



**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Departament de Medicina**

**Línea de investigación:** Tests predictivos de respuesta  
(Oncología Médica)

**Factores pronósticos y predictivos de  
respuesta a la quimioterapia  
neoadyuvante con antraciclinas en  
una serie de cáncer de mama**

Tesis Doctoral presentada por:  
**Mireia Margelí Vila**

Director y Co-director: **Dr. Rafael Rosell Costa**  
**Dr. Agustí Barnadas Molins**

**Año 2012**

**Rafael Rosell Costa**, profesor asociado del departamento de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona, y jefe de servicio de oncología médica del Institut Català d'Oncologia del Hospital Germans Trias i Pujol, y **Agustí Barnadas Molins**, profesor asociado del departamento de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona, y jefe de servicio de oncología médica del Hospital de Sant Pau, certifican que la tesis titulada:

**Factores pronósticos y predictivos de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante con antraciclinas en una serie de cáncer de mama**

Ha sido realizada por Mireia Margelí Vila bajo su dirección y es apta para ser defendida frente un tribunal para optar al grado de doctora.

Rafael Rosell Costa

Agustí Barnadas Molins

Badalona, a 11 de Abril del 2012

## **Agradecimientos**

Al doctor Rosell por la oportunidad de poder realizar esta tesis doctoral, por su ejemplo y su exigencia en todos estos años.

Al doctor Barnadas por su ayuda en este proyecto y por estar a mi lado desde siempre. Por su confianza, por su ejemplo personal y profesional.

Al doctor Miquel Tarón y todo su equipo del laboratorio de Biología Molecular, que han desarrollado un inestimable trabajo, agradecer sus explicaciones y consejos.

A la doctora Eva Castellá y el doctor Gustavo Tapia por toda su colaboración desde el servicio de anatomía patológica, gracias por su paciencia.

A María Sánchez Ronco y Joaquim Raduà que desempeñaron el análisis estadístico. Gracias por su disponibilidad.

A todos los compañeros del servicio de oncología médica, que hacen mucho más agradable el trabajo de cada día.

A todas las pacientes por el estímulo que suponen en lo profesional y personal, por todo lo que nos hacen aprender.

A mi madre

A Ana y a Víctor

A toda la familia

<b>1 INTRODUCCIÓN GENERAL .....</b>	<b>3</b>
1.1 INCIDENCIA Y MORTALIDAD.....	3
1.2 FACTORES DE RIESGO.....	4
1.2.1 Factores de riesgo hereditarios .....	4
1.2.2 Factores de riesgo no hereditarios .....	5
1.3 DIAGNÓSTICO Y ESTADIFICACIÓN .....	7
1.3.1 Diagnóstico histológico .....	7
1.3.2 Clasificación patológica.....	9
1.3.3 Estadificación .....	11
1.4 FACTORES PRONÓSTICOS .....	15
1.4.1 Factores clásicos .....	15
1.4.1.1 Estado ganglionar.....	15
1.4.1.2 Tamaño tumoral .....	16
1.4.1.3 Grado histológico .....	17
1.4.1.4 Invasión linfovascular .....	18
1.4.1.5 Subtipo histológico .....	18
1.4.2 Características del paciente.....	19
1.4.2.1 Edad y estado menopáusico .....	19
1.4.2.2 Raza.....	19
1.4.3 Valor pronostico de los receptores hormonales.....	19
1.4.4 Activadores e inhibidores del plasminógeno .....	21
1.4.5 Receptores de factores de crecimiento: receptor de factor de crecimiento epidérmico 2 (HER-2) .....	21
1.4.6 Índices de proliferación .....	25
1.4.7 Arrays de expresión génica.....	28
1.4.7.1 Subtipos intrínsecos de cáncer de mama.....	28
1.4.7.2 Firmas genéticas.....	31
1.5 TRATAMIENTO .....	35
1.5.1 Cirugía .....	35
1.5.2 Radioterapia.....	37
1.5.3 Tratamiento sistémico: quimioterapia, hormonoterapia y terapia biológica ...	38
<b>2 INTRODUCCIÓN ESPECÍFICA: FACTORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO NEOADYUVANTE .....</b>	<b>40</b>
2.1 TRATAMIENTO NEOADYUVANTE.....	40
2.2 FACTORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA.....	43
2.2.1 Valor predictivo de los receptores hormonales .....	43
2.2.2 Valor predictivo de los activadores e inhibidores del plasminógeno .....	44
2.2.3 Valor predictivo de los receptores de factor de crecimiento: receptor de factor de crecimiento epidérmico 2 (HER-2) .....	45
2.2.4 Valor predictivo de Topoisomerasa II $\alpha$ .....	46
2.2.5 Valor predictivo de los índices de proliferación.....	46
2.2.6 Valor predictivo de los arrays de expresión genómica.....	48
2.2.6.1 Valor predictivo de los subtipos intrínsecos de cáncer de mama.....	48
2.2.6.2 Firmas genéticas.....	49
2.2.7 Valor predictivo de Vimentina .....	50

2.3	HUNTINGTIN INTERACTING PROTEIN 1 (HIP1).....	50
2.4	BRCA1 y ALTERACIONES EN VÍAS DE REPARACIÓN DE DNA COMO PREDICTORES DE RESPUESTA A QUIMIOTERAPIA .....	52
2.4.1	Mecanismos de reparación del DNA.....	52
2.4.2	BREAST CANCER SUSCEPTIBILITY GENE 1 (BRCA1).....	55
2.4.3	Esquema de quimioterapia: FEC (5-Fluorouracilo, Epirubicina, Ciclofosfamida) .....	58
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>60</b>
<b>4</b>	<b>PACIENTES Y MÉTODOS .....</b>	<b>62</b>
4.1	PACIENTES .....	62
4.2	MÉTODOS .....	64
4.2.1	Realización del tissue microarray.....	64
4.2.2	Análisis inmunohistoquímico .....	65
4.2.3	Análisis por CISH de HER-2.....	67
4.2.4	Análisis de BRCA1. Microdissección para extracción de RNA para análisis de BRCA1.....	69
4.3	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	71
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>72</b>
5.1	RESULTADOS PARA EL GLOBAL DE LAS 86 PACIENTES.....	72
5.1.1	Características de las pacientes.....	72
5.1.2	Respuesta clínica y patológica.....	74
5.1.3	Tiempo a progresión y supervivencia.....	75
5.1.4	Resultados del análisis inmunohistoquímico y de HER-2 por CISH y relación con respuesta, tiempo a la progresión y supervivencia.....	76
5.1.5	Análisis de Ki 67 y resultados .....	82
5.1.6	Análisis de resultados según los subgrupos de cáncer de mama definidos en función de RE, RP, HER-2 y Ki 67 .....	86
5.1.7	Resultados en función de HIP1 .....	89
5.2	ANÁLISIS DE LAS 41 PACIENTES EN LAS QUE SE REALIZARON LOS NIVELES DE mRNA DE BRCA1 .....	93
5.2.1	Expresión de mRNA de BRCA1 y resultados.....	93
5.2.2	BRCA1 y características clínicas.....	95
5.2.3	BRCA1 y subgrupos .....	98
5.2.4	BRCA1 y respuesta a la quimioterapia.....	98
5.2.5	BRCA1 y tiempo a progresión y supervivencia .....	100
5.2.6	Análisis uni y multivariante para tiempo a la progresión y supervivencia en las 41 pacientes .....	102
5.2.7	Correlación de BRCA1 por inmunohistoquímica (valores 0,1,2,3) con BRCA1 por cuantitativa. ....	105
<b>6</b>	<b>DISCUSION.....</b>	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>119</b>
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>121</b>

## **1 INTRODUCCIÓN GENERAL**

### **1.1 INCIDENCIA Y MORTALIDAD**

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en mujeres de todo el mundo, suponiendo el 23% de todos los cánceres, con más de 1 millón de casos por año. La incidencia de cáncer de mama se ha incrementado en los años 80 y 90 influenciado por diferentes factores como son los cambios en los hábitos reproductivos, la introducción de la mamografía de cribado, la tendencia a la obesidad, la terapia hormonal sustitutiva, y el uso de contraceptivos<sup>1</sup>. En cambio, algunas comunicaciones recientes informan sobre un descenso de la incidencia en USA y en otros países desarrollados en los últimos años, cuyos motivos son controvertidos, algunos abogan por la reducción de la prescripción de tratamiento hormonal sustitutivo, otros abogan por los cambios en el uso de la mamografía como posible causa<sup>2,3</sup>. En Europa, la incidencia de cáncer de mama sigue aumentando en todos los países. En España, la incidencia es menor a la de la media europea, habiendo experimentado un incremento desde 1973, con un aumento más marcado durante los años 1990<sup>4</sup>. En Cataluña se estimaron unos 4.700 nuevos casos cáncer de mama en el 2008, lo que representa un 30% de todos los cánceres diagnosticados en mujeres<sup>5</sup>.

Existe, sin embargo, un descenso de los rangos de mortalidad por cáncer de mama desde 1990, que se ha atribuido a la detección y diagnóstico temprano así como a la aplicación de nuevos tratamientos. En nuestro medio, la mayoría de las pacientes son diagnosticadas en estadios iniciales, y tan solo un 6% serán diagnosticadas en situación avanzada. No obstante, un 20-30% de las pacientes diagnosticadas en estadios iniciales podrán presentar una recidiva a distancia a lo largo del tiempo<sup>6</sup>. Por ello, son necesarias nuevas estrategias que aumenten la supervivencia en cáncer de mama, en especial en aquellas pacientes que presentan enfermedad avanzada.

## **1.2 FACTORES DE RIESGO**

Los factores de riesgo de cáncer de mama incluyen edad, historia familiar o personal de cáncer de mama, historia reproductiva, y la exposición a carcinógenos específicos.

### **1.2.1 Factores de riesgo hereditarios**

#### **Factores familiares**

Conocemos por estudios epidemiológicos que tan solo de un 5 a un 10% de casos de cáncer de mama son explicables por la presencia de mutaciones en genes de alta penetrancia para susceptibilidad para cáncer de mama como son BRCA1 y BRCA2. Estas mutaciones se heredan de forma autosómica dominante con variable penetrancia<sup>7</sup>. Las alteraciones en PTEN y TP53 son responsables de un 1% de los casos<sup>8</sup>. Así, las mutaciones hereditarias del gen supresor tumoral p53, causan el síndrome de Li-Fraumeni asociado a un incremento del riesgo de cáncer de mama, así como otros tumores, como leucemias, tumores cerebrales, y sarcomas. Las mutaciones de PTEN ocasionan el síndrome de Cowden asociado a incremento de riesgo de cáncer de mama, así como tumores del tracto digestivo, tiroides, útero y ovarios. Otras alteraciones genéticas que se han asociado a cáncer de mama son el síndrome de Muir-Torre en el que se encuentran mutaciones en MLH1, y el síndrome de Peutz-Jeghers con mutaciones en LKB1 y STK11.

Las mutaciones de BRCA1 y BRCA2 predicen la probabilidad de desarrollar un cáncer de mama hasta los 70 años de un 45% a un 87%, y de un 26% a un 84%, respectivamente. Por otra parte, las portadoras de mutaciones de BRCA1 y BRCA2 tendrán un riesgo a los largo de su vida de desarrollar un cáncer de ovario de un 16% a un 63% y de un 10% a un 27%, respectivamente<sup>9</sup>.

BRCA1 es un gen, localizado en el cromosoma 17q12. Se han descrito más de 700 mutaciones, aunque solo unas pocas son recurrentes en familias no relacionadas. Las dos más comunes son 185del AG y 5382insC. En caso del gen BRCA2, se han descrito más de 300 mutaciones diferentes, una de las más frecuentes es la 6174delT que se encuentra en el 1,5% de la población judía Ashkenazi; y la 999del5 supone una alta proporción de la del cáncer de mama hereditario en Islandia.

## **1.2.2 Factores de riesgo no hereditarios**

### **Factores hormonales**

Muchos de los factores de riesgo en cáncer de mama están asociados con una mayor exposición a las hormonas reproductivas femeninas, incluyendo la exposición in útero a altas concentraciones de estrógenos<sup>10</sup>. Así algunos de los factores en relación a esta mayor exposición hormonal son: la menarquia precoz, la menopausia tardía, la edad avanzada, el uso de tratamiento hormonal sustitutivo en la menopausia, la nuliparidad.

En cuanto al embarazo, el riesgo de cáncer de mama incrementa en el periodo inmediato tras el parto, pero disminuye a largo plazo; constituyendo el embarazo un factor protector a largo plazo<sup>11</sup>. El incremento de riesgo a corto plazo está en relación al aumento de proliferación de las células mamarias que precede a su diferenciación para permitir la lactancia. El embarazo y la lactancia reducen el número de ciclos menstruales y por tanto la exposición acumulada a hormonas endógenas. También presentan un efecto directo en las células mamarias, favoreciendo su diferenciación y maduración; algunos grupos consideran que estas células más diferenciadas son más resistentes a ser transformadas en células cancerosas. En relación a los factores hormonales como factor de riesgo de cáncer de mama, la ovariectomía bilateral antes de los 50 años es un factor protector, incluso en mujeres portadoras de mutaciones de BRCA1 y BRCA2.

En cuanto al uso del tratamiento hormonal sustitutivo en la menopausia, los datos del estudio *Women's Health Initiative* confirman que el riesgo de cáncer de mama se incrementa con el uso del tratamiento hormonal sustitutivo, y este incremento está en relación con la duración del mismo, y se produce especialmente en caso de preparados con estrógenos y progesterona<sup>12</sup>.

### **Dieta y estilo de vida**

Existen grandes variaciones geográficas en la incidencia de cáncer de mama, en las que países con dietas ricas en grasas presentan mayor incidencia de cáncer de mama que países con dietas pobres en grasas. Sin embargo, el análisis conjunto de siete estudios epidemiológicos prospectivos, no indica asociación alguna entre el consumo de grasas y el riesgo de cáncer de mama en mujeres adultas de países desarrollados<sup>13</sup>. Existe una clara asociación entre el consumo de alcohol y el riesgo de cáncer de mama, siendo particularmente importante en individuos con mal nivel nutricional, por déficit de folatos,  $\beta$ -caroteno y vitamina C<sup>14</sup>.

La obesidad resulta protectora del riesgo de cáncer de mama en mujeres premenopáusicas, probablemente debido al hecho de que se asocia a mayor irregularidad menstrual, y al incremento del número de ciclos anovulatorios. En cambio, en mujeres postmenopáusicas, la obesidad se asocia a un incremento del riesgo de cáncer de mama; hecho que se ha asociado al hecho de que en mujeres postmenopáusicas los andrógenos son aromatizados a estrógenos en el tejido adiposo, y este proceso será mayor en mujeres obesas<sup>15</sup>.

Por otra parte, el estilo de vida sedentario también se asocia a un mayor riesgo de cáncer de mama, de hecho diferentes estudios de cohortes demuestran un descenso del riesgo de cáncer de mama con ejercicio físico regular<sup>16</sup>.

### **Radiación y edad de exposición**

La radiación ionizante, en especial si se produce antes de los 40 años, aumenta el riesgo de cáncer de mama. Se estima que aproximadamente un 1% de todos los cánceres de mama en Estados Unidos son atribuibles al uso de la mamografía para diagnóstico. Por otra parte, las mujeres con antecedentes de enfermedad de Hodgkin tratada con irradiación de tipo manto antes de la edad de 15 años, especialmente cuando se administraba en combinación con quimioterapia, presentan un incremento muy marcado del riesgo de cáncer de mama, por lo que deben presentar un seguimiento estricto<sup>17</sup>.

#### Densidad mamaria y patrón mamográfico

El patrón de parénquima mamario por mamografía, se ha asociado con el riesgo de cáncer de mama, así, a mayor densidad se encuentra un mayor riesgo<sup>18</sup>.

#### **Lesiones premalignas**

Las lesiones benignas mamarias pueden subdividirse en proliferativas o no proliferativas. Las lesiones no proliferativas no presentan un mayor riesgo de cáncer de mama. En cuanto a las lesiones proliferativas, debemos distinguir entre aquellas que no presente atipia que suponen un incremento del doble de riesgo de padecer cáncer de mama; frente a las que presentan atipia que suponen un incremento de cuatro a cinco veces el riesgo de cáncer de mama, siendo incluso más marcado en caso de presentar historia familiar de primer grado de cáncer de mama. Esta será la población diana para estudios de quimiopreención.

### **1.3 DIAGNÓSTICO Y ESTADIFICACIÓN**

#### **1.3.1 Diagnóstico histológico**

Cualquier área de la mama con criterios de sospecha por exploración o criterios radiológicos, requiere de una biopsia para el diagnóstico. En caso de lesión palpable, la punción con aspiración con aguja fina (PAAF) o la corebiopsia son los procedimientos empleados. Las ventajas y desventajas de las mismas se recogen en la tabla 1.

**Tabla 1. Ventajas y desventajas de las técnicas. Adaptado de de Vita et al<sup>19</sup>**

Área sospechosa	Técnica	Ventajas	Desventajas
Palpable	PAAF	Rápida, no complicaciones locales, Resultado inmediato	No distinguir entre carcinoma in situ e infiltrante. Algunos falsos negativos. Precisa citopatólogo experto
	Core biopsia	Rápido, , no incisión quirúrgica, puede interpretarlo un patólogo general	Algunos falsos negativos Error de muestra en lesiones extensas
No palpable sólida	PAAF guiada por ECO	Rápida, no complicaciones locales, resultado inmediato	No distingue entre carcinoma in situ e infiltrante. Algunos falsos negativos. Precisa citopatólogo experto
	Core Biopsia guiada por ECO	Rápido, no incisión quirúrgica, puede interpretarlo un patólogo general	Algunos falsos negativos Error de muestra en lesiones extensas
	Marcaje con agujas guiado por ECO para posterior exéresis	Histología completa Evaluación de márgenes Puede servir como cirugía definitiva	Más doloroso La incisión debe incluirse en el plan de tratamiento Puede perturbar drenaje linfático para posterior centinela No se visualizan las microcalcificaciones
No palpable microcalcificaciones	Core biopsia por estereotaxia Marcaje radiológico y escisión quirúrgica	Requiere mesa de estereotaxia Histología completa Evaluación de márgenes Puede servir como cirugía definitiva	Caro Más doloroso La incisión debe incluirse en el plan Puede perturbar drenaje linfático centinela No se visualizan las microcalcificaciones
Detectada por RMN	Biopsia guiada por RMN o ECO	-	-

PAAF: Punción con aspiración con aguja fina; RMN: Resonancia Magnética Nuclear;  
ECO: Ecografía

Es importante llegar a un diagnóstico, ya que ayudará a decidir el tipo de procedimiento quirúrgico a seguir en la axila; así como el tipo de tratamiento a seguir (cirugía versus tratamiento neoadyuvante). En caso de lesión no palpable, el diagnóstico deberá realizarse con la ayuda de técnicas de imagen. En caso de lesiones sólidas se podrá realizar PAAF o biopsia guiadas por ecografía. En caso de áreas de microcalcificaciones, requerirán una biopsia por estereotaxia guiada por mamografía, o marcaje por mamografía para su posterior exéresis. La resonancia puede servir para la localización y biopsia de áreas sospechosas no visibles por otras técnicas de imagen.

### **1.3.2 Clasificación patológica**

La clasificación histopatológica de los tipos de cáncer de mama se basa en la clasificación por microscopio de luz convencional hecha por el patólogo. La más usada es la World Health Organization classification<sup>20</sup> que mostramos a continuación; donde el carcinoma ductal invasivo sin otra especificación constituye el 70-75% de los casos.

Carcinoma ductal invasivo

Muchos son "sin otra especificación"

El resto:

Carcinoma de tipo mixto

Carcinoma pleomórfico

Carcinoma con células gigantes osteoclastos

Carcinoma con rasgos de coriocarcinoma

Carcinoma lobular invasivo

Carcinoma tubular

Carcinoma cribriforme invasivo

Carcinoma medular

Carcinoma mucinoso y otros tumores con abundante mucina

Carcinoma mucinoso

Carcinoma mucinoso de células columnares

Carcinoma de células en anillo de sello

Tumores Neuroendocrinos

Carcinoma neuroendocrino sólido

Tumor carcinoide atípico

Carcinoma de célula pequeña

Carcinoma neuroendocrino de célula grande

Carcinoma papilar invasivo

Carcinoma micropapilar invasivo

Carcinoma apocrino

Carcinoma metaplásico

Carcinoma metaplásico puro epitelial

Carcinoma de células escamosas

Adenocarcinoma con metaplasia de células fusiformes

Carcinoma adenoescamoso

Carcinoma mucoepidermoide

Carcinomas mixtos epitelio/mesénquima

Carcinoma rico en lípidos

Carcinoma secretor

Carcinoma oncocítico

Carcinoma adenoide quístico

Carcinoma de células acínicas

Carcinoma de células claras rico en glucógeno

Carcinoma sebáceo

### 1.3.3 Estadificación

La estadificación consiste en agrupar a los pacientes de acuerdo con la extensión del tumor mamario que presenten. Esto puede realizarse según los hallazgos clínicos o patológicos. La clasificación más comúnmente usada es la del American Joint Committee on Cancer (AJCC), que incluye las clasificaciones tanto clínicas como patológicas basadas en las características del tumor (T), el estado ganglionar (N), y la presencia o no de metástasis (M); cuya última edición fue publicada en el 2009 para ponerse en práctica en el 2010<sup>21</sup>.

#### Tumor primario (T)

TX	No se puede evaluar el tumor primario.
T0	No existe prueba de tumor primario.
Tis	Carcinoma in situ.
Tis	CDIS.
Tis	CLIS.
Tis (Paget)	Enfermedad de Paget del pezón sin carcinoma asociado (Nota: la enfermedad de Paget con carcinoma asociado se clasifica de acuerdo con el tamaño del tumor)
T1	El tumor mide $\leq 20$ mm en su mayor dimensión.
T1mi	El tumor mide $\leq 1$ mm en su mayor dimensión.
T1a	El tumor mide $> 1$ mm pero $\leq 5$ mm en su mayor dimensión.
T1b	El tumor mide $> 5$ mm pero $\leq 10$ mm en su mayor dimensión.
T1c	El tumor mide $> 10$ mm pero $\leq 20$ mm en su mayor dimensión.
T2	El tumor mide $> 20$ mm pero $\leq 50$ mm en su mayor dimensión.
T3	El tumor mide $> 50$ mm en su mayor dimensión.
T4	El tumor mide cualquier tamaño con extensión directa a la pared pectoral o a la piel (ulceración o nódulos cutáneos).
T4a	Extensión a la pared torácica que no solo incluye adherencia o invasión a los músculos pectorales.
T4b	Ulceración o nódulos satélites ipsilaterales o edema (incluyendo la piel de naranja) la cual no satisface el criterio de carcinoma inflamatorio.
T4c	Ambos, T4a y T4b.
T4d	Carcinoma inflamatorio.

## Ganglios linfáticos regionales (N)

Clínico	
NX	No se puede evaluar el ganglio linfático regional (p.ej., se extirpó previamente).
N0	No hay metástasis regional a los ganglios linfáticos.
N1	Metástasis en grado ipsilateral movable I, II ganglio linfático axilar o axilares.
N2	Metástasis en grado ipsilateral I, II ganglios linfáticos axilares que están clínicamente fijos o apelmazados.
	O Metástasis en ganglios mamarios ipsilaterales internos detectados clínicamente en ausencia de metástasis a ganglio linfático axilar clínicamente manifiesta.
N2a	Metástasis en ganglios axilares ipsilaterales fijos entre si o a otras estructuras.
N2b	Metástasis solamente en ganglios mamarios internos ipsilaterales detectados clínicamente en ausencia de metástasis clínicamente manifiesta en ganglios axilares
N3	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) infraclaviculares ipsilaterales
	O
	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) mamarios ipsilaterale(s) interno(s) clínicamente detectado(s) con metástasis manifiesta en ganglios linfáticos axilares
	O
	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) supraclaviculare(s) ipsilaterale(s) con implicación axilar o mamaria interna de ganglios linfáticos o sin esta.
N3a	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) infraclaviculares ipsilaterales y axilares
N3b	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) mamarios internos ipsilaterales y ganglio(s) linfático(s) axilares.
N3c	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) ipsilaterales supraclaviculares.

## Ganglios linfáticos regionales (pN) patológico

pNX	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales (p.ej., extirpación previa o no se extirpó para un estudio patológico).
pN0	No se identificó metástasis en ganglios linfáticos regionales por medios histológicos.
pN0(i-)	No afectación histológica, inmunohistoquímica negativa
pN0(i+)	No afectación histológica, inmunohistoquímica positiva, pero sin acúmulos celulares mayores a 0.2 mm
pN0(mol-)	Histológicamente no hay metástasis a ganglio linfático regional, hallazgos moleculares negativo (RT-PCR).
pN0(mol+)	Hallazgos moleculares positivos (RT-PCR), pero no se localizó metástasis a ganglio linfático regional alguno mediante histología o inmunohistoquímica
pN1mi	Micrometástasis (>0,2 mm o >200 células pero ninguna >2,0 mm).
pN1	Metástasis en 1 a 3 ganglios axilares y/o metástasis microscópicas en ganglios de la cadena mamaria interna detectadas por biopsia de ganglio centinela pero no clínicamente aparentes
pN1a	Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos axilares, al menos una metástasis >2,0 mm.
pN1b	Metástasis en ganglios mamaros internos con micrometástasis o macrometástasis detectada mediante biopsia de ganglio linfático centinela pero sin detección clínica.
pN1c	Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos axilares y ganglios linfáticos mamaros internos con micrometástasis o macrometástasis localizado mediante biopsia de ganglio linfático pero sin detección clínica.
pN2	Metástasis in 4-9 ganglios linfáticos axilares o en ganglios de la cadena mamaria interna ipsilateral clínicamente aparentes en ausencia de metástasis ganglionares axilares.
pN2a	Metástasis en 4-9 ganglios linfáticos axilares (al menos un depósito tumoral >2 mm).
pN2b	Metástasis en ganglios linfáticos mamaros internos detectados clínicamente en ausencia de metástasis a ganglio linfático axilar.
pN3	Metástasis en $\geq 10$ ganglios linfáticos axilares; o en ganglios infraclaviculares; o en ganglios de la cadena mamaria ipsilateral clínicamente aparentes en presencia de afectación de 1 o más ganglios axilares ipsilaterales; o en más de 3 ganglios axilares con afectación microscópica de ganglios de la cadena mamaria interna ipsilateral no clínicamente aparentes; o metástasis en ganglios supraclaviculares ipsilaterales
pN3a	Metástasis en $\geq 10$ ganglios linfáticos axilares (por lo menos un depósito tumoral >2,0 mm) o metástasis a los ganglios infraclaviculares ipsilaterales
pN3b	Metástasis en >3 ganglios linfáticos axilares y ganglios mamaros internos detectados clínicamente en presencia de metástasis a ganglio linfático axilar de $\geq 1$ ganglio linfático axilar positivo; o metástasis en >3 ganglios linfáticos axilares y ganglios linfáticos internos mamaros con micrometástasis o macrometástasis localizada mediante biopsia de ganglio linfático centinela pero sin detección clínica.
pN3c	Metástasis en ganglios linfáticos ipsilaterales supraclaviculares.

### Metástasis a distancia (M)

M0	No hay prueba clínica o radiográfica de metástasis a distancia.
cM0(i+)	No hay prueba clínica o radiográfica de metástasis a distancia, pero si detección de depósitos células tumorales moleculares o microscópicas en la sangre circulante, médula ósea u otros tejidos ganglionares no regionales que tienen $\leq 0.2$ mm en pacientes sin signos o síntomas de metástasis.
M1	Hay metástasis a distancia según lo determinan medios clínicos o radiográficos clásicos o se comprueba por medios histológicos que tiene $>0.2$ mm.

### Estadíos

Estadio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0
IB	T0	N1mi	M0
	T1a	N1mi	M0
IIA	T0	N1b	M0
	T1a	N1b	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1a	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

## **1.4 FACTORES PRONÓSTICOS**

### **1.4.1 Factores clásicos**

#### **1.4.1.1 Estado ganglionar**

La ausencia o presencia de afectación ganglionar axilar constituye el factor pronóstico más importante en cáncer de mama. Existe una relación directa entre el número de ganglios afectados y el riesgo de recidiva a distancia<sup>22</sup>. Así, en base a los resultados del grupo NSABP, muchos ensayos clínicos estratifican a las pacientes en diferentes subgrupos: ganglios negativos, 1-3 ganglios afectados, 4-9 ganglios afectados, y 10 o más ganglios afectados.

Tradicionalmente el estado ganglionar axilar ha sido evaluado mediante el vaciamiento ganglionar de niveles I y II axilar. Con el fin de minimizar la morbilidad del vaciamiento ganglionar axilar, la introducción de la técnica del ganglio centinela ha sido implementada de forma creciente en la práctica diaria. Este procedimiento permite la detallada evaluación patológica de cada ganglio, con ello, un incremento de la posibilidad de detección de micrometástasis y la reestadificación de las pacientes. Así, la afectación de los ganglios linfáticos puede dividirse en: macrometástasis (>2 mm), micrometástasis (0.2-2 mm) y células tumorales aisladas (<2 mm). Existe gran controversia a cerca del valor pronóstico de las micrometástasis del ganglio centinela. Uno de los estudios con mayor seguimiento (18,9 años) no encontró diferencias en supervivencia entre pacientes con o sin micrometástasis<sup>23</sup>, sin embargo estudios más recientes sugieren un peor pronóstico para pacientes con afectación micrometastásica. Sin embargo, muchos de los estudios más antiguos se realizaron en base a la detección de micrometástasis a partir del re examen de los ganglios extraídos por vaciamiento ganglionar. Estudios más recientes, que evalúan las micrometástasis en el ganglio

centinela, apoyan un peor pronóstico para pacientes con micrometástasis, mientras sigue en cuestión el valor de las células tumorales aisladas<sup>24-28</sup>.

De forma similar, la presencia de micrometástasis en la médula ósea detectadas por inmunohistoquímica, es un factor pronóstico independiente en pacientes sin afectación ganglionar<sup>29</sup>.

#### **1.4.1.2 Tamaño tumoral**

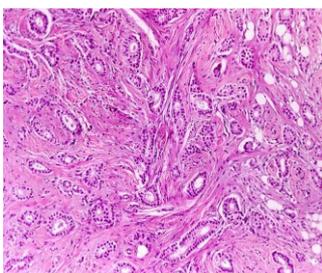
El tamaño tumoral es junto con el estado ganglionar uno de los factores pronósticos más consistentes en cáncer de mama, en especial en pacientes sin afectación ganglionar. El riesgo de recidiva se incrementa con el tamaño tumoral, y esta relación se mantiene con un largo seguimiento de las pacientes como han demostrado algunos estudios<sup>30</sup>. Para evaluar si existen pacientes en las que podríamos evitar la quimioterapia complementaria en función del tamaño, se han realizado evaluaciones retrospectivas de series de tumores de pequeño tamaño y sin afectación ganglionar. Así, el grupo del MD Anderson revisó en 51.246 pacientes, con tumores T1a,bN0M0, la probabilidad de mortalidad específica por cáncer de mama, que fue del 4%, sin embargo existían subgrupos de pacientes (edad menor de 50 años, alto grado, receptores de estrógenos y progesterona negativos), asociados a un mayor riesgo<sup>31</sup>. Recientemente se han reportado dos revisiones<sup>32,33</sup> de la evolución de los tumores con sobreexpresión del receptor de factor de crecimiento epidérmico 2 (HER-2) menores a 1 cm, en la revisión del hospital MD Anderson, la supervivencia libre de recidiva a los 5 años fue de un 77.1% para este tipo de tumores, mientras que fue de 93.7% para los tumores HER-2 negativos. Por tanto, aunque el tamaño es un factor pronóstico importante, en el caso de tumores de pequeño tamaño existen otros factores que deben tenerse en consideración en el momento de decidir el tratamiento adyuvante.

### 1.4.1.3 Grado histológico

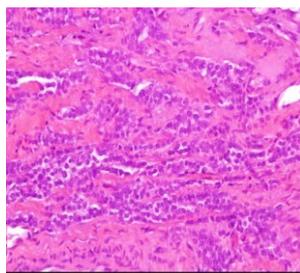
Pese a que el valor pronóstico del grado histológico ha sido puesto de manifiesto en diferentes reportes, las críticas en cuanto a este factor se relacionan con su pobre reproducibilidad y la variabilidad interobservador. Existen diferentes clasificaciones. La más ampliamente aceptada es la de Scarff-Bloom-Richardson que valora los tumores considerando el índice mitótico, la diferenciación y el pleomorfismo, y los clasifica en: bien diferenciados (grado I), moderadamente diferenciados (grado II) o pobremente diferenciados (grado III). Así, los tumores grado III se han asociado a un peor pronóstico que los de grado I. La clasificación de Fisher evalúa el grado nuclear incluyendo: tamaño nuclear, forma, componente nucleolar, patrón de cromatina, y rango mitótico.

El valor pronóstico del grado histológico es especialmente útil en el caso de tumores sin afectación ganglionar.

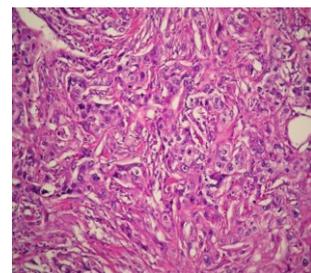
**Figura 1. Imágenes de grado histológico.**



Grado I



Grado II



Grado III

#### **1.4.1.4 Invasión linfovascular**

La invasión linfovascular ha sido asociada a mayor riesgo de recidiva y mortalidad, así en un estudio en 177 pacientes, la presencia de invasión linfovascular se asoció a peor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global<sup>34</sup>.

