



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS  
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

**"Expresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3 como marcador pronóstico asociado a factores clínico-patológicos en pacientes con cáncer de mama"**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD  
PRESENTA

**DRA. ANGÉLICA GEORGINA ROCHA LÓPEZ**  
MÉDICA CIRUJANA Y PARTERA

ASESOR DE TESIS:  
D. EN C. SERGIO GUTIERREZ CASTELLANOS

CO-ASESOR DE TESIS:  
D. EN C. CARLOS CORTÉS PENAGOS

CICLO ESCOLAR 2020-2022

MORELIA, MICHOACÁN

ENERO DE 2022

El comité tutorial designado por la División de Estudios de Posgrado de la  
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad  
Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Aprobó la tesis presentada por:

Médica Cirujana y partera  
Angélica Georgina Rocha López

**Miembros del Comité Tutorial:**

Dr. José Miguel Cervantes Alfaro  
*Presidente*

D. en C. Sergio Gutiérrez Castellanos  
*Vocal 1 (director de Tesis)*

D. en C. Carlos Cortés Penagos  
*Vocal 2 (co-director de Tesis)*

D. en C. Ana Edith Higareda Mendoza  
*Vocal 3*

D. en C. Bertha Fenton Navarro  
*Vocal 4*



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO  
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS Y BIOLÓGICAS  
"DR IGNACIO CHÁVEZ"  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

ACTA DE SEMINARIO DE TESIS

III

En la ciudad de Morelia, capital del Estado de Michoacán de Ocampo siendo las 12:00 h del día 12 de enero del 2022, se reunieron los Profesores:

Presidente: D. en C. José Miguel Cervantes Alfaro  
Vocal 1 (Director de Tesis): D. en C. Sergio Gutiérrez Castellanos  
Vocal 2: D. en C. Carlos Cortés Penagos  
Vocal 3: D. en C. Ana Edith Higareda Mendoza  
Vocal 4: D. en C. Bertha Fenton Navarro

Miembros del Comité Tutorial designado para evaluar el Trabajo de Tesis titulado:  
Expresión nuclear de pSer727-STAT3 como marcador pronóstico asociado a factores clínico-patológicos en pacientes con cáncer de mama.

Presentado por el alumno: Angélica Georgina Rocha López Matrícula: 0856477-B  
del área terminal Biomedicina Celular y Molecular Generación: 2020-2022

El Comité procedió a realizar la evaluación correspondiente al sustentante y al concluir deliberaron en sesión privada, acordando aprobar al alumno con una calificación de 10 (diez) y que la tesis tiene un avance del 100 %.

**OBSERVACIONES:**

Ninguna, la alumna ha concluido satisfactoriamente con su proyecto de tesis. Puede continuar con los trámites para su titulación de la maestría.

Dr. José Miguel Cervantes Alfaro  
PRESIDENTE

D. en C. Sergio Gutiérrez Castellanos  
VOCAL 1 (Director de Tesis)

D. en C. Carlos Cortés Penagos  
VOCAL 2

D. en C. Ana Edith Higareda Mendoza  
VOCAL 3

D. en C. Bertha Fenton Navarro  
VOCAL 4

Angélica Georgina Rocha López  
SUSTENTANTE

PARA CONOCIMIENTO Y CERTIFICACIÓN DE FIRMAS

D. en C. Ma. Soledad Vázquez Garduñas  
Coordinadora del Programa de  
Maestría en Ciencias de la Salud



La Maestría en Ciencias de la Salud de la  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo  
pertenece al Padrón de Posgrado de Excelencia  
del CONACyT

La presente investigación se realizó en:

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo  
Faculta de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”  
División de Estudios de Posgrado,

en el Centro de Investigaciones Biomédicas de Michoacán  
Departamento de Investigación Clínica

y en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez”  
Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas.

## Declaración y agradecimientos

Declaro que el presente trabajo representa el esfuerzo multidisciplinario de un gran equipo interinstitucional. Asimismo, declaro que la inmunotinción, la búsqueda de información, redacción de tesis, análisis estadísticos y discusión fueron realizados en el período estipulado para obtener el grado de Maestra en Ciencias de la Salud, lo cual fue posible gracias a las observaciones realizadas por mi comité tutorial.

Agradezco en especial al Dr. Sergio quien, en el transcurso de mi formación académica, ha cultivado mi amor por la investigación clínica y me ha guiado en cada paso de este proyecto. A mis compañeros de laboratorio, que han sido mi aliciente en todo momento, les agradezco infinitamente su amistad y enseñanza.

Agradezco a la Dra. Sara Huerta Yépez por permitirme aprender en el laboratorio de Investigación Oncológica del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, por sus aportaciones y gran motivación a continuar con esta línea de investigación. Asimismo, agradezco a la M. en C. Mayra Montecillo Aguado, quien me llevó de la mano en cada uno de los pasos de la técnica inmunohistoquímica y digitalización de laminillas, y más que nada, me hizo sentir en casa en mi estancia en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez”. Al Biol. Daniel Hernández Cueto, por su intervención en la realización de microarreglos y por el café de todos los días. A la M. en C. Gabriela Antonio Andrés, por su experiencia en el revelado con DAB, sin su buen tino no sería posible este trabajo. Agradezco también a la Dra. Ricarda Cortés Vieyra por ser mi gran ejemplo a seguir de perseverancia, humanidad y dedicación a la investigación.

Dedico el presente trabajo a mis padres y a mi compañero de vida, Carlos, por su inmensa paciencia, amor y apoyo incondicional.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	8
ABSTRACT .....	9
ÍNDICE DE TABLAS.....	10
ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
ABREVIATURAS.....	14
CAPÍTULO 1 .....	15
INTRODUCCIÓN.....	15
1.1. Factores de riesgo .....	16
1.2. Clasificación del cáncer de mama .....	17
1.3. Proteína transductora de la señal y activadora de la transcripción 3 .....	20
1.4. El papel pronóstico de los residuos Tyr <sup>705</sup> y Ser <sup>727</sup> de STAT3 en cáncer .....	27
JUSTIFICACIÓN.....	34
HIPÓTESIS.....	36
OBJETIVOS.....	36
CAPÍTULO 2 .....	37
MATERIALES Y MÉTODOS .....	37
2.1. Diseño del estudio .....	37
2.2. Selección de la población de estudio .....	38
2.3. Descripción de las variables de estudio .....	40
2.4. Construcción de microarreglos de tejido (TMA) .....	45
2.5. Técnica de Inmunohistoquímica (IHQ).....	47
2.6. Análisis estadístico .....	55
2.7. Consideraciones éticas .....	55
CAPÍTULO 3 .....	57
RESULTADOS.....	57
3.1. Características clínico-patológicas de la población de estudio .....	57
3.2. Evaluación de la tinción nuclear de pSer <sup>727</sup> en tejido tumoral de mama.....	69
3.3. Análisis de supervivencia global.....	89
CAPÍTULO 4 .....	102
DISCUSIÓN.....	102
4.1. Conclusiones .....	108
4.2. Recomendaciones .....	109
REFERENCIAS.....	110

## RESUMEN

**Antecedentes.** El estudio de nuevos biomarcadores ha permitido una mejor comprensión sobre la biología del cáncer, esencial para abordajes oncológicos individualizados. La activación del Transductor de Señal y Activador de la Transcripción 3 (STAT3), en su residuo de Serina 727 (pSer<sup>727</sup>), puede explicar parte del comportamiento del tumor a través de asociaciones clínico-patológicas y supervivencia global (SG).

**Métodos.** En este estudio de cohortes retrospectivo evaluamos el riesgo individual y probabilidad de SG de 292 pacientes con seguimiento a 5 años mediante análisis de expresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3 por inmunohistoquímica y patología digital.

**Resultados.** pSer<sup>727</sup>-STAT3 se sobreexpresó en 55.4% de casos, asociándose positivamente con factores de mal pronóstico como obesidad II ( $p=0.0201$ ), tumores de mayor tamaño con afectación tisular (pT3-pT4) ( $p=0.0301$ ), receptores hormonales negativos ( $p=0.04$ ), HER+ ( $p=0.0404$ ). Asimismo, el patrón pSer<sup>727+</sup>/pTyr<sup>705+</sup> se asoció a >41 años ( $p=0.0435$ ) y, en ausencia de pTyr<sup>705</sup>, se asoció a estadios avanzados (IIIB) ( $p=0.0082$ ). Por otro lado, se asoció a factores de buen pronóstico como índices estrogénicos bajos ( $p=0.0395$ ) y ausencia de nódulos (pN0) ( $p=0.033$ ). A pesar de no ser un factor independiente de SG, nuestros resultados mostraron que pSer<sup>727</sup>-STAT3 fue coadyuvante en SG empeorada en pacientes con características pronósticas adversas.

**Conclusiones.** pSer<sup>727</sup>-STAT3 se asoció a factores de mal pronóstico determinantes de una sobrevida menor, demostrando que su expresión aunada a factores de riesgo contribuye al mal pronóstico general de las pacientes.

**Impacto.** Nuestro estudio es el primer estudio poblacional mexicano de patología digital aplicada a CM que combina evaluación inmunohistoquímica y variables clínico-patológicas.

**Palabras clave:** cáncer de mama, STAT3, pronóstico, predicción de riesgo, supervivencia.

## ABSTRACT

**Background.** The study of novel biomarkers has allowed a better understanding of the biology of cancer, essential for individualized oncological approaches. The activation of Signal Transducer and Transcription Activator 3 (STAT3), at its residue of Serine 727 (pSer<sup>727</sup>), may explain part of the behavior of the tumor through clinical and pathological associations and overall survival (OS).

**Methods.** In this retrospective cohort study, we evaluated individual risk and probability of OS of 292 patients with 5-year median follow-up through nuclear expression analysis of pSer<sup>727</sup>-STAT3 by immunohistochemistry and digital pathology.

**Results.** pSer<sup>727</sup>-STAT3 was overexpressed in 55.4% of cases, positively associated with poor prognostic factors such as obesity II ( $p=0.0201$ ), larger tumors with tissue involvement (pT3-pT4) ( $p=0.0301$ ), negative hormone receptors ( $p=0.04$ ), HER + ( $p=0.0404$ ). Likewise, pSer<sup>727</sup>+ / pTyr<sup>705</sup>+ was also associated with groups >41 years ( $p= 0.0435$ ) and, in the absence of pTyr<sup>705</sup>, pSer<sup>727</sup> was associated with advanced stages (IIIB) ( $p= 0.0082$ ). On the other hand, it was associated with good prognostic factors such as low estrogenic index ( $p= 0.0395$ ) and absence of nodules (pN0) ( $p= 0.033$ ). Despite not being an independent factor of OS, our results showed that pSer<sup>727</sup>-STAT3 was an adjuvant factor in worsened OS in patients with adverse prognostic characteristics.

**Conclusions.** pSer<sup>727</sup>-STAT3 was associated with poor prognostic factors determining a lower survival, demonstrating that its expression, along with risk factors, contributes to the poor overall prognosis of the patients.

**Impact.** Our study is the first Mexican population study of digital pathology applied to CM that combines immunohistochemical evaluation and clinical-pathological variables.

**Keywords:** Breast cancer, STAT3, prognosis, risk prediction, survival.

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1. Factores de riesgo modificables y no modificables para el cáncer de mama..	17
Tabla 1-2. Subtipos moleculares de cáncer de mama y su aproximación por IHQ.....	19
Tabla 1-3. El papel pronóstico del residuo pTyr <sup>705</sup> por IHQ en cáncer.....	29
Tabla 1-4. El papel pronóstico del residuo pSer <sup>727</sup> por IHQ en cáncer.....	30
Tabla 1-5. Evaluación de la tinción IHQ de pTyr <sup>705</sup> -STAT3 en estudios previos.....	31
Tabla 1-6. Evaluación de la tinción IHQ de pSer <sup>727</sup> -STAT3 en estudios previos.....	33
Tabla 2-1. Descripción de variables clínicas en el estudio.....	40
Tabla 2-2. Descripción de variables patológicas en el estudio.....	42
Tabla 2-3. Descripción de variables moleculares en el estudio.....	44
Tabla 2-4. Parámetros utilizados en algoritmo <i>Nuclear v9</i> de Aperio para la captación de imagen.....	52
Tabla 2-5. Parámetros utilizados en algoritmo <i>Positive Pixel Count v9</i> de Aperio para la captación de imagen.....	54
Tabla 3-1. Características clínicas de las cohortes.....	57
Tabla 3-2. Edad de diagnóstico de las cohortes.....	58
Tabla 3-3. IMC, peso y talla de las cohortes.....	60
Tabla 3-4. Características patológicas de las cohortes.....	63
Tabla 3-5. Características moleculares del tumor en las cohortes.....	67
Tabla 3-6. Características generales de tratamiento en las cohortes.....	68
Tabla 3-7. Distribución de la expresión nuclear de ambos residuos de STAT3.....	70
Tabla 3-8. Distribución de casos de acuerdo con la coexpresión nuclear de ambos residuos de STAT3.....	71
Tabla 3-9. Riesgo de sobreexpresar pSer <sup>727</sup> -STAT3 en los grupos de edad.....	72
Tabla 3-10. Patrones de coexpresión de residuos de STAT3 en los grupos de edad.....	73
Tabla 3-11. Riesgo de sobreexpresar pSer <sup>727</sup> -STAT3 por categoría de IMC.....	75
Tabla 3-12. Riesgo de sobreexpresar pSer <sup>727</sup> -STAT3 por clasificación histológica .....	77
Tabla 3-13. Riesgo de sobreexpresar pSer <sup>727</sup> -STAT3 según el tamaño del tumor (cm) y pT del TNM.....	78
Tabla 3-14. Patrones de coexpresión de residuos de STAT3 por categoría de nódulos de TNM.....	79
Tabla 3-15. Patrones de expresión de pSer <sup>727</sup> -STAT3 y estadios TNM.....	82

Tabla 3-16. Riesgo de sobreexpresar pSer <sup>727</sup> -STAT3 de acuerdo con receptores hormonales.....	82
Tabla 3-17. Comparación entre la expresión nuclear de pSer <sup>727</sup> y pTyr <sup>705</sup> de STAT3 según el patrón de RH.....	84
Tabla 3-18. Comparación entre la expresión nuclear de pSer <sup>727</sup> y pTyr <sup>705</sup> de STAT3 según el patrón de HER2 y Ki-67.....	86
Tabla 3-19. Riesgo de sobreexpresar pSer <sup>727</sup> -STAT3 en los subtipos moleculares.....	87
Tabla 3-20. Supervivencia global y seguimiento clínico.....	90
Tabla 3-21. Supervivencia global y patrones de expresión nuclear.....	90
Tabla 3-22. Patrones de expresión nuclear y supervivencia global (seguimiento y recidiva).....	92
Tabla 3-23. Supervivencia global y antecedentes gineco-obstétricos.....	95
Tabla 3-24. Supervivencia global y tamaño tumoral.....	96

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. Glándula mamaria humana.....	16
Figura 1-2. Clasificación histológica del cáncer de mama.....	18
Figura 1-3. Isoformas de STAT3.....	21
Figura 1-4. Principales vías implicadas en la activación canónica de la señalización de JAK/STAT3 y su papel en cáncer.....	23
Figura 2-1. Diagrama de flujo del diseño experimental.....	37
Figura 2-2. Diagrama de flujo de la población de estudio.....	39
Figura 2-3. Microarreglos de tejido embebidos en parafina.....	45
Figura 2-4. Maqueta representativa de los microarreglos de tejido.....	46
Figura 2-5. Estandarización de la técnica con controles positivos para la tinción.....	50
Figura 2-6. Secuenciación de la evaluación IHQ por patología digital.....	50
Figura 2-7. Estandarización de algoritmo Macro 3 Nuevo para el análisis de la tinción nuclear de pSer <sup>727</sup> -STAT3.....	51
Figura 2-8. Ejemplo de la visualización de campo de la positividad de la expresión total para pTyr <sup>705</sup> -STAT3 en tejido de cáncer de mama.....	53

Figura 2-9. Estandarización de algoritmo Macro 2 Bajo para el análisis de la tinción total de pSer <sup>727</sup> -STAT3.....	54
Figura 3-1. Distribución por grupos de edad.....	59
Figura 3-2. Distribución de acuerdo con el IMC.....	60
Figura 3-3. Edad de presentación de menarca y menopausia.....	61
Figura 3-4. Gestaciones de término.....	62
Figura 3-5. Características del tumor.....	64
Figura 3-6. Grado histológico.....	65
Figura 3-7. Ganglios con metástasis.....	66
Figura 3-8. Estadio TNM anatómico.....	66
Figura 3-9. Ejemplos de tinción pSTAT3 (Ser <sup>727</sup> ) en tejido de cáncer de mama de la cohorte de estudio.....	69
Figura 3-10. Distribución de casos según expresión nuclear de pSer <sup>727</sup> -STAT3.....	70
Figura 3-11. Porcentaje de células con expresión pSer <sup>727</sup> -STAT3 por grupos de edad..	72
Figura 3-12. Diagrama BoxPlot de Tukey de la expresión nuclear de pSer <sup>727</sup> -STAT3 en tejidos con cáncer de mama.....	73
Figura 3-13. Diagrama BoxPlot de Tukey de la expresión nuclear de pTyr <sup>705</sup> -STAT3 en tejidos con cáncer de mama.....	74
Figura 3-14. Comparación entre la expresión nuclear de pSer <sup>727</sup> -STAT3 entre categorías de obesidad.....	74
Figura 3-15. Diagrama BoxPlot de Tukey de la expresión nuclear de pSer <sup>727</sup> -STAT3 por categorías de IMC en tejidos con cáncer de mama.....	75
Figura 3-16. ForrestPlots de la expresión de pSer <sup>727</sup> y pTyr <sup>705</sup> de STAT3 de acuerdo a pT del TNM.....	77
Figura 3-17. Diagrama BoxPlot de Tukey de la expresión nuclear de pSer <sup>727</sup> -STAT3 según el tamaño del tumor y pT del TNM.....	78
Figura 3-18. Diagrama que ilustra las diferencias en los patrones de expresión en relación con la cantidad de nódulos afectados (pN).....	80
Figura 3-19. Diagrama BoxPlot de Tukey de la expresión nuclear de pSer <sup>727</sup> -STAT3 y estatus de metástasis y nódulos en tejidos con cáncer de mama.....	80
Figura 3-20. Frecuencia en la expresión nuclear de los residuos de STAT3 según grado histológico.....	81

Figura 3-21. Diagrama que ilustra el riesgo de coexpresión de residuos STAT3 en relación con RE y RP.....	84
Figura 3-22. Frecuencia en la expresión nuclear de los residuos de STAT3 de acuerdo con subtipos moleculares.....	87
Figura 3-23. Diagrama BoxPlot de Tukey de la expresión nuclear de pSer <sup>727</sup> -STAT3 y clasificación molecular.....	88
Figura 3-24. Diagrama BoxPlot de Tukey de la expresión total de pSer <sup>727</sup> -STAT3 y clasificación molecular.....	88
Figura 3-25. Curva Kaplan-Meier de las pacientes en estudio.....	89
Figura 3-26. Curvas Kaplan-Meier en relación con los patrones de expresión de residuos STAT3.....	91
Figura 3-27. Curvas Kaplan-Meier y los grupos de edad en relación con la sobreexpresión nuclear de pSer <sup>727</sup> -STAT3.....	93
Figura 3-28. Curvas Kaplan-Meier y categorías IMC en relación con la sobreexpresión nuclear de pSer <sup>727</sup> -STAT3.....	94
Figura 3-29. Curvas Kaplan-Meier y tamaño tumoral en relación con la sobreexpresión nuclear de pSer <sup>727</sup> -STAT3.....	96
Figura 3-30. Curvas Kaplan-Meier y afectación de nódulos en relación con la sobreexpresión nuclear de pSer <sup>727</sup> -STAT3.....	97
Figura 3-31. Curvas Kaplan-Meier y categorías TNM en relación con la sobreexpresión nuclear de pSer <sup>727</sup> -STAT3.....	98
Figura 3-32. Curvas Kaplan-Meier y RH en relación con la sobreexpresión nuclear de pSer <sup>727</sup> -STAT3.....	99
Figura 3-33. Curvas Kaplan-Meier en relación con HER2, Ki-67 y la sobreexpresión nuclear de pSer <sup>727</sup> -STAT3.....	100
Figura 3-34. Curvas Kaplan-Meier y subtipo molecular en relación con la sobreexpresión nuclear de pSer <sup>727</sup> -STAT3.....	101

## ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASCO/CAP	Sociedad Americana de Oncología Clínica / Colegio de Patólogos Americanos
BMX	Tirosina cinasa no receptora ligada al cromosoma X de la médula ósea
CDI-SPE	Carcinoma ductal infiltrante sin patrón específico
CLI	Carcinoma lobulillar infiltrante
CNTF	Factor neutrófico ciliar
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ERK	Cinasas reguladas por señales extracelulares
GAS	Sitio de activación del interferón gama
GH	Grado histológico
HER2	Receptor epidérmico humano 2
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
IGFR	Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleucina
IMC	Índice de masa corporal
JAK	Janus cinasa
Ki-67	Marcador de proliferación celular
LIF	Factor inhibidor de la leucemia
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
miRNA	Ácido ribonucleico de 22 nucleótidos que regula la expresión de genes
OSM	Oncostatina M
p53	Gen supresor de tumores de 53 kD
PDGFR	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
PI3	Fosfatidilinositol 3 cinasa
PIAS	Proteína inhibidora de STAT activada
RE	Receptor estrogénico
RH	Receptores hormonales
RP	Receptor de progesterona
Ser	Serina
S1PR1	Receptor 1 de esfingosina-1-fosfato
SH2	Dominio 2 de homología Src de STAT
SOCS	Supresor de señalización estimulada por citocinas
STAT	Proteína transductora de señal y activadora de la transcripción
TAD	Dominio de activación transcripcional
TMA	<i>Tissue MicroArray</i> – microarreglo de tejidos – arreglo ordenado de muestras inmovilizadas dentro de una matriz de parafina, creado a partir de la extracción de cilindros de tejido representativos de las muestras de los casos de interés.
Tyr	Tirosina
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

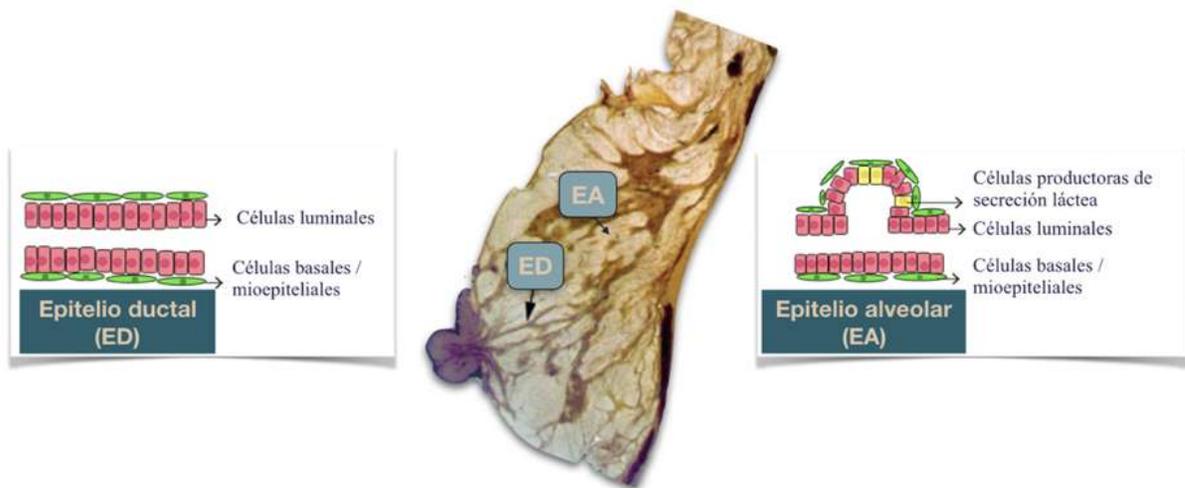
El cáncer de mama es la neoplasia más prevalente en el género femenino, con una incidencia global estimada en 2020 de 2.261.419 casos [1], siendo también la principal causa de mortalidad en mujeres en todo el mundo. Entre los factores de riesgo asociados, los bien establecidos son aquellos dentro del contexto clínico de la paciente, así como las características propias del tumor, resultando así en la adición de múltiples elementos para la evaluación del cáncer de mama a propósito de definir pronóstico, valor predictivo ante tratamientos y estimación de supervivencia. Los factores pronósticos clásicos, como el tamaño del tumor, nódulos y metástasis, se han integrando en sistemas para la clasificación de los pacientes, tales como el sistema de estadios TNM clásico o la clasificación histológica del tumor, dando enfoques más certeros para el tratamiento de los pacientes; sin embargo, el diagnóstico y tratamiento continúan siendo un gran reto traducido en índices de supervivencia reducidos en países de Latinoamérica como México, donde la mayor parte de los casos se encuentran en etapas localmente avanzadas y metastásicas al momento de diagnóstico [2,3].

No obstante, la identificación de nuevos marcadores ha permitido conocer mejor la biología del tumor, establecer diagnósticos moleculares, pronóstico y predicción, posicionándose también como elementos indispensables para el enfoque de tratamientos individualizados; entre ellos se distinguen los receptores de estrógeno (RE) y progesterona (RP) y receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) [4,5]. Bajo este contexto, el estudio de nuevos biomarcadores para cáncer de mama, tales como la proteína transductora de señal y activadora de la transcripción 3 (STAT3), podrán explicar parte del comportamiento del tumor mediante su asociación con variables pronósticas. Este estudio buscó (i) caracterizar y describir los factores de riesgo clínico-patológicos individuales entre las mujeres con cáncer de mama primario,

(ii) asociar la expresión del residuo serina 727 (pSer<sup>727</sup>) de STAT3 con las características clínico-patológicas; y (iii) estimar el pronóstico en pacientes con cáncer de mama y expresión de pSer<sup>727</sup>-STAT3 con una media de seguimiento clínico de 5 años, haciendo énfasis en supervivencia global.

### 1.1. Factores de riesgo

El cáncer de mama comprende un grupo heterogéneo de neoplasias que se originan en el tejido mamario a partir de alteraciones funcionales y morfológicas en las células que le permiten escapar de los mecanismos normales de control biológico; dicha heterogeneidad parte del carácter dinámico entre las células que conforman a la glándula mamaria (**Figura 1-1**), y comprende eventos biológicos alterados tales como la proliferación descontrolada, sin relación con las demandas fisiológicas, capacidad invasiva en tejidos adyacentes y potencial para diseminarse a distancia.



**Figura 1-1. Glándula mamaria humana.** Se muestra el sistema ductal ramificado con capa basal externa formada por células mioepiteliales, la capa luminal interna contiene células con capacidad de producir secreción láctea durante la lactancia. *Abreviaturas: ED: Epitelio ductal; EA: epitelio alveolar.*

A pesar de la heterogeneidad característica, ciertos rasgos son parcialmente compartidos entre tumores como son el potencial angiogénico, invasivo y metastásico, en donde algunos de estos se deben a la diversidad clonal y celular derivadas de alteraciones genéticas y epigenéticas, mientras que otros pueden reflejar mecanismos no hereditarios como respuestas adaptativas o fluctuación en la función de proteínas

reguladoras y su actividad en las vías de señalización, que culminan en cambios morfológicos.

Los factores implicados en la génesis y progresión del cáncer de mama son elementos altamente interdependientes; entre los factores de riesgo no modificables se consideran aquellos relacionados con variables biológicas como la genética y epigenética (explicadas por una susceptibilidad genética y/o por alteraciones genéticas y epigenéticas adquiridas), el ambiente endócrino, el género, la edad, raza y etnia. Dentro de los factores modificables o parcialmente modificables se encuentran aquellos inherentes al individuo (estilo de vida, factores reproductivos, factores iatrogénicos, dieta, actividad física), los dependientes del tumor y los dependientes del ambiente [6], resumidos en la **Tabla 1-1**.

**Tabla 1-1. Factores de riesgo modificables y no modificables para el cáncer de mama.**

<b>Factores modificables</b>	<b>Factores no modificables</b>
Sobrepeso/obesidad	Sexo femenino
Consumo de alcohol	Mayor edad
Tabaquismo	Antecedentes familiares
Terapia de reemplazo hormonal	Mutaciones genéticas
Dietilestibestrol	Raza/etnia
Suplementación vitamínica insuficiente	Embarazo y lactancia
Exposición excesiva a luz artificial	Inicio de menstruación y menopausia
Ingesta de alimentos procesados	Densidad del tejido mamario
Exposición a productos químicos	Antecedentes personales de cáncer de mama
Otras drogas	Enfermedades mamarias no cancerosas
	Radioterapia previa

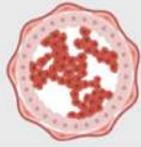
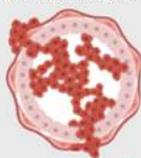
*Tabla adaptada de [6].*

## 1.2. Clasificación del cáncer de mama

### 1.2.1. Clasificación histológica

La evaluación histológica constituye el estándar de oro para el diagnóstico de cáncer de mama; de acuerdo con el patrón morfológico, más del 95% son carcinomas que, a su vez, se diferencia según el origen histológico ductal o lobulillar, y la presencia

o no de infiltración de la membrana basal, infiltrantes o *in situ* respectivamente (**Figura 1-2**).

Subtipos histológicos	Ductal	Lobulillar
<b>Cáncer preinvasivo</b> 25% <i>Células limitadas a la membrana basal</i> 	<b>Carcinoma ductal <i>in situ</i> (CDIS)</b> 80%* Puede diseminarse a ductos, distorsiona arquitectura. Puede progresar a cáncer infiltrante 1%. Usualmente unilateral. <small>*6.8% en México</small>	<b>Carcinoma lobulillar <i>in situ</i> (CLIS)</b> 20% No distorsiona arquitectura; puede ser bilateral. Como factor de riesgo más que precursor.
<b>Cáncer invasivo</b> 75% <i>Extensión a través de membrana basal</i> 	<b>Carcinoma ductal infiltrante (CDI)</b> 79% Deriva de CDIS; respuesta fibrosa puede producir masa palpable. Metástasis por vía linfática y sanguínea.	<b>Carcinoma lobulillar infiltrante (CLI)</b> 10% Deriva de CLIS; con respuesta fibrosa mínima. Metástasis vía visceral (GI, ovarios, útero).

**Figura 1-2. Clasificación histológica del cáncer de mama.** Subtipos histológicos más frecuentes y características principales. *Modificado de [7].*

Dentro de los subtipos infiltrantes se encuentran más de 20 subtipos, el más frecuente de ellos es el carcinoma ductal infiltrante sin patrón específico (CDI-SPE) que representa el 70-80% de casos, seguido de los carcinomas lobulillares infiltrantes (CLI) con el 10%.

### 1.2.2. Grado histológico

Esta clasificación evalúa parámetros morfológicos de acuerdo con el sistema de gradación de *Scarff-Bloom-Richardson* [8], modificado por Elston-Ellis [9], conocido también como sistema de gradación de Nottingham. Las variables en consideración son: (i) la formación de túbulos, (ii) el pleomorfismo nuclear según el tamaño nuclear, características de la cromatina y nucléolo, y (iii) la cantidad de mitosis que refleja el índice proliferativo tumoral. Posteriormente se asigna una puntuación de 1 (más favorable) a 3 (menos favorable) en cada variable, donde la suma de los tres parámetros resultará en puntuaciones de 3 a 5 (grado 1, bien diferenciado), 6 a 7 (grado 2, moderadamente diferenciado), y 8 a 9 (grado 3, indiferenciado).

### 1.2.3. Subtipos moleculares

Esta clasificación valora el estado de los RE y RP, amplificación o sobreexpresión de HER2 y el marcador de proliferación celular Ki-67. De acuerdo a la expresión inmunohistoquímica (IHQ) y siguiendo la Actualización de la Guía de la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) / Colegio de Patólogos Americanos (CAP) en 2020 [10], los RE y RP son considerados como positivos al teñirse >1% de las células tumorales; para HER2 se considera el sistema de clasificación DAKO tomando puntuaciones de 0 a 1+ como negativas, 2+ como débilmente positivas y 3+ fuertemente positivas; finalmente, Ki-67 utilizando un punto de corte del 20% para designar positividad [2,11], como se observa en la **Tabla 1-2**.

**Tabla 1-2. Subtipos moleculares de cáncer de mama y su aproximación por IHQ, según el Consenso de Colima 2021 [2].**

Subtipo molecular	Aproximación por inmunohistoquímica
<b>Luminal A</b>	RE +, RP >20%, Ki-67 <20% y HER2 -
<b>Luminal B</b>	(HER2 negativo) RE +, RP <20% o Ki-67 >20%, HER2 - (HER2 positivo) RE +, RP y Ki-67 cualquier valor, HER2 +
<b>HER2</b>	RE -, RP - y HER2 +
<b>Triple Negativo</b>	RE -, RP - y HER2 -

RE: receptores de estrógeno; RP: receptores de progesterona; Ki-67: Marcador de proliferación celular; HER2: Receptor epidérmico humano 2.

Cabe destacar que en Norteamérica, Australia y Europa los subtipos luminales son los más frecuentes (72.7-73.0%), seguidos por los Triple Negativos (TN) (12.2-16.0%) y HER2 positivos (4.6-6%), siendo éstos dos últimos los que menor índice de supervivencia presentan a nivel mundial y, debido a limitaciones en la información disponible para países de Latino América, incluyendo México, se sugiere un patrón similar de frecuencias en dichos subtipos [12].

### 1.2.4. Estadio anatómico TNM. Clasificación de la American Joint Committee on Cancer, 8ª ed.

La clasificación TNM propuesta por la AJCC en su 8ª edición [13] representa una herramienta imprescindible en la valoración integral del paciente, clásicamente valorando:

- Tamaño tumoral (T). Valorado con base en hallazgos patológicos del tumor primario, medido en centímetros (diámetros tumorales máximos).

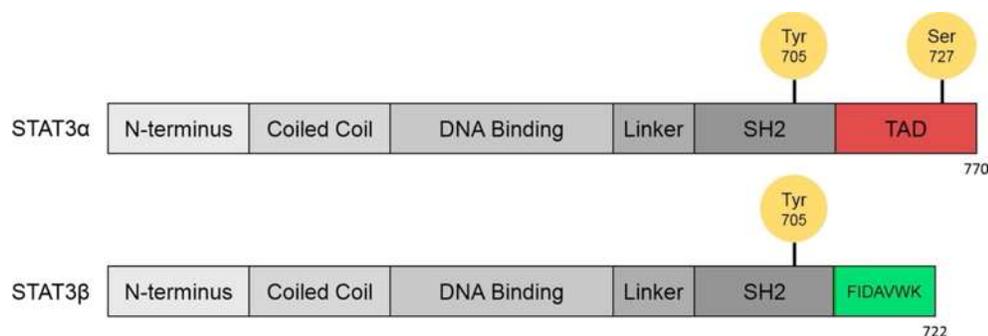
- Afectación ganglionar (N). Evalúa la presencia de infiltración neoplásica a ganglios linfáticos.
- Metástasis (M): Evalúa la presencia clínica o radiológica de metástasis a distancia.

Recientemente, se ha ampliado esta clasificación incluyendo ahora estadios pronósticos tras incorporar marcadores IHQ de RE, RP, HER2 y Ki-67, permitiendo así definir con mayor precisión los diferentes subtipos que componen al cáncer de mama y su pronóstico [13]. En México, más de 65% de los diagnósticos de cáncer de mama se realiza en mujeres en estadios localmente avanzados (IIb-III) con 55.9% de casos, y 10.5% en estadios metastásicos (IV) [2].

### 1.3. Proteína transductora de la señal y activadora de la transcripción 3

Las proteínas transductoras de la señal y activadoras de la transcripción (STAT, del inglés *signal transducer and activators of transcription*) pertenecen a una familia que participa en la transducción de señales provenientes del medio extracelular para desempeñar funciones como moléculas de señalización a nivel citoplasmático y como factores de transcripción a nivel del núcleo [14]. Esta familia está compuesta por siete miembros en mamíferos, relacionados estructural y funcionalmente: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b y STAT6, los cuales presentan dominios altamente conservados comprendiendo al dominio N-terminal, dominio súper enrollado, un dominio de unión al ADN, dominio de enlace, dominio de homología 2 de SRC (SH2, del inglés *Src homology domain 2*), y un dominio de activación transcripcional en el extremo carboxilo-terminal [15], este último siendo el más variable entre los miembros de la familia STAT y el que contribuye a su especificidad.

El gen *Stat3* da lugar a la isoforma STAT3 $\alpha$  de 770 aminoácidos la cual preserva el dominio TAD, sin embargo, puede experimentar corte y empalme alternativo del ARNm en el exón 23, cambiando así el marco de lectura y reemplazando los últimos 55 aminoácidos por siete residuos distintos (FIDAVWK / Phe-Ile-Asp-Ala-Val-Trp-Lys) y un codón de parada, dando lugar a la isoforma STAT3 $\beta$  [16], carente del dominio TAD de STAT3 y, por lo tanto, del residuo Ser<sup>727</sup> (**Figura 1-3**).



**Figura 1-3. Isoformas de STAT3.** Los dominios SH2 en STAT3 contienen residuos Tirosina 705 (Tyr<sup>705</sup>), clave para activar STAT3 tras su fosforilación. Sin embargo, la isoforma STAT3 $\alpha$  (arriba) posee el residuo Serina 727 (Ser<sup>727</sup>) en el dominio de transactivación, a diferencia de STAT3 $\beta$  (abajo). Abreviaturas: STAT3: Proteína transductora de señal y activadora de la transcripción 3; TAD: Dominio de transactivación; SH2: Dominio 2 de homología Src de STAT. Tomado de [16].

Recientemente se ha demostrado que la isoforma STAT3 $\beta$ , carente del residuo Ser<sup>727</sup>, tiene funciones reguladoras y transcripcionales distintas a las observadas en STAT3 $\alpha$ , pudiendo así tener un efecto supresor sobre STAT3 [17-19].

### 1.3.1. Vías de activación de STAT3 y su función en el cáncer

La vía de activación de STAT3 clásicamente descrita comprende la fosforilación de su residuo de Tyr<sup>705</sup> mediada por las tirosinas cinasas de la familia *Janus cinasas* (JAK) asociadas a receptores a nivel de membrana que comparten a la glicoproteína 130 (gp130) como subunidad cooperadora.

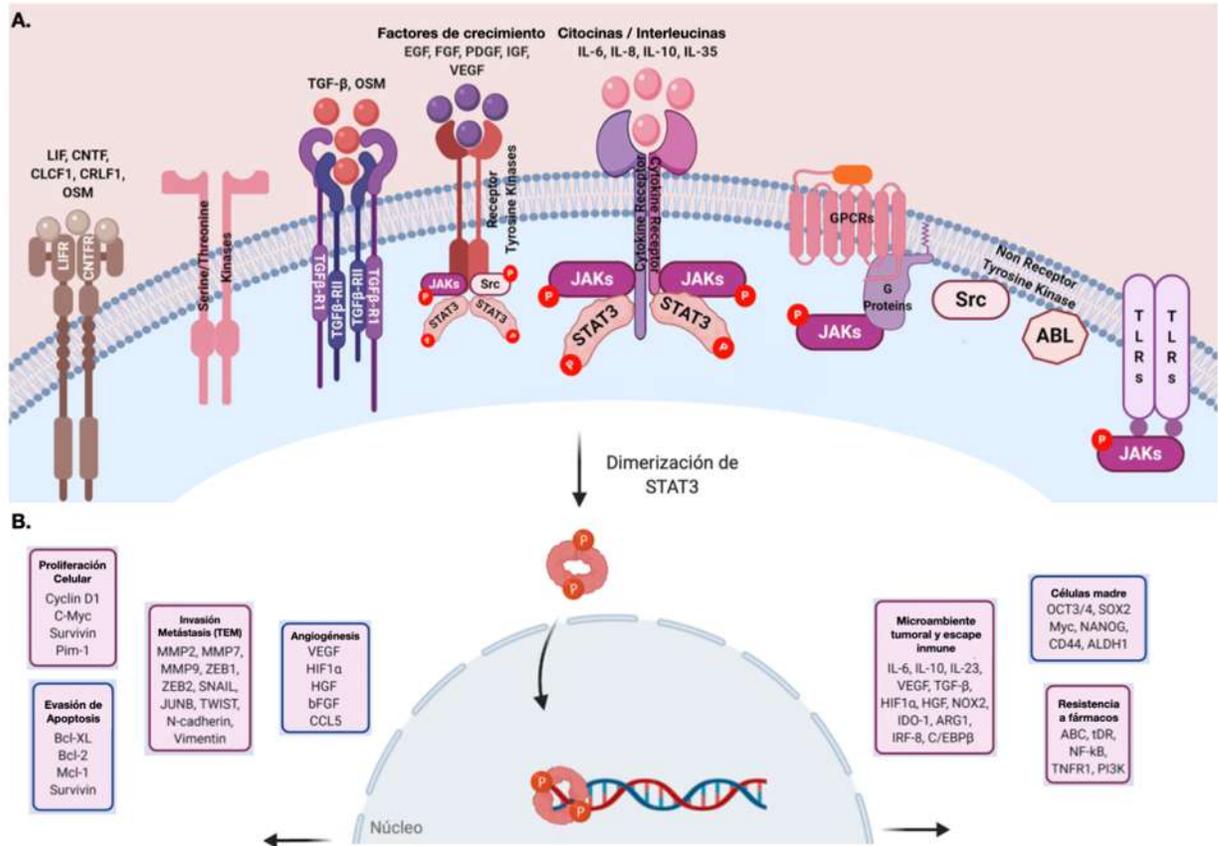
Los receptores asociados a gp130 pueden ser aquellos asociados a interleucina (IL) 6, IL-10, IL-11, OSM (oncostatina M), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor inhibidor de la leucemia (LIF), cardiotrofina-1 y citocinas similares a las cardiotrofinas. Sin embargo, puede haber estímulos independientes de gp130 donde actúan receptores tirosina cinasa, tales como aquellos que involucran al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), al receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), al receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), al receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGFR), al factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), y leptina (OBR) [20].

Otros elementos igualmente asociados son los de tirosinas cinasas no receptoras como las cinasas de la familia Scr (Scr, Hck, Lyn, Fyn, Fgr), BCR-ABL y la tirosina cinasa no receptora ligada al cromosoma X de la médula ósea (BMX); y receptores tipo Toll. Además, Tyr<sup>705</sup> puede ser activado indirectamente por receptores acoplados a

proteína G como el receptor 1 de esfingosina-1-fosfato (S1PR1), BV8 o Angiotensina II [21].

En la vía clásica de activación de STAT3, la unión del ligando extracelular a su receptor afín conduce a la oligomerización del receptor y la activación de las JAK, que luego reclutan y fosforilan a STAT3 en su residuo Tyr<sup>705</sup>, formando así dímeros (homo o heterodímeros) a través del dominio SH2 para después translocarse al núcleo. En cooperación con los cofactores nucleares, el STAT3 ya fosforilado (pSTAT3) se une directamente a elementos del sitio de activación del interferón gamma (GAS, del inglés *Interferon-γ Activated Sequence*) en secuencias consenso palindrómicas del ADN (TTCN<sub>2-4</sub>GAA) y activa la expresión génica [16].

La proteína STAT3 constitutivamente activada y sus vías de señalización pueden explicar la mayoría de las características distintivas conocidas del cáncer descritas por Hanahan & Weinberg [22], donde estudios han sustentado su capacidad para desregular la expresión de genes que controlan la proliferación, angiogénesis y transición epitelial-mesenquimatoso (TME) [23]; resistencia a la quimioterapia y antiapoptosis [24]; angiogénesis [25]; invasión y metástasis [26], y el mantenimiento de células madre cancerosas [27], permitiendo así la progresión maligna (**Figura 1-4**).



**Figura 1-4. Principales vías implicadas en la activación canónica de la señalización de JAK/STAT3 y su papel en cáncer.** La señalización JAK/STAT3 se activa a través de varios receptores que incluyen receptores de citocinas, receptores tirosina cinasas, cinasas serina/ treonina, tirosina quinazas no receptoras, receptores acoplados a proteínas G y receptores tipo toll. **A.** La unión del ligando a receptores conduce a cambios conformacionales que proporcionan señales para que las JAK y las proteínas adaptadoras activen la señalización STAT3. **B.** La fosforilación de STAT3 en el residuo de tirosina 705 resulta en la dimerización de STAT3 y su posterior translocación dentro del núcleo. STAT3 se une directamente en la región promotora de varios genes y altera sus patrones de expresión para promover procesos celulares clave. *Abreviaturas en texto. Imagen modificada de [28] en Biorender.com.*

Entre las asociaciones de STAT3 constitutivamente activada con las características distintivas conocidas del cáncer encontramos las siguientes:

*STAT3 y el mantenimiento de la señalización proliferativa.* Uno de los objetivos genéticos de STAT3 estudiados en tejido neoplásico y líneas celulares mamarias lo constituyen genes que participan en el ciclo celular, proliferación y supervivencia celular como survivina, ciclina D1, Bcl-2, Bcl-xL, c-Myc y Mcl-1, donde se ha documentado una correlación positiva con la expresión de STAT3 [23,24,29].

