

# Universidad de Huelva

Departamento de Biología Ambiental y Salud Pública



## Estudio de casos y controles de marcadores sanguíneos para el diagnóstico precoz de cáncer de mama

Memoria para optar al grado de doctor  
presentada por:

**Juan Lucas Bayo Calero**

Fecha de lectura: 4 de diciembre de 2015

Bajo la dirección del doctor:

Francisco Navarro Roldán

**Huelva, 2015**





Universidad de Huelva



# Universidad de Huelva

## Programa de Doctorado en “Gestión y Salud Ambiental.

Departamento de Biología Ambiental y Salud  
Pública.

## TESIS DOCTORAL

**"ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES DE  
MARCADORES SANGUÍNEOS PARA EL  
DIAGNÓSTICO PRECOZ DE CÁNCER DE MAMA"**

**Memoria de Tesis Doctoral, para optar al grado de Doctor  
Presentada por:**

***D. Juan Bayo Calero***

**Dirigida por:**

***Dr. Francisco Navarro Roldán***

**Huelva, noviembre 2015**





Universidad de Huelva



## INFORME DE APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TESIS

*Departamento de Biología Ambiental y Salud Pública.  
Facultad de Ciencias Experimentales.*

La Memoria del trabajo de investigación para la obtención del **grado de Doctor** realizada por D. **Juan Bayo Calero** (Jefe Sección Oncología Médica. Miembro de la Unidad de Mama. Hospital Juan Ramón Jiménez. Huelva) titulada: *"Estudio de casos y controles de marcadores sanguíneos para el diagnóstico precoz de cáncer de mama"* ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Francisco Navarro Roldán, Profesor titular de Biología Celular, del Departamento de Biología Ambiental y Salud Pública, de la Facultad de Ciencias Experimentales, de la Universidad de Huelva y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Huelva, a 28 de octubre de 2015

Dr. Francisco Navarro Roldán



***“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad”***

***(Albert Einstein)***

***"No hay nada más poderoso que una idea a la que le ha llegado su tiempo"***

***(Victor Hugo)***

***“Tarde o temprano el esfuerzo siempre obtiene su recompensa; el éxito está al alcance de todos, solo requiere tenacidad y paciencia”***

***(El autor)***



## AGRADECIMIENTOS

---

Como oncólogo médico, dedicado desde hace muchos años a la investigación y al tratamiento del cáncer de mama, este trabajo ha sido sin duda el más importante de mi carrera. Por tanto mi agradecimiento infinito a todas las personas que de alguna u otra forma han facilitado que pudiera realizarse.

En primer lugar quiero agradecer al equipo FABIS su apoyo constante y su necesaria colaboración para que pudiera desempeñar el trabajo. Igualmente a las personas de mi hospital que se han involucrado; a Concha la enfermera de la consulta de mama y al Dr. Diego Ladrero por el reclutamiento activo realizado con sus pacientes. A la gente del laboratorio de Bioquímica muy especialmente a Miguel Ángel, que ha estado siempre pendiente de que todo saliera bien.

En segundo lugar quiero resaltar el papel de Fran. Ayuda imprescindible en las cuestiones metodológicas y revisor de este trabajo dejando su impronta tan valiosa como acertada. Espero que este no solo sea el principio y sirva de acicate para seguir colaborando e investigando juntos en el futuro.

El agradecimiento más especial es para mi director Paco Navarro. Director, científico, investigador, profesor universitario, colega y sin embargo amigo. Gran amigo con el que nuestro intenso trabajo se ha mezclado con asuntos propios de la vida sin solución de continuidad entre lo laboral y lo personal, porque entre buenos amigos y colaboradores no podría ser de otra forma. Gracias Paco por tu ánimo y colaboración, gracias a tus becarias,

Eli, Sandra y Zaida que con sus granitos de arena han hecho posible que esta tesis se culminara.

Para finalizar quiero ocuparme de las personas más importantes en mi vida; mi familia. Mis hijos Juan y María, espectadores de mis veladas informáticas interminables, pacientes y curiosos ante esa “desatención” programada, pero contentos por verme feliz. Pero sin duda, mi mención más especial queda para mi esposa; Loreto. Nunca conocí a una mujer tan completa como ella; capaz de darme cariño y ánimo cuando lo necesitaba, de asesorarme científica o informáticamente, de aceptar mi ausencia sin condiciones y en definitiva de quererme como nunca nadie me ha querido.

*“Seamos agradecidos con las personas que nos hacen felices, ellos son los encantadores jardineros que hacen florecer nuestra alma”.*

*Marcel Proust*

*A mi mujer; Loreto*

*A mis hijos; Juan y María*

## **ACRÓNIMOS -ABREVIATURAS**

---

<b>SIGLAS</b>	<b>DEFINICION</b>
<b>ACO</b>	Anticonceptivos orales
<b>AJCC</b>	American Joint Committee on Cancer
<b>ASCO</b>	American society clinical oncology
<b>BIRADS</b>	Breast Imaging Reporting and Data System
<b>BSGC</b>	Biopsia selectiva de ganglio centinela
<b>CDIS</b>	Carcinoma ductal insitu
<b>CI</b>	Consentimiento informado
<b>CM</b>	Cáncer de mama
<b>CO</b>	Cáncer de ovario
<b>CTC</b>	Células tumorales circulantes
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EGFR</b>	Epidermal growth factor receptor
<b>EGTM</b>	Grupo Europeo de Marcadores Tumorales
<b>ESMO</b>	European society medical oncology
<b>FABIS</b>	Fundación Andaluza Beturia para la Investigación en Salud
<b>GEICAM</b>	Grupo español de investigación en cáncer de mama
<b>GH</b>	Grado histológico
<b>IARC</b>	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>NACB</b>	Academia Nacional de Bioquímica Clínica Americana
<b>NCCN</b>	National Comprehensive Cancer Network
<b>NGAL</b>	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
<b>NSE</b>	Enolasa neuroespecífica
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PAI</b>	Proceso Asistencial Integrado
<b>PDP</b>	Programa de Detección Precoz
<b>PSA</b>	Antígeno prostático específico
<b>SEER</b>	Surveillance, Epidemiology, and End Results Program
<b>SEOM</b>	Sociedad española de oncología médica
<b>SG</b>	Supervivencia global
<b>SLE</b>	Supervivencia libre de enfermedad
<b>TDLU</b>	Unidad Terminal Ductolobular
<b>THS</b>	Terapia hormonal sustitutiva
<b>TNM</b>	primary Tumour , regional lymph Nodes, distant Metastasi
<b>UCG</b>	Unidad de Consejo Genético
<b>UICC</b>	International Union for Cancer Control
<b>UPA</b>	Uroquinasa activadora de plasminógeno
<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor
<b>WHI</b>	Women's Health Initiative

# **GLOSARIO**

---

## **TÉRMINO**

## **DEFINICION**

<b><i>Anabolito</i></b>	Cualquier producto producido en por <i>anabolismo</i> que es el proceso constructivo por el cual las células vivas convierten compuestos complejos en sustancias simples.
<b><i>Biomarcador</i></b>	Sustancia que se mide y se evalúa objetivamente siendo un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos, o respuestas farmacológicas a una intervención
<b><i>Braquiterapia</i></b>	Es una modalidad de tratamiento radioterapéutico donde los isótopos radioactivos se colocan dentro o cerca de la zona que requiere tratamiento (próstata, cérvix, etc).
<b><i>Carcinoma Intraductal</i></b>	También llamado “in situ”. En cáncer de mama se refiere al tipo de cáncer no invasor ya que las células tumorales se sitúan en las paredes de los conductos sin sobrepasar a membrana basal y por tanto sin invadir el estroma ni otras estructuras adyacentes del tejido mamario.
<b><i>Clonalidad</i></b>	La capacidad de formar <i>clones</i> , que son la progenie genéticamente idéntica derivada de la reproducción asexual, natural o artificial de un organismo, célula o gen.
<b><i>Displasia</i></b>	Alteración de la forma, dimensiones y organización de la célula adulta de un determinado tejido.

- Esteriotaxia*** Es la localización tridimensional de una lesión en el espacio, aplicando métodos geométricos o radiológicos, para facilitar el abordaje de ese punto. (En nuestro trabajo se refiere a las técnicas radiológicas utilizadas en la marcación de lesiones mamarias no palpables con arpones metálicos guiadas por ecografía con el fin de facilitar su extirpación quirúrgica posterior.)
- Herceptest*** Test comercial de uso habitual para identificar mediante inmunohistoquímica el grado de positividad de la proteína Her-2 sobre tejido tumoral (se utiliza en cáncer de mama y cáncer gástrico).
- Ligando*** Se trata de un ión o una molécula que reacciona para formar un complejo con otra molécula.
- Luminal*** Es un subtipo genético de cáncer de mama caracterizado por la positividad de alguno o ambos receptores hormonales. A su vez se divide en Luminal A y Luminal B.
- Mastopatía fibroquística*** Es la enfermedad benigna de la mama más frecuente y consiste en un aumento de la densidad del tejido mamario, especialmente en las zonas superiores y externas de las mamas, de causa funcional ya que se produce por desequilibrios de las hormonas sexuales femeninas. Puede condicionar la aparición de quistes mamarios o de nódulos sólidos llamados fibroadenomas.

***Nuliparidad***

Hecho referido a una mujer que nunca ha tenido un parto.

## **RESUMEN**

---

### **"ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES DE MARCADORES SANGUÍNEOS PARA EL DIAGNÓSTICO PRECOZ DE CÁNCER DE MAMA"**

#### **INTRODUCCIÓN:**

*En el mundo desarrollado, el cáncer de mama es la neoplasia femenina más frecuente y que causa más mortalidad. Los programas de detección precoz contribuyen a un diagnóstico temprano de la enfermedad y por tanto a mejorar la supervivencia de la misma. No existen marcadores tumorales específicos para la fase precoz del cáncer de mama; si existiera alguno eficaz, podría servir de apoyo al screening radiológico. Sin embargo, ya en la fase de estudio clínico y diagnóstico final, se solicitan muchos marcadores sin ningún criterio clínico.*

#### **ANTECEDENTES Y OBJETIVOS:**

*Las guías clínicas desaconsejan el uso de marcadores tumorales en el cáncer de mama, a excepción del Ca 15.3 para la monitorización de la eficacia del tratamiento oncológico. Nuestro objetivo es determinar la utilidad real de una serie de marcadores tumorales rutinarios en la fase inicial prequirúrgica del cáncer de mama, además de investigar otros marcadores menos conocidos. Complementariamente realizamos un estudio epidemiológico de las muestras.*

#### **MATERIAL Y METODOS:**

*Efectuamos un estudio casos-contróles con 63 pacientes de cáncer de mama localizado, no recidivas y pendientes de intervención quirúrgica, y otras 63 mujeres sanas. Determinamos la detección de marcadores rutinarios (Ca 15.3, CEA, Ca125, Ca 19.9, NSE, Cyfra 21.1, alfafetoproteína) y experimentales en cáncer de mama (NGAL, EGFR y 8-OH-dG). Analizamos las características*

*epidemiológicas de ambas series y determinamos también los niveles de vitamina D.*

### **RESULTADOS:**

*Existen diferencias significativas con niveles más elevados en las pacientes de Ca.15.3, Cyfra, NSE y CEA; pero asumiendo los valores de corte solo sería significativo el Ca 15.3, aunque con escasa sensibilidad. Respecto a los marcadores experimentales son significativos los niveles más elevados de EGFR en los controles y los más elevados de 8-OH-dG en los casos. En el estudio epidemiológico resultaron variables de riesgo significativas para la enfermedad; la edad, la menopausia, la falta de ocupación laboral, el IMC y los niveles bajos de vitamina D, aunque ésta última se relaciona con el IMC.*

### **CONCLUSIONES:**

*Es injustificado e ineficiente el uso actual de marcadores tumorales en la fase diagnóstica o precoz del cáncer de mama. Identificamos por primera vez la existencia de un probable marcador eficaz para las fases precoces del cáncer de mama que es el 8-OH-dG; sería muy deseable planificar nuevos estudios a nivel mundial en esta línea de investigación que hemos iniciado. La edad, la menopausia, la falta de ocupación laboral, el IMC y los niveles bajos de vitamina D son factores asociados al desarrollo del cáncer de mama. Estos factores deberían incluirse en grandes estudios epidemiológicos para su confirmación como factores de riesgo y para determinar la fracción de riesgo acumulado específica de cada uno.*

## **ABSTRAC**

---

### **“CASE-CONTROL STUDY OF BLOOD MARKERS FOR THE EARLY DIAGNOSIS OF BREAST CANCER”**

#### **INTRODUCTION:**

*Breast cancer is the most common female malignancy and the leading cause of death in the developed world. Screening programmes for the early detection contribute to an early diagnosis of the disease and therefore to improving survival. There are no tumour-specific markers for the early stage of breast cancer. In fact, if there was an effective marker, then it would help build support for the radiological screening. However, many markers are requested in the phase of clinical study and final diagnosis without any clinical criteria.*

#### **ANTECEDENTS AND OBJECTIVES:**

*Clinical guidelines recommend against the use of tumour markers in breast cancer, except for the Ca 15.3 which is used to monitor the effectiveness of the oncological treatment. Our objective was to determine the real usefulness of a series of routine tumour markers in the initial pre-surgical phase of breast cancer, in addition to investigating other less known experimental markers. Furthermore, an epidemiological study of the samples was performed.*

#### **MATERIAL AND METHODS:**

*A case-control study was conducted among 63 patients with local breast cancer, no relapses and pending surgery, and another 63 healthy women. We determined the detection of routine markers (Ca 15.3, CEA, Ca 125, Ca 19.9, NSE, Cyfra 21.1, alpha fetoprotein) and experimental markers (NGAL, EGFR and 8-OH-dG). We analyzed the epidemiological characteristics of both series and we also determined the vitamin D levels*

**RESULTS:**

*Significant differences were found in patients with higher levels of Ca 15.3, Cyfra, NSE and CEA. However, considering cut-off values, the Ca 15.3 marker would be the only significant one, although with low sensitivity. In relation to the experimental markers, we found significant results in the highest levels of EGFR in the controls, and in the highest levels of 8-OH-dG in the cases. In the epidemiological study, the following were significant risk variables: age, menopause, unemployment, BMI and low levels of vitamin D, although the latter is related to the BMI.*

**CONCLUSIONS:**

*The current use of tumour markers is unjustified and inefficient in the breast cancer diagnosis phase or early phase. We identified, for the first time, the existence of a probably effective marker for breast cancer early phases, which is the 8-OH-dG marker. It would be highly desirable to plan new global studies in this line of investigation which we have initiated. Age, menopause, unemployment, BMI and low levels of vitamin D are factors associated with the breast cancer development. These factors should be included in large epidemiological studies in order to confirm them as risk factors and to determine the specific cumulative risk fraction for each one.*



# ÍNDICE

---

<b>Capítulo I: Introducción .....</b>	<b>17</b>
1.1 El cáncer de mama; epidemiología, diagnóstico, pronóstico y tratamiento.....	18
1.2 Historia natural del desarrollo del cáncer de mama.....	52
1.3 Factores de Riesgo para cáncer de mama.....	65
1.4 Prevención y Diagnóstico Precoz del cáncer de mama.....	73
1.5 Marcadores Tumorales para el cáncer de mama....	75
 <b>Capítulo II:</b>	
<b>Antecedentes.....</b>	<b>92</b>
2.1 Revisión actualizada sobre el uso de Biomarcadores en el diagnóstico precoz del Cáncer de Mama.....	93
2.2 Estudio de los Marcadores tumorales de mama; contexto actual en la práctica clínica oncológica diaria..	100
2.3 Análisis de los Marcadores propuestos en nuestro trabajo.....	102
2.4 Justificación del trabajo.....	107
 <b>Capítulo III: Objetivos.....</b>	<b>111</b>
3.1 Objetivo principal.....	112
3.2 Objetivos secundarios.....	112
 <b>Capítulo IV: Materiales y Métodos .....</b>	<b>114</b>
4.1 Diseño del estudio .....	115

4.2	Población de referencia y muestra del estudio.....	115
4.3	Variables analizadas.....	119
4.4	Procedimiento.....	120
4.5	Análisis de datos.....	123
4.6	Aspectos éticos.....	126
 <b>Capítulo V: Resultados.....</b>		<b>128</b>
5.1	Análisis descriptivo sobre las características de las muestras.....	129
5.2	Estudio sobre la capacidad predictiva de los biomarcadores analizados sobre el diagnóstico de cáncer de mama.....	132
5.3	Estudio sobre la relación de variables epidemiológicas sobre el diagnóstico de cáncer de mama.....	156
5.4	Resumen final de los resultados del estudio.....	171
 <b>Capítulo VI:</b>		
<b>Discusión.....</b>		<b>173</b>
6.1	Análisis General.....	174
6.2	Discusión sobre el estudio de marcadores.....	175
6.3	Discusión sobre el estudio epidemiológico.....	183
6.4	Limitaciones y fortalezas del estudio.....	192
6.5	Aplicación clínica de la investigación.....	195
 <b>Capítulo VII: Conclusiones.....</b>		<b>197</b>

<b>Capítulo VIII: Bibliografía .....</b>	<b>202</b>
<b>8.1 Citas bibliográficas.....</b>	<b>203</b>
<b>8.2 Otras fuentes bibliográficas .....</b>	<b>219</b>
<b>Capítulo IX: Anexos.....</b>	<b>220</b>
<b>Anexo I. Encuestas epidemiológicas realizadas a los casos y a los controles .....</b>	<b>221</b>
<b>Anexo II. Resolución del Comité Provincial de Ética e Investigación sanitaria.....</b>	<b>223</b>
<b>Anexo III. Hoja de Información y Consentimiento Informado.....</b>	<b>224</b>



# CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

---

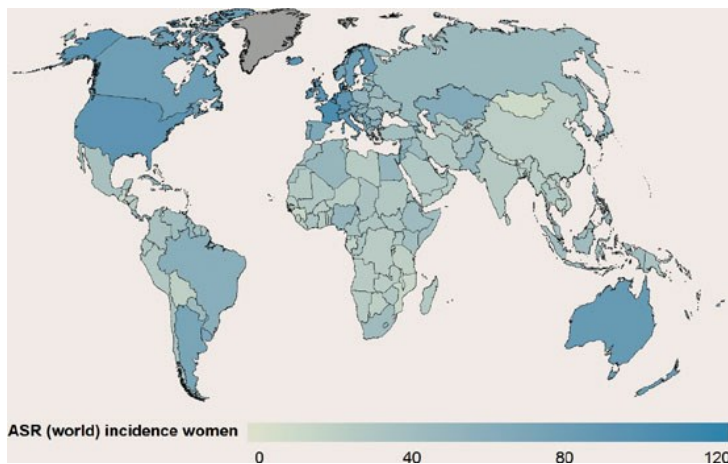
## 1 Introducción

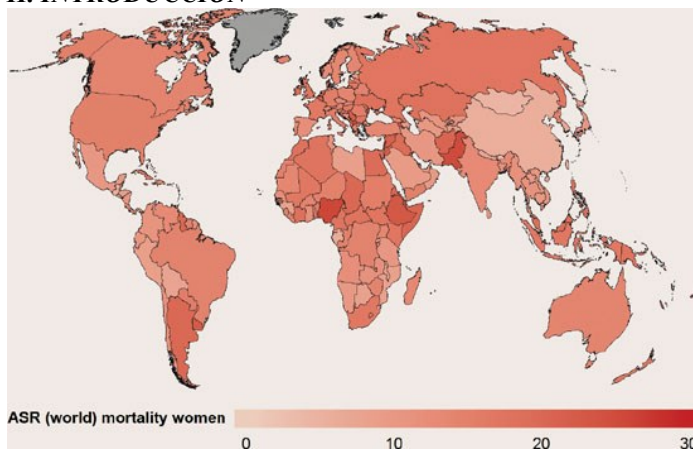
Se define el cáncer de mama como el tumor maligno que se produce a partir de las células epiteliales existentes en la glándula mamaria. En función de la célula donde se origine, el cáncer de mama pertenecerá a un subtipo histológico (ductal, lobulillar, medular, papilar, etc).

### 1.1 El cáncer de mama; epidemiología, diagnóstico, pronóstico y tratamiento

#### 1.1.1 Epidemiología del cáncer de mama.

El cáncer de mama es la neoplasia femenina más frecuente en el mundo, y la primera causa de mortalidad por cáncer en la mujer. Su incidencia está concentrada principalmente en el mundo desarrollado; América del norte y Europa occidental (figura I.1).





**Figuras I.1; Distribución mundial de las tasas de incidencia (azul) y de mortalidad (rosa).** Fuente; Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC

También es la neoplasia femenina más frecuente en España (Tabla 1-1) y por tanto supone el hecho de ser la neoplasia más frecuente en los servicios de oncología de nuestros hospitales, tanto en la fase de tratamiento como en la fase de revisiones, suponiendo así un gasto económico y de medios, mayor que ninguna otra enfermedad oncológica. Por otra parte, el impacto socio-familiar, psicológico, físico y laboral que provoca esta enfermedad y sus tratamientos en la mujer, es incalculable.

Los datos más actualizados a nivel mundial sobre incidencia, prevalencia y mortalidad por cáncer de los 28 tipos más frecuentes de 184 países. Estos datos nos permiten también establecer predicciones a corto y largo plazo. Se recogen en el informe “GLOBOCAN 2012”. GLOBOCAN (<http://globocan.iarc.fr>) es un organismo dependiente de la IARC (Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer) perteneciente a la Organización Mundial de la Salud (OMS).

La Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) emite un completo informe anual con los datos nacionales más actualizados y las previsiones para nuestro país en el contexto mundial. El último informe emitido fue “El cáncer en cifras 2014” ([http:// seom.org](http://seom.org)). Del mismo extraemos los datos sobre cáncer de mama ya que son los más actualizados para los casos españoles.

**Tabla I.1. Localización de los tumores más frecuentes en España (2012)**

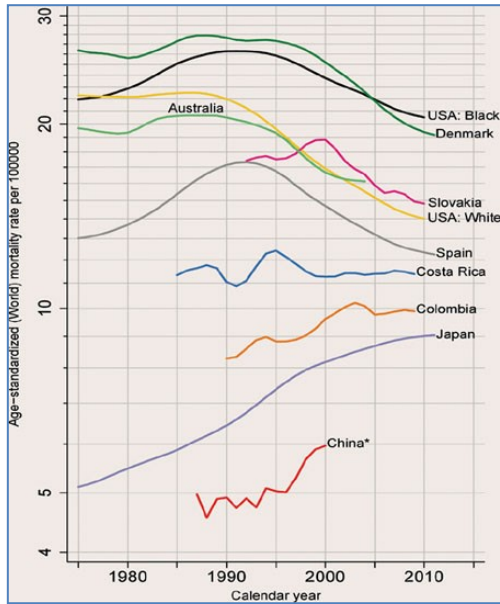
	Hombre	Mujer	Ambos sexos
1º	Próstata	Mama	Colorectal
2º	Pulmón	Colorectal	Próstata
3º	Colorectal	Cuerpo de Útero	Pulmón
4º	Vejiga	Pulmón	Mama
5º	Estómago	Ovario	Vejiga

*Fuente: Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC.)*

**Incidencia;** En nuestro país existen casi 26.000 casos nuevos anuales, lo que supone un 29% de todos los tumores femeninos. La actual tendencia alcista, manteniéndose un incremento anual constante del 1-2%. Afecta a mujeres de edad media, en torno a 55 años, sin embargo últimamente se está describiendo un gran porcentaje de mujeres jóvenes (menores de 40 años). (SEER, 2008; GEICAM, 2014). Respecto al sexo se trata de un tumor femenino existiendo solo el 1% de los casos en el sexo masculino.

**Mortalidad;** En nuestro país se registran más de 6.000 muertes anuales por cáncer de mama. La tendencia es favorable ya

que la mortalidad está descendiendo progresivamente a pesar del aumento de la incidencia, lo cual se traduce en un claro y neto aumento en la supervivencia. Este descenso es compartido con países occidentales pero no con otras áreas del mundo (figura I.2).



**Figura I.2. Índices mundiales ajustados por edad de mortalidad por 100.000 por año para cáncer de mama.** Fuente IARC;circa 1975–2012.

**Prevalencia;** Si al tumor más frecuente se le asocia altos índices de supervivencia es lógico comprender que la prevalencia sea la mayor con gran diferencia sobre los demás. En concreto la prevalencia en España a los 5 años supera los 100.000 con cáncer de mama. Este dato nos ilustra sobre el grado de repercusión sanitaria y social que implica esta enfermedad (tabla I.2). De forma gráfica, el “peso” de esta neoplasia se representa frecuentemente en muchos informes epidemiológicos, tal como podemos ver en la figura I.3.

**Supervivencia;** Actualmente la supervivencia global de la enfermedad se considera de las más altas en oncología situándose entre el 75-80%, debido principalmente al diagnóstico precoz

(Humphrey et al., 2002) y a la mejora en los tratamientos, como se ha demostrado en numerosos estudios (De Angelis et al., 2014; Peto et al., 2000).

Como ya dijimos anteriormente La incidencia de cáncer de mama ha aumentado en las últimas décadas como resultado de múltiples factores, incluyendo cambios en los factores de riesgo, envejecimiento de la población y la introducción de programas de cribado. Por el contrario, la mortalidad ha demostrado una tendencia a la baja atribuible a una combinación de programas de cribado y mejores servicios de salud y tratamientos. Esa diferencia entre la incidencia y la mortalidad ha resultado en un aumento de la supervivencia del cáncer de mama (Pollán, 2007; Puig-Vives, 2013).

La tercera publicación del estudio ALAMO a cargo del Grupo Español de Investigación en Cáncer de Mama (GEICAM) realizada en muchos hospitales españoles, refleja que la Supervivencia Global (SG) a los 5 años se ha incrementado en España de 82.8% a 87% durante los últimos años, la cual está por encima de la media europea. Las supervivencias al primer años son muy altas y lógicamente dependen del estadio de la enfermedad; 99.7%, 99.1%, 96.1% y 74.9% en pacientes diagnosticados con estadios I, II, III y IV, respectivamente. Esas proporciones bajan a 98.6%, 93.7%, 85.5% y 46.9% a los tres años y a 96.5%, 88.9%, 74.8% y 29.2% a los cinco años (GEICAM, 2014).

**Tabla I.2. Incidencia y mortalidad para todas las edades. Prevalencia a 5 años sólo en población adulta. Proporciones por 100.000.**

Cáncer	Incidencia <sup>1</sup>			Mortalidad <sup>1</sup>			Prevalencia a 5 años <sup>2</sup>		
	Número	(%)	ASR (W)	Número	(%)	ASR (W)	Número	(%)	ASR (W)
Labio y cavidad oral	1219	1.4	2.3	351	0.9	0.6	3361	1.3	16.6
Nasofaringe	97	0.1	0.2	50	0.1	0.1	229	0.1	1.1
Otros faringeos	157	0.2	0.4	93	0.2	0.2	384	0.2	1.9
Esófago	334	0.4	0.7	271	0.7	0.5	339	0.1	1.7
Estómago	2944	3.4	5.1	2054	5.2	3.2	4698	1.8	23.3
Colorrectal	12979	14.9	24.2	5958	15.2	8.4	36014	14.1	178.4
Hígado	1516	1.7	2.4	1487	3.8	2.0	1441	0.6	7.1
Vesícula biliar	1055	1.2	1.6	691	1.8	0.9	993	0.4	4.9
Páncreas	3032	3.5	5.0	2717	6.9	4.3	1588	0.6	7.9
Laringe	268	0.3	0.7	86	0.2	0.2	954	0.4	4.7
Pulmón	4935	5.7	11.3	3688	9.4	8.0	5380	2.1	26.6
Melanoma	2718	3.1	7.2	440	1.1	0.9	10584	4.1	52.4
Sarcoma de Kaposi	73	0.1	0.2	8	0.0	0.0	203	0.1	1.0
<b>Mama</b>	<b>25215</b>	<b>29.0</b>	<b>67.3</b>	<b>6075</b>	<b>15.5</b>	<b>11.9</b>	<b>104210</b>	<b>40.8</b>	<b>516.2</b>
Cuello de útero (cervix)	2511	2.9	7.8	848	2.2	2.1	8867	3.5	43.9
Cuerpo del útero	5121	5.9	11.6	1211	3.1	1.9	19272	7.6	95.5
Ovario	3236	3.7	7.7	1878	4.8	3.7	7925	3.1	39.3
Riñón	2128	2.4	4.8	764	1.9	1.2	6023	2.4	29.8
Vejiga	2205	2.5	3.7	905	2.3	1.1	7401	2.9	36.7
Cerebro, sistema nervioso	1661	1.9	4.2	1199	3.1	2.6	1289	0.5	6.4
Tiroides	1361	1.6	4.1	186	0.5	0.3	5306	2.1	26.3
Linfoma Hodgkin	534	0.6	2.2	95	0.2	0.2	1525	0.6	7.6
Linfoma no Hodgkin	2751	3.2	5.9	1071	2.7	1.6	7136	2.8	35.3
Mieloma múltiple	1109	1.3	1.8	826	2.1	1.1	2599	1.0	12.9
Leucemia	2162	2.5	5.0	1378	3.5	2.3	4503	1.8	22.3
Todos los cánceres excl. cáncer de piel no melanoma	86984	100.0	198.2	39183	100.0	67.0	255195	100.0	1264.2

Fuente: *El cáncer en España 2014 (Informe SEOM).*

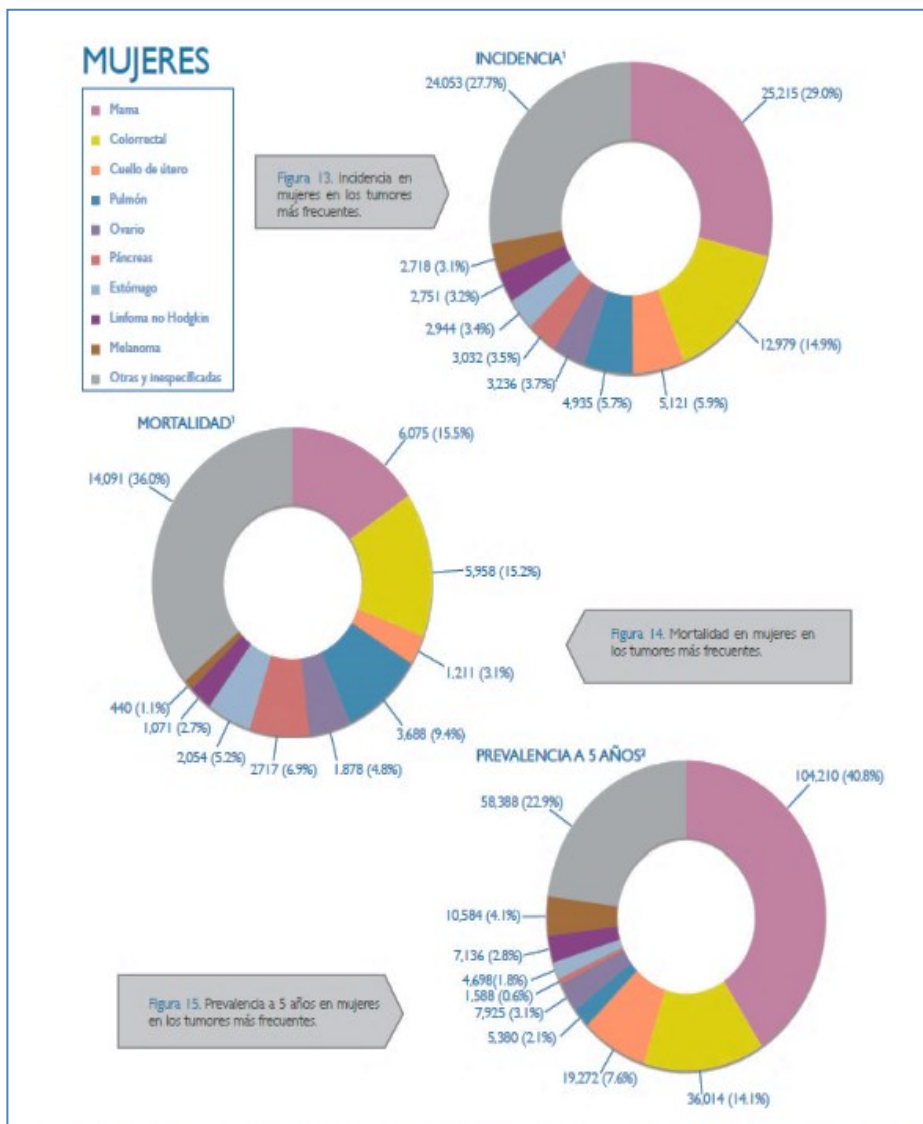


Figura I.3. En estas 3 figuras adaptadas del informe SEOM se puede ver gráficamente el impacto del cáncer de mama (color rosa) en incidencia, mortalidad y prevalencia. Fuente: El cáncer en España 2014 (Informe SEOM).

### 1.1.2 Diagnóstico del cáncer de mama

Este apartado es clave para el presente estudio por lo que es preciso primero entender cómo se realiza este diagnóstico en nuestro medio y qué limitaciones tiene. La forma mejor de entenderlo es exponiendo las situaciones reales de presentación clínica basadas en nuestra experiencia diaria, más allá de un planteamiento meramente teórico.

#### **Manifestación clínica del cáncer de mama y clave diagnóstica.**

Clínicamente la presentación de la enfermedad puede manifestarse de 4 maneras distintas;

1. Asintomática con radiología sospechosa o patológica; Una mamografía con diagnóstico probablemente maligno (especificado en la clasificación radiológica como BIRADS IV) o claramente patológica (BIRADS V) que se haya realizado de forma rutinaria o en el contexto del Programa de Detección Precoz (PDP). Son subsidiarias de biopsia guiada por ecografía o radiodirigida (esterotáxica). En el caso de las lesiones BIRADS III (clasificación radiológica que significa “probablemente benignas, posibilidad de cáncer estimada menor de un 2%”) en la mayoría corresponde solo realizar seguimiento y en algunos casos seleccionados biopsia por ecografía.

Afortunadamente estas situaciones asintomáticas son cada vez más frecuentes. El PAI (Proceso Atención Integrada) de Cáncer de Mama (Acebal et al., 2011) recoge las directrices del PDP del cáncer

de mama como veremos con mayor profundidad en el apartado 2.5. Siguiendo estas indicaciones, el médico que prescribió la mamografía sospechosa deriva el caso al servicio de radiología de referencia. Se realiza un nuevo estudio (repetir la mamografía si procede, realizar ecografía o solicitar Resonancia, etc). Posteriormente si hay una lesión sospechosa, el radiólogo practica en acto único una punción-biopsia de la lesión con aguja fina, gruesa o de vacío (PAFF, BAG, BAV) guiándose por palpación o por ecografía. En caso de que la lesión no fuera palpable, es frecuente que se coloque un marcador o un arpón para facilitar la posterior resección quirúrgica. Cuando no se puede obtener un diagnóstico por parte del radiólogo, se procederá a realizar una biopsia quirúrgica. La coordinación pues entre el equipo de radiología mamaria, los cirujanos de mama y en definitiva de toda la Unidad de mama del hospital, es fundamental para resolver este tipo de casos.

2. Asintomática que consulta por otro motivo y en la valoración se detecta un riesgo aumentado por CM. Se trataría de un diagnóstico precoz selectivo oportunista. Este colectivo supone un grupo de entrada al proceso en el mismo punto que las pacientes con radiología sugestiva o con signos de alarma. Los **grupos de riesgo familiar** se dividen en Alto Riesgo, Riesgo Moderado y Riesgo Habitual, precisando los dos primeros grupos un seguimiento periódico específico por Atención Primaria. Este seguimiento depende del riesgo; así en el grupo de Alto Riesgo es preciso además la derivación a una Unidad de Consejo Genético (UCG) y el estudio abarca la exploración semestral o anual con mamografía y ecografía o resonancia a partir de los 30 años. En el grupo de Riesgo Moderado se recomienda realizar exploraciones anuales con

mamografía a partir de 40 años, y para el grupo de Riesgo Habitual las recomendaciones son las mismas que para la población normal; o sea, la introducción al PDP cuando proceda. Por otro lado, conviene instruir a estas mujeres en la autoexploración mamaria mensual. En este sentido el PAI contiene el Anexo 7 donde se especifican los grupos de riesgo y la actuación clínica recomendable. En él podemos encontrar los criterios de inclusión en los grupos de riesgo hereditarios que se detallan a continuación.

**Tabla I.3. Criterios de inclusión en el Grupo de Alto riesgo.**

4 o más familiares con cáncer de mama (CM) /ovario (CO)
3 familiares de 1º/2º con CM ó CO.
2 casos entre familiares de 1º/2º con: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dos casos de cáncer sean de mama y/o de ovarios.</li> <li>• Un CM en varón y un CM ó CO.</li> <li>• Dos casos de CM &lt; 50 años.</li> <li>• Dos casos de CM de 1º (uno &lt; 50 años.)</li> <li>• Un caso de CM bilateral y otro CM (uno &lt;50 años)</li> </ul>
Mujeres con Familias con 1CM ≤ 35 años.
Mujeres con Familias con 1CM y CO en una misma paciente.
Mujeres con Familias con 1CM bilateral < 50 años.
Mujeres con Familiares de 1º/2º grado de pacientes BRCA1 ó 2 positivos
Factores Personales No hereditarios: neoplasia in situ, la hiperplasia atípica o la radioterapia en la infancia.

*Fuente; PAI cáncer de mama. Consejería de Salud, 2011.*

**Tabla I.4. Criterios de inclusión en el Grupo de Riesgo Moderado.**

1CM en familiar de 1° entre 36 y 50 años
2 familiares con CM de 1°/2° $\geq$ 50 años.
1 CM bilateral > 50 años.

Fuente; PAI cáncer de mama. Consejería de Salud, 2011.

**Tabla I.5. Criterios de inclusión en el Grupo de Riesgo Habitual.**

Personas que no cumplan los criterios anteriores o que teniendo un familiar de 1° o de 2° grado con cáncer de mama, éste sea > 50 años.
---

Fuente; PAI cáncer de mama. Consejería de Salud, 2011.

El manejo adecuado y seguimiento clínico de estas mujeres de riesgo también viene definido en el propio proceso;

**Tabla I.6. Esquema de seguimiento clínico en función de los grupos de riesgo.**

GRUPO DE RIESGO	CENTRO	EDAD DE INICIO	ESTUDIOS	PERIOD
ALTO	MAP (Derivar UCG)	30	Exploración Física Mamografía Anual +/- Eco (RM si precisa)	Anual
MODERADO	MAP	40*	Exploración Física Mamografía Anual +/- Eco	Anual
BAJO	PDP	50	Mamografía Bianual (PDP)	Bianual

Fuente; PAI cáncer de mama. Consejería de Salud, 2011

\*A los 50 años si no ha habido incidencias podría valorarse la inclusión en el PDP

3. Clínica con aparición de un Síntoma de Alarma; el más frecuente es la aparición de un nódulo en la mama; se trata de un nódulo nuevo, generalmente móvil, de consistencia dura y no doloroso, diferente a los fibroadenomas y quistes habituales de la paciente en caso de que los tuviera, suelen aparecer en el cuadrante supero externo. Otros síntomas de alarma son la secreción unilateral por el pezón, la alteración del pezón o de la piel (retracción, ulceraciones, enrojecimiento), los cambios en morfología o tamaño de la mama y la aparición de una adenopatía axilar (tabla I.7). La ruta diagnóstica comienza con la realización de una historia clínica completa, que además debe incluir los antecedentes familiares, la historia reproductiva, antecedentes mamológicos, mamografías previas, hábitos y, en general, otros factores de riesgo posibles para cáncer de mama. A continuación procede la realización de la exploración mamaria con atención a la morfología, aspecto de la piel y del complejo areolar, palpación mamaria y de áreas ganglionares locales. Posteriormente si estuviera indicado se solicitará la prueba de imagen correspondiente que, aunque habitualmente es la mamografía, en mujeres jóvenes es de elección la ecografía. En cualquier caso y siguiendo las directrices del PAI, la petición genérica es de estudio radiológico mamario sin especificación del tipo de estudio, solicitándola en el llamado “Formato normalizado para las solicitudes de pruebas de imagen”.

Una vez el estudio se realice, si es negativo se envía un informe con el resultado al médico solicitante, pero si fuera

patológico, se inicia el proceso diagnóstico y terapéutico en la “Unidad de Mama” del hospital de referencia, tal como se describió en el punto anterior.

**Tabla I.7. Signos de alarma del cáncer de mama**

La aparición de un nódulo en la mama
La secreción anormal por el pezón
La retracción del complejo areola-pezón
Las alteraciones de la piel o cambios en morfología o tamaño de la mama (enrojecimiento, retracciones, ulceraciones, engrosamiento)
La aparición de una adenopatía axilar

Fuente; PAI cáncer de mama. Consejería de Salud, 2011

4. Clínica con síntomas de enfermedad avanzada; por desgracia aún se siguen realizando diagnósticos en fases avanzadas; carcinomas inflamatorios que engloban toda la mama y axila, metástasis óseas o viscerales, etc. Si la enfermedad mamaria es evidente se debe derivar a la unidad de mama para un diagnóstico histológico inicial, y si aparecen lesiones metastásicas de inicio sin un diagnóstico previo de cáncer se derivaría a medicina interna para estudio. Es la única situación diagnóstica donde se practican pruebas generales para enfermedad sistémica como TAC, gammagrafía, analíticas con marcadores tumorales, etc. ya que en todos los apartados anteriores no tienen ninguna utilidad.

### **Diagnóstico en cáncer de mama; mensajes clave**

- El CM es uno en los que más ha avanzado en cuanto a la prevención y donde se han conseguido mejores índices de supervivencia.

- La sociabilización de la enfermedad, la difusión pública y promoción de su prevención, hacen que exista una aceptable cultura sanitaria al respecto. No obstante, el personal sanitario debe fomentar esta educación en su entorno laboral.
- La paciente puede ser diagnosticada de varias formas; ya sea en fase asintomática por un estudio radiológico rutinario sugestivo de neoplasia, por la aparición de signos de alarma ya en fase sintomática o por manifestaciones de la enfermedad avanzada
- Hay que aplicar los protocolos de seguimiento para las pacientes pertenecientes a los Grupos de Riesgo Alto y Moderado.
- Los Signos de Alarma hay que conocerlos y difundirlos para que la población los valore y pueda acudir a su médico de forma temprana
- La Clave Diagnóstica básica es la realización de una detallada historia clínica y una exploración mamaria completa, y cuando proceda la petición del estudio radiológico mamario, siguiendo las directrices del PAI donde está claramente establecido.

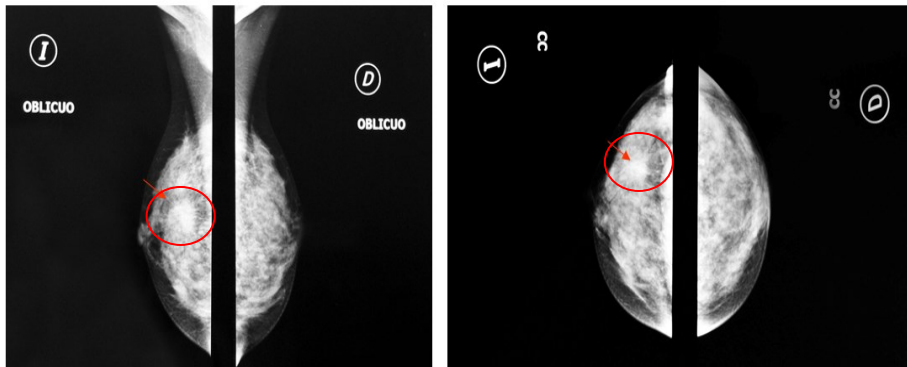
### **Diagnóstico Radiológico**

Hasta aquí hemos referido las distintas pruebas radiológicas de uso frecuente en cáncer de mama y la importancia de que el radiólogo detecte una lesión mamaria incipiente y que consiga el diagnóstico histológico definitivo de forma rápida para que la paciente pueda ser intervenida en fase temprana.