#### **1.4.1.5 Subtipo histológico**

Aunque la mayoría de cánceres de mama son tipificados como carcinoma ductal infiltrante (80-90%), existen algunos otros subtipos asociados a diferente pronóstico.

Así, el carcinoma inflamatorio constituye una entidad poco frecuente (de un 1 a un 5% de todos los cánceres de mama), caracterizándose por ser una enfermedad rápidamente progresiva, asociada a edema, eritema y “piel de naranja”, con un peor pronóstico (las series indican una supervivencia a los 3 años de alrededor de un 40%). Por otra parte se asocia más frecuentemente a amplificación del HER2 (30-50%), a expresión de Rho-C y E-Caderina, a mutaciones de p53, y a pérdida de WISP3.

Por otra parte, el carcinoma lobulillar que constituye el segundo subtipo más frecuente (5-10%), presenta diferentes características. Se ha descrito un diferente patrón de afectación metastásica respecto al carcinoma ductal, presentando menos frecuentemente metástasis en pulmón, hígado, parénquima cerebral; y más frecuentemente riesgo de metastatizar a leptomeninges, peritoneal, retroperitoneo, tracto gastrointestinal, órganos reproductivos y hueso. El valor pronóstico del carcinoma lobulillar, es decir si presenta una supervivencia libre de enfermedad y una supervivencia global diferente al carcinoma ductal es un tema discutido. En una reciente revisión de 12.206 pacientes incluidas en 15 estudios del International Breast Cancer Study Group, con un seguimiento medio de 13 años, las pacientes con carcinoma lobulillar comparadas con las de carcinoma ductal presentaban mayor edad, tumores de

mayor tamaño, mejor diferenciados, más frecuentemente con RE positivo y menor invasión vascular; fueron tratadas más frecuentemente con mastectomía; y presentaban una mayor ventaja en supervivencia libre de enfermedad (SLE) y supervivencia global (SG) precoz (antes de los 6 años para SLE y antes de los 10 años para SG), pero una desventaja tardía (tras 6 años para SLE y tras 10 años para SG) respecto al carcinoma ductal.

Existen otros tipos histológicos menos frecuentes (papilar puro, tubular y mucinoso), que identifican pacientes con mejor pronóstico que las afectas de carcinoma ductal. El carcinoma medular también presenta mejor pronóstico que el ductal, pero no tan excelente como los anteriores.

#### **1.4.2 Características del paciente**

##### **1.4.2.1 Edad y estado menopáusico**

La edad menor a 35 años se ha asociado a un peor pronóstico en diferentes series, incluso ajustando por otros factores pronósticos.

##### **1.4.2.2 Raza**

Las mujeres afroamericanas e hispanas presentan peor supervivencia que las de raza blanca. La razón puede ser multifactorial, como razones socioeconómicas, diferencias en el estadio al diagnóstico, pero también puede contribuir una diferente biología tumoral.

#### **1.4.3 Valor pronóstico de los receptores hormonales**

La determinación de los receptores hormonales de estrógenos (RE) (RE $\alpha$  y RE $\beta$  genes distintos conjuntamente referidos como RE), y de progesterona (RP) (RP $\alpha$  y RP $\beta$ , dos isoformas conjuntamente referidas como RP) son imprescindibles en el manejo clínico actual del cáncer de mama.

Los receptores hormonales pertenecen a una familia de receptores nucleares que actúan como factores de transcripción cuando se unen a sus respectivos ligandos. La unión de hormonas al RE $\alpha$  facilita la activación del receptor y su unión a elementos de respuesta a estrógenos presentes en la región promotora de los genes de respuesta a estrógenos. Los RE y RP presentan un gran número de proteínas correguladoras que actúan para influenciar la transcripción de los genes de respuesta a estrógenos. A través de la unión al DNA, los RE influyen la expresión de los genes de respuesta a estrógenos, como son las dos isoformas del RP, y otros componentes claves para la supervivencia celular.

Recientemente la Sociedad Americana de Oncología Médica junto con Colegio de patólogos americanos ha publicado una guía de recomendaciones para la determinación de los RE y RP en el cáncer de mama<sup>35</sup>. En dicha guía se recomienda la determinación del estado de los receptores hormonales en todos los cánceres de mama invasivos, y en todas las recidivas por cáncer de mama. También se recomienda la consideración de receptor positivo (estrógenos o progesterona) a partir de un mínimo de un 1% de células tumorales positivas. El panel también recomienda una mayor estandarización en como los resultados deben ser reportados, requiriendo tres elementos en el reporte: a) El porcentaje de células tumorales positivas, b) la intensidad de la positividad (expresada como débil, moderada o fuerte), y c) una interpretación del resultado (receptor positivo, receptor negativo o receptor no interpretable).

#### **Valor pronóstico.**

Los RE son considerados un factor pronóstico, así, los rangos de recurrencia en los primeros 5 años en mujeres con tumores con RE positivo sin tratamiento complementario son 5-10% inferiores en comparación a los de los tumores RE negativo<sup>36</sup>. Sin embargo, estudios con más seguimiento consideran que se trata de una

variable dependiente del tiempo, y con mayor tiempo de seguimiento, las diferencias en el rango de recidivas y mortalidad disminuyen e incluso desaparecen, sugiriendo que los RE podrían ser un marcador de rango de crecimiento más lento más que de un potencial intrínseco metastásico<sup>37</sup>. Por otra parte, los RE se asocian a otros factores pronósticos como son edad más avanzada, tumores bien diferenciados, menor índice de proliferación, menor porcentaje de amplificación de HER2.

La utilidad de los RP como factor pronóstico está menos establecida. Sin embargo, estudios recientes, refuerzan el valor pronóstico del RP. La pérdida de RP se correlaciona con la forma luminal B de mayor agresividad, con la expresión de EGFR y HER2, y con la vía PI3K/Akt/mTOR, hechos que se correlacionan con la resistencia al tratamiento hormonal.

#### **1.4.4 Activadores e inhibidores del plasminógeno**

El activador del plasminógeno (uPA) y el activador tisular del plasminógeno (t-PA) pertenece a una familia de proteínas serín-proteasas, que cuando son activadas por plasmina, pueden degradar varios componentes de la matriz extracelular, constituyendo así un factor clave en el crecimiento celular, la invasión celular y las metástasis. Otros componentes del sistema son PAI-1 y PAI-2 que forman parte de una familia de inhibidores de serin proteasas, así PAI-1 es el principal inhibidor de uPA y t-PA.

Numerosos estudios retrospectivos han confirmado su valor pronóstico, asociando alta expresión de uPA y alto PAI-1 con una peor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global. Estos datos fueron confirmados por el análisis de 8.377 pacientes<sup>38</sup>. Muchos de los datos presentados se realizaron mediante técnicas de ELISA en tejido fresco congelado, lo cual ha limitado su uso más generalizado.

#### **1.4.5 Receptores de factores de crecimiento: receptor de factor de crecimiento epidérmico 2 (HER-2)**

Los receptores de factor de crecimiento tipo I incluyen una familia de cuatro receptores transmembrana como son: a) Erb-B1/EGFR, (HER-1), b) Erb-B2/neu (HER-2), c) Erb-B3 (HER-3), y Erb-B4 (HER-4). El dominio extracelular de HER-1, HER-3 y HER-4 interactúa con ligandos específicos, mientras que no se ha identificado un ligando específico para HER-2, sin embargo HER-2 puede ser activado por los otros ligandos que activan los correceptores de HER-2. Tras la unión de ligandos al dominio extracelular de HER-1, HER-3 y HER-4, estos forman heterodímeros con HER-2, en los cuales la kinasa HER-2 puede modular la internalización del receptor y vías de transducción de señales en relación con la proliferación celular y la supervivencia.

#### HER-2

El protooncogen Erb-B2 (HER-2/neu, c-erb-B2, símbolo de gen ERBB2) codifica una proteína monomérica de 185 kDa conocida como fosfoproteína 185, y comúnmente como HER-2 o HER-2/neu. HER-2, como hemos mencionado, forma parte de la familia de receptores de factor de crecimiento epidérmico, siendo una proteína de membrana expresada en niveles bajos en todas las células epiteliales y tejidos normales fetales y de adultos.

El gen Erb-B2 está amplificado, o incrementadas sus números de copias, en aproximadamente el 15-25% de todos los cánceres de mama<sup>39</sup>, así como en un porcentaje variable de neoplasias de ovario, vejiga urinaria, endometrio, glándulas salivares, y neoplasias gástricas.

La amplificación de Erb-B2 con la resultante sobreexpresión e incremento de los niveles de la proteína HER-2 se ha asociado con múltiples vías en relación con el cáncer, como vías de proliferación, angiogénesis, incremento de división celular, e incremento de invasividad<sup>40</sup>.

Método de determinación

Aunque el estado de HER-2 inicialmente fue determinado utilizando tejidos congelados, su valoración en tejido parafinado se ha implantado en la práctica diaria. Existen diversas opciones para su determinación en tejido parafinado:

1. Determinación del estado de amplificación del gen, para lo que existen diferentes técnicas de hibridación in situ, como son: a) Hibridación in situ por fluorescencia (FISH), que es la técnica más frecuentemente usada, b) Hibridación in situ cromogénica (CISH), c) Hibridación in situ de plata (SISH)
2. Determinación de la expresión de mRNA de HER2, mediante: a) el análisis por RQ-PCR (*quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction*), o b) Perfiles de expresión de RNA basados en microarrays.
3. Determinación de la sobreexpresión de la proteína mediante inmunohistoquímica

En general el análisis inmunohistoquímico es el más generalizado, la FDA aprobó Hercep Test (Dako, Carpinteria, California) y CB11 (Patway), como métodos de determinación. La tinción inmunohistoquímica de las membranas de las células tumorales, son valoradas por el patólogo y evaluadas de 0 a 3 (0 y 1 consideradas con ausencia o baja expresión, 2 como expresión indeterminada, y 3 como sobreexpresión). Las guías de la American Society of Clinical Oncology (ASCO) y del Colegio Americano de patólogos (CAP) recomiendan la realización de FISH en los casos de HER-2 2+<sup>41</sup>. Sin embargo, existe discordancia entre la determinación inmunohistoquímica y por FISH, existiendo falsos negativos (en general se considera que menos de un 10% de pacientes con score 0 o 1 por IHQ presentarán amplificación por FISH), y falsos positivos (alrededor de un 10% según las series de casos con score 3+ por IHQ que no presentan amplificación por FISH) por lo que algunos autores son partidarios de la determinación sistemática por FISH<sup>42</sup>.

La FISH es el segundo método más frecuentemente utilizado, siendo un método mucho más preciso que la valoración inmunohistoquímica. La FDA aprobó tres test posibles para la valoración de HER-2: PathVysion, PharmDx y INFORM. La amplificación de HER-2 por PathVysion y PharmDx se valora a partir del número de señales de copia del gen HER-2 y el número de señales del centrómero del cromosoma 17. Cuando el ratio de copias del gen HER-2 respecto a las copias del centrómero del cromosoma 17 es mayor o igual a 2.0, HER-2 se considera amplificado. Recientemente, en una guía de ASCO y CAP, se recomienda poner el punto de corte para la positividad en 2,2 y considerar el ratio entre 1.8 y 2.2 como indeterminado, situación que solo se da en un 2% de cánceres de mama.

### **Valor pronóstico**

La sobreexpresión de HER-2 es un factor pronóstico en ausencia de tratamiento complementario. La sobreexpresión de HER-2 se ha asociado con peor supervivencia libre de enfermedad y peor supervivencia global en pacientes con afectación ganglionar tratadas con cirugía sin tratamiento complementario. HER-2 es un factor pronóstico independiente del estado ganglionar, el tamaño tumoral, el grado histológico y el estado del receptor hormonal<sup>43</sup>. Diferentes estudios, dos de ellos de publicación reciente, recogen información del valor pronóstico de la sobreexpresión de HER-2 en aquellos tumores sin afectación ganglionar con un tamaño inferior a 1 cm y sin tratamiento adyuvante con Trastuzumab; los trabajos coinciden en que un 6-10% de estos pequeños tumores presentarán sobreexpresión de HER-2 y en este caso presentarán un peor pronóstico presentando peor supervivencia libre de enfermedad a los 5 años<sup>44,45</sup>.

El cáncer de mama metastásico al diagnóstico supone un 3-6% del total, sin embargo, un 31% de estos casos tendrán sobreexpresión de HER-2. Por otra parte, en

caso de enfermedad metastásica, las pacientes con sobreexpresión de HER-2 tendrán más riesgo de afectación cerebral a lo largo de su evolución (25-48%)<sup>46</sup>.

#### **1.4.6 Índices de proliferación**

La base del crecimiento y diseminación de un tumor se encuentra en la capacidad de las células de dividirse y replicarse. Existen diferentes técnicas que se han barajado para valorar la capacidad de proliferación de un tumor: a) índice mitótico, b) índice de captación de timidina, c) fase S, d) Ki67, e) ciclinas, f) topoisomerasa II alfa.

El valor pronóstico y predictivo del índice de proliferación tumoral en cáncer de mama ha sido evaluado en algunos estudios, aún así, las guías de la American Society of Clinical Oncology (ASCO) no lo incluyen la lista de parámetros biológicos de rutina en la decisión del tratamiento complementario. Sin embargo, en el último consenso de St Gallen<sup>47</sup> los expertos recomiendan añadir a los parámetros tradicionales, el análisis de marcadores de proliferación (como Ki67 o el índice mitótico) para la decisión del tratamiento complementario.

##### **Índice mitótico**

Es el método más antiguo de determinación del índice de proliferación, generalmente se expresa como el número de cuerpos mitóticos por campo de gran aumento. En general, elevados rangos de índice mitótico se han asociado con un peor pronóstico. Aunque existe heterogeneidad en el punto de corte y en los métodos de evaluación, el índice mitótico es un método que permite una sencilla evaluación del grado de proliferación.

##### **Índice de captación de timidina**

Consiste en la valoración del número de células que se encuentran sintetizando DNA, lo que proporciona una estimación de la proporción de células en la fase S y G2/M del ciclo celular. Esta técnica requiere la valoración de tejido fresco o congelado,

cosa que junto con la falta de estandarización de la técnica, no la hacen viable en la práctica diaria.

### **Determinación de fase S por citometría de flujo**

Se basa en la estimación de la proporción de células con DNA parcialmente replicado, para ello se requiere de la valoración de tejido en fresco o congelado. Su valor pronóstico ha sido documentado en diferentes estudios, pero su falta de estandarización, la inclusión del estroma en la valoración que la hace más dificultosa, y el requerimiento de tejido fresco o congelado, obstaculizan que esta técnica pueda introducirse en la práctica diaria.

### **Ki 67**

Ki67 es un antígeno nuclear expresado en células en fase de proliferación (G1, S, G2 y M), pero no durante la fase G0. Los niveles de ki67 son bajos en las fases G1 y S, adquiriendo un pico en la fase de mitosis. Aunque parece ser que esta proteína juega un papel importante en la división celular, no se conoce la función exacta de Ki67.

Inicialmente, los anticuerpo para identificar esta proteína eran útiles solamente en tejido congelado; pero con el tiempo, nuevos anticuerpos se han desarrollado para su detección en tejido en parafina. Entre ellos, MIB-1 ha sido el validado más frecuentemente. En general, el resultado depende del porcentaje de células que detecta el anticuerpo, aunque esta metodología tiene limitaciones, como son su baja reproducibilidad, y la falta de homogeneidad en los diferentes estudios para considerar un punto de corte que determine su valor pronóstico; así como la dificultad de su estandarización.

Ki67 como factor pronóstico. Diferentes estudios han evaluado el valor pronóstico de Ki67. Así Cheang y colaboradores<sup>48</sup> describieron que mediante la determinación inmunohistoquímica de RE, RP, HER-2 y Ki67 podían dividir los

tumores en los subtipos luminal A y B de forma similar a un perfil de expresión génica de 50 genes. Aquellos tumores luminales con niveles de Ki67 iguales o superiores a 14% eran clasificados como luminal B, mientras los que presentaban niveles inferiores a 14% eran clasificados como luminal A. De esta forma en una serie de tumores sin afectación ganglionar no tratados con quimioterapia describieron 625 luminales A, 263 luminales B, y 55 luminal/HER-2 positivo; la supervivencia específica de cáncer a los 10 años fue del 92% para los luminales A, 79% para los luminales B y del 79% para los luminal/HER-2 positivo. Por otra parte Ki67 se ha asociado a negatividad de receptores de estrógenos y HER-2 positivo.

En un meta-análisis reciente<sup>49</sup> que recogía datos de 29 estudios (en 12.000 pacientes), se confirmó que Ki67 confería un peor pronóstico en la población estudiada, otorgando un mayor riesgo de recaída (HR 1.93 [95% CI 1.74-2.14]  $p < 0.001$ ) en todos los pacientes, tanto ganglio negativo como positivo y peor supervivencia (HR 1.95 [95% CI 1.70-2.24]  $p < 0.001$ ), de acuerdo con los puntos de corte considerados por los investigadores (5-30%). Otro meta-análisis<sup>50</sup> reciente evaluó 43 estudios (15790 pacientes), de los cuales 24 estudios presentaban análisis multivariante de Ki67 y supervivencia; 11 de estos estudios reportaron peor supervivencia en presencia de ki67.

En definitiva, existe una evidencia creciente a cerca del valor pronóstico de Ki67, aunque son necesarios mayores esfuerzos en la estandarización de su determinación y evaluación.

### **Otros: Ciclinas**

La ciclinas dependientes de kinasas y las ciclinas juegan un papel importante en la regulación del ciclo celular. Su determinación se ha realizado por inmunohistoquímica en tejido parafinado, o por RT-PCR de tejido fresco. Las formas de bajo peso molecular de ciclina E se miden por Western blot; existiendo discordancias en

su valor pronóstico en relación con el método de determinación. Existe un estudio retrospectivo<sup>51</sup>, de una sola institución, en el que usando el análisis por Western blot de muestras congeladas, el valor de Ciclina E adquiriría un importante valor pronóstico. En un metaanálisis<sup>52</sup> reciente, de 12 estudios publicados (2.534 pacientes), en el que la determinación de Ciclina E sigue presentando un valor pronóstico. Sin embargo en un estudio reciente<sup>53</sup> en el que todas las pacientes recibieron quimioterapia adyuvante la determinación inmunohistoquímica de Ciclina E no se asoció a un peor pronóstico, sin embargo, estos resultados se han atribuido al método de determinación y al hecho de que la Ciclina E podría asociarse a la respuesta a la quimioterapia, enmascarando su valor pronóstico en pacientes tratados.

#### **1.4.7 Arrays de expresión génica**

Hasta hace pocos años, hablar de factores pronósticos y predictivos era hablar de un solo factor o de paneles de unos pocos factores; con la implantación de la tecnología de la genómica, como son los microarrays capaces de valorar gran número de genes, se están empezando a construir firmas genéticas de tumores individuales, con el fin de conseguir una más afinada aproximación pronóstica y predictiva.

##### **1.4.7.1 Subtipos intrínsecos de cáncer de mama**

En el año 2000, Perou et al identificaron subtipos de cáncer de mama en una población de 40 pacientes con cáncer de mama localmente avanzado<sup>54</sup>. Identificaron 496 genes definidos como genes intrínsecos, con escasa variabilidad entre diferentes muestras de un tumor, y alta variabilidad entre tumores, que sirvieron para definir subtipos de cáncer de mama, como son: a) Luminal A, b) Luminal B, c) Basal, d) HER-2 positivo, RE negativo, y e) el subtipo normal, que es menos claramente un subtipo, se piensa más bien que corresponde a un artefacto técnico. Posteriormente, en el 2007, se identificó un nuevo subtipo molecular denominado claudin-low<sup>55</sup>.

Estos subtipos tienen un importante valor pronóstico, en particular en pacientes con subtipo basal o HER-2 positivo/ RE negativo, que presentan peor tiempo a la progresión y supervivencia que los luminal A según análisis de diferentes bases de datos. Su valor predictivo será comentado más adelante.

**Subtipos luminales.** Son el subtipo más frecuente de cáncer de mama, se llaman así por presentar un patrón de expresión génica que recuerda el componente epitelial luminal de la mama. Dentro de los tumores luminales distinguimos entre Luminal A y B, presentando diferencias notables. Los tumores luminal A, presentan alta expresión de genes reguladores de RE, baja expresión de HER-2, baja expresión de marcadores de proliferación incluyendo Ki67. Contrariamente, los tumores luminal B suelen presentar niveles altos de marcadores de proliferación, mutaciones de p53, y menor expresión de RE y de los genes regulados por RE. En general diferentes estudios consideran los tumores luminal A como más frecuentes constituyendo el 50% de neoplasias de mama, y los luminales B alrededor de un 10%; sin embargo dichos estudios son en base a determinación inmunohistoquímica y pueden ser inexactos. Los estudios de microarray sitúan el subgrupo luminal A en un 30-40% y el luminal B en un 20%. Los tumores luminal A presentan un mejor pronóstico que los luminales B<sup>56</sup>.

**HER-2 positivo/RE negativo.** Este subgrupo presenta elevada expresión de HER-2 y de otros genes situados cerca de HER-2 en el genoma, incluyendo GRB7. Los tumores con HER-2 positivo pero con RE positivo no se incluyen en este grupo sino en el subgrupo luminal B. Suelen ser tumores con alto grado de proliferación, siendo el 75% de alto grado histológico, y presentando el 40% mutaciones de p53. Este subtipo supone un 5-10% de los casos de cáncer de mama. En la era previa al tratamiento antiHER-2 se trataba de un subgrupo de peor pronóstico.

**Subtipo basal.** Se caracteriza por la baja expresión de los genes luminales en relación al receptor hormonal y HER-2, alta expresión de los clusters de proliferación, y alta expresión de un cluster de genes llamado el cluster basal. El cluster de genes basales incluye citokeratinas epiteliales, como la CK5/6, 14, y 17, EGFR, c-Kit, vimentina, p-caherina, fascina, caveolinas 1 y 2, y  $\alpha\beta$ cristalina. En pacientes con mutaciones de BRCA1 que desarrollan un cáncer de mama, en el 80% de ocasiones es fenotipo basal. Sin embargo, dentro de los cánceres de mama basales, muchos de ellos son esporádicos. Diferentes estudios han demostrado una relación entre el subtipo basal y los cánceres de mama desarrollados en la premenopausia y con la raza negra. El subtipo basal se ha asociado a un peor pronóstico en diferentes series, menor riesgo de recidiva ósea, mayor riesgo de metástasis viscerales, y mayor riesgo de afectación cerebral<sup>57</sup>.

**Claudin-low.** Se caracterizan por mostrar marcadores epiteliales de transición epitelio-mesénquima y características de células madre de cáncer. Estos tumores se caracterizan por baja expresión de proteínas de unión como son la Claudina 3, 4 y 7 y E-cadherina. Por otra parte, la firma genética de iniciación celular tumoral derivada de células y mamoesferas de cáncer de mama CD4 positivo/ CD2 bajo, se encontró exclusivamente en el subtipo claudin-low<sup>58,59</sup>. Todo ello, sugiere que esta firma genética pierde las características de las células epiteliales y está enriquecida de las características de las células de iniciación tumoral. Así, clínicamente, este tipo de tumores acostumbra a presentar carcinomas infiltrantes RE negativos, RP negativos y HER-2 negativo, con alta frecuencia de diferenciación metaplásica y medular. Este subtipo representa el 7-14% de los tumores triple negativos, y se caracteriza por presentar peor pronóstico comparado con el subtipo luminal A, sin embargo, similar a los subgrupos de peor pronóstico como son luminal B, HER-2 positivo/RE negativo y subtipo basal<sup>60</sup>.

#### **1.4.7.2 Firmas genéticas**

##### **ONCOTYPE®**

El análisis de 21 genes con el Recurrence Score (RS, Oncotype DX), se desarrolló a partir de 250 genes candidatos seleccionados de la literatura, usando 447 pacientes, la mayoría con tumores ganglio negativo, hormonossensibles, usando RT-PCR (qRT-PCR) para examinar un limitado número de genes en tejido parafinado. De los 255 genes, se seleccionaron 16 relacionados con el cáncer, y 5 de referencia, para calcular el RS a partir de una fórmula matemática. Esta técnica tiene la ventaja sobre otras firmas que puede realizarse sobre tejido parafinado no requiriendo tejido fresco congelado<sup>61</sup>.

El RS fue validado en el estudio NSABP B-14 que evaluaba el beneficio del tratamiento con Tamoxifeno en pacientes intervenidas de cáncer de mama sin afectación ganglionar. De las 2617 pacientes incluidas en la rama de Tamoxifeno, con seguimiento a 10 años, se evaluó el RS en 668. El riesgo de recidiva a distancia a los 10 años fue del 6.8% en las pacientes (51%) con RS <18, 14.3% en las pacientes (22%) con RS 18-30, y 30.5% en las pacientes (27%) con RS ≥31. La comparación de los resultados del test entre las pacientes de bajo y alto riesgo presentaba una  $p < 0.001$ . En el análisis multivariante, incluyendo edad, tamaño tumoral, grado, HER2 y receptores hormonales, sólo RS y grado conservaban un valor pronóstico<sup>62</sup>.

Por otra parte, el RS fue evaluado también en el estudio NSABP-B20 que aleatorizaba a las pacientes a recibir Tamoxifeno y quimioterapia (esquema MF), Tamoxifeno y quimioterapia (esquema CMF) o Tamoxifeno sólo. El estudio de RS en 651 pacientes permitió dividir las en grupos de riesgo. En los grupos con RS bajo o intermedio no existían diferencias en riesgo de recidiva a los 10 años entre las pacientes

con o sin quimioterapia; sin embargo en el grupo de alto riesgo el tratamiento con quimioterapia suponía una reducción del 28% en el riesgo de recidiva<sup>62</sup>.

También en el ensayo clínico del grupo ECOG 2197 que comparaba el tratamiento adyuvante con AT (Adrimicina, Docetaxel) versus AC (Adriamicina, Ciclofosfamida) en pacientes intervenidas de neoplasia de mama con o sin afectación ganglionar, el análisis del RS de 465 pacientes fue un factor pronóstico independientemente del tratamiento realizado<sup>63</sup>.

También hemos de mencionar el ensayo del grupo SWOG 8814 que aleatorizaba a las pacientes intervenidas de neoplasia de mama con afectación ganglionar, a recibir Tamoxifeno versus seis ciclos de quimioterapia tipo FAC concomitante a Tamoxifeno o seis ciclos de FAC seguidos de Tamoxifeno. El RS fue evaluado en las 148 pacientes que recibieron solo Tamoxifeno y en las 219 que recibieron FAC seguido de Tamoxifeno. El RS adquiría un valor pronóstico en el grupo de pacientes tratadas solo con Tamoxifeno, al identificar el subgrupo con  $RS > 31$  como el subgrupo con peor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global. Al analizar la supervivencia libre de enfermedad a los 10 años según el tratamiento y el grupo de RS, no existían diferencias para los grupos de RS bajo e intermedio entre las dos ramas de tratamiento; si existiendo diferencias significativas a favor de la rama de quimioterapia para las pacientes de RS alto; adquiriendo por tanto un valor predictivo del beneficio de la quimioterapia en este subgrupo<sup>64</sup>.

Por último, los resultados del estudio Trans ATAC, en el análisis del RS en 1231 pacientes, RS predijo la recidiva a distancia en pacientes con o sin afectación ganglionar, tratados tanto con Tamoxifeno como con Arimidex<sup>65</sup>.

Actualmente se encuentra en marcha el estudio tTAILORx, que en pacientes intervenidas de neoplasia de mama sin afectación ganglionar y con RE positivo,

aleatoriza a las pacientes en función del RS de la siguiente forma: a) Si RS es inferior o igual a 10 realizan tratamiento hormonal, b) si RS se encuentra entre 11 y 25 aleatoriza a las pacientes a realizar hormonoterapia versus hormonoterapia y quimioterapia, y c) Si RS es superior a 25 las pacientes recibirán quimioterapia y hormonoterapia.

### **MAMMAPRINT®**

El perfil de Amsterdam de 70 genes o Mammaprint® se realizó a partir de tejido congelado de muestras del Netherlands Cancer Institute. Los autores incluyeron 98 tumores (78 eran ganglio negativo, 34 de estas 78 habían desarrollado metástasis a los 5 años de seguimiento, 20 tumores eran de pacientes con cáncer de mama hereditario, 18 con mutaciones de BRCA1 y 2 con mutaciones de BRCA2). Comparando la expresión génica de los tumores mediante microarrays de DNA, definieron una firma de 70 genes con valor pronóstico. Dicha firma ha sido validada posteriormente en diferentes estudios. El primero, en una serie de 295 pacientes con edad inferior a 53 años, intervenidas de tumores T1-T2 con o sin afectación ganglionar, tratadas con o sin tratamiento adyuvante. Con un seguimiento de 7 años, los pacientes clasificados como según la firma genética como de peor pronóstico (180) tuvieron mayor riesgo de recidiva a distancia y muerte que los pacientes clasificados como de buen pronóstico (115) independientemente del estado ganglionar. El segundo estudio de validación se realizó en una muestra de 302 mujeres de diferentes instituciones europeas, menores a 60 años, con tumores T1 o T2 sin afectación ganglionar que no recibieron tratamiento complementario. Con un seguimiento de más de 10 años, la firma genética predijo el riesgo de metástasis a distancia y supervivencia<sup>66,67</sup>.

Posteriormente el valor pronóstico de esta firma genética fue validado en una serie de pacientes con afectación ganglionar. Así Mook y colaboradores publicaron los resultados del análisis de Mammaprint® en una serie de 241 tumores operados de T1 a

T3 con 1 a 3 ganglios afectados, con un seguimiento medio de 8 años. La supervivencia libre de metástasis a distancia y la supervivencia específica de cáncer de mama fue estadísticamente superior en el grupo clasificado como de buen pronóstico por la firma genética<sup>68</sup>.

Estos datos constituyen la base para realizar el estudio MINDACT que incluye pacientes operadas de neoplasia de mama sin afectación ganglionar o con 1 a 3 ganglios afectados valorándose la firma de MammaPrint® y las características clínico patológicas habituales, y clasificando a las pacientes en tres grupos: a) Pacientes de bajo riesgo por MammaPrint® y por las características clínico patológicas habituales, que recibirán hormonoterapia, b) pacientes de alto riesgo por las dos formas de evaluación, que recibirán quimioterapia, y hormonoterapia en caso de hormonosensibilidad, c) discordancia entre las dos formas de evaluación, serán aleatorizadas a decidir el tratamiento en función de MammaPrint o en función de las características clínico patológicas clásicas.

## **OTRAS FIRMAS GENÉTICAS**

### **Firma de Rotterdam**

Se trata de una firma que identificó 76 genes con valor pronóstico en una serie de cáncer de mama sin afectación ganglionar y sin tratamiento complementario. Ha sido validada en una serie de 400 pacientes, identificando que entre un 40 y 41% de las pacientes clasificadas como de riesgo intermedio según el consenso de St Gallen son reclasificadas a bajo riesgo habiéndose podido evitar el uso de la quimioterapia en este subgrupo<sup>69</sup>.

### **MapQuant Dx**

Evalúa el grado genómico en tejido fresco o congelado mediante microarrays de DNA. Consigue estratificar los tumores de grado 2 en bajo riesgo (similar al riesgo de

los de grado 1) o alto riesgo (similar al riesgo de los de grado 3), en tumores con RE positivo<sup>70</sup>.

### ***Theros Breast Cancer Index (Two Gene Sygnature)***

Se trata de una firma genética que se basa en el análisis de dos genes (HOX13:IL17BR) en tejido parafinado mediante la expresión de mRNA valorada por PCR (Q-RT-PCR). Esta firma estratifica a las pacientes con tumores con RE positivo en grupos con alto o bajo riesgo de recurrencia en pacientes tratadas con tamoxifeno. Últimamente su precisión ha mejorado con la inclusión del índice de grado molecular que mide la proliferación celular<sup>71</sup>.

### ***Wound Sygnature***

En base a la hipótesis que los factores implicados en la cicatrización juegan un papel importante en el desarrollo de metástasis, se identificó una firma que evalúa genes de cicatrización, que permite estratificar a las pacientes en dos grupos pronósticos<sup>72</sup>.

Un metaanálisis de las diferentes firmas genéticas con casi 3000 tumores analizados, apoya la relación entre el riesgo de recidiva y los subtipos moleculares, incluyendo diferentes firmas genéticas, así como con las características clínico patológico habitual. Pese a la pobre coincidencia entre los genes que evalúan las diferentes firmas genéticas, su valor pronóstica se ha relacionado con su capacidad de detectar actividad de proliferación<sup>73</sup>.

## **1.5 TRATAMIENTO**

El tratamiento del cáncer de mama debe ser siempre multidisciplinar combinando una o varias de las siguientes terapias: cirugía local y ganglionar, radioterapia, quimioterapia, hormonoterapia en pacientes hormonosensibles y nuevas terapias biológicas.

### **1.5.1 Cirugía**

## **Cirugía de la mama**

El abordaje quirúrgico debe incluir el tumor primario mamario con claros márgenes de escisión, intentando así, si es posible, una cirugía conservadora. No existe uniformidad a cerca de la definición de márgenes negativos. EL NSABP requiere una distancia libre de tumor de 1 a 2 mm, mientras otros grupos de 5 a 10 mm. En general, se considera aceptable, la definición de 1 a 2 mm, considerando que tras la cirugía conservadora deberá realizarse radioterapia complementaria<sup>74</sup>.

