

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO

ESCUELA DE POSGRADO



**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA DE CIENCIAS EN
INVESTIGACIÓN CLÍNICA**

**Expresión de los genes de la vía mTOR como factor pronóstico de sobrevida libre
de recurrencia a distancia en cáncer de mama triple negativo**

Área de investigación:

Cáncer y enfermedades no transmisibles

Autor:

Br. Araujo Soria, Jhajaira Maigreth

Jurado evaluador

Presidente: Dr. Vásquez Tirado, Gustavo Adolfo

Secretario: Dr. Serna Alarcón, Víctor

Vocal: Ms. Guzmán Ventura, Wilmer Valdemar

Asesor:

Dr. José Antonio Caballero Alvarado

Código Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-8297-6901>

**TRUJILLO – PERÚ
2022**

Fecha de sustentación: 2022/08/08

Índice

I. Introducción	1
II. Planteamiento de la Investigación	
2.1 Planteamiento del problema.....	3
2.2 Justificación	3
2.3 Objetivos.....	4
III. Metodología	
3.1 Diseño del estudio.....	5
3.2 Población	5
3.3 Operacionalización de Variables	7
3.5 Procedimientos y Técnicas.....	10
3.6 Plan de análisis de datos.....	10
3.7 Consideraciones éticas.....	11
IV. Resultados.....	13
V. Discusión.....	17
VI. Conclusiones.....	21
VII. Recomendaciones.....	21
VIII. Referencias Bibliográficas	22

Resumen

Objetivo: Este estudio tuvo como objetivo evaluar la expresión de los genes de la vía mTOR como un factor pronóstico de sobrevida libre de recurrencia a distancia (SLRD) en cáncer de mama triple negativo (CMTN). **Métodos:** Se realizó un estudio observacional, analítico, cohorte y retrospectivo. La población de estudio estuvo conformada por las pacientes de la base de datos pública GSE25066 del repositorio *Gene Expression Omnibus* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) que cumplieron con los criterios de elegibilidad. Se utilizó la prueba de regresión Cox para determinar los genes cuya expresión está asociada a la SLRD, y se construyó con ellos una firma génica multiplicando el valor de expresión por el coeficiente de regresión. **Resultados:** Se incluyeron 172 pacientes, 86 en cada grupo. Los genes *PIK3CD* y *RHEB* fueron identificados como factores pronóstico independientes de SLRD y se construyó la firma mTOR [(0,461x *PIK3CD*) + (0,687x*RHEB*)]. Utilizando la mediana del puntaje mTOR (0,0592) como punto de corte, se determinó que existen diferencias significativas en la SLRD (p=0,002); los pacientes con alto puntaje tienen un peor pronóstico (HR=2,453; IC95%: 1,435-4,194) comparadas a aquellas con bajo puntaje. Además, la firma mTOR es un factor pronóstico independiente de la edad, grado histológico y estadio clínico. **Conclusión:** Los genes de la vía mTOR son un factor pronóstico de SLRD en CMTN.

Palabras clave: Cáncer de mama, Expresión Génica, Sobrevida, Pronóstico.

Abstract

Objective: This study aimed to evaluate the expression of mTOR pathway genes as a prognostic factor for distant recurrence-free survival (DRFS) in triple-negative breast cancer (TNBC). **Methods:** An observational, analytical, cohort, retrospective study was conducted. The study population consisted of patients from the public database GSE25066 of the Gene Expression Omnibus repository (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) who met the eligibility criteria. The Cox regression test was used to determine the genes whose expression is associated with DRFS, and a gene signature was constructed with them by multiplying the expression value by the regression coefficient. **Results:** In total, 172 patients were included, 86 cases in each group. *PIK3CD* and *RHEB* genes were determined to be independent prognostic factors of DRFS, and the mTOR signature $[(0.461 \times \textit{PIK3CD}) + (0.687 \times \textit{RHEB})]$ was constructed. Using the median mTOR score (0.0592) as the cut-off point, it was determined that there are significant differences in SLRD ($p=0.002$); patients with high scores have a worse prognosis (HR=2.453; 95% CI: 1.435-4.194) compared to those with low scores. In addition, the mTOR signature is a prognostic factor independent of age, histological grade, and clinical stage. **Conclusion:** mTOR pathway genes are a prognostic factor for DRFS in TNBC.

Keywords: Breast cancer, Gene Expression, Survival, Prognosis.

I. Introducción

De acuerdo al consenso de *St. Gallen* 2013, el cáncer de mama se clasifica de acuerdo al perfil inmunohistoquímico en 4 subtipos; luminal A, luminal B, HER2 y triple negativo. El cáncer de mama triple negativo (CMTN) es aquel que se caracteriza por la falta de expresión de los receptores de estrógeno, progesterona y del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico (HER2) (1). Alrededor del 10 al 20% de los casos de cáncer de mama corresponden a este subtipo (2). La expresión génica de este grupo de tumores es bastante heterogénea; a menudo es considerado como equivalente al subtipo molecular basal, pero en realidad pueden incluir todos los subtipos moleculares (3,4).

El CMTN tiene un comportamiento agresivo y tiene un mal pronóstico. Al igual que en los otros tipos de cánceres, el crecimiento, la invasión y la metástasis del cáncer están regulados por, entre otros procesos, una serie de vías de señalización intracelulares (5). Una de las vías más estudiadas es la vía PI3K/AKT/mTOR. La hiperactivación de esta vía está asociada a la resistencia a la quimioterapia y la progresión de la enfermedad (6,7).

mTOR es una serina/treonina quinasa compuesta por dos complejos de proteínas, el complejo 1 sensible a la rapamicina (TORC1) y el complejo 2 insensible a la rapamicina (TORC2). TORC1 responde al nivel de aminoácidos, estrés oxidativo, requerimientos energéticos y factores de crecimiento, además promueve el crecimiento celular y progresión del ciclo celular. TORC2 responde a factores de crecimiento y regula la supervivencia, el metabolismo celular, así como el citoesqueleto (8,9).

La activación de la vía mTOR puede darse debido a tres condiciones: mutaciones en mTOR que ocasionan una activación constante de la vía, mutaciones en

TORC1 y/o TORC2, y activaciones en genes reguladores *upstream* (10). Una vez activados, TORC1 y TORC2 regularán a su vez otros componentes *downstream* tales como 4EBP1, S6K1, ATG1, S6RP, SGK1, entre otros (10,11).

En el CMTN, la expresión de algunos genes de la vía mTOR ha sido analizada mediante inmunohistoquímica, encontrando una mayor expresión de GLUT1, GLUT3, p-mTOR y p-4EBP1, en comparación de los subtipos no triple negativos (12,13). Adicionalmente, aunque no se ha reportado un valor pronóstico de p-mTOR en el cáncer de mama (14), en el grupo de CMTN aquellos que expresaron p-mTOR tuvieron una peor sobrevida global y sobrevida libre de recurrencia, comparado a aquellos que no expresaron p-mTOR (15,16).

