para quienes la terapia hormonal adyuvante ha demostrado ser sumamente efectiva. El estándar de oro durante muchos años fue el tamoxifeno, hasta que el estudio NSABP B-20 demostró un beneficio significativo de la adición de quimioterapia a la terapia con tamoxifeno.<sup>42</sup> Posteriormente, la mayoría de los pacientes con RH positivos y ganglios negativos recibía la recomendación de agregar quimioterapia adyuvante a la terapia hormonal en base a las recomendaciones las guías internacionales, basadas en esquemas de clasificación clínico patológicas (NCCN y Consenso de St. Gallen).<sup>35-36</sup>

En la década pasada, el descubrimiento y aplicación de perfiles de expresión genética ha revolucionado el entendimiento de la biología molecular del cáncer de mama y su respuesta al tratamiento.<sup>19,44-52</sup>

El cáncer de mama con receptores hormonales positivos es una enfermedad con riesgo de recurrencia durante el periodo de prostración. El seguimiento a largo plazo observado en los estudios con inhibidores de aromatasas, incluidos Arimidex, Tamoxifeno, sólo o en combinación (ATAC) y el estudio BiG 1-98, muestran un riesgo continuo de recurrencia del 2% por año después de iniciada la terapia hormonal, ocurriendo más de la mitad de los casos dentro de los primeros cinco años de terapia adyuvante endocrina.

Estos hallazgos enfatizan la necesidad de extender la terapia adyuvante e identificar los biomarcadores, así como el desarrollo y la utilización de modelos predictivos que nos permitan guiar la decisión de tratamiento en este proceso.

La introducción de pruebas comerciales multigen que predicen el riesgo de recurrencia a distancia y el beneficio de la quimioterapia adyuvante, ha cambiado el manejo clínico de las pacientes con cáncer de mama en etapas clínicas tempranas en general y en pacientes con receptores hormonales positivos, ganglios negativos en particular.

La prueba de Oncotype DX<sup>®</sup> actualmente es la prueba más utilizada por los clínicos en Estados Unidos. A pesar de las dificultades conocidas en el análisis del Oncotype DX en la evaluación del estado genético, el resultado global ha reportado tener un valor pronóstico y predictivo. Lo cual es esperado ya que varios de los genes analizados en esta prueba expresan de forma individual valor pronóstico y predictivo. Aunque la prueba se basa en el análisis de 21 genes sobre el valor individual de parámetros histopatológicos estándar, existen algunos estudios que han comparado el poder pronóstico y predictivo de ciertos marcadores histopatológicos e inmunohistoquímicos

comparados con los resultados de la prueba de Oncotype DX<sup>®</sup>. Recientemente Cuzick y colaboradores<sup>32</sup>, así como Flanagan y colaboradores<sup>33</sup> mediante el establecimiento de los modelos predictivos.

Este estudio fue realizado con la intención de estimar el puntaje de recurrencia del Oncotype DX<sup>®</sup> utilizando parámetros histopatológicos y marcadores inmunohistoquímicos los cuales son reportados de manera rutinaria. La concordancia estimada entre el porcentaje de recurrencia con la prueba de Oncotype DX<sup>®</sup> tiene un rango de 44.4 a 72.2 %, lo cual coincide con lo reportado previamente en la publicación de Klein y colaboradores.<sup>34</sup> Se puede concluir que si el porcentaje de recurrencia estimada se localiza en la categoría alta y/o baja, su valor predictivo del porcentaje de recurrencia de Oncotype DX<sup>®</sup> tendrá una certeza diagnóstica > 85%. Demostrando ser útil aún en los casos en los que el porcentaje de recurrencia se encuentre en la categoría de riesgo intermedio, de acuerdo al presente trabajo observamos que cuando este puntaje se ubica en esta categoría el puntaje actual de recurrencia obtenido a través de la prueba de Oncotype DX<sup>®</sup> se encontrará en riesgo intermedio y/o bajo aproximadamente en un 75% de los casos. Estos resultados son importantes ya que en base a los resultados de validación con pacientes del estudio NSABP-B20 en los que se empleó la prueba del Oncotype DX<sup>®</sup> demostraron que aquellos pacientes con riesgo intermedio presentaban mínimo o nulo beneficio de la quimioterapia adyuvante.<sup>20</sup> Siendo los casos categorizados con riesgo alto aquellos que resultan beneficiados del empleo de este tratamiento.