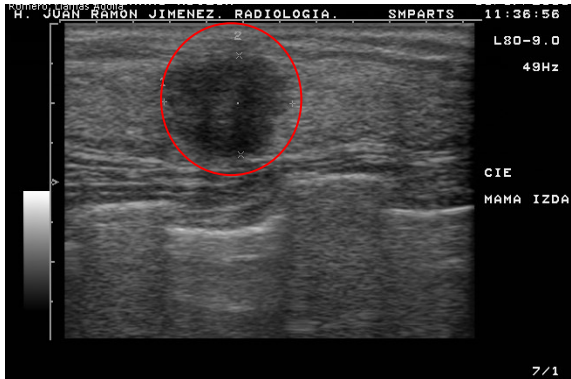
La prueba principal es la mamografía en doble proyección; su uso es válido tanto como prueba diagnóstica inicial como para

screening o para el seguimiento periódico de las pacientes. Sin embargo tiene varias limitaciones ya que por ejemplo, es poco útil en mujeres jóvenes con alta densidad mamaria. Por otro lado, La ecografía es una técnica complementaria a la mamografía para el diagnóstico de tumores y lesiones fibroquísticas benignas. También es útil para el seguimiento de mujeres jóvenes ya que es más segura que la mamografía al no acumular radiaciones iatrogénicas. Ambas técnicas son útiles para establecer un diagnóstico mediante radiología invasiva. El empleo de la resonancia magnética (RM) de mama es fundamental para el diagnóstico de lesiones dudosas, como en el caso de mamas densas, para el seguimiento en mujeres de riesgo o para valorar la situación de una prótesis.

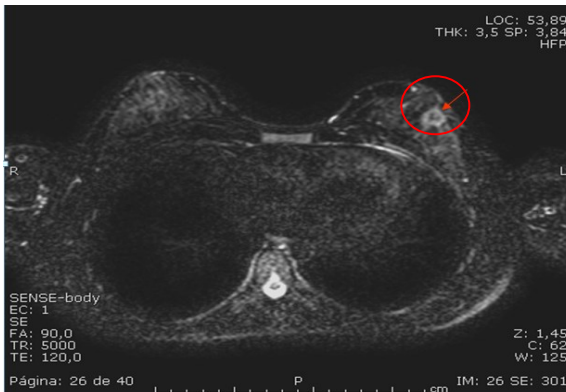
A continuación podemos observar el proceso diagnóstico de una misma paciente siendo coincidentes en el diagnóstico definitivo de cáncer de mama izquierda.



**Figura 1.4. Mamografía Bilateral; Mamas densas bilaterales con existencia de nódulo espiculado de 15 mm en CSE mama Izquierda, rodeado por el círculo rojo. Diagnóstico BIRAD IV. Fuente propia.**



**Figura I.5. Ecografía mamaria bilateral; Categoría BIRAD-IV para la mama izquierda debido a la existencia de un nódulo de características radiológicas y ecográficas sugestivas de malignidad de 2 cm de diámetro máximo que se localiza en el cuadrante ínferoexterno, rodeado por círculo rojo. Fuente propia.**



**Figura I.6. RM mamaria: hallazgos descritos en relación con lesión categoría BIRAD V en CIE de mama izquierda con una extensión a cola axilar, rodeada por círculo rojo. Fuente propia.**

### Diagnóstico Histológico

Una vez finalizado el diagnóstico inicial, se procederá a realizar la técnica quirúrgica adecuada. Posteriormente el patólogo emitirá el diagnóstico definitivo donde constarán todos los datos relativos a las características biológicas del tumor. Los datos histopatológicos más relevantes de este diagnóstico son;

- Según tipo celular: ductal (75%), lobulillar (20%), medular y otros (5%)
- Si el tumor es infiltrante o in situ (no infiltrante).

- El tamaño medido en centímetros. La existencia o no de multifocalidad.
- El estado de los márgenes quirúrgicos.
- El grado histológico de agresividad GH (I, II, III) equivalente a Bajo, Moderado o Poco diferenciado.
- Existencia o no de infiltración vascular, linfática o neural.
- Porcentaje de componente intraductal asociado.
- La cantidad de ganglios extirpados y los que estaban afectados por la enfermedad.
- El porcentaje de positividad de los receptores hormonales (estrógeno y de progesterona).
- La cuantificación de la proteína HER-2 (herceptest). Su función es activar el crecimiento tumoral. Se detecta en el 20-25% de los casos.
- Determinación de Ki 67.
- Subtipo Genético
- Otros factores; p53, ciclina E, catepsina D.

### 1.1.3 Pronóstico del cáncer de mama

Superada la fase quirúrgica, la paciente es normalmente remitida a las consultas de oncología, donde entre otras actuaciones se solicita el **estudio de extensión**; que consiste en la realización de unas determinadas pruebas (analítica básica con marcadores tumorales estándar como son el CEA y el Ca 15.3, acompañado de RX tórax, y en caso de ganglios positivos se añaden TAC o Eco hepática y Gammagrafía ósea) para poder detectar el alcance de la enfermedad y la estadificación que es la fase definitiva de la enfermedad. Con ello

podrá hacerse también una primera aproximación pronóstica y terapéutica.

El oncólogo recoge todos estos datos en una historia clínica y tras valorar el estudio de la extensión, establece la fase o estadio de la enfermedad (según el sistema TNM).

### **Clasificación TNM**

El AJCC (American Joint Committee on Cancer) en colaboración con la UICC (International Union for Cancer Control) publicaron en 1977 la primera edición de la clasificación TNM, consiguiendo de esta forma la unificación mundial en la estadificación de los tumores. Mediante éste sistema TNM se pueden clasificar los carcinomas mamarios por distintos estadios: Según el tamaño tumoral (T), afectación ganglionar (N) y metástasis a distancia (M), para ello se utiliza la exploración física, las técnicas de imagen, los datos histopatológicos y la existencia o no de metástasis. La clasificación TNM es la más utilizada en la práctica clínica por su capacidad pronóstica y porque permite aplicar un plan terapéutico adecuado a cada estadio. Se actualiza periódicamente, siendo la versión 7<sup>a</sup> publicada en 2010 la vigente en la actualidad (Edge, 2010). En lo que respecta al cáncer de mama podemos observar cómo la combinación de los factores TNM condicionan un determinado Estadio que va desde el I de mejor pronóstico al IV que es el de peor pronóstico. Desde el punto de vista clínico los casos podrían separarse en 3 grandes grupos;

- Cáncer de mama precoz; enfermedad operable (Estadios I y II)

- Cáncer de mama localmente avanzado; no operable de entrada, necesidad de tratamiento neoadyuvante previo a la cirugía (Estadios III)
- Cáncer de mama avanzado o metastásico (Estadio IV)

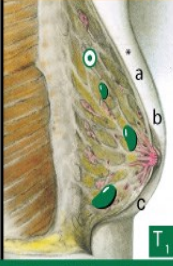





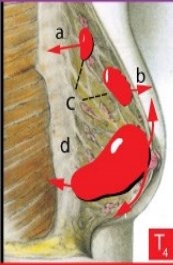
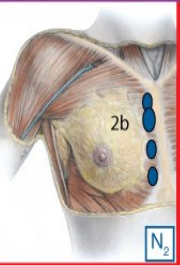
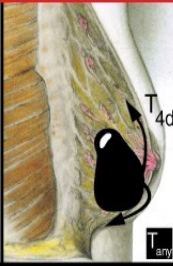
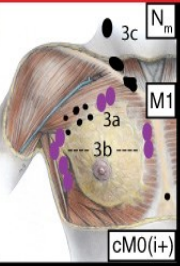
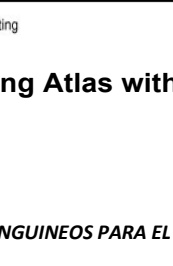
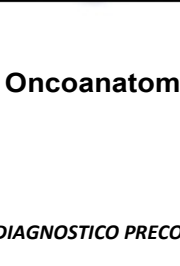
Los detalles de dicha clasificación podemos verlos en el póster facilitado por la propia Asociación y disponible en su página web;

<https://cancerstaging.org/references-tools/quickreferences/Pages/default.aspx>.

**(AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010, pp 347-76)**

Seguidamente se muestra la clasificación TNM en las dos figuras siguientes extraídas del texto TNM Staging Atlas with Oncoanatomy (Second Edition).

	N0	N1	N2	N3	M1
T1	I	IIA	IIIA	IIIC	IV
T2	IIA	IIB	IIIA	IIIC	IV
T3	IIB	IIIA	IIIA	IIIC	IV
T4	IIIB	IIIB	IIIB	IIIC	IV

DEFINITION OF TNM		T <sub>is</sub>	N <sub>0</sub>	STAGE GROUPINGS
0	<b>T1</b> Tumor ≤2 cm			<b>Stage IA</b> *T1 N0 M0
	<b>T1mic</b> Microinvasion ≤0.1 cm			<b>Stage IB</b> T0 N1 <sub>M</sub> T1*N1 <sub>M</sub>
I	<b>T2</b> Tumor >2 cm but ≤5 cm			<b>Stage IIA</b> T0 N1 M0* T1 N1 M0* T2 N0 M0*
	<b>N1</b> Metastasis to movable ipsilateral axillary lymph node(s)			<b>Stage IIB</b> T2 N1 M0 T3 N0 M0*
IIA/IB	<b>pN1</b> Metastasis in 1–3 axillary lymph nodes >0.2 mm foci			<b>Stage IIIA</b> T0 N2 M0* T1 N2 M0* T2 N2 M0* T3 N1 M0* T3 N2 M0*
	<b>T3</b> Tumor >5 cm			<b>N2a</b> Metastasis in ipsilateral axillary lymph node(s) fixed to one another (matted), or to other structures
IIIA	<b>pN2</b> Metastasis in 4–9 axillary lymph nodes, or in clinically apparent internal mammary lymph nodes in the absence of axillary lymph node metastasis >0.2 mm foci			<b>Stage IIIB</b> T4 N0 M0* T4 N1 M0* T4 N2 M0
	<b>T4</b> Tumor of any size with direct extension to (a) chest wall or (b) skin, (c) both a and b, (d) inflammatory			<b>N2b</b> Metastasis in clinically apparent internal mammary lymph nodes in the absence of axillary lymph node metastasis
IIIB	<b>pN2b</b> Metastasis in clinically apparent internal mammary lymph nodes in the absence of axillary lymph node metastasis			<b>Stage IIIC</b> Any T N3 M0
	<b>N3</b> Metastasis in ipsilateral infraclavicular lymph node(s) with or without axillary lymph node involvement, or in clinically apparent ipsilateral internal mammary lymph node(s) and in the presence of clinically evident axillary lymph node metastasis; or metastasis in ipsilateral supraclavicular lymph node(s) with or without axillary or internal mammary lymph node involvement			<b>N3a</b> infraclavicular
IIIC/IV	<b>N3b</b> Axillary and internal mammary			
	<b>N3c</b> Supraclavicular			
<b>pN3</b> Metastasis in ≥10 axillary nodes		<b>T<sub>any</sub></b>	<b>N<sub>m</sub></b> <b>M1</b> 3c 3a 3b cM0(i+)	

\*Disseminated tumor cells in bone marrow or circulating cells in blood or excised tissue as ovary <0.2mm.

Figuras I.7 y I.8. TNM Staging Atlas with Oncoanatomy (Second edition)

**Factores Pronósticos del CM:**

Se diferencian dos grandes grupos según se atiende a las características biológicas del tumor o a las características clínicas de la paciente.

Dependientes del Tumor

- Estadío o Fase de la enfermedad.
- Edad; peor pronóstico < 35 años.
- Tipo de tumor; Medular y lobulillar mejor pronóstico.
- Grado Histológico; Grado III peor pronóstico.
- Tamaño tumoral.
- Afectación Ganglionar; Si existe o no y en qué cuantía.
- Estado de Receptores Hormonales; Si son positivos mejor pronóstico.
- Estado HER-2; Si es positivo es un factor de riesgo.
- Subtipo Genético; triple negativo tiene peor pronóstico.
- Otros factores pronósticos; invasión vascular, etc.

Dependientes de la paciente

- Edad
- Estado general
- Enfermedades asociadas
- Estado nutricional
- Hábitos de vida (sedentarismo, obesidad, dieta, etc)
- Condiciones socioeconómicas

### 1.1.4 Tratamiento actual del cáncer de mama

#### **Perspectiva histórica del cáncer de mama y de su tratamiento.**

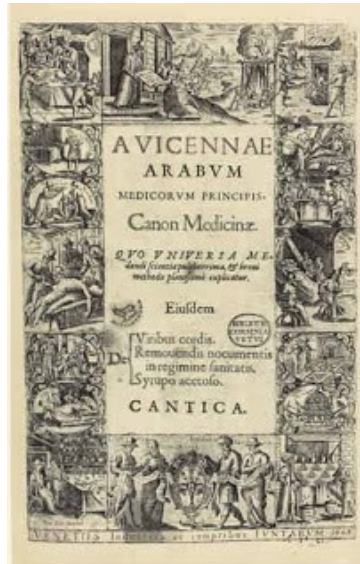
La historia del cáncer de mama y de su tratamiento van paralelas a la historia de la medicina. Desde la antigüedad existen referencias históricas sobre la enfermedad mamaria ya que tiene una simbología sexual, de feminidad y maternal presente en todas las culturas.

En el antiguo Egipto (1600 ac) existen ya referencias que podemos encontrar en el famoso papiro de Smith, hallado en Luxor en 1862, donde se describe un caso clínico de tumor en la mama, explicando cómo debe quemarse o cortarse. El papiro describe otros procesos médicos y su tratamiento con gran racionalidad para la época. Dicho papiro se expone en el Museo de Medicina de Nueva York.

Posteriormente encontramos referencias greco-romanas como Hipócrates que además de definir el término “Karkino” que significaba cangrejo para aludir a los tumores, describe varios casos y recomienda que las pacientes no sean tratadas porque viven más tiempo. Posteriormente el médico romano Celsus traducirá el término griego por el latino “cáncer”.

Durante la época medieval no se registran avances exceptuando la medicina árabe; es Avicena en 1020 quien publica su famoso Canon de Medicina, donde recoge un tratado completo de las enfermedades y unifica la medicina y la cirugía. En concreto propone

que el cáncer debe ser tratado quirúrgicamente de forma precoz y extirpando todos los tejidos que estén afectos.



**Figura I.9. Portada del Canon de Avicena**

Ya en el Renacimiento el avance en el conocimiento de la anatomía humana con personajes como Vesalio, sentará las bases para el desarrollo de la cirugía en los siglos XVIII y XIX donde destacan cirujanos como Paget y se comienzan a practicar extirpaciones mamarias y disecciones ganglionares curativas.

Pero fue sin duda el médico norteamericano William Halsted (1852-1922), quien revolucionó la cirugía oncológica considerándose padre de la misma. Su técnica era radical ya que intentaba por todos los medios extirpar todos los tejidos tumorales y tejidos vecinos sanos. A finales del siglo XIX se hizo popular su célebre mastectomía radical “Halsted” (vigente durante casi un siglo) en la que se extirpaba ampliamente la mama junto a tejidos y piel circundantes, pectoral mayor y disección axilar completa. A pesar de que comenzaron a

verse curaciones de pacientes, la mayoría recaía de la enfermedad al poco tiempo y finalmente moría.

En los años 60 se conocieron los primeros estudios de cirugía conservadora de la mama por lo que esta técnica se fue implantando progresivamente, así como la mastectomía radical modificada (tipo Madden) que conservaba los músculos pectorales. La cirugía actual incluye numerosas técnicas como son la tumorectomía, la biopsia del ganglio centinela, y una amalgama de técnicas reconstructivas que hacen de la cirugía plástica mamaria una ciencia en continua evolución.

Este desarrollo fue permitido gracias a la inclusión de la radioterapia como elemento complementario en la curación del cáncer de mama. Las primeras bombas de cobalto que administraban una irradiación indiscriminada y tóxica han ido dando paso a los modernos aceleradores lineales de electrones con intensidad modulada en 3D que permiten un tratamiento eficaz y exento de complicaciones. La irradiación parcial de la mama, la braquiterapia o la radioterapia intraoperatoria son técnicas que pronto se extenderán a la práctica clínica diaria.

Pero es sin duda en el tratamiento sistémico donde se han obtenido cotas inimaginables de desarrollo. Respecto a la hormonoterapia en 50 años ha evolucionado desde las extirpaciones ováricas, al tamoxifeno en los años 80, los inhibidores de la aromatasas en los años 90 y actualmente otras hormonas como fulvestrant o las combinaciones con modernos agentes biológicos.

La quimioterapia ha ido avanzando en cáncer de mama a la par que la oncología ya que es la enfermedad tumoral donde se ha

obtenido mayor desarrollo de la misma fruto de una incesante investigación. En los años 70 se iniciaron los tratamientos con alquilantes y antifolatos siendo el esquema más usado el CMF (ciclofosfamida, metrotexate, fluorouracilo). En los años 80 se extendió el uso de las antraciclinas y en los 90 en uso de los taxanos.

En el siglo XXI ha comenzado una era terapéutica novedosa que es la terapia dirigida o biológica; se trata de diseñar agentes biológicos que puedan interferir en los mecanismos biomoleculares y genéticos de la célula tumoral de forma sofisticada y segura ya que no afecta al tejido normal. Este avance, junto con la inmunoterapia, hace que actualmente el arsenal de agentes disponibles para tratar el cáncer de mama sea inmenso. Como no podía ser de otra forma la investigación clínica del siglo XX ha dado paso a la investigación biomolecular y translacional del siglo XXI en un desarrollo sin precedentes.

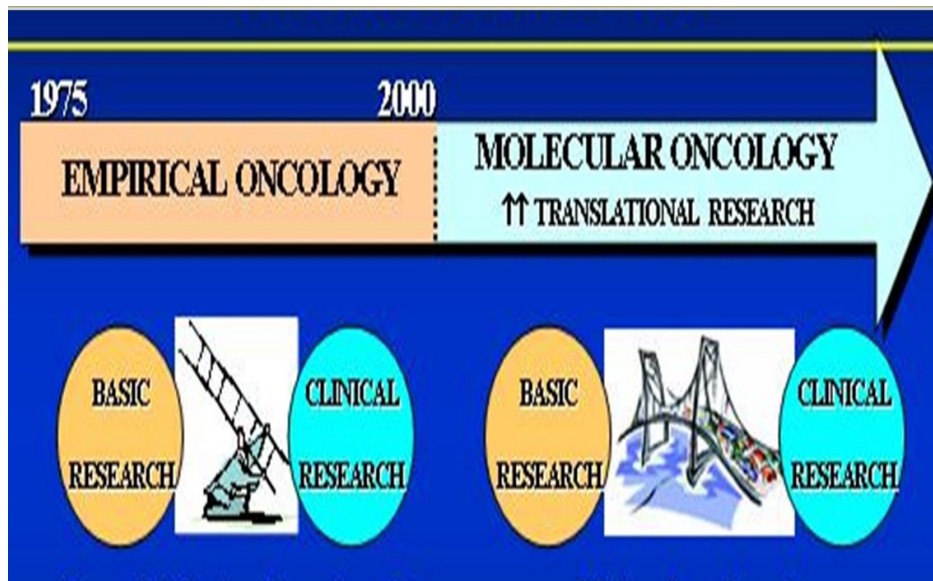


Figura I.10. Representación esquemática sobre la evolución científica en oncología.

La aplicación preventiva tras la cirugía (adyuvante) o curativa para tratar la enfermedad ha obtenido resultados espectaculares. De tal forma que en los últimos 40 años hemos pasado a conseguir elevar una supervivencia que era inferior al 50% a más del 80 % (GEICAM, 2014).

El arsenal terapéutico de terapia sistémica es inmenso. Podemos distinguir citostáticos clásicos y de desarrollo más moderno, dividirlos por mecanismos de acción o por indicaciones. Pueden administrarse solos (monoterapia) o en combinación (poliquimioterapia). También existen otros fármacos con actividad hormonal que se agrupan en el epígrafe de hormonoterapia y que han seguido un amplio desarrollo en cáncer de mama donde presentan una utilidad pareja con la quimioterapia con mejor tolerancia que ésta. Sin embargo la inmunoterapia tiene poca implantación en esta enfermedad sin que existan vacunas ni agentes inmunomoduladores con eficacia clara como para recomendar su uso. La terapia biológica (bioterapia) se ha desarrollado con fuerza y actualmente es imprescindible en muchos pacientes; especialmente en el subgrupo Her2 positivo donde el uso de trastuzumab y otros agentes similares es mandatorio.

En la siguiente tabla se muestran los principales agentes utilizados contra el cáncer de mama, así como el grupo terapéutico al que pertenecen y también su mecanismo de acción antitumoral.

Tabla I.8. Agentes farmacológicos usados en la terapéutica del cáncer de mama

<i>Principio Activo</i>	<i>Grupo Terapéutico</i>	<i>Mecanismo de Acción</i>
Doxorubicina Epirubicina Antraciclinas Liposomales	<b>Antibióticos Citostáticos</b>	<b>Actúan contra el ADN</b>
Ciclofosfamida	<b>Agentes Alquilantes</b>	
Metotrexato Fluorouracilo Capecitabina	<b>Antimetabolitos</b>	
Cisplatino Carboplatino	<b>Platinos</b>	
Taxanos (paclitaxel, docetaxel) Eribulina Vinorelbina	<b>Taxanos  Otros inhibidores de microtúbulos</b>	<b>Inhibidores de la mitois</b>
Antiestrógenos	<b>Tamoxifeno Toremifeno Fulvestrant</b>	<b>Antagonistas del receptor estrogénico</b>
Anastrozol Letrozol Examestano	<b>Inhibidores de Aromatasa</b>	<b>Inhibidores de la enzima aromatasa</b>

Goserelina	<b>AntiLHRH</b>	<b>Análogos de LHRH</b>
Megestrol	<b>Progestágenos</b>	<b>Acción progesterona</b>
Tratuzumab Pertuzumab	<b>Ac. Monoclonales</b>	<b>Inhibición receptor Her2</b>
Lapatinib	<b>Inh. Tirosinquinasa</b>	
Bevacizumab	<b>Inh. Angiogénesis</b>	<b>Antagonistas VEGF</b>
Everolimus	<b>Inh. mTOR</b>	<b>Inhibición de mTOR</b>

Fuente Propia

### **Protocolo actual de tratamiento en cáncer de mama**

Afortunadamente y a diferencia de otros tumores, el protocolo de tratamiento del cáncer de mama está perfectamente consensuado y globalizado. Con pequeñas diferencias en la mayoría de los centros donde tratan a estas mujeres, aplicamos una combinación de tratamientos preestablecida. La era biológica ha determinado también que el estudio histopatológico sea completo y definitorio clasificando al tumor en distintos subtipos patológicos como ya explicamos en el apartado anterior. Por tanto son las características propias del paciente (edad, enfermedades asociadas, preferencias, etc.) junto con las características biomoleculares del tumor, los que confieren un esquema de tratamiento determinado en lo que se ha dado en llamar “*la terapia personalizada*” o “el tratamiento individualizado o a la

carta”. No existe el mismo tratamiento para dos pacientes distintas, cada una recibirá el más ajustado a su situación.

Dependiendo del tipo de tumor, del tamaño de la mama y de las preferencias de la paciente, ésta será sometida a una cirugía radical asociada o no a reconstrucción, o a una cirugía conservadora. Respecto a la axila siempre que no exista contraindicación se practica la biopsia selectiva de ganglio centinela (BSGC). En los casos que el tumor inicial impida una cirugía curativa en primera instancia, se procederá a administrar tratamiento oncológico previo (neoadyuvante) generalmente con quimioterapia aunque también podría incluir hormonoterapia o bioterapia. Posteriormente se procedería a la cirugía ya sea parcial o radical.

Las indicaciones de radioterapia en el cáncer precoz de mama son básicamente la cirugía conservadora y la cirugía radical con factores de riesgo (afectación axilar, tumores grandes, grado 3). La radioterapia paliativa se aplica en diversas situaciones que abarcan desde la recidiva cutánea hasta las metástasis óseas o cerebrales.

Las indicaciones de quimioterapia, hormonoterapia y terapia biológica en cáncer de mama precoz dependen de factores biológicos como son la determinación de los receptores hormonales (receptor estrógeno y progesterona), de la positividad de Her2, de la cuantificación Ki67 y de otros factores de riesgo clínico-patológico clásicos (edad, grado histológico, tamaño tumoral, ganglios linfáticos, invasión vascular).

Para aumentar la complejidad existente, actualmente se definen distintas estrategias para cada subtipo genético. En ocasiones hay que decidir el tipo de tratamiento según la agresividad molecular

del tumor independientemente de los factores ya citados; para ello se utilizan las llamadas plataformas genéticas (Onco-Type, Mamaprint, Prosigna-TM) que nos determinarán el riesgo genético del tumor y por tanto según la categoría decidiremos el tratamiento apropiado.

Combinando las distintas modalidades de tratamiento que hemos descrito se puede obtener un esquema de tratamiento individualizado que sea el más apropiado para cada paciente. No obstante existen unas normas generales y unos protocolos consensuados que son seguidos en la gran mayoría de los centros europeos y americanos. Además existen reuniones de consenso a nivel regional, nacional e internacional que van actualizando periódicamente estos protocolos. Las más conocidas son la reunión bienal de consenso internacional de tratamiento del cáncer de mama precoz de San Gallen en Suiza (Goldhirsch et al., 2013) y las distintas directrices o guías de tratamiento publicadas por la ASCO (Asociación Americana de Oncología) o la NCCN (National Comprehensive Cancer Network) (NCCN, 2014). En Europa destaca la guía ESMO (Sociedad Europea de Oncología Médica) (Senkus et al., 2013; Locally, 2012) y a nivel nacional las guías SEOM (Sociedad Española de Oncología Médica) (Del Barco, 2013). En cualquier caso el tratamiento será comentado ampliamente por el médico a su paciente, ajustándose a las características propias de cada caso.

Con carácter general podemos establecer que el tratamiento depende de varios factores, siendo los más relevantes;

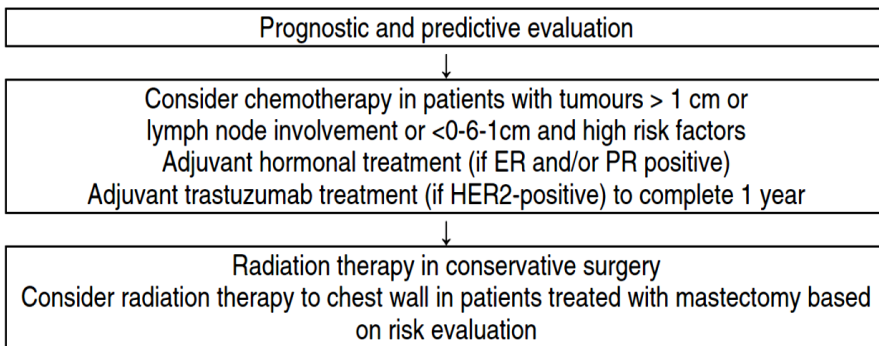
- Categoría de Riesgo; cuando es baja puede optarse por suprimir algún tipo de tratamiento.

- Estado Menopáusico; En las mujeres menopáusicas de bajo riesgo, el tratamiento hormonal cuando puede aplicarse suele ser suficiente, sin necesidad de quimioterapia.
- Situación de los Ganglios; Cuando son positivos el tratamiento es más intenso (así por ejemplo la quimioterapia debe contener antraciclinas que dan alopecia o incluir algún fármaco del grupo taxanos).
- Los Receptores Hormonales; cuando estos son negativos el tratamiento aplicado debe ser la quimioterapia, pero si son positivos la quimioterapia puede obviarse en algunas casos, al ser suficiente el tratamiento hormonal.
- El estado de HER-2; si es positivo podría intensificarse el tratamiento según otros factores de riesgo, y debe valorarse la posibilidad de asociar Anticuerpo (Anti-Her2; trastuzumab) para prevenir las recaídas en mujeres con receptor Her-2 positivo.
- Subtipo Genético; dependiendo el perfil genético del tumor se planifica un tratamiento distinto. Los Luminales A y B se tratan con hormonoterapia, los Her2 enriquecidos con quimioterapia asociada a antiHer2, y los Basales (triple negativo) con quimioterapia.

Subtype	Type of therapy
“Luminal A” “Luminal B HER2 -” “Luminal B HER2+” “HER2+” “Triple negative ( ductal)” “Special histological types”: 1. Endocrine responsive (HR+) 2. Endocrine nonresponsive ( HR-)	HT alone * Consider QT if risk factor is present HT ±QT QT+ Tzb + HT QT+ Tzb QT HT QT

HT: Hormonal therapy; QT: Chemotherapy (with anthracycline and taxanes or taxanes); Tzb: Trastuzumab

**Clinical Algorithm for adjuvant treatment decision**



**Figura I.11. Resumen de Guía SEOM tratamiento cáncer de mama precoz 2013. (Del Barco, 2013)**

## Systemic treatment recommendations

'Subtype'	Type of therapy	Notes
'Luminal A'	Endocrine therapy alone	Few require cytotoxics (e.g. high nodal status).
'Luminal B (HER2 negative)'	Cytotoxics ± endocrine therapy	Inclusion and type of cytotoxics may depend on level of endocrine expression, perceived risk and patient preference.
'Luminal B (HER2 positive)'	Cytotoxics + anti-HER2+ endocrine therapy	No data are available to support the omission of cytotoxics in this group.
'HER2 positive (non luminal)'	Cytotoxics + anti-HER2	Patients at very low risk may be observed without treatment
'Triple negative (ductal)'	Cytotoxics	
'Special histological types*'		
A. Endocrine responsive	Endocrine therapy	
B. Endocrine non responsive	Cytotoxics	Medullary and apocrine carcinomas may not require any adjuvant cytotoxics (if node negative).

**Figura I.12. Recomendaciones para el tratamiento sistémico del cáncer de mama correspondientes al resumen del consenso St.Gallen 2013.**

### Tratamiento Multidisciplinar del cáncer de mama; Unidad de Mama

No es posible realizar el tratamiento de una paciente desde una perspectiva única. La coordinación y colaboración entre todas las especialidades es fundamental. En el seno de la Unidad o comité de mama está compuesta por cirujanos, oncólogos médicos, radioterapeutas, rehabilitadores, patólogos, cirujanos plásticos, ginecólogos, medicina nuclear, enfermeras, etc.

Las funciones principales de la Unidad de Mama son;

- Centralizar en una única Unidad el control de la paciente.
- Unificar Protocolos de tratamiento y seguimiento de las pacientes entre las distintas especialidades.

- Coordinar el tratamiento multidisciplinar del cáncer de mama con las diferentes especialidades que intervienen en el mismo.
- Agilizar el circuito diagnóstico y terapéutico del paciente con carcinoma mamario.
- Participación en investigación y actualización científica sobre cáncer de mama.

**Seguimiento Clínico “postratamiento”:**

Una vez terminado el tratamiento oncológico, la paciente debe normalizar su vida retomando su actividad sociolaboral y familiar habitual. Clínicamente solo tendrá que acudir de forma periódica a las consultas de oncología para someterse a una revisión médica; este estudio consta de exploración física y de solicitud de varias pruebas diagnósticas (analítica general y mamografía). Independientemente de estas citas regulares, la mujer también deberá acudir siempre que surja algún signo de alarma que pudiera relacionarse con la enfermedad. La finalidad principal de esta vigilancia es la detección de posibles recidivas locoregionales que estén en fase extirpable o el inicio de tratamiento oncológico precoz ante una enfermedad metastásica incipiente. Los nuevos agentes terapéuticos consiguen cada vez mayores tasas de supervivencia, optimizadas en los casos iniciales cuando aún hay baja carga tumoral (Henry et al., 2014).

El Programa de Seguimiento suele ajustarse a las normas y recomendaciones internacionales, con mínimas variaciones locales (Khatcheressian et al., 2012). Así generalmente la periodicidad de las revisiones debe ser cada 3- 4 meses durante los dos primeros años, cada 6 meses del tercer al quinto año y posteriormente anual hasta el alta definitiva. Una vez dada de alta la paciente por el servicio de oncología, ésta mujer debería seguir el control clínico y radiológico

previsto de la mama contralateral, así como los exámenes ginecológicos que le correspondían, solicitados ambos en el ámbito de Medicina Primaria.

En cada visita se practicará la entrevista y la exploración clínica; en ausencia de signos de alarma, el tipo de estudio a practicar de forma rutinaria se restringe a una mamografía anual y en ocasiones a alguna analítica, ya que ninguna estrategia de seguimiento intensivo, basado en múltiples pruebas, ha demostrado su utilidad real. En caso de que existan síntomas o signos de alarma, el médico decidirá ampliar el estudio con otras pruebas específicas (TAC, RX, gammagrafía, etc.).

Es recomendable también que la paciente sea revisada por su ginecólogo de forma anual, sobre todo en las pacientes con tratamiento hormonal. Durante el seguimiento y según los casos, también pueden intervenir otros profesionales (psicooncólogos, cirujanos plásticos, traumatólogos, reumatólogos, fisioterapeutas, etc.).

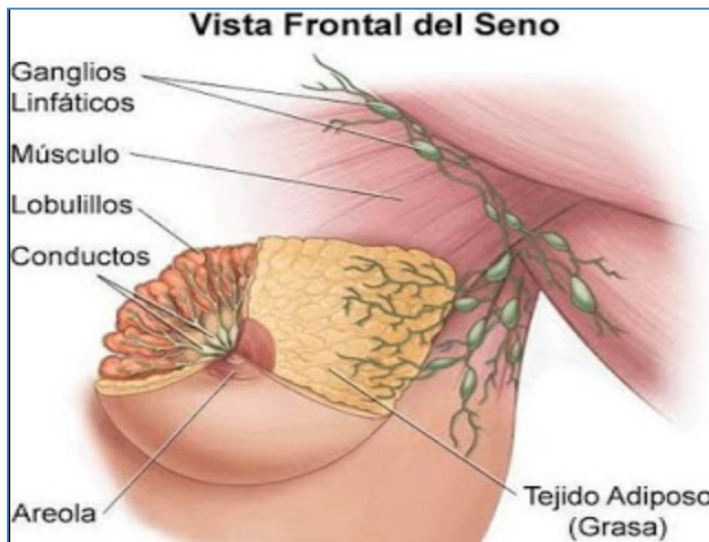
## **1.2 Historia natural en el desarrollo del cáncer de mama**

### **1.2.1 Anatomía y fisiología de la glándula mamaria**

La mama está constituida por dos órganos glandulares que se sitúan en la parte anterior del tórax. Esta glándula que está presente en ambos sexos, es en el hombre rudimentaria durante toda la vida. En la mujer se van desarrollando en la pubertad y alcanza el máximo apogeo durante el embarazo y sobre todo en la

fase de lactancia. En la piel pueden distinguirse dos formaciones cutáneas concéntricas y situadas en el cuadrante central mamario; la areola y el pezón (figura I.13).

La mama está formada por dos tipos de tejido; el tejido fibroadiposo que da consistencia a la mama y el tejido glandular, encargado de las propiedades exocrinas. El tejido glandular se compone de una serie de lóbulos glandulares que se dividen en lobulillos compuestos por racimos o acinos secretores formando la última unidad funcional mamaria que se llama Unidad Terminal Ductolobular (TDLU), donde se produce la leche que es transportada por los conductos galactóforos hacia el exterior. Estos conductos van confluyendo en otros mayores hasta desembocar en el pezón por donde se excreta la leche. A lo largo de toda su longitud, los conductos galactóforos están tapizados por dos capas de células: una capa interna continua de células epiteliales y una capa externa discontinua de células mioepiteliales.



**Figura I.13; Estructura anatómica de la glándula mamaria**

Fuente; CareFirst

(<http://carefirst.staywellsolutionsonline.com/Spanish/TestsProcedures/92,P09278>)

La proliferación glandular de los tejidos mamarios está regulada por hormonas y puede dar lugar a formaciones benignas; las más conocidas son quistes o fibroadenomas en lo que se ha dado en llamar *mastopatía fibroquística*.

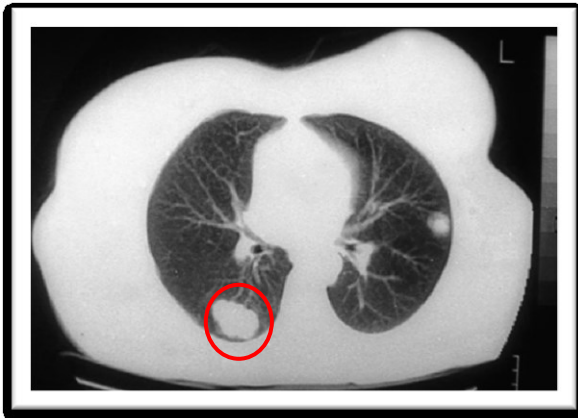
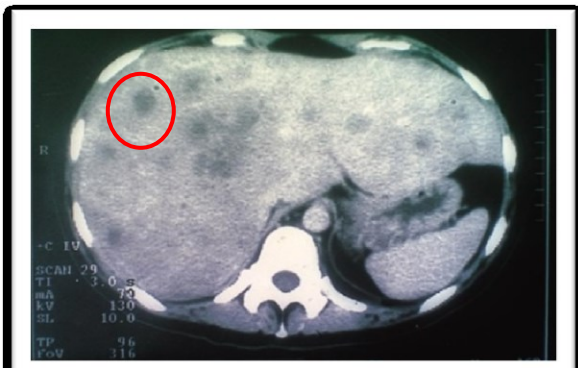
Pero puede ocurrir que las células mamarias, tanto de los conductos como de los lóbulos, vayan alterándose en respuesta a distintos estímulos carcinogénicos (radiaciones, estrógenos, agentes químicos, etc). Existe una fuerte evidencia de que la tumorigénesis comienza con la adquisición de mutaciones somáticas que promueven la inestabilidad genómica. Dicha inestabilidad es un importante rasgo de malignidad debido a que puede generar la diversidad genética que es necesaria para la transformación de células tumorales para adquirir fenotipos variables y cada vez más agresivos (Sen y Hopwood, 2010). Así, se irán produciendo mutaciones y daños en el ADN celular, en principio reparables, hasta que los cambios se vuelven irreversibles y sean ya neoplásicos dando lugar al carcinoma “in situ” o no infiltrante. Estas células neoplásicas comparten ya los criterios histológicos generales del cáncer que son;

- la autonomía con falta de control
- la clonalidad celular de una misma estirpe
- la desdiferenciación progresiva
- el crecimiento expansivo y desordenado.
- la capacidad para diseminarse a lo largo del organismo (metastatizar).

Si las células tumorales atraviesan la membrana basal que las rodea y se extienden por el tejido mamario (grasa, conductos, vasos) se trata ya de un carcinoma infiltrante. Dependiendo de que las células tumorales sean células de los conductos o de los lóbulos, el tumor resultante será carcinoma ductal infiltrante o

lobulillar infiltrante. En una fase posterior, este carcinoma infiltrante puede atravesar vasos linfáticos y llegar hasta los ganglios axilares, o supra e infra claviculares o de la cadena mamaria interna. También puede darse infiltración de vasos sanguíneos, produciéndose una distribución de células tumorales por todo el organismo, de tal forma que si se dan las condiciones fisiológicas adecuadas, pueden asentarse en algún órgano y provocar la “siembra” o metástasis en el mismo. Las metástasis más frecuentes en cáncer de mama son las óseas, hepáticas y pulmonares. Menos frecuentes son las metástasis cutáneas, pleurales o del sistema nervioso central (cerebro o médula).

En las siguientes figuras podemos observar algunos ejemplos reales de nuestras pacientes con metástasis por cáncer de mama de mama.



**Figuras I.14 y I.15.** TAC de una paciente con cáncer de mama metastásico en hígado y pulmones (círculo rojo). Fuente propia

Figura I.16. RMN de una paciente con cáncer de mama y metástasis cerebrales. (círculo rojo). Fuente propia

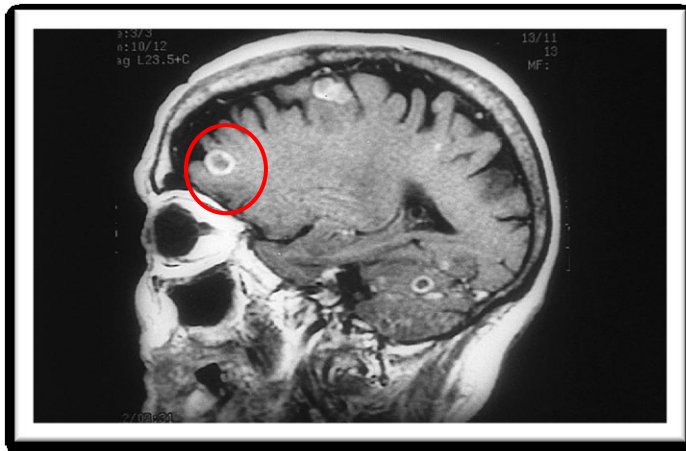


Figura I.17. RMN de columna dorsolumbar de una paciente con cáncer de mama y metástasis óseas en columna lumbar (círculo rojo). Fuente propia



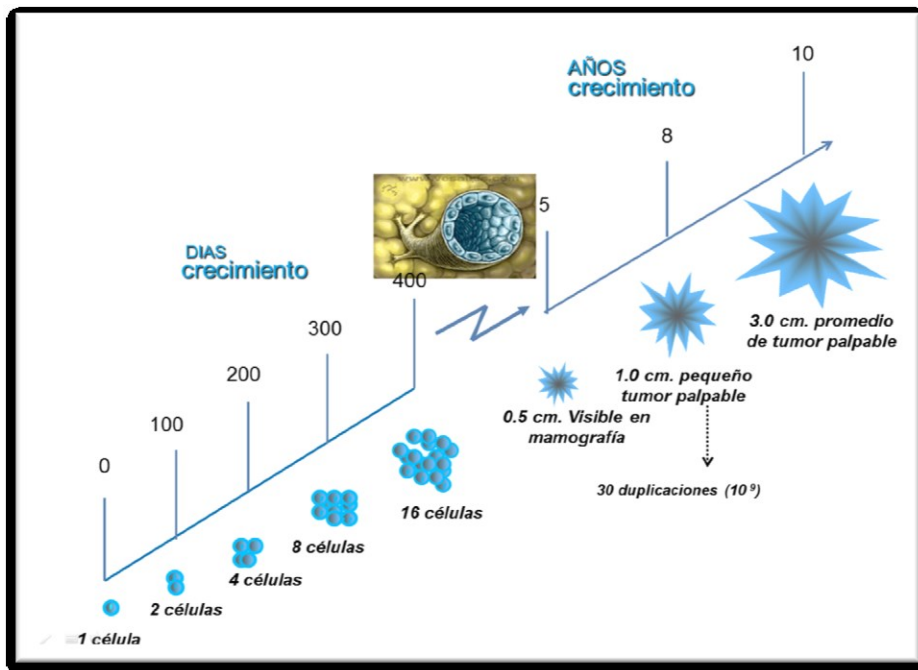
Si el crecimiento es local y el tumor no se interviene, éste puede llegar a la piel o al pezón ulcerándola o retrayéndola provocando el llamado carcinoma localmente avanzado (Estadios T4 ó IIIB) tal como observamos en la siguiente figura.



**Figura I.18. Cáncer de mama localmente avanzado.** *Fuente propia*

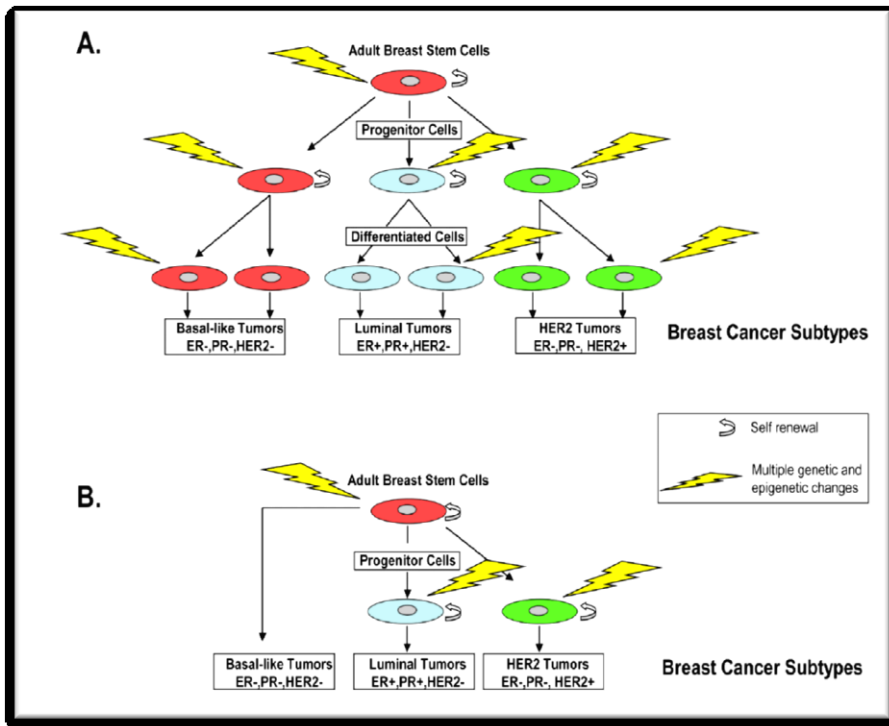
### 1.2.1 Transformación epitelial; ¿cómo llega una célula mamaria normal a convertirse en una célula tumoral de cáncer de mama? Es lo que no se conoce del todo.