Actualmente, existen firmas génicas para predecir la respuesta al tratamiento y la supervivencia de las pacientes con cáncer de mama; sin embargo, están dirigidas a pacientes con características específicas. Oncotype DX® está aprobada para pacientes con cáncer de mama en estadios tempranos, positivo para receptor estrógeno y negativo para HER2 (17–19), mientras que Mamaprint® está aprobada para pacientes con cáncer de mama en estadios I o II, con hasta tres ganglios positivos y tamaño tumoral menor o igual a 5 cm, positivo para receptores hormonales y negativo para HER2 (20,21). Por ello, es necesaria la determinación de biomarcadores que permitan mejorar el manejo de las pacientes con CMTN.

El objetivo de este estudio fue evaluar la expresión de los genes de la vía mTOR como factor pronóstico de sobrevida libre de recurrencia a distancia (SLRD) en CMTN.

II. Planteamiento de la Investigación:

2.1 Planteamiento del problema

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en el mundo. De acuerdo a GLOBOCAN 2020, en el Perú se reportaron 6860 nuevos casos y se calcula que la prevalencia a 5 años es de 22 486 casos (22). Aproximadamente, el 10 al 20% de los casos corresponden al subtipo triple negativo (3).

A comparación de los otros subtipos, el CMTN es más agresivo y tiene opciones de tratamiento limitadas (23,24). La tasa de supervivencia global a los 5 años es de 40% a 60% (25,26), entre 8% a 16% menor comparado a los pacientes con receptores hormonales positivos (27). Además, estos tumores son altamente invasivos, y aproximadamente el 50% de las pacientes tienen recurrencia a distancia (26).

Dado que la vía mTOR regula actividades fundamentales que incluyen el ciclo celular, la proliferación, el crecimiento y la supervivencia, así como la síntesis de proteínas y el metabolismo de la glucosa, procesos importantes en el desarrollo y progresión del cáncer (8), se planteó el siguiente problema de investigación:

¿Es la expresión de los genes de la vía mTOR un factor pronóstico de SLRD en el CMTN?

2.2 Justificación

Aunque en general el CMTN tiene un mal pronóstico, el riesgo de muerte y de progresión en aquellas pacientes tratadas con quimioterapia neoadyuvante que permanecen sin progresión de la enfermedad tres años después de la cirugía, es similar a la de las pacientes no triple negativas (28). La

identificación temprana de las pacientes de acuerdo a su grupo de riesgo, podría ayudar a establecer mejores estrategias de tratamiento. No obstante, las pruebas comerciales aprobadas para predecir la respuesta a la terapia y el riesgo de recurrencia están recomendadas para pacientes con tumores no triple negativos (29). Por ello, es necesario identificar biomarcadores pronósticos y desarrollar firmas génicas para las pacientes con CMTN.

Se ha observado que la activación de la vía mTOR en el CMTN es más frecuente que en los otros subtipos y que está asociada a un peor pronóstico (13,15,30); sin embargo, los estudios evalúan principalmente mTOR y no incluyen los genes involucrados en toda la vía, por lo que no es posible conocer los genes *upstream* o *downstream* asociados a estas diferencias. Esta investigación aportará información al respecto.

2.3 Objetivos

General:

Determinar si la expresión de los genes de la vía mTOR es un factor pronóstico de SLRD en CMTN.

Específicos:

- Determinar los genes de la vía mTOR asociados a SLRD en CMTN
- Establecer una firma génica con los genes de la vía mTOR que son factores pronósticos de SLRD en CMTN.
- Comparar la SLRD de acuerdo al puntaje de la firma génica.
- Evaluar si la firma génica es un factor pronóstico de SLRD independiente de la edad, grado histológico y estadio clínico en CMTN.

III. Metodología

3.1 Diseño de estudio

Observacional, analítico, cohorte, longitudinal y retrospectivo.

3.2 Población, muestra y muestreo

Población

Las pacientes fueron identificadas en la base de datos pública del portal *Gene Expression Omnibus* del *National Center for Biotechnology Information* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

Se incluyeron todas las pacientes de la base GSE25066 que cumplieron los criterios de elegibilidad. Las pacientes fueron reclutadas en un estudio multicéntrico prospectivo desarrollado durante junio 2000 a marzo del 2010 en el *MD Anderson Cancer Center, Lyndon B. Johnson Hospital*, ensayo clínico I-SPY-1, *US Oncology*, Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas del Perú y Grupo Español de Investigación en Cáncer de Mama (GEICAM) (31).

Criterios de inclusión:

Para los expuestos:

- Pacientes con CMTN, estadios clínicos 2 y 3.
- Pacientes tratadas con quimioterapia neoadyuvante.
- Pacientes cuyo perfil génico haya sido evaluado usando *microarrays Affymetrix*.
- Pacientes con alto puntaje de expresión mTOR.

Para los no expuestos:

- Pacientes con CMTN, estadios clínicos 2 y 3.
- Pacientes tratadas con quimioterapia neoadyuvante.
- Pacientes cuyo perfil génico haya sido evaluado usando *microarrays Affymetrix*.
- Pacientes con bajo puntaje de expresión mTOR.

Criterios de exclusión:

- Se excluyeron pacientes cuyo perfil génico fue evaluado después de recibir quimioterapia.

Muestra y muestreo

Aunque se incluyeron todas las pacientes que cumplieron los criterios de elegibilidad del estudio, se calculó el tamaño de muestra para conocer el número mínimo de pacientes a incluir.

Utilizando la fórmula para el cálculo de muestras para estudios de cohorte y considerando que 45,35% y 24,42% de los pacientes con alta expresión y baja expresión, respectivamente, presentaron recurrencia a distancia, razón de expuestos/ no expuestos de uno, nivel de confianza del 95% y potencia del 80%, se estimó que se debían incluir 81 pacientes en cada grupo.

3.3 Operacionalización de variables

Variable de exposición

Expresión de genes de la vía mTOR: Medida mediante microarrays. Se clasificó como alta (\geq mediana) o baja ($<$ mediana) de acuerdo al mTOR *score*.

Variable de respuesta

Sobrevida libre de recurrencia a distancia: intervalo de tiempo en meses, desde la biopsia diagnóstica inicial hasta el diagnóstico de metástasis a distancia o muerte por cualquier causa.