Se aprecia en base a los resultados obtenidos una mayor concordancia en los resultados obtenidos a través del algoritmo estimado del IHC-4 (72.2%) y a diferencia del estudio de Klein y colaboradores<sup>34</sup> nosotros encontramos una mayor concordancia con la aplicación de la ecuación modificada 3 de Magee (61.8%), ecuación en la cual no se toma en cuenta el tamaño del tumor. Sin embargo el coeficiente de correlación de Pearson resultó mayor para la ecuación de Magee 1 siendo este de 0.741 vs 0.702.

## CONCLUSIONES

La solicitud de firmas genómicas en pacientes con cáncer de mama en etapas clínicas tempranas sin afección ganglionar o con un número limitado de ganglios axilares, es por hoy una de las conductas clínicas más recomendadas para la toma de decisiones al considerar ofrecer tratamiento adyuvante en esta población de pacientes.

Sin embargo, en ocasiones el costo de la implementación de dichas pruebas limita su uso en la práctica clínica diaria. Desde el descubrimiento de la existencia de receptores hormonales y la buena respuesta a tratamientos específicos para los tumores portadores de estos receptores, seguido del hallazgo de la sobreexpresión del HER2 y el nacimiento de una terapia específica o diana para este tipo tumoral, la investigación en el cáncer de mama se ha centrado en la búsqueda de optimización del tratamiento.

Los factores pronósticos y predictivos utilizados clínicamente en el cáncer de mama nos han permitido diseñar estrategias de tratamiento y conocer mejor el pronóstico de cada paciente. Estos factores cobran especial importancia en los tumores en estadios tempranos, permitiendo ajustar el tratamiento, de tal forma que no se trate en exceso a aquellos pacientes que no se beneficiarán del tratamiento adyuvante con quimioterapia, sin dejar de tratar a aquellos pacientes que de no tratarse tendrán una recaída.

Es así, que surgen modelos pronósticos y predictivos basados en el análisis de la combinación de estas variables. Ejemplo de esto, es el modelo matemático de ecuaciones de Magee, y el Índice de 4 marcadores inmunohistoquímicos (IHC-4). En el presente trabajo al correlacionar los puntajes de los resultado de la prueba de Oncotype DX® con los puntajes obtenidos en cada una de la ecuaciones de Magee 1,2,3 se obtuvieron similitudes equiparables, encontrando un coeficiente de correlación de Pearson promedio de 0.71, aplicándose cada una, dependiendo de las variables con que se cuente dentro del informe histopatológico. Recordar que existen tres modelos de ecuaciones diferentes ya que no en todos los laboratorios de patología de los centros hospitalarios era posible contar con los mismos marcadores inmunohistoquímicos dentro del informe de patología.

Al implementar el uso de las ecuaciones Modificadas de Magee podría permitirnos optimizar la selección de los pacientes candidatos a realización de firmas genómicas, ya que como observamos en los resultados, resulta factible identificar el 90% de los pacientes que se localizan dentro del grupo de “Riesgo Bajo de Recurrencia”, siendo más beneficiados para la realización de la prueba aquellos pacientes que se localizan en los grupos de “Riesgo Intermedio” y “Riesgo Alto”. Con estos resultados consideramos el médico oncólogo no deberá esperar un resultado diferente del Oncotype DX®, y la prueba podría no influir de manera significativa para la toma de decisión e inicio de terapia adyuvante. Todo esto sin intentar sustituir la utilidad o el valor de la prueba de Oncotype DX®.

Otra observación que consideramos importante a través de los resultados de las ecuaciones de Magee, es que presentan mayor coeficiente de correlación las ecuaciones modificadas 1 y 3,

mismas en las que se incluye el resultado de la obtención de la proteína de proliferación Ki67. Actualmente su uso como factor pronóstico o predictivo es controvertido. Esto se debe principalmente a una falta de consenso sobre qué niveles de Ki67 son considerados de peor pronóstico y a que se basa en un método que genera mucha variabilidad de interpretación entre laboratorios y observadores. Altos niveles de Ki67 predicen una mejor respuesta al tratamiento con quimioterapia. En cuanto a su papel como factor pronóstico, altos niveles de Ki67 se asocian a mayor probabilidad de recaída en cáncer en estadios tempranos independientemente de la afección axilar.