Diferentes estudios aleatorizados demuestran que no existen diferencias en supervivencia entre la realización de cirugía conservadora en combinación con radioterapia respecto a mastectomía<sup>75,76</sup>. Existen, sin embargo algunas ocasiones en las que está indicada la mastectomía, como son: 1) presencia de dos o más tumores primarios de mama en diferentes cuadrantes de la misma, 2) microcalcificaciones de aspecto maligno difusas en toda la mama, 3) historia de irradiación mamaria previa.

En caso de plantear un tratamiento de mastectomía, habrá que valorar la opción de realizar una reconstrucción mamaria, bien de forma inmediata o diferida.

## **Cirugía de la axila**

La indicación principal de la cirugía axilar hoy día es el correcto estudio patológico axilar. Si los ganglios axilares se encuentran afectados, entonces la cirugía axilar cumple dos objetivos: definir el pronóstico mediante el correcto estudio patológico de la axila y disminuir el riesgo de recidiva local axilar. Sin embargo, el vaciamiento ganglionar axilar, que incluye la exéresis de los niveles I y II, se asocia a un incremento del riesgo de complicaciones, como son el linfedema que se produce en alrededor de un 3 a un 5% de casos, neuropatía del territorio del nervio intercostobraquial, etc. En caso de ausencia de afectación ganglionar axilar (previa ecografía axilar), la realización del ganglio centinela constituye la práctica habitual. En

caso de que el centinela se encuentre libre de enfermedad ya no será necesario realizar el vaciamiento ganglionar como se ha demostrado en diferentes estudios<sup>77-79</sup>.

### **1.5.2 Radioterapia**

La radioterapia se administra de forma estándar sobre el volumen mamario siempre tras la cirugía conservadora. Datos del metaanálisis del EBCTCG que incluía estudios que aleatorizaban a las pacientes a recibir cirugía conservadora con o sin radioterapia, demuestran que el grupo sin radioterapia presentaba una mayor mortalidad por cáncer de mama una mayor mortalidad global<sup>80</sup>. También los resultados del estudio NSABP B-06 con 20 años de seguimiento, demuestran un 39,2% de recidiva local sin radioterapia frente a un 14,3% con radioterapia<sup>76</sup>. La irradiación mamaria típica llega a dosis de 35 a 50 Gy usando fracciones diarias de 1.8 o 2 Gy. Se realiza un Boost llega a dosis de 35 a 50 Gy sobre la zona del tumor primario hasta llegar a una dosis total de 60 a 66 Gy.

Existen métodos alternativos de irradiación tras cirugía conservadora, como son: 1) la irradiación acelerada total de la mama, y 2) la irradiación parcial acelerada de la mama mediante diferentes métodos (implantes de braquiterapia intersticial, braquiterapia intracavitaria, radioterapia intraoperatoria, external beam).

La realización de radioterapia tras la mastectomía (que incluye la irradiación de la pared torácica y usualmente las áreas de drenaje ganglionar), está indicada en las siguientes situaciones: cuatro o más ganglios afectados en el vaciamiento y en tumores estadio III (incierto en T3N0M0). Su uso es incierto en las siguientes situaciones: tras tratamiento neoadyuvante, si existen 1 a 3 ganglios afectados en el vaciamiento, en tumores T3N0M0, o en caso de ganglios afectados con extensión extracapsular. El uso de la radioterapia postmastectomía disminuye el riesgo de recidiva local y el riesgo de muerte por cáncer de mama, sin embargo su uso no está exento de complicaciones.

La irradiación ganglionar está indicada en los casos ya mencionados en el párrafo anterior.

### **1.5.3 Tratamiento sistémico: quimioterapia, hormonoterapia y terapia biológica**

El tratamiento complementario o adyuvante evita la recaída tras la cirugía, en un porcentaje importante de pacientes. En caso de pacientes candidatas a quimioterapia, la administración de esquemas de diversos fármacos (habitualmente una antraciclina, un taxano y un agente alquilante) constituyen la forma más generalizada de tratamiento, como han demostrado diferentes estudios<sup>81,82</sup>. Sabemos que tan solo una pequeña proporción de pacientes es la que se beneficia de la quimioterapia; existen hoy día algunas firmas genéticas como Mammaprint y Oncotype que permiten identificar un subgrupo de pacientes que no precisan quimioterapia; sin embargo su elevado coste ha hecho que no se generalicen en la práctica diaria. En caso de hormonoterapia complementaria, disponemos de factores predictivos de respuesta al tratamiento hormonal como los receptores estrogénicos; en general el tratamiento con cinco años de Tamoxifeno constituye el estándar en pacientes premenopáusicas<sup>83</sup>, en cambio, en pacientes postmenopáusicas, los inhibidores de la aromatasas<sup>84</sup> deberán formar parte del tratamiento. Por último, en caso de pacientes con tumores con amplificación del oncogén her2/neu, el tratamiento con trastuzumab<sup>85,86</sup> (anticuerpo monoclonal contra HER2) en combinación con quimioterapia será fundamental.

El tratamiento neoadyuvante constituye la estrategia de elección en caso de tumores de mama localmente avanzados. Sin embargo, con el fin de incrementar el porcentaje de cirugías conservadoras y gracias a la introducción de esquemas más eficaces de tratamiento su uso se ha extendido a estadios más precoces. En caso de tratamiento con quimioterapia, los esquemas secuenciales con antraciclinas y taxanos, hasta un total de seis u ocho ciclos consisten en la terapia más utilizada. En caso de

sobreexpresión de HER2/neu, la combinación de trastuzumab y quimioterapia, incrementa de forma significativa el porcentaje de remisiones completas patológicas. La hormonoterapia primaria supone una alternativa, para los tumores que expresan receptores estrogénicos. En el siguiente capítulo se abordará en más profundidad el concepto del tratamiento neoadyuvante.

En caso de enfermedad diseminada, no existe un tratamiento estándar para las pacientes, el manejo terapéutico requiere una individualización del tratamiento en función de múltiples factores entre los que se encuentran: factores en relación con la biología tumoral, la presencia de enfermedad visceral, los tratamientos previos que hayan sido administrados a la paciente, las enfermedades concomitantes, el perfil de toxicidad de los diferentes tratamientos, y por supuesto las preferencias de la paciente. Los objetivos del tratamiento se podrían resumir en: un incremento en la supervivencia, un incremento en el tiempo a la progresión, y una mejoría sintomática de las pacientes que comporte una mejoría en la calidad de vida de las mismas.

## **2 INTRODUCCIÓN ESPECÍFICA: FACTORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO NEOADYUVANTE**

### **2.1 TRATAMIENTO NEOADYUVANTE**

El tratamiento neoadyuvante constituye el tratamiento estándar para las pacientes que debutan con una enfermedad localmente avanzada y con cáncer de mama inflamatorio; sin embargo, su uso se ha ampliado en los últimos años para situaciones de enfermedad inicialmente operable. El tratamiento neoadyuvante en estadios inicialmente operables, tiene como fin incrementar el porcentaje de cirugías conservadoras. Por otra parte, el tratamiento neoadyuvante presenta como ventajas la evaluación in vivo de la respuesta al tratamiento y la posibilidad de evaluar marcadores biológicos de respuesta a la quimioterapia.

Diferentes ensayos y un metanálisis avalan el uso del tratamiento primario, no presentando diferencias respecto al tratamiento adyuvante en términos de mortalidad<sup>87,88</sup>.

La respuesta a la quimioterapia primaria presenta un valor pronóstico que ha sido evidenciado por diversos trabajos desde hace más de 25 años<sup>89,90</sup>, pero aquellos pacientes que consiguen con el tratamiento una respuesta completa patológica (principalmente si existe remisión completa patológica en la mama y en la axila), son los que obtienen el mayor beneficio en supervivencia a largo plazo de este tipo de alternativa de tratamiento, lo que ha sido demostrado por diferentes grupos en análisis univariados y multivariados<sup>91-93</sup>. Por este motivo la remisión completa patológica es un objetivo habitual en la mayoría de los estudios que evalúan la eficacia del tratamiento neoadyuvante.

No existe un consenso sobre el método más adecuado de evaluar la respuesta completa patológica. Sin embargo, son necesarios métodos que sean reproducibles por

diferentes patólogos, para facilitar la interpretación de los resultados. El método de Miller y Payne<sup>94</sup>, que se basa en determinar el cambio de la densidad celular en el tumor respecto a la biopsia previa al tratamiento, es uno de los más utilizados. En la tabla 2 se muestran los criterios de Miller y Payne.

**Tabla 2. Criterios de Miller y Payne para la respuesta en tumor primario**

G1	Cambios celulares mínimos sin reducción de la densidad celular
G2	Disminución discreta de la celularidad tumoral infiltrante inferior al 30% de la masa tumoral
G3	Disminución discreta de la celularidad tumoral infiltrante entre el 30%-90% de la masa tumoral
G4	Disminución discreta de la celularidad tumoral infiltrante mayor del 90% de la masa tumoral con persistencia exclusiva de focos microscópicos
G5	Ausencia de celularidad tumoral infiltrante en la mama

El método de Miller y Payne también incluye la valoración del estado ganglionar, como incluye en la tabla 3<sup>95</sup>.

**Tabla 3. Criterios de Miller y Payne para la respuesta ganglionar**

Tipo A	Ganglios linfáticos sin metástasis
Tipo B	Ganglios linfáticos con metástasis y sin cambios por quimioterapia
Tipo C	Ganglios linfáticos con metástasis y evidencia de respuesta parcial
Tipo D	Ganglios linfáticos con cambios secundarios a respuesta sin infiltración neoplásica residual

Existen otros métodos de evaluación de respuesta como el Chevallier o el Sataloff<sup>96</sup>, que han validado la remisión completa patológica como marcador pronóstico.

Por otra parte, el hospital MD Anderson<sup>97</sup> ha generado un método de valoración cuantitativa que evalúa la carga tumoral local y ganglionar residual tras la quimioterapia.

En el momento actual, la administración de esquemas secuenciales con antraciclinas y taxanos consigue una tasa de respuestas completas patológicas de alrededor de un 26 a un 34%, que son superiores a las conseguidas con antracilinas. Se considera que tratamientos más prolongados (superiores a tres meses) con unos seis a ocho ciclos de quimioterapia consiguen mayores tasas de remisión completa patológica respecto a cuatro ciclos (34-20% vs 5-17%)<sup>98-100</sup>.

Sin embargo, como se explicará más ampliamente en el apartado de factores predictivos de respuesta a la quimioterapia, se han definido diferentes subgrupos de cáncer de mama que presentan una respuesta heterogénea al tratamiento, siendo la enfermedad triple negativa y la HER2 positiva aquellas que presentan un mayor índice de respuesta y la luminal A la que presenta una menor respuesta a la quimioterapia neoadyuvante.

La enfermedad HER2 positiva merece un tratamiento distinto, ya que las combinaciones de quimioterapia con un agente antiHER2 alcanzan remisiones completas patológicas de alrededor de alrededor de un 40-66%<sup>101,102</sup>. Recientemente se han reportado datos esperanzadores a cerca de la doble inhibición de HER2 con trastuzumab y Lapatinib junto con quimioterapia sin antraciclinas alcanzando tasas de respuesta completa de alrededor de un 61%<sup>103</sup>.

## **2.2 FACTORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA**

### **2.2.1 Valor predictivo de los receptores hormonales**

Los receptores hormonales han sido evaluados clásicamente como factores predictivos de la respuesta a la hormonoterapia, pero también hay estudios que los relacionan con la respuesta a la quimioterapia, como veremos a continuación.

#### **Beneficio de la hormonoterapia**

La mayor utilidad de los receptores hormonales es en la decisión sobre que pacientes pueden beneficiarse de tratamiento hormonal. Así, los RE tienen un indiscutible valor predictivo en la respuesta a hormonoterapia demostrado en pacientes con cáncer de mama metastásico. La ausencia de RE predice la falta de respuesta a tratamiento hormonal en cáncer de mama avanzado y neoadyuvante. Los estudios en cáncer de mama metastásico y en neoadyuvancia otorgan un 50 a un 60% de respuestas a primera línea de hormonoterapia en tumores con RE positivo<sup>104</sup>. En cuanto a su valor predictivo del beneficio de la hormonoterapia adyuvante, el meta-análisis de Oxford claramente confirman el estado del RE como predictor del beneficio de tamoxifeno durante 5 años<sup>105</sup>

El valor de los RP como factor predictivo de respuesta a hormonoterapia está bien establecido en la enfermedad diseminada. Sin embargo, según los datos del meta-análisis de Oxford el estado del RP no ofrece información adicional en predecir el beneficio de Tamoxifeno adyuvante, con la única excepción de los tumores que son RE negativo /RP positivo, en los que Tamoxifeno aporta un beneficio a diferencia de los tumores RE negativo/RP negativo. Aunque hay que decir que pocos estudios incluidos en el meta-análisis incluían la medición del RP, además el correcto análisis del RP puede ser más dificultoso que de RE.

## **Beneficio de quimioterapia**

Existe creciente evidencia a cerca de un menor beneficio de la quimioterapia en aquellos tumores claramente hormonosensibles. El meta análisis de la quimioterapia adyuvante muestra un mayor beneficio de la misma en aquellos tumores con RE negativo<sup>105</sup>. En la misma dirección, los datos de algunos de los diferentes ensayos que evaluaban la introducción de taxanos en el tratamiento adyuvante del cáncer de mama mostraron un mayor beneficio en el subgrupo con RE negativo<sup>106</sup>. Sin embargo el meta análisis de los estudios con taxanos demostró un beneficio de los mismos independientemente del estado del receptor estrogénico<sup>82</sup>. También en neoadyuvancia, diferentes ensayos muestran mayores rangos de remisión completa patológica en caso de RE negativos (20-30%) que en RE positivos (5%)<sup>107,108</sup>.

En definitiva, los RE y RP juegan un papel crucial en el desarrollo y progresión tumoral. Su utilidad en el manejo del cáncer de mama y en la predicción del beneficio del tratamiento hormonal es indiscutible. Su determinación es obligada en todos los cánceres de mama invasivos, en el tumor primario y a ser posible en la recidiva metastásica si ocurre.

### **2.2.2 Valor predictivo de los activadores e inhibidores del plasminógeno**

El papel de uPA y PAI-1 como predictor del beneficio de la quimioterapia no es claro. Así la alta expresión de estos marcadores se asoció a mayor respuesta a quimioterapia con esquema CMF en pacientes sin afectación ganglionar<sup>109</sup>. Recientemente se han presentado los datos de un ensayo prospectivo en pacientes sin afectación ganglionar, en el que aquellas pacientes con alta expresión de uPA y PAI-1 eran aleatorizadas a recibir seis ciclos de CMF vs observación, y las de bajos niveles recibían observación. Los datos a 10 años de seguimiento confirman el valor pronóstico

de este marcador, y en las pacientes de alta expresión existía un beneficio de la quimioterapia, sugiriendo así el valor predictivo de esta variable<sup>110</sup>.

### **2.2.3 Valor predictivo de los receptores de factor de crecimiento: receptor de factor de crecimiento epidérmico 2 (HER-2)**

#### **Valor predictivo**

La amplificación de HER-2 presenta un importante valor predictivo de la respuesta a ciertos tratamientos quimioterápicos y de hormonoterapia, y en especial de la respuesta a los agentes anti-HER-2. Diferentes estudios han relacionado la amplificación de HER-2 con la resistencia a agentes alquilantes<sup>111</sup>. Por otra parte el análisis retrospectivo de diferentes estudios demuestran un mayor beneficio de las antraciclinas en pacientes con amplificación de HER-2; el metaanálisis de diferentes estudios, confirma esta hipótesis<sup>112</sup>. Por otra parte, la amplificación de HER-2 se ha asociado con resistencia a tamoxifeno, y en un pequeño estudio prospectivo neoadyuvante a una mayor respuesta con inhibidores de la aromatasa que con Tamoxifeno<sup>113</sup>.

Por último, la amplificación de HER2 se ha relacionado con la respuesta a los agentes antiHER2, como son trastuzumab (anticuerpo monoclonal contra el dominio extracelular de HER2) y lapatinib (inhibidor tirosin kinasa dual contra EGFR y HER2), que son los dos agentes aprobados por la FDA para el tratamiento de la enfermedad HER2 positiva. Existen datos preclínicos y clínicos que demuestran que solo los cánceres de mama con amplificación de HER2 responden a las terapias anti-ERBB2, este hecho se aprecia tanto con trastuzumab como con lapatinib que pese a ser un inhibidor dual de HER2 y EGFR su eficacia se limita a los tumores con sobreexpresión de HER2 y no de EGFR. Por ello, es fundamental la correcta determinación del estado de HER2<sup>114, 115</sup>.

En definitiva, la determinación del estado de HER2 es crucial en pacientes diagnosticadas de cáncer de mama; tanto para valorar el pronóstico de las mismas como para escoger un correcto esquema terapéutico.

#### **2.2.4 Valor predictivo de Topoisomerasa II $\alpha$**

Las Topoisomerasas son enzimas capaces de unirse a cadenas de DNA, se clasifican en I si catalizan roturas de DNA monocadena, o II si son de cadena doble. La Topoisomerasa II $\alpha$  se localiza en el mismo amplicón del cromosoma 17 de HER2. Las antraciclinas se unen a la Topoisomerasa II $\alpha$  e inhiben su función en la replicación del DNA. Se han descrito alteraciones de la Topoisomerasa II $\alpha$  como son la amplificación y la delección. Estudios preclínicos y clínicos han relacionado la amplificación de la Topoisomerasa II $\alpha$  a la sensibilidad a antraciclinas. La Topoisomerasa II $\alpha$  se encuentra coamplificada con HER2 en un 35% de casos HER2 positivos, considerándose que estos casos son los que mayor beneficio extraerían del tratamiento con antraciclinas<sup>116</sup>.

#### **2.2.5 Valor predictivo de los índices de proliferación**

##### **Ki67**

Ki67 como factor predictivo. La posibilidad de que los marcadores de proliferación como Ki67 puedan identificar que pacientes se pueden beneficiar de quimioterapia o de tratamiento hormonal o de determinados agentes en concreto se encuentra hoy a debate. Así, existen datos de cinco estudios en adyuvancia que han evaluado el valor de Ki 67 en la predicción del beneficio del tratamiento adyuvante con resultados heterogéneos. Así, en el estudio IBCSG VIII<sup>117</sup> las pacientes eran aleatorizadas a Groserelin, CMF o Groserelin más CMF. Los niveles altos de Ki67 se asociaron con un peor pronóstico para las pacientes independientemente del tratamiento recibido. En el estudio IBCSG IX<sup>117</sup> en que pacientes postmenopáusicas eran aleatorizadas a recibir CMF más tamoxifeno vs tamoxifeno, los niveles de Ki67

tampoco fueron predictivos de un mayor beneficio de la quimioterapia. Tampoco en el estudio BR9601<sup>118</sup> que aleatorizaba a las pacientes a recibir 8 ciclos de CMF o cuatro ciclos de epirubicina seguido de cuatro ciclos de CMF, Ki67 no fue predictor del beneficio de las antraciclinas. Sin embargo, en el ensayo BCIRG001<sup>119</sup>, que aleatorizó a las pacientes a recibir seis ciclos de TAC o seis ciclos de FAC, los altos niveles de Ki67 (punto de corte de 11%) fueron predictivos del beneficio de la introducción del taxano. También en el ensayo PACS01<sup>120</sup> en que las pacientes fueron aleatorizadas a recibir seis ciclos de FEC versus tres ciclos de FEC seguidos de tres ciclos de Docetaxel, con un punto de corte del Ki67 de 20%, Ki67 alto permitía definir una población de pacientes con RE positivo con mayor beneficio de la introducción del taxano. El último estudio en adyuvancia que ha valorado el valor predictivo de Ki67 es el estudio BIG 1-98<sup>121</sup>, que evaluaba el tratamiento hormonal complementario con tamoxifeno durante 5 años, versus letrozol durante cinco años, versus dos ramas de tratamiento secuencial de letrozol seguido de tamoxifeno versus la secuencia opuesta. Dicho estudio, utilizado el punto de corte de Ki67 de 11%, encontraba que en aquellos tumores con elevados niveles de Ki67 el beneficio de Letrozol sobre Tamoxifeno en supervivencia libre de enfermedad era muy superior que para los tumores con niveles bajos de Ki67. Es decir Ki67 identificaba un subgrupo de tumores con mayor beneficio de iniciar el tratamiento complementario con Letrozol. En resumen, los ensayos de adyuvancia no permiten confirmar que Ki67 sea un factor predictivo del beneficio de la quimioterapia sobre la hormonoterapia, pero sí parecen discriminar aquellas pacientes con un mayor beneficio del tratamiento con taxanos y con letrozol adyuvante. Por otra parte, en algunos ensayos de quimioterapia neoadyuvante elevados valores de Ki67 se han correlacionado con mejor respuesta a la quimioterapia. Hoy día se está evaluando el uso potencial de Ki67

en predecir la respuesta y la evolución a largo plazo en función de los valores de Ki67 antes y después de quimioterapia u hormonoterapia.

En definitiva, no existe una fuerte evidencia a cerca del valor predictivo de Ki67, aunque existen datos preliminares que requieren su validación en futuros análisis.

## **2.2.6 Valor predictivo de los arrays de expresión genómica**

### **2.2.6.1 Valor predictivo de los subtipos intrínsecos de cáncer de mama**

Los subtipos intrínsecos de cáncer de mama, como ya se ha descrito en el capítulo de introducción general, tienen un importante valor pronóstico, en particular en pacientes con subtipo basal o HER2+/RE-, que presentan peor tiempo a la progresión y supervivencia que los luminal A según análisis de diferentes bases de datos. Pero también presentan un valor predictivo de la respuesta a la quimioterapia, así en diferentes series de quimioterapia neoadyuvante, los subgrupos basal y HER2+/RE- se asociaron a una mayor respuesta<sup>122</sup>.

Por otra parte, existen datos procedentes de análisis retrospectivos que confirman el valor predictivo de esta nueva clasificación. Así, en el ensayo BCIRG001 que comparaba la administración de TAC versus FAC como tratamiento adyuvante en pacientes operadas de cáncer de mama con afectación ganglionar, se realizó un estudio en función de los subgrupos evaluados a partir del análisis inmunohistoquímico y definidos como: Luminal A como RE y/o RP positivo, HER2 – y Ki67 <13%; Luminal B como RE y/o RP positivos y HER2+ y/o Ki 67  $\geq$ 13%; HER 2 como RE y RP negativos y HER2 +, triple negativo como RE y RP negativos y HER2 negativo. Cuando se analizó el beneficio del esquema TAC sobre el esquema FAC únicamente fue significativo en el subgrupo definido como luminal B (p= 0.025) y marginalmente en el triple negativo (p=0.051)<sup>123</sup>.

### **2.2.6.2 Firmas genéticas**

#### **Valor predictivo de Oncotype®**

El análisis de 21 genes con el Recurrence Score (RS, Oncotype DX), se desarrolló a partir de 250 genes candidatos seleccionados de la literatura, como ya se ha mencionado en el capítulo de factores pronósticos.

Como ya se describió previamente, el RS fue evaluado también en el estudio NSABP-B20 que aleatorizaba a las pacientes a recibir Tamoxifeno y quimioterapia (esquema MF), Tamoxifeno y quimioterapia (esquema CMF) o Tamoxifeno sólo. El estudio de RS en 651 pacientes permitió dividir las en grupos de riesgo. En los grupos con RS bajo o intermedio no existían diferencias en riesgo de recidiva a los 10 años entre las pacientes con o sin quimioterapia; sin embargo en el grupo de alto riesgo el tratamiento con quimioterapia suponía una reducción del 28% en el riesgo de recidiva<sup>62</sup>. Estos datos apoyan el probable valor predictivo del beneficio de la quimioterapia de este test.

El ensayo del grupo SWOG 8814 aleatorizaba a las pacientes intervenidas de neoplasia de mama con afectación ganglionar, a recibir Tamoxifeno versus seis ciclos de quimioterapia tipo FAC concomitante a Tamoxifeno o seis ciclos de FAC seguidos de Tamoxifeno. El RS fue evaluado en las 148 pacientes que recibieron solo Tamoxifeno y en las 219 que recibieron FAC seguido de Tamoxifeno. Al analizar la supervivencia libre de enfermedad a los 10 años según el tratamiento y el grupo de RS, no existían diferencias para los grupos de RS bajo e intermedio entre las dos ramas de tratamiento; si existiendo diferencias significativas a favor de la rama de quimioterapia para las pacientes de RS alto; adquiriendo por tanto un valor predictivo del beneficio de la quimioterapia en este subgrupo<sup>64</sup>.

## **Valor predictivo de Mammaprint®**

Por otra parte recientemente se han publicado resultados a favor del valor predictivo de la respuesta a quimioterapia de la firma Mammaprint®. Se analizó mammaprint en 541 tumores de pacientes intervenidas de neoplasia de mama T1-3N0-1 que habían recibido hormonoterapia sola (315) o quimioterapia y hormonoterapia (226). A los 5 años de seguimiento, para el grupo de bajo riesgo establecido por la firma genética no hubo diferencias en supervivencia específica de cáncer de mama y supervivencia libre de enfermedad a distancia entre los pacientes tratados con o sin quimioterapia. Sin embargo, para el grupo de alto riesgo, la supervivencia específica de cáncer de mama y la supervivencia libre de enfermedad a distancia fueron significativamente superiores en el grupo tratado con quimioterapia. De forma que mammaprint podría ser una herramienta útil para determinar en que pacientes la quimioterapia debe formar parte del tratamiento junto con la hormonoterapia<sup>124</sup>.

### **2.2.7 Valor predictivo de Vimentina**

La expresión de Vimentina es un hallazgo poco frecuente en cáncer de mama invasivo, y se asocia a alta invasividad tumoral, y a un peor pronóstico<sup>125</sup>. El valor predictivo de la expresión de vimentina, si bien se ha descrito en estudios in vitro no está claramente establecido.

## **2.3 HUNTINGTIN INTERACTING PROTEIN 1 (HIP1)**

*Huntingtin Interacting Protein 1* (HIP1), es una proteína de unión al lípido inositol y a clathrina que está en relación con la neurodegeneración, en virtud de su interacción con la huntingtina, que es la proteína mutada en la enfermedad de Huntington. La señalización de los receptores de factores de crecimiento mediados por clathrina es uno de los mecanismos por los cuales las células regulan la señalización

intracelular<sup>126</sup>. HIP1 se encuentra mutada, como ya hemos mencionado, en la enfermedad de Huntington, y se han observado altos niveles de la proteína HIP1 en diferentes cánceres epiteliales humanos, como mama, colon, riñón, pulmón, melanoma, ovario y próstata<sup>127</sup>; además su expresión se correlaciona negativamente con la supervivencia en varones con cáncer de próstata. Este hecho ha sido confirmado mediante el análisis de la expresión de HIP1 por inmunohistoquímica del tumor primario humano mediante tissue microarrays. HIP1 también se ha relacionado con la leucemia tras encontrar la proteína oncogénica de fusión HIP1/PDGFR procedente de la translocación cromosómica t(5;7) en un paciente con leucemia mielomonocítica crónica<sup>128</sup>.

HIP1, que interactúa con las proteínas de unión a actina, es considerada el primer componente de la maquinaria de endocitosis, jugando un papel fundamental en el tráfico de clathrina. En los últimos años, alteraciones de la regulación de la endocitosis, se han asociado con tumores. Ya que existe la hipótesis de que alteraciones en la regulación de la endocitosis, son uno de los caminos para alterar diferentes vías de señalización, conduciendo a la iniciación, o a la progresión a cáncer.

HIP1 es necesaria para la progresión del cáncer de próstata. Así, en pacientes con tumores HIP-1 negativos, no hubieron recidivas tras la prostatectomía; mientras que en los HIP1 positivos, un 28% recidivaron<sup>129</sup>. Por otra parte la sobreexpresión de HIP1 se ha visto que inhibe la degradación de EGFR y de los receptores de estrógenos<sup>130</sup>. Así, los niveles elevados de EGFR observados en cáncer de mama (en el tipo basal), podrían ser parcialmente explicados por el incremento de la expresión de HIP1, lo cual conduce a reducir la inhibición de EGFR<sup>131</sup>.

HIP1 es la primera proteína unida a clathrina directamente implicada en la biología del cáncer humano, y la disregulación de la endocitosis del receptor de factor de crecimiento, proporciona una nueva vía de tratamiento antitumoral.

Diferentes razones hacen pensar que HIP1 podría estar en relación con la tumorigénesis mamaria:

1. HIP1 se encuentra sobreexpresada en cáncer de mama. Y se han encontrado niveles de expresión elevados de HIP1 en hiperplasia ductal, carcinoma in situ y carcinoma infiltrante.
2. La expresión de una forma mutada dominante negativa de HIP1 o la delección de HIP1 conduce a la apoptosis de células normales así como de tejido tumoral, sugiriendo que la expresión de HIP1 podría ser necesaria para la supervivencia de muchos tipos celulares.
3. La sobreexpresión de HIP1 podría prevenir la endocitosis de EGFR, lo que minimizaría el efecto de las tirosin kinasas EGFR en el cáncer de mama.

La modificación de las vías de endocitosis debido a la alteración de HIP1, podría por tanto afectar a diferentes procesos en la progresión a cáncer, así como en la respuesta a la quimioterapia de la enfermedad.

## **2.4 BRCA1 y ALTERACIONES EN VÍAS DE REPARACIÓN DE DNA COMO PREDICTORES DE RESPUESTA A QUIMIOTERAPIA**

### **2.4.1 Mecanismos de reparación del DNA**

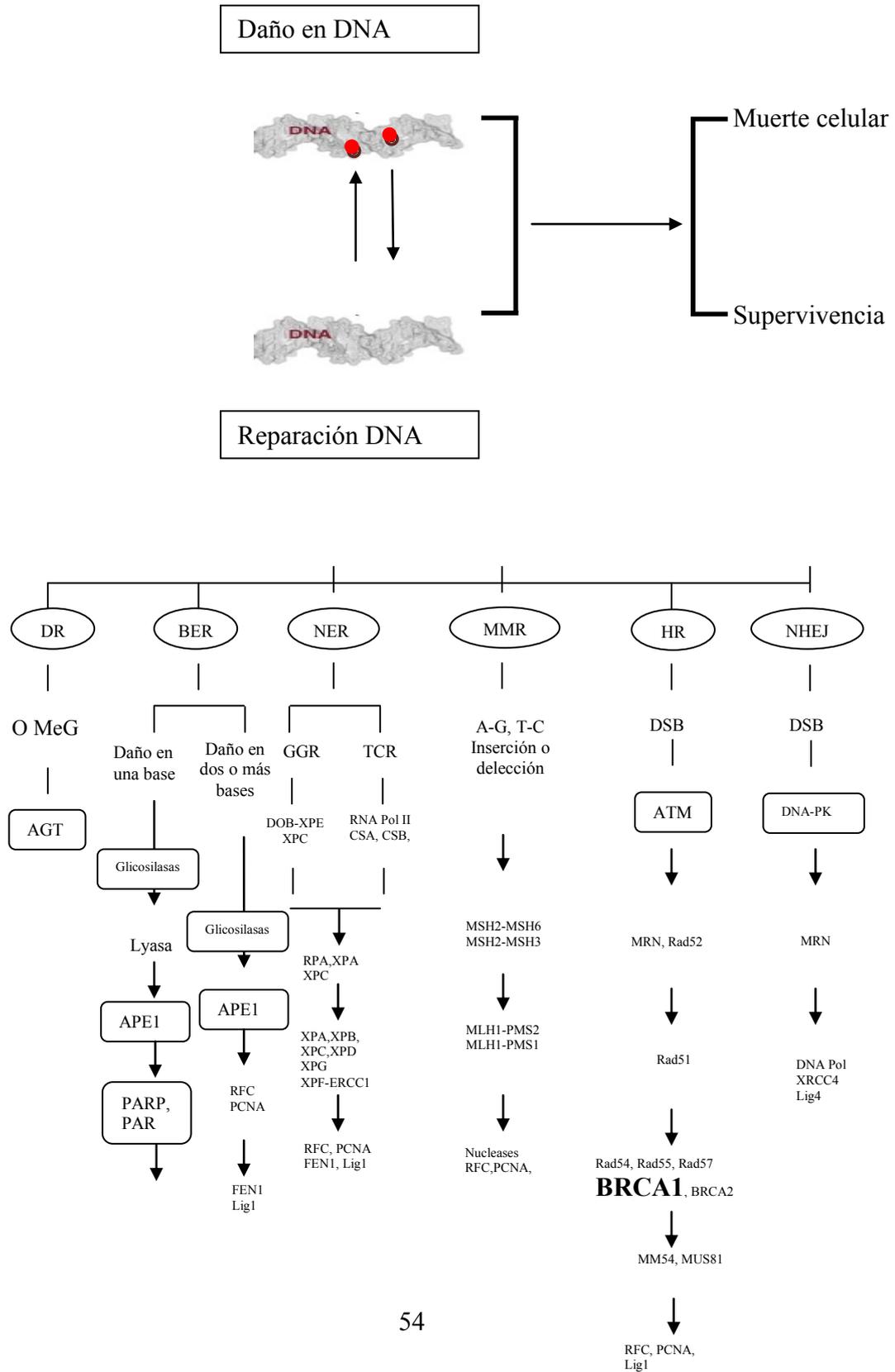
Los mecanismos de reparación de DNA son un conjunto de procesos a través de los cuales la célula identifica y corrige el daño producido a las moléculas de DNA que constituyen el genoma. Este daño puede ser producido por procesos metabólicos normales así como por factores ambientales. Asimismo, muchos agentes

quimioterápicos basan su acción en los daños producidos en el DNA tumoral<sup>132</sup>. Existen diferentes mecanismos de reparación del DNA:

1. Inversión directa. Corrigen errores que afectan a una de las cuatro bases.
2. Daños de cadena única
  - a. *Base excision repair (BER)*, que repara los daños producidos en una sola cadena secundariamente a oxidación, alquilación, hidrólisis, o desaminación.
  - b. *Nucleotide excision repair (NER)*, que reconoce grandes lesiones de cadena única. Se compone de dos subvías, que comparten el mismo mecanismo pero difieren en la forma en cómo las lesiones son reconocidas.
    - i. *Global Genome NER (GG-NER)*: las lesiones son reconocidas por el heterodímero XPC/hHR23B<sup>133</sup>
    - ii. *Transcription-coupled NER (TC-NER)*
  - c. *Mismatch repair (MMR)*, corrige errores de replicación del DNA
3. Daños de doble cadena
  - a. *Non-homologous end joining (NHEJ)*. Repara daños de doble cadena, pero las roturas son reparadas directamente, sin requerir de una cadena homóloga.
  - b. *Microhomology-mediated end joining (MMEJ)*. Se caracteriza por usar de 5 a 25 secuencias de pares de bases microhomólogas para alinear las cadenas rotas antes de unir las
  - c. *Homologous recombination (HR)*. En el que las secuencias de nucleótidos son cambiadas entre dos moléculas de DNA similares

o idénticas. *Breast cancer susceptibility gene 1* (BRCA1) forma parte de HR.