*STAT3 y la evasión de la destrucción inmune.* La actividad constitutiva de STAT3 influye a la cascada de complemento en las fases iniciales del daño, así como a las actividades protumorales del complemento 3a (C3a) y C5a, confiriendo protección ante

la citotoxicidad en células neoplásicas [30]. Sin embargo, esa cualidad de poder ser constitutivamente activada es un atributo particular en muchos cánceres, estudios ha identificado a STAT3 como una molécula oncogénica capaz de potenciar la transformación celular y bloquear la apoptosis [31].

*STAT3 y la inflamación promotora de tumores.* Además, STAT3 juega un papel importante en el microambiente tumoral, tanto de manera intrínseca a las células tumorales como a través de su capacidad para modular la actividad del medio celular circundante al modular la respuesta inmune antitumoral, donde desempeña funciones duales y complementarias como un regulador positivo de los inhibidores inmunitarios tumorales y un supresor de los activadores inmunitarios tumorales [32]. Por ejemplo, la actividad de STAT3 en las células cancerosas estimula la producción de citocinas proinflamatorias, suprime la secreción de IFN tipo I y genes asociados de respuesta al IFN y apoya la inmunosupresión [33]. Estas vías de retroalimentación dependientes de STAT3 permiten que aumente aún más la progresión del tumor al antagonizar el reclutamiento de efectores inmunes en el lecho tumoral al deteriorar la inmunovigilancia y las respuestas inmunitarias anticancerígenas.

*STAT3 y la activación de la invasión y metástasis.* Una de las funciones más prominentes de STAT3 en el pronóstico de cánceres humanos consiste en la regulación al alza de metaloproteinasas de la matriz celular (MMP), involucradas íntimamente en la invasión a tejidos adyacentes y distantes en casos de metástasis [34]. STAT3 regula entonces, a MMP2, MMP7, MMP9, Twist [35], Snail, Slug y vimentina [36]. Recientemente se ha informado sobre la importancia de la vía IL-22/JAK/STAT3/MAPKs/AKT en la metástasis y quimio resistencia en cáncer de mama triple negativo [37]. Entre los reguladores río-arriba de la señalización STAT3 involucrados en la metástasis del cáncer de mama Triple Negativo (TNBC, del inglés *Triple Negative Breast Cancer*) se encuentran los Wwox, una oxidoreductasa que contiene el dominio WW, en la vía IL-6/JAK2 inhibe la fosforilación de JAK2 y bloquea la unión JAK2-STAT3, por lo que reprime la metástasis y proliferación celular en neoplasias mamarias [38]. Además, esta misma vía IL-6/JAK2 puede inhibir igualmente la apoptosis dependiente de la caspasa relacionada con Bax/Bcl-2 e inhibir la migración e invasión a través de MMP2/MMP9/vimentina/fascina en cáncer de mama triple negativo mediante la supresión de la fosforilación de STAT3 inducida por IL-6 [39].

*STAT3 y la inmortalidad replicativa.* La señalización aberrante de STAT3 promueve la progresión del tumor de mama a través de la desregulación de la expresión de genes diana río-abajo que controlan la transición epitelio-mesenquimatoso (Vimentina, TWIST, MMP-9 y MMP-7) [23].

*STAT3 y la inducción de la angiogénesis.* La señalización aberrante de STAT3 promueve la progresión del tumor de mama a través de la desregulación de la expresión de genes diana río-abajo que controlan la angiogénesis como HIF1 $\alpha$  [40] y VEGF [23].

*STAT3 y la energética celular desregulada.* Uno de los elementos más importantes en la tumorigénesis consiste en la adaptación metabólica a los nuevos requerimientos por parte del tejido neoplásico a causa de una mayor tasa de proliferación celular, requiriendo así una mayor generación de energía en forma de adenosina 5'-trifosfato (ATP) a través de la fosforilación oxidativa mitocondrial [41].

Las mitocondrias son la mayor maquinaria intracelular tanto para la producción y reducción de las especies reactivas de oxígeno (ERO's). En el cáncer, las ERO's mitocondriales amplifican el fenotipo tumorigénico y aceleran la acumulación de mutaciones adicionales que conducen a un comportamiento metastásico [42]. La fosforilación de los monómeros STAT3 en su residuo Ser<sup>727</sup> permite la translocación de STAT3 a las mitocondrias sin dimerización (mitoSTAT3), donde se asocia con la membrana mitocondrial interna y la matriz mitocondrial, regula la actividad de la cadena de transporte de electrones y la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial [43].

MitoSTAT3, al estar asociado a la membrana interna mitocondrial donde reside el complejo I de la ETC, interacciona con el componente GRIM-19 para su transporte interno asociado al importador Tom20, siendo la proteína 22 de choque térmico (Hsp20) una lanzadera alternativa para mitoSTAT3 [44].

MitoSTAT3 mejora las actividades del complejo I y II de ETC, donde la fosforilación de Ser<sup>727</sup>-STAT3 es fundamental para estas actividades [44]. Esto se ha demostrado en estudios en células en proceso de transformación oncogénica mediada por Ras donde, a falta de mitoSTAT3, los niveles de ATP disminuyen [45]. Así también, STAT3 mejora la glicólisis aerobia y la función mitocondrial en el contexto del cáncer, por ejemplo, en ratones con cáncer de colon provocados por mutaciones en el gen *Ctnnb1* que codifica para la proteína  $\beta$ -catenina, experimentaron un aumento en la

glucólisis aerobia dependiente de STAT3 y una supresión de la actividad de la cadena de transporte de electrones (ETC, del inglés *Electron Transport Chain*), esto debido en parte a la regulación positiva de HIF-1 $\alpha$  y c-myc por STAT3 constitutivamente activado y, como resultado, las células están protegidas de procesos apoptóticos y senescencia mientras que se vuelven más sensibles a la privación de glucosa [46].

STAT3 puede experimentar modificaciones adicionales a nivel postraduccional para alterar la producción transcripcional, incluida la fosforilación en su residuo Ser<sup>727</sup> [47], donde la evidencia indica que la cooperación de pTyr<sup>705</sup> y pSer<sup>727</sup> no sólo es necesaria para la activación completa de STAT3 [48], si no que también puede activarse STAT3 independientemente de pTyr<sup>705</sup>.

La fosforilación de Ser<sup>727</sup>-STAT3 es dependiente del contexto celular y puede ser regulada positivamente por proteínas a nivel citosólico, como la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK, del inglés *mitogen-activated protein kinase*) como p38 o cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK); las cinasas c-Jun N-terminal (JNC, del inglés *c-Jun N-terminal kinase*); caseína cinasa 2 (CK2, del inglés *casein kinase 2*); la proteína cinasa C (PKC); la diana de rapamicina en mamíferos (mTOR) o cdk5 [49]. Esta vía de activación no canónica permite también que STAT3 sea reclutado en las mitocondrias y regule funciones alternativas a la transcripción.

Otras modificaciones postraduccionales observadas en STAT3 incluyen a la metilación, la acetilación, ubiquitinación, (ISG)-ilación y SUMOilación con diversos efectos sobre las funciones transcripcionales y no transcripcionales de STAT3 [49].

*Regulación de la señalización de STAT3.* La fosforilación, como se ha comentado, forma parte de la regulación positiva o activación de las proteínas STAT3, y desfosforilación o regulación negativa de STAT3 es proporcionada por las proteínas tirosinas fosfatasas (PTP), los inhibidores de proteínas específicos como los supresores de señalización de citocinas (SOCS3) e inhibidores de proteínas STAT activadas (PIAS3), siendo además regulada por varios miARNs [21], las cuales son la diana terapéutica de múltiples fármacos en estudio y que han demostrado eficacia *in vitro* e *in vivo* en cáncer de mama TN [50].

#### 1.4. El papel pronóstico de los residuos Tyr<sup>705</sup> y Ser<sup>727</sup> de STAT3 en cáncer

En el adenocarcinoma colorrectal, la sobreexpresión de STAT3 demostró tener una correlación positiva con la invasión tumoral, la metástasis en los ganglios linfáticos, el grado tumoral y estadio clínico [51]. Generando así un mayor interés en el estudio de esta proteína como factor de mal pronóstico, encontrando estudios que demuestran que la sobreexpresión de STAT3 predice un resultado clínico precario para diversos cánceres como el cáncer de cuello uterino [52], el carcinoma esofágico [53] y carcinoma de cabeza y cuello [54,55] y neoplasias hematológicas [56]. Sin embargo, otros estudios han encontrado una función dual a partir de la identificación de las isoformas de STAT3, donde STAT3 $\beta$ , carente del residuo Ser<sup>727</sup>, se ha relacionado como regulador negativo que puede atenuar la actividad de transcripción de STAT3 $\alpha$  al inducir la formación de heterodímeros STAT3 $\alpha$ :STAT3 $\beta$  contribuyendo así al bloqueo de la quimio resistencia [57,58]. En cuanto al cáncer de mama, la activación constitutiva de STAT3 se ha visto relacionada con 40-60% de los casos [23,59].

Se ha evidenciado el papel que juega la señalización paracrina a través de factores solubles para la activación y fosforilación persistente de STAT3 en el cáncer de mama [60], sin embargo, la mayor parte de los estudios en cáncer de mama se han enfocado en la fosforilación del residuo de tirosina 705 (pTyr<sup>705</sup>) de STAT3.

*Recolección de datos.* Se realizó búsqueda de artículos originales hasta diciembre de 2021 en la base de datos PubMed utilizando combinaciones de términos y palabras clave. Los términos de búsqueda utilizados fueron 'breast cancer', 'STAT3', 'Tyrosine', 'Serine' 'Immunohistochemistry', 'prognosis', 'prognostic'. Los títulos y resúmenes se revisaron inicialmente para determinar su pertinencia en este apartado. Se eliminaron los duplicados. Luego se obtuvieron y revisaron los artículos de texto completo de los títulos restantes. Los criterios de inclusión fueron: artículos completos y originales en inglés que investigaron un resultado pronóstico medible (supervivencia general, supervivencia libre de enfermedad, supervivencia específica del cáncer o recurrencia) así como variables clínico-patológicas de riesgo, en relación la expresión de STAT3 en los uno o los dos residuos de fosforilación (Tirosina 705 y Serina 727). Para ser incluidos en la revisión, requerían haber investigado solo a pacientes con cualquier tipo de cáncer. Los estudios se excluyeron si se publicaron antes de 2000, si utilizaban otras técnicas distintas a la inmunohistoquímica. Además, se verificaron las referencias en los

artículos incluidos para detectar cualquier otro estudio relevante. Los resultados se presentan de manera descriptiva para cada residuo de STAT3.

*Resultados.* Se obtuvieron 2542 resultados de la búsqueda inicial. Después de la revisión de los títulos por relevancia, la revisión de resúmenes, la eliminación de duplicados y artículos en idioma no inglés, y la aplicación de los criterios de inclusión y exclusión, se incluyeron 30 estudios en la revisión final; de estos, 17 estudios fueron adecuados para su inclusión en el metaanálisis.

#### 1.4.1. Expresión de pTyr<sup>705</sup>-STAT3.

Para la valoración del componente pronóstico relacionado con el nivel de expresión y localización del residuo pTyr<sup>705</sup> de STAT3, la IHQ continúa siendo una de las herramientas predilectas para su análisis. En la **Tabla 1-3** se enlistan los hallazgos importantes con el uso de esta técnica en la evaluación del papel pronóstico de pTyr<sup>705</sup>-STAT3 en múltiples tipos de cáncer.

**Tabla 1-2. El papel pronóstico del residuo pTyr<sup>705</sup> por IHQ en cáncer.**

Autor	Año	País	Tipo de estudio	Tipo de cáncer	Pacientes (n)	Seguimiento	Fracción estudiada	Variable(s) de seguimiento	Supervivencia	p
Dolled-Filhart et al [61]	2003	EE. UU.	Retrospectivo de cohortes	Cáncer de mama (ganglios negativos)	346	15.6 años	STAT3 Total nuclear	SG a 5 años SG a 20 años	Mejorada Sin mejoría	0.0332 0.193
							pTyr705-STAT3 nuclear	SG a 5 años SG a 20 años UV: Tumor >2 cm	Mejorada Mejorada -	0.0054 0.0376
							pTyr705-STAT3 citoplasma	SG a 5 años SG a 20 años	Mejorada Sin mejoría	0.0375 0.214
Hsieh et al [62]	2005	EE. UU.	Retrospectivo de cohortes	Cáncer de mama	136		pTyr705-STAT3 nuclear	UV: Nódulos con mets UV: RP+	-	0.042 0.028
Lai et al [63]	2006	EE. UU.	Retrospectivo de cohortes	Sarcoma de Ewing	290	9.9 años	pTyr705-STAT3 nuclear	UV: SG a 5 años UV: SLE a 5 años MV: SG - tumor localizado	Sin mejoría Sin mejoría Mejorada	0.102 0.115 0.020
Yang et al [64]	2007	China	Retrospectivo de cohortes	Carcinoma hepatocelular	69	8 años	pTyr705-STAT3 nuclear	MV: SG MV: Microangiogénesis intratumoral MV: Ki-67 alto MV: Grado histológico	Mejorada	0.036 0.018 0.026 0.019
Seethala et al [65]	2008	EE. UU.	Retrospectivo de cohortes	Cáncer de cabeza y cuello	C1: 61 C2 mets: 79	4 años 7.9 años	pTyr705-STAT3 nuclear	UV: SLE (C1) UV: SLE (C2) UC: Metástasis	Sin mejoría Sin mejoría	0.914 0.655 <0.001
Min et al [66]	2009	China	Retrospectivo de cohortes	Carcinoma epitelial de ovario	50	7 años	pTyr705-STAT3 nuclear	UV: SG a 5 años UV: Estadio clínico Avanzado UV: Alto grado UV: Nódulos con mets	Empeorada	<0.01 <0.05 <0.01 <0.01
Birner et al [67]	2010	Bulgaria	Retrospectivo de cohortes	Glioblastoma	111	337 días	pTyr705-STAT3 nuclear	UV: SG MV: SG + Edad	Empeorada Empeorada	0.004 0.001
Monnien et al [68]	2010	Francia	Retrospectivo de cohortes	Carcinoma colorectal	104	5 años	pTyr705-STAT3 nuclear	UV: SG a 5 años UV: SLP a 5 años	Mejorada Sin mejoría Empeorada	0.04 0.52 <0.01

								MV: SLP + nódulos con mets MV: SG + nódulos con mets MV: SG + nódulos con mets + pSTAT3+	Empeorada Mejorada	<0.01 0.01
<b>Sato et al [69]</b>	2011	EE. UU.	Retrospectivo de cohortes	Cáncer de mama	785	12.5 años	pTyr705-STAT3 nuclear	UV: SG a 12.5 años MV: SG a 12.5 años y bajo GH MV: SG a 12.5 años y alto GH MV: alto GH MV: Nódulos con mets MV: Edad MV: Protector de progresión	Sin mejoría Mejoría Sin mejoría	0.081 0.014 0.711 <0.001 <0.001 <0.001 <0.001
<b>Woo et al [70]</b>	2011	Corea del Sur	Retrospectivo de cohortes	Cáncer gástrico	285	4.25 años	pTyr705-STAT3 nuclear	UV: SG a 4.25 años UV: Estadios tempranos UV: Ausencia de mets UV: Ki-67 alto UV: HIF-1 $\alpha$ + UV: VEGF +	Mejorada	0.001 0.001 0.010 0.004 0.002 <0.001
<b>Sonnenblick et al [71]</b>	2012	Israel	Retrospectivo de cohortes	Cáncer de mama no metastásico	407	16 años	pTyr705-STAT3 nuclear	UV: SLE a 5 años UV: SG a 5 años UV: SG a 10 años MV: SG a 5 años y RH+ MV: SG a 5 años y nódulos (-) MV: SG a 5 años y tumor <2cm	Mejorada Mejorada Mejorada Mejorada Mejorada	0.035 0.023 0.026 0.03 0.003 0.023
<b>Schoppmann et al [53]</b>	2012	Austria	Retrospectivo de cohortes	Cáncer esofágico	324	5 años	pTyr705-STAT3 nuclear	UV: HER2+ UV: SG a 5 años UV: SLE a 5 años	Empeorada Empeorada	0.032 <0.001 <0.001
<b>Lin et al [72]</b>	2014	China	Retrospectivo de cohortes	Glioblastoma	90	11 meses	pTyr705-STAT3 nuclear	UV: SG UV: SLP	Empeorada Empeorada	0.009 0.012

SG: Supervivencia global; UV: Univariable; MV: Multivariable

#### 1.4.2. Expresión de pSer<sup>727</sup>-STAT3.

Además de la fosforilación del residuo crítico de tirosina revisado, tanto STAT3 como STAT1 pueden fosforilarse en su residuo Ser<sup>727</sup> en el dominio TAD C-terminal [73], dependiendo del estímulo y tipo de célula. Se ha demostrado que la fosforilación de STAT3 tanto en Tyr<sup>705</sup> como en Ser<sup>727</sup> conduce a la transactivación completa de la señalización de STAT3 [74] y, por lo tanto, su máxima actividad, muy probablemente mediante el reclutamiento de proteínas coactivadoras como p300 [75], Pin1 [76,77] y RelA [78]. De igual manera, se ha demostrado que la fosforilación de Ser<sup>727</sup>-STAT3 mejora la unión al ADN en un estudio realizado en células epidérmicas ante señales inflamatorias (radiación UVA) mediadas por JNK1/2 [79].

Se ha sugerido que STAT3 puede activarse mediante la fosforilación de Ser<sup>727</sup> en ausencia de la fosforilación de Tyr<sup>705</sup> en un estudio realizado con células madre neuronales donde se encontró una correlación entre pSer<sup>727</sup> en ausencia de pTyr<sup>705</sup> y la supervivencia de estas células [80]. Igualmente, en ausencia de pTyr<sup>705</sup>, pSer<sup>727</sup> es

esencial para la supervivencia y activación de macrófagos diferenciados in vitro humanos primarios [81], y p Ser<sup>727</sup> puede actuar como regulador negativo al reducir pTyr<sup>705</sup>, mejorando así la tasa mitótica [82]. Otra de las posibilidades al fosforilarse Ser<sup>727</sup>-STAT3 es su capacidad de localizarse en la mitocondria y regular funciones mitocondriales independientemente de su actividad transcripcional [45,83].

Los hallazgos anteriores han permitido que se profundice en el estudio de este residuo en diversos cánceres donde se ha logrado demostrar que la activación constitutiva por medio de pSer<sup>727</sup>-STAT3 (independiente de p Tyr<sup>705</sup>) es suficiente para activar a STAT3 impulsando así la proliferación celular en la leucemia linfocítica crónica [84] y la tumorigénesis de próstata prescindiendo de pTyr<sup>705</sup> [85], observándose por primera vez la reelevancia de este residuo en estudios experimentales con células obtenidas de pacientes con cáncer prostático. Por otro lado, se ha observado que las mutaciones de Ser<sup>727</sup> o el bloqueo de pSer<sup>727</sup> alteran la capacidad tumorigénica de STAT3 al comprometer su actividad transactivacional [85].

Con base en lo anterior, se realizó una búsqueda intencionada de estudios acerca del componente pronóstico relacionado con el nivel de expresión y localización del residuo pSer<sup>727</sup>-STAT3 en múltiples tipos de cáncer, a través de la técnica por IHQ, enlistados en la **Tabla 1-4**.

**Tabla 1-3. El papel pronóstico del residuo pSer<sup>727</sup> por IHQ en cáncer.**

Autor	Año	País	Tipo de estudio	Tipo de cáncer	Pacientes (n)	Seguimiento	Fracción estudiada	Variable(s) de seguimiento	Supervivencia	p
Yang et al [33]	2005	China	Retrospectivo de cohortes	Neoplasia intraepitelial cervical	56	7.8 años	pSer727-STAT3 nuclear	UV: NIC 3 alto grado UV: Ki-67 alto		<0.001 <0.001
							pSer727-STAT3 citoplasma	UV: NIC 3 alto grado UV: Ki-67 alto		<0.001 <0.001
Yeh et al [86]	2006	China	Retrospectivo de cohortes	Cáncer de mama	68	3 años	pSer727-STAT3 nuclear pSer727-STAT3 citoplasma	UV: EC mayor UV: RE- UV: Tamaño >2cm		0.024 0.001 0.014
Choi et al [87]	2010	Corea del Sur	Retrospectivo de cohortes	Carcinoma cervical (post-neoadyuvancia)	29	2 años	pSer727-STAT3 nuclear	UV: Nódulos con mets MV: SLP + Nódulos con mets	Mejorada	0.046 0.03
Lin et al [88]	2014	China	Retrospectivo de cohortes	Glioblastoma	88	3.4 años	pSer727-STAT3 nuclear pTyr705-STAT3 nuclear	UV: SG a 3.4 años UV: SLP a 3.4 años MV: SG a 3.4 años + coexpresión de pTyr705-STAT3 nuclear	Empeorada Empeorada Empeorada	0.002 0.006 0.007

SG: Supervivencia general; SLP: Supervivencia libre de enfermedad; UV: Univariable; MV: Multivariable; NIC: neoplasia intraepitelial cervical; KI-67: Marcador de proliferación celular; EC: Estadio clínico TNM; RE: receptores estrogénicos.

### 1.4.3. Análisis de la expresión de residuos STAT3

Tabla 1-5. Evaluación de la tinción IHQ de pTyr<sup>705</sup>-STAT3 en estudios previos.

Autor	Año	País	Tipo de tejido	Fracción estudiada	Anticuerpo	Fabricante	Dilución	Parámetro	Modo de evaluación	Clasificación	Puntos de corte para la expresión
Dolled-Filhart et al [61]	2003	EE. UU.	Cáncer de mama (ganglios negativos) TMA's	STAT3 Total nuclear	Anticuerpo monoclonal de conejo	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA	1:150	<b>Intensidad de la tinción</b>	Microscopia de luz	N/A: Sin posible interpretación 0: sin tinción 1: tinción débil 2: tinción moderada 3: tinción intensa	Negativa: 0 Positiva: 1-3 (tinción débil a intensa)
				pTyr705-STAT3 nuclear/citoplasma	Anticuerpo monoclonal de conejo		1:100				
Hsieh et al [62]	2005	EE. UU.	Cáncer de mama TMA's	pTyr705-STAT3 nuclear	Anticuerpo monoclonal de conejo	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA	1:30	<b>Intensidad de la tinción</b>	Microscopia de luz	N/A: Sin posible interpretación 0: sin tinción 1: tinción débil 2: tinción moderada 3: tinción intensa	Negativa: 0 y 1 Positiva: 2 – 3 (tinción moderada a intensa)
Lai et al [63]	2006	EE. UU.	Sarcoma de Ewing	pTyr705-STAT3 nuclear	Anticuerpo monoclonal de conejo, clona B-7	Santa Cruz Biotechnology, CA Signet Laboratories, Dedham, MA	1:10	<b>Porcentaje de células</b>	Microscopia de luz	Negativo: 0-10% Positivo: >10%	Negativo: 0-10% Positivo: >10%
					Anticuerpo monoclonal de conejo, clona O13		1:50				
Yang et al [64]	2007	China	Carcinoma hepatocelular	pTyr705-STAT3 nuclear	Anticuerpo monoclonal de conejo	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA	1:200	Combinado: Grado de proporción ( <b>Porcentaje de células</b> ) + Grado de intensidad ( <b>promedio de intensidad</b> ) Score combinado: suma de ambos /4	Microscopia de luz	Grado 1: ≤25% de núcleos positivos Grado 2: 26-50% Grado 3: 51-75% Grado 4: ≥76%  Grado 1: intensidad mínima Grado 2: intensidad débil Grado 3: intensidad moderada Grado 4: intensidad fuerte	<i>Score combinado:</i> Score 1: suma de grados 1-2 Score 2: suma de grados 3-4 Score 3: suma de grados 5-6 Score 4: suma de grados 7-8
Seethala et al [65]	2008	EE. UU.	Cáncer de cabeza y cuello	pTyr705-STAT3 nuclear	Anticuerpo monoclonal de conejo	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA	1:50	<b>Combinado:</b>  <b>Intensidad de la tinción</b>  <b>Porcentaje de células</b>	Microscopia de luz	0: sin tinción 1: tinción débil 2: tinción moderada 3: tinción intensa x % células x100 (H-score: 0-300) Percentilas	Punto de corte 1 Baja: <p25% Alta: >p25%  Punto de corte 2 Baja: <p75% Alta: >p75%

<b>Min et al [66]</b>	2009	China	Carcinoma epitelial de ovario	pTyr705-STAT3 nuclear	Anticuerpo monoclonal de conejo, clona SC-8019	Santa Cruz Biotechnology, CA	1:100	<b>Intensidad de la tinción</b>  <b>Porcentaje de células</b>	Análisis por software	1: tinción débil 2: tinción moderada 3: tinción intensa  Expresión baja: 0-10% Expresión alta: ≥10%	Punto de corte 1 1: tinción débil 2: tinción moderada 3: tinción intensa Punto de corte 2 Baja: 0-10% Alta: ≥10%
<b>Birner et al [67]</b>	2010	Bulgaria	Glioblastoma	pTyr705-STAT3 nuclear	Anticuerpo monoclonal de conejo, clona D3A7	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA	1:50	<b>Porcentaje de células</b>	Microscopia de luz	Sin tinción: tinción equívoca Expresión baja: <5% Expresión alta: >5-20% Expresión muy alta: >20%	Baja: 0-5% Alta: >5%
<b>Monnien et al [68]</b>	2010	Francia	Carcinoma colorectal	pTyr705-STAT3 nuclear	Anticuerpo monoclonal de conejo, clona SC-7993	Santa Cruz Biotechnology, CA	1:200	<b>Porcentaje de células</b>	Microscopia de luz	Expresión negativa: ≤15% Expresión positiva: >15%	Negativa: ≤15% Positiva: >15%
<b>Sato et al [69]</b>	2011	EE. UU.	Cáncer de mama	pTyr705-STAT3 nuclear	Anticuerpo monoclonal de conejo	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA	1:60	<b>Intensidad de la tinción</b>  <b>Porcentaje de células</b>	Microscopia de luz	0: sin tinción 1: tinción débil 2: tinción moderada 3: tinción intensa  ¿?	Negativo: score 0 Positivo: score 1-3
<b>Woo et al [70]</b>	2011	Corea del Sur	Cáncer gástrico TMA's	pTyr705-STAT3 nuclear	Anticuerpo monoclonal de conejo	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA	1:50	<b>Porcentaje de células</b>	Microscopia de luz	Expresión negativa: <1% Expresión positiva: ≥1%	Negativa: <1% Positiva: ≥1%
<b>Sonnenblick et al [71]</b>	2012	Israel	Cáncer de mama no metastásico TMA's	pTyr705-STAT3 nuclear	Anticuerpo monoclonal de conejo	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA	1:200	Remmele score (0-6): <b>Intensidad de la tinción</b> + <b>Porcentaje de células</b>	Microscopia de luz	0: sin tinción 1: tinción débil 2: tinción moderada 3: tinción intensa  0: <25% 1: 25-50% 2: 50-75% 3: 75-100%	Remmele score (0-6): Punto de corte 1 (remmel score 3) Positiva: >25% con intensidad moderada Punto de corte 2 (Remmele score 4)
<b>Schoppmann et al [53]</b>	2012	Austria	Cáncer esofágico	pTyr705-STAT3 nuclear	Anticuerpo monoclonal de conejo, clona D3A7	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA	1:100	IHC-score: 0-300 <b>Intensidad de la tinción</b> + <b>Porcentaje de células</b>	Microscopia de luz	1: tinción débil 2: tinción moderada 3: tinción intensa + % de células	Media de IHC score
<b>Lin et al [72]</b>	2014	China	Glioblastoma	pTyr705-STAT3 nuclear	Anticuerpo monoclonal de conejo, clona D3A7	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA	1:100	<b>Porcentaje de células</b>	Microscopia de luz	Sin tinción: 0 Expresión baja: ≤5% Expresión alta: >5%	Baja: ≤5% Alta: >5%

**Tabla 1-6. Evaluación de la tinción IHQ de pSer<sup>727</sup>-STAT3 en estudios previos.**

<b>Autor</b>	<b>Año</b>	<b>País</b>	<b>Tipo de tejido</b>	<b>Fración estudiada</b>	<b>Anticuerpo</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Dilución</b>	<b>Parámetro</b>	<b>Modo de evaluación</b>	<b>Clasificación</b>	<b>Puntos de corte para la expresión</b>
Yang et al [33]	2005	China	Neoplasia intraepitelial cervical	pSer727-STAT3 nuclear pSer727-STAT3 citoplasma	Anticuerpo policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology, CA	1:200	Porcentaje de células	Microscopia de luz	Grado 1: ≤25% de núcleos positivos Grado 2: 26-50% Grado 3: 51-75% Grado 4: ≥76%	Baja: grados 1-2 Alta: grados 3-4
Yeh et al [86]	2006	China	Cáncer de mama	pSer727-STAT3 nuclear pSer727-STAT3 citoplasma	Anticuerpo policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology, CA	N/A	N/A	Microscopia de luz	N/A	N/A
Choi et al [87]	2010	Corea del Sur	Carcinoma cervical (post-neoadyuvancia)	pSer727-STAT3 nuclear	Anticuerpo policlonal de cabra	Santa Cruz Biotechnology, CA	1:200	Porcentaje de células	Microscopia de luz	Negativo: ≤50% Positivo: >51%	Negativo: ≤50% Positivo: >51%
Lin et al [88]	2014	China	Glioblastoma	pSer727-STAT3 nuclear	Anticuerpo policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology, CA	1:100	Porcentaje de células	Microscopia de luz	Sin tinción: 0 Expresión baja: ≤5% Expresión alta: >5%	Baja: ≤5% Alta: >5%

## JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama se ha perfilado como la neoplasia más prevalente en el género femenino, siendo también la primera causa de mortalidad en mujeres en todo el mundo. En México, más del 65% de los diagnósticos de cáncer de mama se realizan en etapas avanzadas por lo que es necesario ajustar el enfoque clínico en población mexicana con la implementación de biomarcadores asociados a pronóstico.

El protocolo de estudio en cáncer de mama incluye el análisis IHQ de marcadores proteínicos como un elemento indispensable en la toma de decisiones médicas para el manejo clínico de acuerdo con los lineamientos establecidos en la NOM-041-SSA2 (Secretaría de Salud, 2012). Tanto el diagnóstico como el tratamiento representan un gran reto actualmente, justificando así los estudios tanto de la biología molecular como la detección temprana de marcadores con técnicas asequibles en nuestro sistema de salud como lo es la técnica por IHQ. Lo anterior permitirá una mayor comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo y la progresión del cáncer de mama y, así mismo, el diseño de estrategias eficaces para la prevención y el tratamiento.

La población mexicana ha sido estudiada con base a los aspectos clínicos e histopatológicos, sin embargo, la información es escasa y contribuye a una gran deficiencia en la implementación de estudios que logren ser incluidos en las guías de práctica clínica a nivel nacional, donde los puntos de corte se basan en poblaciones de países desarrollados con características distintas, razón por la que el conocimiento adecuado a la población mexicana auxiliará en el reconocimiento, intervención y manejo eficaz de esta compleja enfermedad.

En un estudio por nuestro grupo de trabajo, se investigó la función del residuo pTyr<sup>705</sup>-STAT3 en la población objeto de esta investigación, reportándose que pTyr<sup>705</sup>-STAT3 puede expresarse como un factor protector para el avance de la enfermedad entre estadios tempranos I-IIA y como un factor de 2.6 veces más riesgo para el avance de la enfermedad entre estadios localmente avanzados (IIB-IV); asimismo, la expresión

nuclear de pTyr<sup>705</sup>-STAT3 se identificó como factor de riesgo para metástasis ganglionar (Alcalá, B. et al., 2020), sin embargo, es necesario estudiar la contraparte de STAT3 referente al residuo Ser<sup>727</sup> para dilucidar con mayor precisión la función de STAT3 y dar pie a futuras investigaciones donde puedan incluirse ambas isoformas de STAT3 para la caracterización completa de esta proteína en población mexicana.

- Planteamiento del problema

La sobreexpresión de las proteínas STAT ha sido relacionada con múltiples tipos de cáncer siendo STAT3 uno de los miembros más recientemente estudiados relacionado a la progresión del cáncer de mama. STAT3, es un elemento clave en la regulación transcripcional de genes implicados en la proliferación celular, supervivencia, migración celular y quimio resistencia. Sin embargo, las funciones ambivalentes de STAT3 en relación con la progresión y supresión del cáncer lo posicionan como una de las proteínas blanco en el estudio molecular de esta compleja enfermedad.

La caracterización de pSer<sup>727</sup>-STAT3 en tejido mamario neoplásico permitirá ampliar el conocimiento acerca de los factores moleculares que contribuyen en la génesis y progresión de cáncer de mama en población mexicana. La expresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3 puede servir como un biomarcador útil y un monitor sensible para la progresión neoplásica de mal pronóstico en cáncer de mama en población mexicana y, por lo tanto, la generación de terapias dirigidas a pSer<sup>727</sup>-STAT3 en población con cáncer de mama diagnosticado en etapas avanzadas. Lo anterior contribuyendo directamente al mejoramiento en la esperanza de vida y enfermedad libre de progresión, lo cual conllevaría a repercusiones favorables a múltiples niveles en la sociedad.

- Pregunta de investigación

¿Existe asociación entre la expresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3 con los factores clínico-patológicos de mal pronóstico en las pacientes con cáncer de mama?

## HIPÓTESIS

La sobreexpresión de pSer<sup>727</sup>-STAT3 se asocia a factores clínico-patológicos de peor pronóstico en las pacientes con cáncer de mama en comparación con aquellas que sobre expresan a pTyr<sup>705</sup>-STAT3. Así mismo, la sobreexpresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3 se asociará a supervivencia global disminuida.

- Hipótesis nula H0

La sobreexpresión de pSer<sup>727</sup>-STAT3 no se asocia a factores clínico-patológicos de peor pronóstico en las pacientes con cáncer de mama en comparación con aquellas que sobre expresan a pTyr<sup>705</sup>-STAT3. La sobreexpresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3 no tiene relación con la supervivencia general disminuida.

## OBJETIVOS

### **Objetivo general**

Asociar la expresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3 con los factores clínico-patológicos en pacientes con cáncer de mama.

### **Objetivos específicos**

1. Caracterizar los casos de cáncer de mama de acuerdo con los factores clínicos y patológicos.
2. Determinar la expresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3 en tejido neoplásico mamario.
3. Correlacionar la expresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3 y pTyr<sup>705</sup>-STAT3 con las características clínico-patológicas.
4. Determinar la supervivencia global en los casos con sobreexpresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3.

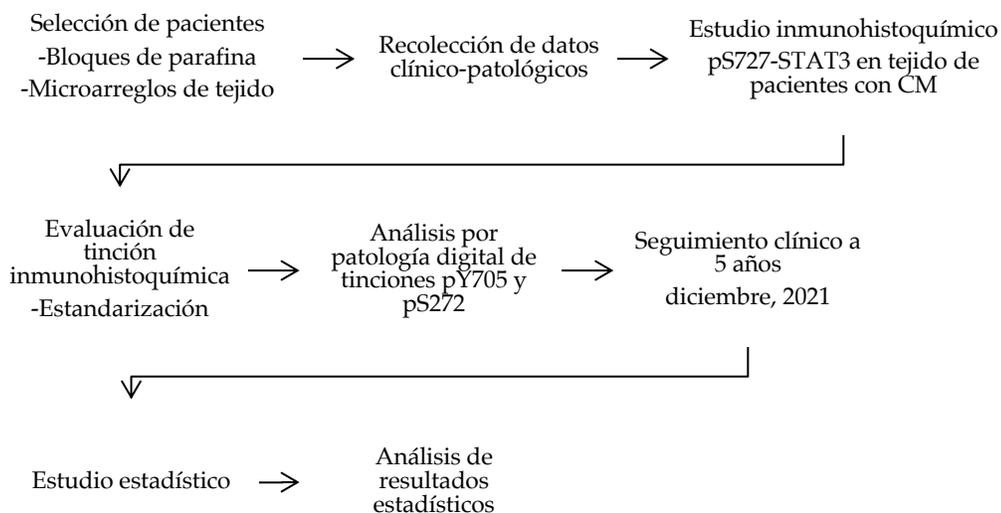
## CAPÍTULO 2

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1. Diseño del estudio

El presente estudio es de tipo ambispectivo, descriptivo, transversal y observacional. Se revisaron los casos con diagnóstico de cáncer de mama con muestras de tejido incluido en bloque de parafina y expediente clínico completo, microarreglos de tejidos y resultados de inmunohistoquímica para receptores de estrógeno, receptores de progesterona, HER2, Ki-67 y pTyr<sup>705</sup>-STAT3.

La población de estudio fueron pacientes afiliadas al Hospital General Regional No. 1 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y el Centro Estatal de Atención Oncológica perteneciente a la Secretaría de Salud (SSA) en Morelia, Michoacán, durante el período de captación entre enero de 2015 y diciembre de 2017, siguiendo el diseño experimental ilustrado en la **Figura 2-1**.



**Figura 2-1. Diagrama de flujo del diseño experimental.**

## 2.2. Selección de la población de estudio

La población de estudio fue seleccionada mediante la técnica de muestreo no probabilística por conveniencia, aplicándose los siguientes criterios:

### Criterios de inclusión:

- Mujeres mayores de 18 años.
- Pacientes con diagnóstico histopatológico de cáncer de mama.
- Expediente clínico completo.
- Reporte histopatológico con resultados de inmunohistoquímica para RE, RP, HER2, Ki-67 y pTyr<sup>705</sup>-STAT3.
- Muestras que cuenten con microarreglo de tejido.

### Criterios de exclusión:

- Diagnóstico de cáncer de mama recurrente o recidivante.
- Diagnóstico previo o actual de cáncer en algún otro sitio.
- Expediente clínico incompleto.
- Casos que no cuenten con microarreglo de tejido o este cuente con material histológico insuficiente y/o con artefactos.

### Criterios de eliminación:

- Muestras con abundante necrosis.
- Microarreglo de tejido con pérdida tisular tras estudio inmunohistoquímico (menos de 2 *spots* por paciente).
- Abandono de seguimiento clínico y/o abandono de permanencia en el estudio.

De acuerdo con lo anterior, la población de estudio se distribuyó como se detalla en la **Figura 2-2**.

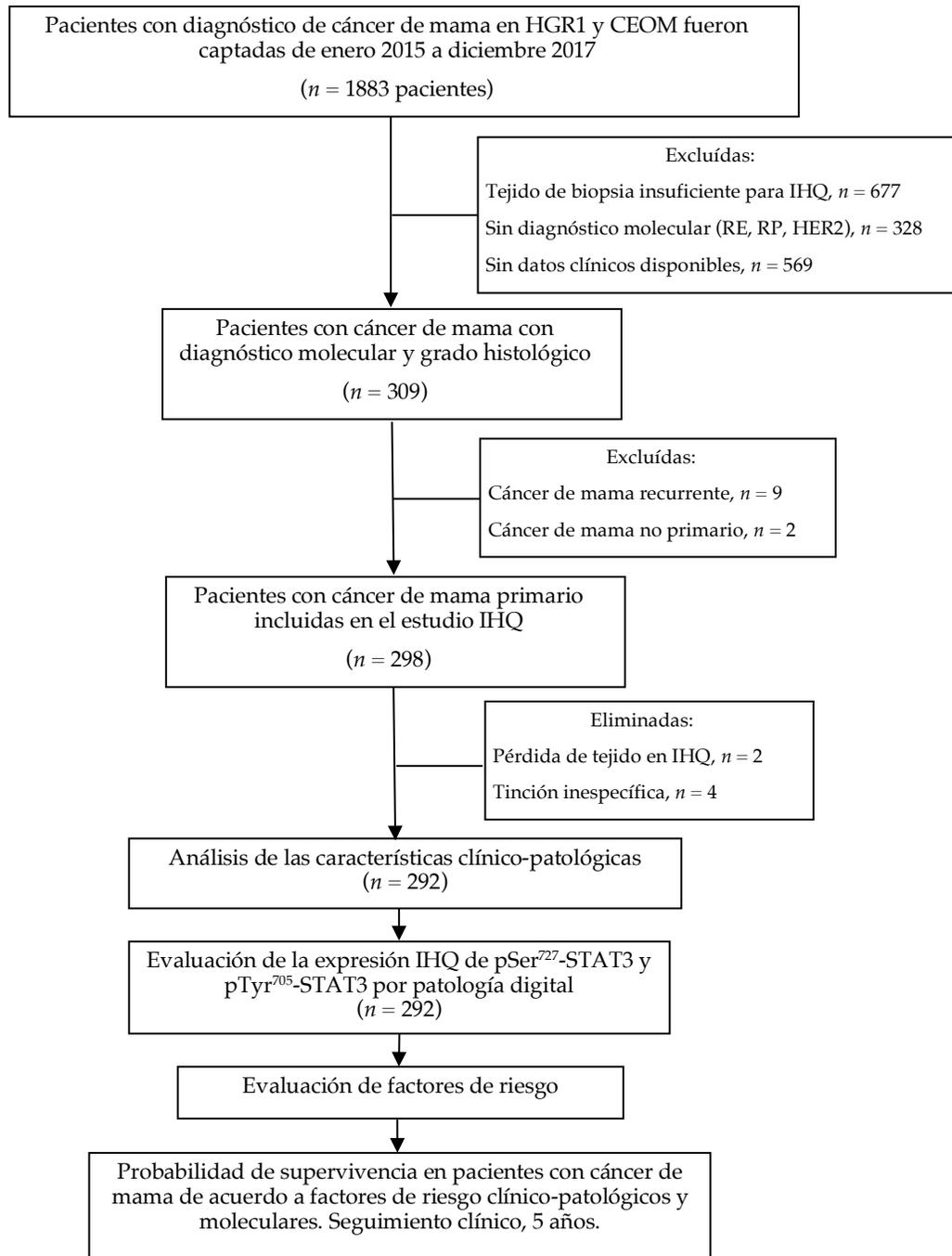


Figura 2-2. Diagrama de flujo de la población de estudio.