Cuando analizamos los resultados obtenidos de la aplicación del IHC-4 encontramos similitud en la identificación del grupo de pacientes categorizados como “riesgo bajo de recurrencia”, con un porcentaje de concordancia de 90.8%. Con un valor medido de acuerdo Kappa 0.530 (p 0.0001). Aunque la correlación encontrada entre el puntaje de recurrencia estimado y el real es buena no es perfecta. Existen diferentes posibilidades. Primero el puntaje de recurrencia estimado mide las características morfológicas e inmunofenotípicas y el porcentaje de recurrencia actual mide los niveles de expresión genéticos por lo que cierta variabilidad es esperada si dos parámetros diferentes son medidos. En segundo término podríamos comentar que existe la variabilidad inter observador para establecer el grado y los resultados semicuantitativos inmunohistoquímicos entre los patólogos. Siendo una de las fortalezas de este estudio, en el que la revisión de cada una de las muestras analizadas para la realización de este trabajo fue interpretada por dos patólogos expertos en patología mamaria, lo que permite encontrar mayor correlación con los resultados obtenidos en la literatura mundial.

En base a las conclusiones enumeradas previamente, podemos inferir de la importancia de contar con un informe completo elaborado por patólogos con experiencia en el manejo de neoplasias, que permitan al clínico la implementación de modelos predictivos y poder optimizar la selección de los pacientes candidatos a realización de firmas genómicas.

Estos modelos predictivos fueron analizados de manera retrospectiva en pacientes con diagnóstico de cáncer de mama que contaban con el resultado de la prueba de Oncotype DX®, consideramos que para poder confirmar nuestras aseveraciones, estas pruebas ameritan ser validadas de manera prospectiva dentro de la institución.

## BIBLIOGRAFIA

1. American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2012. Atlanta GACS, 2012. <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-031941.pdf>
2. INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. "A propósito del Día Mundial contra el cáncer". Datos Nacionales. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/aPropositom.asp?s=inegi&c=2859&ep=113>
3. Knaul FM, Nigenda G, Lozano R, Arreola-Ornelas H, Langer A, Frenk J. Breast cancer in Mexico: a pressing priority. *Reprod Health Matters* 2008; 16: 113–23
4. NCCN Clinical Practice Guidelines (NCCN Guidelines)®. Breast Cancer. Version 3.2016. [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/breast.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf)
5. Hassett MJ, Hughes ME, Niland JC, et al. Chemotherapy use for hormone receptor-positive, lymph node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:5553–5560.
6. Davies C, Godwin J, Gray R, et al: Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: Patient-level metaanalysis of randomised trials. *Lancet* 378:771-784, 2011
7. Peto R, Davies C, Godwin J, et al: Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: Meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet* 379:432-444, 2012
8. Jan P, Baak A, Gudlaugsson E, et al. Proliferation is the strongest prognosticator in node-negative breast cancer: significance, error sources, alternative and comparison with molecular prognostic markers. *Breast Cancer Res Treat* 2009;115:241–254.
9. Koscielny S, Tubiana M, Le MG, et al. Breast cancer: relationship between the size of the primary tumour and the probability of metastatic dissemination. *Br J Cancer* 1984;49:709–715.
10. 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;19:403–410.
11. Fisher B, Bauer M, Wickerham DL, et al. Relation of the number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer* 1983;52:1551–1557.
12. Colditz GA, Rosner BA, Chen WY, et al. Risk factors for breast cancer according to estrogen and progesterone receptor status. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:218–228.
13. Hicks DG, Kulkarni S. Trastuzumab as adjuvant therapy for early breast cancer: the importance of accurate human epidermal growth factor receptor 2 testing. *Arch Pathol Lab Med* 2008;132:1008–1015.
14. Viale G. Pathologic work up of the primary tumor: getting the proper information out of it. *The Breast* 2011;20:S82–S86.
15. Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. *Ann Oncol.* 2007 Jul;18(7):1133-44.
16. Fisher B, Jeong JH, Dignam J, Anderson S, Mamounas E, Wickerham DL, Wolmark N. Findings from recent National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project adjuvant studies in stage I breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2001;(30):62-6
17. Allison KH. Molecular pathology of breast cancer: what a pathologist needs to know. *Am J Clin Pathol* 2012;138:770–780.