Nombre de la variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Dimensión	Indicador	Tipo de Variable	Escala de medición	Unidades de medida
Exposición: Expresión de genes de la vía mTOR	Proceso mediante el cual la información de los genes es transformada a un producto génico funcional.	Medida mediante la técnica de <i>microarrays</i> . De acuerdo al puntaje de la firma génica, se clasificó como alta (\geq mediana) o baja ($<$ mediana).		mTOR <i>score</i> Alta Baja	Cuantitativa continua Cualitativa dicotómica	Razón Ordinal	- -
Respuesta: Sobrevida libre de recurrencia a distancia	Período posterior a un tratamiento exitoso durante el cual no hay signos ni síntomas de la enfermedad que se trató.	Intervalo de tiempo en meses, desde la biopsia diagnóstica inicial hasta el diagnóstico de metástasis a distancia o muerte por cualquier causa.	Estado Tiempo	Sí No	Cualitativa politómica Cuantitativa continua	Nominal Razón	- Meses

Control:							
Edad	Tiempo que ha vivido un ser vivo contando desde su nacimiento.	Edad al momento del diagnóstico		< 50 ≥ 50	Cuantitativa continua Cualitativa Dicotómica	Razón Ordinal	Años
Grado histológico	Descripción de un tumor basada en qué tan anormales se ven las células cancerosas y el tejido bajo un microscopio y qué tan rápido es probable que las células cancerosas crezcan y se propaguen.	Grado histológico al diagnóstico		Grado 2 Grado 3	Cualitativa politómica	Ordinal	-
Estadio clínico	La etapa del cáncer que se basa en las pruebas que se realizan antes de la cirugía	Estado clínico al diagnóstico de acuerdo a la séptima edición de la AJCC		EC2 EC3	Cualitativa dicotómica	Ordinal	-

3.4 Procedimientos y técnicas

Se descargó la base de datos GSE25066 del repositorio *Gene Expression Omnibus* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) y se seleccionaron los pacientes que cumplían con los criterios de elegibilidad.

Las sondas fueron reemplazadas por el nombre del gen correspondiente y se seleccionaron los genes de la vía mTOR de acuerdo a la *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/cards/KEGG_MTOR_SIGNALING_PATHWAY.html) (Anexo 1).

En los genes en que se utilizó más de una sonda para su evaluación, se seleccionó el valor máximo de expresión. Luego, los valores fueron centrados a la mediana, restando el valor de expresión de cada gen menos la mediana de expresión del mismo gen (32).

Todo el procesamiento de la data se realizó con el lenguaje de programación R versión 4.1.0 mediante el programa RStudio versión 1.4.17.17.

3.5 Plan de análisis de los datos

Para las variables cuantitativas se estimó la media y la desviación estándar, mientras que para las variables cualitativas se estimaron las frecuencias absolutas y relativas. Las características de las pacientes fueron comparadas de acuerdo al nivel de expresión de los genes de la vía mTOR empleando las pruebas T de Student y chi cuadrado.

Se utilizó el análisis de regresión de Cox univariado para determinar y seleccionar los genes asociados a la SLRD ($p < 0,05$). Luego, estos genes

fueron incluidos en un análisis multivariado mediante regresión de Cox con método *stepwise* para identificar los genes que son factores pronósticos independiente y construir un modelo lineal (firma génica) que nos permita calcular el puntaje de expresión. Este puntaje fue calculado como se muestra a continuación:

$$\text{mTOr score} = (\beta_1 \times \text{exp}_1) + (\beta_2 \times \text{exp}_2) + (\beta_3 \times \text{exp}_3) \dots + (\beta_n \times \text{exp}_n)$$

Donde:

β : coeficiente de regresión del gen n

exp_n : expresión del gen n

Las pacientes fueron divididas en grupos de alto o bajo puntaje de expresión utilizando la mediana como punto de corte. Se utilizó el método de Kaplan-Meier para determinar la SLRD y las curvas de supervivencia utilizando el método de y las diferencias fueron evaluadas con la prueba log-rank.

Para evaluar si la firma es un factor pronóstico independiente de SLRD de características clínicas (edad, grado histológico y estadio clínico), se utilizó el modelo de regresión de Cox multivariado.

Todos los análisis se realizaron con un nivel de confianza del 95% empleando el lenguaje de programación R versión 4.1.0 mediante el programa RStudio versión 1.4.17.17.

3.6 Consideraciones éticas

Se respetaron los principios éticos de declaración de Helsinki. Además, el proyecto fue aprobado por el comité de investigación de la escuela de

Postgrado de la Universidad Privada Antenor Orrego (RD N° 0036-2022-D-EPG-UPAO).

La información fue recopilada de una fuente de datos secundarios por lo que no se utilizó consentimiento informado. Toda la información obtenida estaba anonimizada.

IV. Resultados

4.1 Características clínicas

Se incluyeron un total de 172 pacientes, 86 pacientes con alto y 86 pacientes con bajo puntaje de expresión de genes de la vía mTOR. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los grupos de acuerdo al estado de expresión mTOR respecto a la edad, grado histológico, ni estadio clínico. Además, se pudo observar que el grupo de con alto puntaje de expresión mTOR tuvo más eventos de SLRD (45,35% (N=39) vs 24,42% (N=21); p=0,004) (Tabla 1).

Tabla 1. Características clínicas de las pacientes con CMTN, de acuerdo al nivel de expresión de genes de la vía mTOR.

Características	Nivel de expresión mTOR			p
	Total (%)	Bajo (%)	Alto (%)	
Edad	172 (100,0)	86 (50,00)	86 (50,00)	
Media	49,38	50,56	48,19	
(Desviación estándar)	(±10,63)	(±10,61)	(±10,57)	0,144
<50	88 (51,16)	41 (47,67)	47 (54,65)	0,360
≥ 50	84 (48,84)	45 (52,33)	39 (45,35)	
Grado histológico				
Grado 2	19 (12,10)	9 (11,54)	10 (12,66)	0,823
Grado 3	138 (87,90)	69 (88,46)	69 (87,34)	
No reportado	15	8	7	
Estadio clínico				0,647
II	85 (49,42)	41 (47,67)	44 (51,16)	
III	87 (50,58)	45 (52,33)	42 (48,84)	
Evento de SLRD				0,004*
No	112 (65,12)	65 (75,58)	47 (54,65)	
Sí	60 (34,88)	21 (24,42)	39 (45,35)	

*estadísticamente significativo (p<0,05)

4.2 Determinación de los genes de la vía mTOR asociados a SLRD

De los 51 genes evaluados (Anexo 2), se determinó que *CAB39L*, *PIK3CD*, *PIK3R1* y *RHEB* estuvieron asociados a la SLRD. El análisis multivariado con método *stepwise*, seleccionó dos genes como factores pronóstico independientes: *PIK3CD* y *RHEB*, ambos asociados a un peor pronóstico (Hazard Ratio >1; Tabla 2).

Tabla 2. Genes de la vía mTOR asociados a la SLRD en CMTN

Genes	Univariado			Multivariado*		
	HR	IC 95%	p-valor	HR	IC 95%	p-valor
<i>CAB39L</i>	0,690	0,484-0,984	0,040			
<i>PIK3CD</i>	1,428	1,070-1,906	0,015	1,585	1,166- 2,154	0,003
<i>PIK3R1</i>	0,743	0,554-0,996	0,047			
<i>RHEB</i>	1,726	1,096-2,718	0,019	1,987	1,246- 3,168	0,004

*Método *stepwise*

HR: Hazard ratio

IC: Intervalo de confianza

4.3 Firma mTOR

Se construyó la firma mTOR multiplicando los coeficientes de regresión por el valor de expresión de *PIK3CD* y *RHEB*. La mediana del puntaje fue de 0,0592.

$$\text{mTOR score} = (0,461 \times \text{PIK3CD}) + (0,687 \times \text{RHEB})$$

4.4 SLRD de acuerdo al puntaje de la firma génica

La mediana de seguimiento de acuerdo al nivel de expresión de la firma mTOR fue de 38,34 meses (Rango intercuartil: 25,75-53,52) y 33,35 meses (Rango intercuartil: 23,50-53,82) para las pacientes con bajo (< 0,0592) y alto nivel ($\geq 0,0592$), respectivamente.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la SLRD de acuerdo a la expresión de genes de la vía mTOR ($p=0,002$) (Figura 1). En el grupo de pacientes con bajo puntaje de expresión de mTOR, no se alcanzó la mediana de SLRD y se estimó que la SLRD a los 3 años fue de 72,47% (IC 95%: 62,86 - 83,56). En el grupo con alto puntaje, la mediana de SLRD fue de 34,5 meses (IC 95%: 25,6 – No alcanzado) y la SLRD a los 3 años fue de 45,81% (IC 95%: 34,47 – 60,89).

