

TESIS DOCTORAL

FACTORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE EN CÁNCER DE MAMA

Autor: Sonia Baulies Caballero

Bajo la dirección de:

**Profesor Jordi Xercavins Montosa
Dra. Maite Cusidó Gimferrer**

**Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología, y
Medicina Preventiva.
Facultad de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona, 2014**

A mi padre y a mi madre por los valores que me han inculcado y su apoyo incondicional. Gracias por estar siempre ahí. Os lo debo todo.

A mi tía Nieves por su amor e ilusión por todos mis proyectos.

?

AGRADECIMIENTOS

A Maite Cusidó por su amistad, apoyo, capacidad de trabajo y por su empeño en que hiciera esta tesis.

Al Profesor Jordi Xercavins por su ayuda y disponibilidad en todo momento.

A Nacho Rodríguez por mostrarme con inmensa paciencia los datos estadísticos de este trabajo.

A María González Cao por hacer descubrir a una ginecóloga el increíble mundo de la oncología médica.

A Rafa Fábregas, por su confianza y permitirme formar parte de su equipo. Por compartir sus conocimientos y despertar en mí el interés por la Senología.

A Ramón Labastida y Amparito, tanto por su ayuda como por sus consejos de impagable valor.

A Carmen Ara por su paciencia durante mis inicios y enseñarme las bases de la cirugía mamaria.

A Francesc Tresserra y al servicio de Anatomía Patológica por toda su inestimable colaboración.

Al Doctor Rosell quien ideó este proyecto en su inicio.

A todo el equipo del Laboratorio de Biología Molecular por su trabajo y explicaciones.

A Montse Manubens, por su constante apoyo a lo largo de los años.

A Monsieur Professeur Roman Rouzier, Fabien Reyat, Eugenie Guillot et l'ensemble du personnel de l'Institut Curie pour leur gentillesse, pour tout ce qu'ils m'ont appris, et pour tout les moments passés ensemble.

A mis compañeros de Dexeus, que facilitan y hacen mucho más agradable el trabajo diario.

A mis amigos, por estar a mi lado.

Y, por último, a mi Time Capsule y todos aquéllos que me recuperaron los archivos perdidos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. GENERALIDADES DEL CÁNCER DE MAMA	13
1.1.1. Epidemiología	13
1.1.2. Carcinogénesis mamaria	15
1.1.3. Diseminación y metástasis	19
1.1.4. Evolución del cáncer de mama infiltrante	22
1.1.5. Factores de riesgo	23
1.1.6. Histopatología del cáncer de mama	29
1.1.7. Factores pronósticos y predictivos	31
1.1.7.1. Factores clásicos	32
1.1.7.2. Factores biológicos y moleculares	39
1.2. PERFIL GENÉTICO	44
1.2.1. Clasificación molecular de los tumores	44
1.2.2. Firmas genéticas	47
1.3. NEOADYUVANCIA	51
1.3.1. Quimioterapia neoadyuvante	51
1.3.1.1. Indicaciones de la quimioterapia neoadyuvante	52
1.3.1.2. Impacto pronóstico	53
1.3.1.3. Esquema terapéutico	56
1.3.2. Valoración radiológica	58
1.3.3. Valoración anatomopatológica	62
1.4. ONCOLOGÍA MOLECULAR	66
1.4.1. Biología molecular y carcinogénesis	66
1.4.2. Biomarcadores moleculares predictivos	68
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO	79

3. OBJETIVOS	83
3.1. OBJETIVO PRINCIPAL	85
3.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS	85
4. MATERIAL Y MÉTODOS	87
4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO	89
4.2. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN	90
4.3. ESQUEMA TERAPÉUTICO	93
4.4. DESCRIPCIÓN DE VARIABLES	94
4.4.1. Tamaño tumoral	94
4.4.2. Valoración de la respuesta	94
4.4.3. Factores pronósticos y predictivos	95
4.4.4. Clasificación tumoral	96
4.5. ESTUDIO MOLECULAR	98
4.5.1. Obtención, selección y procesamiento de las muestras	99
4.5.1.1. Valoración del patólogo	99
4.5.1.2. Macrodissección/microdissección	100
4.5.2. Análisis de mutaciones	101
4.5.2.1. Análisis de las mutaciones de Tp53	101
4.5.2.2. Análisis de las mutaciones de PIK3CA	103
4.5.3. Análisis de RNA	104
4.5.3.1. Extracción del RNA	104
4.5.3.2. Real-time PCR y cuantificación	105
4.6. SUPERVIVENCIA GLOBAL Y LIBRE DE ENFERMEDAD	111