18. Simpson PT, Reis-Filho JS, Gale T, et al. Molecular evolution of breast cancer. *J Pathol* 2005;205:248–254
19. Paik S, Shak S, Tang G, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *New Engl J Med* 2004;351: 2817–2826.
20. Paik S, Tang G, Shak S, et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Onc* 2006;24:3726–3734.
21. J.E.R. Bargallo1 , F. Lara1 , R.J. Shaw Dulin1 , V. Perez-Sánchez1 , C. Villarreal-Garza, Et Al. A Study Of The Impact Of The 21-Gene Breast Cancer Assay On The Use Of Adjuvant Chemotherapy In Women With Breast Cancer In A Mexican Public Hospital. Abstract 2126. *Esmo* 2012.
22. Tang G, Shak S, Paik S, Anderson SJ, Costantino JP, Geyer CE Jr, Mamounas EP, Wickerham DL, Wolmark N. Comparison of the prognostic and predictive utilities of the 21-gene Recurrence Score assay and Adjuvant! for women with node-negative, ER-positive breast cancer: results from NSABP B-14 and NSABP B-20. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 May;127(1):133-42. doi: 10.1007/s10549-010-1331-z. Epub 2011 Jan 11
23. Mamounas EP, Tang G, Fisher B, Paik S, Shak S, Costantino JP, Watson D, Geyer CE Jr, Wickerham DL, Wolmark N. Association between the 21-gene recurrence score assay and risk of locoregional recurrence in node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer: results from NSABP B-14 and NSABP B- 20. *J Clin Oncol*. 2010 Apr 1;28(10):1677-83. doi: 10.1200/JCO.2009.23.7610. Epub 2010 Jan 11.
24. Dowsett M, Cuzick J, Wale C, Forbes J, Mallon EA, Salter J, Quinn E, Dunbier A, Baum M, Buzdar A, Howell A, Bugarini R, Baehner FL, Shak S. Prediction of risk of distant recurrence using the 21-gene recurrence score in node-negative and node-positive postmenopausal patients with breast cancer treated with anastrozole or tamoxifen: a TransATAC study. *J Clin Oncol*. 2010 Apr 10;28(11):1829-34. doi: 10.1200/JCO.2009.24.4798. Epub 2010 Mar 8.
25. Albain KS, Barlow WE, Shak S, et al.. Prognostic and predictive value of the 21- gene recurrence score assay in postmenopausal women with node-positive, oestrogen-receptor-positive breast cancer on chemotherapy: a retrospective analysis of a randomised trial. *Lancet Oncol*. 2010 Jan;11(1):55-65. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70314-6. Epub 2009 Dec 10.
26. Lo SS, Mumby PB, Norton J, Rychlik K, Smerage J, Kash J, Chew HK, Gaynor ER, Hayes DF, Epstein A, Albain KS. Prospective multicenter study of the impact of the 21-gene recurrence score assay on medical oncologist and patient adjuvant breast cancer treatment selection. *J Clin Oncol*. 2010 Apr 1;28(10):1671-6. doi: 10.1200/JCO.2008.20.2119. Epub 2010 Jan 11.
27. Partin JF, Mamounas EP. Impact of the 21-gene recurrence score assay compared with standard clinicopathologic guidelines in adjuvant therapy selection for node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2011 Nov;18(12):3399-406. doi: 10.1245/s10434-011-1698-z. Epub 2011 May 3.
28. J. H. Todd, C. Dowle, M. R. Williams, C. W. Elston, I. O. Ellis, C. P. Hinton, R. W. Blamey, and J. L. Haybittle. Confirmation of a prognostic index in primary breast cancer. *Br J Cancer*. 1987 October; 56(4): 489–492.
29. Yamamoto-Ibusuki M, Yamamoto Y, Yamamoto S, Fujiwara S, Fu P, Honda Y, Iyama K, Iwase H. Comparison of prognostic values between combined immunohistochemical score of estrogen receptor, progesterone receptor, human epidermal growth factor receptor 2, Ki-67 and the corresponding gene expression score in breast cancer. *Mod Pathol*. 2013 Jan;26(1):79-86.