**Figura 2. Vías de reparación de DNA**



## 2.4.2 BREAST CANCER SUSCEPTIBILITY GENE 1 (BRCA1)

*Breast cancer susceptibility gene 1* (BRCA1), un gen que forma parte del *homologous recombination repair*, tiene un papel fundamental en la reparación del DNA, la regulación del ciclo celular, el control transcripcional, la ubiquitinación y la apoptosis.

Pero BRCA1, pese a formar parte del HR, puede influir en TC- NER por su habilidad de actuar como una ligasa ubiquitina a través de su asociación con BARD1. Los heterodímeros de BRCA1 y BARD1 también regulan la función del centrosoma<sup>133</sup>. BRCA1 actúa como un activador transcripcional de un gran número de proteínas claves de GG-NER como son Growth Arrest and DNA damage 45 (GADD45), XPC y DDB2<sup>134</sup> (Figura 3).

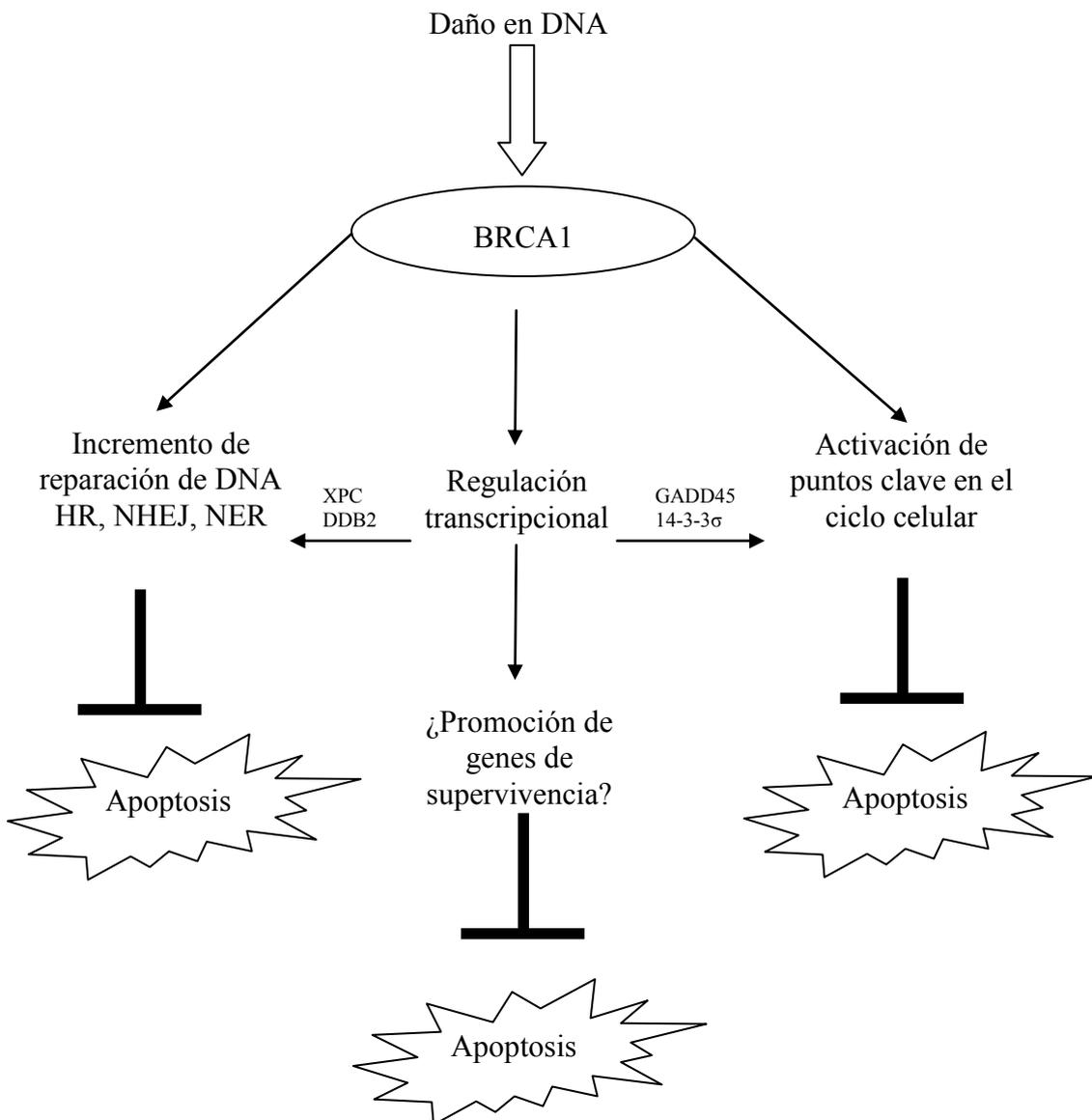
BRCA1 es un componente fundamental de la maquinaria transcripcional y puede actuar como coactivador o corepresor de la transcripción de proteínas implicadas en la remodelación de la cromatina como por ejemplo las histonas deacetilasas HDAC1 y HDAC2. BRCA1 es también un regulador transcripcional de numerosos genes asociados con el G2/M. BRCA1 regula GADD45, que por su parte regula el complejo ciclina B-cdc2.

BRCA1 también regula la chaperona 14-3-3 $\sigma$ , la cual se une a cdc25C y la secuestra en el citoplasma tras el daño en el DNA para prevenirla de la activación del complejo ciclina B-cdc2.

*Breast cancer susceptibility gene 1* (BRCA1) juega un importante papel en la reparación del DNA vía *transcription-coupled nucleotide excision repair*<sup>135</sup>. BRCA1 codifica una proteína multifactorial que se encuentra implicada en la reparación del DNA, control de puntos clave del ciclo celular, regulación transcripcional, y ubiquitinación<sup>136</sup>.

La metilación de BRCA1 y la abolición del mRNA de BRCA1 se ha descrito en cánceres de mama esporádicos<sup>137</sup>. Las mutaciones somáticas de BRCA1 son raras en cancer de mama esporádico; sin embargo la inhibición epigenética de BRCA1 se ha reportado en aproximadamente un 30% de cáncer de mama esporádico y un 70% de cánceres de ovario<sup>138</sup>.

**Figura 3. BRCA1, gen implicado en reparación de DNA, regulación transcripcional y activación de puntos clave en el ciclo celular (adaptado de Mullan et al<sup>139</sup>)**



La expresión de BRCA1 podría modular la respuesta celular a la quimioterapia. Estudios preclínicos sugieren el papel de BRCA1 en predecir la respuesta a agentes quimioterápicos que dañen el DNA y a taxanos. Así la reconstitución completa de BRCA1 en células fibroblásticas de ratón embrionario con BRCA1 alterado condujo a un incremento de la sensibilidad a numerosos agentes que dañan el DNA, incluyendo platinos como carboplatino y oxaliplatino, irinotecan y topotecan, y doxorubicina y etopósido<sup>140</sup>.

La disminución de la expresión de mRNA de BRCA1 en líneas celulares de cáncer de mama, determinada por *real-time quantitative polymerase chain reaction* (RT-QPCR), incrementa la sensibilidad a cisplatino, pero conduce a resistencia a paclitaxel y vinorelbina a través de una respuesta apoptótica defectiva a estas drogas, mientras que el fenómeno opuesto se observa en presencia de niveles normales o altos de mRNA de BRCA1<sup>141</sup>.

Las pacientes con cáncer de mama portadoras de mutaciones de BRCA1 presentan mejores respuestas a las combinaciones de quimioterapia con antraciclinas que las pacientes no portadoras de mutaciones<sup>142</sup>. Sin embargo, en algunos cánceres de mama esporádicos, la nefasta evolución asociada a metilación de BRCA1 y bajos niveles de expresión, podría explicarse por la amplificación de MYC<sup>143</sup>. Además, numerosos estudios retrospectivos de cáncer de mama han confirmado que los portadores de mutaciones de BRCA1 obtienen un mayor beneficio de los quimioterápicos cuyo mecanismo de acción se basa en el daño que producen en el DNA<sup>142</sup>. Niveles bajos de mRNA de BRCA1 se asociaron a una mayor supervivencia en una cohorte retrospectiva de pacientes con cáncer de pulmón tratados con cisplatino y gemcitabina<sup>144</sup> y en dos cohortes retrospectivas de pacientes con cáncer de ovario tratadas con quimioterapia basada en platino<sup>145,146</sup>. Todos estos estudios sugieren que las

mutaciones de BRCA1 así como los bajos niveles de expresión de mRNA de BRCA podrían predecir el beneficio de los agentes quimioterápicos cuya acción se basa en el daño sobre el DNA.

### **2.4.3 Esquema de quimioterapia: FEC (5-Fluorouracilo, Epirubicina, Ciclofosfamida)**

El esquema utilizado en nuestro trabajo es un esquema con capacidad de producir daño en DNA, y por tanto su eficacia podría estar sujeta a cambios en función de alteraciones en los mecanismos de reparación de DNA. Describimos a continuación brevemente el mecanismo de acción de cada una de las drogas usadas.

#### **Antraciclinas: Epirubicina**

Las antraciclinas son productos naturales derivados de la acinetobacteria *Streptomyces peucetius var. Caesius*, forman un grupo de agentes quimioterápicos que en su mecanismo de acción producen daño en DNA.

Las antraciclinas inhiben la reacción de religación de la topoisomerasa II $\alpha$  causando la acumulación de proteínas procedentes de roturas de DNA de doble y simple cadena, lo cual conduce a daños en DNA citotóxicos y a la muerte celular.

#### **Fluorouracilo**

5- Fluorouracilo (5-FU) es inactivo, y requiere su activación intracelular para poder ejercer su efecto citotóxico. 5-FU se convierte en FUDR por la acción de la *thymidine phosphorylase*. La posterior fosforilación de FUDR por *thymidina kinasa* resulta en la formación del metabolito activo de 5-FU, *5-fluoro-deoxyuridine monophosphato* (FdUMP).

La inhibición de *thymidylato synthase* (TS) por FdUMP se considera el principal mecanismo de acción del 5-FU. La inhibición de TS conduce a la depleción de

*deoxythymidine triphosphate* (dTTP), lo que interfiere con la biosíntesis de DNA y reparación de DNA.

### Ciclofosfamida

La Ciclofosfamida es un agente alquilante del DNA, cuyo mecanismo de acción se produce tras su activación a través de su metabolismo hepático en el citocromo p450, y se basa en la formación de un compuesto de amonio cuaternario altamente reactivo que desencadena varias reacciones químicas complejas, que culminan en la alquilación del nitrógeno 7 de los residuos de guanina del ADN. Durante la síntesis del ADN, la guanina modificada puede aparearse mal los residuos de timidina dando lugar a la sustitución del par de bases timina-adenina por guanina-citocina. Además, la alquilación vuelve más lábil al anillo imidazólico haciendo que se abra o que la guanina sea escindida, causando graves daños en la cadena de ADN.

Es, por tanto, este esquema un tratamiento que es capaz de producir daño en el DNA, y podemos pensar que su eficacia pudiera estar condicionada por trastornos en los mecanismos de reparación del DNA.

En el momento de plantear un tratamiento quimioterápico neoadyuvante, sabemos que éste no beneficiará al global de las pacientes que tratemos, por otra parte tampoco estará exento de efectos secundarios. Este es el motivo fundamental por el que conocer factores predictivos de respuesta al tratamiento neoadyuvante nos podría conducir a una mayor individualización del mismo, evitando tratamientos agresivos a aquellas pacientes que no van a obtener un beneficio. En el capítulo de objetivos detallaremos el trabajo que consiste en el análisis de diferentes factores en una serie de pacientes tratadas de forma neoadyuvante, y su relación con la respuesta, el tiempo a la progresión y la supervivencia.

### 3 OBJETIVOS

1. Análisis retrospectivo de una serie de 86 pacientes con cáncer de mama localmente avanzado tratadas con quimioterapia neoadyuvante (esquema FEC). Definir las características clínicas de la serie, el tiempo a la progresión y la supervivencia. Correlación de los resultados con RE, RP, HER2, Vimentina, CK 5/6.
2. Evaluación de Ki67 y su posible valor pronóstico y predictivo de la respuesta a la quimioterapia.
3. Definición de los diferentes subgrupos de cáncer de mama a partir del valor de RE, RP, HER2 i Ki67. Evaluar las características clínicas de los diferentes subgrupos, así como las diferencias entre los mismos en respuesta patológica, tiempo a la progresión y supervivencia.
4. Analizar la expresión inmunohistoquímica de HIP1 en tejido tumoral. Evaluar la respuesta, el tiempo a progresión y supervivencia en función del estado de HIP1, para explorar su posible valor pronóstico y predictivo
5. Análisis de los niveles de mRNA de BRCA1 y su relación con las diferentes características clínicas, con los diferentes subgrupos y con la respuesta, el tiempo a la progresión y la supervivencia. Evaluar la posible correlación entre la

determinación de BRCA1 por inmunohistoquímica versus su evaluación a partir de los niveles de mRNA de BRCA1.

## 4 PACIENTES Y MÉTODOS

### 4.1 PACIENTES

Previo consentimiento informado, se recogieron los datos de 86 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama con estadios II y III que habían sido consideradas candidatas a tratamiento neoadyuvante según la decisión de la unidad funcional de cáncer de mama del Hospital Germans Trias i Pujol entre los años 1993 y 2003. Todas las pacientes fueron tratadas según el protocolo de tratamiento del centro en el momento de la inclusión, que consistía en la administración de cuatro ciclos de quimioterapia con el esquema FEC (fluorouracilo 500 mg/m<sup>2</sup>, epirubicina 75 mg/m<sup>2</sup>, ciclofosfamida 500 mg/m<sup>2</sup>) recibiendo un ciclo cada 21 días, previamente a la cirugía, con el objetivo de incrementar el porcentaje de cirugía conservadora. Tras la cirugía, las pacientes eran evaluadas, y recibían cuatro ciclos más del mismo esquema si no existía afectación ganglionar en el análisis anatomopatológico de la pieza quirúrgica, y seis ciclos si existía afectación ganglionar.

Si el tumor expresaba RE y/o RP, una vez finalizada la quimioterapia las pacientes recibían tratamiento hormonal, que consistía en la administración de tamoxifeno 20 mg cada 24 horas durante cinco años. Las pacientes sometidas a tratamiento conservador, recibían radioterapia sobre el volumen mamario, y la irradiación de la pared torácica y de las cadenas ganglionares se hacía según el protocolo del centro. Las pacientes HER-2 positivas no recibieron trastuzumab pues en el momento del estudio no estaba aprobado en esta indicación.

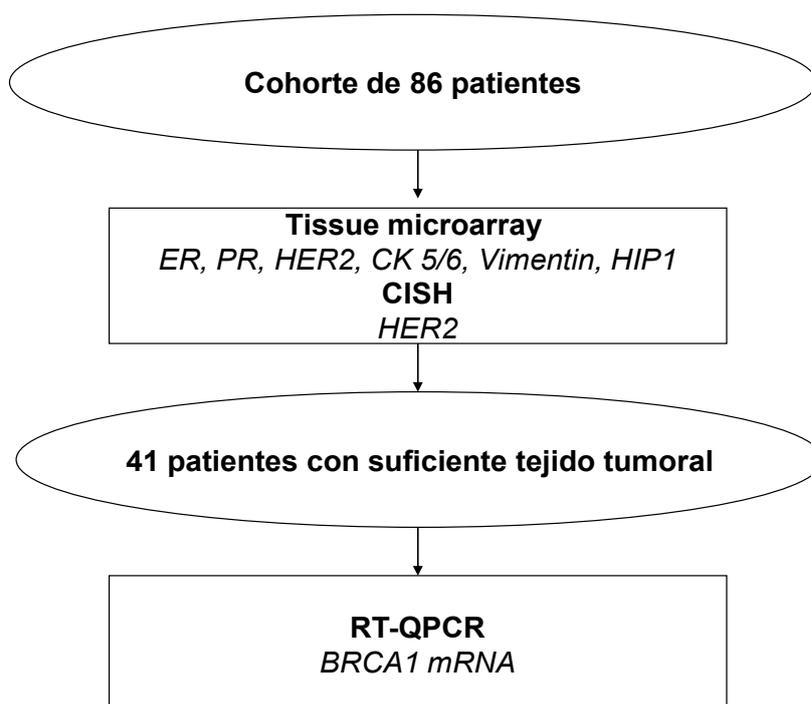
La respuesta clínica fue evaluada según los criterios RECIST a partir de los parámetros obtenidos durante la exploración física. La respuesta patológica fue evaluada según los criterios de Miller y Payne<sup>94</sup>, las pacientes sin evidencia de tumor

residual en la mama ni en la axila fueron consideradas como respuesta patológica completa.

Posteriormente, las piezas quirúrgicas de las 86 pacientes se recuperaron para la realización del “tissue microarray” de las mismas para el análisis inmunohistoquímico.

En la práctica clínica, no siempre es posible disponer de tejido tumoral en fresco, por tanto la recuperación de mRNA del tejido parafinado es crucial. RT-QPCR permite la valoración cuantitativa y precisa de la expresión de mRNA de genes<sup>147</sup>. De las 86 pacientes, la obtención de mRNA para el análisis de los niveles de BRCA1 únicamente fue posible en 41. En la Figura 4 vemos en el diagrama de flujo del proceso.

**Figura 4. Diagrama de flujo del proceso seguido en el estudio**



En definitiva, en una serie retrospectiva de 86 pacientes tratadas de forma neoadyuvante con fluorouracilo, epirubicina y ciclofosfamida (FEC), se evaluaron las características clínicas, la respuesta, el tiempo a la progresión (TTP) y la supervivencia.

Por otra parte, de acuerdo con la clasificación simplificada a partir del análisis inmunohistoquímico de los RE, RP, HER2 y Ki67<sup>148</sup> se definieron los subtipos de cáncer de mama luminal A y B, HER2 positivo y triple negativo, de la siguiente forma: a) Luminal A: RE positivo y/o RP positivo, y HER2 negativo y ki67<14%; b) Luminal B: REpositivo y/o RP positivo, y HER2 positivo y/o ki67≥14%; c) Triple negativo: RE negativo y RP negativo y HER2 negativo; d) HER2 positivo: RE negativo y RP negativo y HER2 positivo. Se evaluaron las características clínicas de la serie, la respuesta, el tiempo a la progresión y la supervivencia en función de estos subgrupos.

Además, se evaluaron CK5/6, Vimentina y HER2 por hibridación in situ cromogénica (CISH), y su relación con los diferentes subgrupos, con la respuesta, el tiempo a la progresión y la supervivencia.

Mediante análisis inmunohistoquímico, se evaluó el estado de HIP1 y su relación con las características clínicas de la serie, la respuesta el tiempo a la progresión y la supervivencia.

Finalmente, en las 41 pacientes para las que quedaba suficiente tumor disponible, mediante RT-QCR se evaluaron los niveles de mRNA de BRCA1 intratumoral. Todos estos datos se correlacionaron con la respuesta, el tiempo a progresión y la supervivencia.

Por último se evaluó BRCA1 mediante inmunohistoquímica y su correlación con el análisis de los niveles de mRNA de BRCA1.

## **4.2 MÉTODOS**

### **4.2.1 Realización del tissue microarray**

Se realizaron “tissue microarray” de cáncer de mama a partir de los bloques de parafina, preparándolos mediante la extracción de dos cores de 1 mm de diámetro de

cáncer de mama invasivo histológicamente confirmado. Las laminillas de estos bloques teñidas con hematoxilina-eosina fueron revisadas por dos patólogos para identificar las áreas de tumor invasivo.

Sobre este material se realizó el análisis inmunohistoquímico para RE, RP, CK 5/6, HER-2, Vimentina, HIP1 y BRCA1. Las dos cores fueron evaluadas para cada uno de los tumores. Cada core fue puntuada individualmente por dos lectores diferentes, y la media de los resultados de las dos fue calculada.

#### **4.2.2 Análisis inmunohistoquímico**

##### **HER-2**

La determinación inmunohistoquímica de HER2 fue realizada con el anticuerpo Herceptest de Dako procesado mediante Autostainer de Dako automáticamente. El resultado era puntuado con los criterios especificados por DAKO para la interpretación del HercepTest.

##### Valoración de resultados

Se evaluó exclusivamente en el componente infiltrante y la tinción de membrana, siendo interpretado como se describe a continuación:

- Negativo (0): ausencia de tinción de membrana o tinción en menos del 10% de las células
- Negativo (1+): tinción de membrana débil e incompleta en más del 10% de las células
- Borderline (2+): tinción completa de membrana, débil o moderada, en más del 10% de las células o tinción completa e intensa en 10-30% de las células.
- Positivo (3+): tinción de membrana completa e intensa en más del 30% de las células

##### **RE, RP, Ki67, CK5/6, Vimentina, HIP1 y BRCA1**

La inmunohistoquímica del resto de anticuerpos (RE, RP, Ki67, CK 5/6, vimentina, HIP1 y BRCA1) fue realizada conjuntamente, utilizando el sistema automatizado de Ventana Benchmarch immunostainer con el kitt ultraview universal. En la siguiente tabla indicamos las clonas y las diluciones correspondientes a los anticuerpos utilizados. En la tabla se describen las clonas y diluciones utilizadas.

**Tabla 4. Análisis inmunohistoquímica de RE, RP, Ki67, CK5/6, Vimentina, HIP1 y BRCA1**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Clona</b>	<b>Dilución</b>
Receptores de estrógenos	6F11 (Novocastra)	1/40
Receptores de progesterona	312 (Noocastra)	1/40
Ki-67	Mib-1 (Dako)	1/600
CK5/6	D5/16B4 (Dako)	1/50
Vimentina	V-9 (Dako)	1/600
HIP1	4b.10.7 (Abcam)	Prediluido
BRCA-1	MS110 (Abcam)	1/40

#### Valoración de resultados

##### RE y RP

Los RE y RP fueron considerados positivos solo si la positividad nuclear era vista en más de un 5% de células neoplásicas.

##### Ki 67

Ki 67 fue puntuado como el porcentaje de células tumorales en el núcleo con positividad para la tinción inmunohistoquímica de acuerdo con los dos patólogos. Un

porcentaje  $>14\%$  era considerado como Ki67 positivo, y un porcentaje  $\leq 14\%$  como ki67 negativo.

#### HIP1

La intensidad por inmunohistoquímica fue puntuada como ausente (0), débil (1), moderada (2), o elevada (3). Los valores 0 y 1 fueron considerados negativos y 2 y 3 positivos.

#### CK 5/6

Los resultados de la tinción de CK 5/6 fueron valorados usando un sistema de evaluación de tres puntos, donde 0 era no tinción, 1 era débil intensidad de tinción y/o menos de un 20% de células tumorales teñidas, y 2 era una fuerte tinción en más de un 20% de células tumorales. Los valores 0 y 1 fueron considerados negativos y 2 positivos.

#### Vimentina

Los resultados de la tinción de Vimentina fueron valorados usando un sistema de evaluación de tres puntos, donde 0 era no tinción, 1 era débil intensidad de tinción y/o menos de un 20% de células tumorales teñidas, y 2 era una fuerte tinción en más de un 20% de células tumorales. Los valores 0 y 1 fueron considerados negativos y 2 positivos.

#### BRCA1 (tinción nuclear)

La intensidad por inmunohistoquímica fue puntuada como ausente (0), débil (1), moderada (2), o elevada (3). Los valores 0 y 1 fueron considerados negativos y 2 y 3 positivos.

### **4.2.3 Análisis por CISH de HER-2**

Se realizaron dos cortes seriados sin teñir de 4 micras de bloques de tejido fijado en formol y parafinado. Se desparafinaron mediante dos pases por xilol de cinco minutos cada uno de ellos, deshidratación en dos pases por alcohol absoluto de 5 minutos cada uno de ellos y tres pases de dos minutos en agua destilada. Los dos cortes se procesaron con los kits SPoT-Light HER2 CISH y SPoT-Light CISH Centromere Detection (Zymed) y se hibridaron respectivamente con las sondas HER2 y Cromosoma 17 (Zymed) siguiendo las instrucciones de los proveedores. Brevemente, las muestras se incubaron en tampón citrato pH6.0 en un baño a 98° C durante 15 minutos, se lavaron con agua destilada y se procedió a la digestión con la pepsina incluida en los kits. Los portas se lavaron con agua destilada y se deshidrataron pasando por alcoholes con gradaciones crecientes.

Las sondas HER2 (marcada con digoxigenina) y del centrómero del cromosoma 17 (marcada con biotina) se aplicaron sobre las secciones que posteriormente fueron montadas con un cubre y selladas con pegamento. La muestra y la sonda fueron sometidas a codesnaturalización a 94° durante 5 minutos y hibridadas a 37°C durante toda una noche. Posteriormente, se desmontaron los cubreobjetos y las preparaciones se lavaron en una solución 0,5 xSSC a temperatura ambiente durante 5 minutos, seguidas de un lavado a 75° C durante 5 minutos y 2 lavados de 3 minutos en PBS.

Las muestras se incubaron con peróxido de hidrógeno al 30% y 9 partes de metanol durante 10 minutos y se procedió a la inmunodetección de las sondas siguiendo las instrucciones del fabricante.

La hibridación in situ cromogénica (CISH) se realizó en los casos de HER-2 inmunopositivo (2+ o 3+) usando un microscopio (Leica DMLS2) equipado con objetivos 10X, 20X, 40X and 63X, con 10 x oculares. Según el estándar ya descrito basado en estudios previos, los tumores sin amplificación de HER-2 fueron los que

tenían uno o dos puntos marrones por núcleo diploide o de tres a cinco si poliploide. Así, la no amplificación se definió como de uno a cinco señales marrones intranucleares por núcleo; la baja amplificación de seis a diez señales por núcleo en más del 50% de las células tumorales; y alto nivel de amplificación en caso de más de 10 señales o una colonia de gran señal en más de un 50% de las células tumorales.

#### **4.2.4 Análisis de BRCA1. Microdissección para extracción de RNA para análisis de BRCA1**

Los niveles de expresión de mRNA de BRCA1 intratumoral fueron evaluados mediante PCR cuantitativa en tiempo real (*real time quantitative PCR*; RT-QPCR) tan solo en los 41 pacientes en los que quedaba suficiente tejido tumoral disponible de la muestra de parafina. El RNA total fue extraído del tejido tumoral del bloque de parafina mediante la microdissección con laser que aseguraba un mínimo del 90% de las células tumorales. Tras la desparafinización, con el proceso estándar con xileno y alcohol, las muestras eran sometidas a lisis en un buffer que contenía tris-chloride, EDTA, *sodium dodecyl sulphate*, y proteinasa K. El RNA era entonces extraído con alcohol phenol-chlorophorm-isoamyl seguido de precipitación con isopropanolol en presencia de glycogen y acetato de sodio. El RNA era resuspendido en agua DEPC (Ambion Inc., Austin, TX) y tratado con DNase I para evitar la contaminación por DNA. cDNA fue sintetizado usando el encima M-MLV retrotranscriptasa. El cDNA fue añadida a TaqMan Universal Master Mix en una reacción de 12.5- $\mu$ L con primers específicos y probada para cada gen. En gen de referencia endógeno fue  $\beta$ -actina. La expresión de genes fue cuantificada mediante el sistema ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems)[18].

Para escoger el gen endógeno de referencia, se testaron seis *housekeeping* (HK) genes en el RNA de las muestras de mama:  $\beta$ -actina, 18S, RPLP0, GADPH, HPRT1 y

TBP. De acuerdo con la guía “User Bulletin of Applied Biosystems”, tras el análisis de los seis genes en 20 muestras, se observó:

- Para RPLP0, GADPH, HPRT1 y TBP, había muchas muestras donde Ct estaba bajo la linealidad ( $Ct > 32$ ). Estos genes fueron descartados, ya que no eran útiles para una cuantificación relativa (las curvas de amplificación no eran obtenidas para todas las muestras)
- El sistema de puntuación (definido como el  $DCt$  para cada  $HK = C_{t\text{muestra}} - C_{t\text{calibrador}}$ ; donde el calibrador usado era una de las muestras tumorales) nos mostró que el mejor control endógeno era  $\beta$ -actina: este gen tuvo el menor  $DCt$  y el menor coeficiente de variación (CV). Así, el escogido  $\beta$ -actina refleja la expresión media de los seis genes testados incluso con menos variación
  - o  $DCt \beta\text{-actina} = 0.55$
  - o Media  $DCt$  de todos los genes = 0.99
- $\beta$ -actina mostró la mayor linealidad en Ct versus concentración de RNA comparado con los otros genes

Además, como se especifica en la “User Guide” antes mencionada, la cuantificación de la expresión de genes con un solo HK es posible si el HK es suficientemente estable. Este hecho puede ser calculado consultando el software data Assist<sup>TM</sup> que se encuentra disponible en la siguiente página web: <https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=606580&tab=Overview>. Este algoritmo calcula el término M (valor de estabilidad: cuanto menor sea, mejor es la estabilidad) para cada HK. En nuestro sistema,  $\beta$ -actina mostró el mayor M. En nuestra experiencia, hemos obtenido resultados válidos usando  $\beta$ -actina como control endógeno<sup>144,149,150</sup>.

Con el fin de evitar potenciales falsos resultados debido a la variación en la calidad del RNA en muestras parafinadas, y también para validar la fortaleza de  $\beta$ -actina como único gen *housekeeping*, en un subgrupo de 34 pacientes con RNA disponible, se analizó la expresión de BRCA1 calculada según los valores medios de  $\beta$ -actina y RPLP0, y  $\beta$ -actina y ribosomal 18S como genes housekeeping.

### **4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Las variables cuantitativas, tales como la expresión génica de mRNA, la edad y otras, se resumieron mediante los valores de mediana y sus rangos. Mientras que las variables cualitativas, fueron resumidas mediante frecuencias absolutas y porcentajes.

Con el fin de proporcionar una evaluación más fácilmente interpretable del efecto de la expresión de mRNA de BRCA1, los valores de expresión del gen fueron divididos en terciles.

TTP fue calculado desde el momento de inclusión en el estudio hasta la progresión de la enfermedad o la muerte. La supervivencia global (SG) fue estimada desde el momento de inclusión en el estudio hasta la muerte por cualquier causa. Las medianas de TTP y SG fueron calculadas y representadas, usando la estimación de Kaplan-Meier y la existencia de diferencia estadística entre las medianas de TTP o SG se contrastó mediante la prueba de log-rank. El método de riesgos proporcionales de Cox, con el cociente de riesgo (Hazard Ratios HR) y su correspondiente intervalo de confianza al 95%, se utilizó para ajustar los modelos tanto univariantes como multivariantes para TTP y SG. El multivariante se construyó con un procedimiento por pasos (hacia adelante y hacia atrás) para evaluar la importancia independiente de las distintas variables en el TTP y SG. Los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico para las Ciencias Sociales (SPSS) para Windows versión 17 (SPSS Inc, Chicago, IL) y S-Plus 6.1 para Windows.