4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	111
5. RESULTADOS	113
5.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA POBLACIÓN	115
5.1.1. Características clínicopatológicas	115
5.1.2. Características del tratamiento neoadyuvante y valoración de la respuesta tumoral	118
5.1.3. Tratamiento quirúrgico y adyuvante	120
5.2. RESPUESTA PATOLÓGICA Y TAMAÑO TUMORAL	121
5.3. FACTORES PREDICTIVOS CLÍNICOPATOLÓGICOS	124
5.4. PRONÓSTICO	128
5.4.1. Recidivas, metástasis y mortalidad	128
5.4.2. Supervivencia	132
5.5. FACTORES PREDICTIVOS MOLECULARES	135
5.5.1. Estudio de los genes FGFR1, BRCA1, RAP80, BIM, BTRCP, PTPN12, YAP, HIF1alfa, GAS6, AXL, ZNF217, EZH2 y ROR1	137
5.5.2. Estudio de mutaciones PIK3CA, Tp53	145
5.5.3. Supervivencia	146
6. DISCUSIÓN	149
6.1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA	151
6.1.1. Características clínicopatológicas	152
6.1.2. Tratamiento neoadyuvante y valoración de la respuesta tumoral	152
6.1.3. Tratamiento quirúrgico	154
6.2. QUIMIOSENSIBILIDAD EN CÁNCER DE MAMA INICIAL	155

6.3. FACTORES PREDICTIVOS CLÍNICOPATOLÓGICOS	158
A. Clásicos	158
B. Según subtipo tumoral	160
6.4. SUPERVIVENCIA E IMPACTO PRONÓSTICO DE LA RESPUESTA HISTOLÓGICA	163
6.5. FACTORES PREDICTIVOS MOLECULARES	167
6.5.1. Expresión de los genes: FGFR1, BRCA1, RAP80, BIM, BTRCP, PTPN12, YAP, HIF1alfa, GAS6, AXL, ZNF217, EZH2 y ROR1	169
6.5.2. Mutaciones PIK3Ca, Tp53	173
6.5.3. Supervivencia	174
7. CONCLUSIONES	177
8. CONCLUSIONS	181
9. BIBLIOGRAFÍA	185
10. ABREVIATURAS	211
11. SUMMARY	215
12. ANEXO	239

1. INTRODUCCIÓN

1.1. GENERALIDADES DEL CÁNCER DE MAMA

1.1.1. EPIDEMIOLOGIA

Actualmente, el cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente en la mujer occidental y la principal causa de muerte por cáncer en la mujer (López-Abente G et al., 2004; Jemal A et al., 2011). En Europa, su incidencia aumentó considerablemente a partir de 1990 debido a los cambios en los factores reproductivos, el uso del tratamiento hormonal sustitutivo y la introducción de programas de cribado que permiten un diagnóstico precoz (Martínez-Alonso M et al, 2010).

A partir de 1999 se registró una leve disminución de su incidencia que se ha mantenido estable. Esto se observó en pacientes menopáusicas y puede atribuirse a la disminución del uso del tratamiento hormonal sustitutivo (tras la publicación de los resultados de Women's Health Initiative) y a la completa instauración del screening con mamografía. Mientras que la incidencia de cáncer de mama en pacientes jóvenes continúa incrementando (Pollán M et al., 2010).

España presenta una de las tasas más bajas de incidencia y mortalidad por cáncer de mama de la Unión Europea (Figura 1). No obstante, continúa siendo el tumor maligno más frecuente en la población femenina española por lo que su impacto es notable (Pollán M et al., 2009; Izquierdo A et al., 2006).