En 1991 Harris describió el proceso de progresión tumoral del cáncer de mama como un proceso lento y progresivo, donde se parte de una primera célula que va sufriendo divisiones exponenciales durante 4-5 años hasta que el tumor alcanza un tamaño suficiente para ser detectable por mamografía. Pasados 3-4 años más, el tumor alcanza 1 cm de diámetro, considerándose palpable y detectable clínicamente. Todo el proceso podría durar en torno a 10 años (Harris et al., 1991) tal como vemos representado en la figura siguiente.



**Figura I.19. Representación de la progresión tumoral del cáncer de mama.** Fuente; Harris et al., 1991.

La carcinogénesis del cáncer de mama es compleja pero cada vez se acumulan más conocimientos. Atendiendo al origen del cáncer de mama se postulan dos modelos distintos; el primero llamado **“modelo clonal o estocástico”** establece la existencia de una primera célula que tras recibir los estímulos carcinogénicos, se transforma en distintos tipos celulares progenitores y estos a su vez dan lugar a distintos subtipos de cáncer. El segundo modelo o **“stem cell”** establece que de esta primera célula se derivan a su vez los tipos celulares y todos los posibles subtipos de cáncer de mama. Ambos modelos se pueden observar en el esquema de Sgroi (Sgroi, 2010).



**Figura I.20. Modelos de carcinogénesis en cáncer de mama según Sgroi.** Fuente; Sgroi, 2010

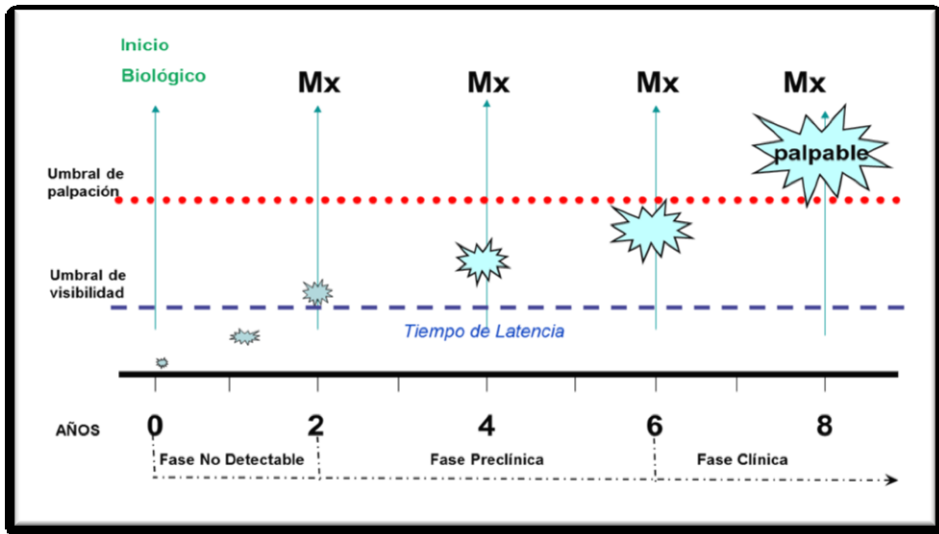
Independientemente de la clonalidad, el desarrollo del cáncer de mama desde el inicio a las etapas invasivas se describe como un proceso progresivo que se inicia en las células de la TDLU. Dependiendo del tipo de células se desarrollará un carcinoma ductal o lobular. Así las etapas preinvasivas del carcinoma lobular incluyen la hiperplasia atípica lobulillar y el carcinoma in situ lobulillar. Las etapas preinvasivas del carcinoma ductal serían la hiperplasia típica usual, la hiperplasia atípica y el carcinoma ductal “in situ”.

Recientes datos de expresión génica y epigenética sugieren que el estroma y el microambiente mioepitelial que existe en la enfermedad preinvasiva, participan activamente en la transición hacia la enfermedad invasiva (Ma et al., 2009). Los datos actuales apuntan a una compleja interacción de señalización epitelial-conjuntiva entre

la matriz, como ocurre entre la secreción de MMPs (metaloproteinas de la matriz) y catepsinas del tejido conjuntivo por células mioepiteliales y las vías de transducción de señales relacionadas con el crecimiento celular. Así por ejemplo, las alteraciones genéticas comunes en los carcinomas ductales invasivos de bajo grado (pérdida material genético en el cromosoma 16q) y alto grado (amplificación de material genético 17q) comienzan a observarse ya en los estados preinvasivos.

Durante este proceso de maduración del tumor es cuando se van adquiriendo las características que lo van definiendo según su perfil genético. Así los tumores más indiferenciados darán lugar al subtipo basal. Si adquiere propiedades de receptor de estrógenos o progesterona dará lugar a tumores con subtipos luminales A o B, y si adquiere diferenciación en ERB2 dará el subtipo Her2 enriquecido. Además en este proceso evolutivo intervienen otros múltiples factores biomoleculares como son las citoqueratinas 5 y 6, el EGFR, E-caderina, p53, Bcl-2 o el Ki 67. Las lesiones preinvasivas constituyen pues un grupo heterogéneo y no está claro aún si todas las lesiones invasivas atraviesan por los mismos estadios o hay situaciones en las que este proceso evolutivo no se sigue tal cual, especialmente en los tumores de alto grado (Di Bonito et al., 2013).

Este proceso es apasionante desde el punto de vista histomorfológico, bioquímico y genético. Cada vez se describe con mayor precisión la intervención de los distintos factores moleculares y factores promotores de esta transformación (como son las hormonas por ejemplo). La evolución cronológica de este proceso suele representarse mediante esquemas donde se representan las distintas fases, la temporalidad y el contexto clínico correlacionadas.



**Figura I.20. Esquema temporal del desarrollo del cáncer de mama.**  
Fuente propia.

Observamos que desde el inicio biológico producido por las primeras transformaciones celulares displásicas hasta la posibilidad de detección radiológica por mamografía, existe un periodo que oscila entre 2 y 4 años llamado **Fase no detectable**. Desde que aparecen los incipientes signos radiológicos hasta que el tumor es palpable pasarían unos 4 años en lo que llamamos la **Fase Preclínica**; es aquí donde el screening radiológico tiene su utilidad. Finalmente después de al menos 6 a 8 años, el tumor sería palpable y por tanto diagnosticable desde el punto de vista clínico. Por tanto, dado que el proceso es lento y que el tiempo medio desde que aparecen las primeras lesiones precancerosas hasta que la enfermedad se hace sistémica es de unos 10 años, existen muchas posibilidades para el diagnóstico preclínico de la enfermedad. Durante el **periodo de latencia** de 4 años que coincide con la fase preclínica, es detectable por mamografía. Pero más interesante aún es la posibilidad de detección en el estadio anterior (Fase no detectable) mediante

biomarcadores de transformación celular. Este método serviría pues tanto en la primera fase como en la fase segunda (preclínica) ya apoyando al diagnóstico radiológico. Resulta evidente que la historia natural tan dilatada del cáncer de mama nos ofrece una oportunidad única para la explotación de los distintos métodos de diagnóstico precoz.

No obstante, al igual que ocurre con otros tumores, la evolución de la enfermedad es muy variable y depende de las características específicas del tumor, del huésped y de los factores ambientales. Como ya comentamos, en algunas ocasiones este proceso es rápido y no sigue los pasos de transformación progresiva, ya que existen factores inductores de tumores de alto grado y agresivos y en poco tiempo se puede desarrollar un tumor localmente avanzado o metastásico. En estos casos no cabe el planteamiento de un diagnóstico precoz que expusimos anteriormente.

El carcinoma invasivo tiende a infiltrar el tejido conjuntivo de los órganos o estroma, los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos. Así es frecuente que comiencen a anidar en la primera estación ganglionar axilar. Por vía hemática pueden afectar a algún órgano quedando situado como grupos celulares quiescentes o si las condiciones de microambiente lo permiten, desarrollándose clínicamente en el órgano metastatizado.

Una paciente intervenida por un cáncer de mama precoz y sometida posteriormente a tratamiento sistémico podría considerarse “curada”. Pero sabemos que el cáncer de mama es una enfermedad sistémica y siempre existen células tumorales circulantes (CTC) de difícil detección. Estas células pueden encontrarse también en médula ósea y habitualmente no tienen repercusión clínica. Sin embargo su

detección indica un factor de riesgo ya que a partir de ahí pueden darse recaídas tardías si se multiplican y anidan en algún órgano. Para que se de este hecho es preciso que concurren varias circunstancias como por ejemplo un déficit inmunitario en esa paciente. Esta es la explicación de por qué el cáncer de mama es de los pocos tumores que puede causar recaídas muy tardías; relativamente frecuentes después de los 10 años e incluso están descritos casos con recaídas después de 20 años. Se trata pues de una historia natural indefinida y espectacular propia del cáncer de mama y diferente al resto de tumores del organismo.

En la figura I.21 podemos observar las alteraciones histopatológicas de los distintos estadios evolutivos del cáncer de mama. Su representación gráfica y su correlación real basada en preparaciones de pacientes con cáncer de mama procedentes del laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Juan Ramón Jiménez.

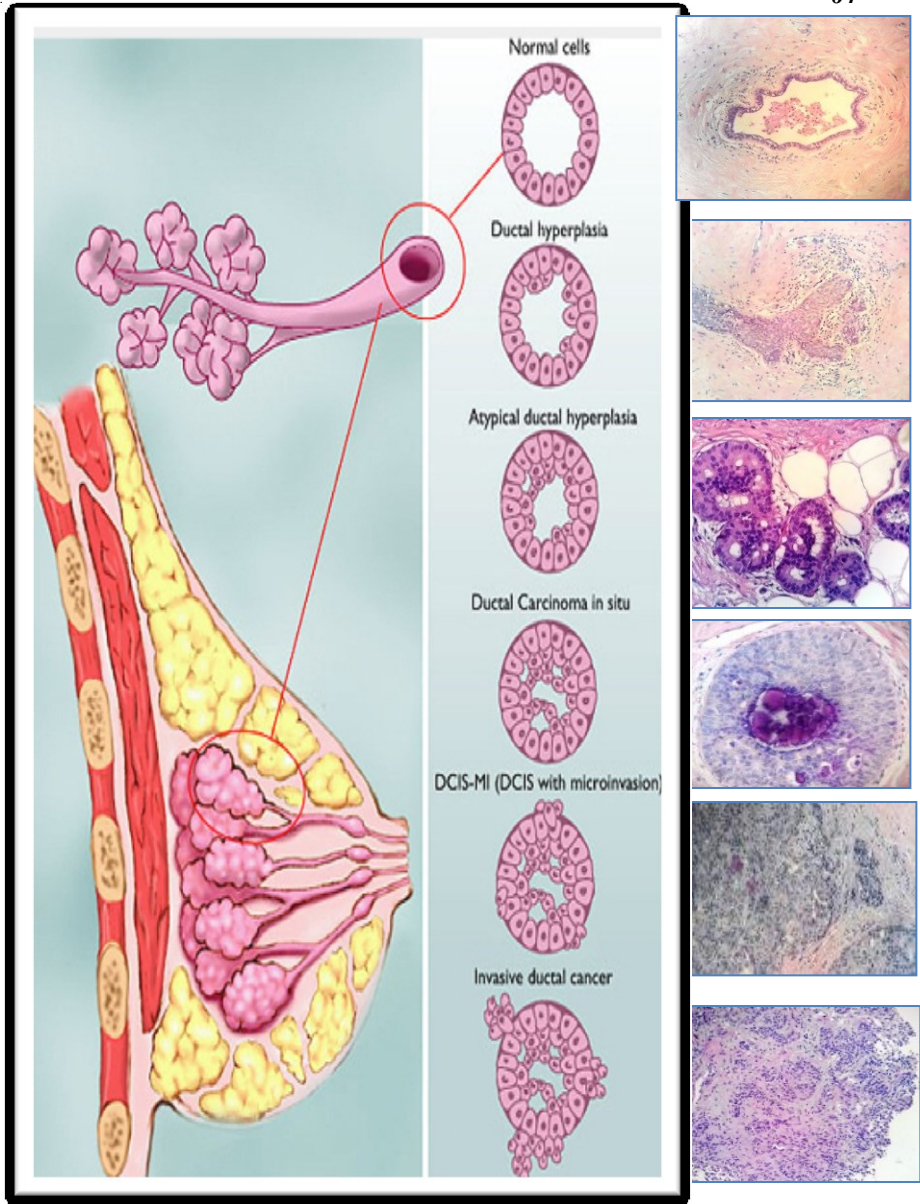


Figura I.21. Esquema de la transformación preinvasiva invasiva en cáncer de mama y sus correlaciones histopatológicas. Fuente; Servicio de Patología H. Juan Ramón Jiménez

## 1.3 Factores de riesgo para cáncer de mama.

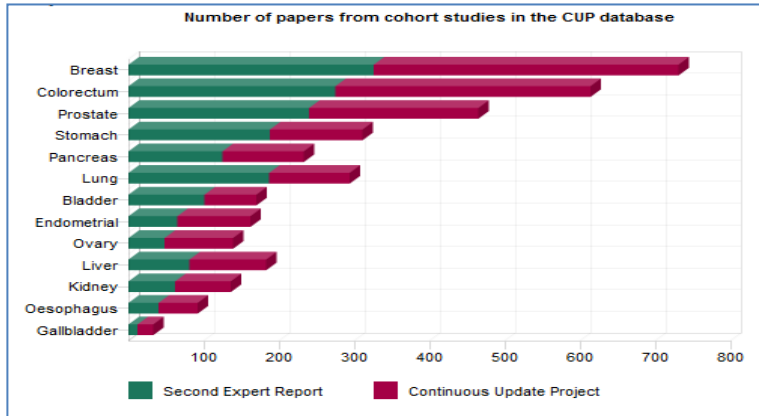
### 1.3.1 Prolegómenos

Dado que nuestro trabajo sigue un diseño de **casos-contrroles** y que compara una población de mujeres con cáncer de mama precoz con una de mujeres sanas, encontramos muy pertinente aprovechar nuestros datos de registro de las características de estas mujeres para compararlos entre ambos grupos. De hecho, como veremos posteriormente, esta comparativa se marca como objetivo secundario; por ello, la descripción de este apartado cobra si cabe mayor importancia.

Hemos realizado un estudio exhaustivo y actualizado de toda la información disponible sobre el tema con intención de aportar un valor añadido a este trabajo.

El pasado 4 de febrero de 2014 se presentó en el día mundial contra el Cáncer, la actualización de la publicación de la IARC llamada “World Cancer Report 2014” (Bernard 2014) donde se analizan en profundidad los aspectos epidemiológicos del cáncer en el mundo de forma global y de cada tumor en particular (se analizan los factores de riesgo más relevantes y su impacto en la salud pública). En 2007 se publicó la segunda publicación especializada en factores de riesgo relacionados con la alimentación y la actividad física (WCRF/AICR, 2007). Desde entonces se han ido añadiendo numerosas actualizaciones (CPU; Continuous Uptate Project). Además hay que resaltar que el cáncer de mama es el tumor donde se produce mayor aporte científico en esta área tal como observamos en la figura

I.22; motivo por el que intentamos ser lo más concretos posible en esta Tesis.



**Figura I.22. Gráfico del número de estudios cohorte por tumores registrados desde 2007 (en rojo) por CPU database.** Fuente; Continuous Uptate Project (WCRF/AICR)

Volviendo al World Cancer Report encontramos que se define la etiología del cáncer de mama como multifactorial ya que agrupa distintos factores largamente estudiados por diferentes áreas; edad, historia familiar, factores reproductivos, densidad mamaria, lesiones benignas de la mama, consumo de alcohol, uso de hormonas, exposición a radiaciones y estilo de vida. Según un importante estudio caso-control realizado en Alemania (Barnes et al., 2011) los factores más influyentes dentro de los no modificables son; la edad de la menarquia y de la menopausia, la paridad, las enfermedades benignas mamarias y la historia familiar. Respecto a los factores modificables destacan el uso de terapia hormonal y el sedentarismo.

Iniciamos ahora una recopilación y repaso actualizado por los principales factores que afectan al desarrollo del cáncer de mama tanto de riesgo como protectores.

### 1.3.2 Factores de Riesgo

#### Edad

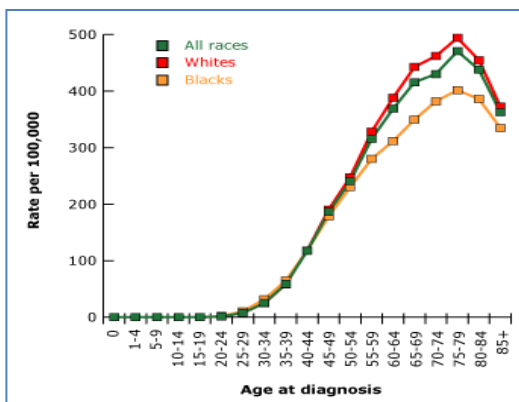
El cáncer de mama incrementa su riesgo con la edad de la mujer, siendo la edad media de incidencia en torno a los 55 años. En USA el riesgo relativo acumulado antes de los 40 años es de 0.49 y a los 70 de 6.58. El riesgo total a lo largo de una vida de una mujer alcanza el 12.29 %, una de cada ocho mujeres (Sieguel et al., 2012). En España el riesgo total acumulado en la vida de una mujer es aproximadamente del 10%.

#### Sexo

Se trata de una enfermedad femenina ya que la incidencia del cáncer de mama en el hombre es muy baja y apenas alcanza el 1% de todos los cánceres de mama.

#### Raza

Es más frecuente en países desarrollados y dentro de ellos en la raza blanca. Este hecho es menos relevante en España pero significativo en USA (Tasa de incidencia por 100.000; 122 en blancas y 117 en negras) (CDC. Vital Signs. 2012). Tal como expresa la figura adjunta.



**Figura I.22. Incidencia del cáncer de mama en USA según raza.** Fuente CDC.VITAL SIGNS. 2012

**IMC (Índice de Masa Corporal)**

Viene determinado por el peso y la talla de la mujer. Los valores situados entre 18-25 kg/m<sup>2</sup> se consideran normales. Entre 25-30 kg/m<sup>2</sup> indican sobrepeso y si es >30 kg/m<sup>2</sup> obesidad.

En mujeres postmenopáusicas, la obesidad favorece la conversión periférica de precursores estrogénicos en el tejido adiposo lo que conlleva elevados índices de estrógeno plasmático. Es por tanto un claro factor de riesgo estimado para la obesidad frente al normopeso de 1.27 (RR 1.27, 95% CI 1.03-1.55) (Brandt et al., 2000). Paradójicamente en mujeres premenopáusicas la obesidad ha demostrado un cierto efecto protector aunque no significativo ni justificable clínicamente (Cheraghi et al., 2012).

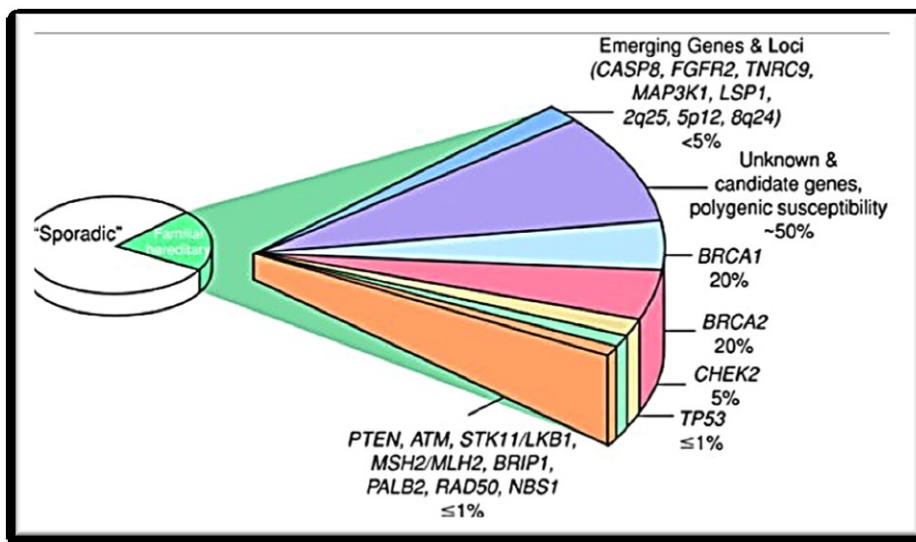
**Factores reproductivos y hormonales**

La exposición continuada a ciclos menstruales en la mujer es un estímulo para el desarrollo de cáncer de mama, especialmente hormonodependiente. Por consiguiente todas las situaciones que alarguen esta exposición (menarquia precoz, menopausia tardía, nuliparidad) contribuyen a aumentar el riesgo. La menarquia por debajo de 13 años es un factor de riesgo frente a edades superiores a 15 años (13-16% disminución de riesgo) (Nelson et al., 2012; Ritte et al., 2013). Respecto a la menopausia se ha demostrado que por cada año mayor de la media que se alargue la menopausia se obtiene un 3% de riesgo como se ha demostrado en un estudio colaborativo publicado en 2012 (Collaborative Group, 2012).

La paridad es un factor de primera magnitud, así independientemente de su estado menopaúsico, las mujeres nulíparas tienen un 30% más de riesgo que las mujeres que hayan tenido algún parto (Ewertz et al., 1990). Pero si cabe es más importante la edad del primer parto siendo el riesgo mayor cuanto más se alarga; 20, 25, 30 y 35 años que es cuando se iguala a la nuliparidad (Colditz y Rosner, 2000).

Una gran controversia ha generado la relación entre el aporte hormonal exógeno (anticonceptivos y terapia hormonal sustitutiva) y el riesgo de cáncer de mama. Tras la publicación de numerosos macroestudios, con frecuencia contradictorios, puede establecerse firmemente el significativo aumento de riesgo que aportan las terapias hormonales, independientemente del estado menopaúsico. Las mujeres que han usado anticonceptivos orales (ACO) presentan un 8% de mayor riesgo, que aumenta si el uso ha sido reciente; < 5 años tras fin de uso (Gierish et al., 2013). La seguridad del uso de preparados sustitutivos de la menopausia (combinados estrógenos+progestágenos) ha sido analizado en el Women's Health Initiative (WHI) que se trata de un estudio aleatorizado realizado en 41.449 mujeres menopaúsicas que se dividieron en un grupo de no uso de hormonas y otro de mujeres en tratamiento hormonal. Las diferencias respecto al riesgo de cáncer de mama fueron de un 55% más para el grupo de mujeres con hormonoterapia (HR = 1.55, 95% CI = 1.41 to 1.70, P < .001) (Chlebowski et al., 2013). En otros estudios realizados con mujeres que utilizaban solamente estrógenos sustitutivos (no combinados) también se ha demostrado el aumento de riesgo (Million, 2003).

Pocas neoplasias han demostrado con tanta solvencia el contexto de riesgo familiar como el cáncer de mama. Existen enfermedades genéticas como son el *Síndrome de cáncer de mama-ovario familiar*, que suponen el 10% del total de los cánceres de mama, y que se asocian a alteraciones de diversos genes (BRCA1, BRCA2) que pueden conferir un riesgo a las portadoras entre el 20 y el 80% de padecer un cáncer de mama y/o de ovario (Mavaddat et al., 2013). Existen otras alteraciones genéticas menos conocidas y algunas que aún no se han determinado. Este hecho queda representado en el siguiente gráfico:



**Figura I.23. Alteraciones genéticas como causa del cáncer de mama.**

Fuente; DeVita VT et al *Cancer: Principles & Practice of Oncology*, 9th Ed. 2011

No obstante, la mayoría de los casos son esporádicos ya que no se pueden determinar alteraciones genéticas conocidas, lo cual no implica que las mujeres con antecedentes familiares de primer o segundo grado estén exentas de riesgo familiar. Así el riesgo relativo suele oscilar entre 2 y 4 dependiendo de que sea 1 o 2 antecedentes de

primer grado y de la temprana edad o bilateralidad de estos casos (Collaborative, 2001).

### **Enfermedad Mamaria**

- Densidad Mamaria; La densidad radiológica la aporta el componente fibroglandular, habiéndose demostrado que mujeres con alta densidad mamaria (>75%) tienen un riesgo 4 veces mayor que las mujeres sin alta densidad para la misma edad (Mc Cormack y Dos Santos 2006).
- Enfermedad “Benigna” de la mama ; las lesiones benignas tanto no proliferativas como proliferativas (fibroadenomas, quistes, hiperplasia típica, mastitis, lesiones apocrinas, papiloma intraductal ) no se relacionan con riesgo de cáncer de mama. Sin embargo, hay una lesión proliferativa que es la hiperplasia atípica que aporta alto riesgo, en torno al 4% (Degnim et al., 2007).
- Cáncer de mama previo ; Pacientes que han sufrido un cáncer de mama o un carcinoma ductal in situ tienen un riesgo aumentado en un 4% de padecer cáncer de mama contralateral dependiendo de factores hormonales y terapéuticos individuales para cada paciente (Nichols et al., 2011).

### **Estilo de vida y hábitos**

Son los factores más importantes precisamente por ser modificables y permitir actuar desde el enfoque de prevención primaria.

Dieta: Existen leves evidencias de que las dietas con carne roja y grasas actúan como factor de riesgo pero esto no ha podido demostrarse. Un trabajo muy reciente del grupo GEICAM publicado

este año, demuestra que la dieta occidental es un factor de riesgo significativo (OR 1.46; 95% CI 1.06-2.01) mientras que la mediterránea (fruta, verduras, legumbres, pescado, patata y aceite oliva) actúa como factor protector (OR 0.56 ; 95% CI 0.40-0.79) (Castello et al., 2014).

Tabaquismo; el riesgo de cáncer de mama es un 12% mayor en las mujeres fumadoras y un 9% en las exfumadoras con respecto a las mujeres que nunca han fumado (Gaudet et al., 2011)

El consumo de alcohol; es un claro elemento de riesgo ya que por cada 10 gr/día de consumo de alcohol aumenta el riesgo un 9% (RR 1.09) (WCRF/AICR, 2010)

Radiaciones Ionizantes; La radiación administrada en la juventud por ejemplo en supervivientes de linfoma Hodgkin o adquirida por accidentes nucleares es un claro carcinógeno que incrementa el riesgo entre un 13-20% (Henderson et al., 2010)

Vitamina D; Diversos estudios han relacionado los niveles plasmáticos bajos de vitamina D (25-OH-vitaminaD) con riesgo de cáncer de mama. Así en mujeres menopaúsicas los ascensos de niveles por encima de 25ng/mL y hasta 35ng/mL, suponen una disminución del riesgo (Bauer et al., 2013)

### **Otros Factores**

Existen multitud de factores cuyos estudios no han sido concluyentes y por tanto solo los citamos para su mero conocimiento; medicamentos (AINEs), vitaminas, caféina, abortos previos, tabaquismo pasivo, agentes químicos, soja, trabajo nocturno, etc.

### 1.3.3 Factores Protectores

La lactancia ha demostrado que ejerce de factor protector para lo que debe durar al menos 6 meses y su eficacia es máxima por encima de un año. En el macroestudio del Grupo Colaborativo que es un metaanálisis de 47 estudios donde se incluyeron más de 150.000 mujeres se demostró la reducción del riesgo relativo en un 4.3% para las mujeres que dieron lactancia durante un periodo mayor a 12 meses (Collaborative Group, 2002).

La realización de actividad física (ocupacional o no ocupacional, con respecto a la inactividad física) disminuye el riesgo de cáncer de mama en un 23% según se refleja en un metaanálisis de 6 estudios prospectivos (Wu et al., 2013).

Respecto a la alimentación se ha demostrado que una alta ingesta de frutas y verduras con respecto a una baja ingesta, reduce el riesgo de cáncer de mama en un 11% (Aune et al., 2012). Asimismo como ya se ha comentado, la dieta mediterránea ejerce un claro efecto protector.

## 1.4 Prevención y Diagnóstico Precoz del cáncer de mama.

Puede realizarse la prevención de varias formas. En primer lugar puede actuarse sobre los factores de riesgo evitando así la aparición de la enfermedad (**prevención primaria**); se actúa sobre los factores ambientales promoviendo una vida más saludable, evitando los tratamientos hormonales, favoreciendo la lactancia etc.

Respecto al riesgo genético se efectúa lo que se ha dado en llamar el

**Consejo Genético** que se trata de calcular el riesgo de cada mujer según las alteraciones genéticas detectadas en los análisis, y así sugerir distintas actitudes preventivas. Según cada caso puede indicarse desde sólo vigilancia periódica de la mujer hasta incluso la mastectomía bilateral profiláctica o preventiva en situaciones especiales.

Otra forma de prevención primaria es la **quimioprofilaxis** que consiste en la administración de fármacos, con características “antihormonales” (antagonistas, bloqueadores de receptores estrogénicos o inhibidores de la secreción hormonal ovárica o suprarrenal), en mujeres de riesgo durante un tiempo determinado, para disminuir las posibilidades de que desarrollen la enfermedad.

Actualmente la estrategia que ha tenido más resultados y mayor implantación es la **prevención secundaria o diagnóstico precoz**; es decir la detección de la enfermedad en las fases precoces, cuando tiene un tratamiento muy asequible y un buen pronóstico. Para ello se han utilizado diferentes métodos, siendo los más conocidos la exploración mamaria y la mamografía. En Andalucía existe un Programa de Detección Precoz, puesto en marcha por la Consejería de Salud en 1995 y basado en la realización de mamografías bianuales a todas las mujeres censadas de edades comprendidas entre 50 y 69 años.

En general, para **prevenir el cáncer de mama**, se podrían hacer las siguientes recomendaciones a las mujeres:

-Hábitos de vida saludable; evitar tabaco y alcohol, realizar actividad física regular y adoptar la dieta mediterránea.

- Modificaciones en los comportamientos reproductivos, en la medida de lo posible. Dar lactancia siempre que se pueda y evitar tratamientos hormonales prolongados.
- Practicar la autoexploración mamaria mensual y acudir a su médico ante alguno de los síntomas de alarma
- Colaborar con los Programas de Diagnóstico Precoz.
- Realizar vigilancia especial en caso de que exista alto riesgo de contraer la enfermedad.
- Consultar con su médico de familia o especialista ante cualquier duda o existencia de signos de alarma.

## **1.5 Marcadores Tumoraes para el cáncer de mama**

### **1.5.1 Marcadores Tumoraes en Oncología. Su utilidad en diagnóstico precoz.**

Los **Marcadores tumorales** son sustancias proteicas producidas por las células tumorales y por tanto fácilmente detectables mediante reconocimiento antígeno-anticuerpo, tanto en sangre como en los tejidos. El Grupo de Trabajo Biomarcadores NIH define un marcador biológico ( biomarcadores) como una característica que se mide y se evalúa objetivamente siendo un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos, o respuestas farmacológicas a una intervención (Biomakers, 2001). Su aplicación clínica depende del tipo de tumor, pero generalmente se usan en el estudio de extensión inicial tras la extirpación del tumor, como valoración de la respuesta al tratamiento y también en el

seguimiento del paciente como detector de una probable recaída precoz. La sensibilidad y especificidad del marcador depende de sus características y de su aplicación para un tumor determinado. Sin embargo, su utilidad máxima sería en el diagnóstico precoz, ya que con un simple análisis de sangre podríamos hacer un *screening* de un tumor a nivel poblacional.

El descubrimiento de un biomarcador es un proceso complejo. En primer lugar hay que identificar las sustancias susceptibles de estudio y los métodos bioquímicos para detectarlas. Una vez detectados, el siguiente paso es el desarrollo de métodos apropiados para su medición de rutina; la valoración de parámetros analíticos clave, tales como la estabilidad del analito, precisión cuantitativa, complejidad de la técnica, veracidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, rendimiento analítico, etc. Posteriormente se procede a una valoración clínica. Se recomienda la comparación de un grupo de enfermos (casos) uniformes en cuanto al tipo de enfermedad y un grupo de personas sanas (controles) con similares características personales que el grupo de casos. La determinación del tamaño muestral es un asunto clave y requiere de la planificación conjunta de bioestadísticos, clínicos y bioquímicos (Solberg, 1987, 1988).

Por último estos resultados deben confirmarse en grandes estudios randomizados y multicéntricos para determinar la verdadera utilidad del marcador que permita su uso global. Las autoridades regulatorias y las empresas tecnológicas culminan este largo proceso con la comercialización del mismo.

Quizás la mejor manera de demostrar la lenta evolución del proceso de biomarcadores es por medio de un ejemplo. El antígeno

carcinoembrionario (CEA) es el marcador tumoral más ampliamente utilizado y su medición puede ser útil en el manejo de pacientes de cáncer de mama. La siguiente sección de esta tesis (Antecedentes) ilustra algunos de los trabajos que nos ayuda a comprender el papel actual de la determinación del CEA en el manejo del cáncer de mama.

Podemos distinguir **dos tipos de marcadores** dependiendo donde se determinen;

Marcadores sanguíneos; sustancias detectadas en plasma sanguíneo sin que por ello implique que exista aún un tumor macroscópico productor de proteínas tumorales. Además de para el estudio de extensión y el seguimiento, estos marcadores son útiles en la detección precoz del cáncer ya que pueden elevarse en las fases iniciales de la enfermedad. Es pues este tipo de marcadores el que nos resulta interesante explorar en nuestro trabajo. A modo de ejemplo, los más utilizados en la práctica clínica podemos encontrarlos en la siguiente tabla. Donde observamos también en qué tumores se utilizan preferentemente cada marcador, a pesar de que muchos de ellos no son específicos para un solo tumor. Podemos asumir que el uso descrito coincide con la práctica clínica habitual en nuestro entorno.

**Tabla I.9. Marcadores sanguíneos más utilizados en oncología.**

<i>MARCADOR(Sérico)</i>	<i>UTILIDAD (Tipo de Cáncer)</i>
CEA	Colorectal
Ca. 19.9	Colorectal, Ovario, Gástrico, Pancreático

Ca. 125	Ovario
Ca 15.3	Mama
PSA	Próstata
alfaFetoproteina	Germinal, Hepático
B-HCG	Germinal, Placentarios

---

*Fuente Propia*

Marcadores Histopatológicos y Genéticos; son marcadores que se determinan sobre el tejido tumoral. Son de gran utilidad en oncología ya que aportan valor pronóstico y predictivo de respuesta a un determinado tratamiento. En la época actual en la que el tratamiento oncológico es dirigido y personalizado, la determinación de estos marcadores es imprescindible para una correcta planificación terapéutica. Sin embargo carecen de valor en el diagnóstico precoz ya que se determinan en enfermos y no en grupos de riesgo de personas sanas. Los más utilizados son los reseñados en la siguiente tabla.

**Tabla I.10. Marcadores histopatológicos más utilizados en oncología.**

MARCADOR (Histológico)	UTILIDAD (Tipo de Cáncer)
Receptores Hormonales - R. Estrógeno - R. Progesterona	Mama
Her2-neu	Mama, Gástrico
Ki-67	Neuroendocrinos, Mama
EGFR, ALK	Pulmón
K-RAS / N-RAS	Colorectal
C-myc	Linfomas, leucemias
BRAF	Melanoma

---

*Fuente Propia*

En referencia a los marcadores sanguíneos que son los que interesan en nuestro trabajo, exponemos una tabla resumen (tabla

I.11) que contiene las características principales de los marcadores tumorales y sus indicaciones en oncología.

**Tabla I.11; Características principales de los Marcadores Tumorales.**

<b>Marcador</b>	<b>Características</b>	<b>Niveles Normales</b>	<b>Significación Clínica</b>
<b>CEA</b> (antígeno carcinoembrionario)	Glucoproteína oncofetal expresada en células de mucosa.	<5 ng/ml	-Cáncer colorectal, tumores digestivos, mama o pulmón. - EPOC, cirrosis, colitis, artritis, fumadores
<b>Ca. 19.9</b>	Glucoproteína siálica derivada del grupo sanguíneo LewisA	<40 U/ml	-Cáncer colorectal, ovario pancreático, biliar, gástrico. -Enfermedad inflamatoria intestinal, pancreatitis, litiasis biliar
<b>Ca. 125</b>	Es una glicoproteína de alto PM expresada por el epitelio celómico durante el desarrollo embrionario. Es un componente normal de la superficie epitelial del tracto genital femenino y del peritoneo.	<35 U/ml	-Cáncer epitelial de Ovario -Ca. endometrio, pulmón o colon -Endometriosis, peritonitis, pleuritis, enfermedad pélvica inflamatoria
<b>Ca 15.3</b>	Es una proteína epitelial polimórfica de alto PM perteneciente a la familia de las mucinas expresado en el polo apical del epitelio, ductos y alveolos de la glándula mama	<30U/ml	- Cáncer de mama precoz o generalmente avanzado -Puede elevarse también en cáncer pulmón, ovario o colon. -Enfermedad benigna. mama
<b>PSA</b> (antígeno prostático específico)	Glucoproteína sintetizada por células prostáticas	<4 ng/ml	-Cáncer Próstata -Prostatitis, biopsia próstata
<b>AlfaFetoproteína</b>	Proteína de origen fetal No aparece en adultos	<10 U/ml	- Hepatocarcinoma y tumores germinales. -Hepatitis crónica,

			Cirrosis
<b>B-HCG</b>	Es una glucoproteína sintetizada por las células sinciotrofoblásticas de la placenta.	< 5 U/ml	-Tumores Germinales y Placentarios -Embarazo
<b>Ca 27-29</b>	Glucoproteína MUC1 presente en la superficie apical de cel. Epiteliales. (similar a Ca 15.3)	<40 U/ml	-Cáncer de mama -C. colon, riñón, pulmón ovario, páncreas. - Endometriosis, enfermedad mamaria benigna
<b>NSE (Enolasa) neuroespecífica</b>	Proteína producida por el tejido neuronal.	< 13 ng/ml	-Ca. microcitico pulmonar, neuroblastomas -Melanoma
<b>S-100</b>	Proteína segregada por células de melanoma	< 0.15 ng/ml	-Melanoma
<b>Cifra 21.1</b>	Componente de la citoqueratina19	<3.3ng/ml	- Cáncer pulmón -Hepatitis, neumonías, Insuficiencia renal.
<b>Cromogranina A</b>	Producida por células secretoras de tumores carcionides	< 100 ng/ml	-Tumores Carcinoides digestivos o pulmonares -Toma de omeprazol
<b>Calcitonina</b>	Hormona producida por células C-parafoliculares tiroideas	< 11.5 pg/ml	-Ca. medular tiroides
<b>Tiroglobulina</b>	Proteína secretada por la glándula tiroidea	< 70 ng/ml	-Ca. Tiroides -Tiroiditis
<b>SCC</b>	Producido por células escamosas	< 1.5 ng/ml	- Ca Epidermoides(cérvix, pulmón, laringe y ano) -I. renal, psoriasis, neumon.

Fuente propia

Ya hemos comentado la utilidad clínica de los marcadores tumorales en oncología. Tanto a la hora de realizar el estudio de extensión, como de evaluar los resultados de un tratamiento como descartar recidivas en el seguimiento periódico. Como claros ejemplos

podríamos citar a varios marcadores con alta sensibilidad y especificidad cuyo uso clínico está aceptado y es generalizado en nuestro medio;

- Ca 125 para cáncer de ovario; detectar recaídas y respuesta al tratamiento.
- $\beta$ HCG y  $\alpha$ -fetoproteína en tumores germinales; para el diagnóstico inicial, como factor pronóstico, para evaluar la eficacia terapéutica y para el seguimiento
- CEA en el seguimiento clínico del carcinoma colorectal y para monitorizar la eficacia del tratamiento
- $\alpha$ -fetoproteína en el diagnóstico inicial del hepatocarcinoma y efectividad de su tratamiento.
- PSA en el diagnóstico precoz de grupos de riesgo para cáncer de próstata, en la evaluación del tratamiento y en el seguimiento oncológico.
- Ca 15.3 en la monitorización de la eficacia del tratamiento hormonal o citostático del cáncer de mama metastásico.

El paradigma del uso de marcadores en oncología bien podría ser el **PSA** (Antígeno prostático específico). Se trata de una glicoproteína sintetizada por células de la próstata, también llamada calicreina III, bioquímicamente es una enzima serín-proteasa de 34 kD, cuyo gen se localiza en el cromosoma 19. La función es la disolución del coágulo seminal, por lo que se encuentra en altas concentraciones en el semen, pero solo en niveles muy pequeños en

sangre periférica. En plasma suele unirse a proteínas aunque un pequeño porcentaje circula de forma libre (PSA libre).

El PSA revolucionó la detección del cáncer de próstata. Inicialmente el PSA se introdujo como un marcador tumoral para detectar la recurrencia del cáncer o progresión de la enfermedad después del tratamiento, siendo ampliamente usado desde los años 80 hasta la actualidad. Posteriormente, se planteó su uso para la detección precoz de la enfermedad generalizándose en poco tiempo y siendo adoptado por las principales sociedades científicas (Mettlin et al., 1993) (American, 1992). Teniendo en cuenta que el cáncer de próstata es el más frecuente en el hombre, el impacto a nivel mundial que ha supuesto el screening con PSA es espectacular. La prueba de PSA condujo a un dramático aumento en la incidencia de cáncer de próstata; la mayoría de estos tipos de cáncer recién diagnosticados eran en fase temprana lo que facilitó su curación mediante cirugía (prostatectomía radical) y la radioterapia.

Sin embargo, la detección del cáncer de próstata ha sido un tema controvertido porque se adoptó su uso generalizado sin conocerse su verdadera eficacia en ensayos clínicos previos. El hecho de que existan falsos positivos con el coste asociado y de la tasa de sobrediagnóstico de tumores de bajo grado que clínicamente nunca darían repercusión ha generado que se replantee su uso.

La publicación reciente de dos grandes estudios parece haber aclarado esta cuestión. El ensayo americano PLCO fue publicado en 2009, realizado en 76.693 hombres no encontraron beneficios de PSA anual y un examen rectal digital de detección después de 7 a 10 años de seguimiento (Andriole et al., 2009). Simultáneamente se publicó el Estudio Aleatorio Europeo de Screening para el cáncer de próstata

(ERSPC) donde se reportó un pequeño beneficio en la supervivencia absoluta con la prueba de PSA después de nueve años de seguimiento, sin embargo se reportaban considerables daños potenciales de los tratamientos agresivos, como la disfunción eréctil, incontinencia urinaria y problemas intestinales (Schröder et al., 2009). Las principales guías oncológicas incorporaron la recomendación de no realizar screening rutinario con PSA para el cáncer de próstata. Aunque en pacientes seleccionados (grupos de riesgo, con sintomatología, con expectativa de vida superior a 10 años, etc.) podría seguir realizándose a partir de los 50 años, siempre que se le explique las ventajas e inconvenientes de dicho seguimiento (Brett y Ablin, 2011; Basch et al., 2012).

### **1.5.2 Utilidad de los Marcadores Tumorales en el diagnóstico precoz del cáncer**

La búsqueda de la validación de un determinado marcador que pudiera servir para el diagnóstico precoz de un determinado tumor, especialmente si este tumor es frecuente, supone un reto mayúsculo en oncología. La repercusión clínica del diagnóstico precoz y la prevención secundaria en general tienen mayor impacto que cualquier avance terapéutico, como ya comentamos aplicado a cáncer de mama en el apartado anterior.

Sin embargo, la medición del nivel de los marcadores tumorales puede ser útil, cuando se utiliza junto con radiografías y otras pruebas diagnósticas, para la detección y el diagnóstico de algunos tipos de cáncer. Ya que en principio, la medición de los

niveles de los marcadores tumorales por sí sola no es suficiente para diagnosticar un cáncer por las siguientes razones:

- ✓ El nivel de un marcador tumoral puede elevarse en personas con condiciones benignas (falsos positivos; poca especificidad).
- ✓ El nivel de un marcador tumoral no se eleva en todas las personas con cáncer, especialmente en las etapas tempranas de la enfermedad (falsos negativos; poca sensibilidad).
- ✓ Muchos marcadores tumorales no son específicos a un tipo particular de cáncer; el nivel de un marcador tumoral puede aumentar como consecuencia de más de un tipo de cáncer.
- ✓ La variabilidad de los niveles de determinados marcadores analizados para un mismo paciente, producido por numerosos motivos fisiológicos.

Las características que debe reunir una determinada prueba de screening para ser útil dependen de varios factores que pueden agruparse en los criterios Wilson (Wilson y Jugner, 1969) Tabla I.12. Estos criterios siguen siendo válidos hasta hoy, aunque recientemente se tiende más a realizar una valoración global entre ventajas en salud pública y los perjuicios de cualquier programa nuevo (Harris et al., 2011).

**Tabla I.12. Características básicas exigibles a los criterios de screening.**

<i>Características de los estudios de screening</i>	
En relación a la enfermedad	Fase presintomática identificable Tratamiento eficaz Problema de salud público
En relación a la población	Definida y accesible  Eficacia probada en ensayos

---

En relación al programa	aleatorios Planificación previa Acceso a la población garantizado Garantizar diagnóstico y tratamiento
En relación a la prueba	Eficacia Sensibilidad Especificidad Valor predictivo Reproducible, sencilla, segura y barata Aceptada por la población y sanitarios

---

Fuente; Wilson 1969

Los cánceres de mama, cérvix, colon y próstata reúnen estos criterios y son enfermedades donde la detección precoz está asegurada. También podemos comprobar cómo son de exigentes los requisitos en relación a la prueba diagnóstica.