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 RESULTADOS PARA EL GLOBAL DE LAS 86 PACIENTES**

#### **5.1.1 Características de las pacientes**

La tabla 5 muestra las características de las 86 pacientes incluidas. La edad media de las pacientes incluidas era de 54 años (rango, 31-79). Cincuenta pacientes (58%) eran posmenopáusicas en el momento de la inclusión. Cuando fueron diagnosticadas, 24 pacientes (28%) presentaban un estadio II, 62 pacientes (72%) un estadio III. Por otra parte, el tamaño clínico tumoral medio era de 6 cm (rango, 2.5-12). Las 86 pacientes fueron consideradas como candidatas a realizar tratamiento primario de acuerdo con la decisión de la Unidad Funcional de Mama de la institución y fueron tratadas con cuatro ciclos de FEC. Una vez completada la quimioterapia y tras revaloración clínica de la respuesta, se realizó cirugía en las 86 pacientes. La cirugía mamaria consistió en una mastectomía en 78 pacientes (91%) y en una tumorectomía en 8 (9%), con vaciamiento ganglionar axilar en el 100% de las pacientes, conforme a la decisión de la Unidad Funcional de Mama del centro. Los estadios patológicos tras la cirugía, se distribuyeron de la siguiente forma: un paciente (1%) presentó estadio 0; ocho (9%) estadio I, 32 (37%) estadio II, 45 (53%) estadio III; siendo el tamaño tumoral medio de 3 cm (rango, 0-12). En el momento de la cirugía, 69 pacientes (80%) presentaban afectación ganglionar y 17 (20%) no. El número medio de ganglios afectados en el vaciamiento fue de 3 (rango, 0-26). Setenta y nueve pacientes (92%) tenían carcinoma ductal, cinco (6%) tenían carcinoma lobulillar y dos (2%) tenían otras histologías (mucinoso, medular). En cuanto al grado histológico de Bloom Richardson, fue evaluado como I en 8 pacientes (10%), como II en 34 pacientes (44%), como III en 35 pacientes (45%), y en 9 no fue determinado. El seguimiento medio para todas las

pacientes fue de 50,5 meses (rango, 5-154), y el seguimiento medio para las pacientes vivas de 77 meses (rango, 40-154).

**Tabla 5. Características de las pacientes**

	<b>N=86</b>
<b>Edad, media (rango)</b>	54 (31-79)
<b>Estado menopáusico</b>	
<b>Premenopausia</b>	36 (42%)
<b>Postmenopausia</b>	50 (58%)
<b>Tamaño Tumoral medio (cm) pretratamiento</b>	6 (2.5-12)
<b>Grado de diferenciación</b>	
<b>Grado I</b>	8 (10.4)
<b>Grado II</b>	34 (44.2)
<b>Grado III</b>	35 (45.5)
<b>Desconocido</b>	9
<b>Estadío Clínico</b>	
<b>II</b>	24 (28%)
<b>III</b>	62 (72%)
<b>Cirugía</b>	
<b>Mastectomía</b>	78 (91%)
<b>Tumorectomía</b>	8 (9%)
<b>Estado ganglionar patológico</b>	
<b>Positivo</b>	69 (80%)
<b>Negativo</b>	17 (20%)
<b>Histología</b>	
<b>Carcinoma ductal infiltrante</b>	79 (92%)
<b>Carcinoma lobular infiltrante</b>	5 (6%)
<b>Otros: mucinos, medular</b>	2 (2%)

### 5.1.2 Respuesta clínica y patológica

Considerando la respuesta clínica evaluada por exploración física con los criterios RECIST, 66 pacientes (76.7%) presentaron respuesta parcial, 18 pacientes (20.9%) presentaron enfermedad estable, y 2 (2.3%) progresión de la enfermedad.

La respuesta patológica fue evaluada de acuerdo con los criterios de Miller y Payne como se puede ver en la Tabla 6. En un caso (1.2%) la respuesta patológica fue completa a nivel ganglionar y local (G5); en 44 casos (51.2%) había signos de inflamación, necrosis y fibrosis con la presencia de nidos de infiltración local por carcinoma ductal (G4, G3); en 37 casos (43%) no existía evidencia de respuesta histológica (G2, G1).

**Tabla 6. Respuesta patológica**

N=86			
RESPUESTA	Local	Axila*	Local + Axila
RC G5	5 (5.8%)	D	1 (1.2%)
RP G4+G3	44 (51.2%)	C	4 (4.7%)
		D	6 (6.9%)
		C+B	32 (37.2%)
		A	6 (6.9%)
<b>NO RESPUESTA</b>			
G1+G2	37 (43%)	C+B	33 (38.4%)
		A	4 (4.7%)

Valoración de respuesta patológica según los criterios de Miller y Payne. Respuesta en tumor: G5: ausencia de células infiltrantes tumorales residuales. G4: marcada desaparición de células tumorales invasivas, solo presencia de pequeños clusters de células dispersas se pueden detectar. G3: considerable reducción en las células tumorales. G2: cierta pérdida de células tumorales invasivas, pero celularidad global

aún elevada. G1: no reducción en el número global respecto a la biopsia pretratamiento. Respuesta en axila: A: Ganglios linfáticos sin metástasis. B: ganglios linfáticos con células malignas. C: ganglios linfáticos aún positivos, pero con evidencia de cierta regresión. D: ganglios linfáticos previamente positivos, ahora sin metástasis.

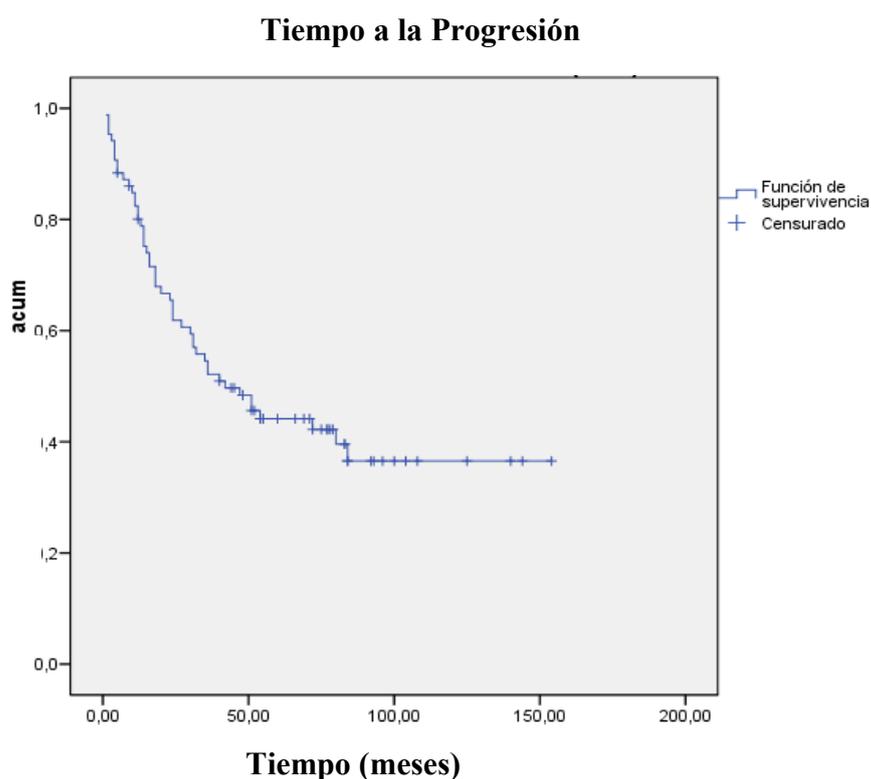
\*En un total de 10 pacientes (11.6%) la linfadenectomía axilar resultó negativa, pero era clínicamente negativa previamente a la cirugía (6 respuestas y 4 no respuestas).

Respuesta axilar tipo A

### 5.1.3 Tiempo a progresión y supervivencia

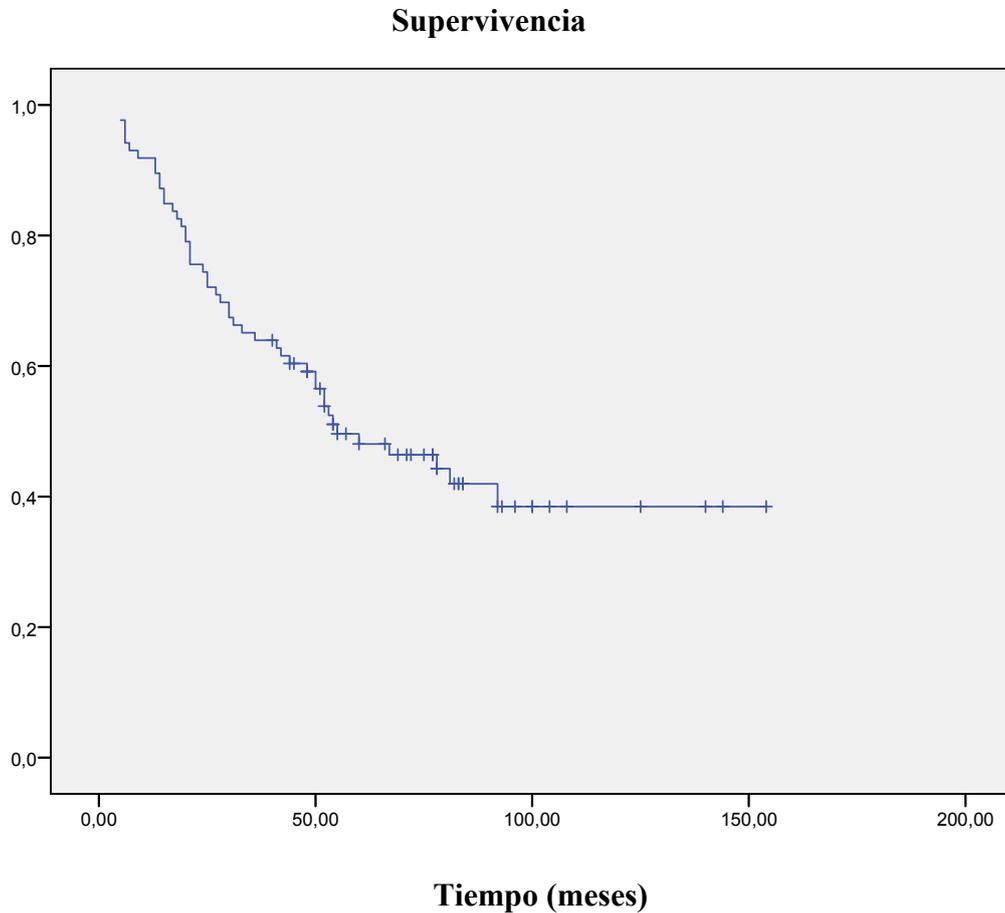
El tiempo medio a la progresión fue de 42 meses (95% IC, 21.66-62.34), y la supervivencia media fue de 55 meses (95% IC, 30.09-79.91) como muestran las figuras 5 y 6.

**Figura 5. Tiempo a la progresión**



Mediana (95% CI) = 42 (21.66-62.34)

**Figura 6. Supervivencia**



Mediana (95% CI) = 55 (30.09-79.91)

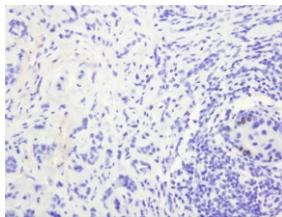
#### **5.1.4 Resultados del análisis inmunohistoquímico y de HER-2 por CISH y relación con respuesta, tiempo a la progresión y supervivencia**

Los RE fueron positivos en 51 pacientes (59.3%), los RP fueron positivos en 27 pacientes (31.4%).

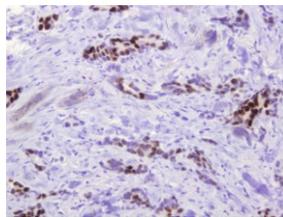
La citokeratinas 5/6 fueron positivas en 18 tumores (21%), de los cuales (como veremos más adelante en el análisis por subgrupos), 11 eran triples negativos (61.1%), 4 HER-2 positivos 22.2%), 2 luminal A (11.1%) y 1 luminal B (5.6%). HER-2 fue evaluado por inmunohistoquímica y considerado negativo en caso de resultados 0 o 1+; en caso de resultados 2+ o 3+ fue evaluado por CISH para decidir su positividad o negatividad. Finalmente la vimentina fue positiva en 13 casos (15%) de los cuales (según el análisis por subgrupos posteriormente especificado) 10 eran triple negativos (77%), 2 HER-2 positivos (15.3%) y 1 luminal B (7.7%).

En las figuras 7, 8, 9, 10 y 11 podemos ver ejemplos de la serie de expresión de RE, HER-2, análisis de HER-2 por CISH, expresión de CK 5/6 y vimentina.

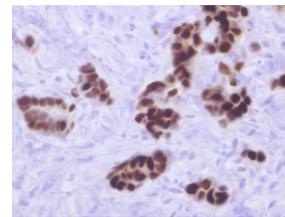
**Figura 7. Análisis inmunohistoquímico de los RE**



**RE 0%**

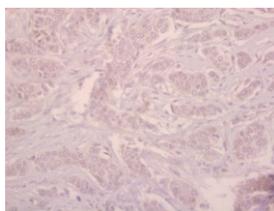


**RE 50%**

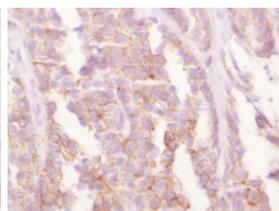


**RE 100%**

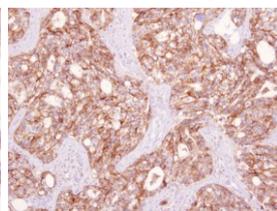
**Figura 8. Análisis inmunohistoquímico de HER-2**



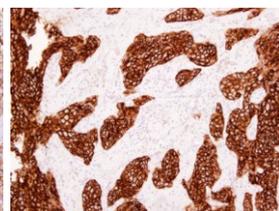
**HER-2 0**



**HER-2 1+**



**HER-2 2+**

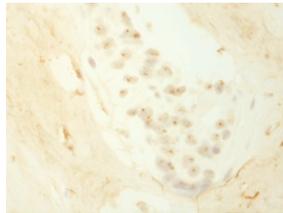


**HER-2 3+**

**Figura 9. Análisis de HER-2 por CISH**

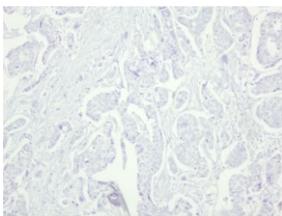


**CISH negativo**

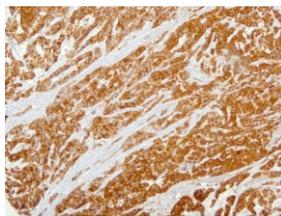


**CISH positivo**

**Figura 10. Análisis inmunohistoquímico de CK 5/6**

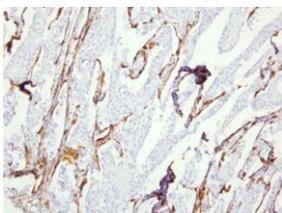


**CK 5/6 negativa**

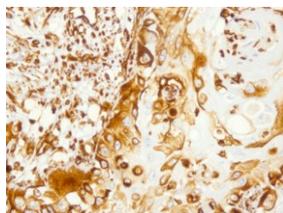


**CK 5/6 positiva**

**Figura 11. Análisis inmunohistoquímico de Vimentina**



**Vimentina negativa**



**Vimentina positivo**

En la Tabla 7 podemos ver los resultados antes mencionados.

**Tabla 7. Tabla de resultados del análisis de RE, RP, HER-2, CK 5/6, Vimentina**

	N=86
<b>RE</b>	
<b>0-4%</b>	35(40.7)
<b>5-100%</b>	51(59.3)
<b>RP</b>	
<b>0-4%</b>	59(68.6)
<b>5-100%</b>	27(31.4)
<b>Citokeratina 5/6*</b>	
<b>Negativo</b>	66 (78.6)
<b>Positivo</b>	18 (21.4)
<b>HER2 por IHQ+CISH*</b>	
<b>Positivo</b>	17 (20.2)
<b>Negativo</b>	67 (79.8)
<b>Vimentina*</b>	
<b>Negativo</b>	72 (84.7)
<b>Positivo</b>	13 (15.3)

\* Determinación no posible en algunos pacientes por problemas técnicos

### **Respuesta patológica y características clínicas y del análisis inmunohistoquímico**

Como únicamente un paciente presentó una respuesta completa patológica en el tumor y en la axila, esto limitó mucho la correlación de los diferentes parámetros con la respuesta completa patológica. Pero, tal y como se ha hecho en algunos trabajos reportados<sup>151</sup>, se clasificaron las pacientes como respondedoras (las que presentaban

respuestas según los criterios de Miller y Payne grado 3,4,5), o como no respondedoras (las que presentaban respuestas grado 1,2). Según esta clasificación, las respuestas patológicas se correlacionaron con mayor expresión de Vimentina ( $p=0.03$ ), y con la ausencia de expresión de receptores de estrógenos y progesterona ( $p=0.008$  y  $p=0.004$ , respectivamente), como se puede ver en la tabla 8.

**Tabla 8. Respuesta patológica y características de las pacientes**

	<b>RESPUESTA</b>	<b>NO RESPUESTA</b>	<b>P</b>
<b>MENOPAUSIA</b>			0.51
<b>No</b>	19(52.8)	17(47.2)	
<b>Si</b>	30(61.2)	19(38.8)	
<b>RP</b>			0.004
<b>0-4%</b>	40(67.8)	19(32.2)	
<b>5-100%</b>	9(33.3)	18(66.7)	
<b>RE</b>			0.008
<b>0-4%</b>	26(74.3)	9(25.7)	
<b>5-100%</b>	23(45.1)	28(54.9)	
<b>Citokeratina 6/7</b>			0.80
<b>NEGATIVO</b>	37(56.1)	29(43.9)	
<b>POSITIVO</b>	11(61.1)	7(38.9)	
<b>HER-2 por IHQ+ CISH</b>			0.59
<b>HER-2 positivo por CISH</b>	11(64.7)	6(35.3)	
<b>HER-2 negativo por CISH</b>	36(53.7)	31(46.3)	
<b>Vimentina</b>			0.03
<b>Negativo</b>	37(51.4)	35(48.6)	
<b>Positivo</b>	11(84.6)	2(15.4)	

**Análisis univariante y multivariante para tiempo a la progresión y supervivencia**

**Tabla 9. Análisis univariante para tiempo a la progresión y supervivencia para las 86 pacientes**

	<b>Pacientes (N=86)</b>				
		<b>Tiempo a Progresión</b>		<b>Supervivencia</b>	
	<b>N</b>	<b>HR (95% CI)</b>	<b>P</b>	<b>HR (95% CI)</b>	<b>P</b>
<b>RE</b>					
<b>Negativo</b>	35	2.25 (1.28-3.95)	<b>0.005</b>	2.51 (1.41-4.47)	<b>0.002</b>
<b>Positivo</b>	51	1		1	
<b>RP</b>					
<b>Negativo</b>	59	1.40 (0.76-2.58)	0.28	1.74 (0.90-3.36)	0.10
<b>Positivo</b>	27	1		1	
<b>HER-2 IHQ+CISH</b>					
<b>Negativo</b>	67	1		1	0.22
<b>Positivo</b>	17	1.38 (0.70-2.71)	0.35	1.53 (0.78-3.03)	
<b>Estado ganglionar</b>					
<b>Negativo</b>	17	1		1	0.11
<b>Positivo</b>	69	2.25 (0.95-5.28)	0.06	2.03 (0.86-4.78)	
<b>Vimentina</b>					
<b>Negativo</b>	72	1.26 (0.54-2.97)	0.59	1.01 (0.45-2.23)	0.99
<b>Positivo</b>	13	1		1	
<b>Citokeratina 5/6</b>					
<b>Negativo</b>	66	1.06 (0.51-2.18)	0.88	0.83 (0.41-1.67)	0.59
<b>Positivo</b>	18	1		1	
<b>Edad</b>	86	1.02 (0.99-1.04)	0.23	1.01 (0.99-1.04)	0.29

En el análisis univariante para tiempo a la progresión para las 86 pacientes, las pacientes con tumores con RE negativo presentaron mayor riesgo de recidiva (HR 2.25, p=0.005). En cuanto al análisis multivariante, el estado ganglionar positivo después de la cirugía y los RE negativos se asociaron significativamente a un mayor riesgo de recidiva (HR 0.37, p=0.04 para el estado ganglionar; y HR 2.07, p=0.01 para el RE).

En el análisis univariante para la supervivencia, las pacientes con RE negativo presentaron mayor riesgo de muerte (HR 2.51, p=0.002). En el análisis multivariante, el estado ganglionar positivo tras la cirugía, y los RE negativos se asociaron significativamente a un mayor riesgo de muerte (HR 0.38, p=0.04 para el estado ganglionar; y HR 2.40, p=0.005 para el RE).

**Tabla 10. Análisis multivariante para tiempo a progresión y supervivencia**

	N	Tiempo a Progresión		Supervivencia	
		HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
<b>RE</b>					
<b>Negativo</b>	35	2.07 (1.14-3.77)	0.01	2.40 (1.30-4.40)	0.005
<b>Positivo</b>	51	1		1	
<b>Estado Ganglionar</b>					
<b>Negativo</b>	17	1	0.04	1	0.04
<b>Positivo</b>	69	0.37 (0.14-0.95)		0.38 (0.14-0.97)	

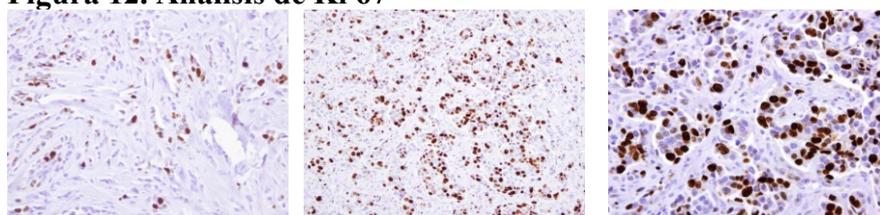
### 5.1.5 Análisis de Ki 67 y resultados

La determinación de Ki67 se realizó en 76 de los 86 casos (88.4%) tomando como punto de corte para su positividad un 13% fue positiva en 22 casos (29%) y negativa en 54. La positividad de Ki67 se asoció a la positividad de Vimentina y CK 5/6, como vemos en la Tabla 11.

**Tabla 11. Ki67 y características de las pacientes**

	<b>Ki67</b>		<b>P</b>
	<b>Positiva (22)</b>	<b>Negativa (54)</b>	
<b>Tamaño clínico</b>	6.7	6.2	0.335
<b>Estadío Clínico</b>			0.709
<b>II</b>	6 (27.3%)	15 (27.8%)	
<b>III</b>	16 (72,8%)	38 (70,4%)	
<b>Grado de diferenciación</b>			.652
<b>I</b>	2 (9.1%)	5 (10.2%)	
<b>II</b>	8 (36.4%)	23 (46.9%)	
<b>III</b>	12 (54.5%)	21 (42.9%)	
<b>Estado ganglionar postcirugía</b>			.449
<b>Negativo</b>	5 (22.7%)	10 (18.5%)	
<b>Positivo</b>	17 (77.3%)	44 (81.5%)	
<b>Vimentina</b>			.004
<b>Negativa</b>	14 (63.6%)	50 (92.6%)	
<b>Positiva</b>	8 (36.4%)	4 (7.4%)	
<b>CK 5/6</b>			.041
<b>Negativa</b>	14 (63.6%)	45 (84.9%)	
<b>Positiva</b>	8 (36.4%)	8 (15.1%)	

**Figura 12. Análisis de Ki 67**



**Ki 67 5%**

**Ki 67 20%**

**Ki67 60%**

Ki67 no se correlacionó con la respuesta clínica ni con la respuesta patológica

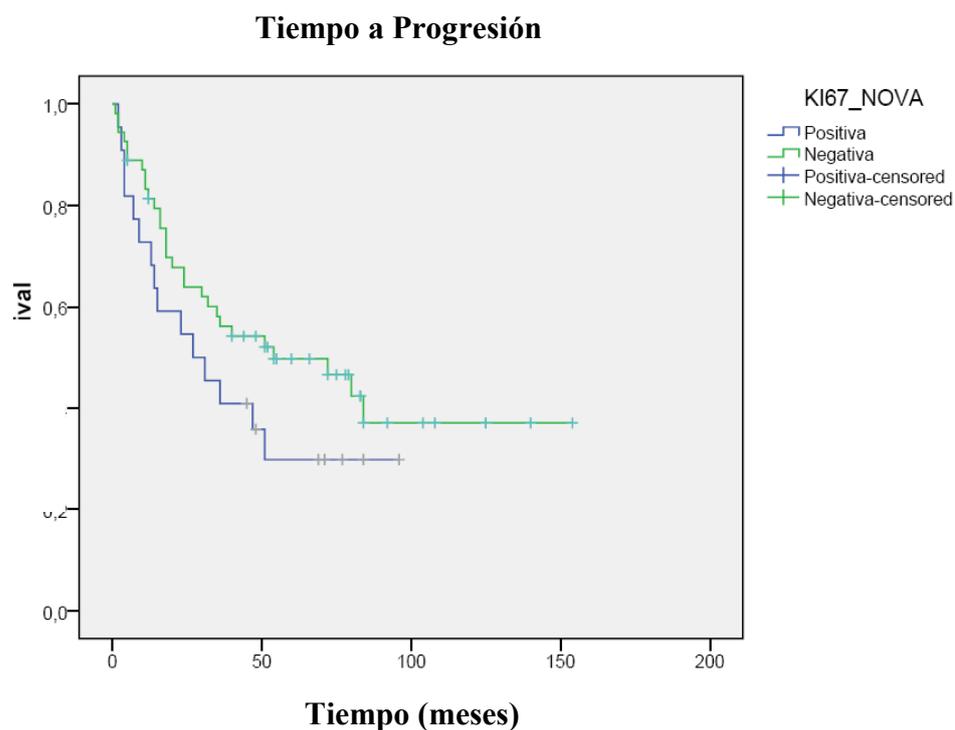
como vemos en la Tabla 12

**Tabla 12. Ki67 y respuesta clínica y patológica**

	Ki67		P
	Positivo	Negativo	
<b>Respuesta Clínica</b>			.492
<b>RP+RC</b>	16 (72.7%)	41 (75.9%)	
<b>EE+PE</b>	6 (27.3%)	13 (24.1%)	
<b>Respuesta Patológica</b>			.433
<b>RESPUESTA</b>	13 (59.1%)	29 (53.7%)	
<b>NO RESPUESTA</b>	9 (40.9%)	25 (46.3%)	

RP: respuesta parcial, RC: respuesta completa, EE: enfermedad estable, PE: progresión

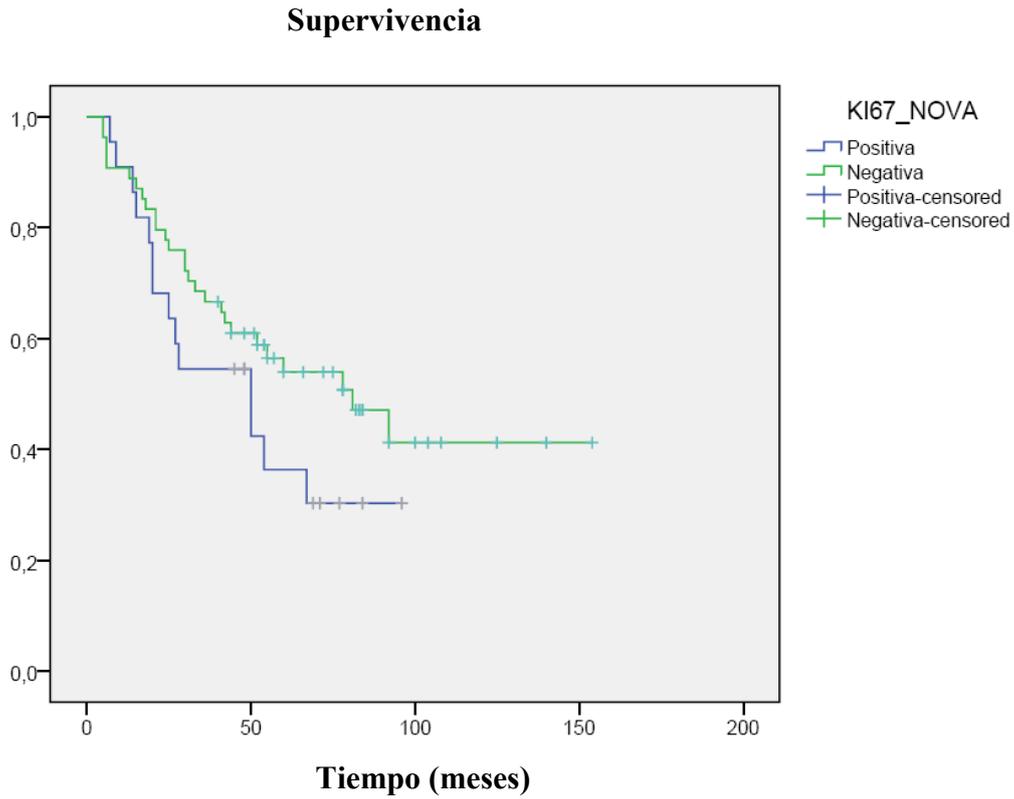
**Figura 13. Ki 67 y tiempo a Progresión**



Ki67	N	Mediana (95% IC)	
<b>Positivo</b>	22	27 (26.79-58.46)	P=.167
<b>Negativo</b>	54	54 (58.78-95.81)	

En cuanto al tiempo a la progresión y a la supervivencia fueron peores en caso de Ki67 positivas, sin embargo las diferencias no fueron estadísticamente significativas como vemos en las figuras10 y 11.

**Figura 14. Ki67 y supervivencia.**



<b>Ki67</b>	<b>N</b>	<b>Mediana (95% IC)</b>	
<b>Positivo</b>	22	50 (36.29-65.39)	P=.167
<b>Negativo</b>	54	81 (66.42-96.29)	

### **5.1.6 Análisis de resultados según los subgrupos de cáncer de mama definidos en función de RE, RP, HER-2 y Ki 67**

Tal y como se ha especificado en el apartado de materiales y métodos se establecieron los diferentes subgrupos de cáncer de mama a partir del análisis inmunohistoquímico de RE, RP, HER-2 (inmunohistoquímica y CISH) y Ki67; estableciéndose los siguientes subgrupos: 1) luminal A: RE y/o RP positivos, y HER-2 negativo y Ki67 <13%; 2) luminal B: RE y/o RP positivos, y/o HER-2 positivo y/o Ki67 ≥13%; 3) triple negativo: RE, RP y HER-2 negativos; y 4) HER-2 positivo: RE y RP negativos y HER-2 positivo.

De acuerdo con esta clasificación, 32 pacientes (40.5%) fueron clasificados como luminal A, 14 pacientes (17.7%) como luminal B, 22 (27.8) como triple negativo y 11 (14%) como HER2 positivo.

En cuanto a las características clínicas, como se describe en la tabla 13, no se encontraron diferencias entre los subgrupos entre edad, estadio, tipo de cirugía, estatus ganglionar. Si que se apreció una tendencia no significativa a un menor tamaño tumoral clínico en el grupo luminal A. Si que existía una diferencia significativa en el grado de diferenciación, siendo los tumores triple negativos y HER2 positivos los más indiferenciados. Por otra parte la expresión de Vimentina se asoció significativamente al subtipo triple negativo, así como la expresión de CK5/6.

No existieron diferencias significativas en la respuesta clínica, y, en cuanto a la respuesta patológica aunque el porcentaje de pacientes respondedoras fue superior en los grupos triple negativo y HER2 positivo las diferencias no fueron significativas como vemos en tabla 14.

Las pacientes con tumores clasificados como luminal A presentaron de forma significativa un mayor tiempo a progresión y una mayor supervivencia, como vemos en las figuras 9 y 10.