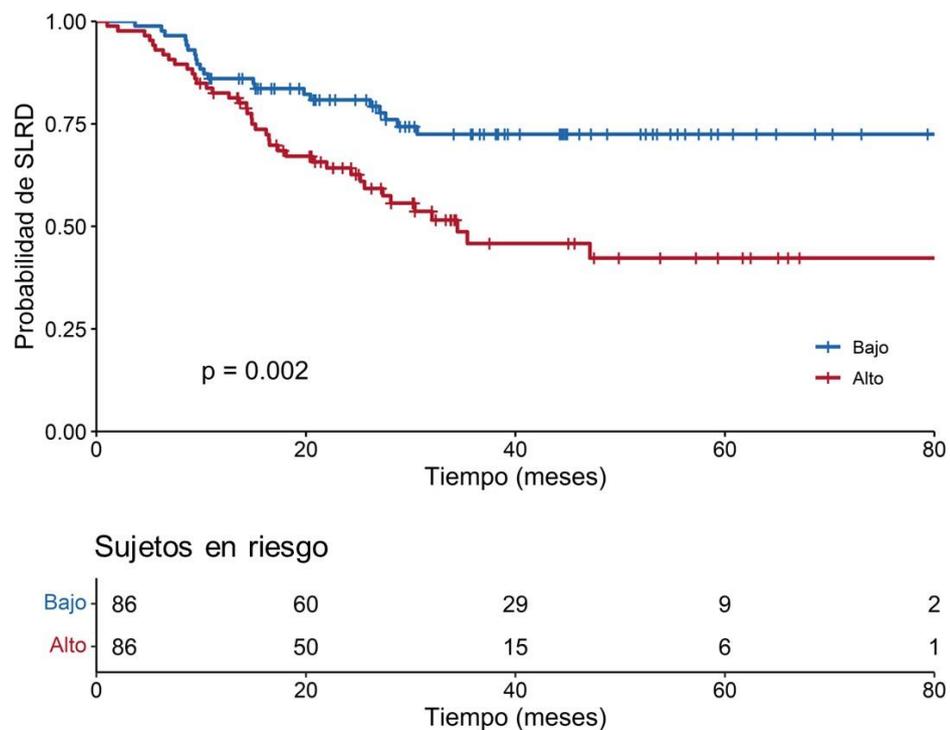


Figura 1. SLRD de acuerdo al puntaje mTOR en CMTN.

4.5 Firma mTOR como factor pronóstico independiente

La firma mTOR y el estadio clínico fueron factores pronóstico independientes de SLRD. De acuerdo al modelo multivariado, las pacientes con estadio clínico 3 (HR= 2,285; IC 95%: 1,346- 3,880) y un

alto puntaje mTOR (HR= 2,453; IC 95%: 1,435- 4,194) tuvieron un mayor riesgo de recurrencia a distancia o muerte (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis univariado y multivariado de las características clínicas de los pacientes y la firma mTOR como factor pronóstico de SLRD.

Características	N (eventos)	Univariado			Multivariado		
		HR	IC 95%	p-valor	HR	IC 95%	p-valor
Edad							
<50	88 (26)	1					
≥ 50	84 (34)	1,328	0,797-2,213	0,277			
Grado histológico							
Grado 2	19 (8)	1					
Grado 3	138 (44)	0,649	0,305-1,383	0,263			
Estadio clínico							
II	85 (22)	1			1		
III	87 (38)	2,065	1,220-3,493	0,007	2,285	1,346- 3,880	0,002
mTOR score							
Bajo	86 (21)	1			1		
Alto	86 (39)	2,232	1,3102-3,801	0,003	2,453	1,435- 4,194	0,001

HR: Hazard ratio

IC: Intervalo de confianza

V. **Discusión**

En la última década, el interés por la biología molecular del CMTN ha crecido y esto ha permitido la identificación de distintos perfiles de mutación y expresión génica que podrían utilizarse como biomarcadores pronósticos y predictivos. Sin embargo, hasta ahora no se ha aprobado ninguno de ellos para uso en la práctica clínica (33).

La alta frecuencia de mutaciones de la vía PI3K/AKT/mTOR en pacientes con cáncer de mama, ha motivado el estudio de los genes involucrados en esta vía como posibles targets terapéuticos y como biomarcadores (34,35). En el CMTN, la activación de la vía mTOR es más frecuente comparada a otros subtipos y es usualmente asociada a un peor pronóstico (13,15,30). En esta investigación se buscó determinar si la expresión de los genes de la vía mTOR es un factor pronóstico de SLRD en CMTN.

En el análisis multivariado de los genes de la vía mTOR, se determinó que la expresión de *PIK3CD* fue un factor pronóstico independiente asociado a una peor SLRD. Este gen codifica la subunidad p110 δ de la proteína PI3K, es expresada principalmente por leucocitos y está involucrado en la respuesta inmune (36). Se ha reportado que tiene un rol crítico en la proliferación, migración y supervivencia celular, además de encontrarse frecuentemente amplificado o sobre expresado en distintos tipos de cánceres (36–38).

En el CMTN, la expresión de *PIK3CD* en fibroblastos (f-PIK3C δ) regula la progresión del cáncer. Se ha mostrado que f-PIK3C δ ejerce una función protumorigénica a través de un mecanismo paracrino. A su vez, la inhibición de f-PIK3C δ promueve la secreción de factores que conducen a la regulación

positiva de NR4A1 en células de CMTN, donde actúa como un supresor de tumores. En ratones, la inhibición de PIK3Cδ redujo el crecimiento y la metástasis tumoral. Adicionalmente, se demostró que aquellas pacientes con altos niveles de *PKI3CD* expresado por fibroblastos asociados al cáncer (CAF-PIK3Cδ), f-PIK3Cδ (proteína) y PIK3Cδ tumoral, tienen un peor pronóstico en sobrevida global (SG) y sobrevida libre de enfermedad (SLE). Asimismo, la expresión tumoral de PIK3CD fue un factor pronóstico independiente de edad, tamaño tumoral, grado, invasión linfovascular y estado ganglionar, tanto para SG (HR= 2,014; IC 95%: 1,219- 3,33; p = 0,006) como para SLE (HR= 1,81; IC 95%: 1,065- 3,076; p = 0,028) (39).