### 2.3. Descripción de las variables de estudio

La recopilación de las variables de interés se resume en las **Tablas 2-1 a 2-3** a continuación:

**Tabla 2-1. Descripción de variables clínicas en el estudio.**

VARIABLE DE ESTUDIO Definición conceptual / operacional	TIPO DE VARIABLE	UNIDAD DE MEDIDA	INDICADORES
<b>EDAD</b> Cantidad de años que un ser ha vivido desde su nacimiento. / Tiempo cronológico de vida cumplido por el paciente al momento del diagnóstico histopatológico inicial, registrado en expediente clínico.	Independiente. Cuantitativa continua.	Edad expresada en años.  Rangos por edad: -Mayor o menor de 40 años. -Intervalo de 10 años. -Intervalo de 5 años.	<u>Grupo 1:</u> Edad (años).  <u>Grupo 2:</u> 1= <40; 2= >41. <u>Grupo 3:</u> 1= <20; 2= 21-30; 3= 31-40; 4= 41-50; 5= 51-60; 6= 61-70; 7= 71-80; 8= 81-90; 9= >90. <u>Grupo 4:</u> 1= <25; 2= 26-30; 3= 31-35; 4= 36-40; 5= 41-45; 6= 46-50; 7= 51-55; 8= 56-60; 9= 61-65; 10= 66-70; 11= 71-75; 12= 76-80; 13= >81
<b>ÍNDICE DE MASA CORPORAL</b> Índice calculado según los kilogramos sobre metros de altura al cuadrado. / Registro de IMC de la paciente según peso y talla registrados en el expediente al momento del diagnóstico.	Independiente. Cuantitativa continua (grupo 1).  Cualitativa continua (grupo 2).	Kg/m <sup>2</sup>  IMC codificado	<u>Grupo 1:</u> IMC (kg/m <sup>2</sup> )  <u>Grupo 2:</u> 1= Peso bajo (<18.4 kg/m <sup>2</sup> ); 2= Peso adecuado (18.5-24.9 kg/m <sup>2</sup> ); 3= Sobrepeso (25-29.9 kg/m <sup>2</sup> ); 4= Obesidad grado I (30-34.9 kg/m <sup>2</sup> ); 5= Obesidad grado II (35-39.9 kg/m <sup>2</sup> ); 6= Obesidad grado III (>40 kg/m <sup>2</sup> ).
<b>EDAD DE MENARCA</b> Edad de comienzo de la menstruación. / Edad de comienzo de la primera menstruación registrada en expediente clínico.	Independiente Cuantitativa continua (grupo 1).  Cualitativa continua (grupo 2).	Edad expresada en años.  Agrupaciones por edad de presentación.	<u>Grupo 1:</u> Edad (años).  <u>Grupo 2:</u> 1= Menarca temprana (<10 años); 2= Menarca adecuada (11-13 años); 3= Menarca tardía (>14 años).
<b>ESTADO OVÁRICO</b> Estado hormonal de la mujer durante ciclo sexual. / Estado hormonal con base en la ausencia (fisiológica) o presencia de la última menstruación un año en retrospectiva, registrado en expediente clínico.	Independiente. Cualitativa nominal.		<u>Grupo 1:</u> 1= Premenopausia; 2= Postmenopausia fisiológica; 3= Postmenopausia quirúrgica.
<b>EDAD DE MENOPAUSIA</b> Edad de la última menstruación. / Edad cumplida al momento de la última menstruación, registrada en expediente clínico. Según la NOM-035-SSA2-2012: -Menopausia prematura: cuando la menopausia ocurre a una edad <2 DE de la media estimada para una población de referencia (edad de 40 años o menos). -Menopausia tardía: cuando la menopausia ocurre a una edad >2 DE de la media estimada para una población de referencia. Se acepta la edad mayor de 55 años como criterio práctico.	Independiente. Cuantitativa continua (grupo 1).  Cualitativa continua (grupo 2).	Edad expresada en años.  Agrupaciones por edad de presentación.	<u>Grupo 1:</u> Edad (años).  <u>Grupo 2:</u> 1= Menopausia temprana (<40 años); 2= Menopausia a edad adecuada (41-54 años); 3= Menopausia tardía (>55 años).
<b>EDAD DE PRIMERA GESTACIÓN</b> Edad del primer embarazo de término. / Se valorará la edad en la cual la paciente haya presentado su primera gestación a término, registradas en expediente clínico.	Independiente. Cuantitativa continua (grupo 1).	Edad expresada en años.	<u>Grupo 1:</u> Edad (años).  <u>Grupo 2:</u> 1= Gestación temprana (≤19 años); 2= Gestación en edad intermedia

	Cualitativa continua (grupo 2).	Agrupaciones por edad de presentación.	(20-34 años); 3= Gestación tardía ( $\geq 35$ años).
<b>NÚMERO DE GESTACIONES</b>			
Valoración cuantitativa y objetiva del número de ocasiones en las cuales una mujer presenta embarazos de término. / Cantidad de gestaciones a término (NOM 007/SSA2-2016) registradas en expediente clínico.	Independiente. Cuantitativa continua (grupo 1).  Cualitativa continua (grupo 2 y 3).	Números enteros.  Agrupaciones por cantidad de gestaciones de término.	<u>Grupo 1:</u> Gestaciones de término. (cantidad) <u>Grupo 2:</u> 1= Nuligesta; 2= >1 gestación. <u>Grupo 3:</u> 1= 1-2 gestas; 2= 3-4 gestas; 3= >5 gestas.
<b>LACTANCIA MATERNA</b>			
Tipo de alimentación de la especie humana mediante la cual el recién nacido satisface sus requerimientos nutricionales a través del seno materno. / Se valorará si paciente brindó lactancia materna a hijo(s), registrado en expediente clínico.	Independiente. Cuantitativa continua (grupo 1).  Cualitativa nominal (grupo 2).	Duración expresada en meses.  Lactancia materna ofrecida por 6 meses o más.	<u>Grupo 1:</u> Duración (meses).  <u>Grupo 2:</u> 1= Sí; 2= No.
<b>ÍNDICE ESTROGÉNICO</b>			
Período acumulado en años de los ciclos ovulatorios en mujeres, los cuales dependen de la edad de menarca, número de gestaciones, duración de lactancia y edad de menopausia. / Se estimaron los años de exposición a estrógenos endógenos para mujeres en postmenopausia (años de la edad de menopausia - la edad de la menarca); para mujeres premenopáusicas: edad al momento de diagnóstico - edad de menarca; posteriormente se restará la duración de las gestaciones y lactancia de los resultados anteriores.	Independiente Cuantitativa continua (grupo 1).  Cualitativa nominal (grupo 2).	Números enteros con decimales.  Grados.	<u>Grupo 1:</u> Tiempo de exposición a estrógenos endógenos (años).  <u>Grupo 2:</u> 1= Bajo; 2= Moderado; 3= Alto.

**Tabla 2-2. Descripción de variables patológicas en el estudio.**

VARIABLE DE ESTUDIO		TIPO DE VARIABLE	INDICADORES
Definición conceptual / operacional			
<b>LOCALIZACIÓN ANATÓMICA DEL TUMOR</b> Localización topográfica del tumor según lateralidad de mama afectada: derecha o izquierda, así como cuadrante afectado. / Se obtendrá de los expedientes clínicos de las pacientes.		Dependiente Cualitativa nominal (grupo 1 y 2).	<u>Grupo 1:</u> 1= Mama derecha; 2= Mama izquierda; 3= Ambas mamas. <u>Grupo 2:</u> 1= Cuadrante superior externo (CSE); 2= Cuadrante superior interno (CII); 3= Cuadrante inferior externo (CIE); 4= Cuadrante inferior interno (CII); 5= Intercuadrante; 6= Retroareolar; 7= Todos los cuadrantes.
<b>TAMAÑO DEL TUMOR POR PATOLOGÍA</b> Dimensión de pieza quirúrgica tumoral en su diámetro mayor medido en cm. / Valoración con base en informes anatomopatológicos del tumor primario, midiéndose en centímetros los dos diámetros tumorales máximos en el transcurso del estudio macroscópico del espécimen.		Dependiente. Cuantitativa continua.	<u>Grupo 1:</u> Tamaño tumoral (cm). <u>Grupo 2:</u> 1= ≤ 2 cm; 2= >2 cm <u>Grupo 3:</u> 1= ≤1 cm; 2= 1-2 cm; 3= 2-3 cm; 4= 3-4 cm; 5= 4-5 cm; 6= 5-6 cm; 7= 6-7 cm; 8= 7-8 cm; 9= 8-9 cm; 10= 9-10 cm; 11= >10 cm
<b>CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA</b> La clasificación histológica se obtendrá de los reportes histopatológicos en el expediente clínico, siguiendo los criterios por la OMS y avalados por el Consenso de Cáncer de Mama. / Reporte histopatológico en expediente clínico.		Dependiente Cualitativa nominal.	<u>Grupo 1:</u> 1= Carcinoma ductal infiltrante; 2= Carcinoma ductal in situ; 3= Carcinoma lobulillar infiltrante; 4= Carcinoma lobulillar in situ; 5= Carcinoma metaplásico; 6= Carcinoma papilar; 7 = Carcinoma medular; 8= Carcinoma pleomórfico; 10= Carcinoma adenoideo quístico; 11= Carcinoma neuroendocrino; 12= Carcinoma mixto.
<b>GRADO HISTOLÓGICO</b> Grado de diferenciación de las células tumorales. Evaluación semicuantitativa de las características citomorfológicas. / Determinación obtenida en expediente clínico según el Sistema de gradación de Nottingham, <i>modificado de [8]</i> . El grado final deriva de la suma de estos parámetros: 3-5: Bajo grado (1, bien diferenciado), 6-7: Grado intermedio (2, moderadamente diferenciado) y 8-9: Alto grado (3, pobremente diferenciado). <i>Modificado de [9]</i> A partir de estos valores se obtiene la suma de los tres parámetros, cuantificándose como 3-5: Grado 1, 6-7: Grado 2 y 8-9: Grado 3.		Dependiente Cualitativa nominal.	<u>Grupo 1:</u> 1= Bien diferenciado (bajo grado); 2= Moderadamente diferenciado (grado intermedio); 3= Indiferenciado (alto grado). <u>Grupo 2:</u> Formación de túbulos 1= 1; 2= 2; 3= 3 <u>Grupo 3:</u> Pleomorfismo nuclear 1= 1; 2= 2; 3= 3 <u>Grupo 3:</u> índice mitótico 1= 1; 2= 2; 3= 3
Parámetro	Características	Punt.	
<i>Formación de túbulos</i>	Formación de túbulos en el 75% o más del tumor	1	
	Formación de túbulos en el 10 – 75% del tumor	2	
	Formación de túbulos en menos del 10% del tumor	3	
<i>Pleomorfismo nuclear</i>	Tumores con núcleos pequeños, regulares con cromatina dispersa y nucleolo indistinto, con tamaño similar o discretamente superior al de las células epiteliales de tejido mamario normal.	1	
	Tumores con moderada variación de tamaño nuclear (1.5-2 veces el tamaño normal) con núcleos vesiculosos y nucleolo visible.	2	
	Tumor con marcada variación de tamaño nuclear y nucleolo muy prominente.	3	
<i>Índice mitótico</i>	De 0 a 6 mitosis por 10 campos (40x)	1	
	De 7 a 10 mitosis por 10 campos (40x)	2	
	Más de 10 por 10 campos (40x)	3	
<b>TIPO DE BORDES</b>		Dependiente	

Características infiltrativas en bordes de la pieza quirúrgica en la evaluación diagnóstica. / Reporte histopatológico en expediente clínico.	Cualitativa nominal.	<b>Grupo 1:</b> 1= Bordes infiltrantes (con neoplasia); 2= Bordes no infiltrantes (libres).
<b>PERMEACIÓN LINFOVASCULAR</b> Características infiltrativas en vasos linfáticos y vasculares de la pieza quirúrgica en la evaluación diagnóstica. / Reporte histopatológico en expediente clínico.	Dependiente Cualitativa nominal.	<b>Grupo 1:</b> 1= Presente; 2= Ausente.
<b>ENTIDADES ASOCIADAS</b> Características adicionales al tumor en la evaluación histopatológica. / Reporte histopatológico en expediente clínico.	Dependiente Cualitativa nominal.	<b>Grupo 1:</b> 1= Presentes; 2= Ausentes.  <b>Grupo 2:</b> 1= Microcalcificaciones; 2= Hiperplasia 3= Células columnares; 4= Adenosis microglandular; 5= Fibrosis; 6= Comedonecrosis; 7= Cancerización lobulillar; 8= Inflamación crónica; 9= Permeación perineural; 10= Fibroadenoma; 11= Inflamación granulomatosa; 12= Papilomas; 13= Ectasia ductal.
<b>ESTADIO AJCC ANATÓMICO</b> Estadificación anatómica TNM AJCC, 8a edición.	Dependiente Cualitativa nominal.	<b>Grupo 1:</b> 1= IA; 2= IIA; 3= IIB; 4= IIIA; 5= IIIB; 6= IIIC; 7= IV.  <b>Grupo 2:</b> 1= Estadio temprano (IA y IIA); 2= Estadios localmente avanzados (IIB-IIIC); 3= Estadios metastásicos (IV).
<b>NÓDULOS</b> Afección a ganglios linfáticos evidenciados en estudio anatomopatológico (pN). / Se evaluará la presencia de afección a ganglios linfáticos con base a la clasificación TNM reportada en expediente clínico. Categoría pN de la clasificación TNM (AJCC, 8a edición): Categoría Criterios de pN a pN pN0 No se han identificado metástasis en los ganglios linfáticos regionales o solo se han identificado células tumorales sueltas (ITCs). pN1 Micrometástasis; o metástasis en 1-3 ganglios linfáticos axilares; y/o ganglios de la cadena mamaria interna clínicamente negativos con micrometástasis o macrometástasis por biopsia del ganglio centinela. pN2 Metástasis en 4-9 ganglios linfáticos axilares; o ganglios positivos mamarios internos ipsilaterales por imagen en ausencia de metástasis en ganglios linfáticos axilares. pN3 Metástasis en 10 o más ganglios linfáticos axilares; o en ganglios linfáticos infraclaviculares (nivel III axilar); o ganglios linfáticos positivos en mamaria interna ipsilateral por imagen en presencia de 1 o más ganglios linfáticos positivos en niveles axilares I-II; o en más de 3 ganglios linfáticos axilares con micrometástasis o macrometástasis en la biopsia del ganglio centinela con ganglios de la mamaria interna clínicamente negativos; o en ganglios linfáticos supraclaviculares ipsilaterales.	Dependiente Cualitativa nominal.	<b>Grupo 1:</b> 1= Presente; 2= Ausente  <b>Grupo 2:</b> 1= pN0; 2= pN1; 3= pN2; 4= pN3
<b>METÁSTASIS</b> Proceso de propagación de un foco canceroso a un órgano distinto de aquel en que se inició. / Se evaluará presencia de metástasis a distancia con base a la clasificación clínica TNM reportada en expediente clínico. Categoría Criterios de M M M0 No hay evidencia clínica o radiológica de metástasis a distancia. M1 Metástasis a distancia detectadas por clínica o por medios radiológicos (cM) y/o metástasis con estudio histológico mayores de 0,2 mm (pM).	Dependiente Cualitativa nominal.	<b>Grupo 1:</b> 1= M0; 2= M1

**Tabla 2-3. Descripción de variables moleculares en el estudio.**

VARIABLE DE ESTUDIO	TIPO DE VARIABLE	INDICADORES
Definición conceptual / operacional		
<b>RECEPTORES HORMONALES</b> Receptores de estrógeno y progesterona identificados en estudio histopatológico. / Se valorará estatus de receptores hormonales, registrado en expediente clínico. Allred Score para RE y RP. Allred Score: Puntuación según porcentaje de células teñidas positivas y puntuación sobre intensidad de la tinción. Guías ASCO/CAP [10].	Dependiente Cualitativa nominal	<u>Grupo 1:</u> 1= Positivos (RE+ /RP+); 2= Negativos (RE- /RP-); 3= RE+ /RP- 4= RE- /RP+
<b>RECEPTORES ESTROGÉNICOS</b>	Dependiente Cualitativa nominal	<u>Grupo 1:</u> 1= Positivos; 2= Negativos
<b>RECEPTORES DE PROGESTERONA</b>		
<b>HER2</b> Miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico, localizado en el cromosoma 17q / Escala de interpretación de inmunohistoquímica. Categorías de la expresión de HER-2.	Dependiente Cualitativa nominal.	<u>Grupo 1:</u> 1= Positivo (+++); 2= Negativo (0 o +)
Sobreexpresión de HER-2	Características	
Positivo (+++ o 3+)	Tinción de membrana es circunferencial, completa e intensa en >10% de células neoplásicas.	
Indeterminado (++ o 2+)	Tinción de membrana es circunferencial pero incompleta y/o débil/moderada en > 10% de células neoplásicas. Tinción de membrana es completa y circunferencial, intensa en < 10% de las células invasoras.	
Negativo (0 o 1+)	Cuando la tinción de membrana incompleta es poco perceptible o débil en >10% de las células neoplásicas, se considera IHQ negativa 1+. Cuando no se observa tinción se considera IHQ negativa (0). Cuando la tinción de membrana es incompleta/débil o apenas perceptible en <10% de las células invasoras se considera IHQ negativa (0).	
<b>Ki-67</b> Proteína nuclear, no histona, que se encuentra en todas las fases del ciclo celular salvo en G0. Identifica las células proliferantes dentro de un tumor, cuanto mayor su presencia, más agresivo es el tumor. / Resultados obtenidos del expediente clínico.	Dependiente Cualitativa nominal.	<u>Grupo 1:</u> 1= Positivo (>20%); 2= Negativos (<20%)
<b>CLASIFICACIÓN MOLECULAR</b> Estado de los receptores hormonales de estrógenos y progesterona, amplificación o sobreexpresión de HER-2 y el marcador de proliferación Ki-67 [2].	Dependiente Cualitativa nominal.	<u>Grupo 1:</u> 1= Luminal A; 2= Luminal B / HER-2 negativo; 3= Luminal B / HER2 positivo; 4= HER2; 5= Triple Negativo <u>Grupo 2:</u> 1= Luminales; 2= HER2; 3= Triple Negativo

## 2.4. Construcción de microarreglos de tejido (TMA)

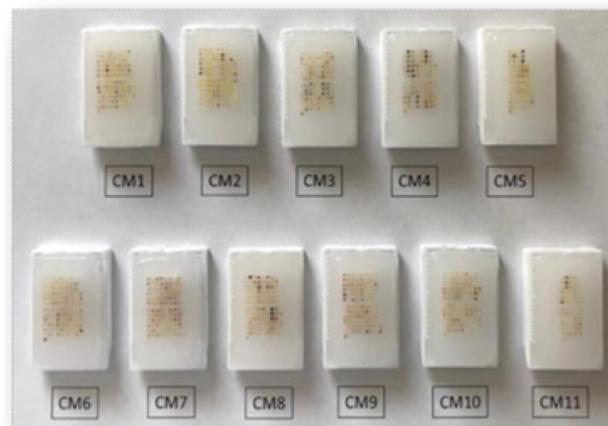
### 2.4.1. Recolección del tejido previo a construcción de TMA

Se recolectó tejido neoplásico de cada paciente obtenido por biopsia en casos diagnosticados en enero 2015 a diciembre de 2017, en donde cada muestra de tejido fue previamente preparado (formol amortiguado al 10%) tras su recolección en el laboratorio de anatomía patológica de las instituciones de salud pública donde estuvieran afiliadas las pacientes, contando con los requerimientos de la NOM-037-SSA3-2016. Las muestras de tejido se incluyeron en bloques de parafina, resultando así en 310 bloques.

Cada muestra fue identificada en código de letra y número (B-001) realizándose su captura en base de datos *Microsoft Excel*.

### 2.4.2. Procedimiento de construcción de TMA

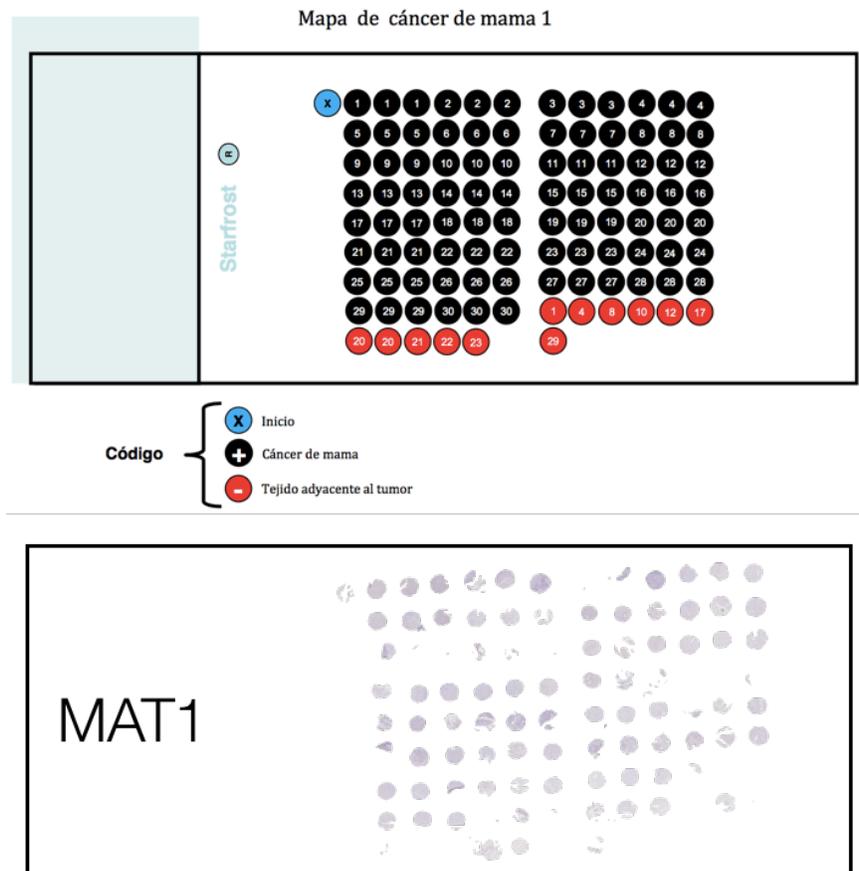
Dos patólogos identificaron secciones representativas del tumor, se tomaron cilindros de tejido de 1 mm de diámetro para la construcción del microarreglo (TMA, *Tissue Microarray*) con el equipo *Tissue Array ATA-100 (Chemicon International, Inc., Temecula, California, USA)*, resultando en 11 TMA de tejido embebido en parafina (**Figura 2-3**).



**Figura 2-3. Microarreglos de tejido embebidos en parafina.** Triplete de “spots” consecutivos equivalen a muestras de la misma paciente, bloques numerados del 1 al 11. CM: *cáncer de mama*.

En cada caso, se realizaron tripletes de *spots* con tejido neoplásico, incluyendo 92 *spots* con tejido peritumoral como controles, entendiéndose por *spot* al tejido neoplásico extraído en cilindros 1 mm de diámetro mediante la sección por el *Arrayer Punch* el cual contiene tejido representativo de las muestras de los casos de interés, y que será analizado con el *software Aperio*.

Cada bloque de tejido embebido en parafina fue posteriormente seccionado con el equipo *Chemicon Advanced Tissue Arrayer (ATA-100)* semiautomático realizándose cortes histológicos de 4µm de espesor en los 11 TMA's, colocándose en laminillas electrocargadas para evitar la pérdida de tejido al momento de realizar la inmunotinción, se realizó mapa de los tejidos dispuestos en cada laminilla para la identificación de cada paciente (**Figura 2-4**).



**Figura 2-4. Maqueta representativa de los microarreglos de tejido.** Microarreglos dispuestos en una laminilla para posterior identificación de casos, cada círculo en color negro representa un *spot* de tejido neoplásico (arriba). En la imagen inferior se observa la disposición de los spots en la laminilla final de microarreglos. *MAT*: *microarreglo de tejido*.

En la **Figura 2-4** se visualiza el orden con el que fueron diseñados los TMA's tomando como ejemplo a CM1, en donde cada TMA contó con un *spot* de inicio (círculo azul), seguido por los spots en orden de izquierda a derecha (círculos negros) de arriba abajo, siendo cada tres *spots* (tripletes del mismo número para cada paciente) los correspondientes para cada caso y numerados para posterior identificación. Los círculos en rojo representan el tejido tomado de las lesiones peritumorales representativas de algunas de las pacientes, conservando misma numeración. La toma del tejido peritumoral fue aleatoria en cada caso y seleccionada por médico anatomopatólogo.

## 2.5. Técnica de Inmunohistoquímica (IHQ)

El procedimiento de inmunohistoquímica para la detección de pSer<sup>727</sup>-STAT3 y pTyr<sup>705</sup>-STAT3 se realizó siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Americana de Oncología Clínica y el Colegio Americano de Patólogos. La tinción de pTyr<sup>705</sup>-STAT3 fue realizada en 2017 por nuestro equipo de trabajo.

La IHQ se utilizó para visualizar los niveles de expresión del residuo Ser<sup>727</sup> de STAT3 fosforilado en los tejidos de pacientes con cáncer de mama. Esta técnica utiliza un anticuerpo específico para el antígeno diana de interés, luego se utiliza un anticuerpo secundario marcado que reacciona con el anticuerpo primario. Se aplica un cromógeno como potenciador de la señal para que la expresión del antígeno se pueda visualizar bajo un microscopio de luz como una mancha marrón (imagen más adelante). Las laminillas posteriormente se contratiñen con hematoxilina para que contraste la mancha marrón primaria. Los diversos pasos en el proceso se describen con más detalle a continuación. Se incluyen imágenes representativas de la tinción de control negativo, así como controles positivos para el anticuerpo de estudio. Este estudio se adhirió a las guías REMARK (*Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies*) [89]. Los materiales fueron los mismos y con las mismas condiciones de uso durante la estandarización de la dilución del anticuerpo y la experimentación en los tejidos de CM de nuestras cohortes.

### 2.5.1. Estandarización de la técnica de IHQ

Para la estandarización de la dilución a usar en las muestras de cáncer de mama de la población de estudio se utilizaron tres muestras de tres tejidos distintos (cáncer de mama, hígado sano de rata, astrocitoma humano). Este procedimiento fue realizado en el Hospital Infantil “Federico Gómez”, constó de los siguientes pasos (materiales utilizados se mencionan antes de la descripción de cada paso):

- **Desparafinización y rehidratación**

Horno: Hybridization Oven (HB-1000 Hybridizer) S/N 120808-001 (Ultra-Violet Products, W 11<sup>th</sup> St. Upland, CA 2066, USA, [www.uvp.com](http://www.uvp.com)).

Las laminillas con tejido parafinado se introdujeron en una cestilla y se desparafinaron en el horno por 15 minutos, a 85°C. Inmediatamente fueron rehidratadas en una serie de solventes: xileno, xileno-etanol, etanol 100%, etanol 90%, etanol 70% y agua destilada, con 30 baños en cada solvente.

- **Recuperación antigénica.**

Equipo de baño con agitación (baño maría): Thermo Electron Corporation Precision 2870 Shaking Water Bath, S/N 200719, (Thermo Electron Corporation, Marrieta, Ohio 45750, USA, [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)).

Agitador de Lavado: Orbital Shaker Mod. OR-100 110V 2A, S/N 2457 5/02, P/N 8293S21 (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ 08085, USA, [www.thomasci.com](http://www.thomasci.com)).

Es necesaria para romper cualquier enlace proteico que se haya formado durante el proceso de fijación de tejido, desenmascarando al antígeno con el fin de que el anticuerpo pueda unirse. En este paso las laminillas fueron introducidas a un coplin para la recuperación antigénica, adicionando una solución de citrato de sodio 0.01M a pH6 y dejando el coplin en un baño de agua a 93°C con agitación por 20 min. Se removió el citrato y se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con PBS 1X en agitación.

- **Bloqueo de peroxidasa endógena**

Se incubaron las laminillas por 15 min en una solución de hidrógeno al 10% en metanol (27 mL metanol + 3 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), dos veces. Se lavó una vez con agua destilada por 5 minutos en agitación y posteriormente se lavó 2 veces con PBS 1X por 5 minutos en cada ocasión, en agitación. Se secó la laminilla con una gasa y se dibujó un círculo alrededor del tejido con un plumón hidrofóbico ImmEdge™ Pen Cat. No. H-4000 N (Vector Laboratories, Inc. 30 Ingold Road, Burlingame, CA 94010, USA, [www.vectorlabs.com](http://www.vectorlabs.com)).

Para evitar unión inespecífica que pueda resultar en tinción de fondo, se realizó el bloqueo con leche al 10% en PBS 1X y se colocaron las laminillas en una caja oscura, en agitación por 2 horas. Después se lavó 2 veces con PBS 1X por 5 min cada lavado, en agitación.

- **Incubación con anticuerpo primario**

Anticuerpo primario: Anticuerpo Anti-STAT3 (phospho S727) monoclonal de conejo [E121-31] para STAT3 (phospho S727), # ab32143 de Abcam, preservado a -20°C, pH: 7.20, Isotipo: IgG. Concentración sugerida por fabricante: 1:250.

Al finalizar paso anterior, se incubaron las laminillas con el anticuerpo primario Anti-STAT3 (phospho S727) en la región de control (C) con las diluciones enumeradas enseguida y se colocó control de isotipo en cada laminilla (CI) con IgG específico de conejo. Se incubaron a temperatura ambiente en agitación, durante toda la noche.

Durante la estandarización, se probaron las siguientes diluciones del anticuerpo en cada uno de los tres tejidos utilizados como controles:

- i. Cáncer de mama, diluciones 1:125, 1:250 y 1:500.
- ii. Hígado de rata (sano), diluciones 1:125, 1:250 y 1:500.
- iii. Astrocitoma humano, diluciones 1:125, 1:250 y 1:500.

- **Incubación con anticuerpo secundario**

Anticuerpo secundario: Horse Anti-Rabbit IgG (Polymer Reagent) de ImmPRESS® (Vector Laboratories, Inc. 30 Ingold Road, Burlingame, CA 94010, USA, [www.vectorlabs.com](http://www.vectorlabs.com)).

- **Detección y visualización**

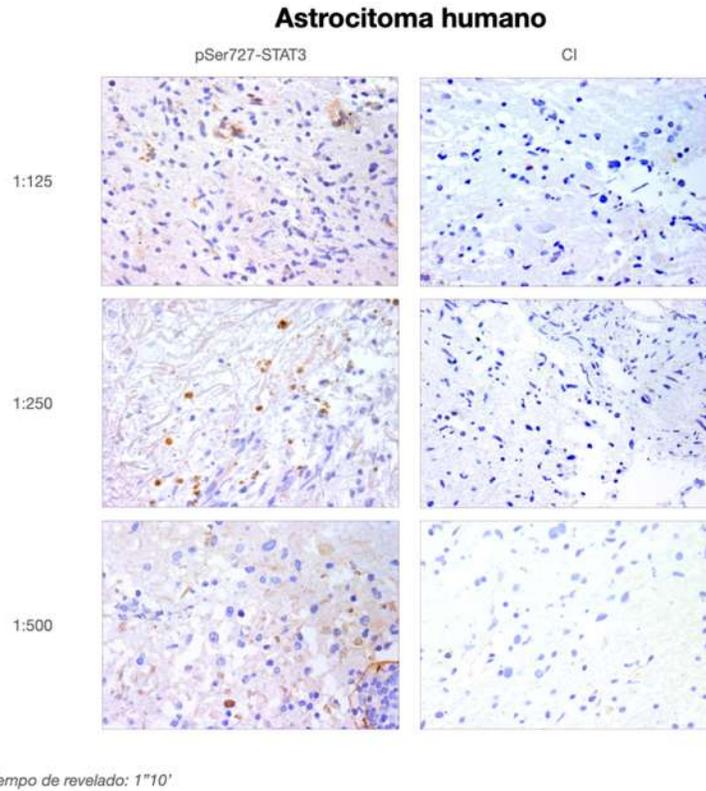
Cromógeno: 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) ImmPACT® DAB Substrate Kit, Peroxidase (Vector Laboratories, Inc. 30 Ingold Road, Burlingame, CA 94010, USA, [www.vectorlabs.com](http://www.vectorlabs.com)). Fue realizada con un tiempo de revelado de 1 minuto 10 segundos.

- **Contratinción**

Hematoxilina de Harris: HX87117653 #1.09253.2500 (Merck KGaA, Darmstadt 64271, Germany, [www.merck-chemicals.com](http://www.merck-chemicals.com)).

- **Resultados de la estandarización**

Se observa en tejido de astrocitoma humano tinción inespecífica con dilución 1:125 y tinción de fondo con dilución 1:500, se utilizó la dilución recomendada por el fabricante para posterior uso (1:250) (**Figura 2-5**).



**Figura 2-5. Estandarización de la técnica con controles positivos para la tinción.**

### 2.5.2. Evaluación de la tinción nuclear de pSer<sup>727</sup> y pTyr<sup>705</sup> de STAT3: patología digital

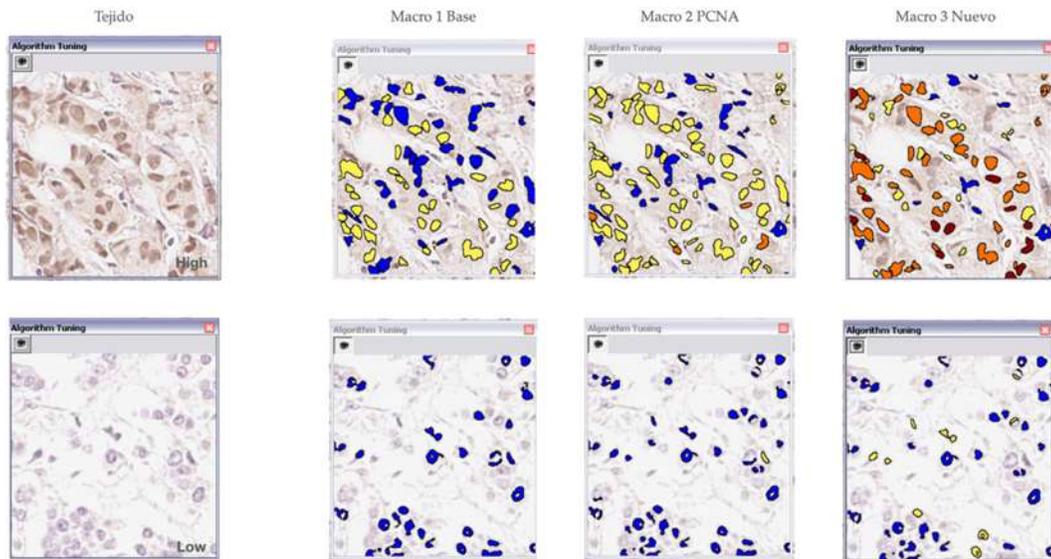
En la **Figura 2-6** se esquematiza el proceso de la obtención del análisis por patología digital, el cual contempla la obtención de datos a través del análisis digital de la imagen, posterior a la selección manual del tejido de interés, siendo así un estudio semicuantitativo.



**Figura 2-6. Secuenciación de la evaluación IHC por patología digital.** La captura de imágenes se realizó con el escáner *Aperio CS2* con posterior visualización en software *Aperio ImageScope* (Aperio Technologies Inc., Vista, California) con los algoritmos *Positive Pixel Count v9* y *Nuclear v9 Image Analysis*.

Previo al análisis de la tinción nuclear, se realizó la selección del tejido tumoral de modo manual con puntero y amplificación de imagen a  $100\mu\text{m}$ , incluyendo aquellas áreas con tejido glandular, tubular y de tejido anaplásico, excluyendo al tejido adiposo y estroma en cada *spot* de tejido. Se realizaron microfotografías de muestras elegidas al azar para verificar que las muestras utilizadas para el análisis fueran representativas de la sección completa. Posteriormente, se realizó la estandarización de “macros” para el análisis de la expresión nuclear con el algoritmo integrado de *Nuclear v9* (**Figura 2-7**).

Estandarización de macros para el análisis de tinción Nuclear de pSer727-STAT3



**Figura 2-7. Estandarización de algoritmo Macro 3 Nuevo para el análisis de la tinción nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3.** De acuerdo a los grados de intensidad de la tinción nuclear se clasifican como: tinción nuclear débil (1+) en color amarillo, tinción moderada (2+) en color naranja, y tinción intensa (3+) en color rojo; aquellos núcleos sin tinción son representados con 0 y la codificación por color es azul.

Los parámetros utilizados en el equipo para la captación de imagen se enlistan en la **Tabla 2-4**.

**Tabla 2-4. Parámetros utilizados en algoritmo *Nuclear v9* de Aperio para la captación de imagen.**

View Width: 1000	Min Roundness: 0.01
View Height: 1000	Min Compactness: 0
Overlap Size: 100	Min Elongation: 0.4
Image Zoom: 1	Clear Area Intensity: 240
Classifier: None	Nuclear Stain (Red): 0.94
Classifier Neighborhood: 0	Nuclear Stain (Green): 0.85
Averaging Radius ( $\mu\text{m}$ ): 1	Nuclear Stain (Blue): 0.24
Curvature Threshold: 2.5	Positive Stain (Red): 0.42
Segmentation Type: Cytoplasmic Rejection	Positive Stain (Green): 0.5
Threshold Type: Edge Threshold Method	Positive Stain (Blue): 0.83
Edge Trimming: Weighted	Cytoplasmic Intensity Threshold: 230
Lower Threshold: 0	Weak (1+) Threshold: 220
Upper Threshold: 230	Moderate (2+) Threshold: 210
Min Nuclear Size ( $\mu\text{m}^2$ ): 10	Strong (3+) Threshold: 195
Max Nuclear Size ( $\mu\text{m}^2$ ): 1000	

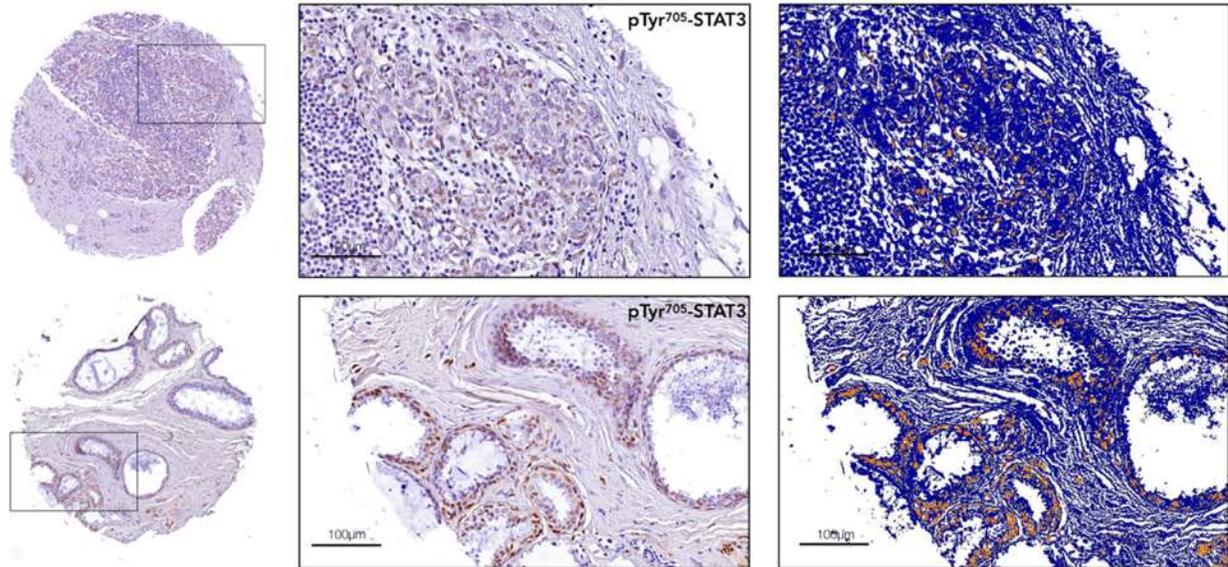
Para la designación de los puntos de corte de pSer<sup>727</sup>-STAT3 se tomaron los valores de los núcleos con tinción fuerte (3+), moderada (2+), débil (1+) y total de núcleos teñidos el obteniéndose así el porcentaje de tinción. El porcentaje de inmunoreactividad fue obtenido por grados de tinción de modo semicuantitativo: grado 1,  $\leq 25\%$  de núcleos positivos; grado 2, 26-50%; grado 3, 51-75%; y grado 4,  $\geq 76\%$ . Para determinar el grado de tinción de pSer<sup>727</sup>-STAT3 se clasificaron los casos como baja expresión (grados 1/2) o alta expresión (grados 3/4) antes de la evaluación estadística.

El método previamente descrito para la evaluación de la tinción ha sido empleado en estudios realizados igualmente en IHQ para la valoración de la expresión de este residuo en otros tipos de cáncer [33,87].

*Evaluación de la tinción total de pSer<sup>727</sup> y pTyr<sup>705</sup> de STAT3 por patología digital.*

La exploración adicional de la tinción total fue de únicamente de carácter informativo. Para la cuantificación de la tinción total (tejido tumoral y peritumoral) de los residuos de STAT3 se seleccionaron manualmente con puntero y amplificación de imagen a 100 $\mu\text{m}$  aquellas áreas con tejido glandular, tubular y de tejido anaplásico, excluyendo al tejido adiposo. Durante la estandarización en este apartado se presentaron los siguientes inconvenientes: los bordes de los *spots* de tejido presentaban mayor tinción secundario a la manipulación en el procesamiento de los TMA's, por lo que, al seleccionar el área de análisis se evitó la selección de los bordes. La composición del tejido fue heterogénea: secciones de tejido con abundante tejido adiposo fueron evitadas, dejando

únicamente secciones de tejido anaplásico y estromal para el análisis de la expresión total de la proteína. Se realizaron microfotografías de muestras elegidas al azar para verificar que las muestras utilizadas para el análisis fueran representativas de la sección completa (Figura. 2-8).



**Figura 2-8. Ejemplo de la visualización de campo de la positividad de la expresión total para pTyr<sup>705</sup>-STAT3 en tejido de cáncer de mama.** Selección del tejido neoplásico de interés (izquierda) en dos puntos aleatorios con la expresión de la proteína en marrón (imagen ampliada, escala de 100µm). En el extremo derecho, se ha aplicado el algoritmo del software *Aperio Image Scope* y muestra los diferentes niveles de intensidad de píxeles, donde el azul representa píxeles negativos; píxeles positivos naranjas de intensidad moderada; y tinción positiva de color rojo intenso.

Para el análisis de la expresión total se utilizó el algoritmo de *Positive Pixel Count v9* versión 9.1, utilizando para el presente estudio el Macro 2 Bajo (Figura 2-9)

Estandarización de macros para el análisis de tinción Total de pSer727-STAT3



Figura 2-9. Estandarización de algoritmo Macro 2 Bajo para el análisis de la tinción total de pSer<sup>727</sup>-STAT3.

Los parámetros utilizados en el equipo para la captación de imagen se enlistan en la **Tabla 2-5**, utilizados previamente en la evaluación inmunohistoquímica de marcadores en cáncer de mama [90,91].

**Tabla 2-5. Parámetros utilizados en algoritmo Positive Pixel Count v9 de Aperio para la captación de imagen.**

View Width: 1000	Hue Width: 0.5
View Height: 1000	Color Saturation Threshold: 0.5
Overlap Size: 0	Iwp (High) <sup>1</sup> : 220
Image Zoom: 1	Iwp (Low) <sup>2</sup> = Ip (High) <sup>3</sup> : 175
Classifier: None	Ip (Low) <sup>4</sup> = Isp (High) <sup>5</sup> : 100
Class List: None	Isp (Low) <sup>6</sup> : 0
Classifier Neighborhood: 0	Inp (High) <sup>7</sup> : -1
Hue Value: 0.1	

<sup>1</sup>Intensity Threshold WEAK (Upper Limit); <sup>2</sup>Intensity Threshold WEAK (Lower Limit); <sup>3</sup>Intensity Threshold MEDIUM (Upper Limit); <sup>4</sup>Intensity Threshold MEDIUM (Lower Limit); <sup>5</sup>Intensity Threshold STRONG (Upper Limit); <sup>6</sup>Intensity Threshold STRONG (Lower Limit); <sup>7</sup>Intensity Threshold Negative Pixels.

La tinción total fue tomada como un análisis adicional, con el fin de ponderar los resultados obtenidos con el método anterior (porcentaje de células). Se realizó el cálculo de la puntuación de H-Score (WHS) con la siguiente fórmula: H-score= (Nwp/Ntotal) (100) + (Np/NTotal) (200) + (Nsp/NTotal) (300), en donde Nwp= N de pixeles positivos débiles, Np= N de pixeles positivos moderados, Nsp= N de pixeles positivos fuertes,

N<sub>Total</sub>= Total de pixeles negativos + positivos, donde los resultados se categorizaron de acuerdo a la media de WHS, este método ha sido utilizado anteriormente en cáncer de mama y STAT3 [92]. Los resultados se promediaron y se obtuvieron valores de distribución central para únicamente como modelo de comparación en caso de significancia estadística.

## 2.6. Análisis estadístico

Previo al análisis estadístico, los resultados fueron introducidos en una hoja de cálculo *Microsoft Excel* como base de datos con cada variable de estudio codificada en caracteres numéricos (variables cuantitativas y semicuantitativas). Posteriormente se realizaron estudios estadísticos de tipo bivalente (univalente) y multivalente (multivariable) así como su graficación por medio del *GraphPad software Prism 9 versión 9.1.1* para macOS.

- Análisis descriptivo. Para distribución de frecuencias, media y desviación estándar de los factores estudiados.
- Análisis bivalente. Se utilizaron técnicas estadísticas paramétricas y no paramétricas en función de cada comparación y el tamaño de las muestras: Prueba  $\chi^2$  de Pearson y Test de la *t*-Student.
- Análisis multivalente. Para este análisis se hizo uso de estudio de regresión logística, análisis de supervivencia de Kaplan-Meier con la prueba Mantel-Cox LogRank, análisis de regresión de Cox y regresión lineal múltiple.

Se consideró un nivel "p" de significatividad del 5% ( $\alpha = 0.05$ ), de manera que valores con  $p < 0.05$  indicaron una relación estadísticamente significativa.

## 2.7. Consideraciones éticas

Las pautas éticas internacionales para la investigación relacionada con la salud en seres humanos, el código de Núremberg y la declaración de Helsinki, con el principio básico es el respeto por el individuo, donde el bienestar del sujeto siempre debe estar por encima de los intereses de la ciencia y de la sociedad.

La presente investigación contempla el uso de bases de datos, expedientes clínicos y microarreglos de tejidos obtenidos por biopsia sin requerir la intervención de individuos en el estudio, por lo que se considera de riesgo mínimo según lo estipulado en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, artículo 23. Asimismo, el proyecto ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo para la realización de este proyecto e instituciones de salud involucradas (**Anexo 2**).

## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS

#### 3.1. Características clínico-patológicas de la población de estudio

Se detectaron 309 casos con diagnóstico de cáncer de mama de pacientes afiliadas al Centro Estatal de Atención Oncológica de Michoacán (CEAOM) y al Hospital General Regional No. 1 (HGR1) del IMSS en el período de enero de 2015 a diciembre de 2017 que cumplieron con los criterios de inclusión, excluyéndose seis casos con diagnóstico de cáncer de mama recidivante, dos con diagnóstico previo de cáncer en sitio distinto al mamario y seis sin resultados en el estudio inmunohistoquímico, resultando así en 292 casos.

##### 3.1.1. Características clínicas

Las características clínicas de las dos cohortes de estudio se resumen en la **Tabla 3-1**.

**Tabla 3-1. Características clínicas de las cohortes.** Tabla que ilustra la composición de las variables clínicas de las dos cohortes para el presente estudio.