**Tabla 13. Subgrupos y características clínicas.**

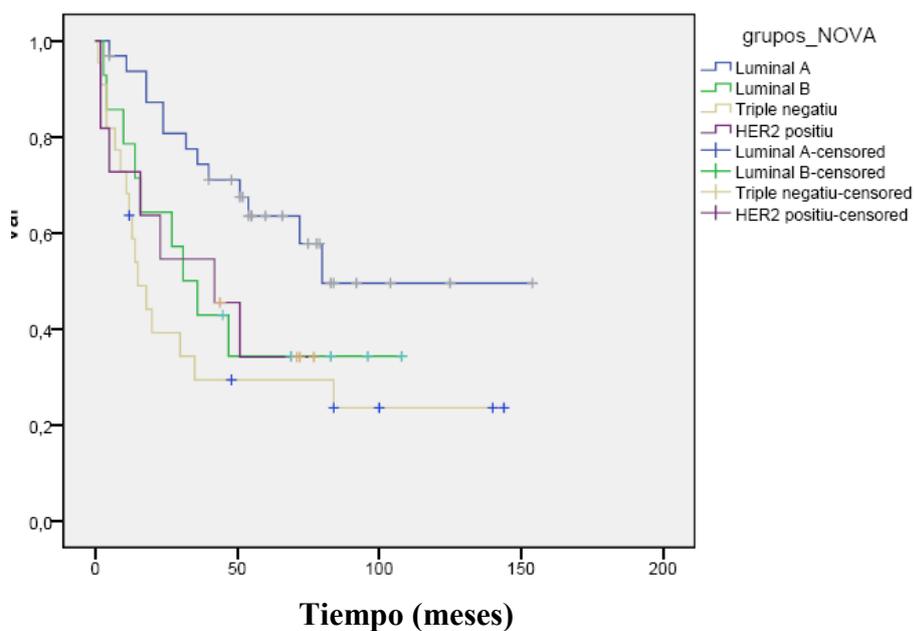
	Subtipos				
	Luminal A	Luminal B	Triple Negativo	HER2 Positivo	
<b>Edad</b>	55.2	55.9	55.5	55.3	.999
<b>Tamaño clínico</b>	5.6	7.1	6.2	7.0	.072
<b>Estadío</b>					.184
<b>II</b>	11(34.4%)	2(14.2%)	7(31.8%)	7(31.8%)	
<b>III</b>	21(65.6%)	12(85.8%)	15(68.2%)	15(68.2%)	
<b>Grado de diferenciación</b>					.009
<b>I</b>	5(17.9%)	2(14.3%)	0 (0%)	0(0%)	
<b>II</b>	14(50%)	8(57.1%)	5(23.8%)	4(40%)	
<b>III</b>	9(32.1%)	4(28.6%)	16(76.2%)	6(60%)	
<b>Tipo de cirugía</b>					.207
<b>Mastectomía</b>	31(96.9%)	12(85.7%)	19(86.4%)	11(100%)	
<b>Tumorectomía</b>	1(3.1%)	2(14.3%)	3(13.6%)	0(0%)	
<b>Estatus ganglionar</b>					.665
<b>Negativo</b>	5(15.6%)	4(28.6%)	6(27.3%)	2(18.2%)	
<b>Positivo</b>	27(84.4%)	10(71.4%)	16(72.7%)	9(81.8%)	
<b>Vimentina</b>					.000
<b>Negativa</b>	32(100%)	13(92.9%)	11(52.4%)	9(81.8%)	
<b>Positiva</b>	0(0%)	1(7.1%)	10(47.6%)	2(18.2%)	
<b>CK 5/6</b>					.001
<b>Negativa</b>	29(93.5%)	13(92.9%)	11(50%)	7(76.9%)	
<b>Positiva</b>	2(6.5%)	1(7.1%)	11(50%)	4(23.1%)	

**Tabla 14. Subgrupos y respuesta**

	Subtipos				
	Luminal A	Luminal B	Triple Negativo	HER2 Positivo	
<b>Respuesta clínica</b>					.779
<b>RP+RC</b>	23(71.9%)	10(71.4%)	18(81.8%)	9(81.8%)	
<b>EE+PE</b>	9(28.1%)	4(28.6%)	4(18.2%)	2(18.8%)	
<b>Respuesta patológica</b>					.114
<b>RESPUESTA</b>	15(46.9%)	6(42.9%)	16(72.7%)	8(72.7%)	
<b>NO RESPUESTA</b>	17(53.1%)	8(57.1%)	6(27.3%)	3(27.3%)	

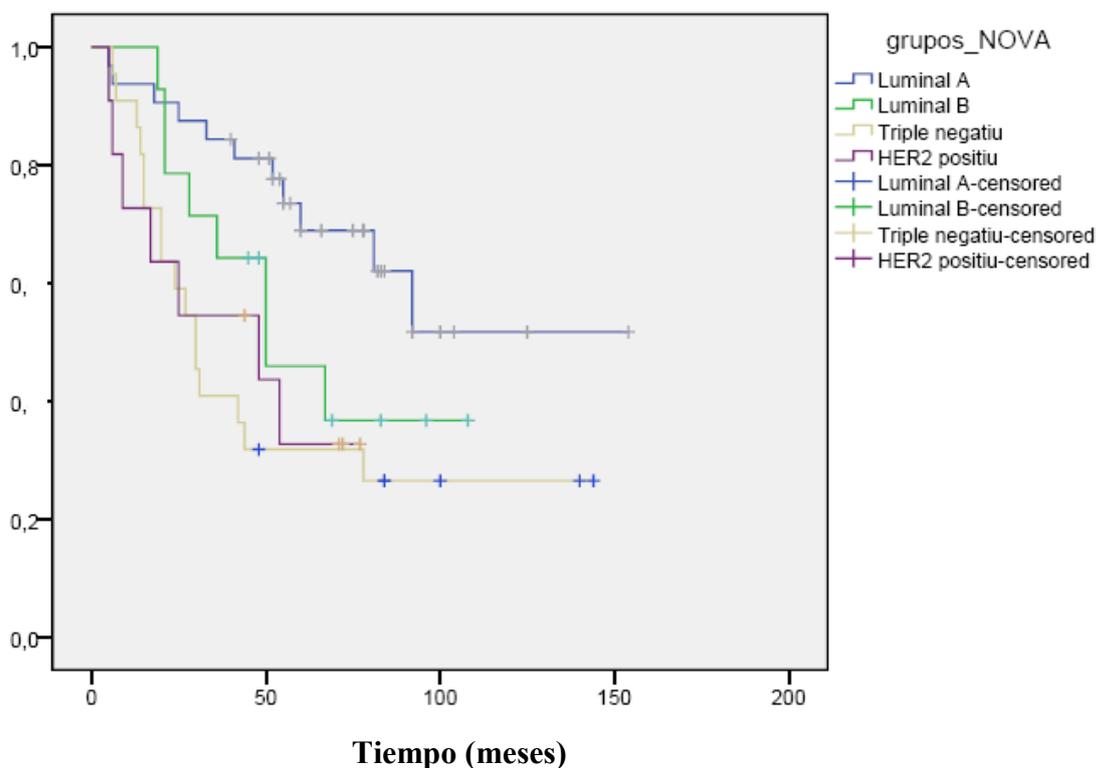
**Figura 15. Subgrupos y tiempo a la progresión**

**Tiempo a progresión**



	N	95% de IC	P
<b>Luminal A</b>	32	80 (74.51-120.78)	.026
<b>Luminal B</b>	13	31 (28.41-73.84)	
<b>Triple Negativo</b>	22	15 (23.92-72.35)	
<b>HER2 positivo</b>	11	42 (22.03-58.42)	

**Figura 16. Subgrupos y supervivencia**  
**Supervivencia**

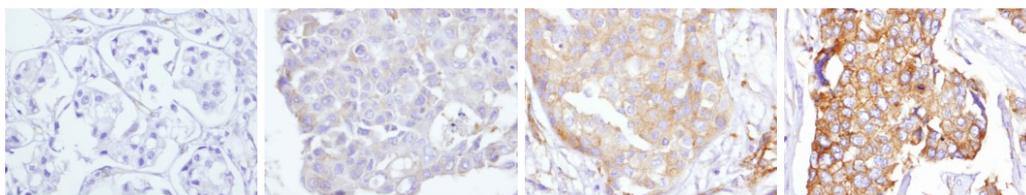


	N	95% de IC	P
<b>Luminal A</b>	32	---	.015
<b>Luminal B</b>	13	50 (44.10-83.77)	
<b>Triple Negativo</b>	22	30 (34.96-80.40)	
<b>HER2 positivo</b>	11	48 (24.60-59.32)	

### 5.1.7 Resultados en función de HIP1

HIP1 fue evaluado por inmunohistoquímica en los 86 pacientes, siendo considerado negativo en caso de que el resultado fuera 0 o 1, y positivo en caso de que fuera 2 o 3. El resultado fue 0 en 11 pacientes (13.3%), 1 en 40 pacientes (48.2%), 2 en 25 pacientes (30.1%), y 3 en 7 pacientes (8.4%). En las imágenes vemos ejemplos de cada uno de los resultados.

**Figura 17. Imágenes de HIP1**



**Huntingtina 0    Huntingtina 1+    Huntingtina 2+    Huntingtina 3+**

El valor de Huntingtina no se correlacionó con ninguna de las características clínicas de la serie, ni con los RE, RP, Vimentina, ni HER2, ni con los subgrupos. HIP1 negativo se correlacionó en el límite de la significación con la positividad de CK5/6.

**Tabla 15. Análisis de HIP1 y CK5/6**

	HIP1		
	Negativa (0+1)	Positiva (2+3)	P
<b>Citokeratina 6/7</b>			0.05
<b>Negativo</b>	34(53.1)	30(46.9)	
<b>Positivo</b>	16(88.9)	2(11.2)	

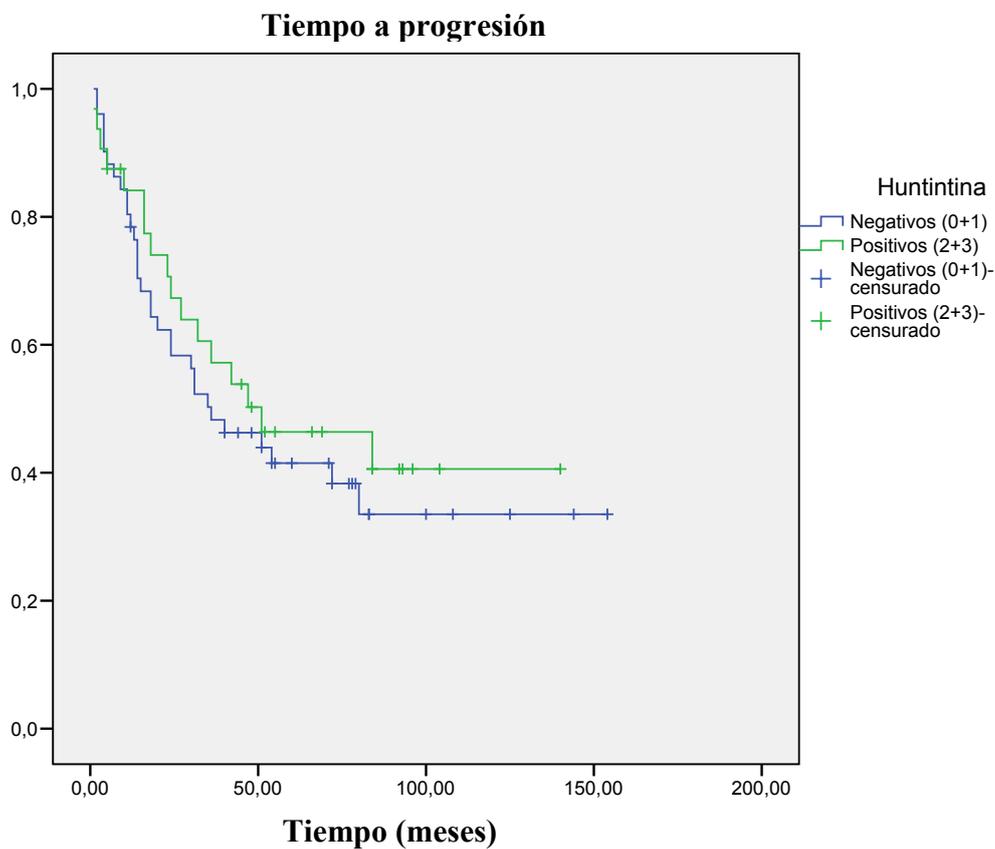
HIP1 no se correlacionó con la respuesta clínica. Sin embargo, si se correlacionó con la respuesta patológica, así los pacientes con HIP1 positiva presentaron una mayor respuesta patológica, como vemos en la tabla 16.

**Tabla 16. HIP1 y respuesta patológica**

	HIP1		P
	Positiva	Negativa	
<b>RESPUESTA PATOLÓGICA</b>			.04
<b>Respuesta</b>	23(71.9%)	24(47.1%)	
<b>No Respuesta</b>	9 (28.1%)	27(52.9%)	

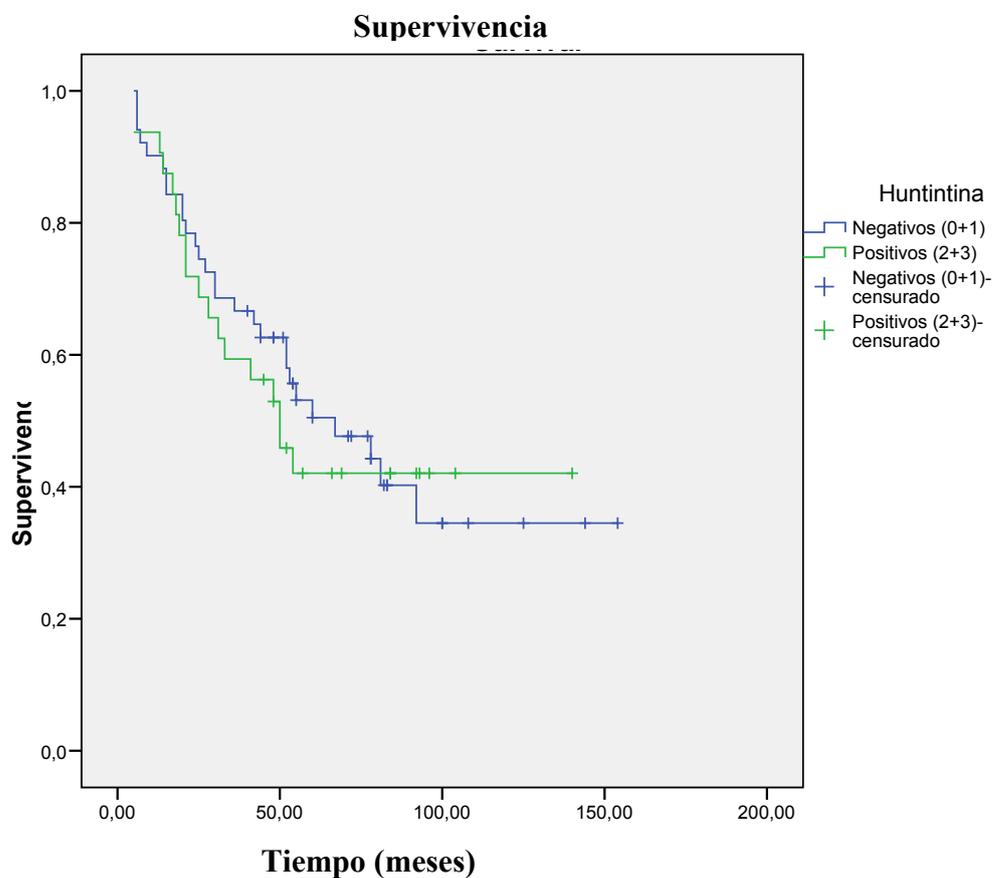
HIP1 no se correlacionó con el tiempo a progresión ni con la supervivencia.

**Figura 18. HIP1 y tiempo a progresión**



HUNTINTINA	N	Median (95% CI)	p
<b>Negativos (0+1)</b>	51	36 (12.49-59.51)	0.49
<b>Positivos (2+3)</b>	32	51 (0-103.31)	

**Figura 19. HIP1 y supervivencia**



<b>HUNTINTINA</b>	<b>N</b>	<b>Median (95% CI)</b>	<b>p</b>
<b>Negativos (0+1)</b>	51	67(34.95-99.05)	0.74
<b>Positivos (2+3)</b>	32	50(33.89-66.11)	

## 5.2 ANÁLISIS DE LAS 41 PACIENTES EN LAS QUE SE REALIZARON LOS NIVELES DE mRNA DE BRCA1

### 5.2.1 Expresión de mRNA de BRCA1 y resultados

El valor medio de la expresión de mRNA de BRCA1 en las 41 muestras analizadas fue de 16.68 (rango, 2.93-187.40). Las pacientes fueron divididas en terciles según los niveles de BRCA1, encontrando 14 pacientes en el primer tercil, 14 en el segundo tercil, y 13 en el tercer tercil. Cuando comparamos los resultados con los dos genes *housekeeping* adicionales (r18S, RPLP0) con los obtenidos en el análisis original con  $\beta$ -actina, usando el test de correlación de Spearman (*two-sided*), se encontró una correlación significativa entre los tres genes:  $\beta$ -actina vs r18S ( $\rho=0.70$ ;  $p<0,001$ );  $\beta$ -actina vs RPLP0 ( $\rho=0.61$ ;  $p<0.001$ ); RPLP0 vs r18S ( $\rho=0.77$ ;  $p<0.001$ ). También hubo una correlación significativa de la expresión de BRCA1 calculada de acuerdo con cada uno de los tres genes *housekeeping*: BRCA1/  $\beta$ -actina vs BRCA1/  $\beta$ -actina y RPLP0 ( $\rho=0.60$ ;  $p<0.001$ ); BRCA1/  $\beta$ -actina vs BRCA1/  $\beta$ -actina y r18S ( $\rho=0.70$ ;  $p<0,001$ ) (Tabla 17).

En 34 de los 41 pacientes, quedaba RNA disponible de las muestras originales, y se realizó la expresión de BRCA1 en estas 34 muestras usando dos genes adicionales *housekeeping*, *ribosomal* 18S (r18s) y RPLP0. Se encontró una correlación significativa entre los tres genes ( $p<0.001$ ). En la tabla 17 se muestran los resultados mediante PCR cuantitativa en tiempo real (*real time quantitative PCR*; RT-QPCR).

**Tabla 17. Real-time QPCR para BRCA1/  $\beta$ -actina vs BRCA1/  $\beta$ -actina y RPLP0**

Número	Ct 18S	Ct RPLP0	Ct - $\beta$ actin	BRCA1 RNA expresión	
				$2^{-\Delta\Delta Ct}$ BRCA1 vs $\beta$ -act/18S	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ BRCA1 vs $\beta$ -act/RPLP0
NM 2	21.37	33.22	30.79	40.79	13.50
NM 3	17.45	30.43	26.53	12.21	5.98
NM 4	21.15	32.49	31.93	59.30	16.45
NM 6	19.84	32.06	27.87	15.30	5.76
NM 7	19.81	31.39	31.80	77.44	23.34
NM 11	17.72	30.78	26.34	9.85	4.96
NM 12	16.44	28.81	24.60	8.06	3.19
NM 13	20.50	33.2	29.99	18.96	8.43
NM 14	18.21	29.96	28.52	13.41	4.29
NM 15	17.86	30.46	28.79	11.04	4.74
NM 16	19.55	33.11	30.45	20.11	12.04
NM 20	18.27	30.86	28.82	18.96	8.11
NM 33	18.12	31.09	27.94	9.06	4.42
NM 34	20.51	32.86	28.41	30.06	11.84
NM 36	18.53	31.46	27.42	5.41	2.60
NM 37	18.92	33.32	33.00	40.22	32.22
NM 38	19.00	31.82	27.51	23.83	11.04
NM 40	17.93	32.34	29.78	9.75	7.84
NM 41	19.23	32.36	28.80	22.39	11.55
NM 42	19.67	31.91	29.38	13.98	5.30
NM 43	17.00	30.22	26.72	8.69	4.63
NM 46	19.41	33.25	27.99	7.52	4.96
NM 47	19.18	32.08	27.70	3.01	1.43
NM 48	19.40	33.36	29.93	25.90	17.81
NM 49	19.33	31.14	28.48	9.55	3.12
NM 50	17.95	30.4	28.72	6.89	2.81
NM 52	18.28	31.31	27.24	15.56	7.75
NM 53	18.49	32.75	28.33	6.11	4.66
NM 64	16.98	30.27	25.52	10.27	5.60
NM 66	21.23	33.95	28.89	10.41	4.66
NM 67	18.13	31.26	26.69	13.18	6.80
NM 68	17.80	31.18	27.83	20.04	11.27
NM 69	19.63	32.22	28.59	42.22	18.06
NM 70	18.68	33.51	28.34	11.39	10.59

## 5.2.2 BRCA1 y características clínicas

Las características clínicas y del análisis inmunohistoquímico de las 41 pacientes en las que se realizaron los niveles de expresión de BRCA1 eran comparables con las características de la cohorte de 86 pacientes como podemos ver en la tabla 18.

**Tabla 18. Tabla de características de la cohorte entera, de las 41 pacientes con análisis de mRNA de BRCA1 y de las restantes 45 pacientes**

	<b>Cohorte entera (N=86) N (%)</b>	<b>Pacientes sin análisis de BRCA1 (N=45) N (%)</b>	<b>Pacientes con análisis deBRCA1 (N=41) N (%)</b>	<b>p</b>
<b>Edad, media (rango)</b>	54 (31-79)	56(34-74)	55 (31-79)	0.78
<b>Estado de Menopausia</b>				0.51
<b>Premenopausica</b>	36 (42%)	28(62.2)	22 (54%)	
<b>Posmenopausica</b>	50 (58%)	17(37.8)	19 (46%)	
<b>Tamaño tumoral (cm)</b>	6 (2.5-12)	6(2.50-12)	6.4 (2.5-12)	0.34
<b>Grado de diferenciación</b>				0.52
<b>Grado I</b>	8 (10.4)	5 (13.2)	3 (7.7)	
<b>Grado II</b>	34 (44.2)	18 (47.4)	16 (41)	
<b>Grado III</b>	35 (45.5)	15 (39.5)	20 (51.3)	
<b>Desconocido</b>	9	7	2	
<b>Estadío Clínico</b>				0.51
<b>II</b>	24 (28%)	14 (31.1)	10 (24%)	
<b>III</b>	62 (72%)	31 (68.9)	31 (76%)	
<b>Respuesta patológica</b>				0.63
<b>Respuesta (G5, G4, G3)</b>	49 (57%)	27 (60)	22 (53.7%)	
<b>No respuesta (G2, G1)</b>	37 (43%)	18(40)	19 (46.3%)	
<b>Cirugía</b>				0.54
<b>Mastectomía</b>	78 (91%)	39(86.6)	39 (95%)	
<b>Tumorectomía</b>	8 (9%)	6(13.3)	2 (5%)	

	<b>Cohorte entera (N=86) N (%)</b>	<b>Pacientes sin análisis de BRCA1 (N=45) N (%)</b>	<b>Pacientes con análisis deBRCA1 (N=41) N (%)</b>	<b>p</b>
<b>Estado ganglionar</b>				0.29
<b>Positivo</b>	69 (80%)	34(75.6)	35 (85%)	
<b>Negativo</b>	17 (20%)	11(24.4)	6 (15%)	
<b>Histología</b>				0.41
<b>Ductal Infiltrante</b>	79 (92%)	41(91.1)	38 (93%)	
<b>Lobular infiltrante</b>	5 (6%)	3(6.7)	2 (5%)	
<b>Otros: mucinoso, medular</b>	2 (2%)	1(2.2)	1 (2%)	
<b>RE</b>				0.38
<b>0-4%</b>	35(40.7)	16(35.6)	19(46.3)	
<b>5-100%</b>	51(59.3)	29(64.4)	22(53.7)	
<b>RP</b>				0.65
<b>0-4%</b>	59(68.6)	32(71.1)	27(65.9)	
<b>5-100%</b>	27(31.4)	13(28.9)	14(34.1)	
<b>Citokeratina 5/6*</b>				0.60
<b>Negativa</b>	66 (78.6)	35 (81.4)	31 (75.6)	
<b>Positiva</b>	18 (21.4)	8 (18.6)	10 (24.4)	
<b>HER2 por IHQ+CISH</b>				0.99
<b>Positivo</b>	17 (20.2)	9 (20.5)	8 (20)	
<b>Negativo</b>	67 (79.8)	35 (79.5)	32 (80)	
<b>Vimentina*</b>				0.56
<b>Negativo</b>	72 (84.7)	37 (82.2)	35 (87.5)	
<b>Positivo</b>	13 (15.3)	8 (17.8)	5 (12.5)	
<b>Subtipos*</b>				0.73
<b>Luminal A</b>	32 (40.5%)	18 (47.5%)	14 (34.1%)	
<b>Luminal B</b>	14 (17.7%)	5 (13.1)	9 (21.9%)	
<b>Triple negativa</b>	22 (27.8%)	10 (26.3)	12 (29.3%)	
<b>HER2 positiva</b>	11 (14%)	5 (13.1)	6 (14.7%)	
<b>BRCA1 (Media, rango)</b>	----	----	16.68 (2.93-187.40)	----

Las características de las pacientes en función de los niveles de BRCA1 clasificados en terciles, no presentaron diferencias como se aprecia en la Tabla 19.

**Tabla 19. Características en función de los niveles de mRNA de BRCA1**

	<b>BRCA1 bajo N (%)</b>	<b>BRCA1 Intermedio N (%)</b>	<b>BRCA1 alto N (%)</b>	<b>p</b>
<b>Edad, median (rango)</b>	59 (45-73)	51 (32-79)	54 (31-74)	0.25
<b>Estado de menopausia</b>				0.52
<b>Premenopausia</b>	5 (26.3)	8 (42.1)	6 (31.6)	
<b>Posmenopausia</b>	9 (40.9)	6 (27.3)	7 (31.8)	
<b>Tamaño tumoral (cm)</b>	6 (4-10)	7 (2.50-12)	6 (4-11)	0.60
<b>Grado de diferenciación</b>				0.56
<b>Grado I</b>	0	2 (14.3)	1 (8.3)	
<b>Grado II</b>	6 (46.2)	4 (28.6)	6 (50)	
<b>Grado III</b>	7 (53.8)	8 (57.1)	5 (41.7)	
<b>Estado ganglionar</b>				0.99
<b>Negativo</b>	2 (33.3)	2 (33.3)	2 (33.3)	
<b>Positivo</b>	12 (34.3)	12 (34.3)	11 (31.4)	
<b>Citokeratina 5/6</b>				0.10
<b>Negativo</b>	11 (35.5)	8 (25.8)	12 (38.7)	
<b>Positivo</b>	3 (30)	6 (60)	1 (10)	
<b>HER2 por IHQ+ CISH</b>				0.43
<b>Negativo</b>	11 (34.4)	10 (31.3)	11 (34.4)	
<b>Positivo</b>	3 (37.5)	4 (50)	1 (12.5)	
<b>RE</b>				0.79
<b>Negativo (0-4%)</b>	7 (36.8)	7 (36.8)	5 (26.3)	
<b>Positivo (5-100%)</b>	7 (31.8)	7 (31.8)	8 (36.4)	
<b>RP</b>				0.18
<b>Negativo (0-4%)</b>	10 (37)	11 (40.7)	6 (22.2)	
<b>Positivo (5-100%)</b>	4 (28.6)	3 (21.4)	7 (50)	
<b>Vimentina</b>				0.74
<b>Negativa</b>	13 (37.1)	12 (34.3)	10 (28.6)	
<b>Positiva</b>	1 (20)	2 (40)	2 (40)	
<b>Subtipo</b>				0.43
<b>Luminal A</b>	5 (38.5)	4 (30.8)	4 (30.8)	
<b>Luminal B</b>	2 (22.2)	3 (33.3)	4 (44.4)	
<b>Triple negativo</b>	4 (33.3)	5 (41.7)	3 (25)	
<b>HER-2 positivo</b>	3 (50)	2 (33.3)	1 (16.7)	

### 5.2.3 BRCA1 y subgrupos

Se analizó la relación de los niveles de mRNA de NRCA1 con los diferentes subgrupos de cáncer de mama previamente descritos. En la tabla 20 encontramos los valores medios de BRCA1 para cada subgrupo, sin que existieran diferencias significativas entre ellos.

**Tabla 20. Subgrupos y niveles de mRNA de BRCA1**

	<b>N</b>	<b>Medio</b>	<b>95% IC</b>	<b>P</b>
<b>Luminal A</b>	14	34.51	5.24-63.78	.53
<b>Luminal B</b>	9	43.09	6.18-80.01	
<b>Triple negativo</b>	12	22.35	9.92-34.77	
<b>HER2 positivo</b>	6	19.27	7.53-31.00	

### 5.2.4 BRCA1 y respuesta a la quimioterapia

Tan solo un paciente adquirió una respuesta patológica completa (en el tumor pero no en la axila); por ello es difícil correlacionar la respuesta con los niveles de mRNA de BRCA1. Considerando la clasificación de los pacientes en respondedores y no respondedores como se ha mencionado previamente, se correlacionaron con los niveles de mRNA de BRCA1. Cuando los pacientes eran divididos en terciles según los niveles de BRCA1, aquellos pertenecientes al tercil de niveles más bajos consiguieron un 47.6 de las respuestas patológicas, mientras los del tercil intermedio tan solo un 28.6%, mientras los del tercil más alto un 23.8%; las diferencias, sin embargo no fueron significativas. En la tabla 21 vemos la respuesta de las 41 pacientes respecto de la respuesta de la cohorte global.

**Tabla 21. Respuesta patológica para la cohorte de 86 pacientes y para las 41 con niveles de mRNA de BRCA1**

RESPUESTA	Cohorte Entera (N=86)			Pacientes con análisis de BRCA1 (N=41)		
	Local	Axila*	Local + Axila	Local	Axila <sup>+</sup>	Local + Axila
<b>CR G5</b>	5 (5.8%)	D	1 (1.2%)	1 (2.5%)	C	1 (2.4%)
<b>PR G4+G3</b>	44 (51.2%)	C	4 (4.7%)	21 (51.2%)	D	2 (4.9%)
		D	6 (6.9%)		C+B	16 (39.0%)
		C+B	32 (37.2%)		A	3 (7.3%)
		A	6 (6.9%)			
<b>NO RESPUESTA</b>						
<b>G1+G2</b>	37 (43%)	C+B	33 (38.4%)	19 (46.3%)	D	1 (2.4%)
		A	4 (4.7%)		C+B	18 (44%)

Valoración de respuesta patológica según los criterios de Miller y Payne. Respuesta en tumor: G5: ausencia de células infiltrantes tumorales residuales. G4: marcada desaparición de células tumorales invasivas, solo presencia de pequeños clusters de células dispersas se pueden detectar. G3: considerable reducción en las células tumorales. G2: cierta pérdida de células tumorales invasivas, pero celularidad global aún elevada. G1: no reducción en el número global respecto a la biopsia pretratamiento. Respuesta en axila: A: Ganglios linfáticos sin metástasis. B: ganglios linfáticos con células malignas. C: ganglios linfáticos aún positivos, pero con evidencia de cierta regresión. D: ganglios linfáticos previamente positivos, ahora sin metástasis.

\*A un total de 10 pacientes (11.6%) la linfadenectomía axilar fue negativa, pero la axila era clínicamente negativa previamente a la cirugía (6 respuestas y 4 pacientes sin respuesta). Respuesta axilar tipo A

<sup>+</sup>En un total de 3 pacientes (7.3%) la linfadenectomía axilar fue negativa, pero la axila era clínicamente negativa previamente a la cirugía (2 respuestas y una paciente sin respuesta). Respuesta axilar tipo A.

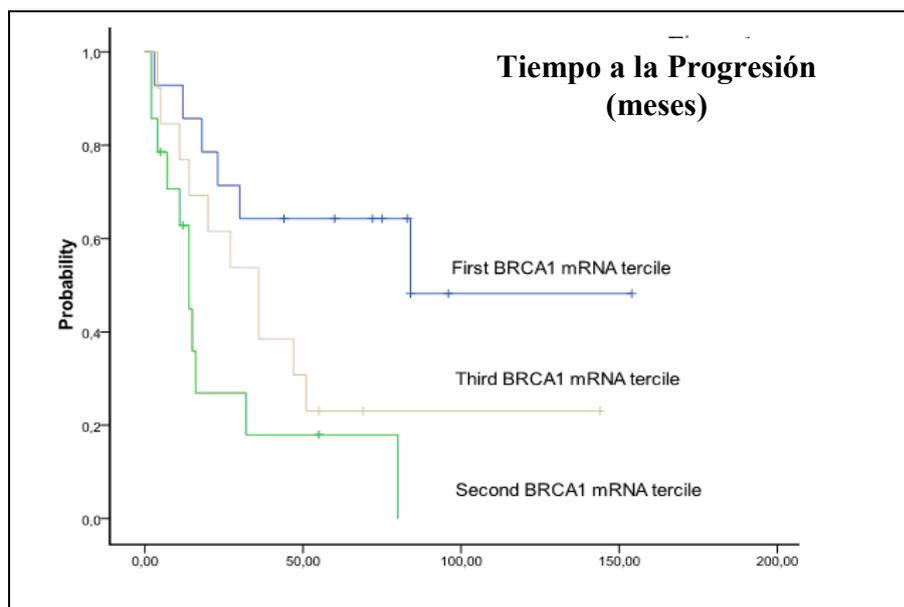
**Tabla 22. Respuesta patológica y niveles de mRNA de BRCA1 por terciles**

	<b>BRCA1 Bajo N (%)</b>	<b>BRCA1 Intermedio N (%)</b>	<b>BRCA1 Alto N (%)</b>	<b>p</b>
<b>Respuesta patológica</b>				0.32
<b>Respuesta (G5, G4, G3)</b>	10(47.6)	6(28.6)	6(23.8)	
<b>No respuesta (G2, G1)</b>	4(22.2)	8(38.9)	7(38.9)	

### 5.2.5 BRCA1 y tiempo a progresión y supervivencia

Los niveles bajos de mRNA de BRCA1 se asociaron con un mejor tiempo a la progresión (84 meses versus 14 y 36 meses; p=0.009) como vemos en la Figura 20.