Por otro lado, la expresión de *RHEB* también estuvo asociada a la SLRD. Diversos estudios han mostrado que *RHEB* se encuentra sobre expresado en diferentes tumores incluyendo mama, cabeza y cuello, próstata y piel, y que además, una alta expresión se asocia con un peor pronóstico (40–42). En cáncer de mamá, se ha observado una mayor expresión de *RHEB* en tumores ductales invasivos que en ductales *in situ*, así como una asociación significativa con la progresión de la enfermedad, siendo mayor la expresión en tumores en estadio 3 y más frecuente en tumores ER y PR negativos (42). Asimismo, la expresión está asociada también al grado histológico de los tumores (40). Al analizar la sobrevida, se pudo comprobar que los pacientes en estadio 3 que tenían una alta expresión de *RHEB*, tuvieron peor sobrevida libre de metástasis en comparación a los que tuvieron una baja expresión (p=0,0332) (42).

Adicionalmente, en estudios en cultivos celulares se encontró que las mutaciones activadoras de *RHEB*, promueven la transformación oncogénica

de las células, en las que se observó fosforilación constitutiva de la proteína Quinasa ribosomal S6 (S6K) y la proteína 1 de unión al factor de iniciación de la traducción eucariota 4E (EIF4EBP1), componentes aguas debajo de la vía mTOR (43). En el CMTN se han reportado dos mutaciones, T23K y D60H, ambas clasificadas como patogénicas (44). Aunque no se han explorado las implicancias de estas mutaciones, en cáncer renal de células claras se ha encontrado que la mutación Y35N produce una mayor activación de MTOR y de la vía RAF/MEK/ERK, resultando en una transformación en células cancerosas (45,46). Es necesario realizar más estudios que permitan dilucidar los mecanismos por los cuáles las mutaciones reportadas en CMTN favorecen la progresión del cáncer.

Dado que la expresión génica y el pronóstico de las pacientes podría variar de acuerdo a algunas características clínicas (15,47), se incluyeron algunas variables de control como edad, grado histológico y estadio clínico. Se utilizó un punto de corte de 50 años ya que previamente se ha evaluado como factor asociado a la expresión de genes de la vía mTOR (47), factor pronóstico de SLRD (48), y como factor asociado a la respuesta de la quimioterapia neoadyuvante (49). Aunque, en algunas pacientes no se conocía el grado histológico, el número de datos perdidos no es suficiente para influir en la significancia estadística y se pudo observar que, en la población de estudio, el nivel de expresión de los genes de la vía mTOR estuvo solo asociado al evento de SLRD.

Se demostró que la firma mTOR fue un factor pronóstico independiente de SLRD de las variables clínicas incluidas en el modelo, al igual que el estadio clínico. Esta característica ya ha sido reportada previamente como factor

asociado a la supervivencia de las pacientes con cáncer de mama tratadas con quimioterapia neoadyuvante (HR: 3,2; IC95%: 1,6-17,0; $p < 0,01$, para EC III vs II,) y con CMTN ($p < 0,001$), con HR de 3,13 (IC95%: 1,56-6,27), 9,65 (IC95%: 4,66-20,0), y 29,0 (IC95%: 9,65-86,9) para EC II, III y IV, respectivamente, vs EC I, y (50–52). En la población estudiada, la edad y el grado histológico no fueron factores pronósticos, similar a lo reportado por otros estudios (52,53), pero esto podría deberse a características propias de las pacientes seleccionadas ya que existen estudios en los que sí se encontró asociación con la edad (26). Por otro lado, aunque el grado histológico es un factor pronóstico en el cáncer de mama, posiblemente, su rol en el CMTN sea más limitado dado que la mayoría de casos son de grado histológico alto, como en el caso de nuestro grupo.

Este estudio tiene algunas limitaciones. Al trabajar con una base de datos secundarios, las variables han sido definidas por otros investigadores y no es posible considerar otras características adicionales como variables de control. Sin embargo, se pudo determinar que los genes de la vía mTOR tienen utilidad como biomarcadores pronóstico de SLRD en CMTN.

Teniendo en cuenta que la invasión local y la metástasis son la causa principal de muerte en cáncer, se debería investigar posibles opciones terapéuticas utilizando inhibidores de PI3K y RHEB.

VI. Conclusiones

Los genes de la vía mTOR son un factor pronóstico de SLRD en CMTN; se determinó que *PIK3CD* y *RHEB* son genes cuya expresión está asociada a un peor pronóstico de SLRD.

Se estableció que utilizando la mediana del puntaje de la firma mTOR como punto de corte es posible discriminar pacientes con diferente pronóstico, siendo aquellas con un alto puntaje las que tuvieron una peor SLRD. Además, la firma génica fue un factor pronóstico independiente de edad, grado histológico y estadio clínico.

VII. Recomendaciones

Se recomienda realizar la evaluación y validación del valor pronóstico de la firma mTOR en otras cohortes de pacientes con CMTN. Adicionalmente, es necesario establecer un punto de corte aplicable a todas las pacientes que no esté influenciado por el grupo al que esta pertenece, como en el caso de la mediana de puntaje. Por otro lado, a fin de hacer la prueba económicamente más accesible, podría utilizarse PCR en tiempo real para la evaluación de la expresión génica.

Se debe investigar el potencial terapéutico de *PIK3CD* y *RHEB* en el manejo del CMTN.

VIII. Referencias bibliográficas

1. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2013;24(9):2206-23.
2. Vallejos CS, Gómez HL, Cruz WR, Pinto JA, Dyer RR, Velarde R, et al. Breast cancer classification according to immunohistochemistry markers: subtypes and association with clinicopathologic variables in a peruvian hospital database. *Clin Breast Cancer*. 2010;10(4):294-300.
3. Sharma P. Biology and Management of Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *The Oncologist*. 2016;21(9):1050-62.
4. Kumar P, Aggarwal R. An overview of triple-negative breast cancer. *Arch Gynecol Obstet*. 2016;293(2):247-69.
5. Fares J, Fares MY, Khachfe HH, Salhab HA, Fares Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):1-17.
6. Guerrero-Zotano A, Mayer IA, Arteaga CL. PI3K/AKT/mTOR: role in breast cancer progression, drug resistance, and treatment. *Cancer Metastasis Rev*. 2016;35(4):515-24.
7. Dong C, Wu J, Chen Y, Nie J, Chen C. Activation of PI3K/AKT/mTOR Pathway Causes Drug Resistance in Breast Cancer. *Front Pharmacol*. 2021;12:143.
8. Chantranupong L, Sabatini DM. The TORC1 pathway to protein destruction. *Nature*. 2016;536(7615):155-6.
9. Gaubitz C, Prouteau M, Kusmider B, Loewith R. TORC2 Structure and Function. *Trends Biochem Sci*. 2016;41(6):532-45.
10. Conciatori F, Ciuffreda L, Bazzichetto C, Falcone I, Pilotto S, Bria E, et al. mTOR Cross-Talk in Cancer and Potential for Combination Therapy. *Cancers*. 2018;10(1):E23.
11. Rad E, Murray JT, Tee AR. Oncogenic Signalling through Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR): A Driver of Metabolic Transformation and Cancer Progression. *Cancers*. 2018;10(1):E5.
12. Ito K, Ogata H, Honma N, Shibuya K, Mikami T. Expression of mTOR Signaling Pathway Molecules in Triple-Negative Breast Cancer. *Pathobiology*. 2019;86(5-6):315-21.
13. Walsh S, Flanagan L, Quinn C, Evoy D, McDermott EW, Pierce A, et al. mTOR in breast cancer: Differential expression in triple-negative and non-triple-negative tumors. *The Breast*. 2012;21(2):178-82.
14. Ding XF, Li LF, Zhou XL, Guo LN, Dou MM, Chi YY, et al. P-mTOR Expression and Implication in Breast Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*. 2017;12(1):e0170302.