En el caso del cáncer de mama, se adapta a la aplicación de una prueba de cribado. Si la prueba fuera una simple determinación plasmática, sería una prueba sencilla, segura, reproducible, barata según se generalizada su uso, aceptada por la población y personal sanitario. Únicamente debería demostrar su utilidad o eficacia y mantener unos límites aceptables de sensibilidad-especificidad. Este hecho es lo que anima a investigadores como nosotros a ahondar en la búsqueda de un marcador sanguíneo que pueda utilizarse en el diagnóstico precoz de un problema sanitario de primer orden como es el cáncer de mama.

### 1.5.3 Marcadores Tumorales en Cáncer de Mama

En cáncer de mama, se han utilizado diferentes marcadores tumorales. Los más utilizados son los marcadores histopatológicos que se determinan sobre el tejido tumoral y tienen un claro valor pronóstico y predictivo de respuesta a tratamiento. Los más utilizados son los receptores hormonales (receptores de estrógeno y de progesterona) y el Her2. También se han utilizado otros marcadores biomoleculares como son UPA (uroquinasa activadora de plasminógeno) y su inhibidor PAI, ciclina E, catepsina D, p53, ki 67, CTC (células tumorales circulantes) etc. Ninguno de estos marcadores se han estudiado en el contexto del diagnóstico precoz del cáncer de mama por lo que no serán objeto de nuestro estudio.

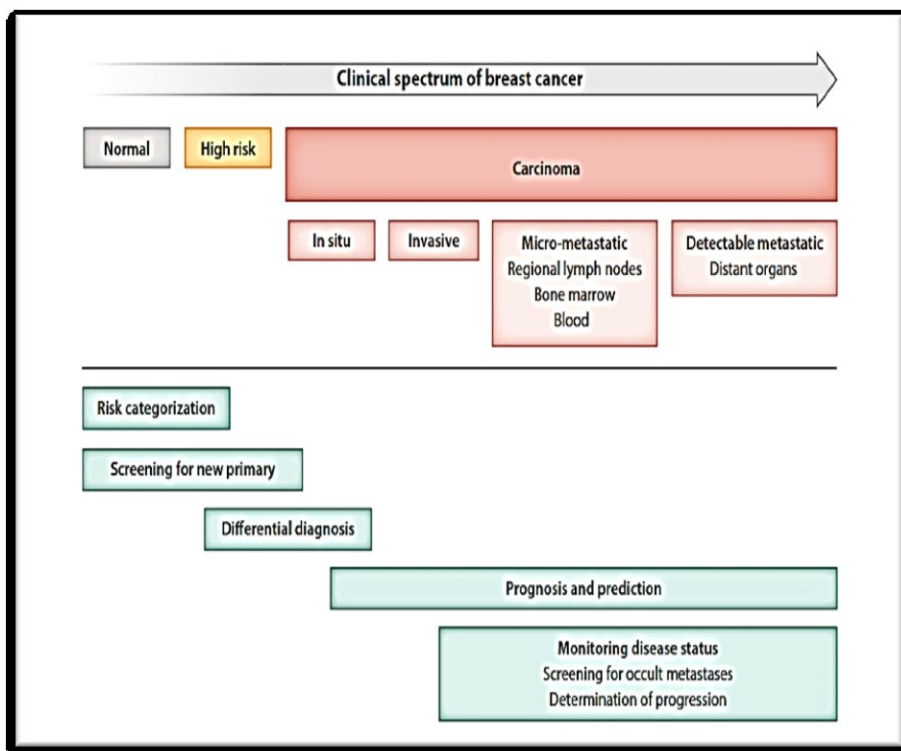
Como ya dijimos, los marcadores sanguíneos son sustancias proteicas segregadas por el tumor y detectables en el suero de los pacientes. En oncología en general y en cáncer de mama en particular tienen un uso en la fase postcirugía como complementación del estudio de extensión, en el seguimiento del tumor y sobre todo en la valoración de la respuesta al tratamiento.

La potencialidad de uso de marcadores en cualquiera de las fases de la enfermedad es amplia y se adapta a las características y necesidades de cada fase. Podemos comprobarlo en el siguiente esquema (figura I.24).

En cáncer de mama los marcadores más usados son el CEA y el Ca 15.3. En USA también se le añade el Ca 27-29. Sin embargo tras multitud de estudios no se ha podido determinar la verdadera utilidad de estos marcadores ni como estudio de extensión, ni tampoco en el seguimiento periódico. Su utilidad clínica se reserva para evaluar la

respuesta al tratamiento oncológico. En 2012 la actualización de las guías ASCO de seguimiento en cáncer de mama desaconsejan el uso generalizado para el seguimiento de pacientes asintomáticos (Khatcheressian et al., 2012) (Figura I.25).

Por tanto actualmente debería restringirse el uso de marcadores tumorales en cáncer de mama a la valoración de la respuesta al tratamiento de las pacientes con enfermedad activa. En las recomendaciones sobre el uso de marcadores en cáncer de mama publicadas en 2007 se estableció el uso de CA 15.3 y/o CA 27.29 como monitorización del tratamiento en pacientes metastásicas (Harris et al., 2007).



**Figura I.24. Espectro clínico del cáncer de mama y la potencialidad de uso de los marcadores tumorales.**

Fuente; Breast Oncology Program of the Comprehensive Cancer Center, and the Department of Internal Medicine, University of Michigan Health and Hospital System, Ann Arbor, Michigan, 2014.

Tabla I.13. Cuadro resumen sobre las guías de seguimiento del cáncer de mama; Guidelines ASCO 2012

THE BOTTOM LINE
<p><b>ASCO GUIDELINE UPDATE</b></p> <p><b>Breast Cancer Follow-Up and Management After Primary Treatment: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update</b></p> <p><b><i>Intervention</i></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Modes of surveillance for patients with breast cancer who have completed primary therapy with curative intent</li> </ul> <p><b><i>Target Audience</i></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Medical oncologists, primary care providers, oncology nurses, surgical oncologists, pathologists, and nuclear medicine specialists</li> </ul> <p><b><i>Key Recommendations</i></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Regular history, physical examination, and mammography are recommended</li> <li>● Examinations should be performed every 3 to 6 months for the first 3 years, every 6 to 12 months for years 4 and 5, and annually thereafter</li> <li>● For women who have undergone breast-conserving surgery, a post-treatment mammogram should be obtained 1 year after the initial mammogram and at least 6 months after completion of radiation therapy; thereafter, unless otherwise indicated, a yearly mammographic evaluation should be performed</li> <li>● Use of CBCs, chemistry panels, bone scans, chest radiographs, liver ultrasounds, computed tomography scans, [<sup>18</sup>F]fluorodeoxyglucose–positron emission tomography scanning, magnetic resonance imaging, or tumor markers (carcinoembryonic antigen, CA 15-3, and CA 27.29) is not recommended for routine breast cancer follow-up in an otherwise asymptomatic patient with no specific findings on clinical examination</li> </ul> <p><b><i>Methods</i></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● A comprehensive systematic review of the literature was conducted, and an Update Committee was convened to review the evidence and develop guideline recommendations</li> </ul> <p><b>A Data Supplement (including evidence tables) and clinical tools and resources can be found at <a href="http://www.asco.org/guidelines/breastfollowup">http://www.asco.org/guidelines/breastfollowup</a></b></p>

*Fuente; Khatcheressian 2012*

### 1.5.4 Importancia del Biomarcador en el diagnóstico precoz del Cáncer de Mama.

Las técnicas actuales disponibles para la detección precoz del cáncer de mama son la mamografía, la autoexploración mamaria y la exploración física periódica en mujeres de riesgo. La aplicación de estas políticas ha permitido detectar una mayoría de los cánceres de mama tempranos y por tanto un descenso en la mortalidad por cáncer de mama estimado entre el 20-40% (Berry et al., 2005; Kalager et al., 2010; Weedon et al., 2014).

Sin embargo tienen grandes limitaciones, puestas de manifiesto en la publicación de un controvertido estudio canadiense (Miller et al., 2014);

- No cubre franjas de edad donde está aumentando la incidencia como son las mujeres menores de 40 años.
- Implican una alta tasa de falsos positivos, biopsias diagnósticas y sobrediagnóstico de lesiones de bajo grado.
- Su utilidad es alta para población general pero son insuficientes para algunos subgrupos de mujeres; no se adaptan específicamente al grupo de mujeres de alto riesgo, ya que éstas precisan controles más frecuentes y técnicas adicionales de diagnóstico precoz.
- Poca utilidad en mujeres jóvenes cuyos tumores son a menudo más agresivos.

Se requieren por tanto enfoques diagnósticos alternativos que aunque no sean perfectos, conserven una utilidad que asociada al resto de métodos consigan aumentar la especificidad y sensibilidad de los

mismos. De esta forma en la última década se han invertido muchos esfuerzos investigando en la búsqueda del “Biomarcador perfecto”. Este marcador debería cumplir las condiciones de sensibilidad, especificidad, valor predictivo, coste bajo, no invasivos y sobre todo ser reproducible y contrastado en meticulosos estudios clínicos. La heterogeneidad del cáncer de mama ha complicado mucho esta tarea pero el avance imparable de la biotecnología está facilitando el estudio de múltiples biomarcadores de varias clases moleculares incluyendo; proteínas, metabolitos, mRNA, microRNA, ADN, péptidos pequeños y otras sustancias. Especialmente son útiles las técnicas de determinación genética como la hibridación fluorescente insitu (FISH) ya que abren un campo nuevo al atribuir a las alteraciones cromosómicas un posible uso como marcador de la transformación invasiva (Das y Tan, 2013).

La posibilidad de que existan mejores resultados combinando diferentes perfiles de sustancias obtenidas por similares o distintos métodos aumenta también la probabilidad de éxito, por lo que es una nueva estrategia en esta área de investigación (Pepe y Thompson, 2000).

En los últimos años diferentes sustancias se han estudiado para este fin; proteínas (Callesen et al., 2008a, 2008b), lípidos (Franky et al., 2008), glicoproteínas-carbohidratos (Kirmiz et al., 2007; Cho et al. 2008), anticuerpos (Chapman et al., 2007) y otros metabolitos (Claudino et al., 2007). Sin embargo no se ha logrado definir un perfil de biomarcador o combinación de ellos con la suficiente sensibilidad para recomendar su uso generalizado en la detección precoz del cáncer de mama.

En el capítulo siguiente que engloba los Antecedentes, analizaremos los marcadores objeto de nuestro trabajo y los estudios más recientes y completos acerca de los mismos. Este análisis nos permitirá comprender mejor su utilidad y el motivo de su selección para este estudio.

## CAPÍTULO II: ANTECEDENTES

---

## 2. Antecedentes

### 2.1 Revisión actualizada sobre el uso de Biomarcadores en el diagnóstico precoz del Cáncer de Mama.

#### 2.1.1 Prolegómenos

Hemos descrito ya la importancia que supondría la identificación de marcadores capaces de detectar la enfermedad en fases precoces. Pues bien, actualmente los grandes consensos no han determinado la dimensión de esta utilidad.

Es cierto que numerosos investigadores se han dedicado a la búsqueda de esa “piedra filosofal” pero los resultados no han sido concluyentes. En el capítulo anterior se describió como en las recomendaciones sobre el uso de marcadores en cáncer de mama publicadas en 2007 se estableció el uso de CA 15.3 y/o CA 27.29 como monitorización del tratamiento en pacientes metastásicas (Harris et al., 2007). Se descartó así otros usos como en el diagnóstico precoz o el estudio de extensión inicial. El Grupo Europeo de Marcadores Tumorales (EGTM) con sede en Praga, publica unas guías disponibles en su web ([http://www.egtm.eu/professionals/breast\\_cancer#\\_edn1](http://www.egtm.eu/professionals/breast_cancer#_edn1)) en las que analiza la utilidad de los marcadores en cáncer de mama, y concluyen que dado que la sensibilidad de los mismos en enfermedad precoz es baja (15-35%) no se recomienda su uso para diagnóstico precoz, ya que podrían ser negativos en pacientes cribados que tuvieran realmente la enfermedad (Molina et al., 2014). La Academia Nacional de Bioquímica Clínica americana (NACB) estableció en 2009 un consenso sobre el uso de marcadores en determinados tumores (Catharine y Eleftherios, 2009;

Sturgeon et al., 2008) estableciendo para cáncer de mama que el CA 15.3, CA 27.29 o CEA no son lo suficientemente sensibles como para ser utilizados en *screening*. Incluso extensas revisiones actualizadas siguen sin definir el papel de los marcadores en el diagnóstico precoz del cáncer de mama (Paoletti y Hayes, 2014; Duffy, 2013).

Parece pues que a priori la literatura no recomienda el uso de marcadores en el diagnóstico precoz del cáncer de mama. Sin embargo hay que realizar dos consideraciones en este aspecto;

1ª.- Los consensos aludidos aunque recientes, se basaban en trabajos publicados en la década de los 90 o de primeros de siglo XXI. Algunos de los trabajos más relevantes lo encontramos en una bibliografía que hemos seleccionado sobre el valor como diagnóstico precoz de Ca 15.3, Ca 27.29 y CEA; (Molina et al., 1998, 2003; Gion et al., 2002; Ebeling et al., 2002; Dnistrian et al., 1995; Duffy et al., 2004 y 2006; Chan et al. 1997).

Sin embargo numerosos investigadores están realizando estudios actuales con los marcadores habituales, con nuevos marcadores o con la combinación de ellos, obteniendo resultados iniciales prometedores (Park et al, 2012; Moazzezy et al, 2014). A pesar de que hasta ahora no existen grandes estudios de revisión sistemática ni ensayos controlados con evidencia firme, comienzan a surgir trabajos que están determinando un papel relevante para distintos marcadores como veremos más adelante.

2ª.- La segunda consideración al argumento de la falta de utilidad de los marcadores en el diagnóstico precoz es que precisamente el enfoque de esta utilidad no tiene porqué ser necesariamente para el diagnóstico precoz como único método válido, sino complementario a otros métodos de diagnóstico precoz. Ni siquiera exclusivamente en fases iniciales; ya que podría ocurrir que la eficacia en detección precoz preclínica en mujeres

asintomáticas fuera pobre pero se elevase en mujeres en fase clínica de la enfermedad. De esta forma servirían de apoyo al diagnóstico diferencial cuando el contexto clínico o radiológico no estuviera claro. Más del 80 % de las biopsias de lesiones dudosas en mamografías (casi todas con diagnóstico radiológico BIRADS III) tienen resultado de benignidad. Este sobrediagnóstico genera unos costes al sistema sanitario y angustias en la paciente innecesarios. Si con un tercer método asociado a la exploración clínica y radiológica pudiéramos discriminar los casos de riesgo donde estuviera indicada la biopsia se optimizarían los recursos y mejorarían los resultados. Es por tanto que la utilidad de los biomarcadores en diagnóstico precoz va más allá de un único método válido como *screening*, sino que bastaría con servir de medio complementario y de apoyo a la radiología en los programas de detección precoz. Incluso sería válida su utilidad como método complementario en pacientes no pertenecientes al screening con diagnóstico radiológico de probable cáncer de mama.

### 2.1.2 Revisión actualizada de estudios sobre el uso de marcadores tumorales como diagnóstico precoz en cáncer de mama.

Varios investigadores han analizado distintos marcadores tumorales (generalmente Ca15.3 y CEA) en pacientes con cáncer de mama aún no tratadas. Con frecuencia son estudios casos-control y sus diseños se acercan mucho al desarrollo de nuestro trabajo siendo éste más ambicioso y completo si cabe. Pero a pesar de tratarse de los dos marcadores cuyo uso está más extendido en cáncer de mama, no existe bibliografía suficiente que avale su uso en las fases precoces; su principal problema es la baja sensibilidad. Molina analizó los niveles de CEA y Ca 15.3 en

muestras de 2062 pacientes con enfermedad localizada, obteniendo un resultado positivo en tan solo 12.7% y 19.6 % respectivamente. Existía clara correlación entre la elevación de los marcadores y el tamaño tumoral o el TNM; de tal forma que las mujeres con tumores mayores tenían mayores elevaciones (Ca 15.3; T1: 10,7 %; T2: 20,6 %; T3: 32,7 %; T4: 44,7%) concluyendo que su función podría estar relacionada más con la carga tumoral (factor pronóstico) que con la detección temprana (Molina et al., 2010).

Thriveni publicó en 2007 un trabajo realizado con 207 casos de mujeres con cáncer de mama en fase pretratada y 75 controles sanas, a las que se determinaba los niveles de Ca 15.3 y CEA; el aumento de Ca 15.3 fue significativo en tumores que al diagnóstico estaban en fases avanzadas (estadios III / IV y en Tumores grandes como T3), sin embargo el CEA no se elevó con significación frente a los controles. Podría deducirse un cierto valor pronóstico de Ca 15.3 coherente con el uso clínico reconocido como es la monitorización de la enfermedad avanzada en tratamiento (Thriveni et al., 2007). Un grupo iraní ha publicado recientemente un trabajo con 60 muestras (30 casos y 30 controles) donde determinan preoperatoriamente los niveles de Ca 15.3 y CEA encontrándose una clara significación estadística en la elevación de ambos marcadores en el grupo casos frente a los controles. El CEA se correlaciona con el grado tumoral pero no con el otro marcador. A pesar de lo limitado del estudio y de la muestra pequeña los resultados invitan a realizar nuevos estudios en este campo (Moazzezy et al., 2014). Otro estudio en la misma línea analiza el valor diagnóstico de Ca 15.3 en 30 mujeres con cáncer de mama y 20 controles encontrando significación con altos niveles de sensibilidad y especificidad (93% y 96% respectivamente) (Ali et al., 2013).

Otros estudios han relacionado la elevación preoperatoria de los marcadores Ca 15.3 y/o CEA como predictores de pronóstico más desfavorable (Shao et al., 2015; Lee et al., 2013). También se han ensayado otros marcadores menos usuales o sus combinaciones con los estándares. Zhang analizó CEA, Ca 15.3, Ca 125 y VEGF (vascular endothelial growth factor) en 65 pacientes intervenidas de cáncer de mama y 50 controles, obteniendo niveles plasmáticos significativamente mayores en el grupo observación frente al control, y fue más evidente conforme aumentaba el estadio y grado de la enfermedad (Zhang et al., 2013). Se repiten nuevamente los resultados que relacionan una mayor carga tumoral inicial (tumores mayores, afectación ganglionar, estadios más avanzados al diagnóstico, etc) con un mejor poder discriminatorio para un determinado marcador; siendo más significativo frente al grupo control en este tipo de pacientes. Esta hipótesis se demuestra para la mayoría de marcadores incluyendo Ca 27.29 (Rack et al., 2010). Otro estudio analizó la determinación de distintos marcadores séricos y su valor pronóstico en cáncer de mama; Her2/neu (expresión plasmática), BCL2, CA15-3 y CEA en un grupo de 89 pacientes con Estadios I y II de cáncer de mama antes y después de operarse. Se compararon con un grupo control de 40 mujeres sanas. Todos los marcadores se elevaron significativamente frente al grupo control y además se asociaron a recaída de la enfermedad (Samy et al., 2010).

Queda pues claramente definido el **valor pronóstico** de estos marcadores independientemente de su valor discriminatorio en situaciones muy precoces de la enfermedad. Este hecho viene avalado por una reciente publicación china en una de las revistas de mayor prestigio en la materia. Se trata de un estudio sobre la detección de Ca 15.3 y CEA en 470 pacientes con cáncer de mama. Se observa que la elevación de ambos marcadores son predictores independientes de la supervivencia libre de

enfermedad (SLE) y de la supervivencia global (SG). Así por ejemplo al SG a 5 años en el grupo de CEA normal vs. CEA elevado fue de 89% vs 78%, y respecto al Ca 15.3 fueron 91% vs 74%. (Wu et al., 2014). Otro estudio realizado con 368 pacientes correlacionó los niveles preoperatorios de CEA, Ca 125 y Ca 15.3 con los diferentes subtipos genéticos de cáncer de mama; los niveles preoperatorios elevados de Ca 15.3 se asociaron con peor pronóstico en los subtipos Luminlaes A, y los niveles elevados de CEA se asoció a peor pronóstico en los subtipos no luminales (Li et al., 2014). Otros estudios se han dirigido al análisis de Ca 125 como marcador independiente de cáncer de mama elevado en situaciones de enfermedad avanzada (Norum et al., 2011).

Sin embargo existen otros marcadores que también se han estudiado en el cáncer de mama pero cuyos resultados han sido negativos o poco concluyentes; es el caso de Cifra 21.1 (Giovanella et al., 2002), NSE (Franjević et al., 2012),  $\alpha$ -fetoproteína (Sturgeon et al., 2009) y Ca 19.9 (Urban y Catane, 2009).

Otra estrategia interesante es la que realizan varios grupos que han diseñado complejos paneles que se componen de muchas sustancias básicamente proteicas para analizarlas conjuntamente en una muestra de sangre. Podemos destacar el trabajo de un grupo americano (Zhang et al., 2013) que estudia la aplicación de cinco paneles de marcadores a 130 mujeres (67 casos y 63 controles) obteniendo niveles altos de sensibilidad (85%, 63%). Otro grupo francés realiza un estudio dirigido a mujeres jóvenes, diseñando un panel de 13 marcadores conocidos que determinan en 396 muestras (CDIS= 87+ C Infiltrante T1N0= 153 + Controles= 156) para una sensibilidad del 90% se obtuvo una especificidad del 42%. Los autores concluyen que su panel aporta datos precisos de diagnóstico de

cáncer de mama precoz en mujeres jóvenes cuya utilidad es máxima en mamografías que no sean concluyentes (Lacombe et al., 2014).

Por otro lado, un aspecto cada vez más interesante es la detección de microfragmentos de ADN circulante procedentes del tumor, la técnica de los paneles genéticos determinados por microarrays nos permite en tiempo real detectar microRNAs en plasma de pacientes. En un estudio detallado donde se analizaron una gran cantidad de microRNAs (1145 detectados en total) se encontraron diferencias significativas entre 20 casos de cáncer de mama y 20 controles con alta sensibilidad y especificidad. Probablemente este sea el instrumento más específico disponible de cara al futuro, ya que desde los primeros inicios de la carcinogénesis pueden comenzar a detectarse microRNA tumoral en la sangre periférica de la paciente asintomática (Zhao et al., 2010).

Recientemente, la mayoría de esfuerzos se están dedicando al valor clínico que aporta la determinación de las células tumorales circulantes (CTC). Su medición en la sangre periférica de pacientes con cáncer de mama ha demostrado ser un factor pronóstico en la enfermedad metastásica y un factor predictivo de recaída. El análisis de las alteraciones genéticas de estas células puede permitir seleccionar el tratamiento dirigido más adecuado, constituyéndose en marcadores predictivos de respuesta a una determinada terapia. Queda por definir la verdadera utilidad en el cáncer de mama precoz y en el *screening* de la enfermedad para lo que se han diseñado numerosos estudios que están en marcha (Pukazhendhi y Gluck, 2014).

La aplicación informática y algoritmo matemático permiten obtener resultados muy satisfactorios. Así, los rápidos avances técnicos e instrumentales en las determinaciones analíticas del laboratorio nos permiten hoy en día la caracterización de numerosas sustancias proteicas

susceptibles de convertirse en un marcador tumoral dentro de la corriente que se ha dado en llamar “*la era de la proteómica*” (Gast et al., 2009).

Resulta pues que el estudio de los marcadores o sus combinaciones en cáncer de mama es un campo en continua evolución y desarrollo aunque debemos admitir que aún falta definir la verdadera aplicabilidad clínica, sobre todo en enfermedad precoz, tal como demuestra la cantidad de revisiones publicadas en este sentido (Donepudi et al., 2014; Duffy, 2013).

## **2.2 Estudio de los Marcadores tumorales de mama; contexto actual en la práctica clínica oncológica diaria.**

Ya hemos comentado que los consensos internacionales no recomiendan el uso de marcadores tumorales en la fase diagnóstica del cáncer de mama. Tanto las guías ASCO sobre marcadores en cáncer de mama (Harris et al., 2007), las guías ASCO sobre seguimiento del cáncer de mama (Khatcheressian et al., 2012) y el consenso europeo de ESMO desaconsejan su uso como herramienta de diagnóstico (Senkus et al, 2013).

Los Servicios de Oncología de nuestro país cuentan también con un consenso propio editado a cargo de la SEOM (SEOM, 2013) donde se recoge la recomendación de no utilizarlos en la fase diagnóstica ni de seguimiento. De hecho el protocolo de nuestro Servicio se ha realizado en base a todas estas recomendaciones reservando el uso de marcadores en cáncer de mama (CEA y Ca 15.3) sólo para el diagnóstico inicial a modo de estudio de extensión cuando, por las características tumorales sospechemos amplia extensión de la enfermedad. El otro uso que realizamos es el universalmente aceptado en las guías, en concreto el Ca

15.3 para monitorizar la respuesta y evolución a un tratamiento de la enfermedad avanzada. No obstante, en muchos Servicios de oncología se realiza un uso *indebido e ineficiente* de estos dos marcadores; es habitual solicitarlos sistemáticamente para el diagnóstico y después periódicamente de forma rutinaria los años que dure el seguimiento de una paciente sana. Por supuesto también en cualquier situación de la enfermedad metastásica.

Es también cuestionable el uso indiscriminado que realizan los servicios afines que colaboran en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de mama. Nos referimos a Medicina Primaria, Medicina Interna, Ginecología y Cirugía de Mama entre otros. Solicitan con frecuencia una batería de marcadores tumorales generales en mujeres con sospecha clínica y radiológica de cáncer de mama de forma totalmente indiscriminada (CEA, Ca 125, Cyfra 21.1,  $\alpha$ fetoproteína, Ca 19.9, NSE, etc). Afortunadamente esta práctica está en desuso por los especialistas quirúrgicos ya que su pertenencia a las Unidades de Mama hospitalarias que son multidisciplinarias nos ha permitido ir corrigiendo estas prácticas.

Por tanto, a pesar de que las directrices son claras, sigue habiendo un uso indebido, inespecífico e indiscriminado de marcadores tumorales en el cáncer de mama, especialmente en las fases diagnósticas. No obstante si las investigaciones recientes que antes aludimos siguen dando fruto, es posible que las directrices cambien y se recomienden nuevos usos pero de momento, hay que esperar y no es aceptable esta práctica tan generalizada. Huelga decir que el contexto actual economicista que impera, donde la eficiencia es el objetivo primario, obliga al profesional a evitar onerosas determinaciones analíticas que no estén plenamente justificadas desde el punto de vista clínico-científico.

### 2.3 Análisis de los Marcadores propuestos en nuestro trabajo

Para la **selección de Marcadores** a estudio tuvimos en cuenta varios factores;

- 1.- Marcadores que desde el punto de vista clínico y científico estuvieran avalados por un buen número de trabajos en relación al cáncer de mama. En este grupo estarían CEA y Ca 15.3.
- 2.- Marcadores que aunque no tengan clara relación con el cáncer de mama se usen en la práctica clínica de forma sistemática en el diagnóstico de la enfermedad; Ca 125, Cyfra 21.1,  $\alpha$ fetoproteína , Ca 19.9 y NSE.
- 3.- Marcadores experimentales que aunque su uso clínico aún no esté extendido existen ya evidencias que aportan cierto valor en relación al cáncer de mama. En este grupo incluimos; NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin), EGFR (Factor de Crecimiento Epidérmico) y 8-OH-dG (8-hidroxi-2'-deoxiguanosina).
- 4.- Independientemente del grupo al que pertenecieran se exigía que existieran Kits comerciales homologados y validados de los mismos, para poder realizar el trabajo con total seguridad y reproducibilidad.

En la siguiente tabla (tabla II.1) podemos observar los diferentes marcadores seleccionados para nuestro estudio. Están agrupados por categorías; marcadores habituales de cáncer de mama, otros marcadores de uso en oncología y por último el grupo de los marcadores experimentales.

Tabla II.1; Cuadro resumen sobre los marcadores objeto del estudio.

<b>GRUPO DE MARCADORES</b>	<b>MARCADORES TUMORALES</b>
Marcadores específicos y de uso habitual en cáncer de mama	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>Ca 15.3</b></li> <li><b>CEA</b></li> </ul>
Marcadores no específicos para cáncer de mama, pero de uso frecuente en esta patología.	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>Ca.125</b></li> <li><b>Cyfra 21.1</b></li> <li><b>αfetoproteína</b></li> <li><b>Ca 19.9</b></li> <li><b>NSE</b></li> </ul>
Marcadores experimentales con referencia bibliográfica en cáncer de mama	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>NGAL</b></li> <li><b>EGFR</b></li> <li><b>8-OH-dG</b></li> </ul>

Como previamente hemos descrito algunos de los marcadores incluidos en el estudio, considerados como marcadores rutinarios habituales, a continuación vamos a profundizar en los tres marcadores experimentales por ser menos conocidos y existir mucha menos bibliografía que los relacione con el cáncer de mama.

1.- NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin); también conocida como Lipocalin-2 (LCN2).

Las lipocalinas constituyen una familia de proteínas de bajo peso molecular capaces de unirse a moléculas hidrófobas tras ser secretadas. Su función principal es el transporte de sustancias lipofílicas aunque también participan en la inmunomodulación y la síntesis de prostaglandinas. Se

expresan en neutrófilos y en bajos niveles en el riñón, la próstata, los epitelios de las vías respiratorias y del aparato digestivo. La Lipocalina 2 o asociada a la gelatinasa neutrofílica (NGAL) es un miembro importante de la familia de las lipocalinas y fue identificado originalmente como una glicoproteína existente en el complejo matriz-metaloproteinasa-9 (MMP-9) en los neutrófilos humanos. NGAL es una proteína de fase aguda (secretadas en respuesta a citoquinas presentes en los focos inflamatorios) y su producción está inducida bajo diversas condiciones como son la insuficiencia renal y la sepsis bacteriana (Martensson et al., 2013). Se considera un marcador precoz de la lesión renal aguda provocada por diversas patologías. También se ha relacionado su secreción con distintos cánceres humanos; como son el cáncer de mama, gástrico, ovárico, pulmonar, esofágico y colorectal.

Respecto al cáncer de mama existen varios trabajos que relacionan la expresión de NGAL con factores desfavorables del cáncer de mama. Bauer en 2008 publicó un trabajo donde se analizó la existencia de NGAL en 207 tumores de mama, detectándose por inmunohistoquímica en 68 casos; la expresión de este marcador se ha correlacionado intensamente con factores adversos para cáncer de mama, como son la existencia de receptores estrogénicos negativos, el alto grado nuclear, la existencia de afectación ganglionar, la sobreexpresión de Her-2 o la alta proliferación Ki-67, además implicaba como factor independiente una menor supervivencia libre de enfermedad (Bauer et al., 2008). Un estudio griego analizó la determinación sanguínea de NGAL y MMP-9 en 113 pacientes con cáncer de mama precoz no palpable y en 30 controles sanos. Se describió un incremento significativo de ambos tumores en el grupo de cáncer de mama frente al grupo control. Así se establecían las bases para un posible uso de estos dos marcadores en la fase precoz de la enfermedad (Provatopoulou et al., 2009). Estudios del grupo alemán en neoadyuvancia

de mama (GeparTrio trial) también demostraron que la expresión de NGAL se correlacionó con una menor supervivencia, aunque también era un factor de obtención de respuesta completa patológica tras quimioterapia neoadyuvante (Wenners et al., 2012). Otro estudio ha resaltado el valor de mal pronóstico que conlleva los altos niveles de MMMP-9 y Her2 (Rashad et al., 2014)

## 2.- EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) o ErbB-1 o HER-1;

Es un receptor celular de la superficie de la célula. El factor de crecimiento epidérmico es un miembro de la familia de receptores ErbB, una subfamilia relacionada con los receptores tirosina quinasa: EGFR (ErbB-1), HER2 (ErbB-2), Her3 (ErbB-3) y Her4 (ErbB-4). Las mutaciones que afectan a la expresión o actividad del EGFR se relacionan con numerosos tipos de cáncer; principalmente de mama, pulmón y glioblastoma (Yewale et al., 2013). El receptor se activa con la unión de sus ligandos como son el factor de crecimiento epidérmico, lo que desencadena una cascada proliferativa en el citoplasma y núcleo celular.

Distintos trabajos han descrito cómo los niveles de EGFR en las poblaciones control son más elevados que en las pacientes con cáncer de mama primario (Asgeirsson et al., 2007). Los decrementos en los niveles plasmático de EGFR también se han correlacionado con menor supervivencia en cáncer de mama metastásico (Souder et al., 2006). Sin embargo, otros trabajos parecidos no encontraron relación entre los niveles de EGFR y el cáncer de mama o si la había era para niveles elevados. Muy recientemente se ha descrito el posible papel que desempeñarían los niveles séricos de EGFR en pacientes con cáncer de mama; en dicho estudio se incluyeron 96 pacientes (37 eran cáncer de mama metastásico) y 30 controles sanas. Los niveles resultaron ser más elevados en las

pacientes con cáncer de mama que en los controles y sobre todo en pacientes con receptores estrogénicos negativos y subtipos triple negativo (Tas et al., 2015). No obstante no se conoce aún la validez de ésta determinación en el diagnóstico precoz del cáncer de mama.

Podemos establecer que la elevación o disminución de este marcador en pacientes con cáncer de mama no alcanza aún una evidencia clara que justifique su aplicación clínica.

### 3.-8-OH-dG (8-hidrodeoxiguanosina);

Se trata de un derivado de la guanosina que se forma cuando existe un daño precoz en el DNA por la existencia de radicales libres producidos en el proceso de oxidación intracelular. Se han detectado elevados niveles en numerosos cánceres (pulmón, colon, mama, esófago) y se postula como un marcador precoz del proceso inicial de carcinogénesis (Valavanidis et al., 2009). Existen otros metabolitos considerados también como marcadores del estrés oxidativo, y no solo del DNA como el que nos ocupa, sino también de los lípidos (isoprostanos, malondialdehído) o proteínas (proteína carbonilada) sin embargo es el 8-OH-dG el que guarda más estrecha relación con los procesos de transformación celular. Como ventaja añadida cuenta el ser además detectable desde las fases precoces de la enfermedad (Panis et al., 2012). Los mecanismos inflamatorios que se inician también con la carcinogénesis permiten que la determinación de sus mediadores se correlacionen con los marcadores oxidativos existiendo trabajos que analizan los metabolitos oxidativos, conjuntamente con los mediadores inflamatorios como son la ferritina o la IL-6 o IL-8 (Goswamia et al., 2010; Yeon et al., 2011)

No obstante pocos trabajos han relacionado el cáncer de mama con el daño celular pro estrés oxidativo. Un estudio indio reclutó 40

mujeres con cáncer de mama y 40 mujeres sanas. Se determinaron distintos agentes implicados en el daño celular oxidativo; 8-OH-dG, la proteína carbonil (PC), malondialdeido (MDA) y el estatus antioxidante total (TAS). Este trabajo demostró que los niveles de los 3 marcadores fueron superiores en las pacientes y que el “estatus antioxidante” fue inferior en este grupo frente a los controles; siendo el marcador más significativo el 8-OH-dG (Pande et al., 2012).

La experiencia biomédica con 8-OH-dG es muy amplia y su valor como marcador precoz del estrés oxidativo en relación a la carcinogénesis está claramente definido. Por tanto nos parece un marcador muy interesante para analizar en nuestro trabajo, máxime cuando su relación con el cáncer de mama aún está poco estudiada.

## **2.4 Justificación del Trabajo**

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en el sexo femenino y supone la principal causa de muerte por cáncer en las mujeres. La incidencia anual es creciente y actualmente en nuestro país supone un total de aproximadamente 26.000 casos al año (los datos epidemiológicos han sido descritos en el capítulo anterior).

En consecuencia es la patología más prevalente en los servicios de oncología tanto a nivel de tratamiento oncológico como de seguimiento de pacientes una vez superada la enfermedad. También supone en nuestra sociedad el mayor grupo de pacientes dados de alta y por tanto supervivientes de la enfermedad. La complejidad terapéutica, psicológica, social y familiar que conlleva la enfermedad, hace que el impacto socio-sanitario sea de primer orden.

No hay otra patología oncológica donde se hayan desarrollado más esfuerzos en todos los aspectos, tanto preventivos como de diagnóstico precoz, terapéuticos, investigadores, etc. como en cáncer de mama. También es la neoplasia más socializada y conocida, así como la que cuenta con mayor desarrollo asociativo y voluntariado.

En base a nuestra experiencia previa en la participación en numerosos estudios de investigación sobre cáncer de mama, básicamente en Ensayos Clínicos multicéntricos, entendimos que el área terapéutica actualmente estaba bastante cubierta en cuanto al desarrollo de nuevas moléculas y de distintas estrategias de tratamiento. En el otro extremo que es el de la prevención también existen multitud de estudios en cuanto a factores de riesgo, prevención primaria y prevención secundaria sobre todo en relación a los programas de diagnóstico precoz con mamografías. De hecho el diagnóstico radiológico se está actualizando de forma continua, consiguiéndose hoy en día por ejemplo diagnósticos en acto único radiológico con una simple punción, y minimizando las complicaciones quirúrgicas utilizando modernas técnicas. No obstante existe una laguna en cuanto a la perfección de los métodos diagnósticos bioquímicos y analíticos enfocados a la prevención secundaria de la enfermedad.

Así, pudimos observar que éste es un aspecto poco estudiado hasta ahora pero que comienza a despertar gran interés en la comunidad científica. Nos referimos al uso de marcadores tumorales para el diagnóstico precoz de la enfermedad. Desde el convencimiento científico de que el cáncer de mama en su lenta fase de transformación desde la célula ductal o lobulillar normal hasta la célula tumoral del carcinoma infiltrante, sufre un cambio metabólico y genético. Este cambio podría

detectarse a tiempo si logramos determinar características propias de estas células en transformación.

La experiencia clínica diaria nos refleja que existe un uso actual inadecuado de los marcadores tumorales. Así por ejemplo; la aplicación clínica de los marcadores tumorales en cáncer de mama está generalizada en la fase de “estudio de extensión” tras ser intervenida la paciente y sobre todo para evaluar una posible recaída posterior (seguimiento) o para determinar la evolución de la paciente en respuesta a un determinado tratamiento. Como hemos indicado anteriormente, en medicina primaria y especializada (cirujanos de mama, ginecólogos, etc.) suelen utilizarse de forma indiscriminada una batería de varios marcadores tumorales con fines diagnósticos mientras que los pocos estudios realizados en este sentido no avalan esta práctica y tampoco definen cuál de estos marcadores podría tener algún valor concreto. Dado el coste de estas determinaciones en un contexto económico como el que atravesamos sería eficiente limitar esta práctica si consensuamos su falta de utilidad. Por otra parte sería eficiente la generalización del uso de un marcador que tanto en nuestro estudio como en otros posteriores más amplios, hubiera demostrado una verdadera utilidad diagnóstica. Es por ello que la finalidad de nuestro trabajo es doble; por una parte la búsqueda de un marcador fiable para el diagnóstico precoz y por otra la evaluación de la eficacia-eficiencia de los marcadores usados actualmente.

El diagnóstico precoz del cáncer de mama se realiza con programas de *screening* muy implantados en el mundo desarrollado. Consiste en la realización de mamografías periódicas a mujeres reclutadas en registro poblacional entre los 50 y 69 años. La eficacia real de estos programas en cuanto su eficiencia es discutida y además cuentan con numerosas limitaciones como son los cánceres de intervalos, los falsos negativos, las

biopsias realizadas a falsos positivos, el sobrediagnóstico, los grupos de mujeres excluidas del estudio, etc. aspectos que ya hemos comentado anteriormente. Por ello se hace necesario buscar algún método complementario que ayude a mejorar el diagnóstico precoz del tumor femenino más frecuente.

La determinación de algún producto del metabolismo celular o de su carga genética (mRNA) en sangre podría suponer un verdadero diagnóstico precoz exento de riesgos para las mujeres y a la vez un apoyo a la determinación de los estudios radiológicos aumentando así la eficacia conjunta de ambos métodos.

En nuestro trabajo nos hemos propuesto el estudio de algunas de estas sustancias así como la determinación de marcadores de uso frecuente, para estimar la utilidad real de los marcadores habituales y la posible eficacia de nuevos marcadores no aplicados en esta área hasta el momento.

Asumimos desde el comienzo del trabajo las limitaciones propias de un estudio de centro único. En cualquier caso supondría un argumento más para evitar el uso incorrecto de los marcadores y mejorar la eficiencia clínica diaria. En ningún caso consideraríamos el estudio como negativo ya que el objetivo principal del mismo es el “análisis de la utilidad de los marcadores” tanto de los actuales como de los nuevos propuestos, independientemente del resultado final que pudiéramos obtener con cada uno de ellos en este trabajo.

## CAPÍTULO III: OBJETIVOS

---

## 3. Objetivos

### 3.1 Objetivo Principal

El **objetivo principal** del estudio es determinar en las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama precoz, si existe algún anabolito sanguíneo con niveles alterados sobre el rango de normalidad establecido por el fabricante para la población general.

Para la consecución de dicho objetivo estudiaremos dos grupos de marcadores;

- a) Los utilizados actualmente en distintas fases de la enfermedad, aunque su eficacia en diagnóstico precoz no esté aún determinada.
- b) Otros marcadores sanguíneos no utilizados hasta el momento en cáncer de mama, pero que son detectados en fases de agresión celular o daño inducido por estrés oxidativo, como respuesta a un proceso biológico de daño celular muy parecido al desarrollo histopatológico de un tumor mamario.

### 3.2 Objetivos Secundarios

- ✓ Nos proponemos valorar la eficacia en el diagnóstico precoz de varias sustancias sanguíneas de uso habitual en la práctica clínica como marcadores tumorales del cáncer de mama, determinando así su eficacia e indirectamente su eficiencia.
- ✓ La realización de un análisis epidemiológico y de factores de riesgo conocidos en nuestra muestra, obteniendo de esta forma un estudio paralelo de casos-controles sobre los factores de riesgo del cáncer de mama.

- ✓ Correlacionar las características clínicopatológicas de las pacientes (tamaño tumoral, grado histológico, afectación ganglionar, expresión de receptores) con los perfiles bioquímicos encontrados, buscando la posible existencia de marcadores pronósticos y evolutivos de la enfermedad. Por ejemplo, dilucidar si alguno de los marcadores estudiados se modifica significativamente en tumores con características agresivas.
  
- ✓ Establecer la posible correlación entre distintos marcadores buscando una combinación de ellos que pueda aportar significación diagnóstica o pronóstica.

El enfoque doble del trabajo; estudio de marcadores y estudio epidemiológico, podría resultar ambicioso pero en ningún caso contradictorio ya que ambos aspectos son complementarios.

# CAPITULO IV: MATERIAL Y MÉTODOS

---

## **4. Material y Métodos**

### **4.1. Diseño del estudio**

El presente trabajo consiste en un estudio epidemiológico observacional analítico con diseño de casos y controles. El estudio tiene un carácter unicéntrico, habiendo sido realizado en el Hospital Juan Ramón Jiménez de Huelva, y están implicados los servicios de Cirugía de mama, Análisis clínico y Oncología, además de la Unidad de Investigación (FABIS) y el Departamento de Biología Ambiental y Salud Pública de la Universidad de Huelva.

### **4.2. Población de referencia y muestra de estudio**

Para la estimación de la muestra hemos de establecer la definición de ambos grupos (casos y control) y establecer los criterios de inclusión y exclusión para cada uno.

El grupo de casos está compuesto por mujeres diagnosticadas de cáncer de mama localizado y precoz, pendientes de intervención quirúrgica. Los criterios de selección de estas pacientes son; el haber sido diagnosticadas de cáncer de mama operable, el no haber padecido anteriormente ningún otro tumor, el que la enfermedad no esté en fase avanzada o metastásica, que no hubiera recibido tratamiento oncológico neoadyuvante previo y que acepte la inclusión en el estudio, mediante la firma del consentimiento informado.

En cuanto al grupo control, se caracteriza por ser mujeres sanas cuyo criterio de selección fue que no tuvieran patologías

crónicas ni antecedentes de ningún cáncer. También deben aceptar la inclusión en el estudio y firmar el consentimiento informado.

Para el cálculo del tamaño muestral necesario para este trabajo se ha tenido en cuenta el número de pacientes totales con cáncer de mama que inician tratamiento en el hospital Juan Ramón Jiménez durante un año (120 aproximadamente), dado que está comprobada la homogeneidad de la población de estas características a lo largo del tiempo.