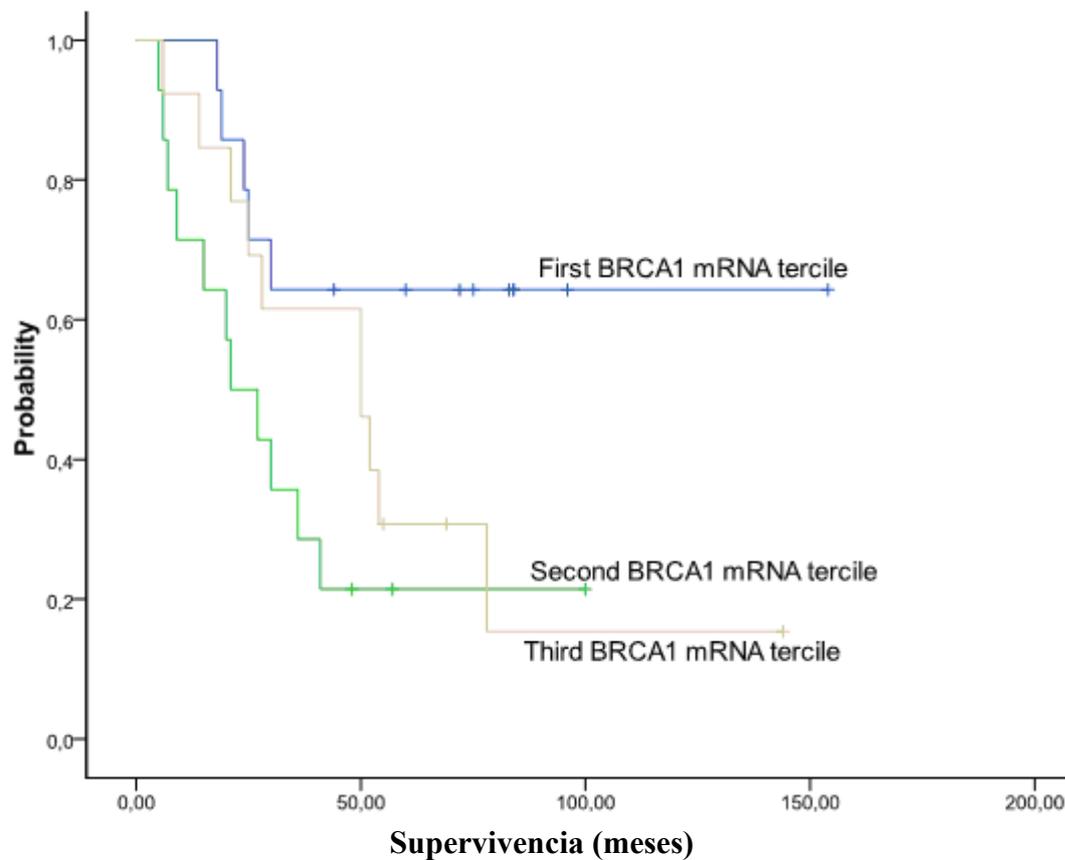
**Figura 20. Tiempo a progresión en función de niveles de BRCA1 por terciles**



<b>BRCA1 por terciles</b>	<b>N</b>	<b>Mediana (95% IC)</b>	<b>P</b>
<b>Tercil bajo</b>	14	84 (--)	0.009
<b>Tercil intermedio</b>	14	14 (9.31-18.69)	
<b>Tercil alto</b>	13	36 (17.66-54.34)	

La supervivencia media no fue alcanzada en los pacientes con niveles bajos de mRNA de BRCA1, mientras que fue de 21 meses para aquellas pacientes que presentaban niveles intermedios y de 50 para las que presentaban niveles altos ( $p=0.03$ ) como vemos en la Figura 21.

**Figura 21. Supervivencia en función de los niveles de BRCA1 por terciles.**



BRCA1 por terciles	N	Mediana (95% IC)	P
Niveles bajos	14	No Alcanzada	0.03
Niveles Intermedios	14	21 (8.17-33.83)	
Niveles Altos	13	50 (21.82-78.18)	

### **5.2.6 Análisis uni y multivariante para tiempo a la progresión y supervivencia en las 41 pacientes**

En el análisis univariante para tiempo a progresión y supervivencia para las 41 pacientes, los niveles bajos de mRNA de BRCA1 se asociaron a menor riesgo de recaída y a mayor supervivencia ( $p=0.004$  y  $p=0.01$ , respectivamente), y el estado ganglionar positivo se asoció a menor tiempo a progresión ( $p=0.005$ ) como se puede apreciar en la tabla 23.

En el análisis multivariante para tiempo a la progresión y supervivencia, los niveles bajos de mRNA de BRCA1, el RP positivo y la ausencia de afectación ganglionar predijo un menor riesgo de recidiva, mientras que los niveles bajos de mRNA de BRCA1 y los RP positivos fueron las únicas variables asociadas de forma significativa con una mejor supervivencia como podemos apreciar en la Tabla 24.

**Tabla 23. Análisis univariante para tiempo a la progresión y supervivencia par alas 86 pacientes y par alas 41 pacientes en las que se realizaron los niveles de mRNA de BRCA1**

**Tabla 23. Análisis univariante para tiempo a la progresión y supervivencia par alas 86 pacientes y par alas 41 pacientes en las que se realizaron los niveles de mRNA de BRCA1.**

	Todos los pacientes (N=86)					Pacientes con BRCA1 analizado (N=41)				
	N	Tiempo a progresión		Supervivencia		N	Tiempo a progresión		Supervivencia	
		HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P		HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	p
<b>BRCA1 por terciles</b>										
<b>Bajo</b>						14	1		1	
<b>Intermedio</b>	---	---	---	---	---	14	4.55 (1.61-12.85)	<b>0.004</b>	3.90 (1.34-11.38)	<b>0.01</b>
<b>Alto</b>						13	2.42 (0.87-6.76)	0.09	2.41 (0.82-7.09)	0.11
<b>RE</b>										
<b>Negativo</b>	35	2.25 (1.28-3.95)	<b>0.005</b>	2.51 (1.41-4.47)	<b>0.002</b>	19	1.57 (0.73-3.36)	0.25	1.70 (0.78-3.69)	0.18
<b>Positivo</b>	51	1		1		22	1		1	
<b>RP</b>										
<b>Negativo</b>	59	1.40 (0.76-2.58)	0.28	1.74 (0.90-3.36)	0.10	27	1.80 (0.77-4.19)	0.17	1.98 (0.83-4.74)	0.13
<b>Positivo</b>	27	1		1		14	1		1	
<b>HER2 por CISH</b>										
<b>Negativo</b>	67	1		1		32	1		1	
<b>Positivo</b>	17	1.38 (0.70-2.71)	0.35	1.53 (0.78-3.03)	0.22	8	1.57 (0.62-3.96)	0.34	1.63 (0.65-4.12)	0.30

Tabla 23. Continúa de página anterior

	Todos los pacientes (N=86)					Pacientes con BRCA1 analizado (N=41)				
	N	Tiempo a progresión		Supervivencia		N	Tiempo a progresión		Supervivencia	
		HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P		HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	p
<b>Estado ganglionar</b>										
<b>Negativo</b>	17	1	0.06	1	0.11	6	1	<b>0.05</b>	1	0.19
<b>Positivo</b>	69	2.25 (0.95-5.28)		2.03 (0.86-4.78)		35	7.52 (0.99-56.75)		2.61 (0.61-11.15)	
<b>Vimentina</b>										
<b>Negativo</b>	72	1.26 (0.54-2.97)	0.59	1.01 (0.45-2.23)	0.99	35	1.13 (0.34-3.77)	0.85	0.65 (0.22-1.88)	0.42
<b>Positivo</b>	13	1		1		5	1		1	
<b>Cytokeratina 5/6</b>										
<b>Negative</b>	66	1.06 (0.51-2.18)	0.88	0.83 (0.41-1.67)	0.59	31	1.28 (0.48-3.39)	0.62	0.90 (0.36-2.26)	0.83
<b>Positive</b>	18	1		1		10	1		1	
<b>Subtypes</b>										
<b>HER2+/ER-</b>	11	0.73 (0.30-1.79)	0.49	0.92 (0.38-2.26)	0.86	6	0.88 (0.26-2.95)	0.84	0.97 (0.30-3.18)	0.96
<b>Luminal A</b>	45	0.39 (0.20-0.75)	<b>0.005</b>	0.38 (0.19-0.74)	<b>0.005</b>	20	0.56 (0.23-1.38)	0.21	0.54 (0.22-1.34)	0.18
<b>Luminal B</b>	6	0.74 (0.25-2.21)	0.59	0.69 (0.23-2.06)	0.50	2	2.07 (0.43-10.05)	0.37	1.65 (0.35-7.82)	0.53
<b>Triple negativo</b>	22	1		1		12	1		1	
<b>Edad</b>	86	1.02 (0.99-1.04)	0.23	1.01 (0.99-1.04)	0.29	41	1.02 (0.99-1.05)	0.28	1.01 (0.98-1.05)	0.38

**Tabla 24. Análisis multivariante para tiempo a la progresión y supervivencia en las 41 pacientes con niveles de mRNA de BRCA1 analizado**

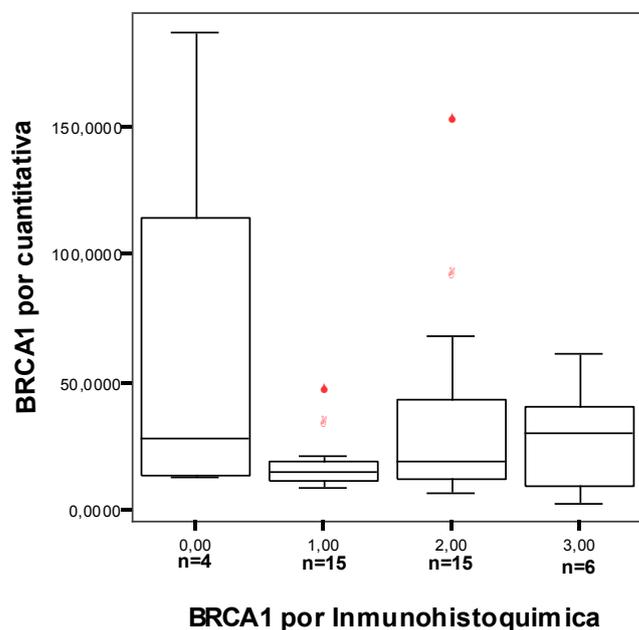
	N	Tiempo a Progresión		Supervivencia	
		HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
<b>BRCA1 por terciles</b>					
<b>Bajo</b>	14	1		1	
<b>Intermedio</b>	14	7.68 (2.41-24.55)	0.001	4.52 (1.51-13.46)	0.007
<b>Alto</b>	13	4.52 (1.50-13.63)	0.007	2.94 (0.99-8.71)	0.05
<b>RP</b>					
<b>Negativo</b>	27	4.15 (1.61-10.69)	0.003	2.43 (0.99-5.93)	0.05
<b>Positivo</b>	14	1		1	
<b>Estado Ganglionar</b>				-----	
<b>Negativo</b>	6	1			
<b>Positivo</b>	35	12.01 (1.51-95.16)	0.02		

### 5.2.7 Correlación de BRCA1 por inmunohistoquímica (valores 0,1,2,3) con BRCA1 por cuantitativa.

La prueba de Kruskal-Wallis ( $p=0.522$ ) nos informa a cerca de que los valores de mediana de BRCA1 por cuantitativa son similares en los cuatro valores de BRCA1 por inmunohistoquímica así como agrupándolos en pos/neg ( $p=0.45$ ) aunque vemos que 0+1 es más frecuente en valores por debajo de la mediana de BRCA1 y 2+3 en valores por encima de la mediana, aunque la correlación no es significativa ( $p=0.21$ )

No existió, por tanto, correlación entre la determinación de BRCA1 por inmunohistoquímica y los niveles de mRNA de BRCA1 como observamos en la figura 22 y la tabla 25.

**Figura 22. Correlación de BRCA1 por inmunohistoquímica (valores 0, 1, 2, 3) con BRCA1 por cuantitativa.**



**Tabla 25. Tabla de comparación de BRCA1 por inmunohistoquímica y niveles de mRNA**

	BRCA1 Inmunohistoquímica					BRCA1 Inmuno Pos/Neg		
	0	1	2	3	P	0+1	2+3	P
<b>Median valores BRCA1 cuantitativa</b>	28.37	15.24	19.43	30.32	0.52	15.24	20.39	0.45
<b>BRCA1 bajo mediana</b>	2(10)	10(50)	6(30)	2(10)	0.40	12(60)	8(40)	0.21
<b>BRCA1 sobre mediana</b>	2(10)	5(25)	9(45)	4(20)		7(35)	13(65)	
<b>BRCA1 terciles</b>					0.30			0.12
<b>T1</b>	1(7)	5(36)	5(36)	3(21)		6(43)	8(57)	
<b>T2</b>	1(7)	7(50)	4(29)	2(14)		8(57)	6(43)	
<b>T3</b>	2(15)	2(15)	7(55)	2(15)		4(31)	9(69)	

## 6 DISCUSION

En definitiva, se trata de una serie de 86 pacientes en su mayoría postmenopáusicas, diagnosticadas de neoplasia de mama, con tumores predominantemente en estadio III, más frecuentemente hormonosensibles, tratadas de forma neoadyuvante con quimioterapia basada en antraciclinas.

**Objetivo 1: Definir las características clínicas de la serie, el tiempo a la progresión y la supervivencia. Correlación de los resultados con RE, RP, HER2, Vimentina, CK 5/6.**

Al analizar los datos de respuesta, debemos considerar que las pacientes de nuestra serie fueron tratadas con un esquema de quimioterapia basado en tan solo cuatro ciclos de antraciclinas previamente a la cirugía, lo que consistía la práctica de rutina en el periodo de tiempo en el que el estudio se realizó, previamente a la introducción de los taxanos en el tratamiento primario del cáncer de mama; este hecho podría explicar el relativamente bajo rango de respuestas completas patológicas (1.2%) y de cirugía conservadora (8%). Los esquemas actuales de quimioterapia neoadyuvante, consistentes en seis a ocho ciclos de quimioterapia secuencial con antraciclinas y taxanos, consiguen aumentar los rangos de respuesta completa patológica (20-30%) y cirugía conservadora (61-67%)<sup>152,153</sup>, con resultados superiores a los alcanzados en nuestra serie de pacientes. También es importante añadir que se trata de una serie en la que predominaban los casos localmente avanzados irresecales, constituyendo los estadios III un 72% de los casos y siendo el tamaño tumoral medio al diagnóstico de 6 cm, lo que explica los resultados previamente mencionados.

Por otra parte, la serie fue tratada en un período de tiempo en el que el tratamiento quimioterápico neoadyuvante en el cáncer de mama era más homogéneo

que en el momento actual; así, el 20% de las pacientes que presentaban amplificación de HER-2 no recibieron tratamiento antiHER-2 lo que constituye la práctica habitual en el momento actual, este hecho, sin duda empeora los resultados de respuesta. Por otra parte, casi un 60% de pacientes presentaban hormonosensibilidad (RE positivo), sabemos que este es un factor predictivo de menor respuesta a la quimioterapia, y que en este subtipo de pacientes raramente encontramos remisiones completas patológicas tras tratamiento neoadyuvante. Recientemente se han reportado resultados que apoyan la combinación de quimioterapia con antraciclinas y taxanos y agentes antiangiogénicos consiguiendo mayor rango de respuestas patológicas y de remisiones completas patológicas, en especial en pacientes triple negativas, en uno de los dos estudios publicados<sup>154,155</sup>.

Pese a tratarse de una serie con predominio de estadios III, el tiempo a la progresión fue de 42 meses y la supervivencia de 55 meses. Este hecho podría estar en relación con el predominio de pacientes hormonosensibles, que tras la quimioterapia y la cirugía, realizaron tratamiento hormonal adyuvante con Tamoxifeno durante 5 años; datos recientes demuestran que cinco años de Tamoxifeno reducen el riesgo de recidiva y mortalidad durante 15 años<sup>83</sup>. En la serie presentada, en el análisis multivariante, el estado ganglionar positivo tras la cirugía, y los RE negativos se asociaron significativamente a un mayor riesgo de muerte.

En cuanto al análisis inmunohistoquímico, la negatividad de los RE y RP fue un fuerte marcador predictivo de respuesta a la quimioterapia. El estado del RE es el factor predictivo más frecuentemente observado en la literatura. Diversos estudios con diferentes agentes quimioterápicos, muestran un mayor índice de remisión completa patológica en tumores RE negativo respecto a RE positivo. El estado del RP también se ha relacionado con la respuesta a la quimioterapia<sup>152,153</sup>.

Por otra parte, en el análisis multivariante incluyendo las 86 pacientes, los RE se erigieron como el más potente predictor de TTP y SG. El valor pronóstico de los RE como ya se ha mencionado en la introducción se ha evidenciado en diferentes series de pacientes<sup>36</sup>, sin embargo, estudios con más seguimiento consideran que se trata de una variable dependiente del tiempo, y con mayor tiempo de seguimiento, las diferencias en el rango de recidivas y mortalidad disminuyen e incluso desaparecen, sugiriendo que los RE podrían ser un marcador de rango de crecimiento más lento más que de un potencial intrínseco metastásico<sup>37</sup>. Nuestra serie presentaba un seguimiento medio de 9 años, lo que refuerza el concepto del valor pronóstico de los RE.

Las citokeratinas son filamentos intermedios que se encuentran en las células de la lámina basal de los ductos mamarios normales. La expresión de citokeratinas basales como la 5 y la 6 se han asociado con el cáncer de mama tipo basal<sup>156</sup>. Las citokeratinas 5/6 fueron positivas en 18 tumores (21%), de los cuales (como veremos más adelante en el análisis por subgrupos), 11 eran triples negativos (61.1%), 4 HER2 positivos (22.2%), 2 luminal A (11.1%) y 1 luminal B (5.6%). En nuestro estudio, la expresión de citokeratinas 5/6 estuvo fuertemente asociada con el subgrupo de tumores con RE y HER2 negativos, como ya se ha reportado en estudios previos.

La expresión de Vimentina es un hallazgo poco frecuente en cáncer de mama invasivo, y se asocia a alta invasividad tumoral. En nuestra serie la expresión de Vimentina fue positiva en 13 casos (15%) de los cuales 10 fueron triple negativos (77%), 2 HER2 positivos (15.3%) y 1 luminal B (7.7%), resultados similares a los reportados por otros grupos<sup>157</sup>. Es de destacar, que no se encontró expresión de Vimentina en caso de tumores luminal A. En nuestra experiencia la expresión de Vimentina se asoció también a una mejor respuesta patológica, un 84.6% de los pacientes con Vimentina positiva presentaron respuesta a la quimioterapia frente a un 51.4% de los pacientes con Vimentina negativa; hecho descrito previamente en estudios

in vitro<sup>158</sup>. Sin embargo, la expresión de este marcador no se asoció a un peor tiempo a la progresión ni a una peor supervivencia, probablemente en relación al escaso número de pacientes de la serie.

## **Objetivo 2: Evaluación de Ki67 y su posible valor pronóstico y predictivo de la respuesta a la quimioterapia.**

Ki67 fue identificado en 1991 como una proteína nuclear no histona. Su ausencia en células quiescentes y su expresión en tejidos en proliferación, planteó su papel como marcador de proliferación. Diferentes estudios han corroborado este hecho. Ki67 es un antígeno nuclear expresado con diferente intensidad a través del ciclo celular, se expresa en fase de proliferación (G1, S, G2 y M), pero no durante durante la fase G0. Así, existen diferencias en su expresión a lo largo del ciclo celular, que reflejan una variabilidad en su síntesis de novo.

En general, el resultado depende del porcentaje de células que detecta el anticuerpo, aunque esta metodología tiene limitaciones, como son su baja reproducibilidad, y la falta de homogeneidad en los diferentes estudios para considerar un punto de corte que determine su valor pronóstico; así como la dificultad de su estandarización.

En nuestro estudio, se realizó la determinación inmunohistoquímica de Ki67% considerándose positivo a partir de 14% según resultados previamente reportados<sup>148</sup>. Ki67 se pudo determinar en 76 de los 86 casos (88.4%), resultando positivo en 22 casos (29%) y negativo en 54 (71%). La positividad de ki67 se asoció a la positividad de Vimentina como se había reportado en algunas experiencias previas<sup>159,160</sup>, lo que podría justificarse por el hecho de que un marcador de proliferación como Ki67 fuera más

frecuente en caso de expresión de un marcador como vimentina asociado a alta invasividad tumoral. La positividad de Ki67 también se asoció a la de CK 5/6.

La expresión de ki67 no se correlacionó con la respuesta a la quimioterapia. El valor predictivo de Ki67 es controvertido, diferentes estudios con quimioterapia neoadyuvante<sup>119,120,161,162</sup> y/ o han encontrado que elevados valores de Ki67 se han correlacionado con mejor respuesta a la quimioterapia, pero otros no han encontrado esta asociación<sup>117,118,163</sup>.

En cuanto al tiempo a la progresión y la supervivencia, fueron inferiores en caso de Ki67 positivo (27 versus 54 meses para tiempo a la progresión, 50 versus 81 meses para supervivencia), de forma similar a un metanálisis recientemente publicado<sup>49</sup>, pero las diferencias no fueron significativas en nuestra serie, probablemente debido al pequeño número de pacientes. Dos metanálisis recientes han reportado asociación significativa entre la alta expresión de Ki67 y un incremento del riesgo de recaída y muerte<sup>49,50</sup>.

### **Objetivo 3: Análisis de Ki 67 y definición de los diferentes subgrupos de cáncer de mama a partir del valor de RE, RP, HER-2 i Ki67.**

De forma similar al trabajo de Cheang<sup>143</sup>, las pacientes fueron subdivididas en subgrupos de acuerdo con la determinación inmunohistoquímica de los RE, RP, HER-2 y Ki67. Según esta clasificación, 32 pacientes (40.5%) fueron clasificados como luminal A, 14 pacientes (17.7%) como luminal B, 22 (27.8%) como triple negativo y 11 (14%) como HER-2 positivo; frecuencias similares a las descritas en otras series. También de forma similar a otros trabajos reportados, los tumores triple negativos y HER-2 positivos fueron los más indiferenciados, es decir presentaron con más frecuencia de forma significativa grado de diferenciación III de la clasificación de

Bloom Richardson. Por otra parte los tumores triple negativos se asociaron de forma significativa a expresión de vimentina, hecho éste asociado a una mayor invasividad tumoral, mientras que en los tumores luminal A, asociados a un mejor pronóstico, la expresión de vimentina fue negativa en todos ellos. Los tumores triple negativos presentaron también de forma significativa una mayor expresión de CK5/6. La mayor expresión de vimentina y CK 5/6 en los tumores triple negativos probablemente se encuentre en relación con la alta expresión de genes del cluster llamado cluster basal, que incluye Citokeratinas epiteliales, como la CK5/6, 14, y 17, EGFR, c-Kit, vimentina, p-caherina, fascina, caveolinas 1 y 2, y  $\alpha\beta$ cristalina, que se ha asociado a los tumores de tipo basal<sup>56</sup>.

En cuanto a la respuesta patológica, no existieron diferencias significativas en la respuesta patológica entre los diferentes subgrupos; aunque de forma similar a series previamente reportadas el porcentaje de pacientes respondedoras fue superior en los grupos triple negativo y HER-2 positivo (72.7% de respondedores en los tumores triple negativo y HER-2 positivo frente a 42.9% en los luminales B y 46.9% en los luminales A).

Coincidiendo con los resultados reportados por Sorlie y colaboradores<sup>55</sup>; en nuestra serie, los pacientes con tumores luminal A alcanzaron mayor tiempo a progresión y supervivencia de forma estadísticamente significativa, este hecho podría encontrarse en relación al tratamiento hormonal complementario con Tamoxifeno durante cinco años, que recibieron las pacientes con RE positivo incluidas en la serie, entre las que se encuentran las pacientes luminal A. El resto de subgrupos, entre las que se encuentran las pacientes luminal B, presentaron peor tiempo a la progresión y peor supervivencia; lo que apoya la caracterización mediante técnicas de inmunohistoquímica del subgrupo luminal B como un grupo de peor pronóstico, y por

tanto probablemente tributario de tratamiento sistémico adicional. En el trabajo se incluyeron como luminal B las paciente con tumores RE positivos con HER-2 positivo (tal y como sugerían los perfiles de expresión génica), pero también aquellos tumores con RE positivos y un índice de proliferación medido mediante  $Ki67 \geq 14\%$ ,

#### **Objetivo 4: Analizar la expresión inmunohistoquímica de HIP1 en tejido tumoral.**

Diferentes trabajos han hipotetizado que la expresión de HIP1 podría ser necesaria para la tumorigénesis mamaria, hipotetizando que su inhibición podría conducir a una inhibición de la progresión tumoral. En nuestra experiencia, HIP1 se encuentra sobreexpresada en cáncer de mama, la expresión de HIP1 por inmunohistoquímica se presentó en 32 de los 86 pacientes (38.5%).

HIP1, que interactúa con las proteínas de unión a actina, es considerada el primer componente de la maquinaria de endocitosis, jugando un papel fundamental en el tráfico de clathrina. En los últimos años, alteraciones de la regulación de la endocitosis, se han asociado con tumores. La modificación de las vías de endocitosis debido a la alteración de HIP1, podría por tanto afectar a diferentes procesos en la progresión a cáncer, así como en la respuesta a la quimioterapia de la enfermedad.

HIP1 no se correlacionó con ninguna del resto de características de la serie, ni se asoció a ninguno de los subgrupos.

En nuestra serie, la expresión por inmunohistoquímica de HIP1 se correlacionó con la respuesta patológica a la quimioterapia, lo que sugiere un papel de HIP1 como factor predictivo de la respuesta a la quimioterapia que debería confirmarse en estudios prospectivos.

Sin embargo, HIP1 no se asoció de forma significativa con el TTP y la SG, sin embargo, las pacientes con tumores con expresión de HIP1 presentaron una tendencia a

una peor supervivencia, como también se ha reportado en tumores de próstata, donde la expresión de HIP1 se relacionó con un peor pronóstico tras la cirugía<sup>139</sup>. Todos estos datos sugieren que la expresión de HIP1 contribuye a la tumorigénesis debido a la ventaja que proporciona en el crecimiento celular, siendo necesarios futuros estudios que evalúen su valor pronóstico.

### **Objetivo 5: Análisis de los niveles de mRNA de BRCA1**

Los niveles de mRNA de BRCA1 fueron determinados en las 41 pacientes de las que se disponía de tejido suficiente para el análisis. En el análisis multivariante de estas 41 pacientes, el nivel de expresión de mRNA de BRCA1 fue el más potente factor predictivo de supervivencia. BRCA1 juega un papel crucial en la reparación del DNA y los niveles bajos de mRNA de BRCA1 se han observado en cáncer de mama tanto hereditario como esporádico. Pese a la ausencia de mutaciones de BRCA1 en el cáncer de mama esporádico, los niveles de mRNA de BRCA1 pueden estar reducidos. Esta reducción de los niveles de mRNA de BRCA1 en los casos de cáncer de mama esporádico se ha relacionado con la metilación adquirida de la región promotora de BRCA1<sup>164</sup> y anomalías en las vías que regulan la expresión de BRCA1<sup>136</sup>.

BRCA1 codifica una proteína del ciclo celular nuclear expresada en fases S y G2, lo que podría explicar el hecho de que la sobreexpresión de BRCA1 ha sido asociada con menor supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón de no célula pequeña que no habían recibido quimioterapia<sup>165</sup>. En el cáncer de mama esporádico, la expresión de BRCA1 ausente o reducida se asoció con alto grado tumoral, estadio avanzado con afectación de los ganglios linfáticos, mayor tamaño tumoral, invasión vascular, receptores de estrógenos negativos, receptores de progesterona negativos y malos resultados terapéuticos<sup>166</sup>. BRCA1 juega un papel multifuncional y se ha

implicado en muchas funciones celulares normales, incluyendo la respuesta del daño en el ADN, la regulación transcripcional, el control de puntos clave del ciclo celular, y la ubiquitinación. En consecuencia, la presencia o ausencia de la función de BRCA1 podría tener un efecto significativo en la respuesta celular a la quimioterapia y también podría tener un valor predictivo, sobre todo en los pacientes tratados con agentes que dañan el ADN, como fue el caso en el presente estudio.

Datos preclínicos sugieren que el gen BRCA1 pueden regular la sensibilidad diferencial a los agentes quimioterapéuticos, la ausencia de la función de BRCA1 resultaría en una mayor sensibilidad a agentes quimioterápicos que producen daño del ADN, mientras que la presencia de los genes BRCA1 funcionantes aumentaría la sensibilidad a agentes antimicrotubulares. En líneas celulares de cáncer de mama humano, ya se reportó inicialmente que la sobreexpresión de BRCA1 daba lugar a una mayor resistencia a la quimioterapia que daña el ADN<sup>167,168,169</sup>. En células HCC1937, la restauración de la función de los genes BRCA1, suprimió la sensibilidad a la apoptosis en presencia de los agentes que dañan el ADN, como el cisplatino y etopósido, mientras que indujo la sensibilidad a agentes antimicrotúbulos como el paclitaxel y la vinorelbina, lo que sugiere que BRCA1 actúa como un modulador diferencial de la apoptosis en función de la naturaleza del insulto celular<sup>170</sup>. En una publicación reciente, la sobreexpresión de los genes BRCA1 y otros (p53, p21, GST, MDR1 y TOPOII  $\alpha$ ) se han asociado con la resistencia adquirida a la doxorubicina en líneas celulares de cáncer de mama<sup>171</sup>.

Un efecto de modulación diferencial de la expresión de mRNA de BRCA1 también se observó en células tumorales aisladas de derrames malignos de cáncer de pulmón no microcítico y pacientes con cáncer gástrico, cuyos niveles de mRNA de BRCA1 se correlacionaron negativamente con la sensibilidad de cisplatino y

positivamente con la sensibilidad al docetaxel<sup>172</sup>. Además, varios ensayos clínicos han demostrado una mejor respuesta clínica al tratamiento con antraciclinas en combinación con ciclofosfamida en pacientes con cáncer de mama portadoras de la mutación BRCA1 que en pacientes con cáncer de mama esporádicos<sup>173</sup>. La regulación positiva de genes de reparación del ADN se ha relacionado con la resistencia a la radioterapia, y las pacientes portadoras de mutaciones de BRCA1 son más sensibles a la radioterapia<sup>174</sup>.

En casos de cáncer de mama esporádico, hay pruebas contradictorias a cerca de si los tumores con la inactivación epigenética de los genes BRCA1 también podrían obtener un mayor beneficio a partir de agentes quimioterápicos que producen daño en el DNA. En un estudio de 51 pacientes con cáncer de mama esporádicos, aquellos con altos niveles de BRCA1 alcanzaron una mejor respuesta a la quimioterapia basada en antraciclinas, a pesar de que la supervivencia global no fue examinada<sup>174</sup>. Este resultado contrasta con los resultados de los modelos in vitro, los resultados con pacientes con mutaciones de BRCA1, y los resultados de nuestra experiencia.

En una cohorte retrospectiva de 70 pacientes con cáncer de ovario epitelial esporádico tratados con quimioterapia basada en platino, aquellos con bajos niveles de expresión de mRNA de BRCA1 tuvieron una supervivencia significativamente mejor en comparación con aquellos con altos niveles<sup>175</sup>. Además, los niveles de expresión de mRNA de BRCA1 predijeron los resultados después de quimioterapia basada en cisplatino en pacientes afectados de cáncer de pulmón de no célula pequeña<sup>144</sup>. En la misma línea, en un estudio retrospectivo de pacientes con cáncer de vejiga localmente avanzado tratados con quimioterapia basada en cisplatino, aquellos con niveles bajos o intermedios de mRNA de BRCA1 alcanzaron una respuesta significativamente mejor, la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global también fueron mejores que en aquellos con niveles altos<sup>176</sup>.

En una serie reciente de 102 pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña, los altos niveles de mRNA de BRCA1 se asociaron con una mejor respuesta y un menor riesgo de progresión a un esquema de quimioterapia basado en gemcitabina y docetaxel<sup>177</sup>. Nuestros resultados son consistentes con la evidencia clínica y otros estudios clínicos en cáncer de mama. En un estudio comparativo de portadoras de mutaciones de la línea germinal de BRCA1 y no portadores, las tasas de respuesta al tratamiento neoadyuvante con docetaxel era limitada en el grupo de portadoras, mientras que las no portadoras alcanzaron un alto número de respuestas parciales o completas<sup>178</sup>. Todos estos datos sugieren que el gen BRCA1 tiene un papel importante en la respuesta celular a la quimioterapia, no sólo a los agentes que dañan el ADN, sino también para antimicrotubulos. De hecho, en un reciente estudio en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico, en el que los pacientes con niveles bajos de mRNA de BRCA1 fueron tratados con cisplatino y gemcitabina, los pacientes con niveles intermedios fueron tratados con cisplatino y docetaxel, y los pacientes con niveles altos fueron tratados con docetaxel solo; esta quimioterapia personalizada en función de los niveles de mRNA de BRCA1, se correlacionó con una excelente supervivencia a 2 años para los pacientes con carcinoma de pulmón<sup>179</sup>. En la misma línea, en una reciente publicación se analizaron los niveles de mRNA de BRCA1 en 133 pacientes con cáncer gástrico avanzado; entre los 59 pacientes que recibieron segunda línea de tratamiento con docetaxel, la supervivencia fue de forma estadísticamente significativa superior para aquellos pacientes con altos niveles de expresión de BRCA1 respecto a los que tenían niveles intermedios o bajos<sup>180</sup>.

Nuestro trabajo, ofrece la experiencia clínica de 41 pacientes sobre el papel que los niveles de mRNA de BRCA1 postratamiento como un potencial marcador de TTP y OS en pacientes afectas de cáncer de mama esporádico tratadas con antraciclinas.

Aunque nuestros resultados deben interpretarse con cautela debido al pequeño número de pacientes y la naturaleza retrospectiva del estudio, merecen proseguir su estudio en ensayos clínicos prospectivos, incluida la evaluación pre-tratamiento de BRCA1. Nuestros datos sugieren que los pacientes de cáncer de mama esporádico con bajos niveles de expresión del mRNA de BRCA1 pueden obtener el mayor beneficio de la terapia basada en antraciclinas.

## 7 CONCLUSIONES

En definitiva, el cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, su mejor tipificación en base a marcadores que puedan generalizarse, nos permitiría perfilar de forma más ajustada el pronóstico de las pacientes. De la misma forma, el conocimiento de factores predictivos nos permite identificar el tratamiento más idóneo para cada caso. Las conclusiones de este trabajo se resumen a continuación:

1. En nuestra serie de 86 pacientes tratadas de forma neoadyuvante con antraciclinas, los factores predictivos de respuesta fueron RE, RP como ya se ha descrito en otras series. Por otra parte, la Vimentina, únicamente sobreexpresada en un 15% de pacientes, también se asoció a una mayor quimiosensibilidad.

En cuanto a los factores predictores de un mejor tiempo a la progresión y supervivencia, en el análisis multivariante de las 86 pacientes, el estado positivo de los RE, y la ausencia de afectación ganglionar fueron los factores significativamente asociados a mayor tiempo a la progresión y supervivencia.