Variable	Cohorte HGR1 n/%	Cohorte CEOM n/%	Valor de p
Número de pacientes	154/52.7	138/47.3	
Promedio de seguimiento*	64 meses	65 meses	
<b>Eventos</b>			<b>0.0219</b>
Defunción	12/7.8	14/10.1	
Recurrencia	23/14.9	45/32.6	
Alta por mejoría	17/11.0	8/5.8	
Abandono	24/15.6	22/15.9	
<b>Edad</b>			<b>0.0019</b>
<40	12/7.8	28/20.3	
>41	142/92.2	110/79.7	
<b>IMC<sup>1</sup></b>			0.1954
Peso bajo	1/0.6	2/1.4	
Peso adecuado	40/25.9	20/14.5	
Sobrepeso	53/34.4	52/37.7	
Obesidad I-III	60/38.9	47/34.1	
Faltantes	0/0	17/10.1	

<b>Edad de menarca</b>	Temprana	1/0.6	1/0.7	0.7421
	Adecuada	42/27.3	82/59.4	
	Tardía	20/13.0	40/29.0	
	Faltantes	91/59.1	5/3.6	
<b>Edad de menopausia</b>	Temprana	9/5.8	9/6.5	0.7643
	Adecuada	36/23.4	50/36.2	
	Tardía	4/2.6	4/2.9	
	Faltantes	60/39.0	7/5.1	
<b>Estado ovárico</b>	Premenopausia	45/29.2	68/49.3	<b>0.0029</b>
	Postmenopausia fisiológica	96/62.3	67/48.6	
	Postmenopausia quirúrgica	8/5.2	3/2.2	
	Faltantes	5/3.2	0/0	
<b>Edad de 1ª gestación</b>	Temprana	7/4.5	43/31.2	0.1406
	Adecuada	18/11.7	56/40.6	
	Tardía	3/1.9	4/2.9	
	Faltantes	116/75.3	1/0.7	
<b>Paridad</b>	Nuligesta	10/6.5	34/24.6	0.0656
	1-2	24/15.6	28/20.3	
	3-4	30/19.5	47/34.1	
	>5	25/16.2	29/21.0	
	Faltantes	65/42.2	0/0	
<b>Lactancia materna &gt;6 meses</b>	Sí	32/20.8	81/58.7	<b>&lt;0.0001</b>
	No	47/30.5	23/16.7	
	Faltantes	65/42.2	0/0	
<b>Índice estrogénico</b>	Bajo	11/7.1	35/25.4	0.5329
	Medio	31/20.1	63/45.7	
	Alto	15/9.7	32/23.2	
	Faltantes	97/63.0	8/5.8	

<sup>1</sup>Promedio de seguimiento en sobrevivientes <sup>2</sup>Desviación estándar; <sup>3</sup>Índice de masa corporal.

## A. Edad

La edad de aquellas mujeres afiliadas a CEOM fue significativamente menor que las adscritas al IMSS (Tabla 3-2).

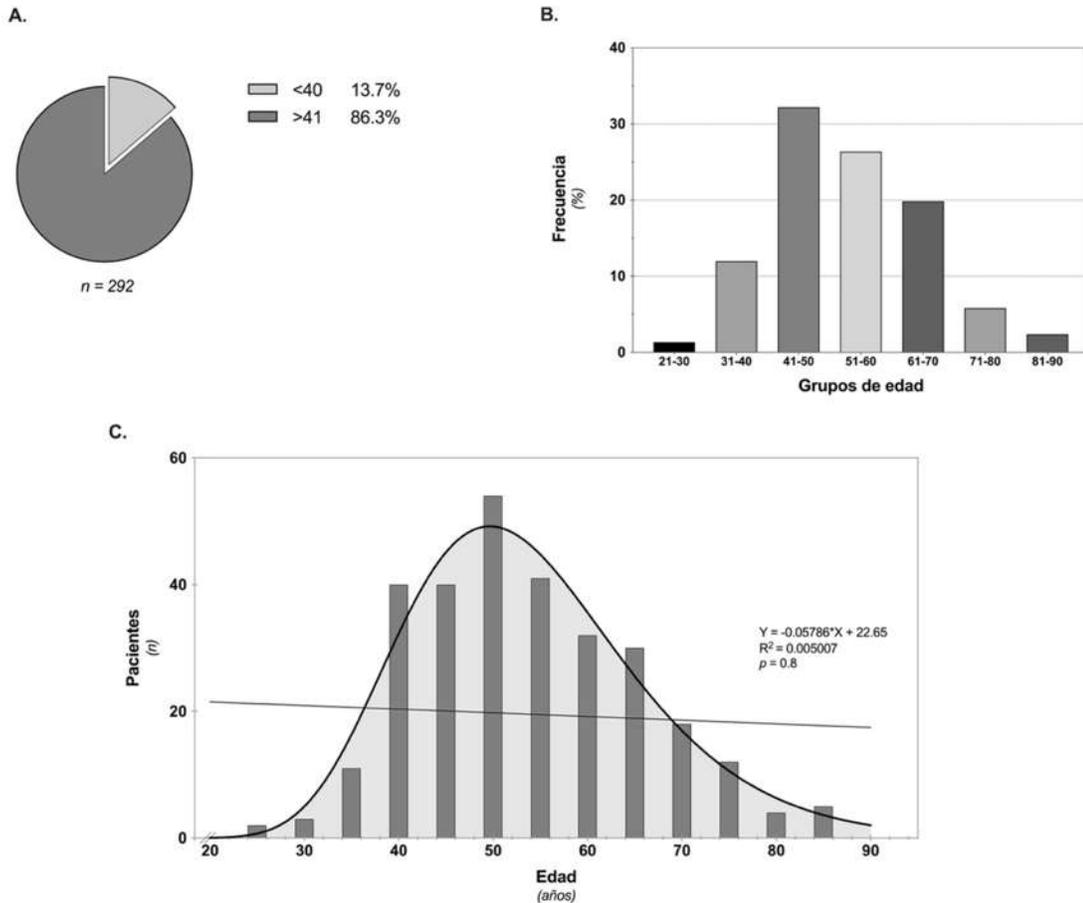
**Tabla 3-2. Edad de diagnóstico de las cohortes.** Se observó una edad media de diagnóstico menor en aquellas mujeres afiliadas al CEOM respecto a las derechohabientes de HGR1.

Variable	Cohorte HGR1	Cohorte CEOM	Valor de P*
	n/%	n/%	
<b>Edad (años)</b>	154/100 (55.5 ±11.4)	138/100 (51.4 ±12.1)	<b>0.0036</b>

\*Prueba T no pareada. Fuente: Formato de recolección de datos (Anexo 1). Edad verificada con CURP.

La media de edad de las pacientes al momento del diagnóstico fue de 53.5 ±11.9 años (rangos: 24–86 años). La mayor cantidad de casos fue observada en mujeres mayores de 41 años con predominio en el grupo etario de los 41–50 años. Se observó una tendencia

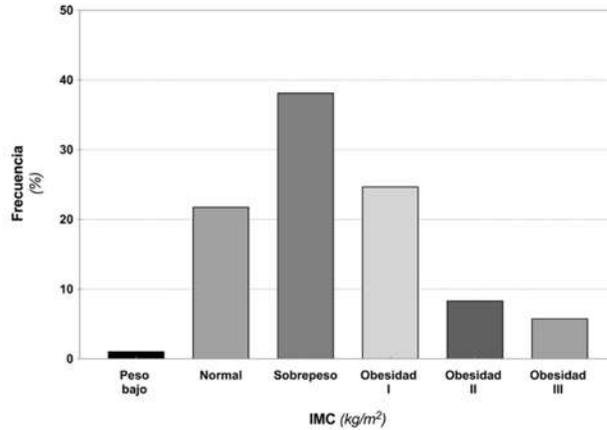
a la baja respecto a la edad de diagnóstico, sin embargo, esta no resultó significativa (Figura 3-1).



**Figura 3-1. Distribución por grupos de edad.** A. Agrupación de casos por edad <40 y >41 años. La edad promedio en las mujeres <40 fue de 36.5 años, mientras que las >41 fue de 56.2 años. B. Grupos de edad con intervalo de 10 años. El grupo de edad con mayor cantidad de casos fue el de 41-50 años con 32.19% (94 casos). C. Edad de diagnóstico, se observa tendencia a la baja respecto a la edad en la que se realizó el diagnóstico, sin embargo, no resultó significativa. Fuente: Formato de recolección de datos de pacientes con cáncer de mama (Anexo 1). Edad verificada con CURP.

### B. Índice de masa corporal (IMC)

Para el cálculo del IMC se valoró peso (promedio de las cohortes:  $69.9 \pm 13.3$  kg) y talla (promedio:  $1.55 \pm 0.06$  m), resultando así en una media de  $29.1 \pm 5.6$  Kg/m<sup>2</sup> de IMC con la siguiente distribución por categorías (Figura 3-2):



**Figura 3-2. Distribución de acuerdo con el IMC.** La mayor cantidad de los casos diagnosticados pertenecieron a mujeres con sobrepeso (38.2%) y obesidad grado I (24.7%). Sin embargo, las mujeres con IMC en categoría de obesidad I-III representaron el 38.9% de casos (107/275) con una media de 34.7 kg/m<sup>2</sup>. Sólo el 21.8% de la población presentó peso adecuado. *IMC: índice de masa corporal.*

No se observaron diferencias entre las cohortes al comparar los parámetros antropométricos (Tabla 3-3).

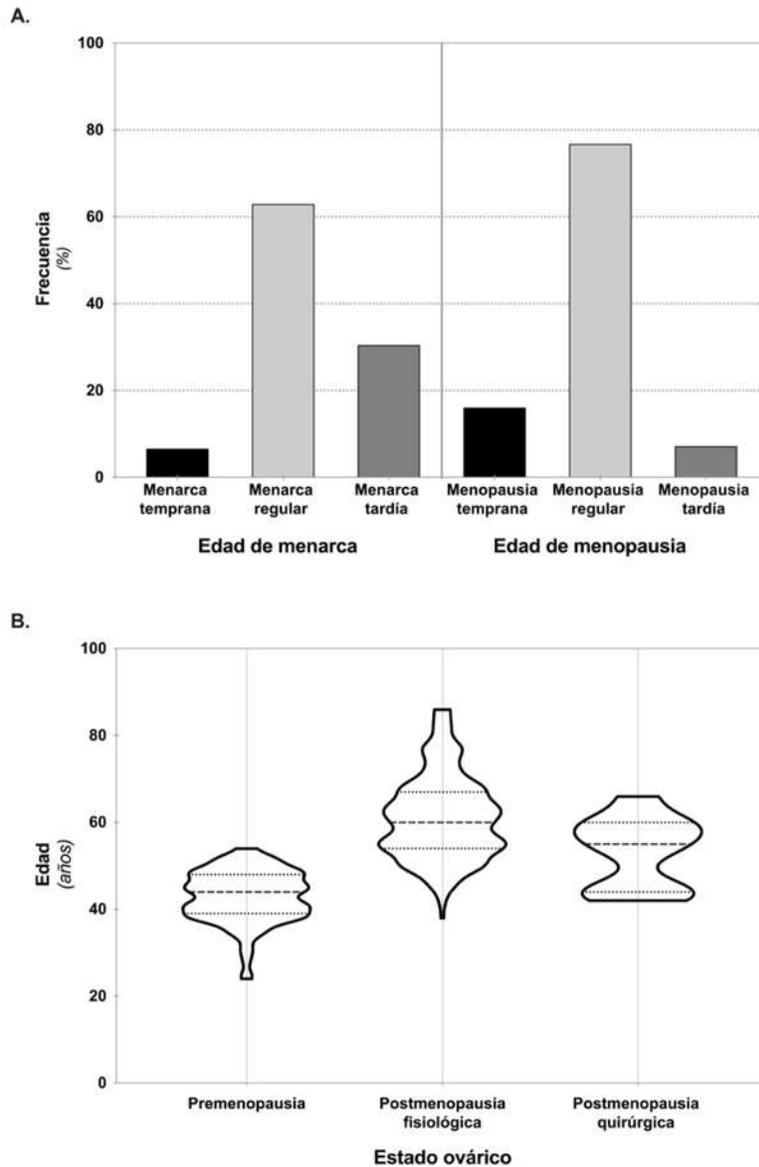
**Tabla 3-3. IMC, peso y talla de las cohortes.** Se observó un comportamiento similar en las dos cohortes de estudio, predominando en ambos grupos el sobrepeso.

Variable	Cohorte HGR1 n/%	Cohorte CEOM n/%	Valor de P*
<b>IMC<sup>1</sup> (media ±DE*)</b>	154/100 (29.2 ±5.8)	121/87.7 (29.2 ±5.4)	0.95
Peso (kg)	154/100 (70.2 ±13.7)	123/89.1 (69.6 ±12.9)	0.74
Talla (m)	154/100 (1.55 ±0.06)	121/87.7 (1.54 ±0.06)	0.24
Faltantes	0/0	17/10.1	

\*Prueba T no pareada; <sup>1</sup>Índice de masa corporal.

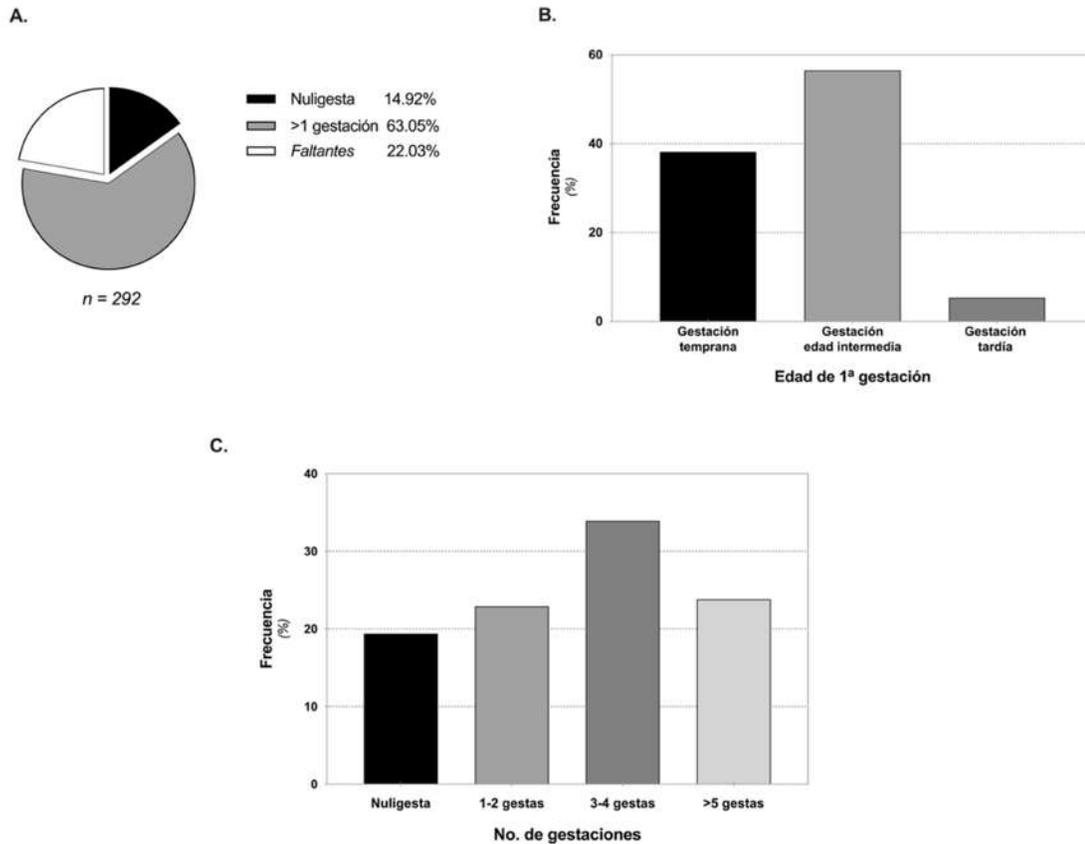
### C. Antecedentes gineco-obstétricos

La edad de menarca fue de 12.8 ±1.6 años (rango: 8-18 años), mientras que la edad de menopausia fue de 47.2 ±5.8 años, ambas con mayor frecuencia de casos en rangos de edad adecuados; al momento de diagnóstico 38.7% (113/292) de las mujeres aún menstruaban mientras que el 55.8% fueron postmenopáusicas, en ambos grupos la edad de presentación fue adecuada (Figura 3-3).



**Figura 3-3. Edad de presentación de menarca y menopausia.** **A.** La mayor cantidad de los casos diagnosticados presentaron menarca y menopausia en edad adecuada, **B.** Hubo 11 casos (3.8%) con postmenopausia quirúrgica por lo que no fueron consideradas en análisis posteriores.

Se identificaron a 183 mujeres con historial de 1 o más gestaciones, con media de edad de la primera gestación a los  $22.11 \pm 5.6$  años (rango: 14-40 años) y un promedio de  $4 \pm 2$  gestaciones por mujer (**Figura 3-4**).



**Figura 3-4. Gestaciones de término.** **A.** La mayoría de las mujeres en las cohortes refirieron más de una gestación de término, sólo 14.9% (44/292) refirieron ser nuligestas. **B. Edad de la primera gestación,** 56.5% refirieron haber presentado primera gestación en edad intermedia (20-34 años), seguido por edades tempranas (<19 años) con 38.2%. **C.** Número de gestaciones de término, la mayor incidencia fue entre mujeres que cursaron con 3-4 gestaciones de término (33.9%), seguido por aquellas con más de 5 gestas (23.8%).

De las mujeres con más de una gestación, el 61.7% refirieron haber ofrecido lactancia materna por al menos 6 meses con una media de  $10 \pm 5$  meses por hijo. La cantidad de años de exposición endógena a estrógenos fue valorada con el índice estrogénico (Métodos), resultando en una media de  $29.6 \pm 6.1$  años por mujer (rango: 8.8–42.5 años), las tres categorías identificadas fueron definidas de acuerdo con los percentiles 25% y 75% obteniendo así 3 grupos según los años de exposición: bajo grado 24.6% de la población de estudio (46/187), medio 50.3% (94/187) y alto grado 25.1% (47/187).

### 3.1.2. Características patológicas del tumor

La mama más afectada fue la izquierda con el 56.8% de casos (166/292), seguido por la mama derecha con 42.8% (125/292), hubo un caso de afectación en ambas mamas

por cáncer metacrónico. Asimismo, el cuadrante mayormente afectado fue el superior externo.

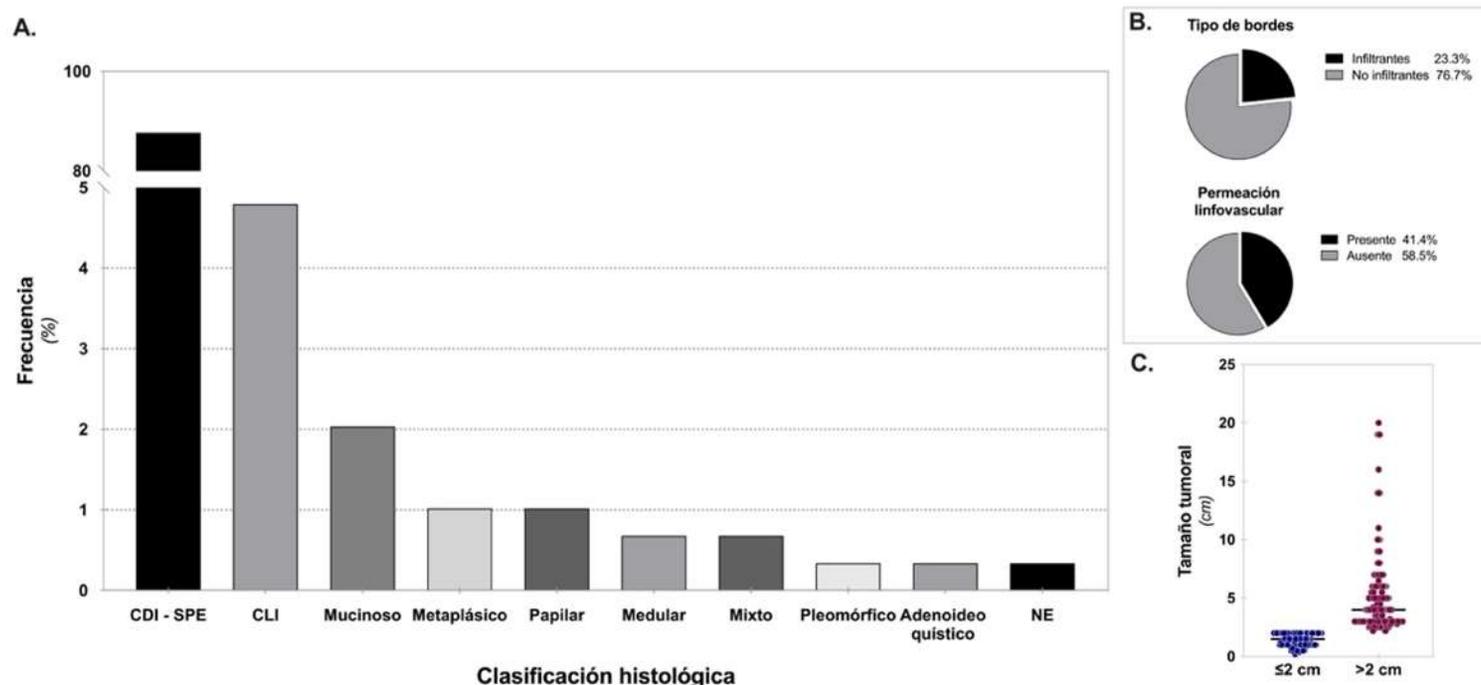
En la **Tabla 3-4** se resumen las características clínicas de las dos cohortes de estudio.

**Tabla 3-4. Características patológicas de las cohortes.** Tabla que ilustra la composición de las variables patológicas de las dos cohortes para el presente estudio.

Variable	Cohorte HGR1 n/%	Cohorte CEOM n/%
<b>Clasificación histológica</b>		
CDI – SPE <sup>1</sup>	135/46.2	121/41.4
CLI <sup>2</sup>	10/3.4	4/1.4
Otros subtipos histológicos	9/3.1	13/4.5
<b>Grado histológico</b>		
Bien diferenciado	23/7.9	39/13.4
Moderadamente diferenciado	89/30.5	67/22.9
Alto grado	41/14.0	30/10.3
Faltantes	1/0.3	2/0.7
<b>Tipo de bordes</b>		
Infiltrantes	59/20.2	9/3.1
No infiltrantes	95/32.5	129/44.2
<b>Permeación linfovascular</b>		
Presente	73/25.0	48/16.4
Ausente	81/27.7	90/30.8
<b>Tamaño tumoral</b>		
≤2 cm	68/23.3	56/19.2
>2 cm	86/29.5	82/28.1
<b>Tamaño tumoral TNM</b>		
pT1	65/22.3	53/18.2
pT2	58/19.9	40/13.7
pT3	12/4.1	14/4.8
pT4	19/6.5	31/10.6
<b>Nódulos TNM</b>		
pN0	47/16.1	31/10.6
pN1	42/14.4	20/6.8
pN2	18/6.2	15/5.1
pN3	8/2.7	5/1.7
Faltantes	39/13.4	67/22.9
<b>Metástasis TNM</b>		
M0	152/52.1	133/45.5
M1	2/0.7	5/1.7
<b>Estadio anatómico TNM</b>		
IA	26/8.9	12/4.1
IIA	34/11.6	22/7.5
IIB	18/6.2	9/3.1
IIIA	18/6.2	10/3.4
IIIB	10/3.4	11/3.8
IIIC	8/2.7	4/1.4
IV	2/0.7	5/1.7
Faltantes	38/13.0	65/22.3

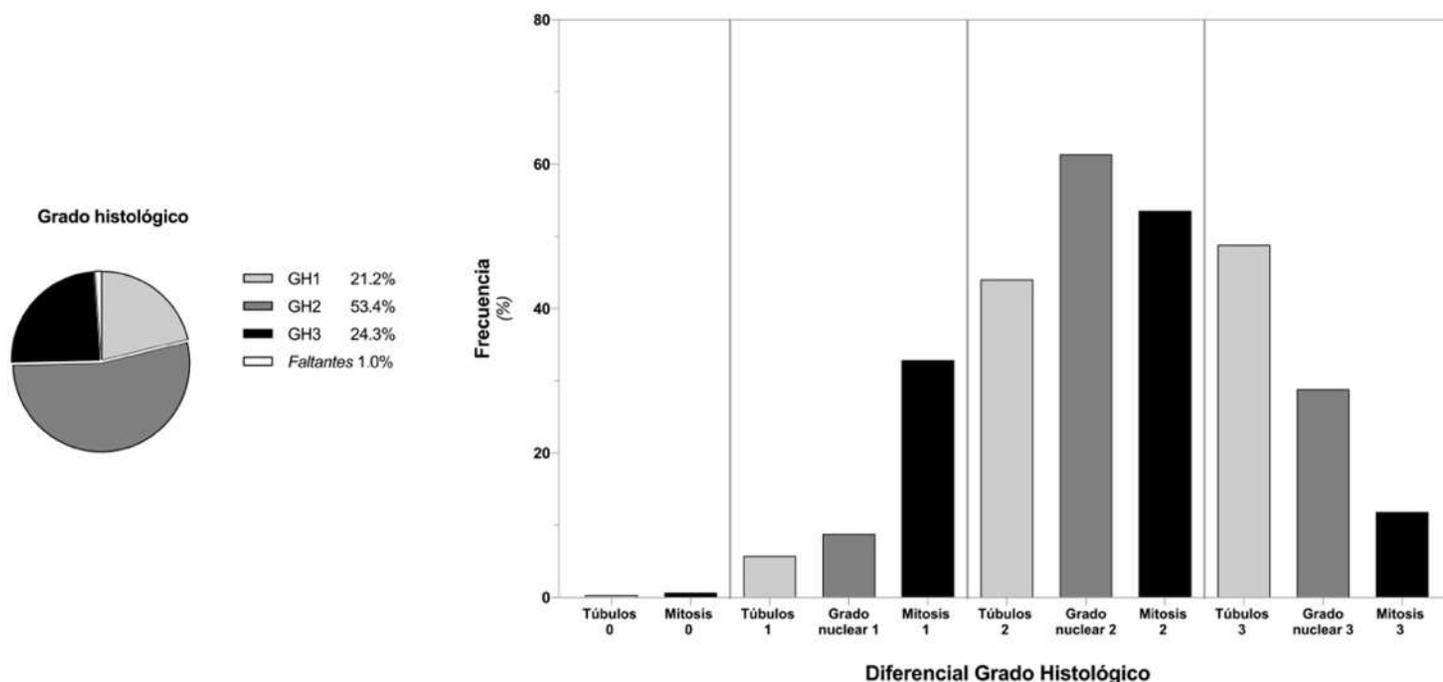
<sup>1</sup>Carcinoma ductal infiltrante - Sin patrón específico; <sup>2</sup>Carcinoma lobulillar infiltrante.

De los 292 casos, el 87.7% fue diagnosticado como carcinoma ductal infiltrante sin patrón específico (CDI-SPE), seguido por el carcinoma lobulillar infiltrante (CLI) con 4.8% de casos. Entre los hallazgos reportados en el estudio histopatológico, la mayoría de los casos resultó con bordes de tipo no infiltrantes y ausencia de permeación linfovascular (76.7% y 58.6% respectivamente) (**Figura 3-5**); sin embargo, más de la mitad de los casos (57.5%) presentó dimensión tumoral mayor de los 2 cm en su eje mayor.



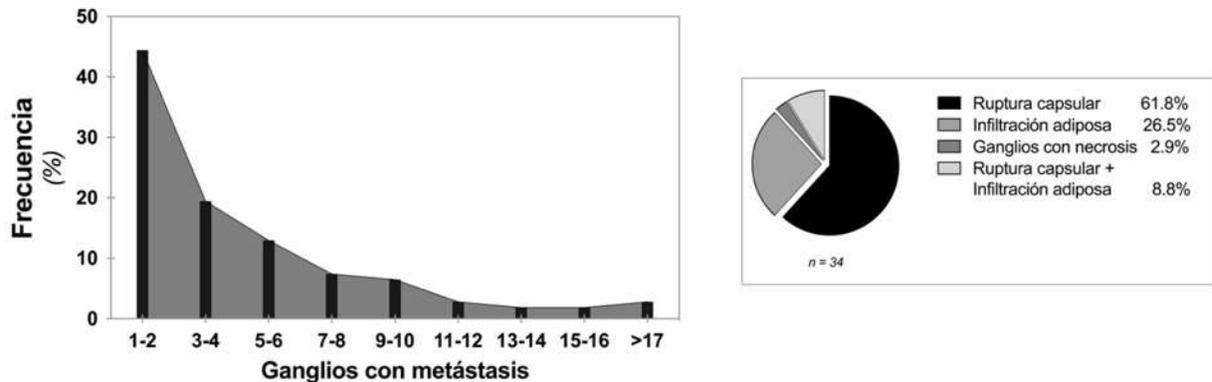
**Figura 3-5. Características del tumor.** A. Clasificación histológica, la mayoría de los casos fueron diagnosticados como CDI-SPE, seguido por CLI. B. Características adicionales del tumor, en su mayoría presentaron bordes no infiltrantes y ausencia de permeación linfovascular. C. Tamaño del tumor, en su mayoría fue mayor de 2 cm. *CDI-SPE: Carcinoma ductal infiltrante-Sin patrón específico; CLI: Carcinoma lobulillar infiltrante; NE: neuroendocrino.*

El grado histológico mayormente encontrado fue el moderadamente diferenciado (GH2) con más de la mitad de los casos, asimismo, en el diferencial para la obtención del puntaje final se observó en su mayoría tumores con grado nuclear moderadamente diferenciado (**Figura 3-6**).



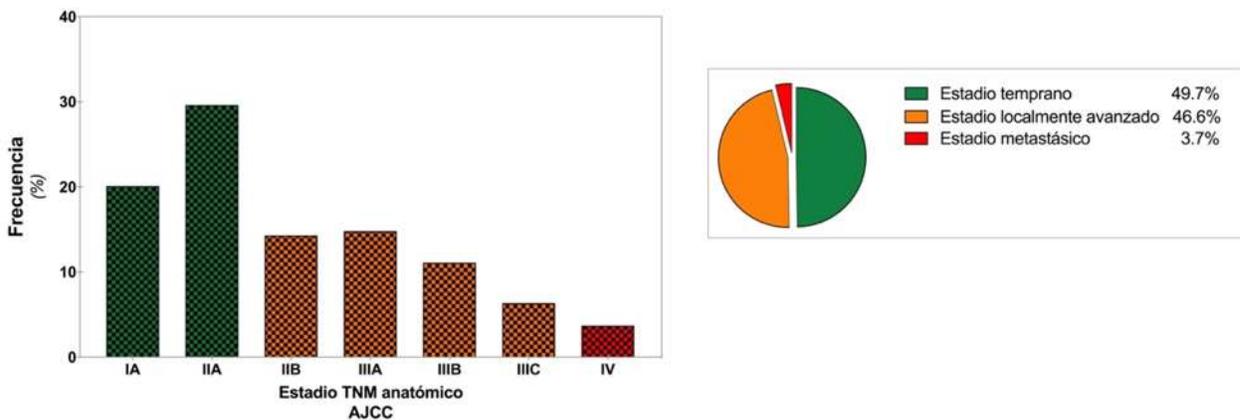
**Figura 3-6. Grado histológico.** Se observó mayor frecuencia de casos (156/292) con GH2 (moderadamente diferenciado), seguido por alto grado histológico (GH3) con 71 casos. A la derecha se muestra el diferencial de la clasificación, en su mayoría siendo grado 3 de diferenciación de túbulos (48.8%), grado nuclear 2 (61.4%) y mitosis 2 (53.6%). *GH: Grado histológico.*

Se realizó disección ganglionar a 186 mujeres (63.7%), de las cuales 108 (58.1%) presentó afectación ganglionar con un promedio de  $4.6 \pm 4$  ganglios con infiltración neoplásica, mientras que el 77.4% de los casos (144/186) presentó hiperplasia ganglionar. De los casos con metástasis a ganglios, el 24.1% (26/108) presentó entidades asociadas como ruptura capsular, infiltración adiposa y ganglios con necrosis (Figura 3-7).



**Figura 3-7. Ganglios con metástasis.** De las mujeres que recibieron disección ganglionar y que presentaron ganglios positivos a metástasis, el 44.4% (48/108) tuvo de 1-2 ganglios afectados, seguido por 3-4 con el 19.4% (21/108). De las entidades asociadas a ganglios, en la mayoría se identificó ruptura capsular, seguido por infiltración adiposa.

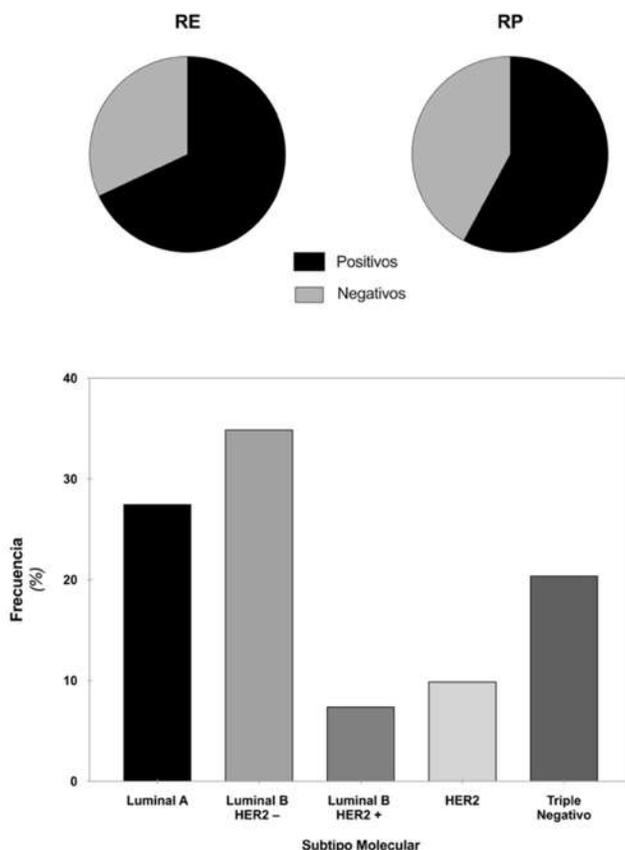
El estadio anatómico fue evaluado de acuerdo con los lineamientos de la AJCC 8<sup>a</sup> edición, tomando en cuenta los hallazgos histopatológicos de T (tumor), N (nódulos) y M (metástasis), con la siguiente distribución (Figura 3-8):



**Figura 3-8. Estadío TNM anatómico.** Al momento del diagnóstico, la mayoría de los casos fueron estadificados como IIA (29.6%), seguido por IA (20.1%), al agrupar los estadios se identificó una mayor incidencia en estos dos últimos estadios (estadios tempranos, en verde), seguido por los estadios localmente avanzados (en naranja).

### 3.1.3. Características moleculares del tumor

Más de la mitad de los casos presentaron receptores estrogénicos (RE) y de progesterona (RP) positivos (67.8% y 57.9%, respectivamente). El subtipo molecular más frecuente fue el Luminal B HER2- con 34.9% de casos, seguido por el Luminal A (27.5%) y Triple Negativo (TN) con 20.4% de casos (**Figura 3-9**).



**Figura 3-9. Subtipo molecular y estatus de receptores hormonales.** Al momento del diagnóstico, la mayoría de los casos fueron positivos a receptores hormonales. El subtipo histológico más frecuente en las cohortes fue el Luminal B HER2 negativo con. *RE: receptores estrogénicos; RP: receptores de progesterona.*

Las características moleculares entre las dos cohortes se enlistan en la **Tabla 3-5**.

**Tabla 3-5. Características moleculares del tumor en las cohortes.** Tabla que ilustra la composición de las variables moleculares de las dos cohortes para el presente estudio.

Variable	Total de casos n/%	Cohorte HGR1 n/%	Cohorte CEOM n/%
<b>Receptores hormonales</b>			
Positivos (RE <sup>1+</sup> /RP <sup>2+</sup> )	161/65.2	96/38.9	65/26.3
Negativos (RE-/RP-)	86/34.8	31/12.6	55/22.3
<b>Receptor de estrógenos</b>			
Positivo (RE+)	198/67.8	120/41.1	78/26.7

	Negativo (RE-)	94/32.2	34/11.6	60/20.5
<b>Receptor de progesterona</b>	Positivo (RP+)	169/57.9	99/33.9	70/24.0
	Negativo (RP-)	123/42.1	55/18.8	68/23.3
<b>HER2</b>	Positivo (HER2 +)	49/17.0	22/7.6	27/9.3
	Negativo (HER2 -)	240/83.0	130/45.0	110/38.1
	<i>Faltantes</i>	3	2	1
<b>Ki-67</b>	Positivo (Ki-67 +, >20%)	200/72.5	102/37.0	98/35.5
	Negativo (Ki-67 -, o <20%)	76/27.5	46/16.7	30/10.9
	<i>Faltantes</i>	16	6	10
<b>p53</b>	Positivo (p53 +)	60/43.5	59/42.8	1/0.7
	Negativo (p53 -)	78/56.5	78/56.5	0/0
	<i>Faltantes</i>	154	17	137
<b>Subtipo molecular</b>	Luminal A	78/27.5	41/14.4	37/13.0
	Luminal B HER2 negativo	99/34.9	65/22.9	34/12.0
	Luminal B HER2 positivo	21/7.4	13/4.6	8/2.8
	HER2	28/9.9	10/3.5	18/6.3
	Triple negativo	58/20.4	21/7.4	37/13.0
	<i>Faltantes</i>	8	4	4

<sup>1</sup>Receptores estrogénicos; <sup>2</sup>Receptores de progesterona; Los datos faltantes no se consideraron para el cálculo de frecuencias.

### 3.1.4. Características generales del tratamiento

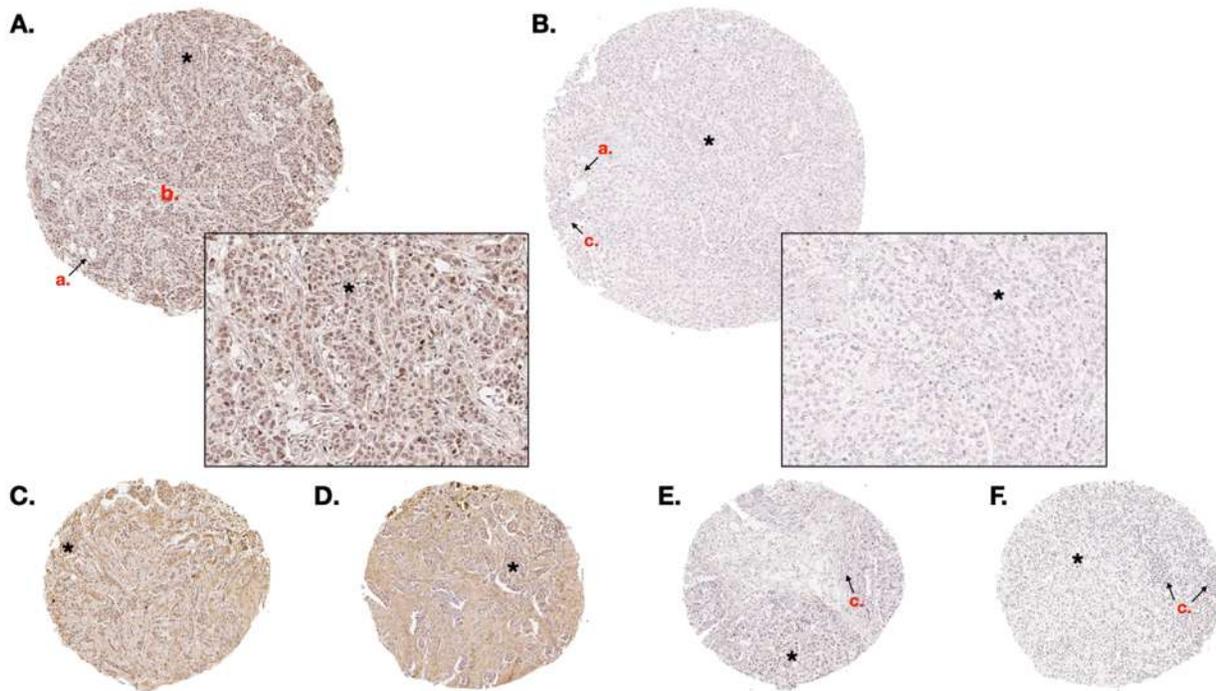
De las 292 pacientes, 90 recibieron terapia neoadyuvante. 277 recibieron algún tipo de tratamiento quirúrgico, de estas, 186 (63.7%) recibieron tratamiento quirúrgico con disección axilar. Cabe destacar que, de las 15 pacientes sin tratamiento quirúrgico, sólo una paciente no recibió ningún tipo de tratamiento (QT, RT, HT, TB) posterior a su diagnóstico. 197 recibieron hormonoterapia. 162 recibieron terapia adyuvante, de las cuales 127 fue radioterapia. Las características generales del tratamiento en las cohortes se enlistan en la **Tabla 3-6**.

**Tabla 3-6. Características generales de tratamiento en las cohortes.** Tabla que ilustra la composición de las variables del tratamiento recibido de las dos cohortes para el presente estudio.

Variable	Cohorte HGR1 n/%	Cohorte CEOM n/%
<b>Tratamiento quirúrgico</b>	Sí	150/51.4
	No	4/1.4
<b>Radioterapia</b>	Sí	110/37.7
	No	40/13.7
	<i>Faltantes</i>	4/1.4
<b>Quimioterapia</b>	Sí	132/45.2
	No	22/7.5

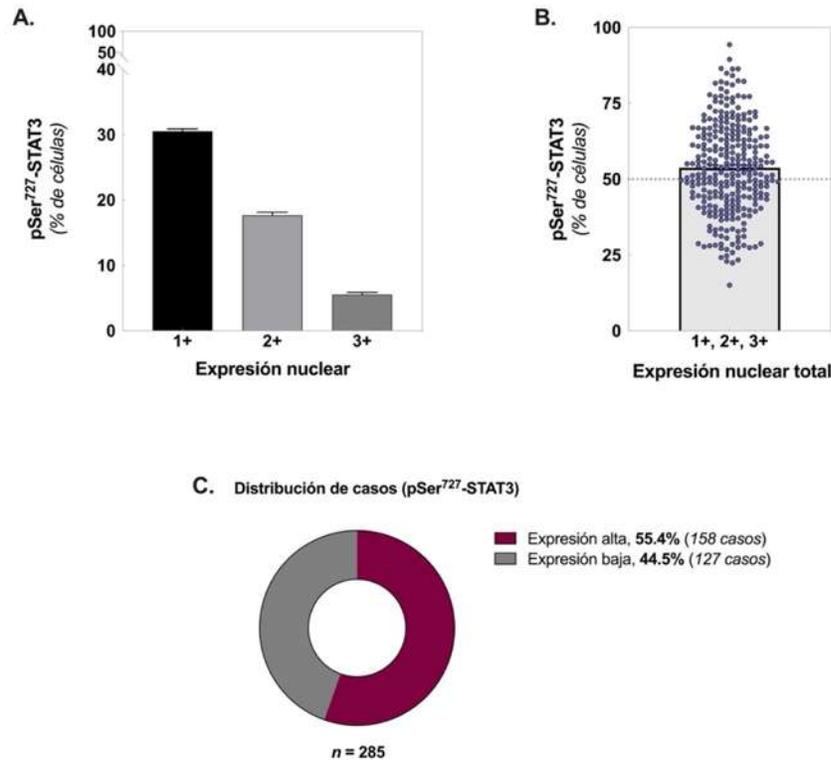
### 3.2. Evaluación de la tinción nuclear de pSer<sup>727</sup> en tejido tumoral de mama

De los 298 casos incluidos en los microarreglos de tejido (TMA), hubo pérdida del tejido en 2 casos y 4 contaron con artefactos (tinción inespecífica), resultando así en 292 casos para análisis. Se evaluó en primera instancia la expresión nuclear de ambas proteínas a nivel de núcleo. De los 292 casos incluidos en los TMA's hubo 7 casos con pérdida de tejido durante la inmunotinción, resultando en 285 casos para la evaluación de la tinción nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3; en el caso de pTyr<sup>705</sup>-STAT3 hubo pérdida de tejido durante la inmunotinción de 14 casos, resultando en 278 casos para el presente análisis (**Figura 3-9**).



**Figura 3-9. Ejemplos de tinción pSTAT3 (Ser727) en tejido de cáncer de mama de la cohorte de estudio.** A. Tinción predominantemente alta a un aumento de 10x con un recuadro a un aumento de 20x. B. Tinción predominantemente baja a un aumento de 10x con un recuadro a un aumento de 20x. C. y D. Ejemplos de tinción predominantemente alta en spot con distribución heterogénea de tejido tumoral (\*) y estromal. E. y F. Ejemplos de tinción predominantemente baja en spot con distribución heterogénea de tejido tumoral e infiltrado inflamatorio crónico. \*Tejido tumoral; a. Tejido adiposo; b. Estroma; c. Infiltrado inflamatorio.

De acuerdo con la distribución de casos con tinción leve (1+), moderada (2+) y fuerte (3+), se realizó el punto de corte de >50% de células (Métodos) (**Figura 3-10**).



**Figura 3-10.** Distribución de casos de acuerdo con expresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3.

La distribución de los casos de acuerdo con la tinción nuclear de ambos residuos se muestra en la **Tabla 3-7**; de los 285 disponibles para la evaluación de pSer<sup>727</sup>-STAT3, se encontró sobreexpresión en 55.4% de casos y 44.5% de baja expresión. Diferencias significativas fueron encontradas al evaluar ambos residuos ( $p = 0.0191$ ), subrayando mayor tendencia (65.1%) a la expresión de pTyr<sup>705</sup> en los tejidos.