15. Ueng SH, Chen SC, Chang YS, Hsueh S, Lin YC, Chien HP, et al. Phosphorylated mTOR expression correlates with poor outcome in early-stage triple negative breast carcinomas. *Int J Clin Exp Pathol*. 2012;5(8):806-13.
16. Wang J, Zhu X, Xu X, Guo L, Shen G, Liu X, et al. PIK3CA mutations and downstream effector p-mTOR expression: implication for prognostic factors and therapeutic targets in triple negative breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2017;10(7):7682-91.
17. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(27):2817-26.
18. Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W, et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2006;24(23):3726-34.
19. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, et al. Adjuvant Chemotherapy Guided by a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2018;379(2):111-21.
20. Buyse M, Loi S, van't Veer L, Viale G, Delorenzi M, Glas AM, et al. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98(17):1183-92.
21. Krop I, Ismaila N, Andre F, Bast RC, Barlow W, Collyar DE, et al. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol*. 2017;35(24):2838-47.
22. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-49.
23. Bhushan A, Gonsalves A, Menon JU. Current State of Breast Cancer Diagnosis, Treatment, and Theranostics. *Pharmaceutics*. 2021;13(5):723.
24. Li X, Yang J, Peng L, Sahin AA, Huo L, Ward KC, et al. Triple-negative breast cancer has worse overall survival and cause-specific survival than non-triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2017;161(2):279-87.
25. Yin L, Duan JJ, Bian XW, Yu S, Cang. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res*. 2020;22(1):61.
26. De-la-Cruz-Ku G, Luyo M, Morante Z, Enriquez D, Möller MG, Chambergo-Michilot D, et al. Triple-negative breast cancer in Peru: 2000 patients and 15 years of experience. *PloS One*. 2020;15(8):e0237811.
27. Howard FM, Olopade OI. Epidemiology of Triple-Negative Breast Cancer: A Review. *Cancer J Sudbury Mass*. 2021;27(1):8-16.
28. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to Neoadjuvant Therapy and Long-Term Survival in Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(8):1275-81.

29. National Comprehensive Cancer Network. Breast Cancer (Version 7.2021) [Internet]. [citado 26 de agosto de 2021]. Disponible en: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf
30. Pelicano H, Zhang W, Liu J, Hammoudi N, Dai J, Xu RH, et al. Mitochondrial dysfunction in some triple-negative breast cancer cell lines: role of mTOR pathway and therapeutic potential. *Breast Cancer Res BCR*. 2014;16(5):434.
31. Hatzis C, Pusztai L, Valero V, Booser DJ, Esserman L, Lluch A, et al. A genomic predictor of response and survival following taxane-anthracycline chemotherapy for invasive breast cancer. *JAMA*. 2011;305(18):1873-81.
32. Pinto JA, Araujo J, Cardenas NK, Morante Z, Doimi F, Vidaurre T, et al. A prognostic signature based on three-genes expression in triple-negative breast tumours with residual disease. *NPJ Genomic Med*. 2016;1:15015.
33. Cocco S, Piezzo M, Calabrese A, Cianniello D, Caputo R, Di Lauro V, et al. Biomarkers in Triple-Negative Breast Cancer: State-of-the-Art and Future Perspectives. *Int J Mol Sci*. 2020;21(13):4579.
34. Khan MA, Jain VK, Rizwanullah M, Ahmad J, Jain K. PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors in triple-negative breast cancer: a review on drug discovery and future challenges. *Drug Discov Today*. 2019;24(11):2181-91.
35. Massihnia D, Galvano A, Fanale D, Perez A, Castiglia M, Incorvaia L, et al. Triple negative breast cancer: shedding light onto the role of pi3k/akt/mTOR pathway. *Oncotarget*. 2016;7(37):60712-22.
36. Tzenaki N, Papakonstanti EA. p110 δ PI3 kinase pathway: emerging roles in cancer. *Front Oncol*. 2013;3:40.
37. Thorpe LM, Yuzugullu H, Zhao JJ. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(1):7-24.
38. Fruman DA, Rommel C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(2):140-56.
39. Gagliano T, Shah K, Gargani S, Lao L, Alsaleem M, Chen J, et al. PIK3C δ expression by fibroblasts promotes triple-negative breast cancer progression. *J Clin Invest*. 2020;130(6):3188-204.
40. Wazir U, Newbold RF, Jiang WG, Sharma AK, Mokbel K. Prognostic and therapeutic implications of mTORC1 and Rictor expression in human breast cancer. *Oncol Rep*. 2013;29(5):1969-74.
41. Kobayashi T, Shimizu Y, Terada N, Yamasaki T, Nakamura E, Toda Y, et al. Regulation of androgen receptor transactivity and mTOR-S6 kinase pathway by Rheb in prostate cancer cell proliferation. *The Prostate*. 2010;70(8):866-74.
42. Lu ZH, Shvartsman MB, Lee AY, Shao JM, Murray MM, Kladney RD, et al. mTOR Activator Rheb Is Frequently Overexpressed In Human Carcinomas And Is Critical And Sufficient For Skin Epithelial Carcinogenesis. *Cancer Res*. 2010;70(8):3287.
43. Jiang H, Vogt PK. Constitutively active Rheb induces oncogenic transformation. *Oncogene*. 2008;27(43):5729-40.