Por el contrario, la mayor incidencia de cáncer de mama no ha conllevado una mayor tasa de mortalidad, debido seguramente al diagnóstico precoz y a los avances en los tratamientos (Figura 2). La supervivencia en mujeres con cáncer de mama en España ha mejorado considerablemente en las últimas décadas, pasando de un 64% a los 5 años del diagnóstico entre 1980-1985, a un 78% en el periodo 1990-1994 y según los datos del EURO CARE 4, actualmente la supervivencia global a 5 años es del 80.8% (Verdecchia A et al., 2007).

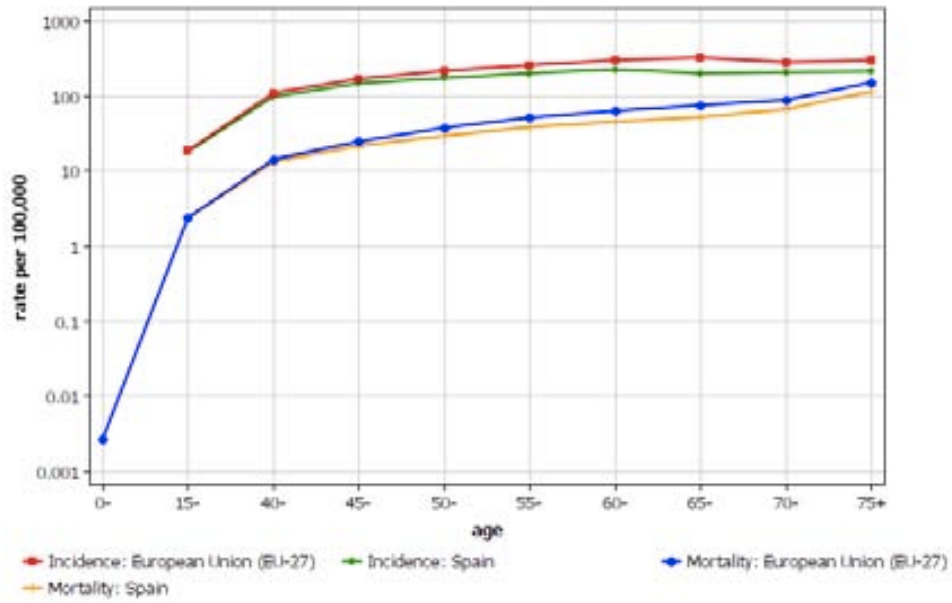


Figura 1. Situación del cáncer de mama en España y Europa (Globocan 2008)

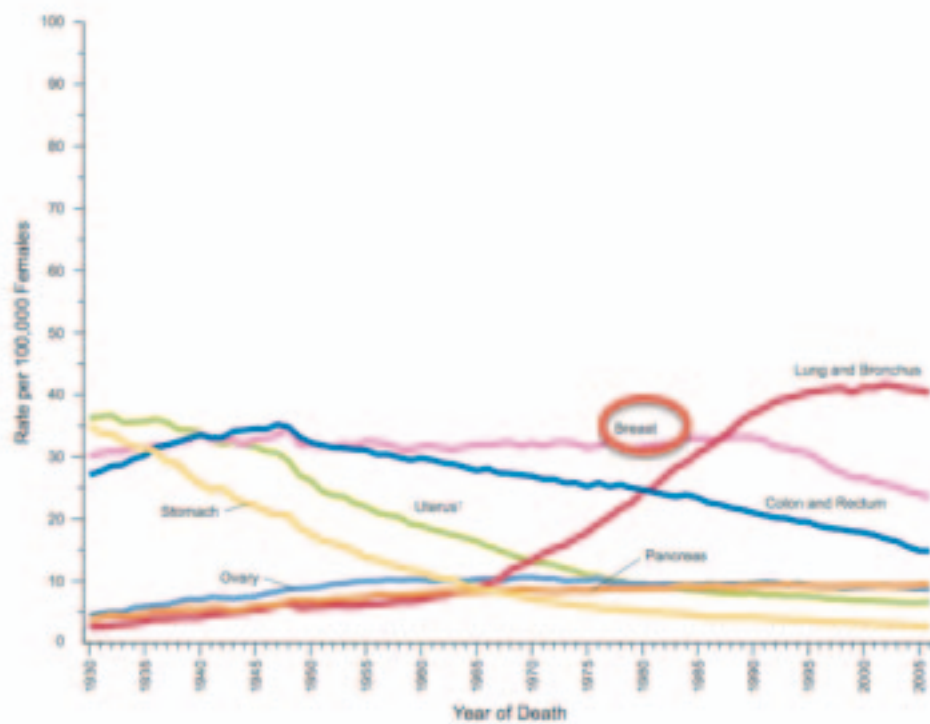


Figura 2. Tasas anuales de mortalidad en EUA, 1930-2006 (modificado de Jemal A et al., 2010).