2. La positividad de Ki67 por inmunohistoquímica tras quimioterapia, se asoció a una tendencia, aunque no estadísticamente significativa, a un menor tiempo a la progresión y una mayor supervivencia.
3. El análisis de ki67, junto con los RE, RP, y HER-2, permitió la caracterización inmunohistoquímica de los subgrupos luminal A, luminal B, triple negativo y HER-2 positivo; siendo el subgrupo de pacientes luminal A, el asociado a un mejor pronóstico, como ya se ha reportado en series previas. Este hecho, apoya la caracterización inmunohistoquímica de los subgrupos como herramienta en la práctica de rutina.

4. HIP1, implicado en la endocitosis, se asoció a una mayor respuesta, aunque este marcador requiere de mayor validación en estudios retrospectivos y prospectivos. Por otra parte, las pacientes con tumores con expresión de HIP1 presentaron una tendencia a una peor supervivencia, como también se ha reportado en tumores de próstata.
  
5. Al evaluar las 41 pacientes en las que fue posible el análisis de los niveles de mRNA de BRCA1, en el análisis multivariante los bajos niveles de BRCA1, el RP positivo y la ausencia de afectación ganglionar se asociaron a un mayor tiempo a la progresión. En cuanto a la supervivencia, los niveles bajos de BRCA1 de forma muy significativa, y el RP positivo en el límite de la significación, se asociaron a una mayor supervivencia. En definitiva, nosotros aportamos la evidencia en 41 pacientes del papel de los niveles de mRNA de BRCA1 tras quimioterapia, como marcador de tiempo a la progresión y supervivencia en cáncer de mama esporádico tratado con antraciclinas. Nuestros datos sugieren que los pacientes de cáncer de mama esporádico con bajos niveles de expresión del mRNA de BRCA1 pueden obtener el mayor beneficio de la terapia basada en antraciclinas. Estos datos deben tomarse con cautela por el pequeño número de pacientes pero aseguran el futuro análisis prospectivo de este factor.

## 8 BIBLIOGRAFÍA

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55: 74-108.
2. Kerlikowske K, Miglioretti DL, Buist DS et al. Declines in invasive breast cancer and use of postmenopausal hormone therapy in a screening mammography population. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 1335–1339.
3. Katalinic A, Rawal R. Decline in breast cancer incidence after decrease in utilization of hormone replacement therapy. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 107:427–430.
4. Pollán M, Pastor-Barriuso R, Ardanaz E et al. Recent changes in breast cancer incidence In Spain, 1980–2004. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: 1584–1591.
5. Martinez-Alonso M, VilaprinYO E, Marcos-Gragera R, Rue M. Breast cancer incidence and overdiagnosis in Catalonia (Spain). *Breast Cancer Research* 2010;12(4):R58. 10.1186/bcr2620.
6. Jemal A, Tiwani RC, Murray T, et al. Cancer statics, 2004. *CA cancer J Clin* 2004, 54:8.
7. Whittemore AS. Risk of breast cancer in carriers of BRCA gene mutations. *N Engl J Med* 1997; 337:788.
8. Fackenthal J, Marsh D, Richardson A, et al. Male breast cancer in owden syndrome patients with germline PTEN mutations. *J Med Gent* 2001; 38: 159.
9. King MC, Marks JH, Mandell JB. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* 2003; 302: 643.
10. EkboM A, Hsieh CC, Lipworth L, et al. Intrauterine environment and breast cancer risk in women: a population-based study. *J Natl cancer Inst* 1997; 89:71

11. Ewertz M, Duffy SW, Adami HO, et al. Age at first birth, parity and risk of breast cancer: a meta-analysis of 8 studies from the Nordic countries. *Int J Cancer* 1990; 46: 597.
12. Design of Women's Health Initiative clinical trial and observational study. The Women's Health Initiative Study Group. *Control Clin Trials* 1998; 19: 61.
13. Hunter DJ, Spiegelman D, Adami HO, et al. Cohort studies of fat intake and the risk of breast cancer-a pooled analysis. *N Eng J Med* 1996; 334: 356.
14. Singletary KW, Gapstur SM. Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms. *JAMA* 2001; 286; 21: 43.
15. Morimoto LM, White E, Chen Z, et al. Obesity, body size, and risk of postmenopausal breast cancer: The Women's Health Initiative (United States). *Cancer Causes Control* 2002; 13: 741.
16. Thune I, Furberg AS. Physical activity and cancer risk: dose-response and cancer, all sites and site-specific. *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33:S530
17. Bhatia S, Yasui Y, Robison LL, et al. High risk of subsequent neoplasms continued with extended follow-up of childhood Hodgkin's disease: report from Late Effects Study Group. *J Clin Oncol* 2003; 21: 4386.
18. Byrne C, Schairer C, Wolfe J, et al. Mammographic features and breast cancer risk: effects with time, age and menopause status. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1622.
19. De Vita V, Hellmann S, Rosenberg SA. *Cancer Principles & Practice of Oncology*. Lippincott Williams & Wilkins

20. Devilee P, Fattaneh A, Tavassoli (2003). World Health Organization: Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Oxford [Oxfordshire]: Oxford University Press. ISBN 92-832-2412-4.
21. Breast. In: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al., eds.: AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010, pp 347-76.
22. Fisher B, Bauer M, Wickerham DL et al. Relation of the number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer* 1983; 52: 1551–1557)
23. Millis RR, Springall R, Lee AH, et al: Occult axillary lymph node metastases are of no prognostic significance in breast cancer. *Br J Cancer* 86:396–401, 2002.
24. Fant JS, Grant MD, Knox SM, et al: Preliminary outcome analysis in patients with breast cancer and a positive sentinel lymph node who declined axillary dissection. *Ann Surg Oncol* 10:126–130, 2003.
25. Gobardhan PD, Elias SG, Madsen EV, et al: Prognostic value of micrometastases in sentinel lymph nodes of patients with breast carcinoma: A cohort study. *Ann Oncol* 20:41–48, 2009.
26. Herbert GS, Sohn VY, Brown TA: The impact of nodal isolated tumor cells on survival of breast cancer patients. *Am J Surg* 193:571–574, 2007.
27. Hwang RF, Gonzalez-Angulo AM, Yi M, et al: Low locoregional failure rates in selected breast cancer patients with tumor-positive sentinel lymph nodes who do not undergo completion axillary dissection. *Cancer* 110:723–730, 2007.
28. Nagashima T, Sakakibara M, Nakano S, et al: Sentinel node micrometastasis and distant failure in breast cancer patients. *Breast Cancer* 13:186–191, 2006.

29. Braun S, Cevatli BS, Assemi C et al. Comparative Analysis of Micrometastasis to the Bone Marrow and Lymph Nodes of Node-Negative Breast Cancer Patients Receiving No Adjuvant Therapy. *J Clin Oncol* 2001;19(5):1468-1475.
30. Rosen PP, Groshen S, Kinne DW et al. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol* 1993; 11: 2090-2100.
31. Emer O, Hanrahan, Ana M, Gonzalez-Angulo, Sharon H, Giordano, et al: Overall Survival and Cause-Specific Mortality of Patients With Stage T1a,bN0M0 Breast Carcinoma. *J Clin Oncol* 2007; 35 (31): 4952-4960
32. Gonzalez-Angulo AM, Litton JK, Broglio KR et al. High Risk of Recurrence for Patients With Breast Cancer Who Have Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive, Node-Negative Tumors 1 cm or Smaller. *J Clin Oncol* 2009; 27(34): 5700-5706
33. Curigliano G, Viale G, Bagnardi V et al. Clinical Relevance of *HER2* Overexpression/Amplification in Patients With Small Tumor Size and Node-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(34):5693-5699
34. Mohammed RA, Martín SG, Gill MS et al. Improved methods of detection of lymphovascular invasion demonstrate that it is the predominant method of vascular invasion in breast cancer and has important clinical consequences. *Ann Surg Pathol* 2007; 31: 1825-1833.
35. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for

- Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2010; 26(16): 2784-2795.
36. Fisher B, Redmond C, Fisher ER et al. Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node-negative breast cancer patients. Findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. *J Clin Oncol* 1988; 6: 1076-1087
37. Hilsenberck SG, Ravdin PM, de Moor CA, et al. Time-dependence of hazard ratios for prognostic factors in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 52: 227-237
38. Look MP, van Putten WL, Duffy MJ et al. Pooled Analysis of Prognostic Impact of Urokinase-Type Plasminogen Activator and Its Inhibitor PAI-1 in 8377 Breast Cancer Patients. *J Natl Cancer Inst*, Jan 2002; 94: 116 - 128.
39. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/neu oncogene. *Science* 1987; 235: 177-182.
40. Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, et al. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER2 therapy and personalized medicine. *The Oncologist* 2009; 14(4): 320- 368
41. Wolff AC, Hammond EH, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 18-43

42. Owens MA, Horten BC, Da Silva MM et al. HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. *Clin Breast Cancer* 5:63–69, 2004
43. Slamon DJ, Godolphin W, Jones SG et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244: 707-712.
44. Gonzalez-Angulo AM, Litton JK, Broglio KR et al. High Risk of Recurrence for Patients With Breast Cancer Who Have Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive, Node-Negative Tumors 1 cm or Smaller. *J Clin Oncol* 2009; 27(34): 5700-5706
45. Curigliano G, Viale G, Bagnardi V et al. Clinical Relevance of *HER2* Overexpression/Amplification in Patients With Small Tumor Size and Node-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(34):5693-5699
46. Lin NU, Bellon JR, Winer EP et al. CNS Metastases in breast cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22(17): 3608-3617.
47. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, et al. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2009. *Ann Oncol* 2009; 20: 1319-29.
48. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: 736–50.
49. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G Jr, et al. Ki67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer* 2007; 96: 1504–13.
50. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast* 2008; 17: 323–34.

51. Keyomarsi K, Tucker SL, Buchholz TA et al. Cyclin E and survival in patients with breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347: 1566-1575.
52. Wang L, Shao ZM. Cyclin E expression and prognosis in breast cancer patients: a meta-analysis of published studies. *Cancer Invest* 2006; 24: 581-587
53. Porter PL, Barlow WE, Yeh IT, et al. p27 (kip1) and cyclin E expression and breast cancer survival after treatment with adjuvant chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 1723-1731.
54. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406: 747-752.
55. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol* 2007, 8: R76
56. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:10869-10874
57. Liedtke C, Mazouni Ch, Hess KR et al. Response to Neoadjuvant Therapy and Long-Term Survival in Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2008: 1275-1281
58. Hennessy BT, Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, et al. Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Res* 2009; 69: 4116-4124.
59. Creighton CI, Li X, Landis M et al. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 13820-13825.

60. Prat A, Parker JS, Karginova O, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010; 12: R68.
61. Paik S, Shak S, Tang G et al. A Multigene Assay to Predict Recurrence of Tamoxifen-Treated, Node-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* 2004;351:2817-2826
62. Paik S, Tang G, Shak S et al. Gene Expression and Benefit of Chemotherapy in Women With Node-Negative, Estrogen Receptor–Positive Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2006;24(23):3726-3734
63. Goldstein LJ, Ravdin P, Gray R, et al. Prognostic utility of the 21-gene assay compared with Adjuvant!, in hormone receptor (HR) positive operable breast cancer with 0-3 positive axillary nodes treated with adjuvant chemohormonal therapy (CHT): an analysis of intergroup trial E2197. *Breast Cancer Res Treat.* 2007; 106(suppl 1):S17.
64. Albain KS, Barlow WE, Shak S, et al. Prognostic and predictive value of the 21-gene recurrence score assay in postmenopausal women with node-positive, oestrogen-receptor-positive breast cancer on chemotherapy: a retrospective analysis of a randomized trial. *Lancet Oncol* 2010; 11(1): 55-65
65. Dowsett M, Cuzick J, Wales C, et al. Risk of distant recurrence using oncotype DX in postmenopausal primary breast cancer patients treated with anastrozole or tamoxifen: a TransATAC study. *SABCS 2008 (abstract 53)*
66. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415 (6871): 530-536.

67. Buyse M, Loi S, van't Veer L et al. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98(17):1183-1192.
68. Mook S, Schmidt MK, Viale G et al. The 70-gene prognosis-signature predicts disease outcome in breast cancer patients with 1-3 positive lymph nodes in an independent validation study. *Breast cancer Res Treat* 2009; 116(2): 295-302
69. Wang Y, Klijn JG, Zhang Y et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* 2005; 365: 671-679
70. Sotirou C, Wirapati P, Loi S et al. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98(4):262-272
71. Ma XJ, Wang Z, Ryan PD, et al. A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer Cell* 2004; 5(6): 607-616.
72. Chang HY, Nuyten DSA, Sneddon JB et al. Robustness, scalability, and integration of a wound-response gene expression signature in predicting breast cancer survival. *PNAS* 2005; 112(10): 3738-3743.
73. Wirapati P, Sotirou C, Kunkel S et al. Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. *Breast Cancer Res* 2008; 10:R65
74. Vicini F, Eberlein T, Connolly J, et al. The optimal extent of resection for patients with stages I or II breast cancer treated with conservative surgery and radiotherapy. *Ann Surg* 1992; 214: 200.

75. Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, et al. Twenty-year follow up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Eng J Med* 2002; 347: 1227.
76. Fisher B, Anderson S, Bryant J, et al. Twenty-year follow up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347: 1233.
77. Giuliano AE, Haigh PI, Brennan MB, et al. Prospective observational study of sentinel lymphadenectomy without further axillary dissection in patients with sentinel node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2000;18(13):2553-9.
78. McMasters K, Tuttle TM, Carlson DJ, et al. Sentinel lymph node biopsy for breast cancer: a suitable alternative to routine axillary dissection in multi-institutional practice when optimal technique is used. *J Clin Oncol.* 2000 Jul;18(13):2560-6.
79. Mansel RE, Fallowfield L, Kissin M, et al. Randomized Multicenter Trial of Sentinel Node Biopsy Versus Standard Axillary Treatment in Operable Breast Cancer: The ALMANAC Trial. *J Natl Cancer Inst* 2006; 599-609
80. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Favorable and unfavorable effects on long-term survival of radiotherapy for early breast cancer: an overview of the randomized trials. *The Lancet* 2000; 355:1757-1770
81. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of Chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomized trials. *The Lancet* 2005; 365: 1687-1717.

82. De Laurentiis M, Canello G, D'Agostino D, et al. Taxane-based combinations as adjuvant chemotherapy of early breast cancer: a meta-analysis of randomized trials. *J Clin Oncol* 2008; 26: 44-53.
83. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomized trials. *The lancet* 2011; 378: 771-784
84. Dowsett M, Cuzick J, Ingle J, et al. Meta-Analysis of Breast Cancer Outcomes in Adjuvant Trials of Aromatase Inhibitors Versus Tamoxifen. *J Clin Oncol* 2010; 28: 509-518.
85. Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus Adjuvant Chemotherapy for Operable HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med* 2005; 353:1673-1684
86. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med* 2005; 353:1659-1672.
87. Fisher B, Brown A, Mamounas E, et al. Effect of preoperative chemotherapy on local-regional disease in women with operable breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J Clin Oncol* 1997; 15(17): 2483-2493.
88. Mauri D, Pavlidis N, Ioannidis JP. Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis. *J Natl C Inst* 2005; 97: 188-194.
89. Feldman LD, Hortobagyi GN, Buzdar AU, et al. Pathological assessment of response to induction chemotherapy in breast cancer. *Cancer Res* 1986;46:2578-2581.

90. Scholl SM, Pierga JY, Asselain B, et al. Breast tumour response to primary chemotherapy predicts local and distant control as well as survival. *Eur J Cancer* .1995; 31A (12): 1969-1975.
91. Fisher B, J Bryant, N Wolmark, et al. Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *J Clin Oncol*. 1998; 16: 2672-2685.
92. Wolmark N, Wang J, Mamounas E, et al. Preoperative chemotherapy in patients with operable breast cancer: nine-year results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2001; 30: 96-102.
93. Pierga JY, Mouret E, Laurence V, et al. Prognostic factors for survival after neoadjuvant chemotherapy in operable breast cancer: the role of clinical response. *Eur J Cancer* 2003; 39: 1089-1096.
94. Ogston KN, Miller ID, Payne S, Hutcheon AW, Sarkar TK, Smith I, et al. A new histological grading system to assess response of breast cancers to primary chemotherapy: prognostic significance and survival. *Breast*. 2003; 12: 320-7.
95. Smith IC, Heys SD, Hutcheon AW, Miller ID, Payne S, Gilbert FJ, et al. Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: significantly enhanced response with docetaxel. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1456-66.
96. Penault-Llorca F, Abrial C, Raouf I, Cayre A, Mouret-Reynier MA, Leheurteur M, et al. Comparison of the prognostic significance of Chevallier and Sataloff's pathologic classifications after neoadjuvant chemotherapy of operable breast cancer. *Hum Pathol*. 2008; 39: 1221-1228.

97. Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C, Rajan R, Kuerer H, Valero V, et al. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2007; 25: 4414-4422.
98. Bear HD, Anderson S, Smith RE, et al. Sequential Preoperative or Postoperative Docetaxel Added to Preoperative Doxorubicin Plus Cyclophosphamide for Operable Breast Cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol* 2006; 24 (13):2019-2027
99. Evans TRJ, Yellowlees A, Foster E, et al. Phase III Randomized Trial of Doxorubicin and Docetaxel versus Doxorubicin and Cyclophosphamide As Primary Medical Therapy in Women With Breast Cancer: An Anglo-Celtic Cooperative Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2988-2995.
100. Buzdar A, Singletary E, Theriault R, et al. Prospective Evaluation of Paclitaxel Versus Combination Chemotherapy With Fluorouracil, Doxorubicin, and Cyclophosphamide as Neoadjuvant Therapy in Patients With Operable Breast Cancer. *Buzdar et al J Clin Oncol* 1999; 17: 3412- 3417.
101. Buzdar A, Ibrahim N, Francis D, et al. Significantly Higher Pathologic Complete Remission Rate After Neoadjuvant Therapy With Trastuzumab, Paclitaxel, and Epirubicin Chemotherapy: Results of a Randomized Trial in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive Operable Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3676-3685.
102. Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, et al. Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER2-positive locally advanced breast

cancer (the NOAH trial): a randomized controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *Lancet* 2010; 375(9712): 377-84.

103. Baselga J, Bradbury I, Eidtmann H, et al. Final Results of the NeoALTTO Trial (BIG01-06 /EGF106903): A Phase III, randomized, open-label, neo-adjuvant study of lapatinib, trastuzumab, and their combination plus paclitaxel in women with HER2-positive primary breast cancer, 2010 CTRC-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium 2010; S3-3.

104. Lower EE, Glass EL, Bradley DA, et al. Impact of metastatic estrogen receptor and progesterone receptor status on survival. *Breast cancer Res Treat* 2005; 90: 65-70

105. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomized trials. *Lancet* 2005; 365: 1687-1717.

106. Berry DA, Cirincione C, Henderson IC, et al. Estrogen-receptor status and outcomes of modern chemotherapy for patients with node-positive breast cancer. *JAMA* 2006; 295: 1658-1667

107. Colleoni M, Gelber S, Coates AS, et al. Influence of endocrine-related factors on response to perioperative chemotherapy for patients with node-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2001;19:4141-9

108. Mazouni C, Kau SW, Frye D, et al. Inclusion of taxanes, particularly weekly paclitaxel, in preoperative chemotherapy improves pathologic complete response rate in estrogen receptor-positive breast cancers. *Ann Oncol* 2007; 18: 874-880.

109. Harbeck N, Kates RE, Look MP, et al Enhanced benefit from adjuvant chemotherapy in breast cancer patients classified high-risk according to urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (n = 3424). *Cancer Res.* 2002; 62(16):4617-22.
110. N. Harbeck, M. Schmitt, C. Meisner, et al. Final 10-year analysis of prospective multicenter Chemo N0 trial for validation of ASCO-recommended biomarkers uPA/PAI-1 for therapy decision making in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 27:15s, 2009 (suppl; abstr 511)
111. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch et al. Prognostic importance of c-erbB2 expression in breast cancer, International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1992; 10: 1049-1056.
112. Gennari A, Sormani MP, Pronzato P et al. HER2 status and efficacy of adjuvant anthracyclines in early breast cancer: a pooled analysis of randomized trials. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 14-20
113. Ellis MJ, Coop A, Singh B et al. Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for ErbB-1- and/or ErbB-2-positive, estrogen receptor positive primary breast cancer: Evidence from a phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3808-3816.
114. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20: 719-726.
115. Di Leo A, Gomez HL, Aziz Z et al. Phase III, Double-Blind, Randomized Study Comparing Lapatinib Plus Paclitaxel With Placebo Plus Paclitaxel As First-Line Treatment for Metastatic Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26(34):5544-5552

116. Brase JC, Schmidt M, Fischbach T et al. ERBB2 and TOP2A in Breast cancer. A Comprehensive Analysis of Gene Amplification, RNA levels, and Protein Expression and Their Influence on Prognosis and prediction. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 2391-2401.
117. Viale G, Regan MM, Mastropasqua MG, et al. Predictive value of tumor Ki67 expression in two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 207–12.
118. Bartlett JM, Munro A, Cameron DA, Thomas J, Prescott R, Twelves CJ. Type 1 receptor tyrosine kinase profiles identify patients with enhanced benefit from anthracyclines in the BR9601 adjuvant breast cancer chemotherapy trial. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5027–35.
119. Hugh Jand. Response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1168–76.
120. Penault-Llorca F, André F, Sagan C, et al. Ki67 expression and docetaxel efficacy in patients with estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 2809–15.
121. Viale G, Giobbie-Hurder A, Regan MM, et al. Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from Breast International Group Trial 1-98 comparing
122. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF et al. Breast molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5678-5685

123. Hugh J, Hanson J, Cheang MCh et al. Breast Cancer Subtypes and Response to Docetaxel in Node-Positive Breast Cancer: Use of an Immunohistochemical Definition in the BCIRG 001 Trial. *J Clin Oncol* 2009; 27(18) 1168-1176
124. Knauer M, Mook S, Rutgers EJT et al. The predictive value of the 70-gene signature for adjuvant chemotherapy in early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 120: 655-661
125. Vora HH, Patel NA, Rajvik KN, et al. Cytokeratin and vimentin expression in breast cancer. *Int J Biol Markers* 2009; 24(1): 28-46
126. Wanker E, Rovira C, Scherzinger E et al. HIP-1: a huntingtin interacting protein isolated by the yeast two-hybrid system. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 487-495
127. Hyun TS, Ross TS .HIP1: trafficking roles and regulation of tumorigenesis. *Trends Mol Med.* 2004; 10: 194-199
128. Ross T, Bernard O, Berger R et al. Fusion of Huntingtin interacting protein 1 to platelet-derived growth factor  $\beta$  receptor (PDGF $\beta$ R) in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;7)(q33;q11.2). *Blood* 1998; 91: 4419-4426.
129. Rao D, Hyun T, Kumar P et al. Huntingtin-interacting protein 1 is overexpressed in prostate and colon cancer and is critical for cellular survival. *J Clin Invest* 2002; 110: 351-360.
130. Mills I, Gaughan L, Robson C et al. Huntingtin interacting protein 1 modulates the transcriptional activity of nuclear hormone receptors. *J Cell Biol* 2005; 170(2): 191-200.
131. Bradley S, Holland E, Liu G et al. Huntingtin interacting protein 1 is a novel brain tumor marker that associates with epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* 2007; 67(8): 3609-3615.

132. Lodish H, Berk A, Matsudaira P et al. *Molecular Biology of the Cell* 2008, p963. WH Freeman: New York, NY. 5th ed.
133. Rosell R, Tarón M, Santarpia M et al. DNA repair and Mitotic Checkpoint Genes as potential predictors of chemotherapy response in Non- Small-Cell Lung Cancer. *Cancer drug Discovery and Development: Genomics and Pharmacogenomics in Anticancer Drug Development and Clinical response* 2008: Humana Press. pp.231-247
134. Sankaran S, Starita LM, Simons AM et al. Identification of domains of BRCA1 critical for the ubiquitin-dependent inhibition of centrosoma function. *Cancer Res* 2006; 66: 4100-4107.
135. Hartman AR, Ford JM. BRCA1 induces DNA damage recognition factors and enhances nucleotide excision repair. *Nat Genet* 2002; 32: 180-184.
136. Bache KG, Slagsvold T, Stenmark H. Defective downregulation of receptor tyrosin kinases in cancer. *EMBO J.* 2004; 23: 2707-2712.
137. Rice JC, Massey-Brown KS et Futscher BW. Aberrant methylation of the BRCA1 CpG island promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA in sporadic breast cancer cells. *Oncogene* 1998; 17: 1907-1912.
138. Yang Q, Sakurai T, Mori I et al. Prognostic significance of BRCA1 expression in Japanese sporadic breast carcinomas. *Cancer.* 2001; 92: 54-60.
139. Mullan PB, Gorski JJ, harkin DP. BRCA1- a good predictive marker of drug sensitivity in breast cancer treatment? *Biochim Biophys acta* 2006; 1766 (2): 205-216.
140. Fedier A, Steiner RA, Schwarz VA et al. The effect of loss of BRCA1 on the sensitivity to anticancer agents in p53-deficient cells. *Int J Oncol* 2003; 22: 1169-1173.

141. Lafarge S, Sylvain V, Ferrara M, et al. Inhibition of BRCA1 levels to increased chemoresistance to microtubule-interfering agents, an effect that involves the JNK pathway. *Oncogene*. 2001; 20: 6597-6606.
142. Chappuis PO, Goffin J, Wong N et al. A significant response to neoadjuvant chemotherapy in BRCA1/2 related breast cancer. *J Med Genet* 2002; 39: 608-610.
143. Grushko TA, Dignam JJ, Das S, et al. MYC is amplified in BRCA1-associated breast cancers. *Clin Cancer Res*. 2004; 10: 499-507.
144. Taron M, Rosell R, Felip E, et al. BRCA1 mRNA expression levels as an indicator of chemoresistance in lung cancer. *Hum Mol Gen*. 2004;13: 2443-2449.
145. Quinn JE, James CR, Stewart GE, et al. BRCA1 mRNA expression levels predict overall survival in ovarian cancer after chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2007 13: 7413-20.
146. Weberpals J, Garbuio K, O'Brien A, et al. The DNA repair proteins BRCA1 and ERCC1 as predictive markers in sporadic ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2009; 124: 806-815.
147. Einspahr JG, Krouse RS, Yochim JM et al. Association between Cyclooxygenase expression and colorectal adenoma characteristics. *Cancer Res* 2003; 63: 3891-3893.
148. Cheang M, Chia S, Voduc D et al. Ki67 Index, HER Status, and Prognosis of Patients with Luminal B Breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: 736-750.
149. Rosell R, Felip E, Taron M et al. Gene expression as a predictive marker of outcome in stage IIB-IIIA-IIIB non-small cell lung cancer after induction

- gemcitabine-based chemotherapy followed by resectional surgery. *Clin Cancer Res* 2004;10: 4215-4219
150. Bellmunt J, Paz-Ares L, Cuello M et al. Gene expression of ERCC1 as a novel prognostic marker in advanced bladder cancer patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *Ann Oncol* 2007; 18(3): 522-528.
151. Barnadas A, Gil M, González S, Tusquets I, Muñoz M, Arcusa A, Prieto L, Margelí-Vila M, Moreno A. Exemestane as primary treatment of oestrogen receptor-positive breast cancer in postmenopausal women: a phase II trial. *Br J Cancer*. 2009; 100(3):442-9.
152. Gianni L, Baselga J, Eiermann W, et al. European Cooperative Trial in Operable Breast Cancer Study Group. Feasibility and tolerability of sequential doxorubicin/paclitaxel followed by cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil and its effects on tumor response as preoperative therapy. *Clin Cancer Res*. 2005; 11 : 8715-8721
153. von Minckwitz G, Kümmel S, Vogel P, et al. Intensified neoadjuvant chemotherapy in early-responding breast cancer: phase III randomized GeparTrio study. *J Natl Cancer Inst*. 2008; 100: 519
154. Bear H, Tang G, Rastogi P, et al. Bevacizumab Added to Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer. *N Engl J Med* 2012; 366: 310-320.
155. von Minckwitz G, Eidtmann H, M.D., Rezai M, et al. Neoadjuvant Chemotherapy and Bevacizumab for HER2-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* 2012; 366: 299-309.
156. Cheang M, Voduc D, Bajdik C et al. Basal-Like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value than Triple-Negative Phenotype. *Clin Cancer Res* 2010; 16:5222-5232.

157. Chen M, Yip G, Tse G et al. Expression of basal keratins and vimentin in breast cancers of young women correlates with adverse pathologic parameters. *Modern Pathology* 2008; 21: 1183-1191.
158. Liedtke C, Pacheisen J, Schmidt H et al. In vitro chemosensitivity testing in invasive breast cancer: Increased sensitivity of the basal subtype is not independent of the tumor proliferation rate. *AACR Meeting Abstracts* 2006: B15-.
159. Raymond WA and Leong A SY. Vimentin—a new prognostic parameter in breast carcinoma? *The Journal of Pathology* 2005; DOI: 10.1002/path.1711580205.
160. Domagala W, Lasota J, Bartkowiak J, Weber K, and Osborn M. Vimentin is preferentially expressed in human breast carcinomas with low estrogen receptor and high Ki-67 growth fraction. *Am J* 1990; 136(1): 219–227.
161. Petit T, Wilt M, Velten M, et al. Comparative value of tumor grade, hormonal receptors, ki-67, HER-2 and topoisomerase II alpha status as predictive markers in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy. *Eur J Cancer* 2004; 40: 205-211.
162. Chang J, Ormerod M, Powles TJ, et al. Apoptosis and proliferation as predictors of chemotherapy response in patients with breast carcinoma. *Cancer* 2000; 89: 2145-2152
163. Estevez LG, Cuevas JM, Anton A, et al. Weekly Docetaxel as neoadjuvant chemotherapy for stage II, and III breast cancer. Efficacy and correlation with biological markers in a phase II, multicenter study. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 686-692.

164. Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, et al. (2000) Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst* 92: 564-569.
165. Rosell R, Skrzypski M, Jassem E et al. BRCA1: a novel prognostic factor in resected non-small-cell lung cancer. *PLoS One* 2007; 2: e1129.
166. Rakha EA, El-Sheikh SE, Kandil MA et al. Expression of BRCA1 protein in breast cancer and its prognostic significance. *Hum Pathol* 2008; 39: 857-865.
167. Husain A, He G, Venkatraman ES, Spriggs DR. BRCA1 up-regulation is associated with repair-mediated resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II). *Cancer Res* 1998; 58: 1120-1123.
168. Fedier A, Steiner RA, Schwarz VA et al. The effect of loss of Brcal on the sensitivity to anticancer agents in p53-deficient cells. *Int J Oncol* 2003; 22: 1169-1173.
169. Sgagias MK, Wagner KU, Hamik B et al. Brcal-deficient murine mammary epithelial cells have increased sensitivity to CDDP and MMS. *Cell Cycle* 2004; 3: 1451-1456.
170. Quinn JE, Kennedy RD, Mullan PB et al. BRCA1 functions as a differential modulator of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 2003; 63: 6221-6228.
171. Saleh EM, El-Awady RA, Abdel Alim MA et al. Altered Expression of Proliferation-Inducing and Proliferation-Inhibiting Genes Might Contribute to Acquired Doxorubicin Resistance in Breast Cancer Cells. *Cell Biochem Biophys* 2009; 55: 95-105.

172. Wang L, Wei J, Qian X et al. ERCC1 and BRCA1 mRNA expression levels in metastatic malignant effusions is associated with chemosensitivity to cisplatin and/or docetaxel. *BMC Cancer* 2008; 8: 97.
173. Chappuis PO, Goffin J, Wong N et al. A significant response to neoadjuvant chemotherapy in BRCA1/2 related breast cancer. *J Med Genet* 2002; 39: 608-610.
174. Kirova YM, Stoppa-Lyonnet D, Savignoni A et al. Risk of breast cancer recurrence and contralateral breast cancer in relation to BRCA1 and BRCA2 mutation status following breast-conserving surgery and radiotherapy. *Eur J Cancer* 2005; 41: 2304-2311.
175. Quinn JE, James CR, Stewart GE et al. BRCA1 mRNA expression levels predict for overall survival in ovarian cancer after chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 7413-7420.
176. Font A, Tarón M, Costa C et al. BRCA1 mRNA expression and outcome to neoadjuvant cisplatin-based chemotherapy in bladder cancer. *Ann Oncol* 2011; 22(1): 139-144.
177. Boukovinas I, Papadaki C, Mendez P et al. Tumor BRCA1, RRM1 and RRM2 mRNA expression levels and clinical response to first-line gemcitabine plus docetaxel in non-small-cell lung cancer patients. *PLoS One* 2008; 3: e3695.
178. Byrski T, Gronwald J, Huzarski T et al. Response to neo-adjuvant chemotherapy in women with BRCA1-positive breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 108 (2): 289-296.

179. Rosell R, Perez-Roca L, Sanchez JJ et al. Customized treatment in non-small-cell lung cancer based on EGFR mutations and BRCA1 mRNA expression. PLoS One 2009; 4: e5133.
180. Wei J, Costa C, Ding Y, et al. mRNA Expression of BRCA1, PIAS1, and PIAS4 and Survival After Second-line Docetaxel in Advanced Gastric Cancer. J Natl Cancer Inst 2011; 103(20): 1552-1556.