30. Geffen DB, Abu-Ghanem S, Sion-Vardy N, Braunstein R, Tokar M, Ariad S, Delgado B, Bayme M, Koretz M. The impact of the 21-gene recurrence score assay on decision making about adjuvant chemotherapy in early-stage estrogen-receptorpositive breast cancer in an oncology practice with a unified treatment policy. *Ann Oncol*. 2011 Nov;22(11):2381-6. doi: 10.1093/annonc/mdq769. Epub 2011 Mar 1.
31. Dowsett M, Allred C, Knox J, et al: Relationship between quantitative estrogen and progesterone receptor expression and human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) status with recurrence in the Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination trial. *J Clin Oncol* 26:1059-1065, 2008.
32. Cuzick J, Dowsett M, Pineda S, Wale C, Salter J, Quinn E, Zabaglo L, Mallon E, Green AR, Ellis IO, Howell A, Buzdar AU, Forbes JF. Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67, and human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the Genomic Health recurrence score in early breast cancer. *J Clin Oncol*. 2011 Nov 10;29(32):4273-8.
33. Flanagan MB, Dabbs DJ, Brufsky AM, et al. Histopathologic variables predict Oncotype DX recurrence score. *Mod Pathol* 2008;21:1255–1261.
34. Klein ME, Dabbs DJ, Shuai Y, et al. Prediction of the Oncotype DX recurrence score: use of pathologygenerated equations derived by linear regression analysis. *Mod Pathol* 2013;26:658–664.
35. Harris L, Fritsche H, Mennel R, et al: American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 25:5287-5312, 2007.
36. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, et al: Strategies for subtypes: Dealing with the diversity of breast cancer—Highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol* 22:1736-1747, 2011.
37. Bergers E, Jannink I, van Diest PI, et al. The influence of fixation delay on mitotic activity and flow cytometric cell cycle variables. *Hum Pathol* 1997;28:95–100.
38. De Cecco L, Musella V, Veneroni S, et al. Impact of biospecimens handling on biomarker research in breast cancer. *BMC Cancer* 2009;9:409.
39. Donhuijsen K, Schmidt U, Hirche H, et al. Changes in mitotic rate and cell cycle fractions caused by delayed fixation. *Hum Pathol* 1990;21:709–714.
40. Yildiz-Aktas IZ, Dabbs DJ, Bhargava R. The effect of cold ischemic time on the immunohistochemical evaluation of estrogen receptor, progesterone receptor.
41. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of adjuvant tamoxifen and of cytotoxic therapy on mortality in early breast cancer. An overview of 61 randomized trials among 28,896 women. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *N Engl J Med*. 1988;319:1681–92.
42. Fisher B, Dignam J, Wolmark N, DeCillis A, Emir B, Wickerham DL, et al. Tamoxifen and chemotherapy for lymph node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89:1673–82.
43. Fisher B, Jeong JH, Bryant J, Anderson S, Dignam J, Fisher ER, et al. Treatment of lymph-node-negative, oestrogen-receptorpositive breast cancer: long-term findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project randomised clinical trials. *Lancet*. 2004;364:858–68.
44. Fisher B, Dignam J, Mamounas EP, Costantino JP, Wickerham DL, Redmond C et al. Sequential methotrexate and fluorouracil for the treatment of node-negative breast cancer patients with estrogen receptor-negative tumors: eight-year results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-13 and first report of findings from

- NSABP B-19 comparing methotrexate and fluorouracil with conventional cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil. *J Clin Oncol*. 1996;14: 1982–92.
45. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group: Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet*. 1998;352:930–42.
  46. Berry DA, Cirincione C, Henderson IC, Citron ML, Budman DR, Goldstein LJ, et al. Estrogen-receptor status and outcomes of modern chemotherapy for patients with node-positive breast cancer. *JAMA*. 2006;295:1658–67.
  47. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci*. 2001;98:10869–74.
  48. Van De Vijver M, He YD, Van t Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*. 2002;347:1999–2009.
  49. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002;415:530–6.
  50. Foekens JA, Atkins D, Zhang Y, Sweep FC, Harbeck N, Paradiso A, et al. Multicenter validation of a gene expression-based prognostic signature in lymph node-negative primary breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24:1665–71.
  51. Goetz MP, Suman VJ, Ingle JN, Nibbe AM, Visscher DW, Reynolds CA, et al. A two-gene expression ratio of homeobox 13 and interleukin-17B receptor for prediction of recurrence and survival in women receiving adjuvant tamoxifen. *Clin Cancer Res*. 2006;12:2080–7.
  52. Jansen MP, Sieuwerts AM, Look MP, Ritstier K, Meijer-van Gelder ME, van Staveren IL, et al. HOXB13-to-IL17BR expression ratio is related with tumor aggressiveness and response to tamoxifen of recurrent breast cancer: a retrospective study. *J Clin Oncol*. 2007;25:662–8.