Con dicho dato, el tamaño muestral mínimo, calculado mediante el programa “Ene 3.0”, para un nivel de confianza del 95% y una potencia del 90%, ha sido estimado en 54 sujetos. Asumiendo un 10% de posibles pérdidas acaecidas durante el periodo de investigación, el tamaño muestral para el grupo de casos ha sido establecido en 60 mujeres diagnosticadas de cáncer de mama. El grupo de controles, compuesto por mujeres sanas, se ha estimado con un tamaño equivalente al del grupo casos, siendo por tanto de 60 sujetos.

Por ello, el tamaño muestral mínimo estimado para este estudio se basa en 120 sujetos, repartidos proporcionalmente entre el grupo de “casos” y el grupo de “control”.

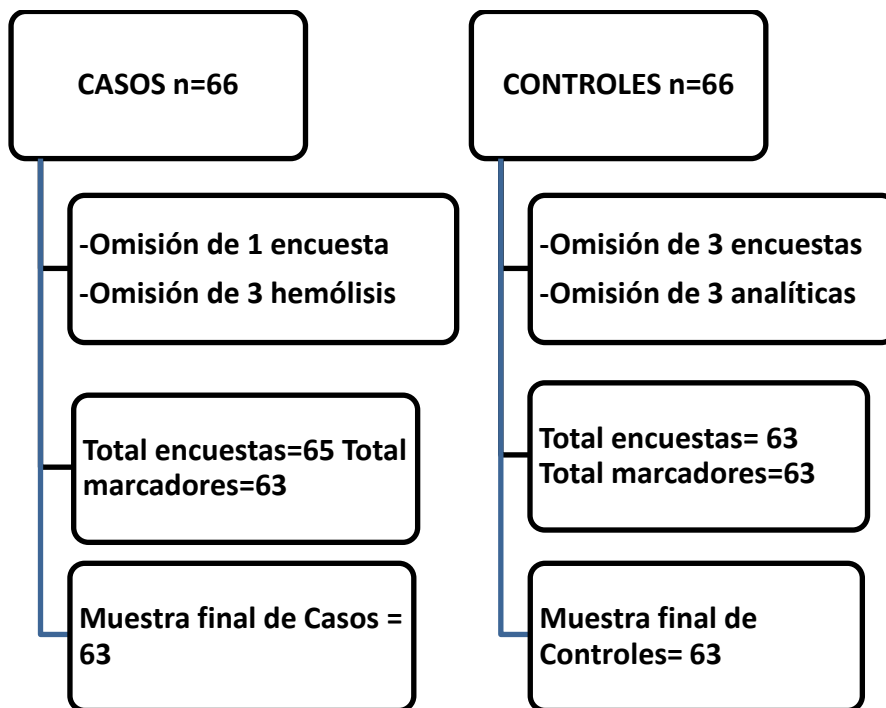
En cuanto a la estrategia para el reclutamiento se ha llevado a cabo a través de un muestreo por accesibilidad, seleccionándose a los sujetos que han cumplido los criterios de selección de inclusión y exclusión planteados para cada uno de los grupos, hasta alcanzar la muestra mínima establecida. El grupo de casos ha sido reclutado

de forma correlativa, según los partes de quirófano de cada semana, mientras que el reclutamiento del grupo de control se ha basado en mujeres sanas que acudieron al laboratorio a realizarse un análisis rutinario encargado por su médico de familia.

Referente a la recogida de datos del grupo de casos, de las 66 mujeres que finalmente se realizaron el análisis sanguíneo, fueron desechados 3 casos por hemólisis. La encuesta con los datos epidemiológicos fue rellena en 65 casos, ya que una paciente no aportó todos los datos necesarios. Por tanto, la muestra final consistió en 63 casos analizados, de los que se contaba tanto con los datos de la analítica sanguínea como los datos epidemiológicos.

Respecto a los 66 controles seleccionados, se perdieron 3 pacientes que no aportaron datos y cuyos datos de analítica no estuvieron disponibles al no presentarse el día de la extracción; por tanto esta investigación parte de 63 controles para la encuesta y para el análisis.

En el siguiente gráfico podemos comprobar la inclusión inicial de cada grupo, las pérdidas de pacientes y la inclusión final que fue la seleccionada para el análisis.



**Figura IV.1; Gráfico sobre la inclusión de sujetos en la Muestra de casos y de controles de esta investigación. Fuente propia.**

Por tanto, la muestra final de este estudio está compuesta por 126 mujeres (63 de la muestra control y 63 de la muestra de casos) con una edad media de 51.28 años y con un rango de edad desde los 23 a los 88 años, de la provincia de Huelva, evaluadas durante el segundo semestre de 2011 y el primer semestres de 2012 en el Complejo Hospitalario Juan Ramón Jiménez.

En el próximo apartado se definen las variables estudiadas y se exponen las características de cada serie.

### 4.3. Variables analizadas.

La relación de variables principales del presente estudio es:

- 1.- Variable Dependiente; Paciente diagnosticada de cáncer de mama operable (estadio precoz clínico).
- 2.- Variables Independientes; Índices de los biomarcadores analizados. Los marcadores serán; CEA, Ca 15.3, Ca 125, Cyfra 21.1, Ca 19.9,  $\alpha$ fetoproteína, NSE, NGAL, EGFR y 8-OHdG.

Un objetivo secundario del trabajo era la comparación de las dos series en cuanto a factores epidemiológicos. En este sentido, para la recogida de estos datos se ha diseñado una encuesta que se realizará a los casos y a los controles, que contendrá datos de carácter demográfico y otros factores de riesgo para cáncer de mama. En la serie casos además se registrarán datos relativos al diagnóstico, tratamiento y características propias del tumor. Los ítems de esta encuesta son expuestos en la tabla IV.1, recogándose el cuestionario en el anexo I.

**Tabla IV.1; Variables epidemiológicas determinadas en los dos grupos**

Grupo de casos	Grupo de controles
Nombre	Nombre
Código	Código
Edad	Edad
Ocupación	Ocupación
Antecedentes Familiares CM	Antecedentes Familiares CM
Edad de Menarquia	Edad de Menarquia
Edad de Menopausia	Edad de Menopausia
Número de Hijos	Número de Hijos
Lactancia	Lactancia

Toma de Anticonceptivos orales	Toma de Anticonceptivos orales
THS (terapia estrogénica)	THS (terapia estrogénica)
Enfermedad mamaria benigna	Enfermedad mamaria benigna
Tabaquismo	Tabaquismo
Consumo de Alcohol	Consumo de Alcohol
IMC	IMC
Nivel de Vit. D	Nivel de Vit. D
Densidad mamaria radiológica	---
Tipo de primer síntoma	---
Fecha de la Cirugía	---
Tipo de histología	---
Grado histológico	---
Receptor Estrógeno	---
Receptor Progesterona	---
Estatus de Her2	---
pT	---
pN	---
Estadio	---
Tipo de tratamiento	---

#### 4.4. Procedimiento.

Una vez confirmadas las características de las pacientes y vista su idoneidad para incluirlas en el grupo de casos o control, se informó a las pacientes de la existencia y detalles del estudio. Posteriormente se les leyó el consentimiento informado (CI) y, cuando la paciente aceptó su inclusión en el estudio y firmó el CI, se procedió al inicio del protocolo de investigación. Se le solicitó una analítica específica que la paciente se realizó posteriormente en el Laboratorio de Análisis Clínico del Hospital Juan Ramón Jiménez en el plazo máximo de una semana desde su inclusión en el estudio.

A continuación, en el grupo de casos, la paciente siguió su curso clínico previsto siendo planificada su intervención quirúrgica según disponibilidad de quirófano y del servicio de cirugía. La intervención pudo ser radical (mastectomía radical) o conservadora, asociada o no a biopsia de ganglio centinela o a vaciamiento axilar según cada caso.

En cuanto al procedimiento de laboratorio, las muestras se extrajeron en el área de extracciones correspondiente y seguidamente se procesaron en el laboratorio de Bioquímica del Hospital Juan Ramón Jiménez. De forma general, para cada determinación de los marcadores propuestos en una única muestra se necesitaron 10  $\mu$ L de orina, plasma o suero. En este estudio, se ha empleado plasma sanguíneo por su mayor versatilidad para posteriores análisis.

Las muestras de sangre se recogieron asépticamente en un tubo con EDTA por personal cualificado y mediante técnicas de venopunción aprobadas. Se emplearon los tubos tipo “vacutainer” de 9 ml (tapón lila) a los que se aplicaron varias inversiones al tubo justo tras la recogida de sangre para homogeneizar la sangre y el EDTA siguiendo la indicación del fabricante.

El plasma se preparó mediante técnicas estándar para pruebas clínicas de laboratorio, centrifugando a 1.500g durante 2 min. a 4°C, y decantándose a temperatura ambiente 20 minutos, recogiendo el sobrenadante (plasma) y conservándolo congelado en muestras alícuotas de unos 200 $\mu$ l. Siguiendo las recomendaciones de este tipo de procedimiento, para conservar las muestras clínicas

durante períodos prolongados, se recurrió a temperaturas inferiores a  $-80^{\circ}\text{C}$ , evitándose congelar y descongelar las muestras repetidamente. No se utilizaron muestras hemolizadas, hiperlipidémicas, sometidas a tratamiento térmico o contaminadas.

Una vez obtenido el plasma de cada paciente se procedió siguiendo las instrucciones específicas del fabricante para cada kit. Los Kit comerciales disponibles en el laboratorio de bioquímica (CEA, Ca 15.3, Ca 125, Cyfra 21.1, Ca 19.9,  $\alpha$ fetoproteína y NSE) se determinaron en el centro. Teniendo en cuenta que los dos primeros son estándares para pacientes con cáncer de mama, no supusieron gasto adicional al estudio. Sin embargo solo se determinaron con motivo del estudio el resto de marcadores en la muestra de 126 pacientes, lo que supuso para el hospital un coste más reducido y asumible.

El resto de los Kits no disponibles en el hospital (NGAL, EGFR y 8-OHdG), fueron procesados en los laboratorios del Departamento de Biología Ambiental y Salud Pública de la UHU bajo la dirección del Dr. Navarro. En cada caso se aplicaron rigurosamente el método recomendado por el fabricante de cada kit.

La elección de los Kits a utilizar se ha efectuado en base a los últimos estudios realizados con diversas sustancias, seleccionando las más adecuadas y prometedoras según la bibliografía del momento. Así mismo se han incluido otros marcadores de uso clínico habitual, pero no suficientemente estudiados en fase de diagnóstico precoz. La batería de Kits seleccionados se refleja en la siguiente tabla.

**Tabla IV.4. Bateria de Kits utilizados en nuestro estudio**

Marcador (KIT)	Significado
CEA	Antígeno Carcinoembrionario
Ca 15.3	Antígeno Carbohidrato 15.3
Ca 125	Antígeno Carbohidrato 125
Cyfra 21.1	Cyfra 21.1
Ca 19.9	Antígeno Carbohidrato 15.3
NSE	Enolasa neuroespecífica
$\alpha$ fetoproteína	$\alpha$ fetoproteína
NGAL	Lipocalina asociada a gelatinasa neutrofílica
EGFR	Factor de Crecimiento Epidérmico
8-OHdG	8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (Daño al ADN por estrés oxidativo)

#### 4.5. Análisis de datos.

Se ha realizado un análisis univariado para la descripción de la muestra (media, mediana y desviación típica para variables cuantitativas y, por otro lado, frecuencias y porcentajes para variables categóricas). Este procedimiento se ha repetido para aquellos objetivos de carácter descriptivo.

Para abordar el objetivo principal, se han empleado, contrastes de proporciones basados en el test de Chi-cuadrado (con la inclusión de la corrección de Yates en caso necesario) y contraste de medias basados en la prueba t de Student. A pesar de no poder asumir la normalidad en base al test de Shapiro-Wilk, en este trabajo, se asume normalidad al trabajarse con muestras grandes. Concretamente Sawilowsky S. y Blair R. C. (1992) demostraron que la prueba t es moderadamente robusta ante las violaciones de la asunción de normalidad en muestras grandes (por

encima de 60 sujetos por grupo). Por ello, en este trabajo se incluye directamente la prueba t, a pesar de haber contrastado previamente que las conclusiones estadísticas no varían en función del uso de pruebas paramétricas o no paramétricas en el contraste de medias.

**Tabla IV.5. Test de Shapiro-Wilk sobre la normalidad de los biomarcadores.**

	Shapiro-Wilk	gl	Sig. Asintótica (bilateral)
Cyfra (ng/mL)	0,739	126	0,000
NSE (ng/mL)	0,699	126	0,000
CA15-3 (U/mL)	0,844	126	0,000
CA19-9 (U/mL)	0,728	126	0,000
CA125 (U/mL)	0,789	126	0,000
AFP U/mL)	0,880	126	0,000
CEA (ng/mL)	0,783	126	0,000
NGAL(ng/ml)	0,782	126	0,000
EGF-R (ng/ml)	0,554	126	0,000
8-OHdG (ng/ml)	0,729	126	0,000

Posteriormente, se ha diseñado un análisis de regresión logística binaria, estableciendo como “variable criterio” la

pertenencia al grupo de casos o control y como “variables predictoras”, los distintos marcadores analizados (CEA, Ca 15.3, Ca 125, Cyfra 21.1, Ca 19.9,  $\alpha$ fetoproteína, NSE, NGAL, EGFR y 8-OHdG). Dentro de los métodos más usuales de cálculo automático del modelo de regresión logística que mejor se adapta a los resultados, destaca el método de Wald. Este método va insertando en el modelo aquellas variables que van resultando significativas hasta saturar un modelo donde la inclusión de nuevas variables no modificara el resultado de la estimación del modelo, resultando su aportación no significativa. En definitiva, el método de estimación del modelo final válido se ha realizado mediante una aproximación hacia adelante por el método de Wald mediante la cual se han ido añadiendo variables cuyo valor predictivo fuera significativo, hasta determinar un modelo válido y con los efectos principales significativos de cada uno de los indicadores incluidos.

Para culminar este objetivo, se ha realizado una curva COR donde, a partir de los valores predichos de probabilidad de cada sujeto en el modelo evaluado, se ha calculado la capacidad de discriminación del modelo y estimada la propia curva COR. Igualmente se complementará con el cálculo del índice de Youden para la estimación del punto de corte más óptimo.

Para abordar el objetivo secundario, y de forma similar a cómo se ha diseñado el análisis de datos del objetivo principal, se ha aplicado el mismo sistema para la determinación de posibles variables predictoras a partir de las variables epidemiológicas analizadas (edad de menopausia, número de hijos, lactancia, toma

de anticonceptivos orales, THS, enfermedad mamaria benigna, tabaquismo, consumo de alcohol, IMC y nivel de vitamina D). El modelo de regresión logística para este grupo de variables no se ha depurado ni tampoco se ha realizado la curva COR, ya que se considera *a priori* que dichas variables no van a tener la misma capacidad predictiva que las del bloque previo. El motivo de dicha decisión viene apoyado en que este objetivo se considera complementario a la investigación principal, no habiéndose diseñado el estudio para tal fin. Por ello, se estima que la capacidad predictiva del modelo, aunque sea aceptable, no llega a niveles lo suficientemente altos como para obtener una curva COR con suficiente capacidad predictiva.

El software estadístico necesario para este trabajo consistió básicamente en el IBM SPSS Statistics 22.0, programa empleado para el tratamiento de los datos y el cálculo de las distintas pruebas de significación. Igualmente, se ha contado con el apoyo de complementos de cálculo proporcionados por el programa Microsoft Excel.

En todos los casos se ha exigido una significación estadística del 5% ( $p < 0.05$ ) para considerar diferencias entre dos parámetros.

#### 4.6. Aspectos éticos

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación Biomédica de Huelva (España) (Anexo II).

Como se ha indicado previamente, todas las pacientes dieron su consentimiento informado por escrito para participar en el estudio. En el Anexo III se incluye tanto la hoja de información al paciente como el consentimiento informado que han cumplimentado los participantes de esta investigación.

Los investigadores del estudio han garantizado la confidencialidad de los datos de todas las pacientes incluidas en el estudio y aseguran el cumplimiento de la normativa de la ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de carácter personal y cualquier reglamentación futura que legisle la confidencialidad de los datos.

La información referente a la identidad de las pacientes es considerada confidencial a todos los efectos. Los datos de las pacientes recogidos en la hoja de recogida de datos han sido documentados de manera anónima. Igualmente, la base de datos generada en el estudio, ha sido gestionada por el director del estudio, no conteniendo datos de identificación personal.

Durante el transcurso de esta investigación, todos los documentos relacionados con los cuestionarios, están localizados en un área segura del hospital. Al final del estudio, el director ha sido el responsable de conservar la documentación necesaria durante los periodos establecidos por la normativa legal.

# CAPÍTULO V: RESULTADOS

---

## 5. Resultados

### 5.1. Análisis descriptivo sobre las características de las muestras.

En primer lugar mostramos las principales características de las mujeres que han participado en ambos grupos.

**Tabla V.1. Características principales de la serie en función del grupo.** (En sombreado gris se destacan las variables cuantitativas)

		Grupo			
		Controles		Casos	
		n	%	n	%
<b>Edad</b>	media y rango (en años)	45,23	(79-23)	57,79	(88-28)
<b>Edad Menarquia</b>	(años)	12,56		12,68	
<b>Ocupación</b>	No trabaja	18	28,57%	33	52,40%
	Trabaja	45	71,43%	30	47,60%
<b>Antecedentes Familiares</b>	No	39	61,90%	42	66,70%
	Sí	24	38,10%	21	33,30%
<b>Menopausia</b>	No	45	71,43%	22	34,90%
	Sí	18	28,57%	41	65,10%
<b>Hijos</b>	No	11	17,46%	12	19,00%
	Sí	52	82,54%	51	81,00%
<b>Lactancia</b>	No	26	41,27%	30	47,60%
	Sí	37	58,73%	33	52,40%
<b>ACO</b>	No	36	57,14%	47	74,60%
	Sí	27	42,86%	16	25,40%
<b>THS</b>	No	59	93,65%	60	94,40%
	Sí	4	6,35%	3	5,60%

Fumadora	No	39	61,90%	47	74,60%
	Si	24	38,10%	16	25,40%
Enfermedad mamaria benigna	No	43	68,30%	41	65,10%
	Si	20	31,70%	22	34,90%
Consumo de alcohol	No	60	95,23%	61	96,82%
	Si	3	4,76%	2	3,17%
IMC		24,43		28,23	
Vitamina D	(ng/ml)	53,18		45,50	

La serie controles tiene una edad media menor (45 vs. 57 años) y por tanto menor proporción de menopausia, y además con mayor ocupación laboral diferente a la de ama de casa. La serie casos tiene, además de lo comentado, menores niveles de vitamina D, mayor IMC, y menos lactancia. El resto de características están bien balanceadas.

En segundo lugar se muestra en la tabla V.2, las características del grupo de casos referentes a los tipos de tumores, de cirugía y otras variables de interés clínico.

**Tabla V.2. Características clínicas del grupo de casos.**

		n	%
ADM-RX	No	44	69,84%
	Si	19	30,16%
1ºSint	MX Rutinaria	19	30,16%
	Nódulo Palpable	42	66,67%
	Alteraciones cutáneas	1	1,59%
	Mastalgia	0	0,00%
	Retracción pezón	1	1,59%
	Otros	0	0,00%
Hist	In situ	0	0,00%
	Ductal	52	82,54%
	Lobulillar	9	14,29%
	Otros	2	3,17%

GH	Desconocido	2	3,17%
	Grado I	6	9,52%
	Grado II	43	68,25%
	Grado III	10	15,87%
	Grado IV	2	3,17%
RE	Negativo	8	12,70%
	Positivo <20%	2	3,17%
	Positivo 20-80%	26	41,27%
	Positivo >80%	25	39,68%
	Desconocido	2	3,17%
RP	Negativo	28	44,44%
	Positivo <20%	5	7,94%
	Positivo 20-80%	20	31,75%
	Positivo >80%	8	12,70%
	Desconocido	2	3,17%
Her-2	Negativo	50	79,37%
	Positivo	11	17,46%
	Desconocido	2	3,17%
pT	Tis	1	1,59%
	T1a	4	6,35%
	T1b	7	11,11%
	T1c	30	47,62%
	T2	18	28,57%
	T3	3	4,76%
	Tx	0	0,00%
pN	N0	40	63,49%
	N1	15	23,81%
	N2	3	4,76%
	N3	3	4,76%
	NX	2	3,17%
Estadio	Desconocido	0	0,00%
	IA	33	52,38%
	IB	0	0,00%
	IIA	14	22,22%
	IIB	9	14,29%
	IIIA	4	6,35%
	IIIB	0	0,00%
	IIIC	3	4,76%
Tto	Seguimiento	3	4,76%
	HT	14	22,22%
	HT+QT	5	7,94%
	HT+RT	16	25,40%
	QT+RT	4	6,35%
	QT+HT+RT	15	23,81%
	Inmunoterapia+QT+RT+HT	4	6,35%
	Inmunoterapia+QT+RT	2	3,17%

ADM-RX; alta densidad mamaria radiológica. 1º Sint; primer síntoma. Hist; histología. GH; grado histológico. RE; receptor de estrógeno. RP; receptor de progesterona. Tto; tratamiento.

Así la gran mayoría de las pacientes tuvieron como síntoma inicial la palpación de un nódulo o la existencia de una mamografía rutinaria sospechosa. La histología confirma los datos habituales; preponderancia de carcinomas ductales, grados 2, Her2 negativo, receptores de estrógeno y de progesterona positivos. Los tumores más frecuentes fueron T1 y T2 (64% y 29%), sin afectación ganglionar (N0; 63%) y los estadios fueron precoces (I=52%, IIA=22%, IIB=14%, IIIA= 6%, IIIC= 4%). Respecto al tratamiento empleado se utilizó hormonoterapia en el 90% de los casos, quimioterapia en el 48%, radioterapia en el 65% e inmunoterapia en un 9%.

## 5.2. Estudio sobre la capacidad predictiva de los biomarcadores analizados sobre el diagnóstico de cáncer de mama.

Como se ha indicado con anterioridad, se ha determinado la capacidad predictiva del cáncer de mama en una muestra de casos (mujeres diagnosticadas con cáncer de mama) frente a una muestra de control (mujeres sanas). Para ello, se procede a analizar las diferencias entre ambos grupos para cada uno de los biomarcadores, para posteriormente realizar un modelo de regresión logística y determinar así que conjunto de variables tienen una mayor capacidad predictiva sobre los casos y control.

### *Análisis bivariado de los marcadores con respecto al grupo control y de casos.*

Se ha estimado la diferencia entre ambos grupos (mujeres con cáncer de mama en contraste con mujeres sanas) usando los valores continuos de cada uno de los marcadores, recurriendo para ello a una prueba de contraste de medias basada en el test de t de Student, debido a que se asume el supuesto de normalidad al presentar un amplio tamaño muestral.

En la tabla V.3 se muestran los valores descriptivos para cada grupo en cada una de los biomarcadores analizados.

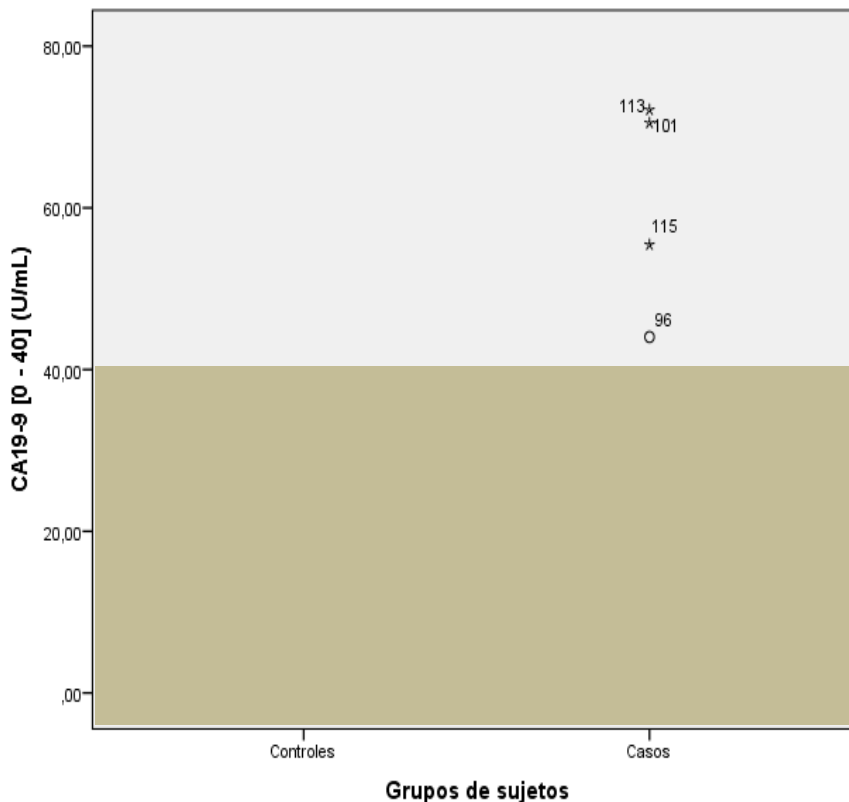
**Tabla V.3. Estadísticos de los biomarcadores analizados en función del grupo**

		Media	Mediana	Desviación típica	Valor Máximo	Valor Mínimo
Cyfra (ng/mL)	Controle	1,29	1,06	0,69	3,46	0,53
	Casos	1,70	1,46	1,12	7,49	0,57
NSE (ng/mL)	Controles	19,48	12,81	20,51	82,40	1,58
	Casos	7,09	4,54	6,41	30,20	1,07
CA15-3 (U/mL)	Controles	16,19	16,24	5,26	28,39	6,14
	Casos	19,99	18,09	11,48	62,26	4,16
CA19-9 (U/mL)	Controles	9,75	8,14	6,99	27,75	0,60
	Casos	13,56	9,59	14,72	72,12	0,60
CA125 (U/mL)	Controles	14,00	12,77	6,61	38,74	4,72
	Casos	16,10	13,99	9,39	53,46	6,39
AFP (U/mL)	Controles	2,21	1,88	1,35	7,92	0,53
	Casos	2,05	1,69	1,01	4,39	0,61
CEA (ng/mL)	Controles	1,66	1,32	1,48	6,68	0,20
	Casos	2,48	1,84	2,07	10,54	0,51
NGAL(ng/ml)	Controles	4,49	2,97	4,01	19,63	1,21
	Casos	4,70	4,06	2,33	13,45	1,81
EGF-R (ng/ml)	Controles	6,24	5,82	2,39	23,07	3,20
	Casos	5,05	5,10	0,91	6,83	2,80
8-OHdG (ng/ml)	Controles	7,59	7,29	2,49	14,77	3,26
	Casos	11,10	9,90	5,88	46,76	0,23

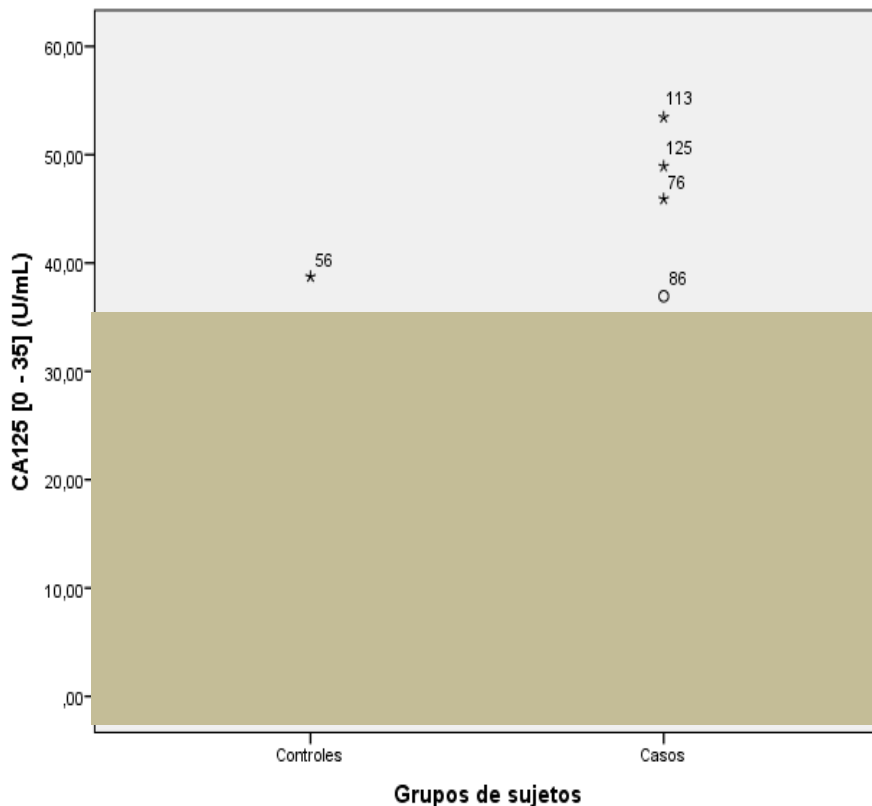
A continuación realizamos el estudio estadístico mediante la prueba de significación (Tabla V.5) para comprobar cuáles de estos biomarcadores son significativos en función de cada grupo. El análisis bivariado ha reflejado que cuatro marcadores (Ca 19.9, Ca 125, AFP y NGAL) no han resultado significativos, tal como representamos en las gráficas que siguen.

**Tabla V.5. Estadísticos de los biomarcadores categorizados en contraste con el grupo de sujetos**

		Grupo			
		Grupo de controles		Grupo de casos	
		n	%	n	%
Cyfra [0,25 - 3,30] (ng/mL)	Bajo	62	98,41%	59	93,65%
	Alto	1	1,59%	4	6,35%
NSE [0 - 13] (ng/mL)	Bajo	63	100,00%	63	100,00%
	Alto	0	,00%	0	0,00%
CA15-3 [0 - 30] (U/mL)	Bajo	63	100,00%	56	88,89%
	Alto	0	,00%	7	11,11%
CA19-9 [0 - 40] (U/mL)	Bajo	63	100,00%	59	93,65%
	Alto	0	,00%	4	6,35%
CA125 [0 - 35] (U/mL)	Bajo	62	98,41%	59	93,65%
	Alto	1	1,59%	4	6,35%
AFP [0 - 10](U/mL)	Bajo	63	100,00%	63	100,00%
	Alto	0	,00%	0	0,00%
CEA [0 - 4] (ng/mL)	Bajo	57	90,48%	55	87,30%
	Alto	6	9,52%	8	12,70%



**Figura V.1. Comparación en los niveles de Ca 19.9 (U/mL) en el grupo de controles (mujeres sanas) 9,75 U/ml en comparación con el grupo de casos (mujeres con cáncer de mama) 13,56 U/ml ( $p=0,069$ ). (niveles normales en área sombreada)**  
 O; representa los valores atípicos (casos entre 1,5 y 3 amplitud intercuartil (IQR), del extremo de la caja). \*; representa los valores extremos (por encima de 3IQR del extremo de la caja).



**Figura V.2. Comparación en los niveles de Ca 125 (U/mL) en el grupo de controles (mujeres sanas) 14 U/mL en comparación con el grupo de casos (mujeres con cáncer de mama) 16,1 U/mL (p=0,152).. (niveles normales en área sombreada)**

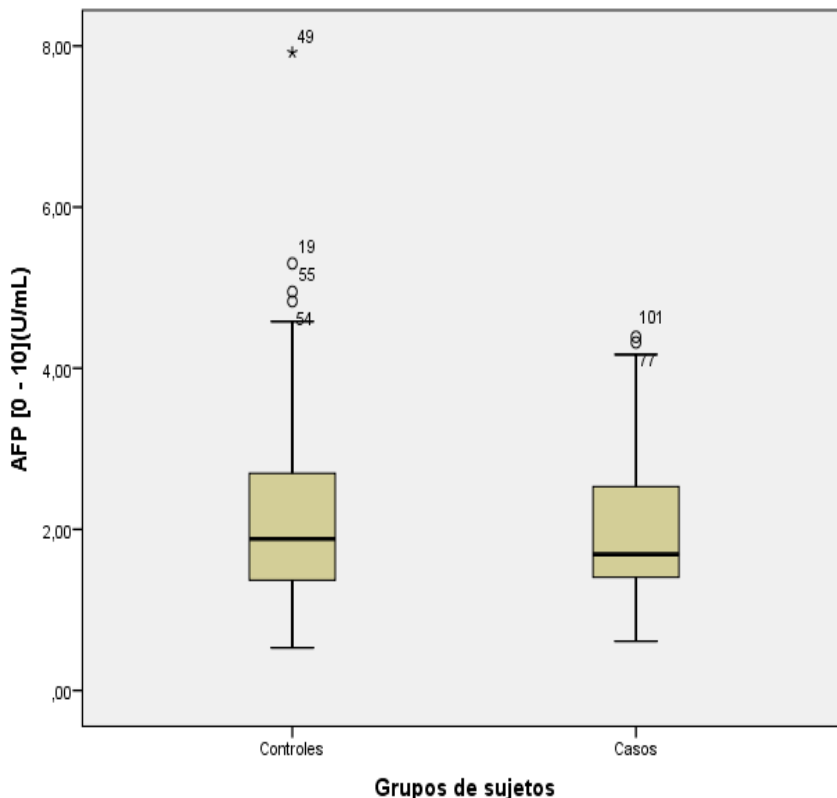
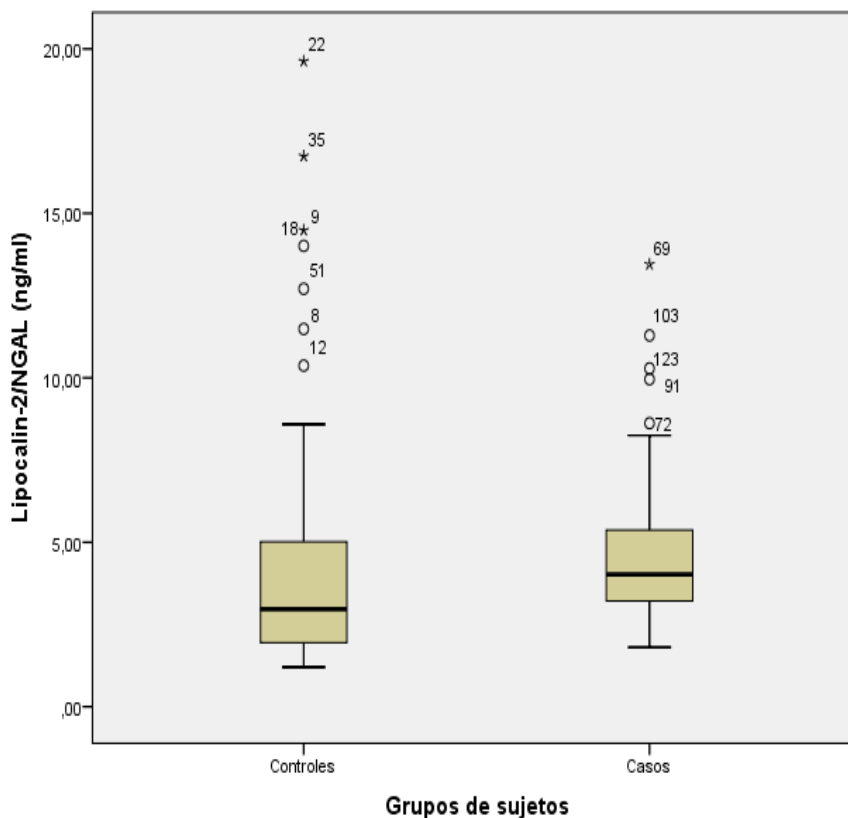


Figura V.3. Comparación en los niveles de AFP (U/mL) en el grupo de controles (mujeres sanas) 2,21 U/mL en comparación con el grupo de casos (mujeres con cáncer de mama) 2,05 U/mL (p=0,452).

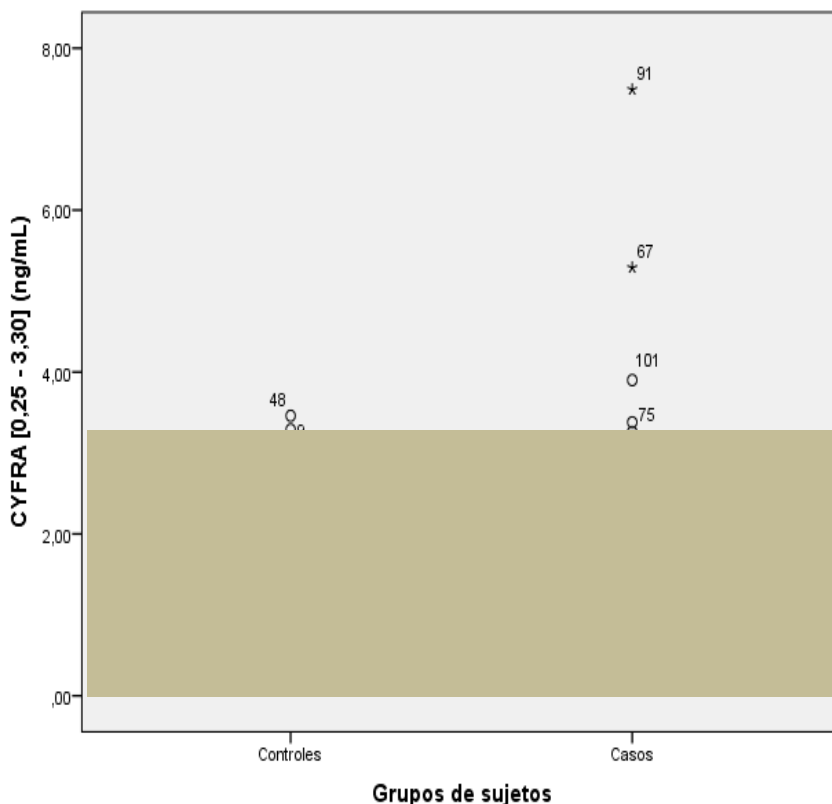


**Figura V.4. Comparación en los niveles de NGAL (ng/mL) en el grupo de controles (mujeres sanas) 4,49 ng/mL en comparación con el grupo de casos (mujeres con cáncer de mama) 4,7 ng/mL ( $p=0,722$ ).**

El resto de marcadores (Cyfra, NSE, Ca 15.3, CEA, EGFR, 8-OHdG) han sido significativos en el estudio bivariado.

Concretamente los resultados muestran para el marcador Cyfra (ng/mL) una diferencia estadísticamente significativa, con unos valores más elevados para este marcador en el grupo de mujeres con cáncer de mama ( $M = 1,70$ ,  $Mdn = 1,46$  y  $DT = 1,12$ )

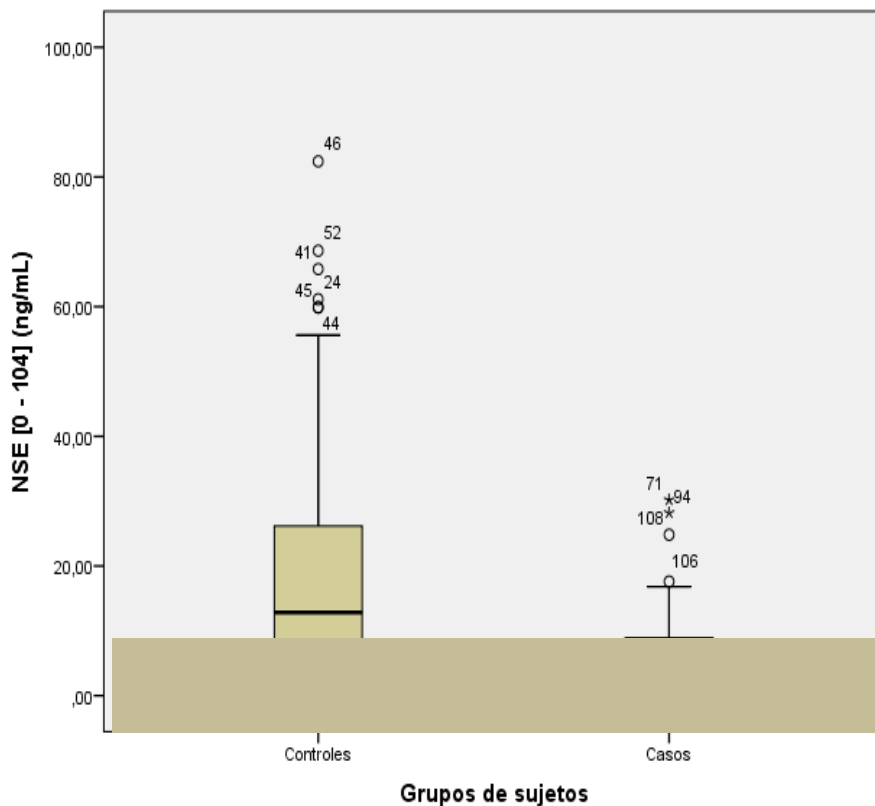
frente al grupo control, mujeres sanas (M = 1,29, Mdn = 1,06 y DT = 0,69), como puede observarse en la figura V.5.



**Figura V.5. Comparación en los niveles de Cyfra (ng/mL) en el grupo de controles (mujeres sanas) 1,29 ng/mL en comparación con el grupo de casos (mujeres con cáncer de mama) 1,7 ng/mL (p=0,015).** Fuente propia. (niveles normales en área sombreada)

En cuanto a los niveles del marcador NSE (ng/mL) las diferencias son estadísticamente significativas, con un mayor nivel de este marcador en el grupo de mujeres sanas (M = 19,48, Mdn = 12,81 y DT = 20,51) frente al grupo de casos, mujeres con cáncer de

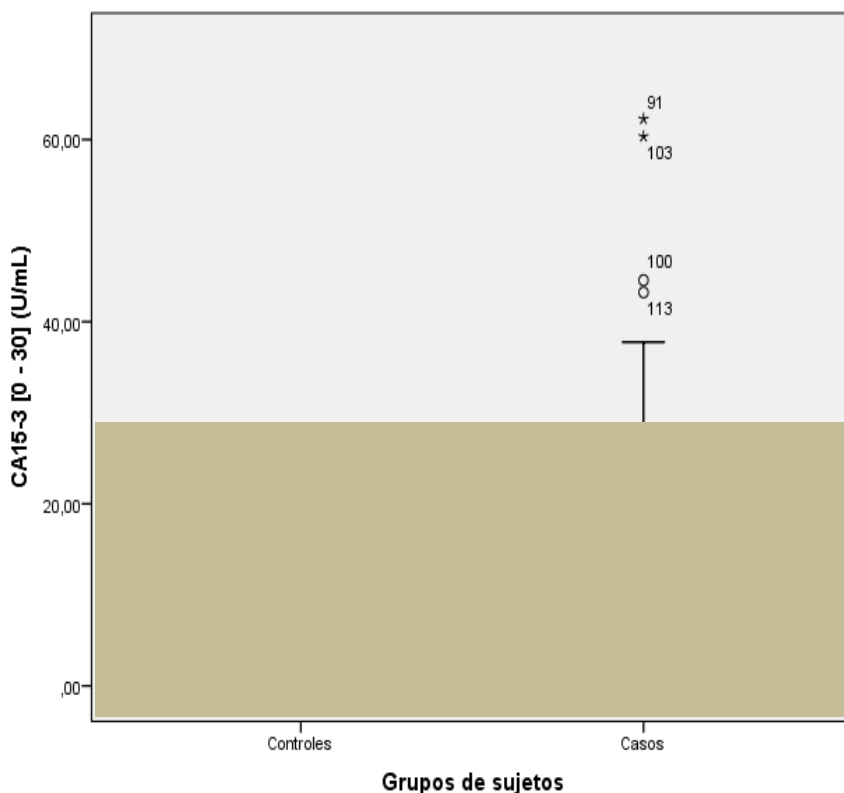
mama (M = 7,09, Mdn = 4,54 y DT = 6,41), como se deduce en la figura V.6.