**Tabla 3-7.** Distribución de la expresión nuclear de ambos residuos de STAT3.

Residuos de STAT3	<i>n</i>	Expresión nuclear en tejido tumoral de cáncer de mama			RR	95% IC	<i>p</i> <sup>1</sup>
		Alta, n/%	Baja, n/%				
pSer <sup>727</sup>	285	158/55.4	127/44.5	0.8515	0.7427 - 0.974	<b>0.0191</b>	
pTyr <sup>705</sup>	278	181/65.1	97/34.9	1.174	1.027 - 1.347		

<sup>1</sup>Valor de *p* con la prueba de Chi cuadrada; RR: riesgo relativo; IC 95%: intervalo de confianza del 95%.

Se investigaron los casos que compartieron los mismos patrones de expresión nuclear de los dos residuos de interés encontrando que, de los 273 disponibles para la

evaluación de la coexpresión, el binomio pSer<sup>727+</sup> / pTyr<sup>705+</sup> presentó mayor riesgo en los tejidos con 41.4% de casos ( $p < 0.0001$ ), con significativamente menor expresión en los casos pSer<sup>727+</sup> / pTyr<sup>705-</sup> con el 13.6% de casos ( $p < 0.0001$ ) (Tabla 3-8).

**Tabla 3-8. Distribución de casos de acuerdo con la coexpresión nuclear de ambos residuos de STAT3.**

	Expresión nuclear en tejido tumoral de cáncer de mama			
	n/%	RR	95%IC	p <sup>1</sup>
<b>Residuos de STAT3 (n = 273)</b>				<0.0001
pSer <sup>727+</sup> / pTyr <sup>705+</sup>	113/41.4	2.119	1.734 - 2.577	<0.0001
pSer <sup>727+</sup> / pTyr <sup>705-</sup>	37/13.6	0.4703	0.3408 - 0.6416	<0.0001
pSer <sup>727-</sup> / pTyr <sup>705+</sup>	65/23.8	0.9375	0.7327 - 1.188	0.5999
pSer <sup>727-</sup> / pTyr <sup>705-</sup>	58/21.2	0.8093	0.6242 - 1.039	0.0981

<sup>1</sup>Valor de p con la prueba de Chi cuadrada; RR: riesgo relativo; IC 95%: intervalo de confianza del 95%.

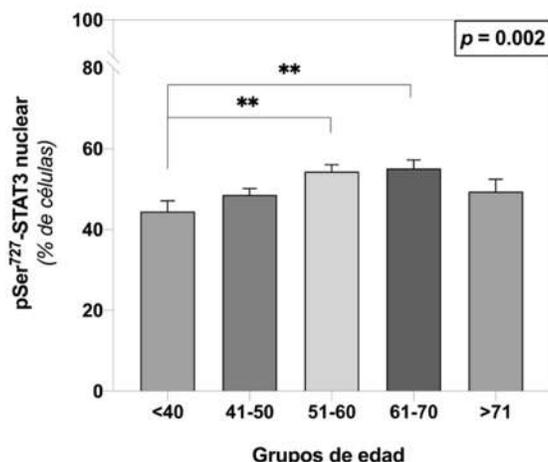
En cada caso se realizó una evaluación de riesgos individual, incluyendo variables clínicas y características propias del tumor.

### 3.2.1. Asociación de la expresión nuclear de los residuos pSer<sup>727</sup> y pTyr<sup>705</sup> de STAT3 con las características clínicas

La distribución de los casos según la expresión de los residuos pSer<sup>727</sup> y pTyr<sup>705</sup> de STAT3 se muestran en la **Tabla suplementaria S1**.

#### A. Edad

Los casos con sobreexpresión alta de pSer<sup>727</sup>-STAT3 reportaron una distribución de edad similar a la del resto de la población (media: 53.4 ±11.7 años). El porcentaje total de células teñidas fue mayor en los grupos de 51-60 años y 61-70 años (**Figura 3-11**); mientras que pTyr<sup>705</sup> (media: 53.5 ±11.9 años) presentó mayor prevalencia en edades de 41-50 años (21.9%), 51-60 años (18.3%) y >61 años (16.9%).



**Figura 3-11. Porcentaje de células con expresión pSer<sup>727</sup>-STAT3 por grupos de edad.** Mayor expresión de pSer<sup>727</sup>-STAT3 en mujeres de 51-60 ( $p = 0.0076$ ) y 61-70 años ( $p = 0.0069$ ). Resultado de  $p$  con prueba de Anova.

En seguida se procedió a determinar el riesgo de sobreexpresar el residuo de pSer<sup>727</sup>-STAT3 en cada grupo de edad respecto a la expresión nuclear de pTyr<sup>705</sup>-STAT3 presentando una tendencia a la sobreexpresión en los grupos de 31-40 años sin ser significativa; sin embargo, fue posible observar un riesgo incrementado de la sobreexpresión del residuo pTyr<sup>705</sup> en el grupo de edad de los 41-50 años ( $p = 0.0111$ ; RR 1.358; IC de 95% 1.073-1.741) al ser comparado con pSer<sup>727</sup>-STAT3 (Tabla 3-9).

**Tabla 3-9. Riesgo de sobreexpresar pSer<sup>727</sup>-STAT3 en los grupos de edad.** De los casos positivos a la expresión independiente de ambos residuos, se observó que el grupo de 41-50 años presentó protección a la expresión del residuo pSer<sup>727</sup>, no así a la de pTyr<sup>705</sup>.

Grupo de edad	Riesgo de expresión nuclear de pSer <sup>727</sup> -STAT3		
	RR	IC 95%	$p^1$
<30	0.6667	0.2077 - 1.490	0.2123
31-40	1.201	0.7907 - 1.852	0.3865
41-50	0.7361	0.5742 - 0.9324	<b>0.0111<sup>4</sup></b>
51-60	0.8148	0.6241 - 1.050	0.1137
>61	0.9304	0.7139 - 1.211	0.5875

<sup>1</sup>Valor de  $p$  con la prueba de Chi cuadrada; <sup>4</sup>Efecto protector; RR: riesgo relativo; IC 95%: intervalo de confianza del 95%.

Posteriormente, se determinó el riesgo entre los grupos de edad en relación con la coexpresión de ambas proteínas tomando como referencia la coexpresión de pSer<sup>727+</sup> / pTyr<sup>705+</sup> (Tabla 3-10), de esta manera fue posible determinar diferencias entre los 4 subgrupos ( $p = 0.0433$ , ANOVA tabla no mostrada) dependientes de la ausencia en la expresión nuclear de pSer<sup>727</sup> ( $p = 0.0383$ ). No hubo diferencias al comparar los grupos de

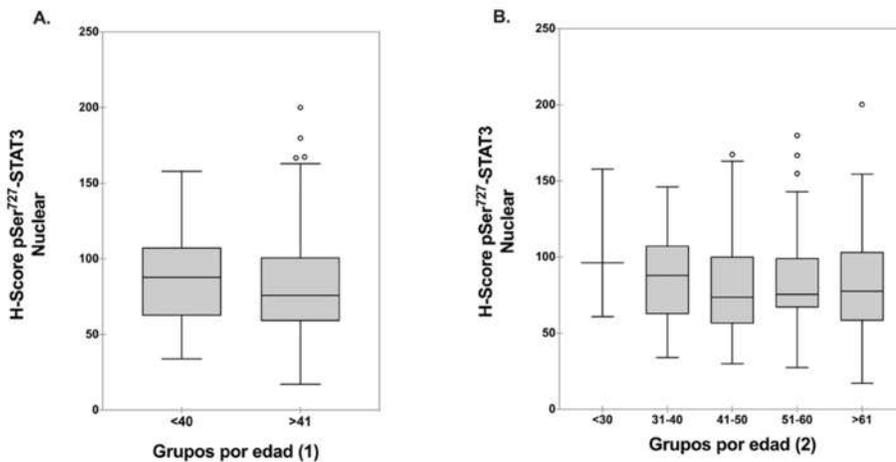
<40 años *vs* >41 años. De manera interesante, se encontró que el binomino pSer<sup>727+</sup> / pTyr<sup>705+</sup> presentó mayor riesgo de expresión en los grupos 41-50 años ( $p = 0.0435$ ).

**Tabla 3-10. Patrones de coexpresión de residuos de STAT3 en los grupos de edad.**

Variable	n/%	pSer <sup>727+</sup> / pTyr <sup>705+</sup>	pSer <sup>727+</sup> / pTyr <sup>705-</sup>	RR	95%IC	$p^1$
<b>Grupo de edad (1) (n = 273)</b>						
<30	3/1.1	2/66.7	0/0	1.333	0.4552 - 2.927	0.4153
31-40	34/12.5	13/38.2	8/23.5	0.7986	0.5229 - 1.049	0.1237
41-50	87/31.9	38/43.7	6/6.9	1.221	1.007 - 1.443	<b>0.0435</b>
51-60	73/26.7	31/42.5	9/12.3	1.040	0.8222 - 1.246	0.7105
>61	76/27.8	29/38.2	14/18.4	0.8591	0.6591 - 1.053	0.1552
<b>Grupo de edad (2) (n = 273)</b>						
<40	37/13.6	15/40.5	8/21.6	0.6139	0.2947 - 1.337	0.2213
>41	236/86.4	98/41.5	29/12.3	1.629	0.7482 - 3.393	

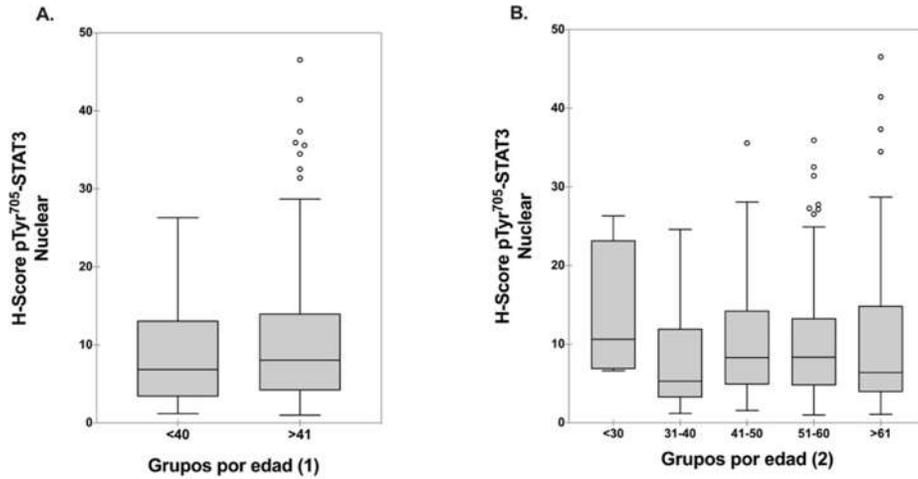
<sup>1</sup>Valor de p con la prueba de Chi cuadrada; RR: riesgo relativo; IC 95%: intervalo de confianza del 95%.

Se realizó exploración adicional en estos grupos con el cálculo de H-Score (WHS) para cada residuo (Métodos), sin encontrar diferencias significativas entre grupos (**Figura 3-12**).



**Figura 3-12. Diagrama BoxPlot de Tukey de la expresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3 en tejidos con cáncer de mama.** Diagramas que ilustran la expresión de pSer<sup>727</sup>-STAT3 nuclear del tejido tumoral en A. pacientes menores de 40 años y mayores de 41 años ( $p = 0.34$ , T test no pareado), y B. por grupos de edad con intervalo de 10 años ( $p = 0.57$ , ANOVA).

A pesar de no resultar estadísticamente significativo, visualmente se aprecia una tendencia de sobreexpresión de pSer<sup>727</sup>-STAT3 en aquellas mujeres edad menor a los 40 años, contrario a lo que sucede con pTyr<sup>705</sup>-STAT3 (**Figura 3-13**).

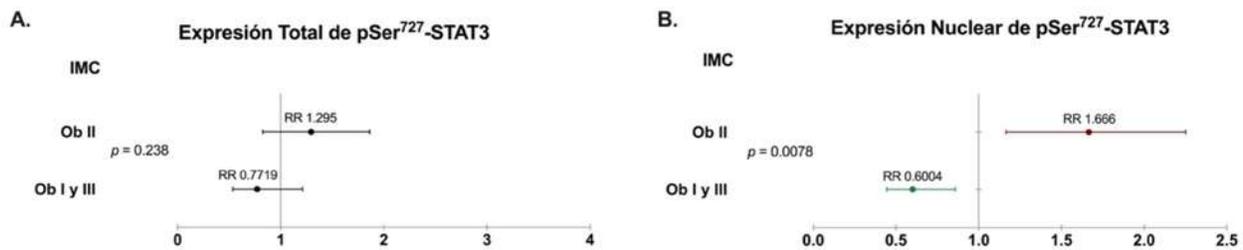


**Figura 3-13. Diagrama BoxPlot de Tukey de la expresión nuclear de pTyr<sup>705</sup>-STAT3 en tejidos con cáncer de mama.** Diagramas que ilustran la expresión de pTyr<sup>705</sup>-STAT3 nuclear del tejido tumoral en A. pacientes menores de 40 años y mayores de 41 años ( $p = 0.22$ , T test no pareado), y B. por grupos de edad con intervalo de 10 años ( $p = 0.43$ , ANOVA).

### B. Índice de masa corporal (IMC)

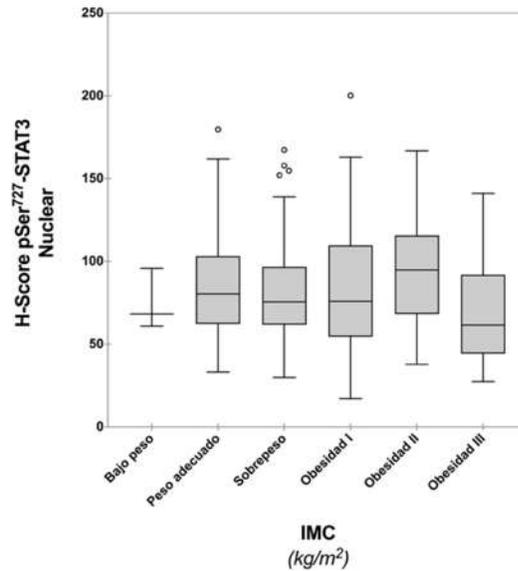
El residuo pSer<sup>727</sup>-STAT3 fue mayormente expresado en el grupo categorizado con sobrepeso (20.1%), seguido por obesidad grado I (12.7%), mismo patrón de expresión se encontró con pTyr<sup>705</sup> (26.1% y 18%, respectivamente).

Al asociar la expresión con IMC, se observó que el grupo con obesidad grado II exhibió un riesgo aumentado para sobreexpresar pSer<sup>727</sup>-STAT3 respecto al resto de la cohorte ( $p = 0.0201$ ), sobretodo al comparar los otros grupos de obesidad I y III ( $p = 0.0238$ ; RR 1.475; IC de 95% 1.076-1.802). Con el fin de cerciorar que la significancia radicara en la expresión a nivel nuclear, se comparó el riesgo relativo en el análisis total (expresión en estroma, citoplasma y membranas en tejido tumoral y peritumoral) de la proteína (Figura 3-14).



**Figura 3-14. Comparación entre la expresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3 entre categorías de obesidad.** Al comparar el grupo de obesidad II vs I y III se observó que el primero continúa representando el grupo con el mayor riesgo de sobreexpresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3 ( $p =$

0.0078; RR 1.666; IC de 95% 1.165-2.251), con una tendencia similar en el análisis de expresión total, sin ser significativa.



**Figura 3-15. Diagrama BoxPlot de Tukey de la expresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3 por categorías de IMC en tejidos con cáncer de mama.** Diagramas que ilustran la expresión de pSer<sup>727</sup>-STAT3 de tejido tumoral de acuerdo con IMC con predominio en obesidad grado II, sin diferencias significativas entre grupos.

De forma recíproca, se observó que el grupo de obesidad grado III fungió como factor protector ante la expresión nuclear del residuo pTyr<sup>705</sup>-STAT3 ( $p = 0.0175$ ), sobre todo al ser comprada con los grupos de obesidad I y II ( $p = 0.0211$ ; RR 0.5667; IC de 95% 0.277-0.9377). En seguida se procedió a determinar el riesgo de sobreexpresar el residuo de pSer<sup>727</sup>-STAT3 en cada grupo respecto a la expresión nuclear de pTyr<sup>705</sup>-STAT3 donde fue posible observar un riesgo incrementado de la sobreexpresión del residuo pTyr<sup>705</sup> en el grupo de obesidad grado I ( $p = 0.0110$ ; RR 1.425; IC de 95% 1.085-1.911) (Tabla 3-11).

**Tabla 3-11. Riesgo de sobreexpresar pSer<sup>727</sup>-STAT3 por categoría de IMC.**

IMC	Riesgo de expresión nuclear de pSer <sup>727</sup> -STAT3		
	RR	IC 95%	$p^1$
Peso bajo	1.000	0.2750 - 3.636	>0.9999
Normal	0.8242	0.6257 - 1.070	0.1451
Sobrepeso	0.8020	0.6341 - 1.005	0.0548
Obesidad I	0.7018	0.5233 - 0.9219	<b>0.0110<sup>L</sup></b>
Obesidad II	1.204	0.8197 - 1.874	0.3336
Obesidad III	0.7813	0.3023 - 1.985	0.6109

<sup>1</sup>Valor de p con la prueba de Chi cuadrada. RR: riesgo relativo; IC 95%: intervalo de confianza del 95%; IMC: índice de masa corporal.

En el análisis de riesgo entre las categorías de IMC en relación con la coexpresión de ambas proteínas, se observó diferencia entre los 4 subgrupos tomando como referencia la coexpresión de pSer<sup>727+</sup> / pTyr<sup>705+</sup> ( $p = 0.0353$ , ANOVA, tabla no mostrada); sin embargo, no hubo diferencias al comparar las categorías con IMC <25 vs >25 ( $p = 0.7244$ ).

### **C. Antecedentes gineco-obstétricos**

El residuo pSer<sup>727</sup>-STAT3 fue mayormente expresado en el tejido mamario de mujeres con menarca a edad adecuada (36.3%), postmenopáusicas (33.3%), edad de menopausia adecuada (47.7%), así como el 1er embarazo a edad regular (32%) y de 3-4 gestaciones de término (20.4%). También fue más frecuente en aquellas mujeres con lactancia >6 meses (33.9%) y un índice estrogénico (IE) medio (29.8%).

Al correlacionar los antecedentes ginecológicos, se observó que aquellas mujeres que cursaron con menarca a temprana edad, así como aquellas con inicio de menopausia a edad tardía presentaron protección ante la expresión nuclear de la proteína ( $p = 0.0238$  y  $p = 0.0442$ , respectivamente). Sin embargo, pTyr<sup>705</sup> presentó mayor riesgo en mujeres con 1-2 gestaciones de término ( $p = 0.0319$ ).

#### *3.2.2. Asociación de la expresión nuclear de los residuos pSer<sup>727</sup> y pTyr<sup>705</sup> de STAT3 con las características patológicas del tumor*

La correlación con las características patológicas del tumor representa una de las asociaciones sólidas en la caracterización de los casos, resumidos en la **Tabla S2**. Los siguientes apartados corresponden a la correlación entre la expresión nuclear de pSer<sup>727</sup> y pTyr<sup>705</sup> de STAT3 como elementos independientes con cada una de las variables de interés.

#### **A. Hallazgos mastográficos: BI-RADS**

No se observó correlación entre la expresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3 y los hallazgos por mastografía, sin embargo, fue posible correlacionar patrones de mayor expresión nuclear dependientes de pTyr<sup>705</sup>-STAT3 en los casos con BI-RADS 4 ( $p = 0.04$ ; RR 1.24; IC de 95% 1.010-1.513).

#### **B. Clasificación histológica**

Se encontró que aquellos casos diagnosticados como carcinoma ductal infiltrante – sin patrón específico (CDI-SPE) presentaron un mayor riesgo de sobreexpresar del

residuo pTyr<sup>705</sup> ( $p = 0.0302$ ; RR 1.178; IC de 95% 1.016-1.371) al ser comparado con pSer<sup>727</sup>-STAT3 (Tabla 3-12); el resto de los subtipos histológicos presentó una distribución homogénea en la expresión de ambos residuos.

Tabla 3-12. Riesgo de sobreexpresar pSer<sup>727</sup>-STAT3 según la clasificación histológica.

Clasificación histológica	Riesgo de expresión nuclear de pSer <sup>727</sup> -STAT3		
	RR	IC 95%	$p^1$
CDI-SPE	0.8486	0.7296 - 0.9844	<b>0.0302</b>
CLI	0.7714	0.4489 - 1.272	0.2750
Otros	0.9091	0.6000 - 1.370	0.6252

<sup>1</sup>Valor de p con la prueba de Chi cuadrada; RR: riesgo relativo; IC 95%: intervalo de confianza del 95%; CDI-SPE: carcinoma ductal infiltrante – sin patrón específico; CDL: carcinoma lobulillar infiltrante.

En el análisis de riesgo en relación con los subtipos histológicos, no se observó diferencia entre los 4 subgrupos de coexpresión ( $p = 0.2521$ , ANOVA, tabla no mostrada).

### C. Tamaño tumoral

La agrupación de tumores por tamaño  $\leq 2$  cm y  $>2$  cm no fue una condición determinante de la expresión nuclear de pSer<sup>727</sup> ni pTyr<sup>705</sup> ( $p = 0.4177$  y  $p = 0.587$ , respectivamente). Posteriormente se analizaron los casos de acuerdo con pT (TNM, Métodos), en donde los subgrupos pT3-pT4 representaron mayor riesgo de expresión de pSer<sup>727</sup>-STAT3 (Figura 3-16).

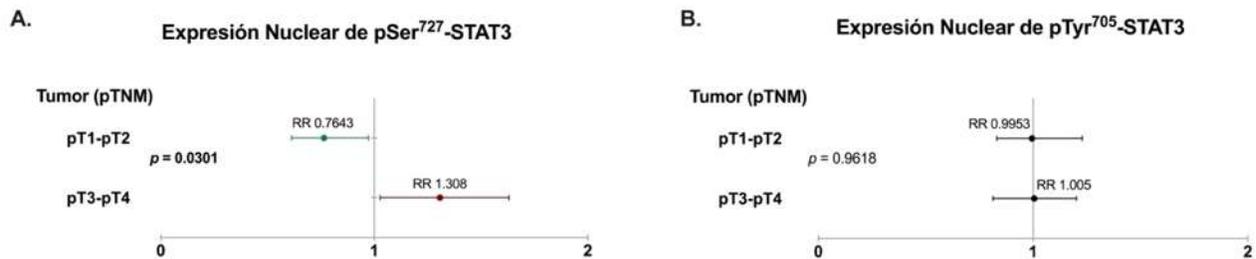
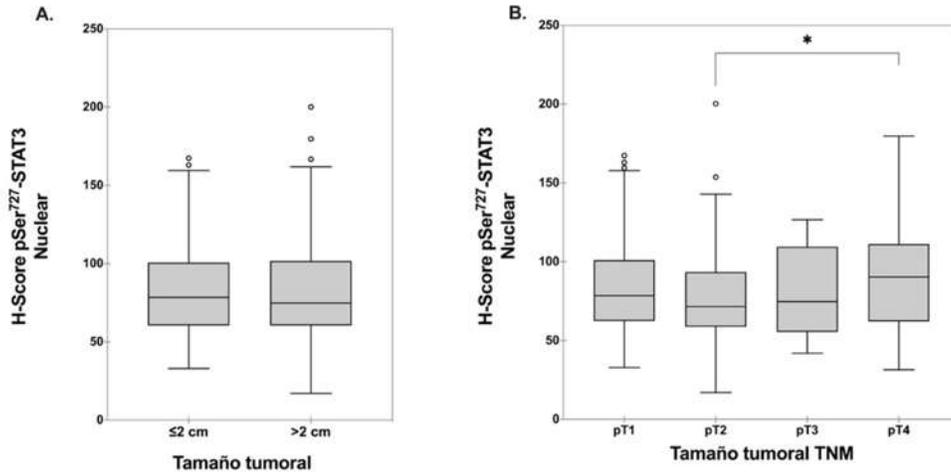


Figura 3-16. ForrestPlots de la expresión de pSer<sup>727</sup> y pTyr<sup>705</sup> de STAT3 de acuerdo con pT del TNM. A. Correlación entre la expresión de pSer<sup>727</sup>-STAT3 y los subgrupos pT1-pT2 vs pT3-pT4, siendo este último el de mayor riesgo de expresión. B. pTyr<sup>705</sup> no representó ser un factor de riesgo independiente en los subgrupos. RR: riesgo relativo.

Con el fin de comparar el riesgo de sobreexpresión como factor de riesgo independiente en las categorías avanzadas de pT (pT3-pT4) se realizó exploración adicional con el cálculo WHS (Figura 3-17), evidenciando la sobreexpresión de pSer<sup>727</sup> en los tumores pT4 ( $p = 0.026$ ).



**Figura 3-17. Diagrama BoxPlot de Tukey de la expresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3 según el tamaño del tumor y pT del TNM.** Diagramas que ilustran la expresión de pSer<sup>727</sup>-STAT3 nuclear del tejido tumoral en A. tumores de menores y mayores de 2 cm ( $p = 0.8184$ , T test no pareado), y B. por grupos de acuerdo con características de pT de la clasificación TNM ( $p = 0.0752$ , ANOVA), pT4 representó la categoría con mayor expresión en comparación con pT2 (de menor expresión) ( $*p = 0.0266$ ).

De manera recíproca, al comparar la expresión de ambos residuos a nivel nuclear, se observó que las categorías menores de pT (pT1 y pT2) representaron factores de protección ante la expresión de pSer<sup>727</sup> (Tabla 3-13), no así de pTyr705 en donde pT1 resultó de mayor riesgo para la sobreexpresión ( $p = 0.0092$ ; RR 1.358; IC del 95% 1.077-1.740), así como para pT2 ( $p = 0.0282$ ; RR 1.349; IC del 95% 1.032-1.783); sobretodo al agruparse ambas condiciones pT1-pT2 ( $p = 0.006$ ; RR 1.358; IC del 95% 1.138-1.631).

**Tabla 3-13. Riesgo de sobreexpresar pSer<sup>727</sup>-STAT3 según el tamaño del tumor (cm) y pT del TNM.**

Tamaño tumoral, cm/pT	Riesgo de expresión nuclear de pSer <sup>727</sup> -STAT3		
	RR	IC 95%	$p^1$
≤2 cm	0.8692	0.7104 - 1.059	0.1640
>2 cm	0.8365	0.6933 - 1.005	0.0559
pT1	0.7365	0.5747 - 0.9282	<b>0.0092</b>
pT2	0.7414	0.5608 - 0.9688	<b>0.0282</b>
pT3	0.7895	0.5149 - 1.164	0.2253
pT4	1.067	0.7809 - 1.465	0.6803
pT1-pT2	0.7366	0.6129 - 0.8785	<b>0.0006</b>
pT3-pT4	0.9592	0.7501 - 1.223	0.7337

<sup>1</sup>Valor de p con la prueba de Chi cuadrada; RR: riesgo relativo; IC 95%: intervalo de confianza del 95%.

#### D. Nódulos y metástasis

En relación con la cantidad de nódulos involucrados y sus categorías pN del TNM, no se observaron diferencias significativas al comparar la expresión de los residuos

pSer<sup>727</sup> y pTyr<sup>705</sup> de manera independiente. Asimismo, la valoración de patrones de coexpresión revelaron diferencias entre el patrón pSer<sup>727+</sup> / pTyr<sup>705+</sup> y pSer<sup>727-</sup> / pTyr<sup>705-</sup> (Tabla 3-14).

Tabla 3-14. Patrones de coexpresión de residuos de STAT3 por categoría de nódulos TNM.

Variable	n/%	pSer <sup>727+</sup> / pTyr <sup>705+</sup>	pSer <sup>727+</sup> / pTyr <sup>705-</sup>	pSer <sup>727-</sup> / pTyr <sup>705+</sup>	pSer <sup>727-</sup> / pTyr <sup>705-</sup>	Faltantes	p <sup>1</sup>
<b>Nódulos (TNM)</b>							
pN0	71/41.0	27/38.0	13/18.3	14/19.7	17/23.9	7	0.0907
pN1	57/32.9	19/33.3	5/8.8	20/35.1	13/22.8	5	
pN2	33/19.1	10/30.3	9/27.3	8/24.2	6/18.2		
pN3	12/6.9	8/66.7	1/8.3	1/8.3	2/16.7	1	
Total	173/100	64	28	43	38	13	
<b>p<sup>1</sup></b>		1 (Ref.)	0.1317	0.3566	<b>0.0299</b>		
pN0	71/41.0	27/38.0	13/18.3	14/19.7	17/23.9	7	0.2364
pN1-pN3	102/59.0	37/36.3	15/14.7	29/28.4	21/20.6	6	
Total	173/100	64	28	43	38	13	
<b>RR</b>		1.045	1.161	0.7426	1.118		
<b>IC 95%</b>		0.7164 - 1.492	0.7117 - 1.723	0.4514 - 1.147	0.7208 - 1.631		
<b>p<sup>2</sup></b>		0.8142	0.5267	0.1921	0.600		

<sup>1</sup>Valor de p con ANOVA de una vía; <sup>2</sup>Valor de p con la prueba de Chi cuadrada; RR: riesgo relativo; IC 95%: intervalo de confianza del 95%.

En el análisis de patrones de coexpresión nuclear se observó un comportamiento singular entre las dicotomías pSer<sup>727+</sup>/pTyr<sup>705-</sup> y pSer<sup>727-</sup>/pTyr<sup>705+</sup> observándose que, ante la ausencia de nódulos (pN0) la presencia de la expresión elevada del residuo serina 727 en ausencia de tirosina 705 fue mayor en relación con aquellos casos con 1-3 nódulos (pN1) (IC del 95% 1.050-2.904) e, inversamente, fue mayor la expresión del patrón expresión elevada de pTyr<sup>705</sup> en ausencia de serina 727 en los casos pN1 al compararlos con pN2 (IC del 95% 1.073-4.49) (Figura 3-18).

### Coexpresión Nuclear de pSer<sup>727</sup> y pTyr<sup>705</sup> de STAT3

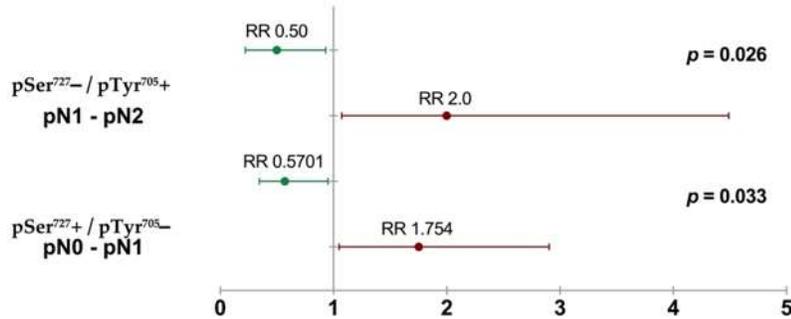


Figura 3-18. Diagrama que ilustra las diferencias en los patrones de expresión en relación con la cantidad de nódulos afectados (pN). Diagramas que muestran las diferencias entre los patrones de expresión nuclear.

A pesar de las correlaciones anteriores, no fue posible corroborar el papel de pSer<sup>727</sup> como factor independiente relacionado a nódulos, lo anterior ejemplificado en la Figura 3-19 donde, a pesar de demostrar un WHS visiblemente mayor en pN3 (>10 nódulos), este no alcanzó significancia estadística al compararlo con las otras categorías pN ( $p = 0.3569$ ).

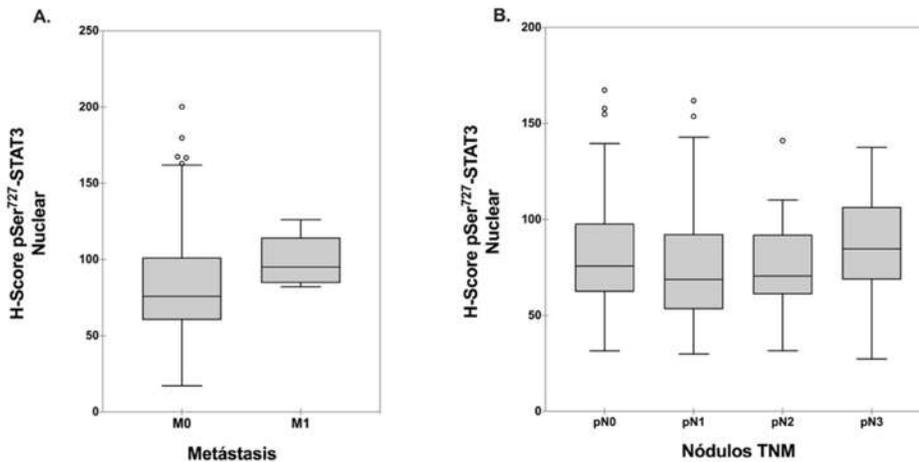


Figura 3-19. Diagrama BoxPlot de Tukey de la expresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3 y estatus de metástasis y nódulos en tejidos con cáncer de mama. Diagramas que ilustran la expresión de pSer<sup>727</sup>-STAT3 nuclear del tejido tumoral en A. pacientes sin (M0) y con metástasis (M1) ( $p = 0.19$ , T test no pareado), y B. de acuerdo con afectación a nódulos ( $p = 0.35$ , ANOVA).

Se identificó mayor riesgo de expresión del residuo pTyr705 en los casos con metástasis, sin embargo, cabe destacar que 6 de los 7 casos presentaron coexpresión con

pSer<sup>727</sup>. Con el fin de dilucidar el papel de pSer<sup>727</sup>-STAT3 en la progresión del cáncer, se consideraron las entidades asociadas a los hallazgos patológicos (Tabla S3), sin ser significativos.

### E. Grado histológico

Del total de casos positivos, el residuo pSer<sup>727</sup>-STAT3 fue mayormente expresado en tumores de alto grado (GH3) (Figura 3-20), mientras que pTyr<sup>705</sup> presentó mayor prevalencia en tumores mejor diferenciados (GH1).

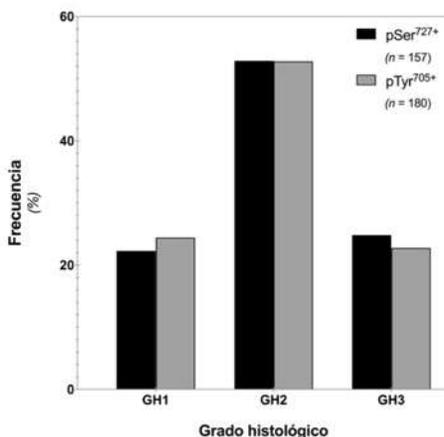


Figura 3-20. Frecuencia en la expresión nuclear de los residuos de STAT3 según grado histológico.

### F. Estadio TNM anatómico

Ambos residuos presentaron mayor prevalencia en estadios tempranos de la enfermedad (IA-IIA), no obstante, la expresión de pTyr<sup>705</sup> fue significativamente mayor en estadios metastásicos (IV) ( $p = 0.0397$ ).

Posteriormente, se determinó el riesgo entre los estadios TNM en relación con la coexpresión de ambas proteínas tomando como referencia la coexpresión de pSer<sup>727</sup>+ / pTyr<sup>705</sup>+, de esta manera fue posible determinar diferencias entre los 4 subgrupos ( $p = 0.0199$ , ANOVA tabla no mostrada) dependientes de la presencia de pSer<sup>727</sup> en ausencia de pTyr<sup>705</sup> ( $p = 0.0328$ ). Al correlacionar la coexpresión, se evidenció un riesgo casi 5 veces mayor de sobreexpresar el binomino pSer<sup>727</sup>+ / pTyr<sup>705</sup>- en el estadio IIIB al compararlo con pSer<sup>727</sup>+ / pTyr<sup>705</sup>+ ( $p = 0.0082$ ; RR 4.963; IC del 95% 1.443-17.04) (Tabla 3-15).

**Tabla 3-15. Patrones de expresión de pSer<sup>727</sup>-STAT3 y estadios TNM.**

Variable	n/%	pSer <sup>727</sup> + / pTyr <sup>705</sup> +	pSer <sup>727</sup> + / pTyr <sup>705</sup> -	RR	95%IC	p <sup>1</sup>
TNM (n= 176)						0.1020
IA	33/18.8	13/39.4	4/21.3	1.090	0.7368 - 1.401	0.6010
IIA	51/29.0	21/41.2	10/34.5	0.9278	0.6686 - 1.207	0.5952
IIB	25/14.2	8/32.0	2/14.1	1.139	0.6879 - 1.457	0.5190
IIIA	28/15.9	9/32.1	4/25.1	0.9668	0.5831 - 1.295	0.8606
IIIB	21/11.9	3/14.3	6/50.3	4.963	1.443 - 17.04	<b>0.0082</b>
IIIC	11/6.3	7/63.6	1/16.0	1.254	0.7485 - 1.552	0.2890
IV	7/4.0	6/85.7	0/0	1.443	0.8699 - 6.566	0.1080

<sup>1</sup>Valor de p con la prueba de Chi cuadrada; RR: riesgo relativo; IC 95%: intervalo de confianza del 95%.

### 3.2.3. Asociación de la expresión nuclear de los residuos pSer<sup>727</sup> y pTyr<sup>705</sup> de STAT3 con las características moleculares del tumor

Al correlacionar la expresión nuclear de pSer<sup>727</sup> y pTyr<sup>705</sup> de STAT3 como elementos independientes de la expresión de acuerdo con las características moleculares propias del tumor, resumidos en la **Tabla S4**.

#### A. Receptores hormonales

A pesar de que la sobreexpresión del residuo pSer<sup>727</sup>-STAT3 no fue el resultado del efecto que, de manera individual, presentaban los receptores de estrógeno (RE) ( $p = 0.7769$ ) ni los de progesterona (RP) ( $p = 0.2243$ ), se observó que, al comparar la expresión entre ambos residuos, hubo mayor riesgo de sobreexpresar pSer<sup>727</sup>-STAT3 en aquellos casos negativos a RP (**Tabla 3-16**).

**Tabla 3-16. Riesgo de sobreexpresar pSer<sup>727</sup>-STAT3 de acuerdo con receptores hormonales.**

Receptores hormonales (RH)	Riesgo de expresión nuclear de pSer <sup>727</sup> -STAT3		
	RR	IC 95%	p <sup>1</sup>
<b>RH</b>			
Positivos (RE+/RP+)	0.7756	0.6466 - 0.9243	<b>0.0045</b>
Negativos (RE-/RP-)	1.024	0.7956 - 1.319	0.8516
<b>Receptor de estrógenos</b>			
Positivo (RE+)	0.7997	0.6793 - 0.9369	<b>0.0057</b>
Negativo (RE-)	0.9808	0.7594 - 1.266	0.8803
<b>Receptor de progesterona</b>			
Positivo (RP+)	1.181	0.9436 - 1.485	0.1467
Negativo (RP-)	1.444	1.120 - 1.881	<b>0.0045</b>

<sup>1</sup>Valor de p con la prueba de Chi cuadrada; RR: riesgo relativo; IC 95%: intervalo de confianza del 95%; RH: receptores hormonales; RE: receptores estrogénicos; RP: receptores de progesterona.

Bajo esta condición, se encontró que pTyr<sup>705</sup> fue mayormente expresada en los casos positivos a ambos receptores hormonales (RH) así como aquellos con RE+ ( $p = 0.0045$ ; RR 1.289; IC de 95% 1.082-1.547 y  $p = 0.0057$ ; RR 1.250; IC de 95% 1.067-1.472, respectivamente).

De acuerdo con los hallazgos anteriores, fue interesante encontrar que el efecto combinado entre aquellos con ausencia de RE y presencia de RP presentaron un efecto protector ante la sobreexpresión de pSer<sup>727</sup>, no observado con pTyr<sup>705</sup> (Tabla 3-17). Asimismo, el presentar una combinación distinta a la de RE-/RP+ confirió un riesgo de hasta 4 veces mayor para la sobreexpresión de pSer727 ( $p = 0.0266$ ; RR 3.953; IC del 95% 1.092-22.04).

Variable	n/%	Expresión nuclear de pSer <sup>727</sup>			p	Expresión nuclear de pTyr <sup>705</sup>			p
		Alta, n/%	RR <sup>2</sup>	95%IC <sup>3</sup>		Alta, n/%	RR <sup>2</sup>	95%IC <sup>3</sup>	
<b>Receptores hormonales</b>					0.1211				0.2287
RE+/RP+	161/55.1	86/53.4	0.9465	0.7693 - 1.170	0.6063	106/65.8	1.172	0.9841 - 1.410	0.0753
RE+/RP-	37/12.7	21/56.8	1.06	0.7546 - 1.370	0.7085	23/62.2	0.9786	0.7201 - 1.220	0.8694
RE-/RP+	8/2.7	1/12.5	0.253	0.04538 - 0.9155	<b>0.0266</b>	2/25.0	0.6101	0.1790 - 1.186	0.2346
RE-/RP-	86/29.5	50/58.1	1.127	0.8953 - 1.386	0.2958	50/58.1	0.8666	0.6967 - 1.047	0.1446
Total	292/100	158				181			

Tabla 3-17. Comparación entre la expresión nuclear de pSer727 y pTyr705 de STAT3 según el patrón de RH.

En el análisis de patrones de coexpresión nuclear se observó diferencias entre las dicotomías pSer727+/pTyr705- y pSer727-/pTyr705+ asociados a RH+ y RP+ (Figura 3-21), ambos casos tuvieron efecto protector para la expresión de Serina 727.

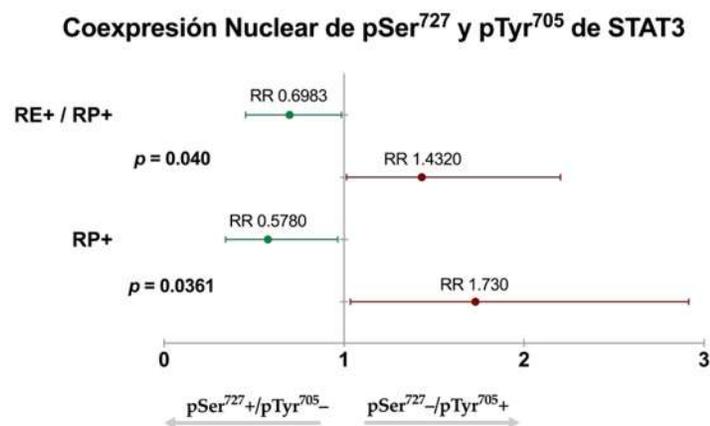


Figura 3-21. Diagrama que ilustra el riesgo de coexpresión de residuos STAT3 en relación con RE y RP. Hubo mayor riesgo de coexpresar pSer727-/pTyr705+ en tumores RE+/RP+ y RP+ que pSer727+/pTyr705-. RE: receptor de estrógenos; RP: receptor de progesterona.

## B. HER2 y Ki-67

Al comparar la condición (positiva o negativa) de HER2 y Ki-67 alto (>20%), no se observaron diferencias significativas entre los residuos Ser<sup>727</sup> ni Tyr<sup>705</sup> de STAT3. Sin embargo, se encontraron asociaciones con la expresión de pSer727 al combinar HER2 y Ki-67 de acuerdo a su condición, siendo así que los casos positivos para HER2 pero negativos a Ki-67 (HER2+/ Ki-67-) desempeñaron el papel condicionante para la sobreexpresión de pSer727-STAT3 ( $p = 0.0404$ ; RR 1.777; IC del 95% 1.033-2.432), contrario a la condición negativa de ambos marcadores (HER2-/ Ki-67-) los cuales dilucidaron más bien un papel protector ante la expresión ( $p = 0.0404$ ; RR 0.5629; IC del 95% 0.4112-0.9676). Este comportamiento no fue compartido por Tyr705 (**Tabla 3-18**).

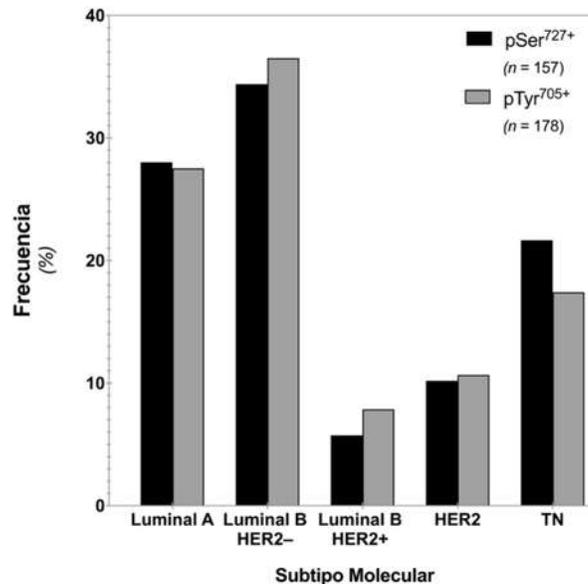
Variable	n/%	Expresión nuclear de pSer <sup>727</sup>			p	Expresión nuclear de pTyr <sup>705</sup>			p
		Alta, n/%	RR <sup>2</sup>	95% IC <sup>3</sup>		Alta, n/%	RR <sup>2</sup>	95% IC <sup>3</sup>	
<b>HER2 – Ki-67</b>					<b>0.0482</b>				0.741
HER2+/Ki-67+	37/13.6	16/43.2	0.7478	0.4894 - 1.046	0.0974	25/67.6	1.078	0.8132 - 1.317	0.5589
HER2+/ Ki-67–	8/2.9	7/87.5	1.596	0.9567 - 1.907	0.0668	5/62.5	0.9583	0.4666 - 1.351	0.8738
HER2–/ Ki-67+	160/58.6	93/58.1	1.2	0.9638 - 1.516	0.1044	97/60.6	0.9087	0.7626 - 1.091	0.2952
HER2–/ Ki-67–	68/24.9	33/48.5	0.8492	0.6352 - 1.090	0.2122	43/63.2	1.087	0.8745 - 1.301	0.4245
<i>Total</i>	273/100	149				170			

Tabla 3-18. Comparación entre la expresión nuclear de pSer<sup>727</sup> y pTyr<sup>705</sup> de STAT3 según el patrón de HER2 y Ki-67.