1.1.2. CARCINOGENESIS MAMARIA

Para reducir el riesgo de cáncer es necesario comprender como éste se desarrolla en el cuerpo, ya que su conocimiento nos permitirá aplicar terapias que eviten su progresión o incluso evitar su desarrollo desde su origen.

La carcinogénesis se desarrolla debido a un proceso que implica varios pasos en el que las células sanas se convierten en células anormales con capacidad de dividirse sin control (Ann Clark R et al., 1997).

Las mutaciones en los genes pueden producirse por mutaciones puntuales, amplificación, delección o traslocaciones, interfiriendo en su capacidad de regulación de señales o codificando proteínas que emiten señales incorrectas a la célula (Figura 3):

- **Activación de oncogenes:** factores de crecimiento, receptores de los factores de crecimiento, c-myc; CDK-1.
- **Inactivación de genes supresores:** BRCA, PTEN, p53, APC, NF1, DCC, p16.
- **Alteración en los genes responsables de la estabilidad del genoma:** genes reguladores de la apoptosis (Bcl2, bad, bax, bak) o genes reparadores del DNA.

La combinación de estos fenómenos dará lugar al fenotipo característico de las células cancerígenas, que se caracterizan por presentar:

- diferenciación aberrante
- proliferación aumentada
- supervivencia prolongada (resistencia a la apoptosis)
- invasión y diseminación

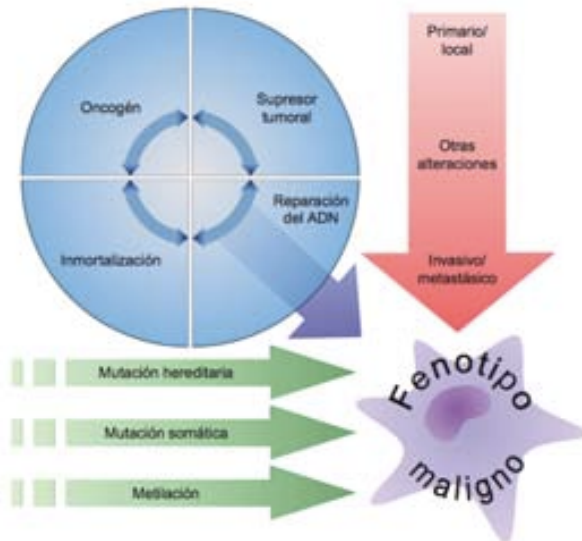


Figura 3. Mutaciones en DNA asociados a la carcinogénesis. (Riley et al., 2009).

El cáncer ha sido clásicamente considerado un desorden genético como consecuencia de la adquisición de mutaciones (somáticas o hereditarias) en los genes responsables de mantener la función celular. No obstante, recientemente se ha observado que la inestabilidad genómica juega también un papel importante en la carcinogénesis mediada por mutaciones somáticas.

Dada la eficacia de los mecanismos de reparación del DNA y de los mecanismos que eliminan las células con el DNA alterado, resulta poco probable que esta molécula, aún siendo el blanco de continuas agresiones, pueda acumular suficientes mutaciones como para dar lugar al fenotipo característico de los tumores malignos. Para que puedan acumularse un número suficiente de mutaciones deben perturbarse los mecanismos de reparación y de eliminación de células mutadas.

Una pieza fundamental en estos mecanismos es la proteína p53, en respuesta a las alteraciones del DNA aumenta la concentración de p53 en la célula. El aumento de la p53 detiene el ciclo celular y permite, mientras el ciclo se encuentra detenido, la reparación del DNA. Cuando la reparación resulta imposible la p53 elimina las células por apoptosis. Los mecanismos dependientes de la p53 están alterados en la mayoría o en la totalidad de los tumores humanos. Otros genes que codifican

proteínas que forman parte de los circuitos en los que interviene la p53 pueden estar igualmente alterados y contribuir a la inestabilidad del genoma.