44. Shah SP, Roth A, Goya R, Oloumi A, Ha G, Zhao Y, et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature*. 2012;486(7403):395-9.
45. Ghosh AP, Marshall CB, Coric T, Shim E hee, Kirkman R, Ballestas ME, et al. Point mutations of the mTOR-RHEB pathway in renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2015;6(20):17895-910.
46. Heard JJ, Phung I, Potes MI, Tamanoi F. An oncogenic mutant of RHEB, RHEB Y35N, exhibits an altered interaction with BRAF resulting in cancer transformation. *BMC Cancer*. 2018;18:69.
47. Ilozumba MN, Yao S, Llanos AAM, Omilian AR, Zhang W, Datta S, et al. mTOR pathway gene expression in association with race and clinicopathological characteristics in Black and White breast cancer patients. *Discov Oncol*. 2022;13(1):34.
48. Liedtke C, Hess KR, Karn T, Rody A, Kiesel L, Hortobagyi GN, et al. The prognostic impact of age in patients with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. abril de 2013;138(2):591-9.
49. Li CL, Wu CC, Kan JY, Chen FM, Hou MF, Chuang CH, et al. The impact of age group in breast cancer survival outcome according to neoadjuvant treatment response: A matched case–control study. *Kaohsiung J Med Sci*. 2022;38(3):277-82.
50. Huang Z, Jin S, Zeng M, Shu J, Liu Y, Zhang J, et al. Clinical and Therapeutic Factors Vary by Prognosis in Patients with Pathological Complete Response After Neoadjuvant Therapy for Breast Cancer. *Cancer Manag Res*. 2021;13:9235-46.
51. Luo SP, Wu QS, Chen H, Wang XX, Chen QX, Zhang J, et al. Validation of the Prognostic Significance of the Prognostic Stage Group According to the Eighth Edition of American Cancer Joint Committee on Cancer Staging System in Triple-Negative Breast Cancer: An Analysis From Surveillance, Epidemiology, and End Results 18 Database. *J Surg Res*. 2020;247:211-9.
52. Urru SAM, Gallus S, Bosetti C, Moi T, Medda R, Sollai E, et al. Clinical and pathological factors influencing survival in a large cohort of triple-negative breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2018;18(1):56.
53. Ovcaricek T, Frkovic SG, Matos E, Mozina B, Borstnar S. Triple negative breast cancer – prognostic factors and survival. *Radiol Oncol*. 2010;45(1):46-52.

IX. Anexos

Anexo 01. Genes de la vía mTOR y sondas Affymetrix (*Human Genome U133A Array*) evaluados.

Genes	Sondas	Genes	Sondas	Genes	Sondas
AKT1	207163_s_at	MAPK3	212046_x_at	RPS6KA2	204906_at
AKT2	203809_s_at	MLST8	220587_s_at	RPS6KA2	212912_at
AKT2	211453_s_at	MTOR	202288_at	RPS6KA3	203843_at
AKT3	212607_at	PDPK1	204524_at	RPS6KA6	220738_s_at
AKT3	212609_s_at	PDPK1	32029_at	RPS6KB1	204171_at
AKT3	219393_s_at	PGF	209652_s_at	RPS6KB1	211578_s_at
BRAF	206044_s_at	PGF	215179_x_at	RPS6KB2	203777_s_at
CAB39	217873_at	PIK3CA	204369_at	STK11	204292_x_at
CAB39L	221003_s_at	PIK3CB	212688_at	STK11	41657_at
DDIT4	202887_s_at	PIK3CB	217620_s_at	STRADA	221554_at
EIF4B	211937_at	PIK3CD	203879_at	STRADA	52169_at
EIF4B	211938_at	PIK3CD	211230_s_at	TSC1	209390_at
EIF4E	201435_s_at	PIK3CG	206369_s_at	TSC2	215624_at
EIF4E	201436_at	PIK3CG	206370_at	TSC2	215735_s_at
EIF4E	201437_s_at	PIK3R1	212239_at	ULK1	209333_at
EIF4E2	209393_s_at	PIK3R1	212240_s_at	ULK2	204062_s_at
EIF4E2	213571_s_at	PIK3R1	212249_at	ULK2	204063_s_at
EIF4EBP1	221539_at	PIK3R2	207105_s_at	ULK2	215154_at
HIF1A	200989_at	PIK3R3	202743_at	VEGFA	210512_s_at
IGF1	209540_at	PIK3R3	211580_s_at	VEGFA	210513_s_at
IGF1	209541_at	PIK3R5	220566_at	VEGFA	211527_x_at
IGF1	209542_x_at	PRKAA1	209799_at	VEGFA	212171_x_at
IGF1	211577_s_at	PRKAA2	207709_at	VEGFB	203683_s_at
INS	206598_at	RHEB	201452_at	VEGFC	209946_at
LAMTOR2	218291_at	RHEB	201453_x_at	VEGFD	206742_at
LAMTOR3	217971_at	RHEB	213404_s_at		
LAMTOR5	202299_s_at	RPS6	200081_s_at		
LAMTOR5	202300_at	RPS6	201254_x_at		
MAPK1	208351_s_at	RPS6	209134_s_at		
MAPK1	212271_at	RPS6KA1	203379_at		