**Figura V.6. Comparación en los niveles de NSE (ng/mL) en el grupo de controles (mujeres sanas) 19,48 ng/mL en comparación con el grupo de casos (mujeres con cáncer de mama) 7,09 (p<0,05). (niveles normales en área sombreada)**

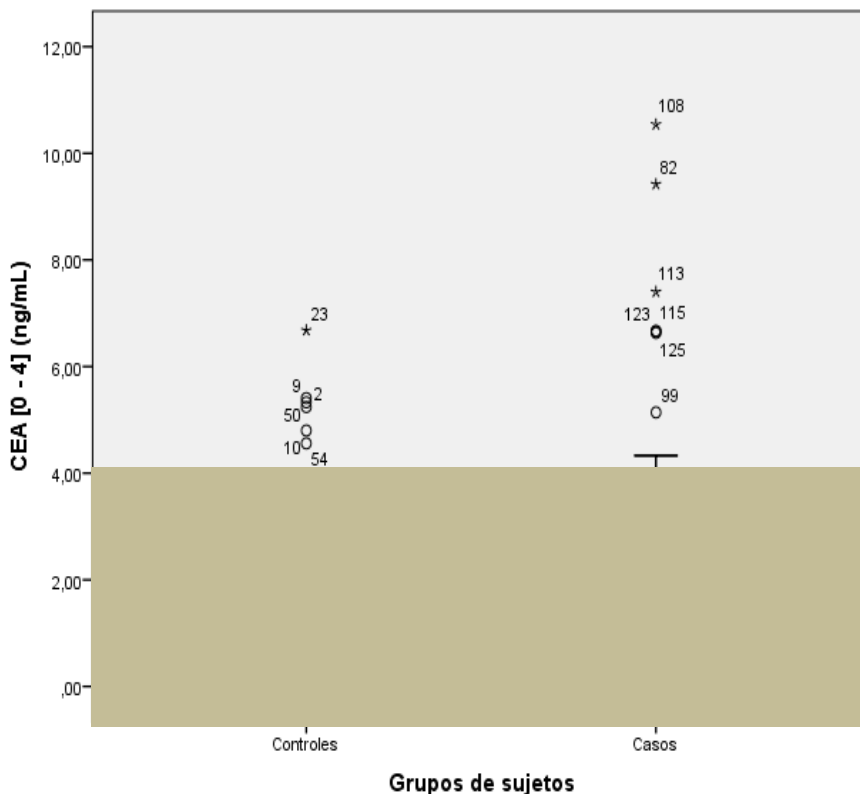
Igualmente sucede en el caso del marcador CA15-3 (U/mL), que presenta una diferencia estadísticamente significativa (p = 0,020), con mayores niveles de este marcador en el grupo de casos,

mujeres con cáncer de mama, (M = 19,99, Mdn = 18,09 y DT = 11,48) frente al grupo de mujeres sanas (M = 16,19, Mdn = 16,24 y DT = 5,26) como se representa en la figura V.7.



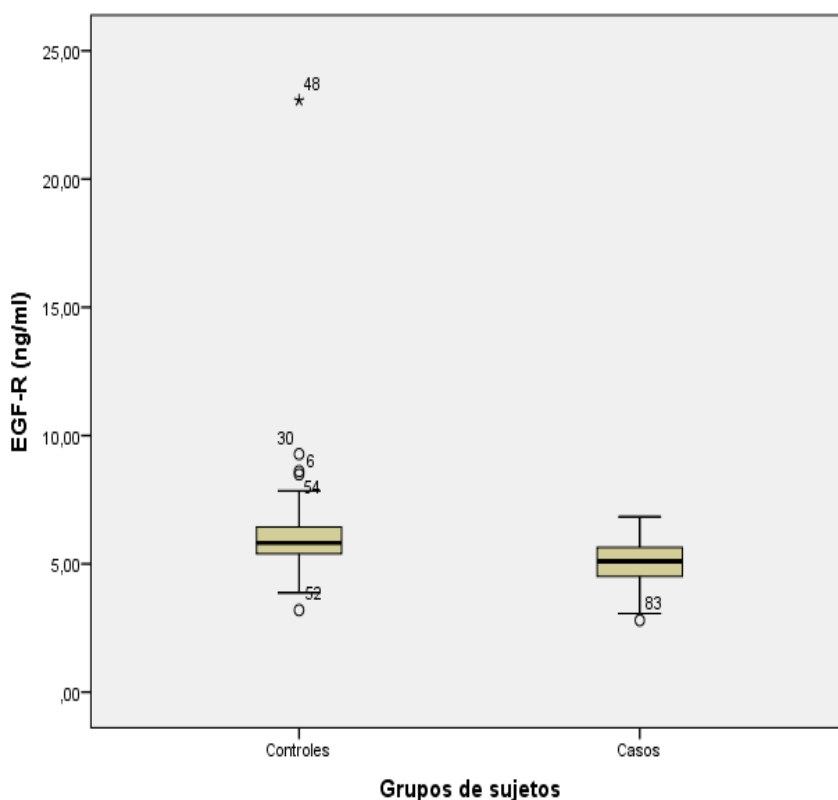
**Figura V.7. Comparación en los niveles de Ca 15.3 (U/mL) en el grupo de controles (mujeres sanas) 16,9 U/mL en comparación con el grupo de casos 19,99 U/mL (mujeres con cáncer de mama) (p=0,020). (niveles normales en área sombreada)**

Otro tanto se observa para el biomarcador CEA (ng/mL) en el grupo con cáncer de mama ( $M = 2,48$ ,  $Mdn = 1,84$  y  $DT = 2,07$ ) son mayores que en el grupo de referencia (mujeres sanas) ( $M = 1,66$ ,  $Mdn = 1,32$  y  $DT = 1,48$ ), siendo significativa la diferencia con una  $p = 0.012$ ; tal y como se representa en la figura V.8.



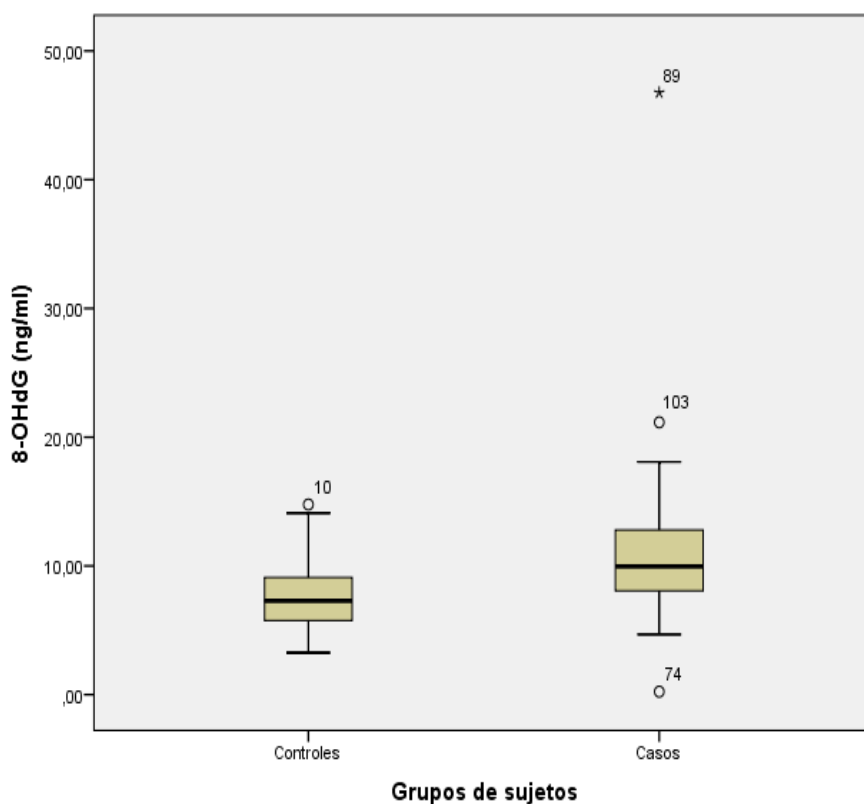
**Figura V.8. Comparación en los niveles de CEA (ng/mL) en el grupo de controles (mujeres sanas) 1,66 ng/mL en comparación con el grupo de casos (mujeres con cáncer de mama) 2,48 ng/mL ( $p=0,012$ ). (niveles normales en área sombreada)**

Por otro lado, como puede observarse en la figura V.9, los resultados muestran que el EGF-R (ng/mL) presenta una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ), con niveles más bajos de este marcador en el grupo de mujeres con cáncer de mama ( $M = 5,05$ ,  $Mdn = 5,10$  y  $DT = 0,91$ ) frente al grupo control de mujeres sanas ( $M = 6,24$ ,  $Mdn = 5,82$  y  $DT = 2,39$ ).



**Figura V.9. Comparación en los niveles de EGFR (ng/mL) en el grupo de controles (mujeres sanas) 6,24 ng/mL en comparación con el grupo de casos (mujeres con cáncer de mama) 5,05 ng/mL ( $p < 0,05$ ).**

En cuanto a los niveles de 8-OHdG (ng/mL) las diferencias entre ambos grupos son estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ), con un mayor nivel de este marcador en el grupo de mujeres con cáncer de mama ( $M = 11,10$ ,  $Mdn = 9,90$  y  $DT = 5,88$ ) frente al grupo de control ( $M = 7,59$ ,  $Mdn = 7,29$  y  $DT = 2,49$ ), como puede observarse en la figura V.10.



**Figura V.10. Comparación en los niveles de 8-OHdG (ng/mL) en el grupo de controles (mujeres sanas) 7,59 ng/mL en comparación con el grupo de casos (mujeres con cáncer de mama) 11,1 ng/mL ( $p > 0,05$ ).**

Como se ha observado en el estudio estadístico anterior, los resultados de las pruebas de significación, tal y como se recoge en la tabla V.4, muestran que existen diferencias significativas para los marcadores Cyfra (ng/mL), NSE (ng/mL), CA15-3 (U/mL), CEA (ng/mL), EGF-R (ng/ml) y 8-OHdG (ng/ml).

**Tabla V.4. Prueba de significación de los biomarcadores en función del grupo**

		t de Student	gl	Sig. Asintótica (bilateral)
Cyfra (ng/mL)	Se han asumido v. iguales	-2,463	123	0,015
NSE (ng/mL)	No se han asumido v. iguales	4,572	74,196	0,000
CA15-3 (U/mL)	No se han asumido v. iguales	-2,371	85,213	0,020
CA19-9 (U/mL)	No se han asumido v. iguales	-1,842	86,896	0,069
CA125 (U/mL)	Se han asumido v. iguales	-1,442	123	0,152
AFP U/mL)	Se han asumido v. iguales	0,754	123	0,452
CEA (ng/mL)	Se han asumido v. iguales	-2,565	123	0,012
NGAL(ng/ml)	No se han asumido v. iguales	-0,360	99,813	0,720
EGF-R (ng/ml)	Se han asumido v. iguales	3,664	123	0,000
8-OHdG (ng/ml)	No se han asumido v. iguales	-4,329	81,937	0,000

gl; grados de libertad V; varianzas

Por otro lado, si asumimos los **puntos de corte** establecidos para aquellos marcadores rutinarios de los que se dispone de dicho umbral (Cyfra, NSE, CA15-3, CA19-9, CA125, AFP y CEA), los resultados de la prueba de contraste de proporciones (chi-cuadrado) muestran una baja estimación de resultados altos en los distintos marcadores (como puede corroborarse en la tabla V.5), lo que causa problemas en la estimación de la prueba de significación. Esta dificultad viene determinada por la dificultad de la estimación estadística para calcular diferencias al haber tan pocos resultados positivos (niveles superiores al rango normal) con los distintos marcadores.

Concretamente, como se muestra en la tabla V.6, la prueba de significación sólo ha podido ser calculada en cinco de los siete marcadores ya que en dos de ellos (NSE y AFP) no existía ningún sujeto con un valor superior al umbral. En los contrastes calculados, y mediante la corrección de Yates, sólo se han encontrado diferencias estadísticamente significativas para CA15-3 [0 - 30] (U/mL), donde se observa un porcentaje de 11.29% positivos (por encima del umbral) en el grupo con cáncer de mama, y ningún caso en el grupo control. Por tanto podríamos considerar a este marcador como el único capaz de pronosticar el cáncer de mama.

**Tabla V.6. Prueba de significación de los biomarcadores categorizados en contraste con el grupo de sujetos**

	chi cuadrado	gl	Sig. Asintótica (bilateral)
Cyfra [0,25 - 3,30] (ng/mL)	0,833	1	0,361
NSE [0 - 13] (ng/mL)	. <sup>a</sup>	.	.
CA15-3 [0 - 30] (U/mL)	5,445	1	0,020
CA19-9 [0 - 40] (U/mL)	2,324	1	0,127
CA125 [0 - 35] (U/mL)	0,833	1	0,361
AFP [0 - 10](U/mL)	. <sup>a</sup>	.	.
CEA [0 - 4] (ng/mL)	0,080	1	0,777
Nota: Estimadas la chi cuadrado mediante la corrección de Yates. <sup>a</sup> No se ha podido estimar el valor de chi-cuadrado al ser constante una de las variables analizadas. gl; grados de libertad			

Como puede concluirse a partir de los resultados derivados de los umbrales establecidos en los kits rutinarios, los biomarcadores Cyfra, NSE, CA19-9, AFP y CEA no presentan capacidad discriminativa en la presencia de cáncer de mama. Incluso el único biomarcador que resulta significativo, CA15-3 [0 - 30] (U/mL), sólo se manifiesta como positivo en el 11.11% de los casos (frente al 0% de los controles).

Por último, este resultado conduce a estimar el modelo de regresión logística mediante las variables cuantitativas, ya que los marcadores categorizados a partir del umbral establecido no muestran adecuada variabilidad para ser integrados dentro de dicho análisis multivariante.

*Regresión Logística binaria y curva COR del modelo.*

A continuación se procede a establecer una regresión logística binaria que establezca una ecuación que evalúe la probabilidad de sufrir cáncer de mama a partir de los parámetros obtenidos.

Se ha llevado a cabo un procedimiento de Regresión Logística Binaria mediante inclusión (hacia adelante) por el método de Wald incluyendo 126 sujetos en el análisis. La codificación de la variable dependiente ha sido Controles = 0, Casos = 1, no incluyéndose más variables categóricas en el modelo.

Según el coeficiente de determinación, con éste modelo se explica un 48.5% de la varianza (o un 64.7% mediante la  $R^2$  corregida de Nagelkerke). Así mismo, la Prueba de Hosmer y Lemeshow indica que el ajuste del modelo estimado es bueno ( $p > 0.05$ ).

Según la tabla de clasificación se comprueba que el modelo tiene una Sensibilidad alta (85.7%) y también una Especificidad alta (82.3%), clasificando adecuadamente a los sujetos en los grupos de casos y controles.

En la tabla V.7, se incluyen los parámetros estimados para cada una de las variables incluidas en la ecuación. Como puede contrastarse, los marcadores NSE, CA15.3, NGAL, EGFR y 8-OHdG son los únicos marcadores que siguiendo el método de Wald son los que aportan diferencias entre ambos grupos, desechando el

resto de marcadores cuyo impacto relativo en combinación con los demás según el método, no presenta diferencias significativas.

**Tabla V.7. Parámetros del modelo final estimado mediante regresión logística**

	B	ET	Wald	gl	Sig.	OR	95% C.I. para OR	
							Inferior	Superior
NSE	-0,097	0,028	12,029	1	0,001	0,908	0,860	0,959
CA15.3	0,091	0,036	6,196	1	0,013	1,095	1,019	1,176
NGAL	-0,224	0,100	5,074	1	0,024	0,799	0,657	0,971
EGFR	-1,463	0,351	17,390	1	0,000	0,232	0,116	0,461
8-OHdG	0,404	0,101	16,007	1	0,000	1,498	1,229	1,825
Constante	5,096	2,161	5,561	1	0,018	163,345		

B; parámetro estimado. ET; error estándar. gl; grado de libertad. OR; Odds ratio 95% C.I. para OR; Intervalo de confianza al 95% del Odds ratio. C.I.; Intervalo de confianza

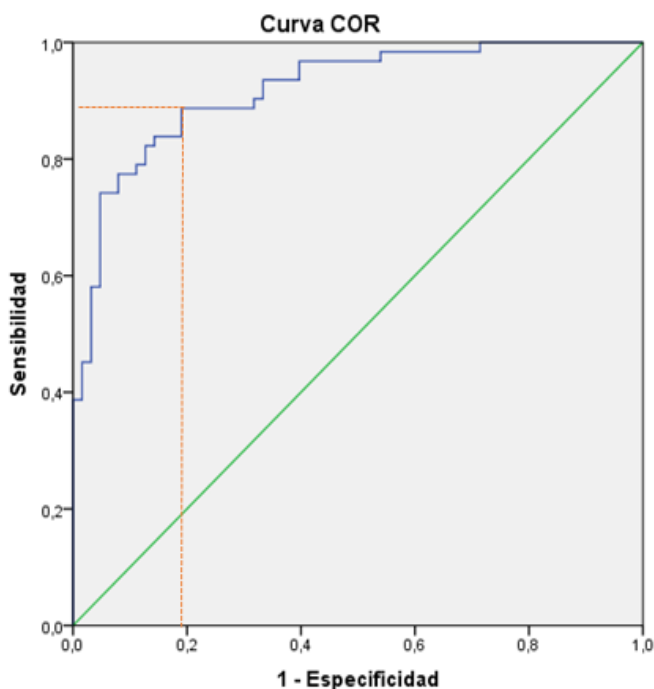
Por tanto, para calcular la probabilidad de que un individuo sea clasificado en el grupo de caso (con presencia de cáncer de mama), bastaría con sustituir las puntuaciones del sujeto para éstas variables, en la siguiente ecuación propuesta, donde p es la probabilidad de padecer cáncer de mama:

$$p(\text{Grupo} = 1) = \frac{1}{1 + e^{-(5.096 + (-0.097) \cdot \text{NSE} + (0.091) \cdot \text{CA15}_3 + (-0.224) \cdot \text{NGAL} + (-1.463) \cdot \text{EGFR} + 0.404 \cdot \text{OHdG} - 8)}}$$

### *Sensibilidad del modelo estimado.*

Para la realización de la curva COR (característica operativa del receptor) (Fig V.11) se han estimado los valores predictivos de probabilidad de cada sujeto en el modelo evaluado, y se han utilizado para modelizar la curva COR.

Los resultados muestran que tanto la sensibilidad como la especificidad varían según los puntos de corte, y que el área bajo la Curva COR es de 0.918, lo que indica un alto poder de discriminación del modelo (un 91.8% del máximo posible), siendo estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).



**Figura V.11. Curva COR sobre modelo estimado**

Como puede contrastarse, la curva presenta altos niveles de sensibilidad desde el comienzo, ya con niveles bajo de especificidad. Por último, el modelo estimado por la curva COR ha resultado estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ), lo que indica la pertinencia de dicho modelo a la hora de estimar la probabilidad de padecer cáncer de mama a partir de los biomarcadores NSE, CA15.3, NGAL, EGFR y 8-OHdG.

Por último, al incluir en un modelo únicamente NGAL (ng/ml), EGFR (ng/ml) y 8-OHdG (ng/ml) se explica el 45.9% de la variabilidad, mientras que insertando las cinco se eleva a 64.7%. Por ello, el modelo estimado con cinco variables realmente presenta mejores indicadores de capacidad predictiva que el compuesto únicamente con tres, ya que en el caso de ser reducido, se limitaría a priori la sensibilidad y especificidad del modelo.

#### *Índice de Youden del modelo estimado.*

Por último, se ha calculado el Índice de Youden para los valores estimados de la regresión logística clasificándolos en la curva ROC a partir del grupo original de estudio. El valor del índice de Youden es 0.6966, con un IC 95% (.5835 - .7768). Dicho punto se corresponde a una sensibilidad de .8871 y una especificidad de .8095.

*Análisis de correlación de los marcadores entre sí mismos.*

Por último, se ha realizado una matriz de correlaciones entre los diferentes biomarcadores analizados. Los resultados muestran correlaciones significativas en varios cruces de biomarcadores, como se recoge en la tabla V.8.

**Tabla V.8. Matriz de correlaciones entre biomarcadores.**

	NSE	CA15-3	CA19-9	CA125	AFP	CEA	NGAL	EGFR	8-OHdG
Cyfra	-0,221*	0,327**	0,118	-0,016	-0,045	0,310**	0,371**	0,051	0,099
NSE	-	-0,098	-0,027	0,047	0,042	-0,118	-0,211*	0,017	-0,117
CA15-3	-	-	0,351**	0,183*	0,073	0,182*	0,230**	-0,055	0,161
CA19-9	-	-	-	0,217*	0,185*	0,288**	0,007	-0,039	0,084
CA125	-	-	-	-	-0,019	0,216*	-0,111	-0,051	0,024
AFP	-	-	-	-	-	0,141	-0,017	0,120	0,008
CEA	-	-	-	-	-	-	0,202*	-0,104	0,076
NGAL	-	-	-	-	-	-	-	-0,154	0,121
EGFR	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,097

\*. La correlación es significativa en el nivel 0,05 (2 colas).

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

Concretamente se observan correlaciones significativas de Cyfra con los marcadores CA15-3, CEA y NGAL (todas ellas con relación directa, indicando que niveles altos de Cyfra se relacionan con niveles altos del resto de marcados, y a la inversa) y relación inversa significativa con NSE (a mayores niveles de Cyfra, menores niveles de NSE).

Igualmente destaca CA15-3 al presentar relación directa significativa con CA19-9, CA125, CEA y NGAL, mientras que CEA se relaciona con CEA, CA15-3, CA19-9 y CA125. Esta situación muestra que, exceptuando los marcadores EGFR y 8-OHdG donde no se establece ninguna relación significativa, en el resto de los marcadores existe en una u otra dirección una correlación con los otros marcadores.

Si contrastamos dicho resultado con el obtenido en la regresión logística se constata como de los cinco marcadores significativos para el modelo, dos de ellos no presenta relación con otros biomarcadores (EGFR y 8-OHdG), mientras que NSE (con dos correlaciones significativas, Cyfra y NGAL), CA15-3 (con cinco, CA19-9, CA125, CEA, NGAL y Cyfra) y NGAL (con tres, Cyfra, NSE y CA15-3) sí se relacionan con el resto de biomarcadores.

#### *Análisis bivariado de los marcadores en el grupo de casos con respecto al estadio de cáncer.*

Un objetivo secundario de nuestro trabajo era el análisis de los marcadores en relación al estadio de la enfermedad. Para ello, se ha estimado la diferencia entre tres grupos (mujeres con cáncer de mama en estadio I, II o III) usando los valores continuos de cada uno de los marcadores, recurriendo para ello a una prueba de contraste de medias basada en el test de Kruskal-Wallis, debido al bajo tamaño muestral de pacientes en el estadio III.

En la tabla V.9 se muestran los valores descriptivos para cada grupo en cada una de los biomarcadores.

**Tabla V.9. Estadísticos de los biomarcadores en el grupo de casos en función del estadio de cáncer**

		Estadio				
		Media	Mediana	Des. típica	Máximo	Mínimo
Cyfra [0,25 - 3,30] (ng/mL)	Estadio I	1,50	1,35	0,74	3,90	0,57
	Estadio II	1,79	1,44	1,00	5,29	0,77
	Estadio III	2,45	1,95	2,28	7,49	0,92
NSE [0 - 13] (ng/mL)	Estadio I	5,73	4,31	4,54	17,60	1,07
	Estadio II	7,90	5,83	6,97	28,21	1,52
	Estadio III	11,26	8,18	9,97	30,20	2,53
CA15-3 [0 - 30] (U/mL)	Estadio I	18,25	16,71	8,03	32,24	4,16
	Estadio II	19,25	17,68	11,29	60,35	4,86
	Estadio III	31,11	26,65	19,50	62,26	9,91
CA19-9 [0 - 40] (U/mL)	Estadio I	15,14	10,00	16,19	72,12	0,60
	Estadio II	9,69	8,79	7,05	26,76	0,60
	Estadio III	18,15	7,58	24,61	70,50	0,60
CA125 [0 - 35] (U/mL)	Estadio I	16,35	14,61	8,40	45,91	7,03
	Estadio II	14,37	13,75	8,62	48,93	6,39
	Estadio III	21,41	19,31	14,90	53,46	8,96
AFP [0 - 10] (U/mL)	Estadio I	2,17	1,84	1,16	4,39	0,61
	Estadio II	1,84	1,60	0,81	3,86	0,77
	Estadio III	2,13	1,51	1,06	3,70	1,25
CEA [0 - 4] (ng/mL)	Estadio I	2,08	1,90	1,35	6,66	0,51
	Estadio II	3,03	2,11	2,69	10,54	0,51
	Estadio III	2,65	1,45	2,38	7,40	1,15
NGAL (ng/ml)	Estadio I	4,13	3,75	1,74	8,62	1,81
	Estadio II	5,41	4,55	2,75	13,45	2,07
	Estadio III	4,84	3,69	2,91	10,29	1,81
EGF-R (ng/ml)	Estadio I	5,08	5,10	0,84	6,58	3,52
	Estadio II	4,97	5,13	1,05	6,83	2,80

8-OHdG (ng/ml)	Estadio III	5,29	5,25	0,83	6,45	3,98
	Estadio I	10,09	9,61	2,75	18,08	5,19
	Estadio II	11,18	12,15	4,69	21,15	0,23
	Estadio III	15,33	10,13	14,40	46,76	4,67

Los resultados de la prueba de significación, tal como se recoge en la tabla V.10 no muestra diferencias significativas para ningún marcador.

**Tabla V.10. Prueba de significación de los biomarcadores en función del Estadio de cáncer**

	Cyfra [0,25 - 3,30] (ng/m L)	NSE [0 - 104] (ng/m L)	CA15 -3 [0 - 30] (U/m L)	CA19 -9 [0 - 40] (U/m L)	CA12 5 [0 - 35] (U/m L)	AFP [0 - 10] (U/m L)	CEA [0 - 4] (ng/m L)	NGAL(n g/ml)	EGF R (ng/m l)	8- OHd G (ng/m l)
Chi- cuadra do gl Sig. asintóti ca	2,260 2 0,323	3,420 2 0,181	2,450 2 0,294	0,808 2 0,668	3,776 2 0,151	0,778 2 0,678	1,443 2 0,486	4,504 2 0,105	0,393 2 0,822	1,103 2 0,576

gl; grados de libertad

### 5.3 Estudio sobre la relación de variables epidemiológicas sobre el diagnóstico de cáncer de mama.

Paralelamente se han analizado las diferencias entre un conjunto de variables epidemiológicas (edad al diagnóstico, ocupación, antecedentes familiares, edad de menarquia, menopausia, número de hijos, lactancia, toma de anticonceptivos orales, THS, enfermedad mamaria benigna, tabaquismo, consumo de alcohol, IMC y nivel de vitamina D) entre una muestra de casos (mujeres diagnosticadas con cáncer de mama) frente a una muestra de control (mujeres sanas)

#### *Análisis bivariado de los marcadores con respecto al grupo control y de casos.*

En primer término, estimamos la diferencia entre ambos grupos estudiados, para las variables antes descritas. El consumo de alcohol ha sido eliminado del análisis por implicar a muy pocos sujetos ya que prácticamente todas las mujeres incluidas en ambos grupos respondieron “no” (=no bebe nunca ó = bebe ocasionalmente)

Para los valores continuos de cada uno de los marcadores considerados cuantitativos (edad, edad de menarquía, IMC y nivel de vitamina D), se ha decidido recurrir a pruebas paramétricas debido al tamaño muestral utilizado. Tabla V.11. que podemos ver a continuación.

En primer lugar, se muestran los valores descriptivos para cada grupo en cada una de las variables epidemiológicas analizadas, tal como hicimos en el capítulo anterior. Se han utilizado en la tabla V.11 la media, mediana y desviación típica para variables cuantitativas y, por otro lado, en la tabla V.12, se han empleado frecuencias y porcentajes para las variables consideradas categóricas.

**Tabla V.11. Estadísticos de las variables epidemiológicas cuantitativas analizados en función del grupo**

		Media	Mediana	Desviación típica	Máximo	Mínimo
Edad	Controles	45.23	42,00	10.73	79,00	23
	Casos	57.79	58,00	15.25	88,00	28
Edad menarquía	Controles	12.56	13,00	1.30	15,00	10
	Casos	12.68	13,00	1.41	16,00	9
IMC	Controles	24.43	24,09	3.43	36,75	18
	Casos	28.23	27,00	5.96	54,00	18
Vit. D (ng/ml)	Controles	53.18	56,70	17.17	88,50	20,85
	Casos	45.50	43,50	14.77	94,50	17,19

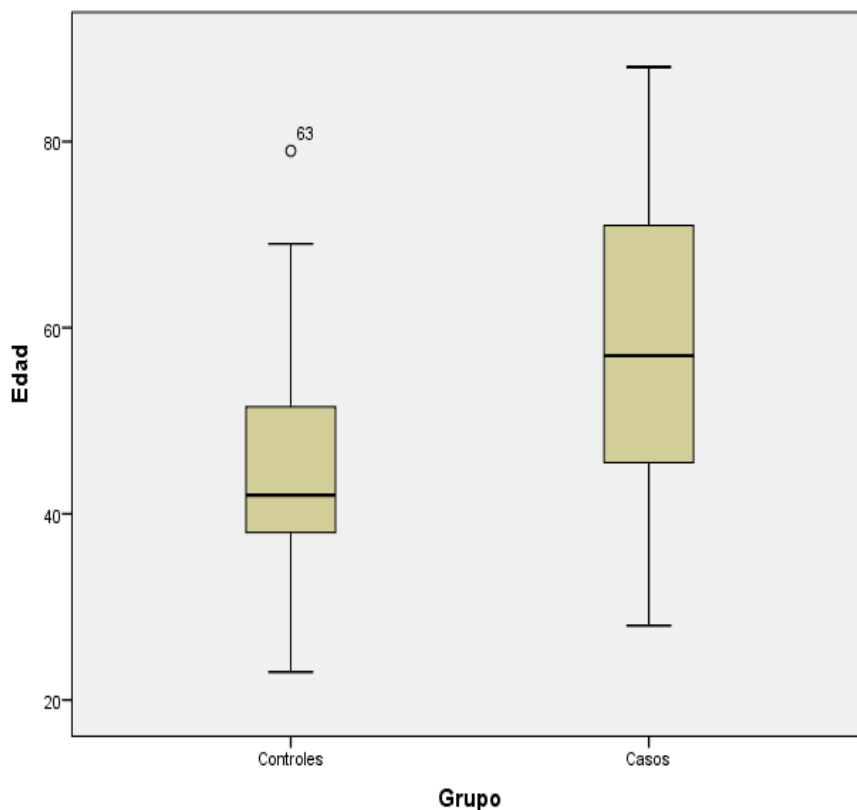
**Tabla V.12. Estadísticos de las variables epidemiológicas categóricas analizados en función del grupo**

		Grupo			
		Controles		Casos	
		Frecuencia	%	Frecuencia	%
Ocupación	No trabaja	18	28,57	33	52,40
	Trabaj	45	71,43	30	47,60

Antecedentes	No	39	61,90	42	66,70
	Sí	24	38,10	21	33,30
Familiars	No	45	71,43	22	34,90
	Sí	18	28,57	41	65,10
Menopausia	No	11	17,46	12	19,00
	Sí	52	82,54	51	81,00
Hijos	No	26	41,27	30	47,60
	Sí	37	58,73	33	52,40
Lactancia	No	36	57,14	47	74,60
	Sí	27	42,86	16	25,40
ACO	No	59	93,65	60	94,40
	Sí	4	6,35	3	5,60
THS	No	39	61,90	47	74,60
	Si	24	38,10	16	25,40

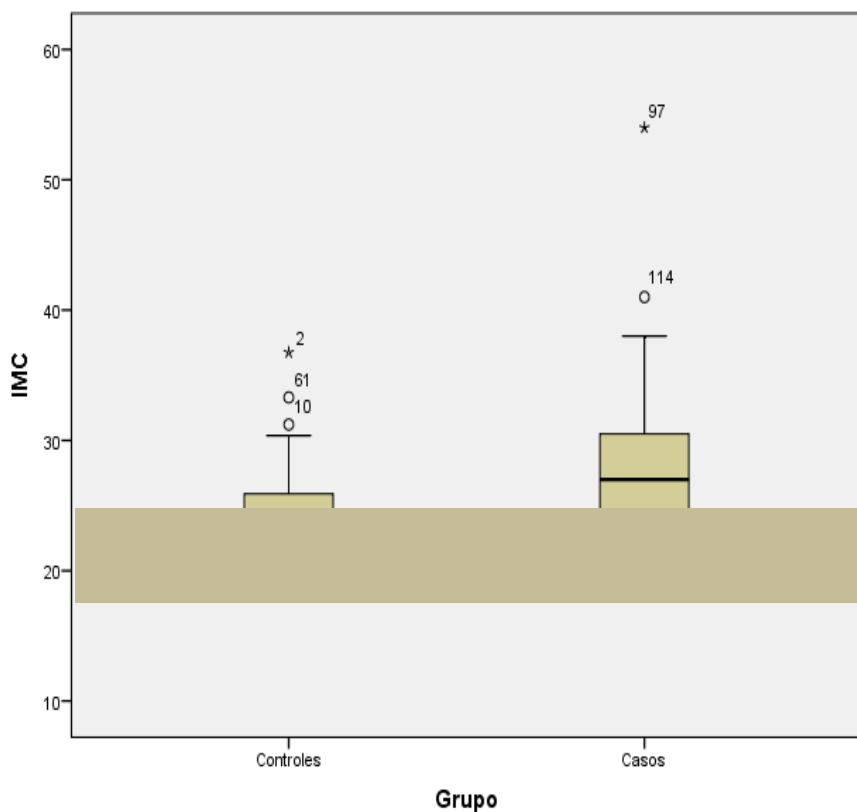
Los resultados de las pruebas de significación referidas a las variables cuantitativas, tal, muestran que sí existen diferencias significativas entre la **edad, IMC y nivel de Vitamina D** para el grupo de casos respecto del grupo control.

Concretamente los resultados muestran, en el caso edad, una diferencia estadísticamente significativa, con un mayor edad media el grupo de mujeres con cáncer de mama ( $M = 57,79$ ,  $Mdn = 58$  y  $DT = 15,25$ ) frente al grupo de mujeres sanas ( $M = 45,23$ ,  $Mdn = 42$  y  $DT = 10,73$ ), como puede observarse en la figura V.12.



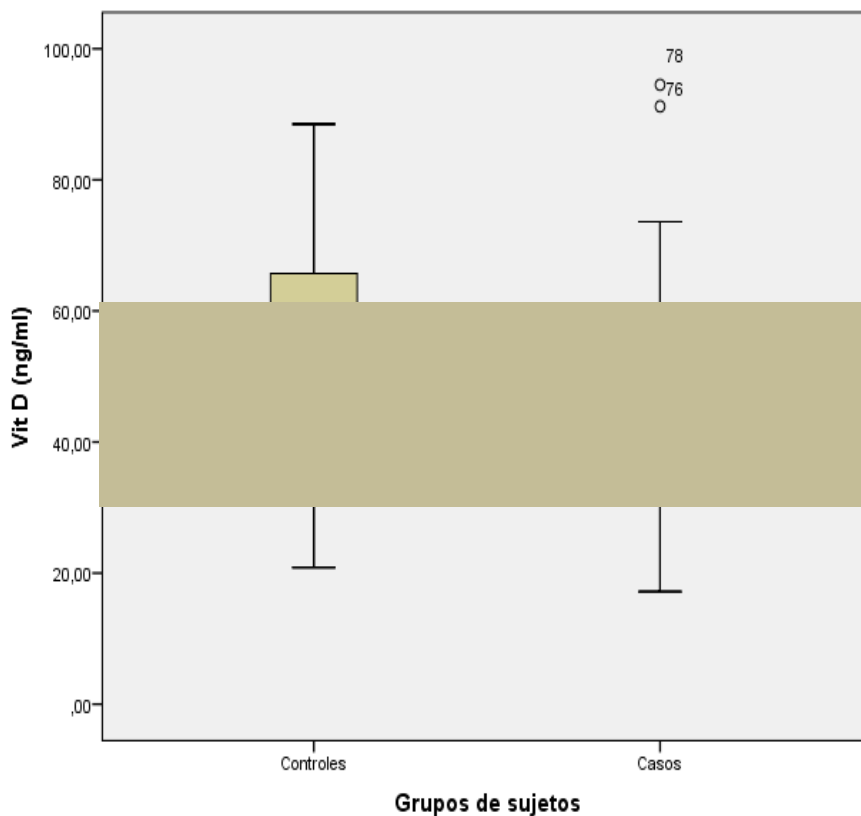
**Figura V.12. Comparación de la edad media en el grupo de controles (mujeres sanas) 45,23 años, en comparación con el grupo de casos (mujeres con cáncer de mama) 57,79 años ( $p < 0,05$ ).**

Por otro lado, los resultados de la prueba de significación muestran concretamente en el caso del IMC una diferencia estadísticamente significativa, con un mayor nivel de IMC en el grupo de mujeres con cáncer de mama ( $M = 28,23$ ,  $Mdn = 27$  y  $DT = 5,96$ ) frente al grupo control ( $M = 24,43$ ,  $Mdn = 24,09$  y  $DT = 3,43$ ), como se recogen en la figura V.13.



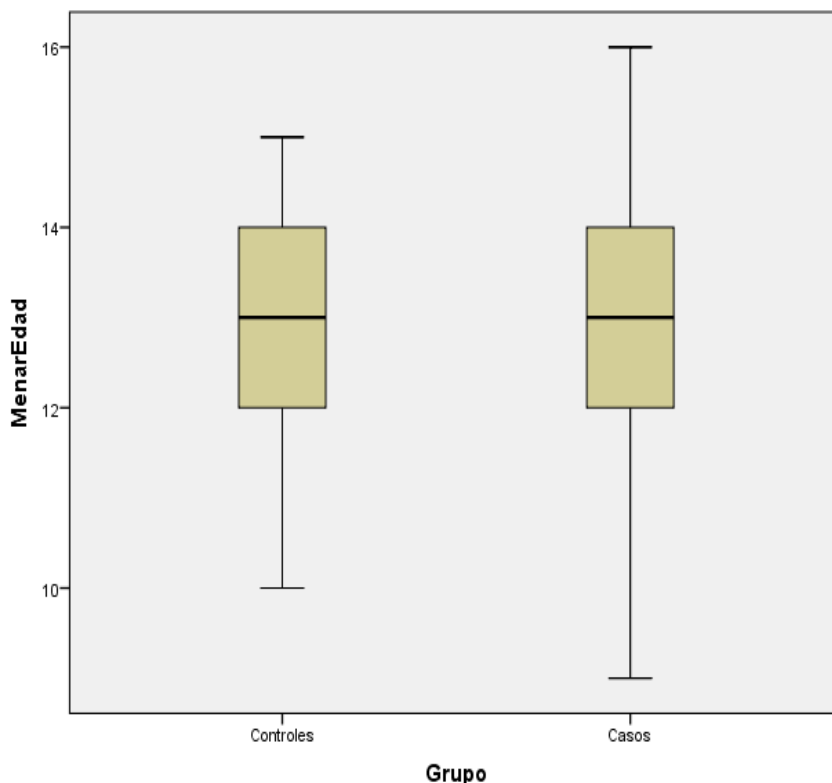
**Figura V.13. Comparación del IMC en el grupo de controles (mujeres sanas) 24,43, en comparación con el grupo de casos (mujeres con cáncer de mama) 28,23 ( $p < 0,05$ ). (niveles normales en área sombreada)**

En cuanto a Vitamina D, se observan diferencias estadísticamente significativas, con niveles mayores de este marcador en el grupo de mujeres sanas ( $M = 53,18$ ,  $Mdn = 56,70$  y  $DT = 17,17$ ) frente al de mujeres con cáncer de mama ( $M = 45,50$ ,  $Mdn = 43,50$  y  $DT = 14,85$ ), como se recoge en la gráfica V.14.



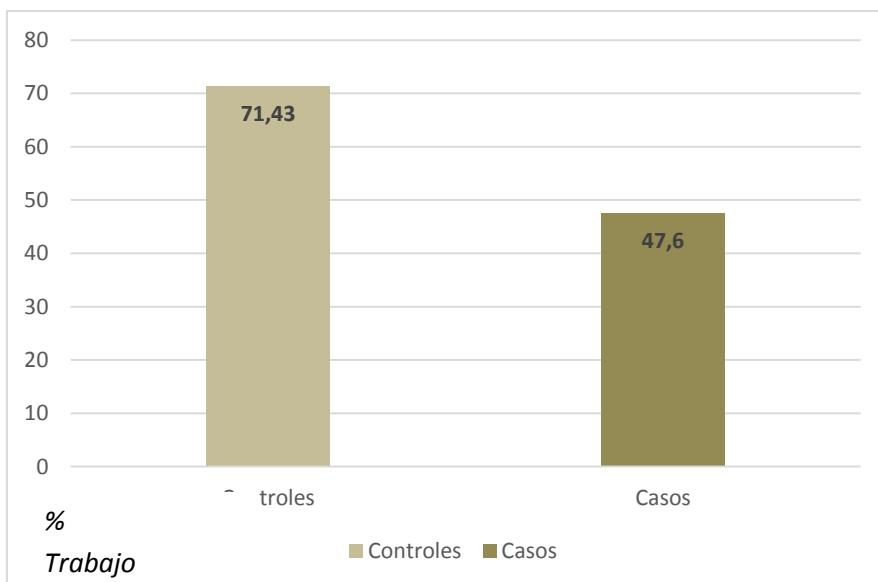
**Figura V.14. Comparación de los niveles de vitamina D (ng/ml) en el grupo de controles (mujeres sanas) 53,18 ng/ml, en comparación con el grupo de casos (mujeres con cáncer de mama) 45,50 ng/ml ( $p=0,010$ ). (niveles normales en área sombreada)**

La última variante cuantitativa es la edad de la menarquia; en nuestro caso no es significativa manteniendo una igualdad en ambos grupos. Obtenemos edades en el grupo de mujeres sanas ( $M = 12,56$   $Mdn = 13$  y  $DT = 1,30$ ) frente al de mujeres con cáncer de mama ( $M = 12,65$ ,  $Mdn = 13$  y  $DT = 1,41$ ), como se recoge en la gráfica V.15.

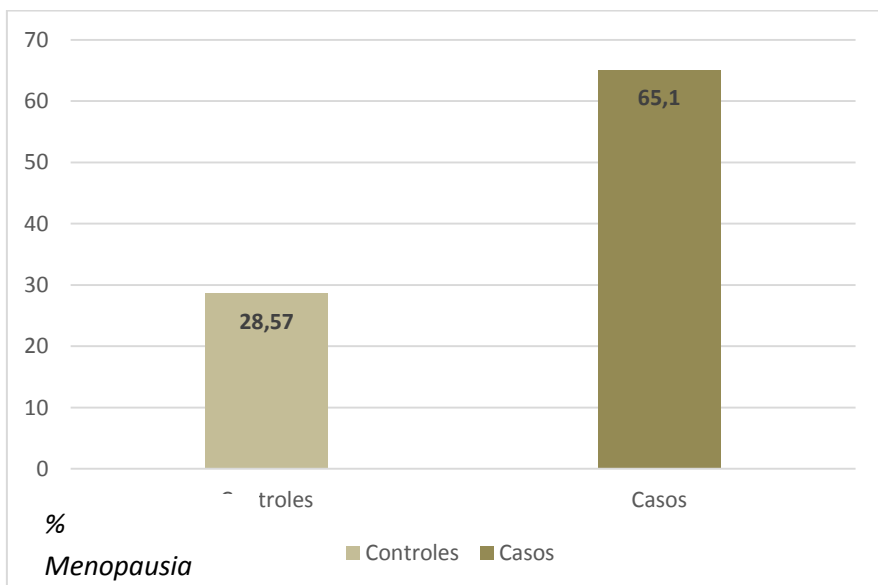


**Figura V.15. Comparación de la edad de la menarquia en años en el grupo de controles (mujeres sanas) 12,56 años, en comparación con el grupo de casos (mujeres con cáncer de mama) 12,65 años ( $p=0,730$ )**

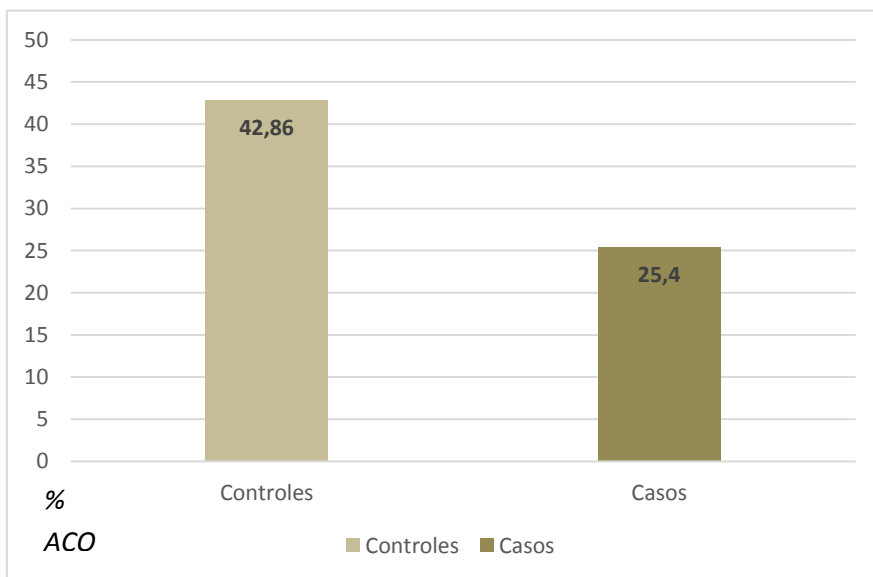
Por último, en cuanto a variables categóricas con diferencias significativas, se observa que en los grupos control hay un mayor porcentaje de mujeres que trabajan (71.43% frente al 47.60% del grupo de casos), menor presencia de menopausia (28.57% frente a 65.10%) y mayor presencia de ACO (42.86% frente a 25.40%).