El concepto de la epigenética, describe los cambios químicos de actividad de los genes que no implican alteraciones de la secuencia primaria del DNA. En los últimos años, dos mecanismos epigenéticos se han convertido en los puntos más críticos de la regulación de la transcripción: *La metilación del DNA y las modificaciones químicas de las histonas* (Veeck J et al., 2010). De esta forma, la mayor o menor metilación de los genes hacen que estos se expresen en mayor o menor intensidad. La hipermetilación de un gen con función supresora comportará que este no se exprese y que no efectúe su acción supresora, resultando en una mayor activación del ciclo celular (Esteller M, 2008).

El genoma humano tiene complejos proteicos que permiten eliminar mutaciones puntuales y reparar el DNA. Las alteraciones del DNA se van acumulando a lo largo de la vida pero puede existir en determinadas personas una predisposición hereditaria si los genes se encuentran mutados en la línea germinal (como es el caso de las mutaciones BRCA1/2).

En el 2000 Hanahan et al. describieron las seis alteraciones esenciales que debe presentar una célula cancerígena:

- Producción de señales de crecimiento de forma autosuficiente.
- Insensibilidad a los factores supresores de crecimiento
- Resistencia a la apoptosis
- Capacidad replicativa ilimitada
- Inducción de la angiogénesis
- Invasión y metástasis.

El avance científico de los últimos años ha añadido dos características más a la lista: la capacidad de reprogramar el metabolismo celular y la capacidad de evitar su propia destrucción por parte del sistema inmune (Hanahan D et al., 2011) (Figura 4).

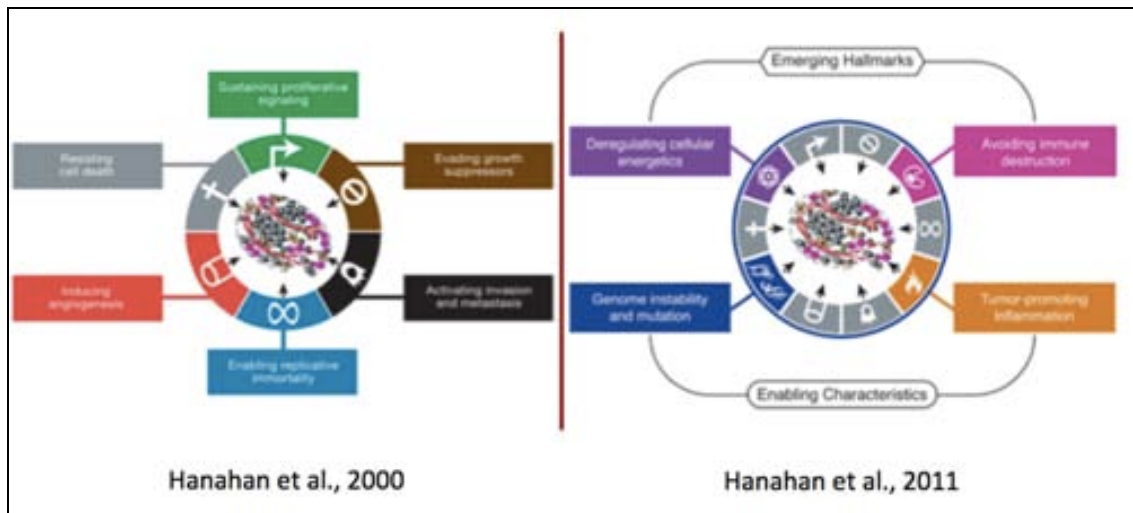


Figura 4. Bases de la carcinogénesis (modificado de Hanahan et al.).

Pero los tumores no son sólo un conjunto de células cancerígenas, sino que existen células sanas que constituyen un microambiente tumoral (Figura 5). Se ha observado que las diferentes células presentan interacciones heterotópicas las unas con las otras, con lo que las células sanas del estroma se consideran parte activa en la carcinogénesis contribuyendo al desarrollo y a la expresión de las alteraciones esenciales.