Anexo 02. Resultados del análisis de regresión de Cox univariado

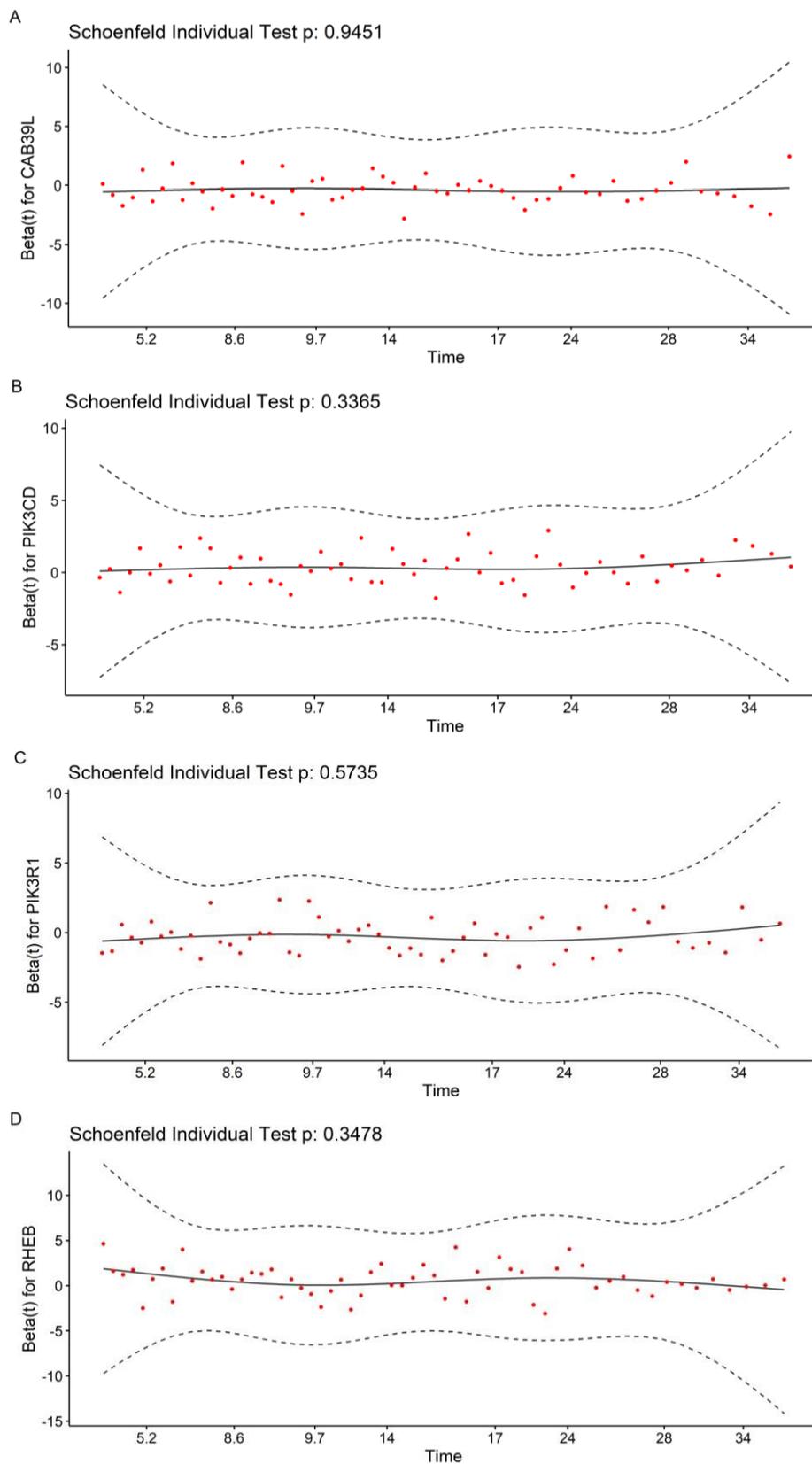
Genes	HR	IC 95%	p-valor	Genes	HR	IC 95%	p-valor
AKT1	0,860	0,654-1,131	0,280	PIK3CG	1,133	0,873-1,471	0,347
AKT2	1,007	0,768-1,319	0,960	PIK3R1	0,743	0,554-0,996	0,047*
AKT3	1,300	0,996-1,697	0,054	PIK3R2	1,138	0,718-1,803	0,581
BRAF	1,294	0,821-2,040	0,268	PIK3R3	0,969	0,696-1,349	0,853
CAB39	1,179	0,685-2,029	0,553	PIK3R5	0,994	0,591-1,673	0,983
CAB39L	0,690	0,484-0,984	0,040*	PRKAA1	1,045	0,877-1,246	0,622
DDIT4	1,196	0,940-1,522	0,146	PRKAA2	0,858	0,658-1,119	0,260
EIF4B	0,796	0,509-1,245	0,317	RHEB	1,726	1,096-2,718	0,019*
EIF4E	1,188	0,806-1,752	0,385	RPS6	1,332	0,884-2,007	0,170
EIF4E2	1,490	0,876-2,536	0,141	RPS6KA1	1,319	0,873-1,993	0,188
EIF4EBP1	1,190	0,939-1,507	0,150	RPS6KA2	1,075	0,703-1,642	0,740
HIF1A	1,181	0,796-1,752	0,409	RPS6KA3	1,506	0,935-2,427	0,092
IGF1	0,826	0,629-1,084	0,168	RPS6KA6	0,791	0,537-1,165	0,236
INS	1,287	0,756-2,191	0,352	RPS6KB1	0,701	0,471-1,045	0,081
LAMTOR2	0,916	0,621-1,350	0,656	RPS6KB2	1,145	0,757-1,733	0,521
LAMTOR3	0,788	0,468-1,329	0,372	STK11	1,079	0,664-1,752	0,760
LAMTOR5	1,236	0,614-2,488	0,552	STRADA	1,294	0,736-2,275	0,371
MAPK1	1,202	0,762-1,895	0,429	TSC1	1,093	0,647-1,844	0,740
MAPK3	0,950	0,761-1,184	0,646	TSC2	0,976	0,709-1,345	0,884
MLST8	0,863	0,672-1,107	0,246	ULK1	0,852	0,682-1,064	0,158
MTOR	1,454	0,950-2,225	0,085	ULK2	1,382	0,825-2,316	0,219
PDPK1	0,964	0,539-1,724	0,901	VEGFA	1,177	0,944-1,467	0,147
PGF	1,316	0,942-1,839	0,108	VEGFB	0,824	0,590-1,153	0,259
PIK3CA	0,971	0,655-1,439	0,882	VEGFC	1,089	0,790-1,502	0,601
PIK3CB	1,213	0,771-1,909	0,404	VEGFD	0,854	0,709-1,028	0,095
PIK3CD	1,428	1,070-1,906	0,015*				

*p<0,05

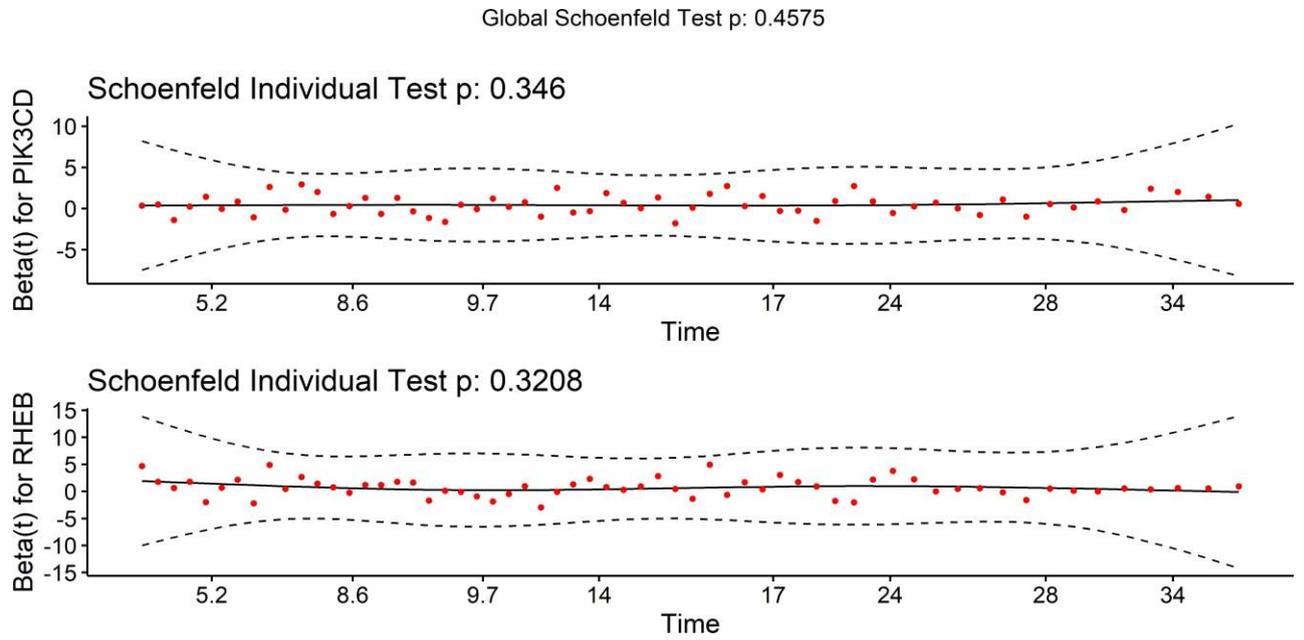
HR: Hazard ratio

IC: Intervalo de confianza

Anexo 03. Evaluación del supuesto de proporcionalidad de riesgos de los genes significativos en el análisis de Cox univariado.



Anexo 4. Evaluación del supuesto de proporcionalidad de riesgos de los genes significativos en el análisis de Cox multivariado.



Anexo 5. Evaluación del supuesto de proporcionalidad de riesgos de acuerdo al estadio clínico y puntaje mTOR

Global Schoenfeld Test p: 0.3141