**Figura V.16. Comparación del nivel de ocupación el grupo de controles (mujeres sanas) 71,43 %, en comparación con el grupo de casos (mujeres con cáncer de mama) 47,6 %s ( $p=0,006$ ).**



**Figura V.17. Comparación de la existencia de menopausia en el grupo de controles (mujeres sanas) 28,57 %, en comparación con el grupo de casos (mujeres con cáncer de mama) 65,1 % ( $p<0,05$ ).**



**Figura V.16. Comparación de la existencia de consumo de ACO en el grupo de controles (mujeres sanas) 42,86 %, en comparación con el grupo de casos (mujeres con cáncer de mama) 25,4 % ( $p < 0,05$ )**

Los resultados obtenidos en las pruebas de significación se resumen a continuación en las tablas en las tablas V.13 y V.14.

**Tabla V.13. Prueba de significación de las variables epidemiológicas cuantitativas en función del grupo**

		t de Student	gl	Sig. Asintótica (bilateral)
Edad	No se han asumido varianzas iguales	-5,344	111,26	0,000
	Se han asumido varianzas iguales	-0,493	124	0,623
IMC	No se han asumido varianzas iguales	-4,393	99,102	0,000
	Se han asumido varianzas iguales	2,680	123	0,008

gl; grado de libertad

**Tabla V.14. Prueba de significación de las variables epidemiológicas categóricas en función del grupo**

	chi cuadrado	gl	Sig. Asintótica (bilateral)
Ocupación	7,412	1	0,006
Antecedentes Familiares	0,311	1	0,577
Menopausia	16,862	1	0,000
Hijos	0,053	1	0,818
Lactancia	0,514	1	0,473
ACO	4,272	1	0,039
THS	0,151	1	0,697
Fumadora	2,706	1	0,100

gl; grado de libertad

### *Regresión Logística binaria.*

A continuación se procede a establecer una regresión logística binaria para evaluar la asociación multivariante entre las diferentes variables epidemiológicas que han resultado significativas en el paso previo con respecto al grupo de casos y de control, con el objetivo de detectar posibles interrelaciones entre dichas variables.

Se ha llevado a cabo un procedimiento de Regresión Logística Binaria que como ya se explicó en el método, se elige este análisis al tratarse la variable dependiente como variable cualitativa dicotómica. Hemos ido introduciendo todas las variables significativas en el modelo previo, incluyendo 126 sujetos en el análisis. La codificación de la vitamina D ha sido Controles = 0, Casos = 1, incluyéndose en el modelo como variables categóricas la

ocupación (0 = no trabaja, 1 = trabaja), la menopausia (0 = no, 1 = sí) y el ACO (0 = no, 1 = sí) y como variables continuas la edad, el IMC y el nivel de vitamina D.

Según el coeficiente de determinación, con éste modelo se explica un 25,3% de la varianza (o un 33,8% mediante la  $R^2$  corregida de Nagelkerke). Así mismo, la Prueba de Hosmer y Lemeshow indica que el ajuste del modelo estimado es adecuado ( $p > 0.05$ )

Según la tabla de clasificación se comprueba que el modelo tiene una sensibilidad alta (79,4%) y una especificidad media (63,9%), clasificando adecuadamente al 71,8% de los sujetos en los respectivos grupos de casos y controles.

En la tabla V.15. se incluyen los parámetros estimados para cada una de las variables incluidas en el modelo. Como puede apreciarse, sólo la edad y el IMC presentan en este análisis multivariante una relación positiva con la presencia de cáncer.

**Tabla V.15. Parámetros del modelo final estimado mediante regresión logística**

	B	ET	Wald	gl	Sig.	OR	95% C.I. para OR	
							Inferior	Superior
Edad	0,068	0,030	5,293	1	,021	1,071	1,010	1,135
Ocupación	-0,246	0,511	0,232	1	0,630	0,782	0,287	2,129
Menopausia	0,421	0,731	0,332	1	0,564	1,524	0,364	6,389
ACO	0,362	0,456	0,633	1	0,426	1,437	0,588	3,509
IMC	0,145	0,057	6,343	1	0,012	1,156	1,033	1,293
Vitamina D	-0,009	0,014	0,444	1	0,505	0,991	0,965	1,018

Constante	-7,204	2,524	8,145	1	0,004	0,001
-----------	--------	-------	-------	---	-------	-------

B; parámetro estimado. ET; error estándar. gl; grado de libertad. OR; Odds ratio 95% C.I. para OR; Intervalo de confianza al 95% del Odds ratio. C.I.; Intervalo de confianza

Los resultados muestran cómo la vitamina D, que en el análisis bivariado resultaba significativa, en el modelo multivariante no aporta capacidad predictiva. La explicación de dicho resultado queda evidente cuando se analiza la correlación entre la vitamina B, la edad y el IMC. En la siguiente tabla podemos observar el análisis de correlación entre los tres parámetros.

**Tabla V.16. Análisis de correlación de Pearson entre el nivel de Vitamina D, edad e IMC.**

	IMC	Vit.D
Edad	,364**	-,334**
IMC	1	-,206*

\* Significativo a  $p < 0,05$ ;

\*\* Significativo a  $p < 0,01$

Como se puede observar, existe una correlación significativa e inversa de la variable vitamina D con respecto a la edad y al IMC, mientras que la relación es significativa y directa entre IMC y edad. Esta relación significativa de la edad y el IMC sobre la vitamina D puede ser una de las explicaciones de la no significatividad del nivel de vitamina D. O sea, el estudio multivariante indica que la edad y el IMC se correlacionan inversamente con los niveles de vitamina D, por lo que a la hora de predecir la probabilidad de padecer cáncer, la edad y el IMC por sí mismos darían más información que

la vitamina D. En todo caso, este análisis con resultado diferente al estudio bivariado no invalida los niveles de vitamina D como factor de riesgo para la enfermedad.

### *Regresión logística binaria del modelo de variables epidemiológicas y biomarcadores.*

A continuación se procede a establecer una regresión logística binaria que contrasta si la combinación de las variables epidemiológicas y los biomarcadores, añade una mejora con respecto a los modelos previos.

Se ha llevado a cabo un procedimiento de Regresión Logística Binaria mediante inclusión (hacia adelante) por el método de Wald incluyendo 126 sujetos en el análisis. La codificación de la variable dependiente ha sido Controles = 0, Casos = 1, no incluyéndose más variables categóricas en el modelo.

Según el coeficiente de determinación, con éste modelo se explica un 51.8% de la varianza (o un 69.1% mediante la  $R^2$  corregida de Nagelkerke). Así mismo, la Prueba de Hosmer y Lemeshow indica que el ajuste del modelo estimado es bueno ( $p > 0.05$ ).

Sin embargo, si se contrasta lo que el modelo de variables epidemiológicas añade al modelo de biomarcadores, únicamente se registra un incremento de varianza explicada del 5,1%, resultando, no obstante, dicha mejora significativa en base a la prueba ómnibus del modelo ( $p = 0,005$ ).

Concretamente, en este modelo se conserva todos los biomarcadores incluidos de inicio (NSE, CA15.3, NGAL, EGFR y 8-OHdG), mientras que de las variables epidemiológicas sólo se conserva el IMC.

Según la tabla de clasificación se comprueba que el modelo tiene una Sensibilidad alta (88.5%) y también una Especificidad alta (82.3%), clasificando adecuadamente a los sujetos en los grupos de casos y controles.

En la tabla V.17 se incluyen los parámetros estimados para cada una de las variables incluidas en la ecuación, observándose pocas diferencias con los parámetros de la tabla V.7 de los parámetros de los biomarcadores sin incluir el IMC.

**Tabla V.17. Parámetros del modelo final estimado mediante regresión logística de los indicadores epidemiológicos y de los biomarcadores.**

	B	ET	Wald	gl	Sig.	95% C.I. para OR		
						OR	Inferior	Superior
NSE	-0,104	0,032	10,896	1	0,001	0,901	0,847	0,959
CA15.3	0,088	0,038	5,328	1	0,021	1,092	1,013	1,178
NGAL	-0,287	0,111	6,627	1	0,010	0,751	0,603	0,934
EGFR	-1,469	0,383	14,713	1	0,000	0,230	0,109	0,487
8-OHdG	0,351	0,107	10,673	1	0,001	1,420	1,151	1,753
IMC	0,210	0,078	7,362	1	0,007	1,234	1,060	1,437
Constante	0,643	2,705	0,057	1	0,812	1,903		

B; parámetro estimado. ET; error estándar. gl; grado de libertad. OR; Odds ratio 95% C.I. para OR; Intervalo de confianza al 95% del Odds ratio. C.I.; Intervalo de confianza

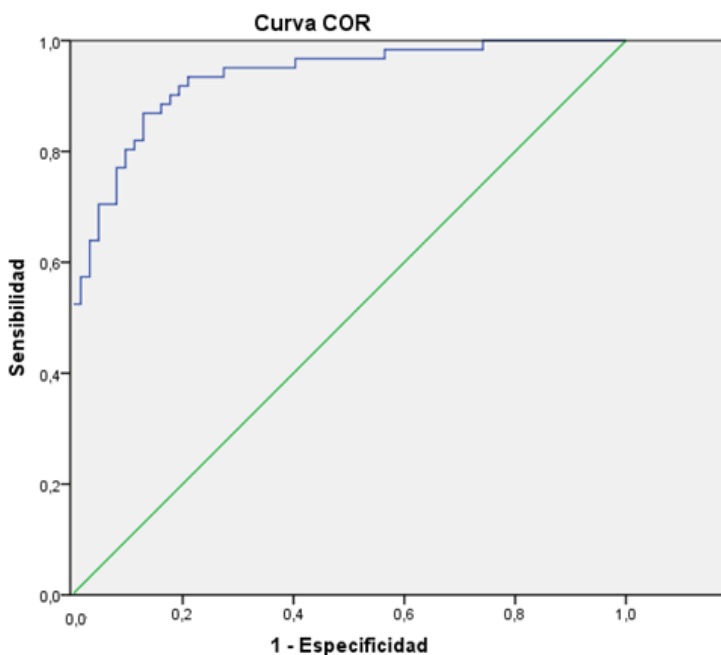
Según estos parámetros exponemos una nueva ecuación donde  $p$  es la posibilidad de padecer cáncer de mama;

$$p(\text{Grupo} = 1) = \frac{1}{1 + e^{-(0.643 + (-0.104) \cdot NSE + (0.088) \cdot CA15_3 + (-0.287) \cdot NGAL + (-1.469) \cdot EGFR + 0.351 \cdot OHdG - 8 + 0.210 \cdot IMC)}}$$

*Sensibilidad del modelo estimado.*

Como hicimos anteriormente, procedemos a la realización de la nueva curva COR (Fig V.17) se han estimado los valores predictivos de probabilidad de cada sujeto en el modelo evaluado, y se han utilizado para modelizar la curva COR.

Los resultados muestran que el poder predictivo es muy elevado con una sensibilidad muy alta y por tanto indica un alto poder de discriminación del modelo.



**Figura V.17. Curva COR sobre modelo estimado**

#### **5.4 Resumen final de los resultados del estudio.**

En resumen, los resultados muestran como la mayoría de marcadores, utilizando sus rangos comerciales, tienen una muy limitada capacidad predictiva, derivado principalmente de la poca frecuencia de positivos (por encima del rango aceptable) de los sujetos, tanto en el grupo de controles como de casos.

Sin embargo, la utilización de los marcadores como valores continuos ofrece una mayor capacidad predictiva. Concretamente Cyfra, NSE, CA15-3, CEA, EGF-R y 8-OHdG ofrecen diferencias significativas entre ambos grupos. De estos resultados, se desprende un modelo predictivo compuesto por NSE, CA15-3, NGAL, EGF-R y 8-OHdG, realizado a partir de una regresión logística, en el que la capacidad de bien clasificados supera el 85% de los casos.

Por último, el estudio de otras variables sociodemográficas ha mostrado diferencias entre ambos grupos en la edad de los sujetos, el IMC, los niveles de Vitamina D, el tipo de ocupación, la presencia de la menopausia y el ACO. A pesar de que mediante una regresión logística se constituyó un modelo predictivo a partir de estas variables, dicho modelo clasificó adecuadamente a más del 70% de los sujetos, lo cual mostró que a pesar de no ser variables de orden clínico, la capacidad predictiva del modelo generado a partir de estas variables se sitúa con niveles de sensibilidad y especificidad adecuados.

Con todo ello, se ha logrado una definición adecuada del grupo de cáncer de mama frente al grupo de mujeres sanas usando,

por un lado, una serie de biomarcadores y, por otro, una combinación de variables sociodemográfica, todo ello con una adecuada capacidad predictiva.

## CAPÍTULO VI: DISCUSION

---

## 6. Discusión

### 6.1 Análisis General

Globalmente podemos considerar que nuestros resultados aportan hallazgos relevantes en el estudio del cáncer de mama. Por un lado el estudio de marcadores indica que los marcadores “rutinarios” no son útiles para las fases precoces de la enfermedad, aunque algunos de ellos presentan diferencias significativas siendo más elevados en los casos. Sin embargo, no se elevan por encima de los valores estándares y por tanto no son aptos para realizar un diagnóstico precoz por sí mismos. Por otra parte, de los tres marcadores experimentales utilizados hay dos (EGFR y 8-OHdG) que arrojan claras diferencias significativas entre ambos grupos, estos marcadores son esperanzadores y por tanto tendrían que ser objeto de estudios con mayor profundidad.

Respecto al análisis de los diferentes factores de riesgo; teniendo en cuenta que el objetivo principal del trabajo no era ese y que la muestra era pequeña para un estudio epidemiológico al uso, podemos extraer evidencias muy interesantes y coincidentes con macroestudios realizados en la materia. Así destacan la edad, el IMC y los niveles bajos de vitamina D como factores relacionados con la presencia de cáncer de mama. La existencia de menopausia y paradójicamente la menor toma de ACO también se asociaron al cáncer de mama significativamente. Por último, el papel de la falta de ocupación laboral como factor de riesgo es si cabe más interesante. La discusión sobre todos estos hallazgos la realizamos en los apartados siguientes.

## 6.2 Discusión sobre el estudio de marcadores

La batería de marcadores analizados ha sido muy amplia y ha incluido todos los marcadores rutinarios que de una forma u otra se utilizan en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de mama. Tanto los más específicos (CEA y Ca 15.3) como aquellos que se usan con mayor frecuencia en otras patologías oncológicas (Cyfra, NSE, Ca 125, Ca 19.9 y AFP).

En la prueba de significación obtuvimos diferencias significativas para Cyfra, NSE, Ca 15.3 y CEA. Cuando asumimos los puntos de corte, suministrado por los propios fabricantes, ningún marcador, excepto Ca 15.3, resulta significativamente diferente. Por tanto, el único que mantenía niveles medios elevados por encima de los rangos del grupo control fue el Ca.15.3. Por ello podríamos considerarlo el más específico de todos los ensayados, lo que coincide con la bibliografía (Eskelinen, 1997; Chen, 2014). Sin embargo hay que tener en cuenta que el nivel de casos con los niveles elevados sólo fue del 11,29 %, por lo que la sensibilidad del marcador obtenida es baja. Este dato es coherente con multitud de estudios previos donde se constata que en el cáncer de mama precoz, la sensibilidad del Ca 15.3 es baja y que depende del estadio de la enfermedad (Lumachi et al. 2004; Molina et al., 2010); así en Estadios I, la posibilidad de que el marcador se eleve, es tan solo del 10 %, en Estadios II del 20 %, en Estadios III del 40% y ya en Estadios IV del 75% (Duffy, 2006). En el estudio de Molina (2010), la posibilidad de elevación en una muestra muy amplia de mujeres con cáncer de mama primario fue del 19%. Comparado con nuestro

resultado (11%) es un valor superior con mayor sensibilidad pero hay que tener en cuenta que en el estudio se incluyeron muchas pacientes con T3 y T4; sin embargo en nuestro estudio las pacientes con T4 no se incluyeron y solo había un 5% de T3.

En cuanto a la especificidad del Ca 15.3, debemos recordar que aunque mayor que la sensibilidad, sigue siendo limitada; más aún si se persigue un uso en diagnóstico precoz y por tanto evitar los falsos positivos. Así, según la misma bibliografía citada anteriormente, la especificidad es media debido principalmente a que existen multitud de situaciones clínicas no cancerígenas en las que puede elevarse y por tanto producir un falso positivo (infecciones pulmonares, enfermedades autoinmunes, quistes ováricos, insuficiencia renal, cirrosis, anemia megaloblásticas y otros tumores como el cáncer de ovario) (Molina et al., 2013). Otro estudio realizado en muestras de 72 mujeres con cáncer de mama, 19 con patología mamaria benigna y 45 controles sanos, obtuvo elevación del marcador Ca15.3 en un 37 % de cáncer de mama, 12 % del grupo de patología mamaria benigna y 14 % del grupo controles sanos. Además de reflejar la disparidad de resultados positivos obtuvo solo diferencias significativas en la comparación con el subgrupo de pacientes en estadios II y III en línea con el argumento ya comentado sobre la relación directa entre la carga tumoral y la elevación de Ca 15.3, lo que cuestiona su validez como marcador en diagnóstico precoz (Atoum et al., 2012). Nuestros datos presentan alta especificidad sin contabilizarse ningún falso positivo en el grupo control. Este hecho podría deberse a que son

mujeres sanas y sin patología crónica benigna; por tanto sin existir potencialmente causa de falsos positivos.

Un trabajo análogo al nuestro fue publicado en 2012 por un grupo holandés (Annemieke et al., 2012), en el que analizaron 10 marcadores tumorales (Ca 15.3, CEA, Ca 125, Ca 19.9, alfafetoproteína, prolactina, osteopontin, haptoglobina, leptina y el factor inhibitorio de la migración) medidos en 68 mujeres con cáncer de mama y 68 controles sanos y no se encontraron diferencias significativas con ningún marcador individual ni tampoco combinados en forma de panel.

En base a nuestros resultados **desaconsejamos el uso de estos marcadores en el diagnóstico precoz del cáncer de mama**, lo que es congruente con los consensos internacionales y las guías de práctica clínica. Sin embargo se produce actualmente un uso indebido de los marcadores “específicos” (CEA y Ca 15.3) o del resto de marcadores en la fase diagnóstica de la enfermedad, que no está justificado en base a hallazgos científicos.

Lógicamente existe gran preocupación en los gestores sanitarios, responsables de laboratorios y muchos médicos implicados, ya que se constata el desconocimiento y la *mala praxis* en la prescripción de marcadores tumorales. Además de los consensos internacionales, las distintas sociedades científicas han intentado regular esta cuestión y protocolizarla (Algara y Sabadell, 2013; Henry et al, 2014), sin mucho éxito hasta la fecha.

La actuación de los profesionales de atención primaria es básica en esta materia ya que es el mayor colectivo de potenciales prescriptores. Sus consensos y protocolos han desaconsejado el uso en el diagnóstico precoz de estos marcadores, tal como se expone en la excelente revisión dirigida por el médico de atención primaria Gustavo Teresa en colaboración con medicina interna (Teresa et al., 2002). Un estudio americano realizado en 40.000 mujeres con cáncer de mama comparó los costes de unas 17.000 pacientes que habían sido sometidas a seguimiento con la realización de marcadores tumorales (CEA, Ca 15.3 o Ca 27.29) durante 2 años, frente al resto donde no se había determinado ningún marcador. El sobrecoste del primer grupo fue un 29.4 % mayor. No se detectaron más recidivas en el grupo de seguimiento con marcadores, pero si fueron sometidas a más estudios radiológicos (Ramsey et al., 2014).

Nuestra opinión es que debiera regularse el abandono de estas peticiones de marcadores tanto en el contexto clínico del screening como en el clínico de pacientes con nódulos mamarios en estudio por parte de cirujanos, ginecólogos o médicos de atención primaria. El ahorro consiguiente en un uso racional y restrictivo de los marcadores tumorales en la fase diagnóstica podría repercutir muy beneficiosamente en otros recursos necesarios en la sanidad pública. El coste-oportunidad del uso de estos marcadores refleja una ingente cantidad de actuaciones eficientes que podrían ponerse en marcha con un uso responsable de los mismos (Rodríguez, 2005; Ocaña y Aceituno, 2014).

En cuanto al marcador NGAL no ha presentado diferencias significativas respecto al grupo control, lo cual no es coincidente con parte de la bibliografía disponible donde se han observado niveles significativamente elevados de NGAL y MMP9 en suero (Provatopoulou et al., 2009) o en orina (Fernández et al., 2005). Nuestro estudio cuestiona dicha utilidad y los mismos autores reconocen que los trabajos se han realizado con muestras pequeñas y son poco concluyentes, precisándose nuevos estudios para determinar la verdadera eficacia del marcador.

Diferente enfoque planteamos respecto al análisis de los otros dos marcadores experimentales analizados. El análisis del EGFR resulta muy interesante ya que nos indica significación (al elevarse en el grupo control frente al grupo casos). Aunque estos resultados podrían interpretarse como paradójicos, en realidad son comprensibles si revisamos resultados de otros trabajos previos. Un estudio inglés sobre los niveles de EGFR, realizado en 57 mujeres con cáncer de mama y 57 controles, reveló unos niveles significativamente más elevados en las mujeres sanas (mediana 75.3 ng/ml frente a 59.3 ng/ml en pacientes, ( $p < 0.001$ )) (Asgeirsson et al., 2007) lo que coincide con nuestros resultados.

Sin embargo, Hutchinson estudió un grupo de mujeres pertenecientes a la cohorte del estudio WHY-OS (Women's Health Initiative Observational Study) comparando 93 casos con 93 controles y analizando 6 marcadores proteicos, y el único significativo fue el EGFR, elevado en los casos con una OR de 1,44 ( $p = 0.0008$ ) (Hutchinson, 2011).

En un trabajo reciente encontramos diferencias significativas con niveles elevados de EGFR en 96 pacientes frente a 30 controles sanos (Tas et al., 2015). A dicha confusión se le une el problema de la escasez de estudios en esta área por lo que podríamos asumir el texto introductorio de Tas; *“los niveles séricos de EGFR (sEGFR) han sido objeto de relativamente pocos informes, y los resultados de los estudios son contradictorios. Se describió que los pacientes con cáncer de mama mostraron disminución de los niveles de proteína sEGFR comparados con los sujetos control sanos, mientras que otros encontraron niveles de aumento de o ninguna diferencia entre sujetos sanos y pacientes.”*

De momento pues, y a la espera de nuevos estudios, no es recomendable el uso de los niveles EGFR como marcador del cáncer de mama precoz.

Por otro lado sabemos que el estrés oxidativo está presente desde las fases iniciales del cáncer, y que la cuantificación sérica del 8-OH-dG es uno de los parámetros más validados para medir el estrés oxidativo (Valavanidis et al., 2009). Sin embargo sorprende sobremanera la escasez de estudios que hay en este campo, teniendo en cuenta además la potencialidad de uso en un área tan necesitada como es la oncología. El profesor Navarro, director de este trabajo, participa en un equipo con experiencia mundial en este área (García-Sevillano et al., 2014) por lo que decidimos incluirlo entre el conjunto de marcadores de este estudio.

No hemos encontrado **ninguna referencia** sobre la medición del 8-OH-dG como marcador precoz del cáncer de mama, sin embargo a nivel teórico subyacía en la comunidad científica la hipótesis de que los niveles de 8-OH-dG podrían elevarse en fases iniciales del cáncer de mama como reflejo del estrés oxidativo provocado por los cambios displásicos incipientes (Valavanidis et al., 2009). Pues bien; los resultados de este estudio confirman por primera vez que la elevación del marcador 8-OH-dG es significativa en el grupo casos ( $p < 0.0005$ ) y por tanto podría confirmarse como un nuevo marcador precoz para cáncer de mama. En este sentido, y destinado a la validación de dicho parámetro como marcador precoz de cáncer de mama, el primer paso sería realizar un nuevo estudio en una muestra amplia de controles, para definir los rangos estándar de la población sana. Posteriormente mediante un estudio multicéntrico se mediría el marcador en distintas situaciones de pacientes con cáncer de mama (diagnóstico precoz, fase prequirúrgica, en seguimiento, enfermedad avanzada, etc.) comparado con grupo control para definir la sensibilidad, especificidad y valor predictivo del marcador.

Otro objetivo de nuestro trabajo fue establecer una posible correlación entre los distintos marcadores. En pocos trabajos se ha realizado este estudio y con resultados contradictorios. Así por ejemplo, en un trabajo realizado con Ca 15.3 y CEA no se encontró correlación entre ambos (Moazzezy et al, 2014). En nuestro trabajo encontramos correlación generalmente positiva entre la mayoría de marcadores. Solo dos marcadores; EGFR y 8-OHdG no mantienen ninguna correlación con los demás. La explicación pudiera ser que

el origen biológico y funcional es distinto a los demás marcadores y no comparten tantas similitudes. No obstante se desconoce una aplicación clínica de estas asociaciones en sí mismas, más allá de la creación de un modelo combinado que ofrezca mayor sensibilidad predictiva, tal como exponemos a continuación.

Existen numerosos investigadores que han estudiado diferentes combinaciones de varios marcadores para así optimizar la sensibilidad y especificidad del método (Pedersen et al, 2013). Estos aspectos son muy importantes cuando se pretende generalizarlos en el ámbito del diagnóstico precoz tal como establecía ya Wilson (1969) en sus condiciones para una determinada prueba de *screening*.

Así mediante la regresión logística, hemos encontrado un modelo final compuesto por una ecuación que es capaz de discriminar un caso con una potencia estadística del 91.8 %. Nuestra ecuación está compuesta por cinco marcadores (NSE, Ca 15.3, NGAL, EGFR, 8-OH-dG) tal como se expone en la Figura VI.1.

$$p(\text{Grupo} = 1) = \frac{1}{1 + e^{-(5.096 + (-0.097) \cdot \text{NSE} + (0.091) \cdot \text{CA15}_3 + (-0.224) \cdot \text{NGAL} + (-1.463) \cdot \text{EGFR} + 0.404 \cdot \text{OHdG})}}$$

**Figura VI.1. Ecuación derivada del análisis de regresión logística de los marcadores.**

Aplicando la ecuación propuesta podríamos obtener un instrumento que ante mujeres con sospecha clínica o radiológica de cáncer de mama, nos seleccionaría en más del 90% la existencia de

cáncer de mama y por tanto la necesidad o no de realizar estudios biopsicos. No obstante, la determinación de cinco marcadores supone un coste elevado para generalizar el uso en diagnóstico precoz poblacional, por lo que podría restringirse su uso a casos particulares; donde existiera una duda diagnóstica clínico-radiológica, con antecedentes familiares o con factores de riesgo elevados. Desde nuestro punto de vista, nos resulta interesante depurar y mejorar dicha ecuación en estudios futuros para disminuir el número de parámetros y optimizar la razón coste/beneficio permitiendo así un uso generalizado de la misma.

En este intento de optimizar dicha ecuación, hemos realizado también un estudio de regresión logística combinando los Biomarcadores con las características epidemiológicas, encontrando que solo la incorporación del IMC tendría un discreto pero significativo impacto, al elevar la sensibilidad al 88% y la especificidad al 82%. Por otra parte cuando se trata de ganar eficiencia eliminando alguno de los marcadores, el poder de predicción disminuye ostensiblemente.

### 6.3 Discusión sobre el estudio epidemiológico

La encuesta epidemiológica (Anexo1) fue diseñada para incluir los principales factores de riesgo conocidos para el cáncer de mama; incluimos preguntas sencillas y que requerían datos conocidos por cualquier participante.

El análisis de las variables ofreció un resultado interesante, demostrándose una tendencia superior en la mayoría de ítems de riesgo en el grupo casos. Así; los antecedentes familiares de cáncer de mama, el tabaquismo, la enfermedad mamaria benigna y el IMC fueron más elevados en el grupo casos. La edad es superior en el grupo casos además con carácter significativo con respecto al grupo control. La existencia de menopausia fue más frecuente en el grupo casos motivada por la edad más elevada de dicho grupo. Todos ellos están claramente definidos como factores de riesgo como expusimos en el apartado 1.3 de la Introducción. Respecto a la lactancia, el resultado es paradójico ya que es un claro factor protector demostrado en múltiples revisiones sistemáticas (Anothaisintawee et al., 2013) y sin embargo su práctica fue ligeramente mayor en el grupo casos. Probablemente este hecho se deba a que las mujeres del grupo control son más jóvenes y viven su maternidad en una época en que los beneficios de la lactancia están claramente definidos.

Otros factores de riesgo conocidos han sido similares en ambos grupos como la nuliparidad, el consumo de alcohol y el uso de terapia hormonal sustitutiva, probablemente por las pocas mujeres expuestas a estos factores en ambos grupos. La edad de la menarquia fue similar en ambos grupos, cuando podría esperarse que fuera menor en el grupo casos (Nelson et al., 2012).

Por el contrario y paradójicamente, el consumo de ACO fue mayor en el grupo control, y la ocupación laboral también fue mayor en el grupo de controles que en el de casos, lo que apoya que

estas mujeres están en línea con el prototipo de mujer de la sociedad actual.

De todos los factores analizados, solo 6 resultaron **significativos** en el análisis bivariado; tres cuantitativos: la edad, el IMC y los niveles de vitamina D y tres categóricos: la falta de ocupación laboral, la menopausia y la menor toma de ACO. Por ello, según nuestro trabajo podemos considerarlos como factores asociados a la presencia de la enfermedad.

Respecto a la edad, las diferencias entre el grupo casos y controles fueron significativas (57 años vs 45 años). Está contrastado que el cáncer de mama aumenta con la edad, elevándose la fracción acumulada de riesgo conforme la mujer pasa la edad media de su vida. La edad de nuestra serie coincide con la de múltiples estudios publicados, lo que refuerza la validez de la muestra (GEICAM, 2014; McGuire, 2015). El motivo de que los controles sean más jóvenes puede deberse a un sesgo de selección al incluirse mujeres sanas preocupadas por sus salud. Entendemos pues que la edad es un factor de riesgo en línea con otras publicaciones, aunque asumimos que parte de este efecto puede deberse no solo a la fracción acumulada de riesgo, sino al posible sesgo de selección de los controles.

Otro factor que ha resultado tener diferencias significativas ha sido el IMC; ya que la mediana de los índices fue de sobrepeso (25-30; nivel sobrepeso) en la serie casos (28,23) frente a la mediana con índices normales (18-25; nivel normal) de la serie

controles (24,43). Recientemente se ha postulado que la obesidad es un factor de primer orden en la oncogénesis, superado únicamente con el tabaquismo y capaz de multiplicar el riesgo de cáncer entre 2 y 5 veces. Se relaciona directamente con numerosos tumores, entre los que figuran los más frecuentes como el cáncer de mama o el colorectal, y está motivando numerosas llamadas de atención por parte de la sociedad médica (SEOM, 2015). Nuestro estudio avala esta teoría y establece el papel relevante de la obesidad como factor de riesgo en el cáncer de mama.

El análisis de la vitamina D refleja diferencias significativas con niveles inferiores detectados en el grupo casos (53.19 vs 45.65), tal como cabía esperar. El descenso de vitamina D sérica se ha postulado como factor de riesgo de cáncer de mama (Chlebowski, 2013). Sin embargo, cuando profundizamos en el examen, observamos que los niveles de vitamina D que en el análisis bivariado habían resultado significativos, en el modelo multivariante no aportaban capacidad predictiva. La explicación de dicho resultado queda evidente cuando se analiza la correlación entre la vitamina D, la edad y el IMC. Existe una correlación significativa e inversa de la variable vitamina D con edad y con el IMC. Mientras que la relación es significativa y directa entre IMC y Edad. Esta relación de la edad y el IMC sobre la vitamina D puede ser una de las explicaciones que interfiera en la falta de significatividad del nivel de vitamina D, tal como explicamos en los resultados. La obesidad se relaciona con decrementos en la vitamina D y ambos están implicados en el aumento de riesgo del cáncer de mama. La relación entre la vitamina D y el IMC que

hemos encontrado está recientemente descrita en la literatura y supone un debate vivo sobre el papel independiente o no, de los niveles de vitamina D en el riesgo de cáncer de mama (Morton and Thompson, 2013).

Otro dato recogido que resultó tener diferencias significativas fue la ocupación laboral existiendo un mayor porcentaje de amas de casa en el grupo casos (52% vs 28%). No encontramos una explicación clara a este hecho pero podría relacionarse con que de las mujeres controles, predispuestas a cuidar su salud, tendrían por tanto mejor nivel cultural y posiblemente socioeconómico. Otra explicación es que aunque la ocupación laboral no se considere un factor de riesgo *per se*, si se ha descrito el bajo nivel socioeconómico como factor predisponente de cáncer de mama, probablemente por la dificultad de acceso a cuidados médicos (Ward et al., 2004) o también por una alimentación más deficiente desde el punto de vista de antioxidantes como por ejemplo el aceite de oliva o el pescado. Este hecho puede relacionarse, en parte, con mujeres en desempleo o amas de casa. Pocos estudios se han llevado a cabo en poblaciones de pacientes con cáncer de mama para entender sus comportamientos en la búsqueda de asistencia médica. En los países en vías de desarrollo, la mayoría de las pacientes con cáncer de mama continúan siendo diagnosticadas en estadios relativamente avanzados. Se ha observado que el cáncer de mama frecuentemente se diagnostica en estadios avanzados en pacientes con bajos ingresos y bajo nivel educativo (Baena, et al. 2011; Pakseresht, et al. 2014)

La existencia de menopausia fue más frecuente de forma significativa en el grupo de pacientes (65,1 % vs 28,57 %) y por tanto un factor a tener en cuenta. Su importancia como factor de riesgo está determinada cuando es tardía (>54 años), pero no en sí por la existencia de la misma. En nuestro caso asumimos que este factor va paralelo a la diferencia de edad entre ambas series como proceso natural. No disponemos de la edad en la ocurrió la menopausia de todas las mujeres de ambas series ya que al ser un proceso continuo y duradero, en algunos casos no la recordaban, o no estaban seguras. Por tanto no hemos podido realizar un análisis más detallado de éste factor.

Por último destacar que la toma de ACO fue más frecuente en el grupo control (42,8% vs 25,4 %) al contrario de lo descrito en la bibliografía. Sin embargo hay dos consideraciones que aclaran esta controversia. En primer lugar, podría existir un sesgo de selección como ya explicamos anteriormente, en el grupo control; compuesto por mujeres más jóvenes y con mejor nivel cultural, a la par que preocupadas por no tener embarazos. Este hecho favorece que la toma de ACO sea más probable que en el grupo casos ya que su consumo se relaciona con la formación y con el nivel de educación sexual de las mujeres. El otro motivo que justifica estos resultados se deduce del análisis pormenorizado de la variable; cuando recogemos el tiempo de toma de ACO, observamos que la gran mayoría del grupo control ha estado realizando dicho tratamiento por un espacio menor de 5 años, siendo tan solo 5 mujeres (7,9 %) las tomadoras de 5 o más años. En el grupo casos son solo 4 mujeres lo que supone un 6,4 % del total. Queda claro

que la toma de ACO durante 5 o más años tal cual está establecida como factor de riesgo, es similar en ambos grupos y por tanto no deberíamos establecerla como factor de riesgo ni protector en función de nuestros resultados.

El grupo casos es un grupo homogéneo que se reclutó de forma consecutiva conforme las pacientes iban acudiendo a la consulta de cirugía, siempre con un diagnóstico previo de cáncer de mama. Refleja con exactitud nuestra práctica clínica diaria coincidente con nuestro entorno nacional. Las características de la muestra se expusieron en el apartado 4.3 de Material y Métodos. Realizando una comparativa con la serie mayor, publicada en España en el contexto del estudio “Alamo III” donde se incluyeron 10.505 pacientes, las muestras son perfectamente superponibles (GEICAM, 2014). La mediana de edad es la misma (58 años), la edad de la menarquia es similar (12,6 años en nuestra serie vs. 13 años en Alamo III), la nuliparidad es del 20% en ambos casos, el porcentaje de mujeres menopaúsicas es el mismo (66% vs 67%), y los porcentajes de fumadoras y antecedentes familiares fueron ligeramente superiores en nuestra serie. Respecto a las características de los tumores también encontramos claras similitudes; la variedad histológica predominante fue ductal seguida de lobulillar en ambos casos (82% y 14% en nuestra serie vs. 81% y 9,3% en la de referencia). El grado histológico 2 fue más frecuente en nuestra serie (68% vs 48%) probablemente porque el grado 1 que obtuvimos fue menor que en la serie de referencia indicando posiblemente diferencias inter-servicios en la percepción y procedimiento del patólogo. Los receptores hormonales de

estrógeno y/o progesterona solo fueron negativos en un 12% en nuestra muestra y en un 21% en el estudio Alamo. La positividad del Her-2 fue menor en nuestra serie (17% vs 26%) este hecho puede deberse a que en la recogida de datos del estudio Alamo III, se incluyeron todas las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama, incluyendo las pacientes con tumor localmente avanzado (7.7 %) o metastásico de inicio (4.4%), que estaban excluidos en nuestro estudio ya que el objeto de nuestro estudio fue la detección precoz del cáncer de mama.

Esta también puede ser la explicación de porqué la serie Alamo III tiene mayores índices de factores de riesgo en comparación con la nuestra (Grado III, Her-2 positivo, receptores hormonales negativos). No obstante, con la salvedad aludida de un 12% de pacientes clasificados en la serie de referencia y que no están incluidos en la nuestra, el resto de tumores se distribuyen de forma homogénea; así el tamaño tumoral, la afectación ganglionar y los estadios fueron similares. En nuestra serie los estadios de nuestra serie se agruparon básicamente en fases precoces I, IIA y IIB (52%, 22% y 14%) de forma parecida a la serie de referencia (38%, 32% y 18%). Otra explicación posible a esta diferencia es que estas mujeres fueron diagnosticadas en 35 centros españoles en el periodo 1998-2001 cuando aún los resultados de los Programas de detección precoz no estaban completamente desarrollados como ocurre en la actualidad y en el momento de reclutar nuestra serie.

En cualquier caso queremos recordar que el objetivo de este trabajo es la *determinación de marcadores útiles para detección*

*precoz del cáncer de mama* y por tanto nos centramos en el reclutamiento de pacientes en fases tempranas; la gran mayoría fueron estadios I y IIA. El grupo casos incluía u muchos tumores microscópicos no palpables que habían sido diagnósticos en mamografías del PDP (30%). El resto eran tumores localizados y operables incluidos en fase precoz prequirúrgica, o sea, clínicamente estadios precoces (I y II).

Así en el análisis de correlación entre los distintos marcadores y el estadio tumoral no encontramos resultado positivo que relacione la elevación de ninguno de los marcadores con un estadio determinado (I, II o III). Como dijimos anteriormente, numerosos investigadores han encontrado mayores índices de elevación de marcadores (principalmente CEA y Ca 15.3) en estadios más avanzados (III y IV) (Molina et al, 2010; Zhang et al, 2013). Estos estadios eran criterios de exclusión en nuestro trabajo y por ello pensamos que en nuestra serie no ha habido correlación entre la elevación de algunos marcadores y el estadio puesto que no contiene tumores localmente avanzados ni metastásicos.

Otro aspecto a resaltar del grupo casos es la elevada proporción de alta densidad mamaria radiológica. Este factor de riesgo no pudo evaluarse en el grupo control porque muchas mujeres nunca se habían hecho una mamografía y era imprescindible disponer del informe radiológico para computarlo. En un estudio canadiense realizado con 1.112 casos y controles, se encontró una prevalencia media de alta densidad mamaria del 24% siendo mayor en mujeres menores de 56 años con relación a las

mayores de esa edad (37% vs 12%). Este dato suponía frente a mujeres sin densidad mamaria un riesgo relativo de cáncer de mama de 4,7 veces mayor (Boyd, et al, 2007). Nuestra serie, con una edad media similar al estudio referido, presenta un porcentaje mayor de casos con alta densidad mamaria que el propio estudio (30% vs. 24%), aunque no haya sido posible realizar el estudio comparativo con los controles. Así pues, destacamos el posible impacto como factor de riesgo que ha desempeñado la alta densidad mamaria radiológica en nuestra investigación.

El grupo control es homogéneo en cuanto a que se trata de mujeres sanas, de edad media, con ocupación laboral y seguidoras de vida saludable con pocos hábitos tóxicos. Podemos asumirlo como un grupo control adecuado con la única particularidad llamativa en contraste con el grupo casos de tener una mediana de edad inferior. Este hecho no ha sido un inconveniente para la finalidad con la que se ha diseñado nuestro estudio. En cualquier caso, la confirmación de nuestros resultados requerirá otros estudios posteriores con mayor población y entre distintos complejos hospitalarios

#### **6.4 Limitaciones y fortalezas del estudio**

Como se describió anteriormente, nuestro estudio sigue un diseño de casos-contróles y como tal está sujeto a la producción de errores sistemáticos, sobre todo sesgos de selección. Así el hecho de que los controles sean mujeres sanas que acudían al laboratorio

para hacerse una analítica rutinaria podría seleccionar mujeres sanas, indicativas de la población normal, pero preocupadas por su salud y motivadas para participar en este estudio. Por otra parte son mujeres más jóvenes que las del grupo casos (que obviamente refleja la edad media del cáncer de mama en España) ya que se excluían las mujeres que acudían al laboratorio cuando tenían patologías crónicas (hipertensión, diabetes, enfermedad vascular, etc.). Este hecho sin duda ha influido en la selección de mujeres más jóvenes, aunque se estima que dado el objetivo de la investigación los resultados no se hayan visto alterado por esta diferencia etaria entre ambos grupos.

Otra limitación reseñable es el número de la muestra que, aunque suficiente para nuestro objetivo, (ya que nos permite establecer diferentes respuestas a nuestras preguntas), precisará de la confirmación definitiva con otros estudios mayores para poder establecer la reproducibilidad de nuestros resultados. El análisis de marcadores rutinarios ofrece resultados muy interesantes y coincidentes con la extensa bibliografía, pero el de marcadores experimentales resulta solo indicativo ya que antes de generalizar nuestras aportaciones requeriría de nuevos estudios confirmatorios. Demostrar la utilidad verdadera de un determinado marcador tumoral emergente exige estudios multicéntricos con gran número de sujetos. El análisis de las variables epidemiológicas es aproximado ya que queda claro que el objetivo de estudiar ampliamente los factores de riesgo del cáncer de mama requieren otro tipo de estudios.

Asumimos pues, nuestras limitaciones, siendo conscientes de que el estudio tiene un carácter preliminar ya que en función de los resultados tenemos previsto proponer la realización de nuevos y amplios estudios dirigidos a confirmar aspectos concretos de nuestra investigación.

Respecto a la **fortaleza** del trabajo, queremos destacar el enorme e innovador campo que se ha abierto acerca del análisis de los marcadores de estrés oxidativo como marcadores tumorales en cáncer de mama. Pensamos que sería de gran utilidad seguir esta línea de investigación, al igual que nuestro equipo hará en futuros trabajos que ya estamos planificando. Por otra parte, nuestro resultado con los marcadores rutinarios amplían el cuerpo de conocimiento confirmando las evidencias obtenidas por otros investigadores en trabajos similares. El estudio epidemiológico aporta un *plus* de evidencia a la extensa bibliografía plagada de revisiones sistemáticas. La edad y el IMC son factores clave que deben seguir estudiándose. El papel de la vitamina D y la falta de ocupación laboral como factores de riesgo probablemente sea muy relevante y aún no están suficientemente aclarados, por lo que con seguridad será objeto de futuros trabajos por nuestro equipo y esperamos que también por otros investigadores.

### 6.5 Aplicación clínica de la investigación

Creemos que el presente trabajo puede contribuir a mejorar la eficiencia en el diagnóstico del cáncer de mama y también a desarrollar nuevas vías de investigación con nuevos marcadores. Podríamos resumir esta relevancia en 4 **recomendaciones**.

1. El abandono de la práctica clínica basada en la petición de marcadores tumorales (básicamente Ca 15.3 y CEA) en las fases diagnósticas del cáncer de mama. Estamos seguros de que nuestro trabajo contribuye y refuerza el mensaje expresado ya en las guías internacionales, aportando cercanía y claridad en nuestro entorno médico. Pretende ser una herramienta más, para que los gestores sanitarios y profesionales del sector puedan optimizar y actualizar los protocolos diagnósticos del cáncer de mama.
2. El diseño de estudios donde se mida el estrés oxidativo y en concreto el marcador 8-OHdG en pacientes con cáncer de mama en distintas situaciones clínicas; diagnóstico precoz, estudio extensión, monitorización del tratamiento oncológico, etc. Incluso podrían iniciarse estudios en otras patologías oncológicas que compartan historia natural y condiciones clínicas que permitan un diagnóstico precoz (cáncer de colon o cáncer de próstata).
3. El apoyo en los casos clínicos de diagnóstico complejo; mediante el diseño de una fórmula matemática por la que

con la simple extracción de una analítica (para la determinación de 5 marcadores tumorales) en una mujer en estudio por lesiones mamográficas dudosas, podemos asegurar con más del 90% de seguridad si es o no cancerosa y por lo tanto requiere completar el estudio biopsico o solo procede seguimiento radiológico.