Asimismo, la expresión de Ki-67 alto fue el único factor de riesgo para la coexpresión de pSer<sup>727</sup>+ / pTyr<sup>705</sup>– en el análisis univariable (p = 0.0239; RR 1.252; IC del 95% 1.038-1.417)

### C. Subtipo molecular

El residuo pSer<sup>727</sup>-STAT3 fue más frecuente expresado en el subtipo TN (**Figura 3-22**), mientras que pTyr<sup>705</sup> presentó mayor prevalencia en los subtipos Luminal B y HER2.



**Figura 3-22.** Frecuencia en la expresión nuclear de los residuos de STAT3 de acuerdo con subtipos moleculares. TN: Triple Negativo.

Pese a no encontrar diferencias significativas al comparar el riesgo de expresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3 respecto a su contraparte pTyr<sup>705</sup>, fue interesante observar una tendencia de mayor expresión del primero en los subtipos TN, sin llegar a la significancia (**Tabla 3-19**).

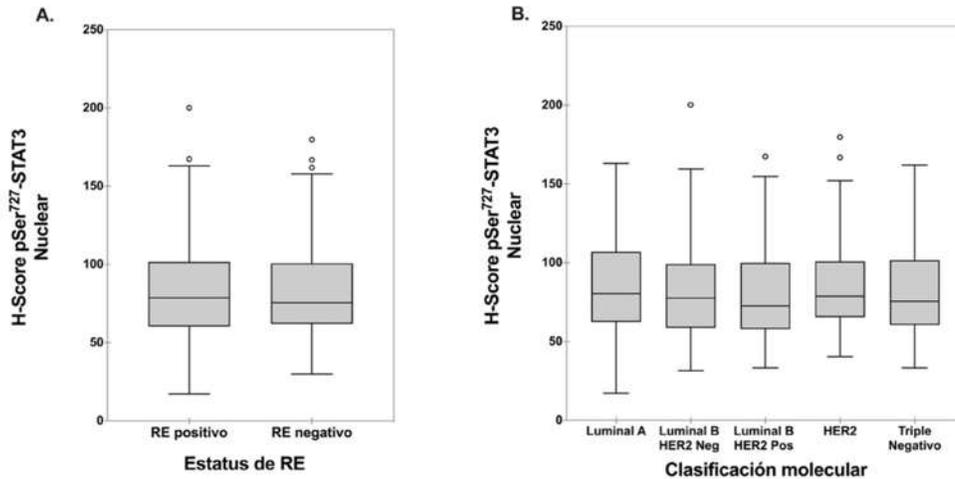
**Tabla 3-19.** Riesgo de sobreexpresar pSer727-STAT3 en los subtipos moleculares.

Subtipo molecular	Riesgo de expresión nuclear de pSer <sup>727</sup> -STAT3		
	RR	IC 95%	p <sup>1</sup>
Luminal A	0.8513	0.6572 - 1.095	0.2081
Luminal B HER2 negativo	0.8051	0.6395 - 1.004	0.0546
Luminal B HER2 positivo	0.6122	0.3323 - 1.061	0.0800
HER2	0.8421	0.5445 - 1.273	0.4076
Triple negativo	<b>1.137</b>	0.8274 - 1.572	0.4256

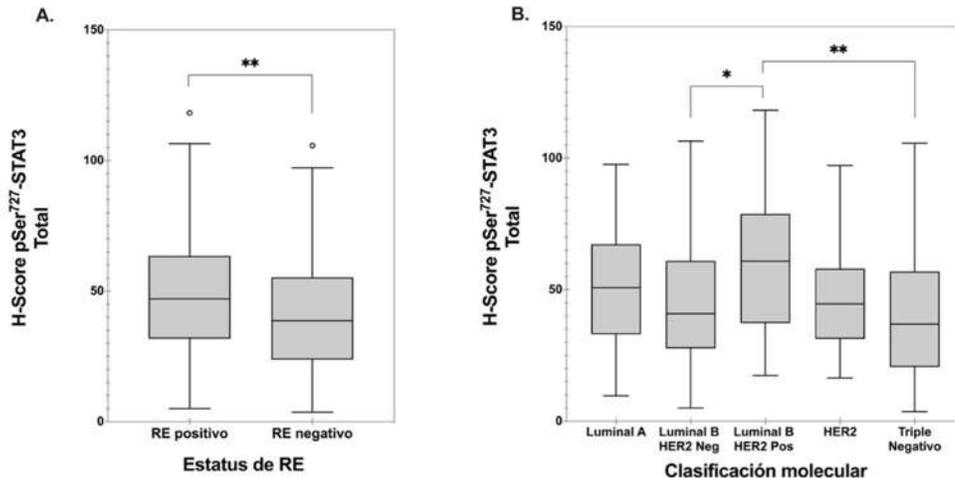
<sup>1</sup>Valor de p con la prueba de Chi cuadrada; RR: riesgo relativo; IC 95%: intervalo de confianza del 95%; RH: receptores hormonales; RE: receptores estrogénicos; RP: receptores de progesterona.

Tras observar lo anterior, se confirmó tras el análisis individual que el riesgo de sobreexpresar pTyr<sup>705</sup> a nivel nuclear fue mayor en todos los subtipos excepto los TN ( $p = 0.0484$ ; RR 1.275; IC del 95% 1.001-1.665), el cual tuvo un efecto protector contra la

expresión de este residuo. En la distribución de casos respecto a WHS se observa en la **Figura 3-23**; se observan diferencias respecto a la tinción total siendo mayor en los subtipos Luminal B/HER2- (**Figura 3-24**).



**Figura 3-23. Diagrama BoxPlot de Tukey de la expresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3 y clasificación molecular.** Diagramas que ilustran la expresión de pSer<sup>727</sup>-STAT3 nuclear del tejido tumoral en A. pacientes positivos y negativos a RE ( $p = 0.95$ , T test no pareado), y B. de acuerdo con clasificación molecular ( $p = 0.78$ , ANOVA). RE: receptores estrogénicos.

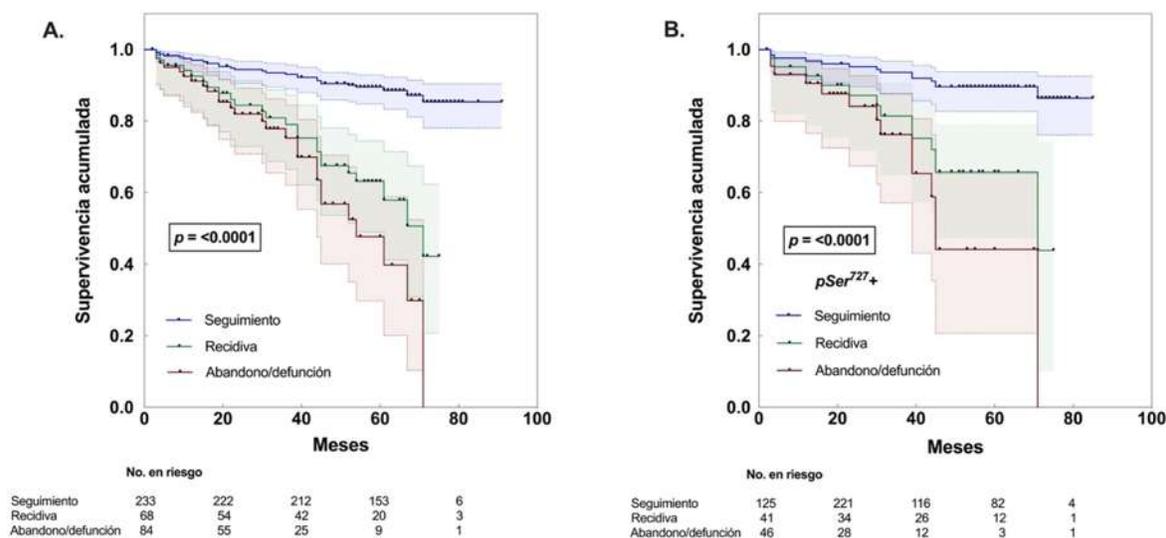


**Figura 3-24. Diagrama BoxPlot de Tukey de la expresión total de pSer<sup>727</sup>-STAT3 y clasificación molecular.** Diagramas que ilustran la expresión de pSer<sup>727</sup>-STAT3 total del tejido tumoral en A. pacientes positivos y negativos a RE, con mayor expresión de la proteína en relación con RE positivos (\*\* $p = 0.0085$ , T test no pareado), y B. de acuerdo con clasificación molecular ( $p = 0.0054$ , ANOVA), con mayor expresión de la proteína en los subtipos Luminal B HER2 positivo en relación con Luminal B HER2 negativo (\* $p = 0.0441$ ) y los Triple Negativos (\*\* $p = 0.0043$ ). RE: receptores estrogénicos.

### 3.3. Análisis de supervivencia global

Las pacientes cumplieron con una mediana de seguimiento de 64 meses en el periodo comprendido de enero 2014 a diciembre de 2021. De las 292 pacientes, 206 (70.5%) continuaban en seguimiento, de las cuales 156 se reportaron en última consulta sin actividad tumoral, 25 con actividad tumoral y 25 fueron dadas de alta del servicio de oncología por remisión de la enfermedad y continúan seguimiento en su unidad médica; 86 pacientes (29.5%) presentaron abandono/defunción durante el seguimiento.

El análisis de supervivencia global reveló una mejor sobrevida en aquellas mujeres que continuaron seguimiento médico en comparación con aquellas que abandonaron el seguimiento/defunción y aquellas con recidiva de la enfermedad, con una  $p < 0.0001$  en las curvas Kaplan-Meier (Figura 3-25).



**Figura 3-25. Curva Kaplan-Meier de las pacientes en estudio.** Comparación de curvas con prueba Mantel-Cox (Log-Rank)

Se observó menor sobrevida en aquellas que presentaron recidiva en algún momento del seguimiento y aquellas con abandono/defunción (Tabla 3-20).

**Tabla 3-20. Supervivencia global y seguimiento clínico.**

Variable	Supervivencia global					Supervivencia global Sobreexpresión pSer <sup>727</sup> -STAT3				
	n	Meses	RR	95%IC	p <sup>1</sup>	n	Meses	RR	95%IC	p <sup>1</sup>
Seguimiento*	233	58.8 ±15.7			1 (ref.)	125	59.0 ±15.2			1 (ref.)
Recidiva	68	42.6 ±21.3	4.151	2.020 - 8.529	<0.0001	41	42.5 ±20.3	3.769	1.462 - 9.719	<0.0001
Abandono/defunción	86	29.3 ±18.8	5.342	2.570 - 11.11	<0.0001	47	26.8 ±18.5	5.552	1.982 - 15.55	<0.0001

<sup>1</sup>Valor de p con la prueba Mantel-Cox (Log-Rank); RR: riesgo relativo; IC 95%: intervalo de confianza del 95%. \*Pacientes que continuaron seguimiento médico, incluye defunciones a pesar de seguimiento.

### 3.3.1. Supervivencia global y expresión nuclear de los residuos pSer<sup>727</sup> y pTyr<sup>705</sup> de STAT3

Se buscó correlacionar la SG con los patrones de expresión, evidenciando que la positividad en la expresión de pSer727 no fue un factor independiente de la SG (Tabla 3-21), tampoco lo fueron los distintos patrones de expresión.

**Tabla 3-21. Supervivencia global y patrones de expresión nuclear.**

Variable	Supervivencia global				
	n	Meses	RR	95%IC	p <sup>1</sup>
<b>Patrones de expresión</b>					
pSer <sup>727</sup> -STAT3 +	158	51.9 ±20.8	0.9583	0.4426 - 2.075	0.9136
pSer <sup>727</sup> -STAT3 -	127	53.3 ±19.4	1.044	0.4820 - 2.259	
pTyr <sup>705</sup> -STAT3 +	181	52.7 ±20.3	0.9519	0.4182 - 2.167	0.9057
pTyr <sup>705</sup> -STAT3 -	97	53.1 ±18.8	1.050	0.4615 - 2.391	
pSer <sup>727</sup> + / pTyr <sup>705</sup> -	37	50.7 ±21.4			1 (ref.)
pSer <sup>727</sup> + / pTyr <sup>705</sup> +	113	52.7 ±20.0	1.655	0.4559 - 6.007	0.5064
pSer <sup>727</sup> - / pTyr <sup>705</sup> +	65	53.5 ±20.7	1.344	0.2842 - 6.354	0.7229
pSer <sup>727</sup> - / pTyr <sup>705</sup> -	58	54.1 ±17.1	1.810	0.4331 - 7.568	0.4598

<sup>1</sup>Valor de p con la prueba Mantel-Cox (Log-Rank); RR: riesgo relativo; IC 95%: intervalo de confianza del 95%. \*Pacientes que continuaron seguimiento médico, incluye defunciones a pesar de seguimiento.

Lo anterior se ilustra en la **Figura 3-26**.

Supervivencia global y patrones de expresión STAT3

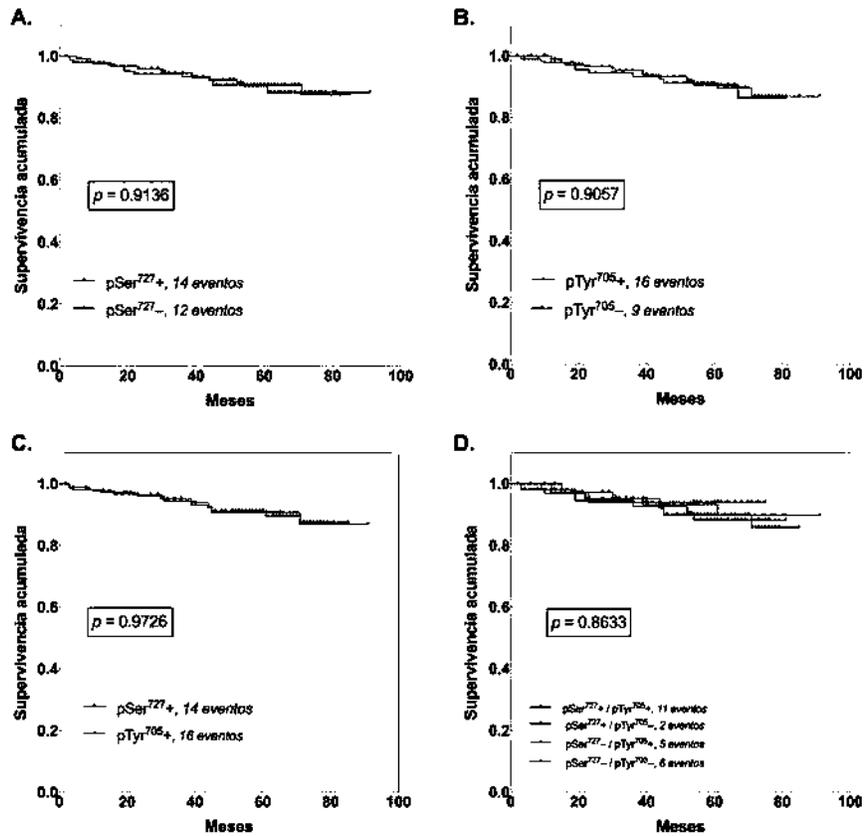


Figura 3-26. Curvas Kaplan-Meier en relación con los patrones de expresión de residuos STAT3. Comparación de curvas con prueba Mantel-Cox (Log-Rank).

A partir del análisis realizado en cuanto a seguimiento y recidiva, se buscó intencionadamente la correlación con los distintos patrones de expresión, sin encontrar significancia (Tabla 3-22).

**Tabla 3-22. Patrones de expresión nuclear y supervivencia global (seguimiento y recidiva).** No hubo significancia estadística en ninguna de las comparaciones.

Variable	Supervivencia global					Supervivencia global Seguimiento*					Supervivencia global Recidiva				
	n	Meses	RR	95%IC	p <sup>1</sup>	n	Meses	RR	95%IC	p <sup>1</sup>	n	Meses	RR	95%IC	p <sup>1</sup>
<b>Patrones de expresión</b>															
pSer <sup>727</sup> -STAT3 +	158	51.9 ±20.8	0.9583	0.4426 - 2.075	0.9136	125	59.0 ±15.2	0.9423	0.4349 - 2.042	0.8798	41	42.5 ±20.3	0.8291	0.3586 - 1.917	0.6530
pSer <sup>727</sup> -STAT3 -	127	53.3 ±19.4	1.044	0.4820 - 2.259		103	58.1 ±16.4	1.061	0.4898 - 2.299		26	41.8 ±23.0	1.206	0.5217 - 2.789	
pTyr <sup>705</sup> -STAT3 +	181	52.7 ±20.3	0.9519	0.4182 - 2.167	0.9057	143	59.3 ±15.4	0.9575	0.4210 - 2.178	0.9169	42	41.0 ±18.8	1.341	0.5772 - 3.117	0.4934
pTyr <sup>705</sup> -STAT3 -	97	53.1 ±18.8	1.050	0.4615 - 2.391		79	58.2 ±14.2	1.044	0.4591 - 2.376		48	48.5 ±22.9	0.7455	0.3208 - 1.732	
pSer <sup>727</sup> + / pTyr <sup>705</sup> -	37	50.7 ±21.4			1 (ref.)	28	59.6 ±13.2			1 (ref.)	13	49.4 ±22.2			1 (ref.)
pSer <sup>727</sup> + / pTyr <sup>705</sup> +	113	52.7 ±20.0	1.655	0.4559 - 6.007	0.5064	91	58.9 ±15.0	1.639	0.4499 - 5.969	0.5149	27	40.4 ±17.8	0.3364	0.1044 - 1.084	0.1295
pSer <sup>727</sup> - / pTyr <sup>705</sup> +	65	53.5 ±20.7	1.344	0.2842 - 6.354	0.7229	51	60.1 ±16.4	0.7257	0.1544 - 3.412	0.7002	15	42.1 ±20.9	0.4918	0.09925 - 2.437	0.4014
pSer <sup>727</sup> - / pTyr <sup>705</sup> -	58	54.1 ±17.1	1.810	0.4331 - 7.568	0.4598	49	57.0 ±15.0	1.795	0.4286 - 7.514	0.4665	10	45.1 ±25.0	0.2689	0.05936 - 1.218	0.0907

<sup>1</sup>Valor de p con la prueba Mantel-Cox (Log-Rank); RR: riesgo relativo; IC 95%: intervalo de confianza del 95%. \*Pacientes que continuaron seguimiento médico, incluye defunciones a pesar de seguimiento.

### 3.3.2. Supervivencia global y expresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3 en relación con los factores clínicos

#### A. Edad

La supervivencia global en los casos <40 años fue mayor respecto a las mujeres >41 años (media de 56.1 ±15.2 meses y 52.1 ±20.8, respectivamente). La sobreexpresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3 no representó un efecto negativo en la supervivencia, de forma interesante se observa un decremento (no significativo) en la supervivencia de 1 mes en aquellas pacientes <40 años (media de 55.2 meses) y en >41 años (media de 51.4 meses) al comparar las curvas de la población general con las que sobreexpresaron la proteína (Figura 3-27, A y B).

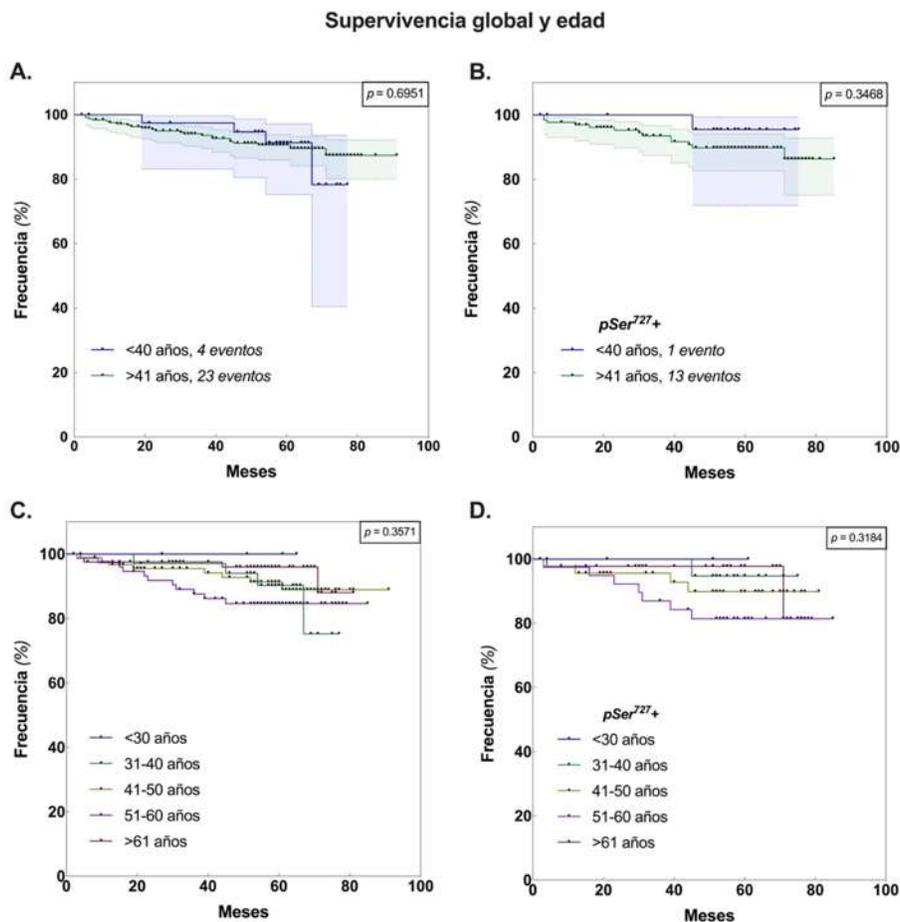


Figura 3-27. Curvas Kaplan-Meier y los grupos de edad en relación con la sobreexpresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3. Comparación de curvas con prueba Mantel-Cox (Log-Rank).

El efecto que presentó pTyr<sup>705</sup> fue ligeramente mayor en las mujeres <40 años con decremento de 2 meses en la supervivencia global (media de 54.4 ±17.2 meses) y sin cambios en los casos >41 años (media de 52.5 ±20.8 meses), sin ser significativo ( $p = 0.4006$ ).

## B. IMC

En relación con aquellas pacientes con IMC >25 kg/m<sup>2</sup>, se observó una ligera mejoría en la sobrevida (no significativa) en función con la sobreexpresión nuclear de los residuos pSer<sup>727</sup> al comparar las curvas de la población general (Figura 3-28).

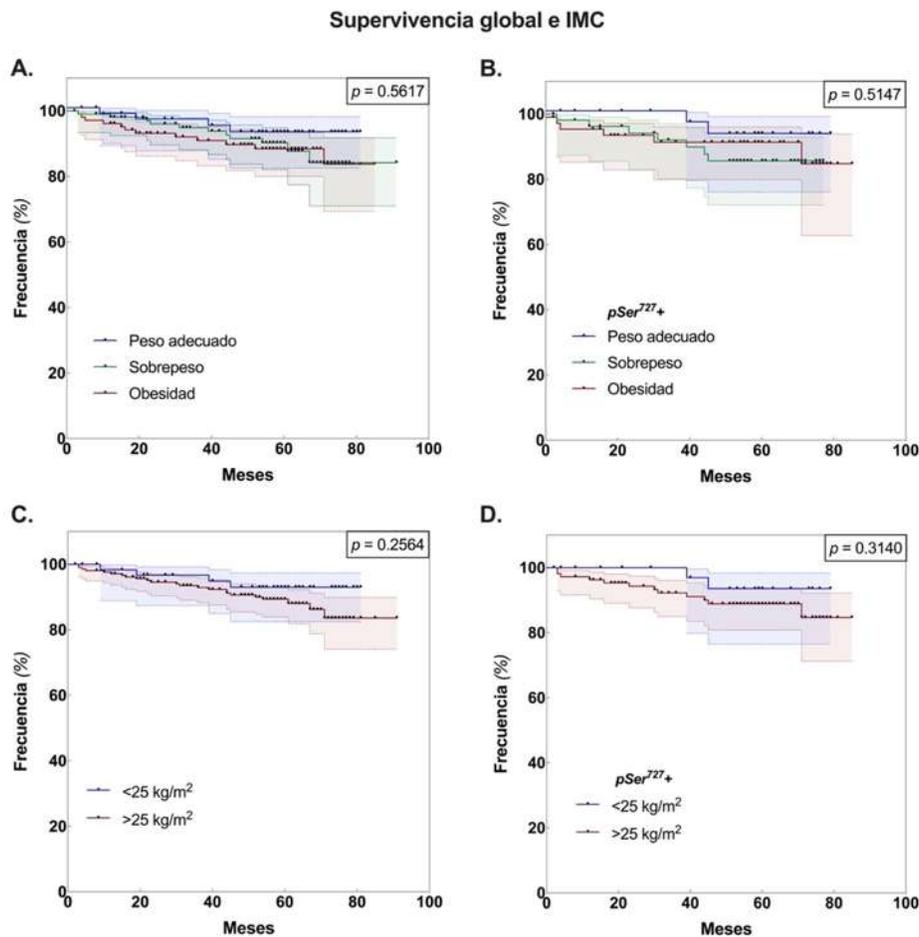


Figura 3-26. Curvas Kaplan-Meier y categorías IMC en relación con la sobreexpresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3. Comparación de curvas con prueba Mantel-Cox (Log-Rank).

### C. Antecedentes gineco-obstétricos

La sobreexpresión nuclear de pSer<sup>727</sup> fue un determinante de supervivencia global disminuida en las pacientes con índice estrogénico (IE) bajo respecto a aquellas con IE medio y alto ( $p = 0.0395$ ) (Tabla 3-23).

Tabla 3-23. Supervivencia global y antecedentes gineco-obstétricos.

Variable	Supervivencia global			Supervivencia global Sobreexpresión pSer <sup>727</sup> -STAT3		
	<i>p</i> <sup>1</sup>	RR <sup>2</sup>	95%IC <sup>3</sup>	<i>p</i> <sup>1</sup>	RR <sup>2</sup>	95%IC <sup>3</sup>
<b>Estado ovárico</b>						
Premenopausia	0.0973	1.960	0.8706 - 4.413	0.2875	1.882	0.5602 - 6.325
Postmenopausia		0.5102	0.2266 - 1.149		0.5313	0.1581 - 1.785
<b>Menopausia (edad)</b>						
Temprana	0.9815	0.9749	0.1160 - 8.196	0.4111	2.633	0.1198 - 57.87
Regular- Tardía		1.026	0.1220 - 8.623		0.3798	0.01728 - 8.346
<b>1ª gestación (edad)</b>						
Temprana	0.6413	1.283	0.4333 - 3.800	0.6486	1.455	0.3131 - 6.761
Regular- Tardía		0.7793	0.2631 - 2.308		0.6873	0.1479 - 3.194
<b>Paridad</b>						
Nuligesta	0.4339	0.5608	0.1695 - 1.856	0.5992	0.4874	0.09899 - 2.399
>1 gesta		1.783	0.5389 - 5.900		2.052	0.4168 - 10.10
<b>Lactancia &gt;6m</b>						
Sí	0.0788	2.925	1.077 - 7.942	0.2013	2.675	0.7156 - 9.998
No		0.3419	0.1259 - 0.9285		0.3739	0.1000 - 1.397
<b>Índice Estrogénico (IE)</b>						
Bajo	0.0545	2.605	0.8114 - 8.365	<b>0.0395</b>	3.652	0.6850 - 19.47
Medio-Alto		0.3839	0.1196 - 1.232		0.2738	0.05135 - 1.460

<sup>1</sup>Valor de *p* con la prueba Mantel-Cox (Log-Rank); RR: riesgo relativo; IC 95%: intervalo de confianza del 95%.

#### 3.3.3. Supervivencia global y expresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3 en relación con los factores patológicos

La densidad mamaria al momento del diagnóstico no fue un determinante de la supervivencia global en las pacientes ( $p = 0.5832$ ), ni en asociación con pSer<sup>727</sup> ( $p = 0.6238$ )

#### A. Tamaño tumoral

En el análisis de supervivencia global de la población de estudio se identificó que el tamaño tumoral >2 cm al momento de diagnóstico fue un factor de mal pronóstico en la supervivencia general de las pacientes (media: 49.4 ±21.6 meses) (Figura 3-29, A), encontrando asimismo que la sobreexpresión nuclear de pSer<sup>727</sup> no fue un determinante

en el cambio de este factor de riesgo al encontrar resultados similares en la supervivencia (Figura 3-29, B).

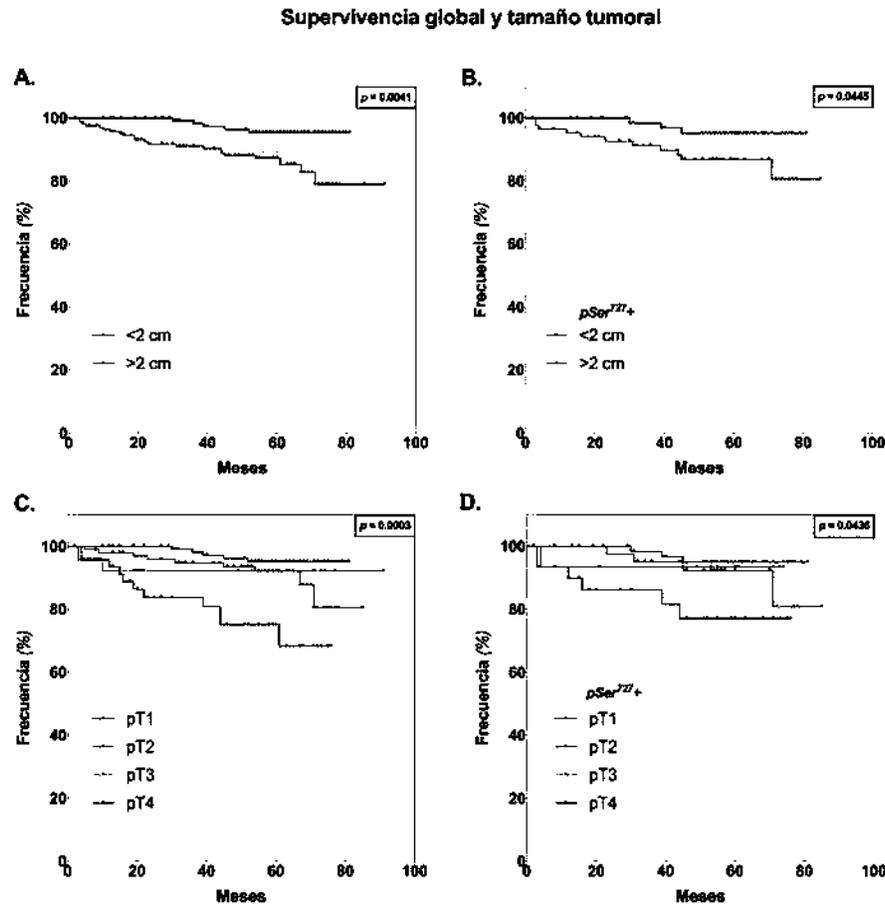


Figura 3-29. Curvas Kaplan-Meier y tamaño tumoral en relación con la sobreexpresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3. Comparación de curvas con prueba Mantel-Cox (Log-Rank).

Se observa el efecto coadyuvante de pSer<sup>727</sup>-STAT3 al asociarse a factores de mal pronóstico como pT3-pT4 y la ausencia de RE en tumores de mayor tamaño (Tabla 3-24).

Tabla 3-24. Supervivencia global y tamaño tumoral. Se observó menor supervivencia en aquellas pacientes con IE bajo respecto al medio y alto, no se encontraron otras correlaciones.

<i>Supervivencia global</i>					<i>Supervivencia global</i> Sobreexpresión pSer <sup>727</sup> -STAT3			
Variable	<i>p</i> <sup>1</sup>	RR	95% IC	Meses <sup>2</sup>	<i>p</i>	RR	95% IC	Meses
<b>Tamaño</b>								
pT1-pT2	<b>0.0009</b>	0.2993	0.1199 - 0.7468	55.9	<b>0.0330</b>	0.3387	0.1015 - 1.130	55.8
pT3-pT4		3.341	1.339 - 8.337	43.5		2.952	0.8848 - 9.850	43.1
<b>Tamaño + RE</b>								
>2cm + RE+	<b>0.0239</b>	0.3899	0.1633 - 0.9310	50.4	<b>0.0439</b>	0.3062	0.08861 - 1.058	50.9
>2cm + RE-		2.565	1.074 - 6.125	47.6		3.266	0.9453 - 11.29	44.3

<sup>1</sup>Valor de p con la prueba Mantel-Cox (Log-Rank); RR: riesgo relativo; IC 95%: intervalo de confianza del 95%.

## B. Nódulos

El hecho de presentar más de un nódulo con metástasis (pN1-3) fue un factor de mal pronóstico independiente en la supervivencia general de las pacientes con una media de defunción de 34.2 meses (**Figura 3-30, A**), encontrando que la sobreexpresión nuclear de pSer<sup>727</sup> actuó acorde al mal pronóstico observado en la población general al encontrar resultados similares en la sobrevida, con una media de defunción de 33.5 meses (**Figura 3-30, B**). Sin embargo, al comparar las categorías de nódulos (pN 1, 2 y 3) para determinar el grupo con peor sobrevida, no se observaron diferencias en los grupos (**Figura 3-30, C y D**).

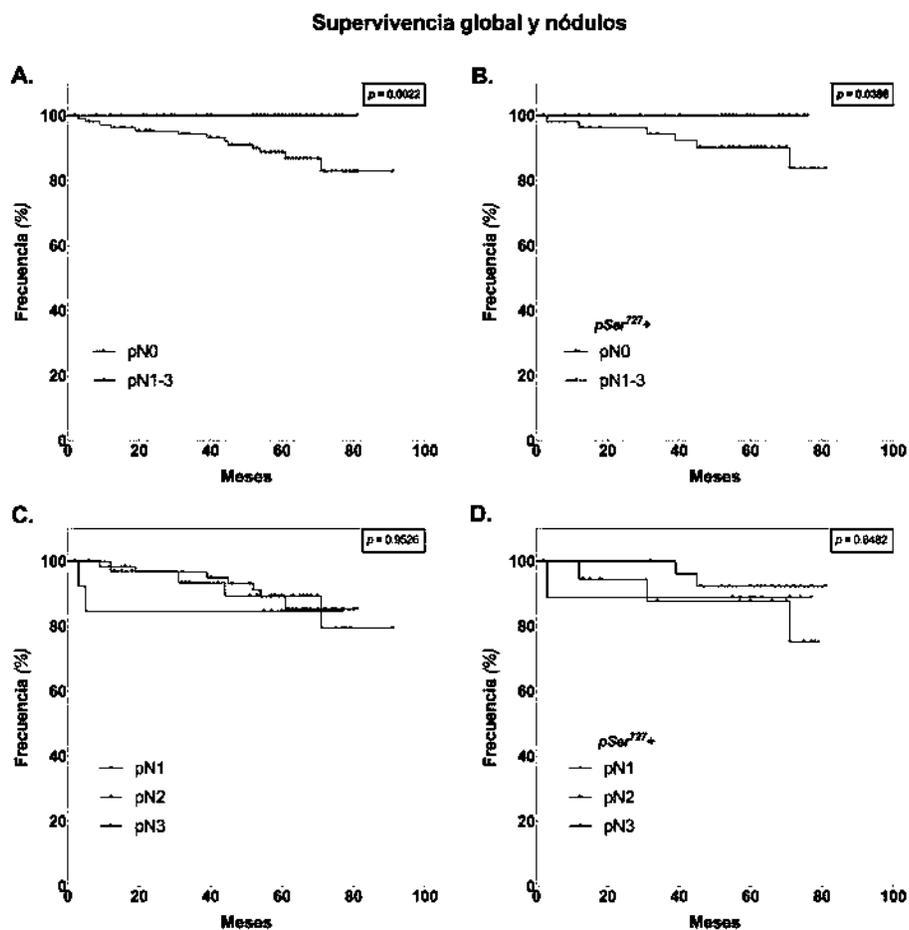


Figura 3-30. Curvas Kaplan-Meier y afectación de nódulos en relación con la sobreexpresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3. Comparación de curvas con prueba Mantel-Cox (Log-Rank).

### C. Estadío TNM anatómico

La sobreexpresión de pSer<sup>727</sup> actuó como coadyuvante de mal pronóstico en los estadios localmente avanzados y metastásicos, de manera paralela a lo observado en la población general (Figura 3-31).

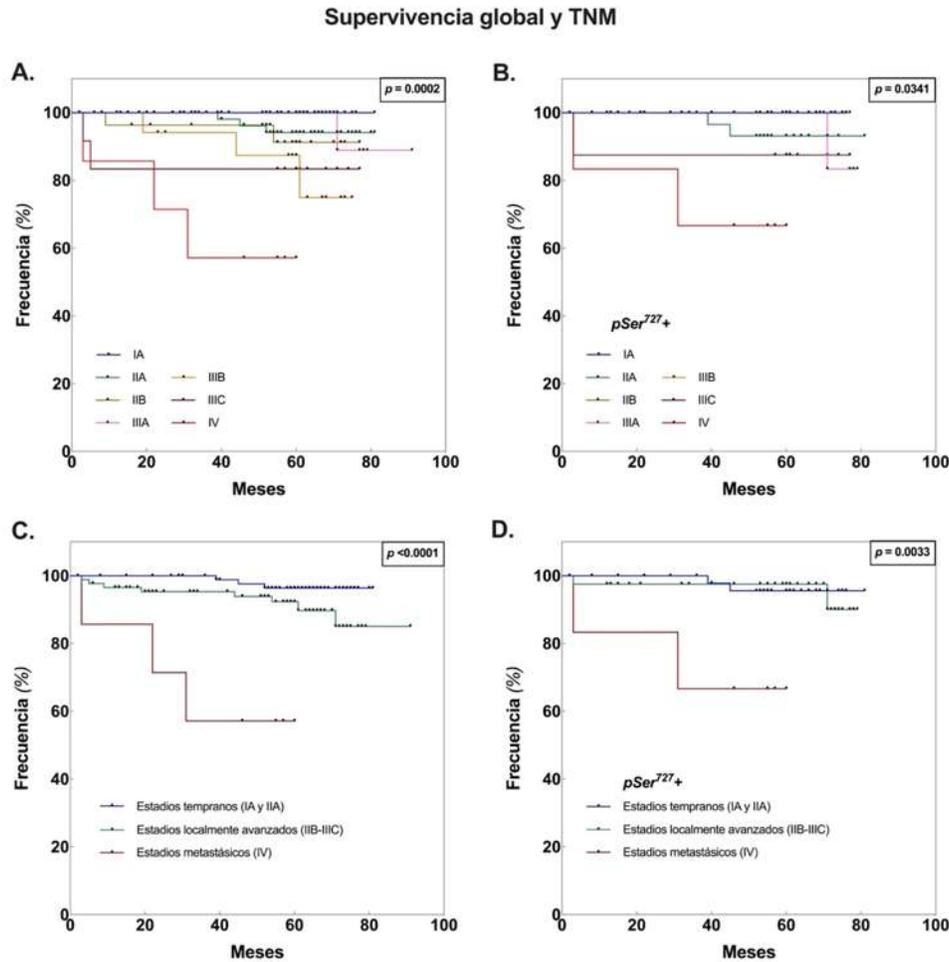


Figura 3-31. Curvas Kaplan-Meier y categorías TNM en relación con la sobreexpresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3. Comparación de curvas con prueba Mantel-Cox (Log-Rank).

#### 3.3.4. Supervivencia global y expresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3 en relación con los factores moleculares del tumor

##### A. Receptores hormonales

La sobreexpresión de pSer<sup>727</sup> actuó como coadyuvante de mal pronóstico en los tumores carentes de RE y RP, de manera paralela a lo observado en la población general (Figura 3-32).

### Supervivencia global y RH

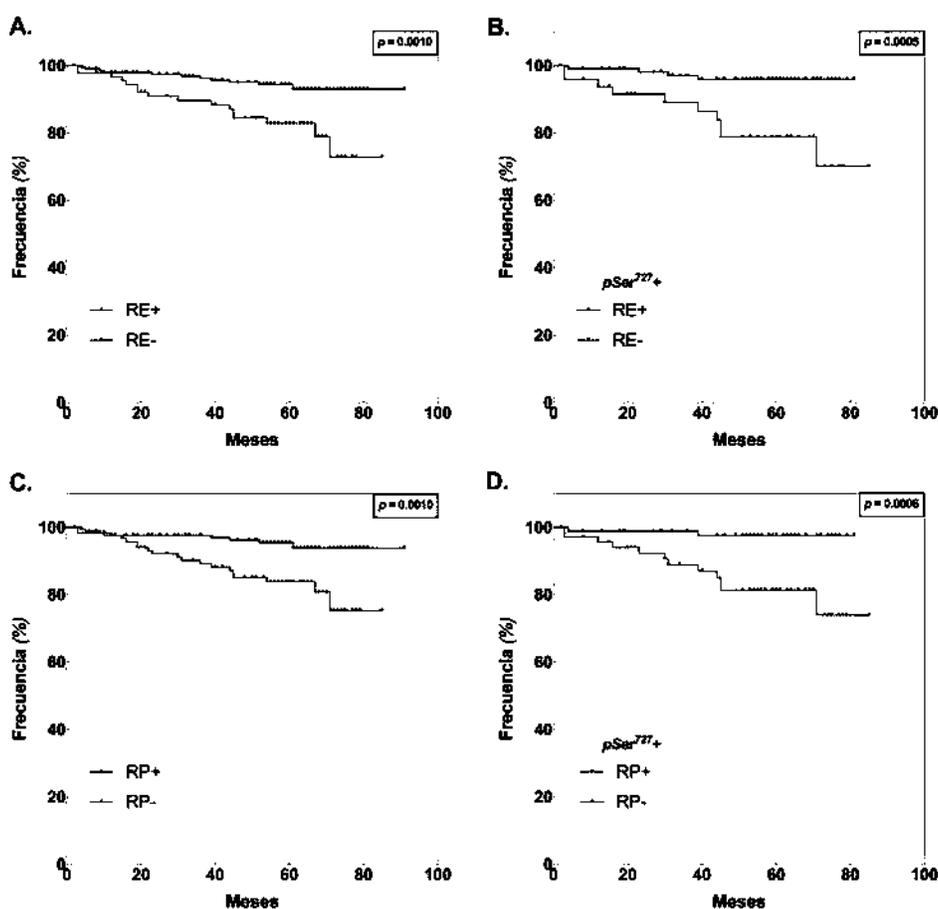


Figura 3-32. Curvas Kaplan-Meier y RH en relación con la sobreexpresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3. Comparación de curvas con prueba Mantel-Cox (Log-Rank). RH: Receptores hormonales; RE: receptores de estrógenos; RP: receptores de progesterona.

### B. HER2 y Ki-67

La sobreexpresión de pSer<sup>727</sup>-STAT3 fue un determinante en la diferenciación del efecto pronóstico de HER y Ki-67, a pesar de no ser estadísticamente significativo se observó una mayor diferenciación entre las curvas de supervivencia global en relación con el peor pronóstico en los casos HER2+ y Ki-67+ (Figura 3-33).