En los últimos años se ha incorporado el concepto de las Stem Cells tumorales, las cuales también presentan un papel importante en la carcinogénesis. Son células que tienen una capacidad de autorenovación constante y han perdido la capacidad de regulación del crecimiento pero tienen capacidad de diferenciación. Así se convertirían en las proveedoras de nuevas células tumorales para el tejido canceroso (Talmadge JE et al., 2010). Parece que las stem cells tumorales se mantienen en general en estado quiescente, explicando la resistencia a tratamientos antineoplásicos y la recidiva tumoral (Cameron MD et al., 2000; Naumov et al., 2002).

Es de esperar que en un futuro el conocimiento de todos estos factores afectará de manera creciente al desarrollo de nuevas terapias personalizadas contra el cáncer.

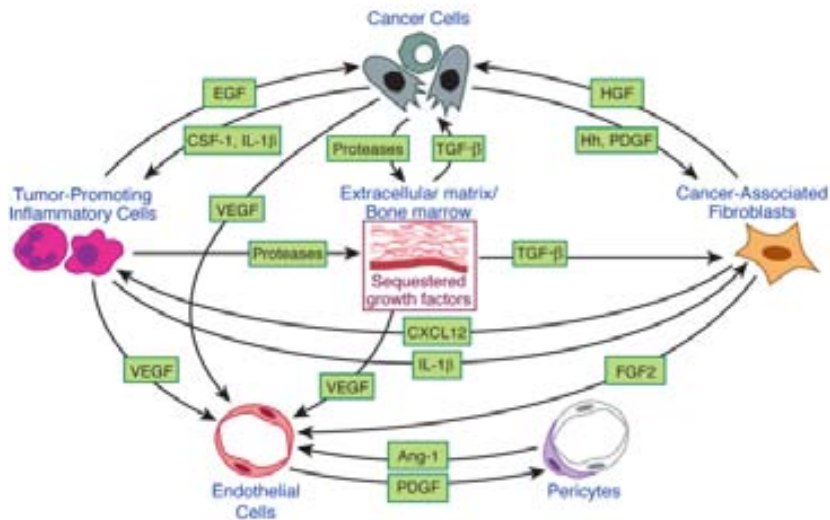


Figura 5. Microambiente tumoral (Hanahan D et al, 2011).

1.1.3. DISEMINACIÓN Y METÁSTASIS

El tumor primario puede progresar a un mayor grado patológico de malignidad, causando una invasión a tejidos adyacentes y también a distancia.

La importancia de llegar a conocer las diferentes vías de diseminación radica en que las metástasis:

- son el factor principal en la morbilidad y mortalidad del cáncer, causando el 90% de las muertes por cáncer (Sporn MB et al, 1996).
- su diagnóstico modifica las estrategias terapéuticas.
- son la causa mayor de fallos de tratamiento.

Se puede considerar que en un mismo tumor existen diferentes poblaciones celulares. La mayoría de los cánceres se originan de la transformación maligna de una única célula, posteriormente, la inestabilidad genética permite la existencia de subpoblaciones celulares con diferentes características y diferente potencial de metástasis. La capacidad de invasión es el “Hallmark” de la célula maligna. La cascada metastásica (Figura 6) es un proceso multifactorial que consta de una serie de pasos secuenciales e independientes (Bland K et al., 2007; Talmadge JE et al., 2010):

1-Proliferación de células tumorales con el apoyo de factores de crecimiento. La sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el c-erbB-2/HER2Neu pueden otorgar a las células malignas un mayor crecimiento.

2-Neovascularización o angiogénesis es necesaria para el crecimiento continuado de un tumor (Hanahan D et al., 1996). La angiogénesis está controlada por factores que o bien la inducen o la bloquean (Baeriswyl V et al., 2009). Algunos de estos reguladores angiogénicos son proteínas de señalización que se unen a un receptor activador o inhibidor de la superficie celular de las células endoteliales vasculares. Los prototipos más conocidos inductores e inhibidores de la angiogénesis son el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) y angiopoyetina 2, y la trombo-espondina-1 (TSP-1), respectivamente.

3-Invasión y destrucción de la membrana basal mediante las proteasas.