4. El refuerzo de las campañas de prevención primaria, actuando sobre los factores de riesgo prevenibles y que también se han puesto de manifiesto en nuestro trabajo. La determinación de la vitamina D y el estudio de la ocupación laboral pueden incorporarse al bloque de riesgo y por tanto ser objeto de nuevas e innovadoras actuaciones preventivas (suplementación de vitamina D en mujeres de riesgo o la actuación preferente en entornos socioeconómicos deprimidos por ejemplo). El riesgo aumenta paralelamente con la edad ya que conforme va aumentando hacia edades medias en torno a 55 años, este riesgo alcanza valores altos; las campañas y esfuerzos preventivos deben priorizar las franjas etarias de mayor riesgo. Merece una mención especial el IMC, que se ha posicionado como un factor de riesgo independiente. Las actuaciones dirigidas al control de la obesidad y al seguimiento de una alimentación equilibrada, son el mejor enfoque disponible para luchar contra el cáncer de mama.

## CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES

---

## 7. Conclusiones

Enumeramos a continuación las **principales conclusiones** de esta Tesis.

1. La prevención precoz del cáncer de mama se realiza en el contexto de los PDP que se basan en la realización de mamografías rutinarias. Este medio no está exento de errores y para optimizar sus resultados precisa apoyos complementarios como pudieran ser los marcadores tumorales. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha encontrado ningún marcador con la suficiente sensibilidad y especificidad para poder ser utilizado en el *screeing* del cáncer de mama. Nuestro estudio revela la falta de eficacia de muchos marcadores y la eficacia de otros o de sus combinaciones.
2. Según la evidencia disponible, el uso de marcadores en la patología cáncer de mama debe reservarse exclusivamente para el biomarcador Ca 15.3 en la indicación de monitorización del tratamiento y evolución clínica de la enfermedad avanzada. No obstante, en nuestro medio, es habitual el uso de muchos marcadores para varias indicaciones como son el diagnóstico preoperatorio, el estudio de extensión de la enfermedad, el seguimiento periódico, etc. El coste sanitario que supone el uso indebido

de estos marcadores es inasumible y detrae recursos de otras áreas muy necesitadas.

3. Nuestro trabajo ha evaluado en un estudio casos-contróles la eficacia predictiva preoperatoria de todos los marcadores rutinarios disponibles que eventualmente se usan en el diagnóstico del cáncer de mama; CEA, Ca 15.3, Cyfra, NSE, Ca 125, Ca 19.9 y AFP. De ellos, el único marcador significativo cuya elevación fue capaz de predecir la existencia de cáncer de mama es el Ca 15.3. No obstante su sensibilidad obtenida es baja por lo que no recomendamos su uso rutinario en el diagnóstico precoz ni en la fase preoperatoria. Por tanto en las fases iniciales diagnósticas del cáncer de mama no debería utilizarse ninguno de estos marcadores. Este hecho podría implicar importantes ahorros en gasto sanitario.
  
4. En el mismo supuesto, o sea en la fase prequirúrgica con la enfermedad localizada, hemos estudiado 3 marcadores experimentales en cáncer de mama, seleccionados por su interés científico entre muchos otros. El NGAL no fue significativo por lo que no recomendamos profundizar en su estudio. El EGFR resultó estar más elevado en el grupo control coincidente con algunos estudios y contradictorio con otros, es preciso continuar investigaciones en este sentido.

5. En este trabajo se ha estudiado por primera vez la implicación de un marcador del estrés oxidativo (8-OHdG) en el cáncer de mama. Resultó significativamente elevado en el grupo casos. Se abre pues un nuevo campo de estudios que a buen seguro conllevará el diseño de nuevos y amplios ensayos con este biomarcador en el diagnóstico precoz y otras situaciones clínicas del cáncer de mama.
6. Hemos diseñado una ecuación matemática en la que intervienen los resultados de 5 marcadores y que es capaz de predecir la existencia de cáncer de mama con un 92% de seguridad. Aplicada a pacientes con dudas diagnósticas podría convertirse en un gran apoyo para el radiólogo o la Unidad de mama. Así mismo, en una segunda fase optimizada y simplificada, dicha fórmula, podría utilizarse como elemento de apoyo en programas de detección precoz.
7. No hemos encontrado correlación entre los marcadores y el Estadio tumoral, ya que nuestra serie de casos estaba compuesta por tumores pequeños y fases precoces tal como requería el objetivo de nuestro trabajo.
8. Tras el análisis estadístico de los factores epidemiológicos de ambas series resultaron ser significativos como factores asociados a cáncer de mama; la edad, la menopausia, la falta de ocupación laboral, el IMC y los niveles bajos de vitamina D entre todos ellos. Este trabajo pone en relieve al déficit de vitamina D y a la falta de ocupación laboral como factores

novedosos y poco estudiados. Proponiendo que estos factores de riesgo se incluyan en los grandes estudios epidemiológicos, para así poder determinar la fracción de riesgo acumulado específica de cada uno, lo que supondría la optimización de las campañas de prevención primaria y secundaria, haciéndolas más selectivas y eficaces en la lucha contra el cáncer femenino más frecuente.

# CAPÍTULO VIII: BIBLIOGRAFÍA

---

## 8. Bibliografía

### 8.1 Citas bibliográficas

- Acebal M.M**, Alba E, et al. *Cáncer de mama: proceso asistencial integrado*. 3ª ed. Sevilla: Consejería de Salud, (2011).
- Algara M** y Sabadell D. “Consenso de seguimiento de pacientes con cáncer de mama”. Sociedad Española de Patología mamaria.(2013).[http://www.sespm.es/file/doc/3491840/3491840-250.2013\\_consenso\\_seguimiento\\_cancer\\_mama.pdf](http://www.sespm.es/file/doc/3491840/3491840-250.2013_consenso_seguimiento_cancer_mama.pdf)
- Ali H.Q**, Mahdi N.K.,Al-Jowher M.H. The value of CA15-3 in diagnosis, prognosis and treatment response in women with breast cancer. *J Pak Med Assoc* Vol. 63, No. 9, 1138-1141. September (2013).
- American** Urological Association . Early detection of prostate cancer and use of transrectal ultrasound. Baltimore, Md: Williams & Wilkins; (1992). In: American Urological Association 1992 Policy Statement Book.
- Andriole GL**, Crawford ED, Grubb RL 3rd, et al. Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *N Engl J Med* (2009); 360:1310.
- Annemieke W. J.**, Winden O, Wendy Rodenburg W, et al. A Bead-Based Multiplexed Immunoassay to Evaluate Breast Cancer Biomarkers for Early Detection in Pre-Diagnostic Serum. *Int. J. Mol. Sci.* (2012), 13, 13587-13604; doi:10.3390/ijms131013587.
- Anothaisintawee T**, Wiratkapun C, Lerdsitthichai P, et al. Risk factors of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Asia Pac J Public Health.* (2013) Sep;25(5):368-87. doi: 10.1177/1010539513488795. Epub 2013 May 23.
- Asgeirsson KS**, Agrawal A, Allen C, et al. Serum epidermal growth factor receptor and HER2 expression in primary and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* (2007);9 (6):R75.
- Atoum M**, Nimer N, Abdeldayem S, et al. Relationships among Serum CA15-3 Tumor Marker, TNM, Staging, and Estrogen and Progesterone Receptor Expression in Benign and Malignant Breast Lesions. *Asian Pacif J Cancer Prev*, 13, 857-860 (2012).

- Aune D**, Chan DS, Vieira AR, Rosenblatt DA, Vieira R, Greenwood DC, Norat T. Fruits, vegetables and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Breast Cancer Res Treat.* (2012);134(2):479-93.
- Baena JM**, Estalella S, González M, y col. Influencia de los factores clínicos y biográficos en la calidad de vida de las mujeres durante la quimioterapia adyuvante por cáncer de mama. *Rev Calid Asist.* (2011); 26(5):299-305.
- Barnes BB**, Steindorf K, Hein R *et al.* (2011). Population attributable risk of invasive postmenopausal breast cancer and breast cancer subtypes for modifiable and non-modifiable risk factors. *Cancer Epidemiol*, 35:345-352  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.canep.2010.11.003> PMID:21159569.
- Basch E**, Oliver T K, Vickers A, et al. Screening for Prostate Cancer With Prostate-Specific Antigen Testing: American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion. *Clin Oncol* 30:3020-3025. (2012).
- Bauer M**, Eickhoff JC, Gould MN, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is a predictor of poor prognosis in human primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* (2008) Apr; 108(3):389-97.
- Bauer SR**, Hankinson SE, Bertone-Johnson ER, Ding EL. Plasma vitamin D levels, menopause, and risk of breast cancer: dose-response meta-analysis of prospective studies. *Medicine (Baltimore)* (2013); 92:123.
- Berry DA**, Cronin KA, Plevritis SK, et al. Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *N Engl J Med* (2005); 353:1784.
- Biomarkers Definitions Working Group.** Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* Mar (2001);69(3):89-95.
- Boyd N**, Guo H, Martin L, et al. Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *N Engl J Med.* (2007); 356:227-36.
- Brandt PA**, Spiegelman D, Yaun SS, et al. Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. *Am J Epidemiol.* (2000) Sep 15; 152(6):514-27.

- Brett AS**, Ablin RJ. Prostate-cancer screening--what the U.S. Preventive Services Task Force left out. *N Engl J Med* (2011); 365:1949.
- Callesen AK**, Vach W, Jorgensen PE, et al. Combined experimental and statistical strategy for mass spectrometry based serum protein profiling for diagnosis of breast cancer: A case-control study. *J Proteome Res.* Feb 28, (2008).
- Callesen AK**, Vach W, Jorgensen PE, et al. Reproducibility of mass spectrometry based protein profiles for diagnosis of breast cancer across clinical studies: A systematic review. *J Proteome Res.* Feb 28, (2008).
- Castelló A**, Pollán M, Buijsse B et al. Spanish Mediterranean diet and other dietary patterns and breast cancer risk: case-control EpiGEICAM study. *Br J Cancer.* 2014 Aug 7. doi: 10.1038/bjc. (2014).434.
- Catharine M.** and Eleftherios P. Use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast, and ovarian cancers. *The American Association for Clinical Chemistry.* (2009).
- CDC.** Vital Signs: Racial Disparities in Breast Cancer Severity — United States, 2005-2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* (2012); 61:922.
- Chan DW**, Beveridge RA, Muss H, et al. Use of Truquant BR radioimmunoassay for early detection of breast cancer recurrence in patients with stage II and stage III disease. *J Clin Oncol* (1997);15:2322–2328.
- Chapman C**, Murray A, Chakrabarti J, et al. Autoantibodies in breast cancer: Their use as an aid to early diagnosis. *Ann Oncol.* May (2007);18(5):868–873.
- Chen Y**, Zheng YH, Lin YY et al. Clinical and prognostic significance of preoperative serum CA153, CEA and TPS levels in patients with primary breast cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* (2011) Nov; 33(11):842-6.
- Cheraghi Z**, Poorolajal J, Hashem T, Esmailnasab N, Doosti Irani A. Effect of body mass index on breast cancer during premenopausal and postmenopausal periods: a meta-analysis. *PLoS One.* (2012);7(12):e51446. doi: 10.1371/journal.pone.0051446.

- Chlebowski RT**, Manson JE, Anderson GL, et al. Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in the Women's Health Initiative Observational Study. *J Natl Cancer Inst* (2013);105(8):526-35.
- Chlebowski RT**. Vitamin D and breast cancer incidence and outcome. *Anticancer Agents Med Chem.* (2013) Jan;13(1):98-106.
- Cho W**, Jung K, Regnier FE. Use of glycan targeting antibodies to identify cancer-associated glycoproteins in plasma of breast cancer patients. *Anal Chem.* Jul 15, (2008);80(14):5286–5292.
- Claudino WM**, Quattrone A, Biganzoli L, Pestrin M, Bertini I, Di Leo A. Metabolomics: Available results, current research projects in breast cancer, and future applications. *J Clin Oncol.* Jul 1, (2007);25(19):2840–2846.
- Colditz GA**, Rosner B. Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status: data from the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol* (2000); 152:950.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer**. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet* (2002); 360:187.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer**. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet* (2001); 358:1389.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer**. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncol* (2012);13(11):1141-51.
- Das K**, Tan P. Molecular cytogenetics: recent developments and applications in cancer. *Clin Genet.* 2013 Oct;84(4):315-25. doi: 10.1111/cge.12229. Epub 2013 Aug 6.
- De Angelis R**, Sant M, Coleman MP, et al. Cancer survival in Europe 1999—2007 by country and age: results of

EUROCARARE-5—a population-based study. *The Lancet Oncology*, Volume 15, Issue 1, Pages 23 - 34, January (2014). doi:10.1016/S1470-2045(13)70546-1.

**Degnim AC**, Visscher DW, Berman HK, Frost MH, Sellers TA, Vierkant RA, Maloney SD, Pankratz VS, de Groen PC, Lingle WL, Ghosh K, Penheiter L, Tlsty T, Melton LJ 3rd, Reynolds CA, Hartmann LC. Stratification of breast cancer risk in women with atypia: a Mayo cohort study. *J Clin Oncol.* (2007);25(19):2671.

**Del Barco** et al. SEOM clinical guidelines for the systemic treatment of early breast cancer. *Clin Transl Oncol* (2013) 15:1004-1017.

**Di Bonito M**, Cantile M, De Cecio R et al. Prognostic value of molecular markers and cytogenetic alterations that characterize breast cancer precursor lesions (Review). *Oncology letters* 6: 1181-1183,( 2013).

**Dnistrian AM**, Schwartz MK, Greenberg EJ, et al. BR29.29 as a marker in breast cancer. *J Tumor Marker Oncol* (1995);10:91–97.

**Donepudi MS**, Kondapalli K1, Amos SJ, et al. Breast cancer statistics and markers. *J Cancer Res Ther.* 2014 Jul-Sep;10(3):506-11. doi: 10.4103/0973-1482.137927.

**Duffy M.J.** Tumor Markers in Clinical Practice: A Review Focusing on Common Solid Cancers. *Med Princ Pract* (2013);22:4–11 DOI: 10.1159/000338393.

**Duffy MJ**, Duggan C, Keane R, et al. High preoperative CA 15-3 concentrations predict adverse outcome in node-negative and node-positive breast cancer: study of 600 patients with histologically confirmed breast cancer. *Clin Chem* (2004);50:559–563.

**Duffy M.J.** Serum Tumor Markers in Breast Cancer: Are They of Clinical Value? *Clinical Chemistry* 52:3; 345–351 (2006).

**Duffy MJ**, Evoy D, McDermott EW: CA 15-3: uses and limitation as a biomarker for breast cancer. *Clin Chim Acta* (2010); 411: 1869–1874.

- Ebeling FG**, Stieber P, Untch M, et al. Serum CEA and CA 15-3 as prognostic factors in primary breast cancer. *Br J Cancer* (2002);86:1217–1222.
- Edge SB**, Byrd DR, Compton CC et al. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, NY: Springer,(2010), pp 347–76.
- Eskelinen M**, Kataja V, Hämäläinen E. Serum tumour markers CEA, AFP,CA 15-3, TPS and Neu in diagnosis of breast cancer. *Anticancer Res.* (1997) Mar-Apr;17(2B):1231-4.
- Ewertz M**, Duffy SW, Adami HO, Kvåle G, Lund E, Meirik O, Møllerhaug A, Soini I, Tulinius H. Age at first birth, parity and risk of breast cancer: a meta-analysis of 8 studies from the Nordic countries. *Int J Cancer.* (1990);46(4):597-603.
- Fernández C.A**, Yan L, Louis G, et al. TheMatrixMetalloproteinase-9/Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Complex Plays a Role in BreastTumor Growth and is present in the urine of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* (2005);11:5390-5395.
- Franjević A**, Pavićević R, Bubanović G. Differences in initial NSE levels in malignant and benign diseases of the thoracic wall. *Clin Lab.*( 2012);58(3-4):245-52.
- Franky Dhaval S**, Shilin Nandubhai S, Pankaj Manubhai S, Patel HR, Prabhudas Shankerbhai P. Significance of alterations in plasma lipid profile levels in breast cancer. *Integr Cancer Ther.* Mar (2008);7(1):33–41.
- García-Sevillano MA**, García-Barrera T, Navarro F. et al. Absolute quantification of superoxide dismutase in cytosol and mitochondria of mice hepatic cells exposed to mercury by a novel metallomic approach. *Anal Chim Acta.* (2014) Sep 9;842:42-50
- Gast MC**, Schellens JH, Beijnen JH. Clinical proteomics in breast cancer: a review. *Breast Cancer Res Treat* (2009) 116:17–29.
- Gast MC**, Schellens JH, Beijnen JH. Clinical proteomics in breast cancer: a review. *Breast Cancer Res Treat.* (2009) Jul;116(1):17-29. doi: 10.1007/s10549-008-0263-3.

- Gaudet MM**, Gapstur SM, Sun J, et al. Active Smoking and Breast Cancer Risk: Original Cohort Data and Meta-Analysis. *J Natl Cancer Inst* (2013);105(8):515-25.
- GEICAM**. Grupo Español de Investigación en Cáncer de Mama. Proyecto El Álamo III. Encuesta de evolución de pacientes con cáncer de mama en hospitales del grupo GEICAM; 1998 – 2001. (2014).
- Gierisch JM**, Coeytaux RR, Urrutia RP, et al. Oral contraceptive use and risk of breast, cervical, colorectal, and endometrial cancers: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* (2013);22(11):1931-43. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-13-0298.
- Gion M**, Boracchi P, Dittadi R, et al. Prognostic role of serum CA15.3 in 362 node-negative breast cancers. An old player for a new game. *Eur J Cancer* (2002);38:1181–1188.
- Giovanella L**, Ceriani L, Giardina G, et al. Serum cytokeratin fragment 21.1 (CYFRA 21.1) as tumour marker for breast cancer: comparison with carbohydrate antigen 15.3 (CA 15.3) and carcinoembryonic antigen (CEA). *Clin Chem Lab Med.* (2002) Mar;40(3):298-303
- Goldhirsch A**, et al Panel members ; 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. Special article *Annals of Oncology* 24.(2013).
- Goswamia B**, Rajappab M, Guptac N, et al. Breast cancer: Interaction between oxidant-antioxidant dynamics and inflammation in Indian females. *Cancer Biomarkers* 6 (2009/2010) 95–103 95.
- Harris J**, Hellman S, Henderson C, kinne D (eds.), breast diseases, vol. 2 j.b. Lippincott. 2da. Edic.(1991):165-189.
- Harris L**, Fritsche H, Mennel R, et el. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* (2007); 25: 5287-312.
- Harris R**, Sawaya GF, Moyer VA, Calonge N. Reconsidering the criteria for evaluating proposed screening programs: reflections from 4 current and former members of the U.S. Preventive

- services task force. *Epidemiol Rev.* (2011) Jul;33(1):20-35. doi: 10.1093/epirev/mxr005. Epub 2011 Jun 10.
- Henderson TO**, Amsterdam A, Bhatia S, et al. Systematic review: surveillance for breast cancer in women treated with chest radiation for childhood, adolescent, or young adult cancer. *Ann Intern Med* (2010); 152:444.
- Henry L.N**, Hayes D.F, Ramsey S.D, et al. Promoting Quality and Evidence-Based Care in Early-Stage Breast Cancer Follow-up. *JNCI J Natl Cancer Inst* (2014) 106(4): dju034 doi:10.1093/jnci/dju034.
- Humphrey LL**, Helfand M, Chan BK, Woolf SH. Breast cancer screening:a summary of the evidence for the US Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* (2002);137:347-60.
- Kalager M**, Zelen M, Langmark F, Adami HO. Effect of screening mammography on breast-cancer mortality in Norway. *N Engl J Med* (2010); 363:1203.
- Khatcheressian J.L**, Hurley P,Bantug E, et al Breast Cancer Follow-Up and Management After PrimaryTreatment: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol* 30. (2012).
- Kirmiz C**, Li B, An HJ, et al. A serum glycomics approach to breast cancer biomarkers. *Mol Cell Proteomics.*Jan (2007);6(1):43–55.
- Lacombe J**, Mangé A, Bougnoux A-C, et al. A Multiparametric Serum Marker Panel as a Complementary Test to Mammography for the Diagnosis of Node-Negative Early-Stage Breast Cancer and DCIS in Young Women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 23(9): 1834-1842 September (2014).
- Lee J.S**, Park S., Park J.M. et al. Elevated levels of preoperative CA 15-3 and CEA serum levels have independently poor prognostic significance in breast cancer. *Annals of Oncology* 24: 1225–1231, (2013).
- Li H**, Chen K, Su F, et al. Preoperative CA 15-3 levels predict the prognosis of nonmetastatic luminal A breast cancer. *J Surg Res.* (2014) Jun 1; 189(1):48-56. doi: 10.1016/j.jss.2014.02.048. Epub 2014 Mar 2.

- Locally** recurrent or metastatic breast cancer; ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* (2012); 23 (Suppl7):vii 11-9.
- Lumachi, F.**; Basso, S.M.; Brandes, A.A.; et al. M. Relationship between tumor markers CEA and CA 15-3, TNM staging, estrogen receptor rate and MIB-1 index in patients with pT1-2 breast cancer. *Anticancer Res.* (2004), 24, 3221-3224.
- Ma XJ**, Dahiya S, Richardson E, Erlander M, Sgroi DC. Gene-expression profiling of the tumor microenvironment during breast cancer progression. *Breast Cancer Res.* (2009); 11:R7. [PubMed: 19187537]
- Martensson J**, Bell M, Xu S, et al. Association of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) with sepsis and acute kidney dysfunction. *Biomarkers.* 2013 Jun; 18(4):349-56. doi: 10.3109/1354750X.2013.787460. Epub (2013) Apr 29.
- Mavaddat N**, Peock S, Frost D, et al. Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. *J Natl Cancer Inst* (2013); 105:812.
- McCormack VA**, dos Santos Silva I. Breast Density and Parenchymal Patterns as Markers of Breast Cancer Risk: A Meta- analysis. *Cancer Epidem Biomar Prev* (2006);15(6):1159-69.
- McGuire A.**, Brown J., Malone C., et al. Effects of Age on the Detection and Management of Breast Cancer. *Cancers* (2015), 7, 908-929;doi:10.3390/cancers7020815.
- Mettlin C**, Jones G, Averette H, et al. Defining and updating the American Cancer Society guidelines for the cancer-related checkup: prostate and endometrial cancers. *CA Cancer J Clin* (1993); 43:42.
- Miller AB**, Wall C, Baines CJ, et al. Twenty five year follow-up for breast cancer incidence and mortality of the Canadian National Breast Screening Study: randomised screening trial. *BMJ* (2014); 348:g366.
- Million Women Study Collaborators.** Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* (2003);362(9382):419-27.

- Moazzezy N**, Farahany T Z, Oloomi M et al. Relationship between Preoperative Serum CA15-3 and CEA Levels and Clinicopathological Parameters in Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15 (4), 1685-1688. (2014).
- Molina R**, Auge JM, Farrus B, et al. Prospective Evaluation of Carcinoembryonic Antigen (CEA) and Carbohydrate Antigen 15.3 (CA 15.3) in Patients with Primary Locoregional Breast Cancer. *Clinical Chemistry* 56:7, 1148–1157 (2010).
- Molina R**, Filella X, Alicarte J, et al. Prospective evaluation of CEA and CA 15.3 in patients with locoregional breast cancer. *Anticancer Res* (2003);23:1035–1041. 597.
- Molina R**, Jo J, Filella X, et al. C-erbB-2 oncoprotein, CEA, and CA 15.3 in patients with breast cancer: prognostic value. *Breast Cancer Res Treat* (1998);51:109–119.
- Molina R**. et al. Breast cancer Tumor Markers in Breast Cancer – European Group on Tumor Markers Recommendations. (2014). [http://www.egtm.eu/professionals/breast\\_cancer#\\_edn1](http://www.egtm.eu/professionals/breast_cancer#_edn1)
- Morton M.L.** and Thompson C.L. Decreasing 25-hydroxy-vitamin D levels account for portion of the effect of increasing body mass index on breast cancer mortality. *Mol Nutr Food Res*. (2013) February; 57(2): 260–266. doi:10.1002/mnfr.201200405.
- NCCN** (2014). NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®). Breast Cancer v2.2014 [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/f\\_guidelines.asp#site](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site).
- Nelson HD**, Zakher B, Cantor A, et al. Risk factors for breast cancer for women aged 40 to 49 years: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* (2012); 156:635.
- Nichols HB**, Berrington de González A, Lacey JV Jr, et al. Declining incidence of contralateral breast cancer in the United States from 1975 to 2006. *J Clin Oncol* (2011); 29:1564.
- Norum, L.F.**; Erikstein, B.; Nustad, K. Elevated CA125 in breast cancer—A sign of advanced disease. *Tumour Biol*. (2001), 22, 223–228.
- Ocaña E** y Aceituno MI. Utilidad clínica de los marcadores tumorales. *Revista Médica de Jaén*, octubre (2014) · nº 4.

- Pakseresht S**, Ingle G.K, Garg S., et al. Stage at Diagnosis and Delay in Seeking Medical Care Among Women With Breast Cancer, Delhi, India. 2014 Iran Red Crescent Med J. (2014) December ;16(12): e14490. DOI: 10.5812/ircmj.14490
- Pande D**, Negi R, Karki K, et al. Oxidative damage markers as possible discriminatory biomarkers in breast carcinoma. Translational Research (2012);160:411–418.
- Panis C**, Victorino V.J, Herrera A.C, et al. Differential oxidative status and immune characterization of the early and advanced stages of human breast cancer. Breast Cancer Res Treat (2012) 133:881–888.
- Paoletti C** and Hayes D.F. Molecular Testing in Breast Cancer. Annu. Rev. Med. (2014). 65:95–110.
- Park B.W**, Oh J.W, Kim J.H, et al. Preoperative CA 15-3 and CEA serum levels as predictor for breast cancer outcomes. Annals of Oncology 19: 675–681, (2008) doi:10.1093/annonc/mdm538
- Pepe MS**, Thompson ML. Combining diagnostic test results to increase accuracy. Biostatistics. Jun (2000);1(2):123–140.
- Peto R**. UK and USA breast cancer deaths down 25% in year 2000 at ages 20-69 years. Lancet (2000); 355:1822.
- Pedersen AC**, Sørensen PD, Jacobsen EH, et al. Sensitivity of CA 15-3, CEA and serum HER2 in the early detection of recurrence of breast cancer. Clin Chem Lab Med. (2013) Jul;51(7):1511-9. doi: 10.1515/cclm-2012-0488
- Pollán M**, García-Mendizabal MJ, Pérez Gómez, et al. Epidemiological situation of Breast Cancer in Spain [Spanish]. Psicooncología. (2007);4:231-248.
- Provatopoulou X**, Gounaris A, Kalogera E, et al. Circulating levels of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and their complex MMP-9/NGAL in breast cancer disease. BMC Cancer (2009), 9:390.
- Puig-Vives M**, Oisca-Gelis G, Camprubi-Font C, et al. Proportion of breast cancer in women aged 50 to 69 years from Girona according to detection method [Spanish]. Med Clin (Barc). (2013) Dec 27.

- Pukazhendhi G** and Glück S. Circulating tumor cells in breast cancer. *J Carcinog.* (2014) Jun 30;13:8. doi: 10.4103/1477-3163.135578.
- Rack B.** Schindlbeck C, Jückstock J et al. Prevalence of CA 27.29 in primary breast cancer patients before the start of systemic treatment. *Anticancer Research* 30: 1837-1842 (2010).
- Ramsey S.D,** Henry N.L, Gralow J.R.;, et al. Tumor Marker Usage and Medical Care Costs Among Older Early-Stage Breast Cancer Survivors. *J Clin Oncol* 33:149-155. (2014).
- Rashad YA,** Elkhodary TR, El-Gayar AM, et al. Evaluation of Serum Levels of HER2, MMP-9, Nitric Oxide, and Total Antioxidant Capacity in Egyptian Breast Cancer Patients: Correlation with Clinico-Pathological Parameters. *Sci Pharm.* 2013 Sep 22;82(1):129-45. doi: 10.3797/scipharm.1306-18. eCollection (2014).
- Ritte R,** Lukanova A, Tjønneland A, et al. Height, age at menarche and risk of hormone receptor-positive and -negative breast cancer: a cohort study. *Int J Cancer* (2013); 132:2619.
- Rodríguez J.** El laboratorio clínico: uso y abuso, modelos de gestión y gasto sanitario. *Med Clin (Barc)* (2005);125(16):622-5
- Samy N,** Ragab HM, El Maksoud NA, et al. Prognostic significance of serum Her2/neu, BCL2, CA15-3 and CEA in breast cancer patients: A short follow-up. *Cancer Biomark.* (2010);6(2):63-72. doi: 10.3233/CBM-2009-0119.
- Sawilowsky S. & Blair R. C.** «A more realistic look at the robustness and type II error properties of the t test to departures from population normality». *Psychological Bulletin* 111 (2): 353–360. (1992)
- Schröder FH,** Hugosson J, Roobol MJ, et al. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *N Engl J Med* (2009); 360:1320.
- SEER Program** (Surveillance Epidemiology and End Results Program). National Cancer Institute, Surveillance Research Program, Cancer Statistic Branch, released April (2008).
- Sen S,** Hopwood V. Molecular cytogenetic evidence for multistep tumorigenesis: implications for risk assessment and early

- detection. *Cancer Biomark.* (2010);9(1-6):113-32. doi: 10.3233/CBM-2011-0171.
- Senkus E**, Kyriakides S, Penault-Llorca F, et al.; ESMO Guidelines Working Group. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* (2013);24 Suppl 6:vi7-23.
- SEOM** clinical guidelines for the systemic treatment of early breast cancer. *Clin Transl Oncol* (2013) 15:1011-1017.
- SEOM**. Reflexión de expertos de la SEEDO y la SEOM sobre el vínculo obesidad y cáncer; Prevenir la obesidad, previene el cáncer, N° 4. (2015). [http://www.seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Vinculo\\_obesidad\\_y\\_Cancer.pdf](http://www.seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Vinculo_obesidad_y_Cancer.pdf).
- Sgroi D.C.** Preinvasive Breast Cancer. *Annu Rev Pathol.* (2010); 5: 193–221. doi:10.1146/annurev.pathol.4.110807.092306.
- Shao Y**, Sun X, He Y, et al. Elevated Levels of Serum Tumor Markers CEA and CA15-3 Are Prognostic Parameters for Different Molecular Subtypes of Breast Cancer. *PLoS ONE* 10(7) (2015): e0133830. doi:10.1371/journal.pone.0133830.
- Siegel R**, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *A Cancer Journal for Clinicians* (2012); 62:10.
- Solberg HE**, PetitClerc C. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), Scientific Committee, Clinical Section, Expert Panel on Theory of Reference Values. Approved recommendation (1988) on the theory of reference values. Part 3. Preparation of individuals and collection of specimens for the production of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem.* Sep 1988;26(9):593–598.
- Solberg HE**. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), Scientific Committee, Clinical Section, Expert Panel on Theory of Reference Values, and International Committee for Standardization in Haematology (ICSH), Standing Committee on Reference Values. Approved recommendation 1986, on the theory of reference values. Part 1. The concept of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem.* May (1987);25(5):337–342.

- Souder C**, Leitzel K, Ali SM, et al. Serum epidermal growth factor receptor/HER-2 predicts poor survival in patients with metastatic breast cancer. *Cancer*. (2006) Nov 15;107(10):2337-45.
- Sturgeon C.M**, Duffy M.J, Stenmam U-H, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for Use of Tumor Markers in Testicular, Prostate, Colorectal, Breast, and Ovarian Cancers. *Clinical Chemistry* (2008) Dec;54(12).
- Sturgeon C.M**, Lai L.C and Duffy M.J. Serum tumour markers: how to order and interpret them. *BMJ* (2009);339:b3527.
- Tas F**, Bilgin E, Karabulut S, et al. Clinical significance of serum epidermal growth factor receptor (EGFR) levels in patients with breast cancer. *Cytokine*. (2015) Jan;71(1):66-70. doi: 10.1016/j.cyto.2014.09.001.
- Teresa G. de**, Casado V., Jimeno A. Utilización de marcadores tumorales en Atención Primaria. *Medifam [revista en a Internet]*. (2002) Ene;12(1): 13-37. Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1131-57682002000100003&lng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1131-57682002000100003&lng=es).
- Thriveni K.**, Krishnamoorthy L. and Ramaswamy G. Correlation study of carcino embryonic antigen & cancer antigen 15.3 in pretreated female breast cancer patients. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, (2007) / 22 (1) 57-60.
- Urban D.** and Catane R. Serum Tumor Markers in Oncology. *IMAJ* (2009);11:103–104.
- Valavanidis A**, Vlachogianni T, and Fiotakis C. 8-hydroxy-2-deoxyguanosine(8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. *Journal of Environmental Science and Health Part C*, 27:120–139, (2009).
- Van den Brandt PA**, Spiegelman D, Yaun SS, et al. Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. *Am J Epidemiol* (2000); 152:514.
- Ward E.**, Jemal A., Cokkinides V., et al., et al. Cancer disparities by race / ethnicity and socioeconomic status. *CA Cancer J Clin* (2004) Mar;54(2):78-93.

- World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research** Systematic Literature Review. Continuous Update Report. The Associations between Food, Nutrition and Physical Activity and the Risk of Breast Cancer. Sección 5.4. Alcohol. Página 83. (2007)
- World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research.** Second Expert Report, Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. (2014).
- Weedon-Fekjaer H,** Romundstad PR, Vatten LJ. Modern mammography screening and breast cancer mortality: population study. *British Medical Journal* (2014); 348:g3701.
- Wenners AS,** Mehta K, Loibl S, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) predicts response to neoadjuvant chemotherapy and clinical outcome in primary human breast cancer. *PLoS One.* (2012);7(10):e45826. doi: 10.1371/journal.pone.0045826.
- Wilson JMG,** Jungner G. Principios y métodos del examen colectivo para identificar enfermedades. Cuadernos de Salud pública, nº34. Organización Mundial de la Salud. Ginebra, (1969).
- Wu S,** He Z, Zhou J. et al. Serum levels of CEA and CA15-3 in different molecular subtypes and prognostic value in Chinese breast cancer. *The Breast* 23 (2014) 88-93.
- Wu Y,** Zhang D, Kang S. Physical activity and risk of breast cancer: a meta-analysis of prospective studies. *Breast Cancer Res Treat.* (2013) Feb;137(3):869-82. doi: 10.1007/s10549-012-2396-7. Epub 2012 Dec 30.
- Yeon JY,** Suh YJ, Kim SW, et al. Evaluation of dietary factors in relation to the biomarkers of oxidative stress and inflammation in breast cancer risk. *Nutrition.* (2011) Sep;27(9):912-8.
- Yewale C,** Baradia D, Vhora I, et al Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: a review of trends and strategies. *Biomaterials.* 2013 Nov;34(34):8690-707. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.07.100. Epub 2013 Aug 13.

- Zhang F**, Deng Y and Drabier R. Multiple biomarker panels for early detection of breast cancer in peripheral blood. *Biomed Res Int.* (2013);2013:781618. doi: 10.1155/2013/781618
- Zhang S.J.**,Hu J, Qian HL. et al. Expression and Significance of ER, PR, VEGF, CA15-3, CA125 and CEA in Judging the Prognosis of Breast Cancer *Asian Pacific J Cancer Prev*, 14 (6), 3937-3940. (2013).
- Zhao H**, Shen J, Medico L. et al. (2010) A Pilot Study of Circulating miRNAs as Potential Biomarkers of Early Stage Breast Cancer. *PLoS ONE* 5(10): e13735. doi:10.1371/journal.pone.0013735.

## 8.2 Otras Fuentes Bibliográficas

### PAGINAS WEBS

1. GEICAM; <http://www.geicam.org/>
2. SEOM; <http://www.seom.org/>
3. FABIS; <http://www.fabis.org/>
4. ESMO; <http://www.esmo.org/>
5. ASCO; <http://www.asco.org/>
6. NCI (National Cancer Institute); <http://www.cancer.gov/>
7. NCCN (National Comprehensive Cancer Network); [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/f\\_guidelines.asp#site](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site).
8. Entrevista diario “el Mundo” al Presidente de SEOM (Dr. M. Martín) sobre cáncer de mama (1-Noviembre-2015). <http://www.elmundo.es/salud/2015/11/01/5633a478e2704e107f8b456c.html>

## CAPÍTULO IX: ANEXOS

---

## Anexo I

### Encuestas epidemiológicas realizadas a los casos y a los controles

<b>CUESTIONARIO EPIDEMIOLÓGICO CONTROLES</b>		
	<b>ITEM</b>	<b>RESPUESTA</b>
1º	<i>Nombre Paciente;</i>	
2º	<i>Código</i>	
3º	<i>Edad (años)</i>	
4º	<i>¿A que se dedica?</i>	
5º	<i>¿Tiene Ud. Antecedentes Familiares de cáncer de mama? ¿Son de primero o de segundo grado?</i>	
6º	<i>¿A qué edad tuvo la primera regla?</i>	
7º	<i>¿Ha tenido menopausia? ¿A qué edad?</i>	
8º	<i>¿Cuántos hijos tiene?</i>	
9º	<i>¿Dio Ud. Lactancia a alguno de sus hijos por un periodo igual o superior a 6 meses?</i>	
10º	<i>¿Ha tomado alguna vez Anticonceptivos orales? En total un tiempo mayor o menor a 5 años;</i>	
11º	<i>¿Ha usado tratamiento hormonal para combatir los síntomas de la menopausia? (parches de estrógenos, cápsulas hormonales de estrógeno y/o progesterona, etc)</i>	
12º	<i>¿Ha padecido Ud. De enfermedad mamaria benigna? (mastopatía fibroquística diagnosticada, intervenciones mamarias no estéticas, drenaje de quistes, etc?)</i>	
13º	<i>¿Es fumadora o exfumadora?</i>	
14º	<i>¿Consume alcohol a diario?</i>	
15º	<i>Peso (kg)</i>	
16º	<i>Talla (m)</i>	
<i>Observaciones;</i>		

<b>CUESTIONARIO EPIDEMIOLÓGICO CASOS</b>		
	<b>ITEM</b>	<b>RESPUESTA</b>
<b>1º</b>	<b>Nombre Paciente;</b>	
<b>2º</b>	<b>Código</b>	
<b>3º</b>	<b>Edad (años)</b>	
<b>4º</b>	<b>¿A que se dedica?</b>	
<b>5º</b>	<b>¿Tiene Ud. Antecedentes Familiares de cáncer de mama? ¿Son de primero o de segundo grado?</b>	
<b>6º</b>	<b>¿A qué edad tuvo la primera regla?</b>	
<b>7º</b>	<b>¿Ha tenido menopausia? ¿A qué edad?</b>	
<b>8º</b>	<b>¿Cuántos hijos tiene?</b>	
<b>9º</b>	<b>¿Dio Ud. Lactancia a alguno de sus hijos por un periodo igual o superior a 6 meses?</b>	
<b>10º</b>	<b>¿Ha tomado alguna vez Anticonceptivos orales? En total un tiempo mayor o menor a 5 años;</b>	
<b>11º</b>	<b>¿Ha usado tratamiento hormonal para combatir los síntomas de la menopausia? (parches de estrógenos, cápsulas hormonales de estrógeno y/o progesterona, etc)</b>	
<b>12º</b>	<b>¿Ha padecido Ud. De enfermedad mamaria benigna? (mastopatía fibroquística diagnosticada, intervenciones mamarias no estéticas, drenaje de quistes, etc?)</b>	
<b>13º</b>	<b>¿Es fumadora o exfumadora?</b>	
<b>14º</b>	<b>¿Consume alcohol a diario?</b>	
<b>15º</b>	<b>Peso (kg)</b>	
<b>16º</b>	<b>Talla (m)</b>	
<b>17º</b>	<b>¿Es usted conocedora de que tenga alta densidad mamaria radiológica? (Nota; comprobar informe de mamografía más reciente)</b>	
<b>18º</b>	<b>¿Cuál fue el primer síntoma de la enfermedad?</b>	
<b>Observaciones;</b>		

## Anexo II

### Resolución del Comité Provincial de Ética e Investigación sanitaria.



Servicio Andaluz de Salud  
CONSEJERÍA DE IGUALDAD, SALUD Y POLÍTICAS SOCIALES

#### SUBCOMISIÓN DE INVESTIGACIÓN SANITARIA Hospital Juan Ramón Jiménez y centros adscritos de la provincia de Huelva

D. CARLOS PÉREZ HERNÁNDEZ, como Secretario de la Comisión de Ética e Investigación Sanitarias del Hospital Juan Ramón Jiménez y centros adscritos de la provincia de Huelva

#### CERTIFICA

Que el Proyecto de Investigación titulado: "Análisis descriptivo de marcadores proteicos sanguíneos para el diagnóstico precoz del cáncer de mama: selección del kit más adecuado", presentado ante esta Comisión en Marzo de 2011 y cuyo investigador principal es: Dr. Juan Luens Bayo Calero, de la Unidad Clínica de Oncología, del Área Hospitalaria Juan Ramón Jiménez, ha sido evaluado, por esta Comisión de forma FAVORABLE, al comprobar que:

Se marcan unos objetivos relevantes, de interés para el Centro y en el marco de prioridades de investigación biosanitaria, considerándose suficientemente justificada la investigación propuesta.

La capacidad del investigador y su equipo y los medios disponibles merecen un voto de confianza sobre la viabilidad del proyecto.

La metodología, el plan de trabajo y análisis que se plantea con los datos resultan adecuados para alcanzar los objetivos.

El desarrollo del estudio no va a suponer coste alguno para el Centro, ni menoscabo de la actividad asistencial del Servicio en el que se realiza.

Se asegura la confidencialidad de los datos y es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado de los sujetos que van a ser estudiados.

Y para que así conste y a efectos de presentación como Proyecto de Tesis,

Se firma el presente certificado en Huelva, a 17 de Marzo de 2011

Fdo: Carlos Pérez Hernández

221882

Área Hospitalaria Juan Ramón Jiménez  
Ronda Norte, s/n. 21005 Huelva  
Teléf. 959 01 60 60



## Anexo III

### Hoja de Información y Consentimiento Informado para las mujeres incluidas en el estudio.

**DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES EN MUESTRAS DE SANGRE CONSERVADA PROCEDENTE DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE CÁNCER DE MAMA**

En nuestro hospital (Hospital Juan Ramón Jiménez de Huelva) se está realizando un estudio denominado "ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE MARCADORES PROTEICOS SANGUÍNEOS PARA EL DIAGNÓSTICO PRECOZ DE CÁNCER DE MAMA: SELECCIÓN DEL KIT MÁS ADECUADO." Este estudio pretende analizar en una muestra de sangre de pacientes diagnosticadas de cáncer de mama los niveles existentes de determinados marcadores, con el fin de encontrar alguna sustancia que pueda estar elevada. Así en estudios posteriores podría identificarse un marcador sanguíneo que analizado en mujeres de riesgo pudiera servir como diagnóstico precoz en este grupo.

Para ello en el laboratorio vamos a obtener el suero de una muestra de sangre y posteriormente determinar una serie de marcadores tumorales por los medios convencionales habituales. En ningún caso supone ningún riesgo para la salud de la paciente, ni alteración de su tratamiento previsto ni nada perjudicial de otra índole. Solo supone el estudio sobre la muestra de sangre obtenida de cada paciente.

He leído la información anterior sobre el estudio y entiendo para qué sirve.

Por lo que Deseo Donar la muestra de sangre necesaria para el estudio por lo que Autorizo que se recoja y que se procese según el protocolo que se haya establecido.

He tenido ocasión de hacer preguntas, entiendo que recibiré una copia de este documento después de firmarlo y que puedo retirar mi consentimiento para que mis muestras opcionalmente sean conservadas y por tanto sean destruidas.

Firma de la Paciente	Nombre y Apellidos	Fecha de la Firma

Yo el abajo firmante, he explicado íntegramente la información relativa a la conservación y procesamiento de muestras de la paciente cuyo nombre figura aquí arriba.

Firma del Investigador/ Médico que obtiene el CI	Nombre y Apellidos	Fecha de la Firma
	Dr. Juan Bayo Calero	