### Supervivencia global - HER2 y Ki-67

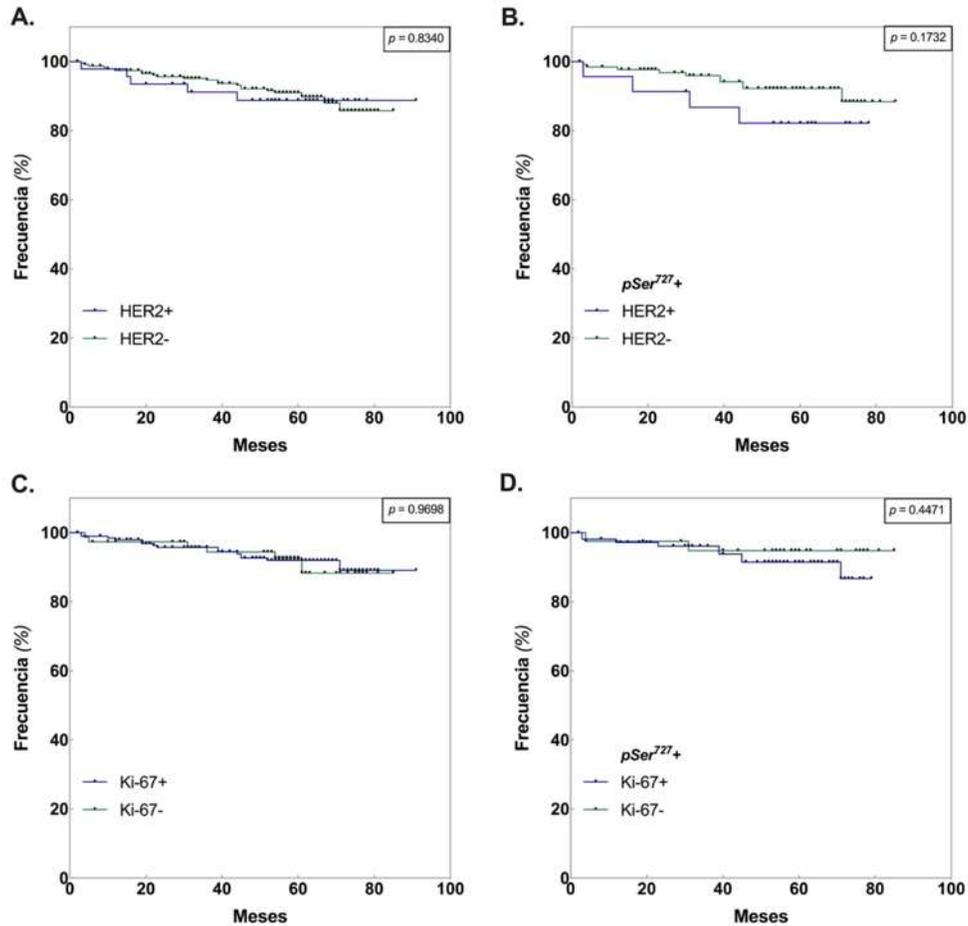
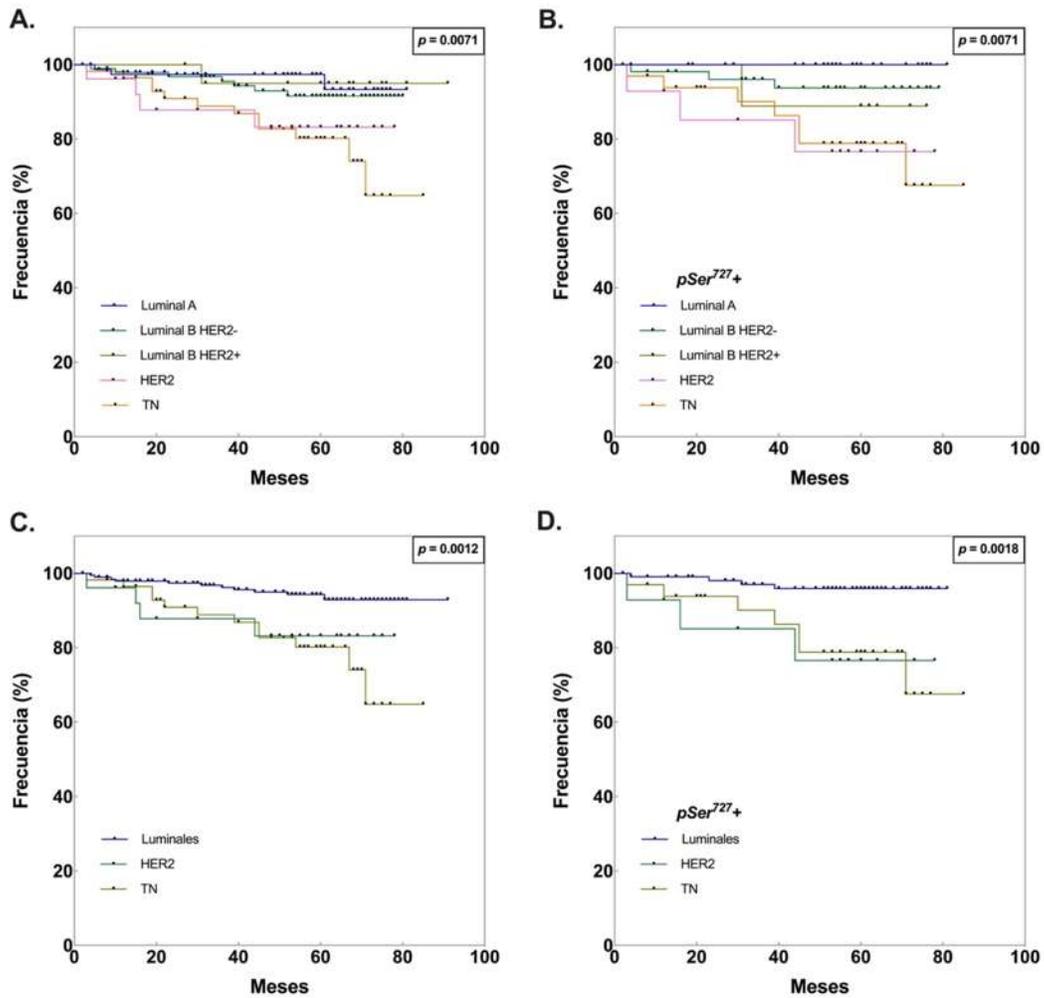


Figura 3-33. Curvas Kaplan-Meier en relación con HER2, Ki-67 y la sobreexpresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3. Comparación de curvas con prueba Mantel-Cox (Log-Rank).

### C. Subtipo molecular

Compatible con lo observado, la sobreexpresión de pSer<sup>727</sup>-STAT3 se asoció a peor supervivencia en los casos con subtipo molecular de mal pronóstico Luminal B HER2+, HER2 y TN (Figura 3-34).

### Supervivencia global y subtipo molecular



Valores de p (Fig. 3-34B)

	Luminal A	Luminal B HER2-	Luminal B HER2+	HER2	Triple Negativo
Luminal A		0.1061	<b>0.0374</b>	<b>0.0011</b>	<b>0.0011</b>
Luminal B HER2-	0.1061		0.6040	0.0635	<b>0.0356</b>
Luminal B HER2+	<b>0.0374</b>	0.6040		0.4559	0.3950
HER2	<b>0.0011</b>	0.0635	0.4559		0.9278
Triple Negativo	<b>0.0011</b>	<b>0.0356</b>	0.3950	0.9278	

**Figura 3-34. Curvas Kaplan-Meier y subtipo molecular en relación con la sobreexpresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3. Comparación de curvas con prueba Mantel-Cox (Log-Rank).**

## CAPÍTULO 4

### DISCUSIÓN

La activación constitutiva del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) desempeña un papel crítico en muchos tipos de cáncer sólido, incluido el cáncer de mama (CM), donde se ha sugerido que es un factor predisponente para la progresión del cáncer [93]. La fosforilación de STAT3 en su residuo tirosina 705 (pTyr<sup>705</sup>) ha sido objeto de múltiples análisis con respecto a las características clínico-patológicas y valor pronóstico, sin embargo, el estudio de la expresión del residuo pSer<sup>727</sup>-STAT3 continúa siendo la contraparte menos estudiada en la actividad de STAT3 en el cáncer, sobretudo el mamario, destacando así la necesidad de una investigación en profundidad. Este es el primer estudio, que conocemos, que evalúa a ambas proteínas en el contexto de una cohorte poblacional mexicana con tecnología de patología digital.

En el presente estudio se analizaron las variables clínico-patológicas de 292 casos de mujeres mexicanas con cáncer de mama, con 285 muestras de tejido disponibles para la evaluación de la expresión nuclear de los residuos pSer<sup>727</sup> y 278 casos para el residuo pTyr<sup>705</sup> de STAT3. La diversidad en el comportamiento de la expresión de ambos residuos fue sustancial, encontrando así diferencias significativas dentro de las variables clínicas y patológicas conocidas por sus valores pronósticos, lo cual se traduce en una heterogeneidad dentro de la biología de propia de los tumores.

El presente estudio cumplió parcialmente con la hipótesis inicial, en la cual se pretendió encontrar asociación entre la sobreexpresión de pSer<sup>727</sup>-STAT3 con los factores clínico-patológicos de peor pronóstico en las pacientes con cáncer de mama. Sin embargo, no fue posible asociar la sobreexpresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3 como factor independiente condicionante de una supervivencia global disminuida.

Asimismo, fue posible cumplir con los objetivos propuestos para llegar a responder la pregunta de investigación.

Bajo este tenor, en los siguientes párrafos se dará la revisión de los resultados a partir de la expresión de cada residuo en relación con las variables clínico-patológicas, seguido por el riesgo de expresión y, finalmente, la asociación con la supervivencia global.

pSer<sup>727</sup>-STAT3 se encontró sobreexpresado en el 55.4% de la población. Sin embargo, su frecuencia fue significativamente menor respecto a pTyr<sup>705</sup>-STAT3 el cual presentó expresión alta en 65.1% de casos, esta expresión heterogénea de STAT3 en los núcleos de tejido de pacientes con CM ha sido reportada de manera consistente con informes previos [61,62,71,94,95].

Es sabido que la activación clásica de STAT3 ocurre con la mediación del residuo pTyr<sup>705</sup>, sin embargo, se ha demostrado que la fosforilación de STAT3 tanto en Tyr<sup>705</sup> como en Ser<sup>727</sup> conduce a la transactivación completa de la señalización de STAT3 [74]. Asimismo, se ha sugerido que STAT3 puede activarse mediante la fosforilación de Ser<sup>727</sup> en ausencia de pTyr<sup>705</sup> [80,81], incluso pSer<sup>727</sup> ha sido considerado como un regulador negativo de pTyr<sup>705</sup> [82]. Por esa razón, nos dimos a la tarea de investigar los patrones de expresión, encontrando que el binomio pSer<sup>727+</sup> / pTyr<sup>705+</sup> fue el más frecuentemente expresado en nuestra población de estudio con el 41.4% de casos, mientras que la expresión única de pSer<sup>727</sup> (pSer<sup>727+</sup> / pTyr<sup>705-</sup>) se encontró en sólo el 13.6% de casos. Esto demuestra la cooperación existente entre ambas proteínas para llevar a cabo sus actividades activadoras de la transcripción en núcleo.

Ahora bien, a fin de demostrar la correlación entre ambas proteínas, se realizó el análisis individual de los factores de riesgo comúnmente asociados al CM.

Cerca del 80% de los casos son diagnosticados en mujeres mayores de 50 años [96], de forma interesante, en nuestra población de estudio se encontró esta proporción de casos a partir de los 40 años, en donde la edad media de diagnóstico fue a los 53.5 años, lo cual coincide con lo reportado en estudios realizados en población mexicana [97-99], reflejando así una diferencia de 10 años respecto a poblaciones en países desarrollados, donde la edad de diagnóstico se observa principalmente entre los 65-74 años de edad [100]. También, en nuestra población se identificaron 13.7% de los casos en edades jóvenes (<40 años), lo cual representa más de tres veces la incidencia reportada para este grupo de edad en países más desarrollados [101].

Al correlacionar la expresión nuclear del residuo pSer<sup>727</sup>-STAT3 el grupo de 41-50 años fungió como el parteaguas demostrando ser un factor de protección para su expresión individual, donde pTyr<sup>705</sup> actuó como relevo de la sobreexpresión de STAT3 en los grupos mayores de 41 años. A pesar de lo anterior, al asociarse pSer<sup>727</sup> y pTyr<sup>705</sup> con el grupo de 41-50 años este representó ser un factor de riesgo independiente para la expresión de este binomio, denotando la cooperación de ambos residuos en este grupo; sin embargo, la edad no afectó la supervivencia global como variable independiente ni en aquellos casos con sobreexpresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3.

La obesidad se ha identificado como un factor de riesgo para el cáncer de mama, donde una actividad de aromatasas elevada y una mayor expresión de leptina en depósitos de tejido adiposo expandido juegan un papel principal como factor contribuyente [102], algo visto sobretodo en mujeres posmenopáusicas obesas que tienden a desarrollar cáncer de mama positivo para receptores de estrógeno. Sin embargo, las mujeres obesas, aún sin llegar a la menopausia, han logrado peores resultados clínicos traducidos en supervivencia global [103].

Bajo el supuesto anterior, fue interesante encontrar la mayor cantidad de los casos diagnosticados en el presente estudio pertenecieron a mujeres con IMC >25 kg/m<sup>2</sup>, en donde la sobreexpresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3 fue significativamente mayor en el tejido neoplásico de mujeres con obesidad grado II ( $p = 0.0201$ ), mientras que pTyr<sup>705</sup> presentó mayor riesgo en el grupo con obesidad grado I ( $p = 0.0110$ ). De esta manera se infiere que el riesgo de expresar ambos residuos fue mayor en relación con el incremento del IMC. Esto puede explicarse parcialmente por el papel del supresor de la señalización de citoquinas 3 (SOCS3), un regulador negativo de la activación de STAT3 en la vía de señalización JAK2/STAT3 activada por leptina, donde la leptina se asocia con mayor expresión de SOCS3 en pacientes obesos debido al aumento en la expresión de citocinas en el contexto de inflamación crónica de bajo grado [93]. Cabe señalar que solo el 21.8% de nuestra cohorte presentó peso adecuado, destacando la necesidad de intervenciones preventivas en la atención médica en nuestra población.

A pesar de lo anterior, el IMC >25 kg/m<sup>2</sup> no representó ser un factor condicionante de la supervivencia global, contrario a lo anteriormente reportado [104], ni en aquellos casos asociados a pSer<sup>727</sup>-STAT3.

En relación con los antecedentes gineco-obstétricos, se observó que la sobreexpresión de pSer<sup>727</sup>-STAT3 fue un condicionante de la supervivencia global disminuida en aquellas mujeres con índice estrogénico bajo ( $p = 0.0395$ ), el cuál corresponde con una cantidad menor de años con exposición a estrógenos. Lo anterior resulta interesante en el sentido de que la relación estrecha entre la exposición endógena a hormonas ha sido ampliamente investigada, en particular el estrógeno y la progesterona, y el riesgo elevado de cáncer de mama en las mujeres. Por lo tanto, eventos específicos en la vida reproductiva de la mujer como el embarazo, la lactancia materna, la primera menstruación y la menopausia, vistos como factores protectores, en nuestro estudio sugieren ser elementos cruciales en términos de una posible inducción de los eventos cancerígenos en el microambiente mamario.

Nuestro estudio reporta que la edad media de menarca y menopausia fueron adecuadas en la mayoría de la población de estudio; asimismo, al momento de diagnóstico la mayoría de las mujeres fueron postmenopáusicas. Destaca el hecho de que la presentación temprana de la menarca, así como edad tardía de menopausia presentaron protección ante la expresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3 ( $p = 0.0238$  y  $p = 0.0442$ , respectivamente).

Cabe destacar que pTyr<sup>705</sup> presentó mayor riesgo en mujeres con 1-2 gestaciones de término ( $p = 0.0319$ ).

En cuanto a las variables patológicas propias del tumor, se buscó correlacionar la densidad mamaria con base en los hallazgos mastográficos (BI-RADS) encontrando que aquellas mujeres con mayor densidad clasificadas como BI-RADS 4 cursaron con mayor expresión nuclear del residuo pTyr<sup>705</sup>-STAT3 ( $p = 0.04$ ), pero no así de pSer<sup>727</sup>. Bajo este contexto, se ha identificado que la mayor densidad del tejido mamario se correlaciona con el mayor riesgo de cáncer de mama tanto en mujeres premenopáusicas como posmenopáusicas [105]. No obstante, la mayor densidad mamaria no representó un factor determinante de la supervivencia global.

A pesar de ser el tipo más frecuentemente diagnosticado, el carcinoma ductal infiltrante–sin patrón específico (CDI-SPE) representó ser un factor de protección para la expresión de pSer<sup>727</sup>-STAT3. En nuestro estudio, CDI-SPE mostró un mayor riesgo de sobreexpresión de pTyr<sup>705</sup>-STAT3 en comparación con los subtipos lobulillares y otros

subtipos invasivos de cáncer, contrario a otros informes que asocian niveles más altos de la proteína con el subtipo lobulillar [92].

La ausencia de nódulos (pN0) actuó como determinante de la expresión del residuo Serina 727 en ausencia de tirosina 705 al compararlos con casos pN0 e, inversamente, fue mayor la expresión del patrón expresión elevada de pTyr<sup>705</sup> en ausencia de Serina 727 en los casos pN1 al compararlos con pN2, tales asociaciones han sido indirectamente descritas previamente donde pTyr<sup>705</sup>-STAT3 ha mostrado una posible asociación con metástasis ganglionares y, por lo tanto, se ha sugerido como un biomarcador de mal pronóstico [62,106], sin embargo, también ha sido descrito como un factor no asociado al estado ganglionar axilar [95]. Esta ambivalencia en observaciones puede ser explicada por la cooperación que existe entre ambos residuos en distintos estadios de la enfermedad, tal como ha sido sugerido [16,107].

En el análisis de supervivencia global, pSer<sup>727</sup>-STAT3 actuó acorde al mal pronóstico observado en la población general al encontrar resultados similares en la sobrevida de las pacientes con >1 nódulo (pN1-pN3) al compararlas con aquellas sin afectación de nódulos (pN0). Estos hallazgos retratan una pista importante en el pronóstico general del paciente, siendo la presencia de afectación ganglionar un factor independiente para el mal pronóstico, y pSer<sup>727</sup>-STAT3 como un factor no modificador del mal pronóstico.

Estudios han reportado la asociación entre tumores de menor tamaño y el riesgo de sobreexpresar pTyr<sup>705</sup>-STAT3 [92,94,95,108], sin embargo, dicha relación no fue encontrada en nuestro estudio al correlacionar únicamente las dimensiones del tumor en cm. Sin embargo, al categorizar los grupos de acuerdo con tamaño y efectación de tejidos (pT de TNM), sí fue posible observar mayor riesgo de sobreexpresión de pTyr<sup>705</sup>-STAT3 en los tumores pequeños <2 cm sin afectación a tejidos (pT1-pT2) los cuales contribuyeron a una mejor supervivencia global y, de modo contrastante, se observó mayor riesgo de expresión nuclear de pSer<sup>727</sup>-STAT3 en los tumores >2 cm y con afectación tisular (pT3-pT4) ( $p = 0.0301$ ), acorde con reportes anteriores [86], siendo este grupo el que reportó disminución en la supervivencia global tanto en la población general como en aquellos tumores con sobreexpresión de pSer<sup>727</sup>-STAT3.

Los tumores de alto grado (GH3) presentaron mayor riesgo de expresar al residuo pSer<sup>727</sup>-STAT3, contrario a lo sucedido con los tumores mejor diferenciados (GH1), donde

pTyr<sup>705</sup> presentó mayor prevalencia. Esta asociación de pSer<sup>727</sup> con tumores de alto grado histológico ha sido descrita previamente en otro tipo de cáncer, como el cervicouterino [33], en donde revelan también su asociación con el marcador de proliferación Ki-67, sin embargo, no fue posible asociar este marcador a la expresión de pSer<sup>727</sup>.

A pesar de que ambos residuos se expresaron mayormente en estadios tempranos de la enfermedad (IA-IIA) contrario a lo reportado anteriormente [86], mientras que la expresión de pTyr<sup>705</sup> fue significativamente mayor en estadios metastásicos (IV) ( $p = 0.0397$ ). Asimismo, se evidenció un riesgo casi 5 veces mayor en el estadio IIIB al coexpresar el binomino pSer<sup>727+</sup> / pTyr<sup>705-</sup> ( $p = 0.0082$ ), lo cual contribuye en parte al papel de pSer<sup>727</sup> en el mal pronóstico observado en estos estadios de la enfermedad, reflejado en la SG.

Al asociarse la expresión con estatus de los receptores hormonales, se observó que, hubo mayor riesgo de sobreexpresar pSer<sup>727</sup>-STAT3 en aquellos casos negativos a RP. De la misma manera, aquellos tumores con un patrón de RE+/RP+ presentaron un efecto protector ante pSer<sup>727</sup>-STAT3. Lo anterior ha sido observado en líneas celulares de cáncer de mama con RE-, en donde la sobreexpresión de pSer<sup>727</sup>-STAT3 se correlacionó significativamente con el estado negativo de RE [86]. Estos resultados, aunado al hecho de que hay mayor expresión en los casos con IE bajo, sugieren que este pSer<sup>727</sup>-STAT3 puede estar involucrado en la patogénesis del cáncer de mama de una manera dependiente del receptor de estrógeno.

Se ha sugerido también que la vía 17 $\beta$ -estradiol-ER inhibe la actividad de STAT3 en células de CM [109], donde tales observaciones pueden apoyar el papel de CM con RE- en la activación de STAT3 [62]. Bajo este sentido, STAT3 ha sido descrito como un elemento clave implicado en la regulación de los mecanismos de invasión, como la remodelación de la matriz extracelular y la migración celular, especialmente en el CM Triple Negativo (TN) [110], el cual carece de estos receptores hormonales previamente asociados en el presente estudio.

## 4.1. Conclusiones

A pesar de no haber encontrado a pSer<sup>727</sup>-STAT3 como un factor independiente de supervivencia global disminuida, fue posible asociarlo a factores de mal pronóstico determinantes de una sobrevida menor en nuestra población de estudio:

### **pSer727-STAT3 asociado a factores de mal pronóstico:**

- Dependiente de mayor edad (51-60 y 61-70 años).
- Obesidad grado II.
- Receptores estrogénicos (RE) negativos
- Tumores HER2+ con Ki-67 bajo.
- Tumores de mayor tamaño (>5 cm) y de cualquier tamaño con afectación tisular (pT4).
- Tumores de alto grado en asociación con Ki-67 alto.

### **pSer727-STAT3 asociado a factores de mal pronóstico:**

- Menor exposición endógena a estrógenos
- Ausencia de nódulos
- Sin asociación con subtipo histológico más frecuente.

### **pSer727-STAT3 asociado a supervivencia global disminuida:**

- Pacientes de 51-60 años.
- Postmenopáusicas con RE negativos.
- Subtipos moleculares Luminal B HER2+, HER2 y TN.
- Tumores >10 cm.
- Tumores de cualquier tamaño con afectación tisular (pT4).
- Presencia de nódulos.
- Menor exposición endógena a estrógenos
- Recidiva.

La dicotomía encontrada en algunos factores respecto a pTyr<sup>705</sup> asevera la plétora de funciones que ambas proteínas llevan a cabo de manera independiente. Este estudio, así como los realizados anteriormente por diversos autores, han descrito diferencias sustanciales con respecto al papel desempeñado por STAT3 en el pronóstico del cáncer de mama, especulamos que tales hallazgos inconsistentes cumplen con la naturaleza heterogénea entre las poblaciones de investigación y, también, los criterios de evaluación utilizados para determinar la sobreexpresión de esta proteína en las muestras de tejido.

Las limitaciones encontradas en el presente estudio retratan la necesidad de ofrecerle continuidad al seguimiento de las pacientes para mejorar la ventana de

observación en cuanto a supervivencia. Asimismo, la información clínica disponible redujo los datos en ciertos grupos para el análisis.

#### 4.2. Recomendaciones

Una de las funciones menos investigadas de STAT3 compete directamente al residuo pSer<sup>727</sup>-STAT3 y su acción a nivel mitocondrial, el cual de manera indirecta pudimos apreciar en la evaluación de la tinción total (resultados no discutidos en este trabajo). Bajo el supuesto de que la fosforilación de monómeros STAT3 en su residuo Ser<sup>727</sup> permiten la translocación de STAT3 a las mitocondrias sin dimerización (mitoSTAT3) [43], esta podría apreciarse en la evaluación de la tinción a nivel de citoplasma.

## REFERENCIAS

1. Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Parkin, D.M.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Bray, F. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer* **2021**, doi:10.1002/ijc.33588.
2. Cárdenas-Sánchez, J.; Valle-Solís, A.A.; Arce-Salinas, C.; Bargalló-Rocha, J.E.; Bautista-Piña, V.; Cervantes-Sánchez, M.G.; Flores-Balcázar, C.H.; Lara Tamburrino, M.C.; Lluch Hernández, A.; Maffuz Aziz, A.; et al. *Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario.*, 9 ed.; Colima, México. , 2021; p. 233.
3. Justo, N.; Wilking, N.; Jönsson, B.; Luciani, S.; Cazap, E. A Review of Breast Cancer Care and Outcomes in Latin America. *The Oncologist* **2013**, *18*, 248-256, doi:10.1634/theoncologist.2012-0373.
4. Harris, L.N.; Ismaila, N.; McShane, L.M.; Andre, F.; Collyar, D.E.; Gonzalez-Angulo, A.M.; Hammond, E.H.; Kuderer, N.M.; Liu, M.C.; Mennel, R.G.; 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. *J Clin Oncol* **2016**, *34*, 1134-1150, doi:10.1200/JCO.2015.65.2289.
5. Weigel, M.T.; Dowsett, M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocrine-Related Cancer* **2010**, *17*, R245-R262, doi:10.1677/erc-10-0136.
6. Łukasiewicz, S.; Czezelewski, M.; Forma, A.; Baj, J.; Sitarz, R.; Stanisławek, A. Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. *Cancers* **2021**, *13*, 4287, doi:10.3390/cancers13174287.
7. Harbeck, N.; Penault-Llorca, F.; Cortes, J.; Gnant, M.; Houssami, N.; Poortmans, P.; Ruddy, K.; Tsang, J.; Cardoso, F. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers* **2019**, *5*, 66, doi:10.1038/s41572-019-0111-2.
8. Bloom, H.J.; Richardson, W.W. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* **1957**, *11*, 359-377, doi:10.1038/bjc.1957.43.
9. Elston, C.W.; Ellis, I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* **1991**, *19*, 403-410, doi:10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x.
10. Allison, K.H.; Hammond, M.E.H.; Dowsett, M.; McKernin, S.E.; Carey, L.A.; Fitzgibbons, P.L.; Hayes, D.F.; Lakhani, S.R.; Chavez-MacGregor, M.; Perlmutter, J.; et al. Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology / College of American Pathologists Guideline Update. *Arch Pathol Lab Med* **2020**, *144*, 545-563, doi:10.5858/arpa.2019-0904-SA.
11. Coates, A.S.; Winer, E.P.; Goldhirsch, A.; Gelber, R.D.; Gnant, M.; Piccart-Gebhart, M.; Thurlimann, B.; Senn, H.J.; Panel, M. Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol* **2015**, *26*, 1533-1546, doi:10.1093/annonc/mdv221.
12. Rojas-Lima, E.; Gamboa-Loira, B.; Cebrián, M.E.; Rothenberg, S.J.; López-Carrillo, L. A cumulative index of exposure to endogenous estrogens and breast cancer by molecular subtypes in northern Mexican women. *Breast Cancer Research and Treatment* **2020**, *180*, 791-800, doi:10.1007/s10549-020-05562-0.
13. Hortobagyi, G.N.; Edge, S.B.; Giuliano, A. New and Important Changes in the TNM Staging System for Breast Cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* **2018**, *38*, 457-467, doi:10.1200/EDBK\_201313.
14. O'Shea, J.J.; Schwartz, D.M.; Villarino, A.V.; Gadina, M.; McInnes, I.B.; Laurence, A. The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. *Annu Rev Med* **2015**, *66*, 311-328, doi:10.1146/annurev-med-051113-024537.
15. Guanizo, A.C.; Fernando, C.D.; Garama, D.J.; Gough, D.J. STAT3: a multifaceted oncoprotein. *Growth Factors* **2018**, *36*, 1-14, doi:10.1080/08977194.2018.1473393.
16. Aigner, P.; Just, V.; Stoiber, D. STAT3 isoforms: Alternative fates in cancer? *Cytokine* **2019**, *118*, 27-34, doi:10.1016/j.cyto.2018.07.014.
17. Zhang, H.X.; Yang, P.L.; Li, E.M.; Xu, L.Y. STAT3beta, a distinct isoform from STAT3. *Int J Biochem Cell Biol* **2019**, *110*, 130-139, doi:10.1016/j.biocel.2019.02.006.

18. Ng, I.H.; Ng, D.C.; Jans, D.A.; Bogoyevitch, M.A. Selective STAT3-alpha or -beta expression reveals spliceform-specific phosphorylation kinetics, nuclear retention and distinct gene expression outcomes. *Biochem J* **2012**, *447*, 125-136, doi:10.1042/BJ20120941.
19. Aigner, P.; Mizutani, T.; Horvath, J.; Eder, T.; Heber, S.; Lind, K.; Just, V.; Moll, H.P.; Yeroslaviz, A.; Fischer, M.J.M.; et al. STAT3beta is a tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Blood Adv* **2019**, *3*, 1989-2002, doi:10.1182/bloodadvances.2018026385.
20. Heinrich, P.C.; Behrmann, I.; Haan, S.; Hermanns, H.M.; Muller-Newen, G.; Schaper, F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* **2003**, *374*, 1-20, doi:10.1042/BJ20030407.
21. Galoczova, M.; Coates, P.; Vojtesek, B. STAT3, stem cells, cancer stem cells and p63. *Cell Mol Biol Lett* **2018**, *23*, 12, doi:10.1186/s11658-018-0078-0.
22. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
23. Banerjee, K.; Resat, H. Constitutive activation of STAT3 in breast cancer cells: A review. *Int J Cancer* **2016**, *138*, 2570-2578, doi:10.1002/ijc.29923.
24. Gritsko, T.; Williams, A.; Turkson, J.; Kaneko, S.; Bowman, T.; Huang, M.; Nam, S.; Eweis, I.; Diaz, N.; Sullivan, D.; et al. Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells. *Clin Cancer Res* **2006**, *12*, 11-19, doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1752.
25. Doucette, T.A.; Kong, L.Y.; Yang, Y.; Ferguson, S.D.; Yang, J.; Wei, J.; Qiao, W.; Fuller, G.N.; Bhat, K.P.; Aldape, K.; et al. Signal transducer and activator of transcription 3 promotes angiogenesis and drives malignant progression in glioma. *Neuro Oncol* **2012**, *14*, 1136-1145, doi:10.1093/neuonc/nos139.
26. Xiong, H.; Hong, J.; Du, W.; Lin, Y.W.; Ren, L.L.; Wang, Y.C.; Su, W.Y.; Wang, J.L.; Cui, Y.; Wang, Z.H.; et al. Roles of STAT3 and ZEB1 proteins in E-cadherin down-regulation and human colorectal cancer epithelial-mesenchymal transition. *J Biol Chem* **2012**, *287*, 5819-5832, doi:10.1074/jbc.M111.295964.
27. Sherry, M.M.; Reeves, A.; Wu, J.K.; Cochran, B.H. STAT3 is required for proliferation and maintenance of multipotency in glioblastoma stem cells. *Stem Cells* **2009**, *27*, 2383-2392, doi:10.1002/stem.185.
28. Garg, M.; Shanmugam, M.K.; Bhardwaj, V.; Goel, A.; Gupta, R.; Sharma, A.; Baligar, P.; Kumar, A.P.; Goh, B.C.; Wang, L.; et al. The pleiotropic role of transcription factor STAT3 in oncogenesis and its targeting through natural products for cancer prevention and therapy. *Med Res Rev* **2020**, doi:10.1002/med.21761.
29. Liu, L.C.; Su, C.H.; Wang, H.C.; Chang, W.S.; Tsai, C.W.; Maa, M.C.; Tsai, C.H.; Tsai, F.J.; Bau, D.T. Contribution of personalized Cyclin D1 genotype to triple negative breast cancer risk. *Biomedicine (Taipei)* **2014**, *4*, 3, doi:10.7603/s40681-014-0003-4.
30. Buettner, R.; Huang, M.; Gritsko, T.; Karras, J.; Enkemann, S.; Mesa, T.; Nam, S.; Yu, H.; Jove, R. Activated signal transducers and activators of transcription 3 signaling induces CD46 expression and protects human cancer cells from complement-dependent cytotoxicity. *Mol Cancer Res* **2007**, *5*, 823-832, doi:10.1158/1541-7786.MCR-06-0352.
31. Bromberg, J.F.; Wrzeszczynska, M.H.; Devgan, G.; Zhao, Y.; Pestell, R.G.; Albanese, C.; Darnell, J.E., Jr. Stat3 as an oncogene. *Cell* **1999**, *98*, 295-303, doi:10.1016/s0092-8674(00)81959-5.
32. Yu, H.; Kortylewski, M.; Pardoll, D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* **2007**, *7*, 41-51, doi:10.1038/nri1995.
33. Yang, S.F.; Yuan, S.S.; Yeh, Y.T.; Wu, M.T.; Su, J.H.; Hung, S.C.; Chai, C.Y. The role of p-STAT3 (ser727) revealed by its association with Ki-67 in cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* **2005**, *98*, 446-452, doi:10.1016/j.ygyno.2005.05.032.
34. Song, Y.; Qian, L.; Song, S.; Chen, L.; Zhang, Y.; Yuan, G.; Zhang, H.; Xia, Q.; Hu, M.; Yu, M.; et al. Fra-1 and Stat3 synergistically regulate activation of human MMP-9 gene. *Mol Immunol* **2008**, *45*, 137-143, doi:10.1016/j.molimm.2007.04.031.
35. Lo, H.W.; Hsu, S.C.; Xia, W.; Cao, X.; Shih, J.Y.; Wei, Y.; Abbruzzese, J.L.; Hortobagyi, G.N.; Hung, M.C. Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression. *Cancer Res* **2007**, *67*, 9066-9076, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0575.
36. Kamran, M.Z.; Patil, P.; Gude, R.P. Role of STAT3 in cancer metastasis and translational advances. *Biomed Res Int* **2013**, *2013*, 421821, doi:10.1155/2013/421821.

37. Wang, S.; Yao, Y.; Yao, M.; Fu, P.; Wang, W. Interleukin-22 promotes triple negative breast cancer cells migration and paclitaxel resistance through JAK-STAT3/MAPKs/AKT signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* **2018**, *503*, 1605-1609, doi:10.1016/j.bbrc.2018.07.088.
38. Chang, R.; Song, L.; Xu, Y.; Wu, Y.; Dai, C.; Wang, X.; Sun, X.; Hou, Y.; Li, W.; Zhan, X.; et al. Loss of Wwox drives metastasis in triple-negative breast cancer by JAK2/STAT3 axis. *Nat Commun* **2018**, *9*, 3486, doi:10.1038/s41467-018-05852-8.
39. Xie, Q.; Yang, Z.; Huang, X.; Zhang, Z.; Li, J.; Ju, J.; Zhang, H.; Ma, J. Ilamycin C induces apoptosis and inhibits migration and invasion in triple-negative breast cancer by suppressing IL-6/STAT3 pathway. *J Hematol Oncol* **2019**, *12*, 60, doi:10.1186/s13045-019-0744-3.
40. Pawlus, M.R.; Wang, L.; Hu, C.J. STAT3 and HIF1alpha cooperatively activate HIF1 target genes in MDA-MB-231 and RCC4 cells. *Oncogene* **2014**, *33*, 1670-1679, doi:10.1038/onc.2013.115.
41. Vander Heiden, M.G.; Cantley, L.C.; Thompson, C.B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **2009**, *324*, 1029-1033, doi:10.1126/science.1160809.
42. Sabharwal, S.S.; Schumacker, P.T. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat Rev Cancer* **2014**, *14*, 709-721, doi:10.1038/nrc3803.
43. Garama, D.J.; White, C.L.; Balic, J.J.; Gough, D.J. Mitochondrial STAT3: Powering up a potent factor. *Cytokine* **2016**, *87*, 20-25, doi:10.1016/j.cyto.2016.05.019.
44. Maritano, D.; Sugrue, M.L.; Tininini, S.; Dewilde, S.; Strobl, B.; Fu, X.; Murray-Tait, V.; Chiarle, R.; Poli, V. The STAT3 isoforms alpha and beta have unique and specific functions. *Nat Immunol* **2004**, *5*, 401-409, doi:10.1038/ni1052.
45. Gough, D.J.; Corlett, A.; Schlessinger, K.; Wegrzyn, J.; Larner, A.C.; Levy, D.E. Mitochondrial STAT3 supports Ras-dependent oncogenic transformation. *Science* **2009**, *324*, 1713-1716, doi:10.1126/science.1171721.
46. Demaria, M.; Giorgi, C.; Lebedzinska, M.; Esposito, G.; D'Angeli, L.; Bartoli, A.; Gough, D.J.; Turkson, J.; Levy, D.E.; Watson, C.J.; et al. A STAT3-mediated metabolic switch is involved in tumour transformation and STAT3 addiction. *Aging (Albany NY)* **2010**, *2*, 823-842, doi:10.18632/aging.100232.
47. Zhong, Z.; Wen, Z.; Darnell, J.E., Jr. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* **1994**, *264*, 95-98, doi:10.1126/science.8140422.
48. Aziz, M.H.; Manoharan, H.T.; Church, D.R.; Dreckschmidt, N.E.; Zhong, W.; Oberley, T.D.; Wilding, G.; Verma, A.K. Protein kinase Cepsilon interacts with signal transducers and activators of transcription 3 (Stat3), phosphorylates Stat3Ser727, and regulates its constitutive activation in prostate cancer. *Cancer Res* **2007**, *67*, 8828-8838, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1604.
49. Bharadwaj, U.; Kasembeli, M.M.; Robinson, P.; Tweardy, D.J. Targeting Janus Kinases and Signal Transducer and Activator of Transcription 3 to Treat Inflammation, Fibrosis, and Cancer: Rationale, Progress, and Caution. *Pharmacol Rev* **2020**, *72*, 486-526, doi:10.1124/pr.119.018440.
50. Qin, J.J.; Yan, L.; Zhang, J.; Zhang, W.D. STAT3 as a potential therapeutic target in triple negative breast cancer: a systematic review. *J Exp Clin Cancer Res* **2019**, *38*, 195, doi:10.1186/s13046-019-1206-z.
51. Kusaba, T.; Nakayama, T.; Yamazumi, K.; Yakata, Y.; Yoshizaki, A.; Inoue, K.; Nagayasu, T.; Sekine, I. Activation of STAT3 is a marker of poor prognosis in human colorectal cancer. *Oncol Rep* **2006**, *15*, 1445-1451.
52. Takemoto, S.; Ushijima, K.; Kawano, K.; Yamaguchi, T.; Terada, A.; Fujiyoshi, N.; Nishio, S.; Tsuda, N.; Ijichi, M.; Kakuma, T.; et al. Expression of activated signal transducer and activator of transcription-3 predicts poor prognosis in cervical squamous-cell carcinoma. *Br J Cancer* **2009**, *101*, 967-972, doi:10.1038/sj.bjc.6605212.
53. Schoppmann, S.F.; Jesch, B.; Friedrich, J.; Jomrich, G.; Maroske, F.; Birner, P. Phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) correlates with Her-2 status, carbonic anhydrase 9 expression and prognosis in esophageal cancer. *Clin Exp Metastasis* **2012**, *29*, 615-624, doi:10.1007/s10585-012-9475-3.
54. Sriuranpong, V.; Park, J.I.; Amornphimoltham, P.; Patel, V.; Nelkin, B.D.; Gutkind, J.S. Epidermal growth factor receptor-independent constitutive activation of STAT3 in head and neck squamous cell carcinoma is mediated by the autocrine/paracrine stimulation of the interleukin 6/gp130 cytokine system. *Cancer Res* **2003**, *63*, 2948-2956.

55. Macha, M.A.; Matta, A.; Kaur, J.; Chauhan, S.S.; Thakar, A.; Shukla, N.K.; Gupta, S.D.; Ralhan, R. Prognostic significance of nuclear pSTAT3 in oral cancer. *Head Neck* **2011**, *33*, 482-489, doi:10.1002/hed.21468.
56. Bournazou, E.; Bromberg, J. Targeting the tumor microenvironment: JAK-STAT3 signaling. *JAKSTAT* **2013**, *2*, e23828, doi:10.4161/jkst.23828.
57. Zhang, H.F.; Chen, Y.; Wu, C.; Wu, Z.Y.; Tweardy, D.J.; Alshareef, A.; Liao, L.D.; Xue, Y.J.; Wu, J.Y.; Chen, B.; et al. The Opposing Function of STAT3 as an Oncoprotein and Tumor Suppressor Is Dictated by the Expression Status of STAT3beta in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* **2016**, *22*, 691-703, doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-1253.
58. Banerjee, A.S.; Pal, A.D.; Banerjee, S. Epstein-Barr virus-encoded small non-coding RNAs induce cancer cell chemoresistance and migration. *Virology* **2013**, *443*, 294-305, doi:10.1016/j.virol.2013.05.020.
59. Berishaj, M.; Gao, S.P.; Ahmed, S.; Leslie, K.; Al-Ahmadie, H.; Gerald, W.L.; Bornmann, W.; Bromberg, J.F. Stat3 is tyrosine-phosphorylated through the interleukin-6/ glycoprotein 130/Janus kinase pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res* **2007**, *9*, R32, doi:10.1186/bcr1680.
60. Lieblein, J.C.; Ball, S.; Hutzen, B.; Sasser, A.K.; Lin, H.J.; Huang, T.H.; Hall, B.M.; Lin, J. STAT3 can be activated through paracrine signaling in breast epithelial cells. *BMC Cancer* **2008**, *8*, 302, doi:10.1186/1471-2407-8-302.
61. Dolled-Filhart, M.; Camp, R.L.; Kowalski, D.P.; Smith, B.L.; Rimm, D.L. Tissue microarray analysis of signal transducers and activators of transcription 3 (Stat3) and phospho-Stat3 (Tyr705) in node-negative breast cancer shows nuclear localization is associated with a better prognosis. *Clin Cancer Res* **2003**, *9*, 594-600.
62. Hsieh, F.C.; Cheng, G.; Lin, J. Evaluation of potential Stat3-regulated genes in human breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **2005**, *335*, 292-299, doi:10.1016/j.bbrc.2005.07.075.
63. Lai, R.; Navid, F.; Rodriguez-Galindo, C.; Liu, T.; Fuller, C.E.; Ganti, R.; Dien, J.; Dalton, J.; Billups, C.; Khoury, J.D. STAT3 is activated in a subset of the Ewing sarcoma family of tumours. *J Pathol* **2006**, *208*, 624-632, doi:10.1002/path.1941.
64. Yang, S.F.; Wang, S.N.; Wu, C.F.; Yeh, Y.T.; Chai, C.Y.; Chunag, S.C.; Sheen, M.C.; Lee, K.T. Altered p-STAT3 (tyr705) expression is associated with histological grading and intratumour microvessel density in hepatocellular carcinoma. *J Clin Pathol* **2007**, *60*, 642-648, doi:10.1136/jcp.2006.036970.
65. Seethala, R.R.; Gooding, W.E.; Handler, P.N.; Collins, B.; Zhang, Q.; Siegfried, J.M.; Grandis, J.R. Immunohistochemical analysis of phosphotyrosine signal transducer and activator of transcription 3 and epidermal growth factor receptor autocrine signaling pathways in head and neck cancers and metastatic lymph nodes. *Clin Cancer Res* **2008**, *14*, 1303-1309, doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1543.
66. Min, H.; Wei-hong, Z. Constitutive activation of signal transducer and activator of transcription 3 in epithelial ovarian carcinoma. *J Obstet Gynaecol Res* **2009**, *35*, 918-925, doi:10.1111/j.1447-0756.2009.01045.x.
67. Birner, P.; Toumangelova-Uzeir, K.; Natchev, S.; Guentchev, M. STAT3 tyrosine phosphorylation influences survival in glioblastoma. *J Neurooncol* **2010**, *100*, 339-343, doi:10.1007/s11060-010-0195-8.
68. Monnien, F.; Zaki, H.; Borg, C.; Mougin, C.; Bosset, J.F.; Mercier, M.; Arbez-Gindre, F.; Kantelip, B. Prognostic value of phosphorylated STAT3 in advanced rectal cancer: a study from 104 French patients included in the EORTC 22921 trial. *J Clin Pathol* **2010**, *63*, 873-878, doi:10.1136/jcp.2010.076414.
69. Sato, T.; Neilson, L.M.; Peck, A.R.; Liu, C.; Tran, T.H.; Witkiewicz, A.; Hyslop, T.; Nevalainen, M.T.; Sauter, G.; Rui, H. Signal transducer and activator of transcription-3 and breast cancer prognosis. *Am J Cancer Res* **2011**, *1*, 347-355.
70. Woo, S.; Lee, B.L.; Yoon, J.; Cho, S.J.; Baik, T.K.; Chang, M.S.; Lee, H.E.; Park, J.W.; Kim, Y.H.; Kim, W.H. Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription 3 correlates with better prognosis, cell proliferation and hypoxia-inducible factor-1alpha in human gastric cancer. *Pathobiology* **2011**, *78*, 295-301, doi:10.1159/000321696.
71. Sonnenblick, A.; Shriki, A.; Galun, E.; Axelrod, J.H.; Daum, H.; Rottenberg, Y.; Hamburger, T.; Mali, B.; Peretz, T. Tissue microarray-based study of patients with lymph node-positive breast cancer shows tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 (tyrosine705-STAT3) is a marker of good prognosis. *Clin Transl Oncol* **2012**, *14*, 232-236, doi:10.1007/s12094-012-0789-z.

72. Lin, G.S.; Yang, L.J.; Wang, X.F.; Chen, Y.P.; Tang, W.L.; Chen, L.; Lin, Z.X. STAT3 Tyr705 phosphorylation affects clinical outcome in patients with newly diagnosed supratentorial glioblastoma. *Med Oncol* **2014**, *31*, 924, doi:10.1007/s12032-014-0924-5.
73. Wen, Z.; Zhong, Z.; Darnell, J.E. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* **1995**, *82*, 241-250, doi:10.1016/0092-8674(95)90311-9.
74. Wang, R.; Cherukuri, P.; Luo, J. Activation of Stat3 Sequence-specific DNA Binding and Transcription by p300/CREB-binding Protein-mediated Acetylation. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 11528-11534, doi:10.1074/jbc.m413930200.
75. Schuringa, J.-J.; Schepers, H.; Vellenga, E.; Kruijer, W. Ser727-dependent transcriptional activation by association of p300 with STAT3 upon IL-6 stimulation. *FEBS Letters* **2001**, *495*, 71-76, doi:10.1016/S0014-5793(01)02354-7.
76. Lufei, C.; Koh, T.H.; Uchida, T.; Cao, X. Pin1 is required for the Ser727 phosphorylation-dependent Stat3 activity. *Oncogene* **2007**, *26*, 7656-7664, doi:10.1038/sj.onc.1210567.
77. Nakada, S.; Kuboki, S.; Nojima, H.; Yoshitomi, H.; Furukawa, K.; Takayashiki, T.; Takano, S.; Miyazaki, M.; Ohtsuka, M. Roles of Pin1 as a Key Molecule for EMT Induction by Activation of STAT3 and NF- $\kappa$ B in Human Gallbladder Cancer. *Annals of Surgical Oncology* **2019**, *26*, 907-917, doi:10.1245/s10434-018-07132-7.
78. Lee, H.; Herrmann, A.; Deng, J.-H.; Kujawski, M.; Niu, G.; Li, Z.; Forman, S.; Jove, R.; Pardoll, D.M.; Yu, H. Persistently Activated Stat3 Maintains Constitutive NF- $\kappa$ B Activity in Tumors. *Cancer Cell* **2009**, *15*, 283-293, doi:10.1016/j.ccr.2009.02.015.
79. Zhang, Y.; Liu, G.; Dong, Z. MSK1 and JNKs Mediate Phosphorylation of STAT3 in UVA-irradiated Mouse Epidermal JB6 Cells. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 42534-42542, doi:10.1074/jbc.m106044200.
80. Androutsellis-Theotokis, A.; Leker, R.R.; Soldner, F.; Hoepfner, D.J.; Ravin, R.; Poser, S.W.; Rueger, M.A.; Bae, S.-K.; Kittappa, R.; McKay, R.D.G. Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo. *Nature* **2006**, *442*, 823-826, doi:10.1038/nature04940.
81. Liu, H.; Ma, Y.; Cole, S.M.; Zander, C.; Chen, K.-H.; Karras, J.; Pope, R.M. Serine phosphorylation of STAT3 is essential for Mcl-1 expression and macrophage survival. *Blood* **2003**, *102*, 344-352, doi:10.1182/blood-2002-11-3396.
82. Shi, X.; Zhang, H.; Paddon, H.; Lee, G.; Cao, X.; Pelech, S. Phosphorylation of STAT3 serine-727 by cyclin-dependent kinase 1 is critical for nocodazole-induced mitotic arrest. *Biochemistry* **2006**, *45*, 5857-5867, doi:10.1021/bi052490j.
83. Wegrzyn, J.; Potla, R.; Chwae, Y.J.; Sepuri, N.B.; Zhang, Q.; Koeck, T.; Derecka, M.; Szczepanek, K.; Szelag, M.; Gornicka, A.; et al. Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration. *Science* **2009**, *323*, 793-797, doi:10.1126/science.1164551.
84. Frank, D.A.; Mahajan, S.; Ritz, J. B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia contain signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 and STAT3 constitutively phosphorylated on serine residues. *Journal of Clinical Investigation* **1997**, *100*, 3140-3148, doi:10.1172/jci119869.
85. Qin, H.R.; Kim, H.-J.; Kim, J.-Y.; Hurt, E.M.; Klarmann, G.J.; Kawasaki, B.T.; Duhagon Serrat, M.A.; Farrar, W.L. Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 through a Phosphomimetic Serine 727 Promotes Prostate Tumorigenesis Independent of Tyrosine 705 Phosphorylation. *Cancer Research* **2008**, *68*, 7736-7741, doi:10.1158/0008-5472.can-08-1125.
86. Yeh, Y.T.; Ou-Yang, F.; Chen, I.F.; Yang, S.F.; Wang, Y.Y.; Chuang, H.Y.; Su, J.H.; Hou, M.F.; Yuan, S.S. STAT3 ser727 phosphorylation and its association with negative estrogen receptor status in breast infiltrating ductal carcinoma. *Int J Cancer* **2006**, *118*, 2943-2947, doi:10.1002/ijc.21771.
87. Choi, C.H.; Song, S.Y.; Kang, H.; Lee, Y.Y.; Kim, C.J.; Lee, J.W.; Kim, T.J.; Kim, B.G.; Lee, J.H.; Bae, D.S. Prognostic significance of p-STAT3 in patients with bulky cervical carcinoma undergoing neoadjuvant chemotherapy. *J Obstet Gynaecol Res* **2010**, *36*, 304-310, doi:10.1111/j.1447-0756.2009.01131.x.
88. Lin, G.S.; Chen, Y.P.; Lin, Z.X.; Wang, X.F.; Zheng, Z.Q.; Chen, L. STAT3 serine 727 phosphorylation influences clinical outcome in glioblastoma. *Int J Clin Exp Pathol* **2014**, *7*, 3141-3149.
89. Sauerbrei, W.; Taube, S.E.; Mcshane, L.M.; Cavenagh, M.M.; Altman, D.G. Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK): An Abridged Explanation

- and Elaboration. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **2018**, *110*, 803-811, doi:10.1093/jnci/djy088.
90. Davis, M.; Tripathi, S.; Hughley, R.; He, Q.; Bae, S.; Karanam, B.; Martini, R.; Newman, L.; Colomb, W.; Grizzle, W.; et al. AR negative triple negative or "quadruple negative" breast cancers in African American women have an enriched basal and immune signature. *PLoS One* **2018**, *13*, e0196909, doi:10.1371/journal.pone.0196909.
  91. Perkins, S.M.; Bales, C.; Vladislav, T.; Althouse, S.; Miller, K.D.; Sandusky, G.; Badve, S.; Nakshatri, H. TFAP2C expression in breast cancer: correlation with overall survival beyond 10 years of initial diagnosis. *Breast Cancer Res Treat* **2015**, *152*, 519-531, doi:10.1007/s10549-015-3492-2.
  92. Nilsson, L.; Sandén, E.; Khazaei, S.; Tryggvadottir, H.; Nodin, B.; Jirström, K.; Borgquist, S.; Isaksson, K.; Jernström, H. Patient Characteristics Influence Activated Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) Levels in Primary Breast Cancer—Impact on Prognosis. *Frontiers in Oncology* **2020**, *10*, doi:10.3389/fonc.2020.01278.
  93. Santillán-Benítez, J.G.; Mendieta-Zerón, H.; Gómez-Oliván, L.M.; Ordóñez Quiroz, A.; Torres-Juárez, J.J.; González-Bañales, J.M. JAK2, STAT3 and SOCS3 gene expression in women with and without breast cancer. *Gene* **2014**, *547*, 70-76, doi:10.1016/j.gene.2014.06.025.
  94. Wang, Y.; Wang, Q.; Tang, C.H.; Chen, H.D.; Hu, G.N.; Shao, J.K.; Dong, X.F.; Jin, L.L.; Wang, C.Q. p-STAT3 expression in breast cancer correlates negatively with tumor size and HER2 status. *Medicine (Baltimore)* **2021**, *100*, e25124, doi:10.1097/MD.00000000000025124.
  95. Aleskandarany, M.A.; Agarwal, D.; Negm, O.H.; Ball, G.; Elmouna, A.; Ashankyty, I.; Nuglozeh, E.; Fazaludeen, M.F.; Diez-Rodriguez, M.; Nolan, C.C.; et al. The prognostic significance of STAT3 in invasive breast cancer: analysis of protein and mRNA expressions in large cohorts. *Breast Cancer Res Treat* **2016**, *156*, 9-20, doi:10.1007/s10549-016-3709-z.
  96. Benz, C.C. Impact of aging on the biology of breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **2008**, *66*, 65-74, doi:10.1016/j.critrevonc.2007.09.001.
  97. Reynoso-Noverón, N.; Villarreal-Garza, C.; Soto-Perez-De-Celis, E.; Arce-Salinas, C.; Matus-Santos, J.; Ramírez-Ugalde, M.T.; Alvarado-Miranda, A.; Cabrera-Galeana, P.; Meneses-García, A.; Lara-Medina, F.; et al. Clinical and Epidemiological Profile of Breast Cancer in Mexico: Results of the Seguro Popular. *Journal of Global Oncology* **2017**, *3*, 757-764, doi:10.1200/jgo.2016.007377.
  98. Hortobagyi, G.N.; de la Garza Salazar, J.; Pritchard, K.; Amadori, D.; Haidinger, R.; Hudis, C.A.; Khaled, H.; Liu, M.C.; Martin, M.; Namer, M.; et al. The global breast cancer burden: variations in epidemiology and survival. *Clin Breast Cancer* **2005**, *6*, 391-401, doi:10.3816/cbc.2005.n.043.
  99. Flores-Díaz, D.; Arce, C.; Flores-Luna, L.; Reynoso-Noveron, N.; Lara-Medina, F.; Matus, J.A.; Bargallo-Rocha, E.; Perez, V.; Villarreal-Garza, C.; Cabrera-Galeana, P.; et al. Impact of invasive lobular carcinoma on long-term outcomes in Mexican breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* **2019**, *176*, 243-249, doi:10.1007/s10549-019-05234-8.
  100. Howlader N; Noone AM; Krapcho M; Miller D; Brest A; Yu M, R.J., Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2018, National Cancer Institute. Bethesda, MD, , based on November 2020 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2021. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2018. **2021**.
  101. Nasim, Z.; Girtain, C.; Gupta, V.; Patel, I.; Hossain, M.A. Breast Cancer Incidence and Behavior in Younger Patients: A Study From the Surveillance, Epidemiology and End Results Database. *World Journal of Oncology* **2020**, *11*, 88-97, doi:10.14740/wjon1278.
  102. Hu, X. Leptin--A Growth Factor in Normal and Malignant Breast Cells and for Normal Mammary Gland Development. *CancerSpectrum Knowledge Environment* **2002**, *94*, 1704-1711, doi:10.1093/jnci/94.22.1704.
  103. Kolb, R.; Zhang, W. Obesity and Breast Cancer: A Case of Inflamed Adipose Tissue. *Cancers (Basel)* **2020**, *12*, doi:10.3390/cancers12061686.
  104. Protani, M.; Coory, M.; Martin, J.H. Effect of obesity on survival of women with breast cancer: systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* **2010**, *123*, 627-635, doi:10.1007/s10549-010-0990-0.
  105. Kim, E.Y.; Chang, Y.; Ahn, J.; Yun, J.S.; Park, Y.L.; Park, C.H.; Shin, H.; Ryu, S. Mammographic breast density, its changes, and breast cancer risk in premenopausal and postmenopausal women. *Cancer* **2020**, *126*, 4687-4696, doi:10.1002/cncr.33138.

106. Chen, Y.; Wang, J.; Wang, X.; Liu, X.; Li, H.; Lv, Q.; Zhu, J.; Wei, B.; Tang, Y. STAT3, a Poor Survival Predictor, Is Associated with Lymph Node Metastasis from Breast Cancer. *Journal of Breast Cancer* **2013**, *16*, 40, doi:10.4048/jbc.2013.16.1.40.
107. Bharadwaj, U.; Kasembeli, M.; Eckols, T.; Kolosov, M.; Lang, P.; Christensen, K.; Edwards, D.; Tweardy, D. Monoclonal Antibodies Specific for STAT3 $\beta$  Reveal Its Contribution to Constitutive STAT3 Phosphorylation in Breast Cancer. *Cancers* **2014**, *6*, 2012-2034, doi:10.3390/cancers6042012.
108. Sonnenblick, A.; Salgado, R.; Brohée, S.; Zahavi, T.; Peretz, T.; Van Den Eynden, G.; Rouas, G.; Salmon, A.; Francis, P.; Di Leo, A.; et al. p-STAT3 in luminal breast cancer: Integrated RNA-protein pooled analysis and results from the BIG 2-98 phase III trial. *International Journal of Oncology* **2017**, doi:10.3892/ijo.2017.4212.
109. Yamamoto, T.; Matsuda, T.; Junicho, A.; Kishi, H.; Saatcioglu, F.; Muraguchi, A. Cross-talk between signal transducer and activator of transcription 3 and estrogen receptor signaling. *FEBS Lett* **2000**, *486*, 143-148, doi:10.1016/s0014-5793(00)02296-1.
110. Mcdaniel, J.M.; Varley, K.E.; Gertz, J.; Savic, D.S.; Roberts, B.S.; Bailey, S.K.; Shevde, L.A.; Ramaker, R.C.; Lasseigne, B.N.; Kirby, M.K.; et al. Genomic regulation of invasion by STAT3 in triple negative breast cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 8226-8238, doi:10.18632/oncotarget.14153.

# ANEXOS.

## ANEXO 1. Formato de recolección de datos de pacientes con cáncer de mama.



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**  
**Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas**  
**“Dr. Ignacio Chávez”**  
**División de Estudios de Posgrado**  
**Maestría en Ciencias de la Salud**



FICHA DE IDENTIFICACIÓN			
			Fecha de ingreso: _____
			Folio de biopsia: _____
			Folio de inmunohistoquímica: _____
			No. De caso: _____
Nombre: (iniciales)	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
	<i>Nombre</i>	<i>Primer apellido</i>	<i>Segundo Apellido</i>
No de afiliación	<input type="text"/>	CURP	<input type="text"/>
Tel de contacto	<input type="text"/>	Correo electrónico	<input type="text"/>
Edad	<input type="text"/>	Fecha de nacimiento	<input type="text"/>
		Gpo sanguíneo y Rh	<input type="text"/>
Edad por grupos	<ul style="list-style-type: none"><li><input type="radio"/> 29 años o menos</li><li><input type="radio"/> 30-34 años</li><li><input type="radio"/> 35-39 años</li><li><input type="radio"/> 40-44 años</li><li><input type="radio"/> 45-49 años</li><li><input type="radio"/> 50-54 años</li><li><input type="radio"/> 55-59 años</li><li><input type="radio"/> 60-64 años</li><li><input type="radio"/> 65-69 años</li><li><input type="radio"/> 70 años o más</li></ul>		
ANTECEDENTES			
<b>Antecedentes Heredofamiliares</b>			
Neoplasias no hematológicas Neoplasias hematológicas. (Familiares de primer y segundo grado)	<input type="text"/>		
<b>Antecedentes personales no patológicos</b>			
Lugar de origen	<input type="text"/>	Lugar de residencia	<input type="text"/>
Escolaridad	<input type="text"/>	Ocupación	<input type="text"/>
Estado civil	<input type="text"/>	Actividad física	<input type="text"/>
Dieta	<input type="text"/>		
<b>Índices antropométricos</b>			
Peso (kg)	<input type="text"/>	Talla (m)	<input type="text"/>
		IMC	<input type="text"/>

<b>Antecedentes gineco-obstétricos</b>					
Edad de menarca	<input type="text"/>	Ritmo de menstruación	<input type="text"/>	Método de planificación actual	<input type="text"/>
Fecha de última menstruación	<input type="text"/>	Edad de inicio de menopausia	<input type="text"/>	Tratamiento de reemplazo hormonal	<input type="text"/>
Gestaciones	<input type="text"/>	Partos	<input type="text"/>	Cesáreas	<input type="text"/>
Abortos	<input type="text"/>				
Edad de primera gestación de término	<input type="text"/>	Número de gestaciones de término	<input type="text"/>	Ofrecimiento de lactancia materna en cada hijo (>6 meses)	<input type="text"/>
<b>Antecedentes personales patológicos</b>					
<b>Toxicomanías</b>					
Hábito tabáquico	<input type="text"/>				
Consumo de alcohol	<input type="text"/>				
Otros	<input type="text"/>				
<b>Enfermedades crónico-degenerativas</b>					
Padecimientos oncológicos	<input type="text"/>				
Diabetes Mellitus	<input type="text"/>				
Cardiopatías	<input type="text"/>				
Nefropatías	<input type="text"/>				
Hepatopatías	<input type="text"/>				
Neuropatías	<input type="text"/>				
Otros	<input type="text"/>				
<b>Exposición ambiental</b>					
Radiación ionizante	<input type="text"/>				
Quimioterapia	<input type="text"/>				
Pesticidas	<input type="text"/>				
Benceno	<input type="text"/>				
Solventes	<input type="text"/>				
Electromagnetismo	<input type="text"/>				
Otros	<input type="text"/>				
<b>INFORMACIÓN DE LA MUESTRA</b>					
<b>Macroscopía</b>					
Especimen	<input type="text"/>				
Tamaño tumoral (diámetro mayor en cm)	<p>pT1 (0.1-2cm)</p> <p>pT2 (&gt;2-5cm)</p> <p>pT3 (&gt;5cm)</p> <p>pT4 (cualquier tamaño, afectación pared torácica, ulcera/edema en piel, carcinoma inflamatorio)</p>				
Localización	<p>Mama izquierda / mama derecha.</p> <p>Primer cuadrante</p> <p>Segundo cuadrante</p> <p>Tercer cuadrante</p> <p>Cuarto cuadrante</p>				
Cantidad de ganglios	<input type="text"/>				
Otros datos	<input type="text"/>				
<b>Diagnóstico Histopatológico</b>					
Tipo de cáncer (Clasificación Histológica)	<input type="text"/>				
		Grado histológico (Clasificación SBR Mod.)	Grado 1	Grado 2	Grado 3
Formación túbulos	<input type="text"/>	Pleomorfismo nuclear	<input type="text"/>	Mitosis (40x)	<input type="text"/>
Necrosis	<input type="text"/>	Margen quirúrgico	<input type="text"/>	Permeación linfovascular	1) Presente

Ganglios afectados	pN0 (0) pN1 (1-3) pN2 (4-9) pN3 (10 ó +)	Ruptura capsular		Metástasis	2) No identificada
<b>Determinación Inmunoquímica</b>					
Receptores de estrógeno	Índice de Allred -Intensidad (0-3): -Proporción (0-5): -Total (0-8):	Receptores de progesterona	Índice de Allred -Intensidad (0-3): -Proporción (0-5): -Total (0-8):		
Receptores hormonales		0) Negativos 1) Estrógenos Positivo / Progesterona positivo 2) Estrógenos Positivo / Progesterona negativo 3) Estrógenos Negativo / Progesterona Positivo			
HER2	1) Negativo (0) 2) Negativo (+) 3) Indeterminado (++) 4) Positivo (+++)	Ki67	1) Bajo: <10 % 2) Medio: 10 – 20 % 3) Alto: >20 %	p53	
pTyr <sup>705</sup> -STAT3	% / Intensidad			pSer <sup>727</sup> -STAT3	% / Intensidad
<b>TRATAMIENTO PREVIO</b>					
Tratamiento quirúrgico	0) No se realizó cirugía 1) Mastectomía total 2) Madden 3) Patey 4) Halsted 5) E. Amplia	Tratamiento médico sistémico	0) Ninguno 1) QT neoadyuvante 2) HT neoadyuvante 3) QT-RT concomitante 4) QT-RT secuencial 5) QT adyuvante 6) HT adyuvante 7) QT-HT adyuvante	Tratamiento radioterápico	0) Ninguno 1) QT-RT Concomitante 2) QT-RT Secuencial 3) RT preoperatoria 4) RT adyuvante
	Fecha:		Fecha de inicio:		Fecha:
	Observaciones:		Tiempo de tratamiento (meses):		Observaciones:
			Observaciones:		
<b>TRATAMIENTO ACTUAL</b>					
Tratamiento actual					
Fecha de inicio					
Tiempo en tratamiento (meses):					

ANEXO 2. Carta de no inconveniente de HGR1.



GOBIERNO DE  
MÉXICO



2020  
LEONA VICARIO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
DELEGACIÓN REGIONAL MICHOACÁN  
HOSPITAL GENERAL REGIONAL No. 1

**CARTA DE NO INCONVENIENTE**

Morelia, Mich., a 3 agosto de 2020

**Dr. Sergio Gutiérrez Castellanos**  
Investigador Asociado "A"  
Centro de Investigación Biomédica de Michoacán  
Presente.

Por este conducto me dirijo a Usted de la manera más atenta, para informar que *no existe inconveniente* para que Ud. pueda llevar al cabo la revisión y recolección de datos de los expedientes clínicos en el Hospital General Regional No. 1 en los Servicios de Patología, Laboratorio Clínico, Medicina Interna y Archivo Clínico para realizar el trabajo de investigación intitulado "*Expresión nuclear de Ser<sup>727</sup>-STAT3 en pacientes con cáncer de mama*".

Recuerde que la información que usted vaya a utilizar para identificar a los pacientes, tales como nombre, teléfono y dirección, debe ser conservada de manera confidencial y no se debe otorgar información que pudiera revelar su identidad, ya que esta siempre debe permanecer protegida.

Sin otro particular, le envío un cordial saludo.

Atentamente

**Dra. Patricia Ortega León**

Directora Médico del HGR No. 1

## TABLAS SUPLEMENTARIAS.

Tabla suplementaria S1. Distribución de los casos según la expresión nuclear de pSer<sup>727</sup> y pTyr<sup>705</sup> de STAT3, y las características clínicas.

Variable	Expresión nuclear de pSer <sup>727</sup> -STAT3						Expresión nuclear de pTyr <sup>705</sup> -STAT3						
	Alta, n/%	Baja, n/%	Faltantes	p <sup>1</sup>	RR <sup>2</sup>	95%IC <sup>3</sup>	Alta, n/%	Baja, n/%	Faltantes	p	RR	95%IC	
<b>Grupo de edad (n= 285)</b>				0.8589			<b>Grupo de edad (n= 278)</b>				0.1455		
<30	2/0.7	1/0.4	1	0.6941	1.205	0.3740 - 1.749	<30	4/1.4	0/0		0.1403	1.548	0.7866 - 3.380
31-40	21/7.4	13/4.6	1	0.4291	1.132	0.8115 - 1.447	31-40	18/6.5	17/6.1		0.0694	0.7667	0.5255 - 1.018
41-50	48/16.8	45/15.8	1	0.3658	0.9009	0.7059 - 1.123	41-50	61/21.9	26/9.4	7	0.2372	1.116	0.9255 - 1.321
51-60	41/14.4	33/11.6	3	0.9947	0.9992	0.7746 - 1.248	51-60	51/18.3	24/8.6	2	0.5386	1.062	0.8667 - 1.264
>61	46/16.1	35/12.3	1	0.7724	1.034	0.8125 - 1.283	>61	47/16.9	30/10.8	5	0.3783	0.9156	0.7339 - 1.106
<40	24/8.4	14/4.9	2	0.3038	1.164	0.8555 - 1.470	<40	22/7.9	17/6.1		0.219	0.8479	0.6094 - 1.087
>41	134/47.0	113/39.6	5		0.859	0.6803 - 1.169	>41	159/57.2	80/28.8			1.179	0.9202 - 1.641
<b>IMC (n= 268)</b>				0.0725			<b>IMC (n= 261)</b>				0.2358		
Peso bajo	2/0.7	1/0.4		0.6886	1.21	0.3755 - 1.760	Peso bajo	2/0.8	1/0.4		0.9658	0.9829	0.3054 - 1.412
Normal	35/13.1	23/8.6	2	0.3756	1.121	0.8595 - 1.403	Normal	41/15.7	15/5.7	4	0.3292	1.104	0.8935 - 1.306
Sobrepeso	54/20.1	47/17.5	4	0.6525	0.9499	0.7510 - 1.182	Sobrepeso	68/26.1	34/13.0	3	0.7502	0.9725	0.8104 - 1.150
Obesidad I	34/12.7	33/12.3	1	0.3947	0.8947	0.6729 - 1.144	Obesidad I	47/18.0	18/6.9	3	0.3711	1.09	0.8919 - 1.288
Obesidad II	18/6.7	5/1.9		<b>0.0201</b>	1.475	1.076 - 1.802	Obesidad II	13/5.0	7/2.7	3	0.7791	0.9552	0.6313 - 1.231
Obesidad III	5/1.9	11/4.1		<b>0.0467</b>	0.5507	0.2480 - 0.9936	Obesidad III	6/2.3	9/3.4	1	<b>0.0175</b>	0.5754	0.2840 - 0.9340
Faltantes	10	7					Faltantes	4	13				
<b>Menarca (edad) (n= 190)</b>				0.073			<b>Menarca (edad) (n= 188)</b>				0.3942		
Temprana	3/1.6	9/4.7		<b>0.0238</b>	0.4279	0.1513 - 0.9250	Temprana	5/2.7	7/3.7		0.1776	0.679	0.3126 - 1.133
Regular	69/36.3	51/26.8	4	0.6665	1.059	0.8213 - 1.399	Regular	73/38.8	47/25.0	4	0.6648	1.057	0.8305 - 1.381
Tardía	35/18.4	23/12.1	2	0.458	1.106	0.8375 - 1.418	Tardía	35/18.6	21/11.2	4	0.6624	1.058	0.8090 - 1.336
Faltantes	51	44	1				Faltantes	68	22	6			
<b>Estado ovárico (n= 270)</b>							<b>Estado ovárico (n= 264)</b>						
Premenopausia	59/21.9	51/18.9	3	0.6713	0.9535	0.7590 - 1.184	Premenopausia	71/26.9	38/14.4	4	0.8324	1.02	0.8450 - 1.219
Postmenopausia	90/33.3	70/25.9	3		1.049	0.8447 - 1.318	Postmenopausia	99/37.5	56/21.2	8		0.9806	0.8201 - 1.183
Faltantes	3	2					Faltantes	11	3	2			
<b>Menopausia (edad) (n= 109)</b>				0.1133			<b>Menopausia (edad) (n= 106)</b>				0.6052		
Temprana	10/9.2	8/7.3		0.7657	0.9362	0.5550 - 1.355	Temprana	9/8.5	7/6.6	2	0.7783	0.9375	0.5411 - 1.365
Regular	52/47.7	31/28.4	3	0.136	1.357	0.9198 - 2.231	Regular	51/48.1	32/30.2	3	0.4229	1.178	0.8158 - 1.912

Tardía	2/1.8	6/5.5		<b>0.0442</b>	0.4073	0.1156 - 0.9854	Tardía	3/2.8	4/3.8	1	0.3554	0.7071	0.2584 - 1.285
Faltantes	35	31	1				Faltantes	47	16	4			
<b>1ª gestación (edad) (n= 128)</b>				0.805			<b>1ª gestación (edad) (n= 124)</b>				0.7601		
Temprana	26/20.3	23/18.0	1	0.666	0.9315	0.6599 - 1.274	Temprana	26/21.0	23/18.5	1	0.5382	0.9045	0.6414 - 1.237
Regular	41/32.0	32/25.0	1	0.8552	1.03	0.7551 - 1.429	Regular	40/32.3	29/23.4	5	0.7023	1.063	0.7798 - 1.473
Tardía	4/3.1	2/1.6	1	0.5719	1.214	0.5393 - 1.759	Tardía	4/3.2	2/1.6	1	0.6049	1.192	0.5295 - 1.727
Faltantes	62	54	1				Faltantes	87	24	6			
<b>Paridad (n= 221)</b>				0.5058			<b>Paridad (n= 218)</b>				0.0954		
Nuligesta	25/11.3	16/7.2	3	0.5702	1.087	0.7960 - 1.391	Nuligesta	24/11.0	19/8.7	1	0.4356	0.8961	0.6482 - 1.158
1-2	30/13.6	21/9.5	1	0.7659	1.042	0.7788 - 1.328	1-2	37/17.0	13/6.0	2	<b>0.0319</b>	1.295	1.025 - 1.577
3-4	45/20.4	30/13.6	2	0.5204	1.081	0.8443 - 1.357	3-4	45/20.6	27/12.4	5	0.7513	1.037	0.8183 - 1.283
>5	26/11.8	28/12.7		0.1301	0.8041	0.5788 - 1.060	>5	27/12.4	26/11.9	1	0.0842	0.793	0.5790 - 1.029
Faltantes	32	32	1				Faltantes	48	12	5			
<b>Lactancia &gt;6m (n= 180)</b>							<b>Lactancia &gt;6m (n= 175)</b>						
Sí	61/33.9	50/27.8	2	0.6918	0.948	0.7338 - 1.246	Sí	62/35.4	45/25.7	6	0.1371	0.8383	0.6690 - 1.061
No	40/22.2	29/16.1	1		1.055	0.8024 - 1.363	No	47/26.9	21/12.0	2		1.193	0.9428 - 1.495
Faltantes	17	47	1				Faltantes	48	12	5			
<b>Índice Estrogénico (n= 181)</b>				0.4369			<b>Índice Estrogénico (n= 181)</b>				0.6639		
Bajo	27/14.9	17/9.4	2	0.4925	1.106	0.8139 - 1.430	Bajo	26/14.5	18/10.1	2	0.9149	0.9848	0.7209 - 1.273
Medio	54/29.8	38/21.0	2	0.6211	1.066	0.8264 - 1.381	Medio	57/31.8	34/19.0	3	0.4273	1.102	0.8659 - 1.412
Alto	22/12.2	23/12.7	2	0.2102	0.8209	0.5732 - 1.106	Alto	24/13.4	20/11.2	3	0.4152	0.8872	0.6365 - 1.164
Faltantes	23	81	1				Faltantes	74	25	6			

<sup>1</sup>Chi cuadrada; <sup>2</sup>Riesgo relativo; <sup>3</sup>Intervalo de confianza.

Tabla suplementaria S2. Distribución de los casos según la expresión nuclear de pSer727 y pTyr705 de STAT3, y las características patológicas.

Variable	Expresión nuclear de pSer <sup>727</sup> -STAT3						Expresión nuclear de pTyr <sup>705</sup> -STAT3						
	Alta, n/%	Baja, n/%	Faltantes	p <sup>1</sup>	RR <sup>2</sup>	95%IC <sup>3</sup>	Alta, n/%	Baja, n/%	Faltantes	p	RR	95%IC	
<b>BI-RADS (n = 222)</b>				0.7995				<b>BI-RADS (n = 213)</b>				0.1198	
1-3	11/5.0	8/3.6		0.6649	1.098	0.6779 - 1.517	1-3	9/4.2	7/3.3	3	0.5382	0.8795	0.5142 - 1.233
4	45/20.3	37/16.7	3	0.6935	1.052	0.8095 - 1.346	4	59/27.7	23/10.8	3	<b>0.0400</b>	1.24	1.010 - 1.513
5	62/27.9	59/26.6		0.5317	0.9241	0.7222 - 1.186	5	67/31.5	48/22.5	6	0.093	0.8396	0.6827 - 1.030
<i>Faltantes</i>	38	20	3				<i>Faltantes</i>	43	17	1			
<b>Clasificación histológica (n= 285)</b>				0.3404				<b>Clasificación histológica (n= 278)</b>				0.2315	
CDI-SPE	134/47.0	115/40.4	7	0.147	0.8072	0.6460 - 1.090	CDI-SPE	156/56.1	90/32.4	10	0.1005	0.8117	0.6837 - 1.050
CLI	9/3.2	5/1.8		0.4946	1.169	0.6984 - 1.570	CLI	10/3.6	2/0.7	2	0.1757	1.296	0.8525 - 1.545
Otros	15/5.3	7/2.5		0.2106	1.254	0.8585 - 1.599	Otros	15/5.4	5/1.8	2	0.2788	1.192	0.8360 - 1.464
<b>Tamaño tumoral (n= 285)</b>							<b>Tamaño tumoral (n= 278)</b>						
≤2 cm	71/24.9	51/17.9	2	0.4177	1.09	0.8822 - 1.341	≤2 cm	77/27.7	38/13.7	9	0.587	1.049	0.8777 - 1.245
>2 cm	87/30.5	76/26.7	5		0.9171	0.7459 - 1.133	>2 cm	104/37.4	59/21.2	5		0.9529	0.8032 - 1.139
<b>Tumor TNM (n= 285)</b>				0.1247				<b>Tumor TNM (n= 278)</b>				0.435	
pT1	68/23.9	48/16.8	2	0.3706	1.101	0.8894 - 1.353	pT1	74/26.6	35/12.6	9	0.4345	1.072	0.8961 - 1.271
pT2	43/15.1	51/17.9	4	<b>0.0209</b>	0.7598	0.5847 - 0.9613	pT2	58/20.9	36/12.9	4	0.3945	0.923	0.7545 - 1.105
pT3	15/5.3	10/3.5	1	0.6309	1.091	0.7311 - 1.438	pT3	19/6.8	6/2.2	1	0.231	1.187	0.8737 - 1.433
pT4	32/11.2	18/6.3		0.1798	1.194	0.9135 - 1.482	pT4	30/10.8	20/7.2		0.4027	0.906	0.6879 - 1.124
<b>No. de nódulos (n= 108)</b>				0.159				<b>No. de nódulos (n= 102)</b>				0.3022	
1 a 3	27/25.0	35/32.4		0.075	0.7154	0.4936 - 1.035	1 a 3	39/38.2	18/17.6	5	0.3769	1.14	0.8536 - 1.566
4 a 9	19/17.6	14/13.0		0.3592	1.199	0.8006 - 1.716	4 a 9	18/17.6	15/14.7		0.1375	0.7841	0.5320 - 1.074
>10	9/8.3	4/3.7		0.1592	1.43	0.8461 - 2.016	>10	9/8.8	3/2.9	1	0.427	1.184	0.7242 - 1.565
<i>Faltantes</i>	60	42	4				<i>Faltantes</i>	73	31	2			
<b>Nódulos TNM (n= 183)</b>				0.2191				<b>Nódulos TNM (n= 174)</b>				0.3841	
pN0	43/23.5	32/17.5	3	0.3927	1.126	0.8540 - 1.470	pN0	42/24.1	30/17.2	6	0.3935	0.9015	0.6985 - 1.140
pN1	27/14.8	35/19.1		0.0521	0.7422	0.5285 - 1.003	pN1	39/22.4	18/10.3	5	0.2281	1.16	0.9047 - 1.452
pN2	19/10.4	14/7.7		0.6087	1.093	0.7541 - 1.464	pN2	18/10.3	15/8.6		0.3224	0.8545	0.5847 - 1.142
pN3	9/4.9	4/2.2		0.2396	1.322	0.7959 - 1.771	pN3	9/5.2	3/1.7	1	0.3387	1.227	0.7559 - 1.574
<b>Metástasis (n= 285)</b>							<b>Metástasis (n= 278)</b>						
M0	152/53.3	126/44.2	7	0.1027	0.6379	0.5288 - 1.131	M0	174/62.6	97/34.9	14	<b>0.0498</b>	0.6421	0.5834 - 0.9994
M1	6/2.1	1/0.4			1.568	0.8838 - 1.891	M1	7/2.5	0/0			1.557	1.001 - 1.714

<b>Grado histológico (n= 282)</b>				0.9501			<b>Grado histológico (n= 275)</b>				0.2108		
GH1	35/12.4	26/9.2	1	0.7623	1.039	0.7943 - 1.304	GH1	44/16.0	16/5.8	2	0.1466	1.159	0.9437 - 1.372
GH2	83/29.4	68/24.1	5	0.7975	0.9731	0.7901 - 1.202	GH2	95/34.5	50/18.2	11	0.9816	1.002	0.8433 - 1.194
GH3	39/13.8	31/11.0	1	0.9937	1.001	0.7722 - 1.253	GH3	41/14.9	29/10.5	1	0.1607	0.8638	0.6802 - 1.055
<i>Faltantes</i>	1	2					<i>Faltantes</i>	2	1				
<b>Estadio TNM anatómico (n= 186)</b>				0.3312			<b>Estadio TNM anatómico (n= 177)</b>				0.2036		
IA	20/10.8	17/9.1	1	0.9684	1.007	0.6961 - 1.355	IA	22/12.4	11/6.2	5	0.6543	1.067	0.7771 - 1.353
IIA	32/17.2	22/11.8	2	0.3363	1.15	0.8559 - 1.496	IIA	32/18.1	20/11.3	4	0.757	0.9615	0.7295 - 1.215
IIB	12/6.5	15/8.1		0.2935	0.803	0.4898 - 1.174	IIB	16/9.0	9/5.1	2	0.9355	1.013	0.6935 - 1.319
IIIA	13/7.0	15/8.1		0.3983	0.8432	0.5264 - 1.212	IIIA	18/10.2	10/5.6		0.9039	1.019	0.7136 - 1.315
IIIB	9/4.8	12/6.5		0.2872	0.7771	0.4373 - 1.188	IIIB	9/5.1	12/6.8		0.0387	0.6491	0.3670 - 0.9825
IIIC	8/4.3	4/2.2		0.354	1.261	0.7279 - 1.720	IIIC	8/4.5	3/1.7	1	0.502	1.161	0.6860 - 1.510
IV	6/3.2	1/0.5		0.0839	1.632	0.9156 - 2.029	IV	7/4.0	0/0		<b>0.0397</b>	1.619	1.036 - 3.645
<i>Faltantes</i>	58	41	4				<i>Faltantes</i>	69	32	2			
<b>Categorías de estadios TNM (n= 186)</b>				0.1011			<b>Categorías de estadios TNM (n= 177)</b>				0.1077		
Estadio temprano	52/28.0	39/21.0	3	0.3656	1.131	0.8656 - 1.483	Estadio temprano	54/30.5	31/17.5	9	0.9466	1.008	0.8011 - 1.264
Estadio localmente avanzado	42/22.6	46/24.7		0.1177	0.8064	0.6085 - 1.055	Estadio localmente avanzado	51/28.8	34/19.2	3	0.3847	0.9049	0.7160 - 1.134
Estadio metastásico	6/3.2	1/0.5		0.0839	1.632	0.9156 - 2.029	Estadio metastásico	7/4.0	0/0		<b>0.0397</b>	1.619	1.036 - 3.645

<sup>1</sup>Chi cuadrada; <sup>2</sup>Riesgo relativo; <sup>3</sup>Intervalo de confianza.

**Tabla suplementaria S3. Distribución de los casos según la sobreexpresión nuclear de pSer<sup>727</sup> y entidades asociadas al tumor.**

Variable	Expresión nuclear de pSer <sup>727</sup> -STAT3				
	Alta, n/%	Baja, n/%	p <sup>1</sup>	RR <sup>2</sup>	95% IC <sup>3</sup>
<b>Tipo de bordes (n= 285)</b>					
Infiltrantes	39/13.7	26/9.1	0.3997	1.109	0.8616 - 1.377
No infiltrantes	119/41.8	101/35.4			
<b>Permeación linfovascular (n= 285)</b>					
Presente	66/23.2	52/18.2	0.8879	1.015	0.8177 - 1.250
Ausente	92/32.3	75/26.3			
Bordes + / PLV +	26/9.1	19/6.7	0.6341	1.075	0.7810 - 1.405
Bordes - / PLV -	79/27.7	68/23.9			
<b>Asociación con mastopatía fibroquística (n= 285)</b>					
Presente	12/4.2	9/3.2	0.8703	1.033	0.6535 - 1.405
Ausente	146/51.2	118/41.4			
<b>Entidades asociadas al tumor (n= 107)</b>					
Microcalcificaciones	10/9.3	3/2.8	0.0794	1.506	0.9428 - 2.032
Hiperplasia	11/10.3	15/14.0	0.1617	0.7291	0.4281 - 1.117
Comedonecrosis	14/13.1	11/10.3	0.8370	1.044	0.6648 - 1.495
Adenosis microglandular	9/8.4	9/8.4	0.6946	0.9082	0.5135 - 1.378
Fibrosis	14/13.1	11/10.3	0.8370	1.044	0.6648 - 1.495
<b>Entidades asociadas a ganglios (n= 33)</b>					
Ruptura capsular	10/30.3	11/33.3	0.8953	0.9524	0.4793 - 2.077
Infiltración adiposa	5/15.2	4/12.1	0.6187	1.212	0.5316 - 2.355
RC + IA	1/3.0	2/6.1	0.5818	0.6667	0.1202 - 1.847

<sup>1</sup>Chi cuadrada; <sup>2</sup>Riesgo relativo; <sup>3</sup>Intervalo de confianza.

Tabla suplementaria S4. Distribución de los casos según la sobreexpresión nuclear de pSer<sup>727</sup> y pTyr<sup>705</sup> de STAT3, y las características moleculares.

Variable	Expresión nuclear de pSer <sup>727</sup> -STAT3						Expresión nuclear de pTyr <sup>705</sup> -STAT3						
	Alta, n/%	Baja, n/%	Faltantes	p <sup>1</sup>	RR <sup>2</sup>	95%IC <sup>3</sup>	Alta, n/%	Baja, n/%	Faltantes	p <sup>1</sup>	RR <sup>2</sup>	95%IC <sup>3</sup>	
<b>Receptores hormonales (n = 250)</b>							<b>Receptores hormonales (n = 250)</b>						
Positivos (RE+/RP+)	86/35.5	73/30.2	2	0.3598	0.8979	0.7211 - 1.138	Positivos (RE+/RP+)	106/44.7	46/19.4	9	0.0893	1.186	0.9753 - 1.479
Negativos (RE-/RP-)	50/20.7	33/13.6	3		1.114	0.8791 - 1.387	Negativos (RE-/RP-)	50/21.1	35/14.8	1		0.8435	0.6763 - 1.025
<b>Receptor de estrógenos (n= 295)</b>							<b>Receptor de estrógenos (n= 295)</b>						
Positivo (RE+)	107/37.5	88/30.9	3	0.7769	0.9683	0.7836 - 1.222	Positivo (RE+)	129/46.4	59/21.2	10	0.076	1.188	0.9831 - 1.474
Negativo (RP-)	51/17.9	39/13.7	4		1.033	0.8182 - 1.276	Negativo (RP-)	52/18.7	38/13.7	4		0.842	0.6785 - 1.017
<b>Receptor de progesterona (n= 295)</b>							<b>Receptor de progesterona (n= 295)</b>						
Positivo (RP+)	87/30.5	79/27.7	3	0.2243	0.8784	0.7150 - 1.085	Positivo (RP+)	108/38.8	49/17.6	12	0.1423	1.14	0.9575 - 1.374
Negativo (RP-)	71/24.9	48/13.7	4		1.138	0.9220 - 1.399	Negativo (RP-)	73/26.3	48/17.3	2		0.877	0.7280 - 1.044
<b>HER2 (n= 292)</b>							<b>HER2 (n= 292)</b>						
Positivo (HER2 +)	25/8.9	24/8.5		0.4707	0.9006	0.6499 - 1.174	Positivo (HER2 +)	33/12.0	15/5.5	1	0.5583	1.069	0.8362 - 1.291
Negativo (HER2-)	132/46.8	101/35.8	7		1.11	0.8519 - 1.539	Negativo (HER2-)	146/53.1	81/29.5	13		0.9355	0.7748 - 1.196
Faltantes	1	2					Faltantes	2	1				
<b>Ki-67 (n= 279)</b>							<b>Ki-67 (n= 279)</b>						
Positivo (Ki-67 +, >20%)	110/40.7	85/31.5	5	0.6486	1.058	0.8404 - 1.374	Positivo (Ki-67 +, >20%)	124/47.0	70/26.5	6	0.4836	0.9321	0.7801 - 1.148
Negativo (Ki-67 -, o <20%)	40/14.8	35/13.0	1		0.9455	0.7278 - 1.190	Negativo (Ki-67 -, o <20%)	48/18.2	22/8.3	6		1.073	0.8708 - 1.282
Faltantes	8	7	1				Faltantes	9	5	2			
<b>p53 (n= 140)</b>							<b>p53 (n= 140)</b>						
Positivo (p53 +)	33/24.3	26/19.1	1	0.9918	1.002	0.7332 - 1.349	Positivo (p53 +)	47/35.9	13/9.9		0.621	1.049	0.8590 - 1.277
Negativo (p53 -)	43/31.6	34/25.0	1		0.9984	0.7412 - 1.364	Negativo (p53 -)	53/40.5	18/13.7	7		0.953	0.7834 - 1.164
Faltantes	82	67	5				Faltantes	81	66	7			
<b>Subtipo molecular (n= 287)</b>							<b>Subtipo molecular (n= 287)</b>						
Luminal A	44/15.8	33/11.9	1	0.6866	1.016	0.7960 - 1.261	Luminal A	49/18.0	24/8.8	5	0.7238	1.035	0.8410 - 1.237
Luminal B HER2 -	54/19.4	43/15.5	2	0.8036	0.9729	0.7743 - 1.200	Luminal B HER2 -	65/23.9	29/10.7	5	0.3501	1.089	0.9053 - 1.291
Luminal B HER2 +	9/3.2	12/4.3		0.1905	0.7442	0.4213 - 1.123	Luminal B HER2 +	14/5.1	6/2.2	1	0.656	1.076	0.7327 - 1.351
HER2	16/5.8	12/4.3		0.9401	1.013	0.6837 - 1.343	HER2	19/7.0	9/3.3		0.7765	1.041	0.7491 - 1.296
Triple negativo	34/12.2	21/7.6	3	0.3722	1.121	0.8607 - 1.394	Triple negativo	31/11.4	26/9.6	1	<b>0.0484</b>	0.7954	0.6004 - 0.9985
Faltantes	1	6	1				Faltantes	3	3	2			

<sup>1</sup>Chi cuadrada; <sup>2</sup>Riesgo relativo; <sup>3</sup>Intervalo de confianza.