4-Algunas células tumorales muestran una expresión reducida o ausente de moléculas de cohesión lo que conlleva a una mayor movilidad y desplazamiento a tejidos alejados del tumor primario.

Las moléculas de adhesión implicadas en la progresión tumoral son:

-en menor expresión: integrinas, E-cadherinas.

-mayor expresión: 67KD, CD44.

5-Penetración vascular o linfática.

6-Formación de pequeños grupos de células tumorales en otros órganos (micrometástasis).

7-Colonización y formación de tumores macroscópicos (metástasis).

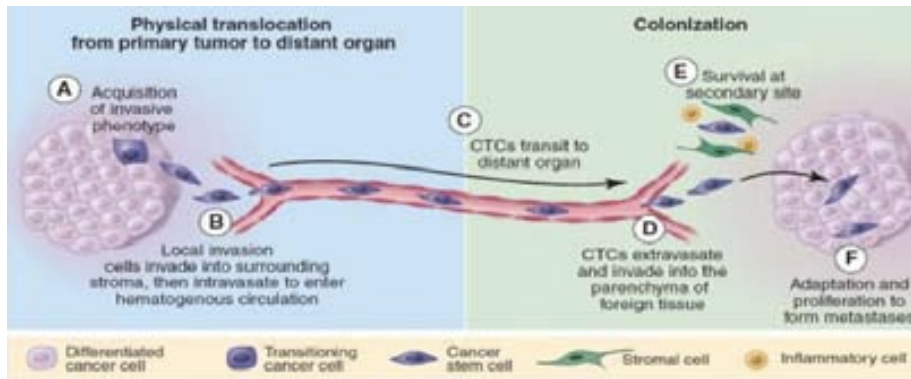


Figura 6. Cascada metastásica

Se han establecido diferentes teorías que explicarían porque cada tipo tumoral presenta cierta tendencia a formar metástasis en órganos específicos. Así, podemos diferenciar diferentes patrones de metástasis:

-Factores mecánicos (Virchow R, 1858). la propia anatomía del sistema circulatorio determina el lugar de metastatización de cada tumor, de manera que las células tumorales formarían metástasis en el tejido del primer microcapilar donde queden atrapadas

-"Soil and seed": las células metastásicas se establecen y proliferan donde encuentran un microambiente adecuado (Paget S, 1889)

-Adhesión: La diseminación está relacionada con la estructura anatómica del sistema vascular entre el tumor primario y los órganos secundarios (Ewing J, 1928).

-"Homing theory": Las células tumorales pueden expresar receptores a ciertas citoquinas que serían segregadas en ciertos tejidos (pulmón hueso, hígado..) que los harían más atractivos para la colonización por células cancerosas que otros que no las segregan (Moore et al., 2001).

-Nicho premetastásico: los tumores primarios producen factores que inducen la formación de un microambiente adecuado en sitios premetastásicos específicos antes de que acudan las células tumorales (Kaplan RN et al., 2006).

-Firma genética o modelo integrador: debido a un acúmulo de mutaciones genéticas ya existen algunas células en el tumor primario con capacidad de metastatizar. El perfil genético marcará la habilidad celular para colonizar órganos específicos. (Minn et al., 2005, Gupta GP et al., 2006).

1.1.4. EVOLUCIÓN DEL CÁNCER DE MAMA INFILTRANTE

Hoy en día se puede afirmar que el cáncer de mama no es una enfermedad localizada, sino que se trata de una enfermedad sistémica desde el inicio; ya que tumores pequeños y sin afectación axilar pueden hacer producir metástasis a distancia.

El comportamiento clínico del cáncer de mama se caracteriza por una historia natural muy prolongada y heterogénea entre pacientes. A pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento de estos tumores, se sigue observando que en muchos casos el cáncer de mama se comporta de manera muy agresiva con una mortalidad anual del 25%, similar a la de pacientes no tratadas; en otros casos su comportamiento es mucho más benigno con una supervivencia excelente a los 10 años, y una mortalidad anual 10 veces menor (2.5%) (Anderson WF et al., 2005). Esto se debe seguramente a que se trata de una enfermedad sistémica que puede presentar varios comportamientos de agresividad biológica.

Los diferentes aspectos que van a influir en su evolución natural son la velocidad de crecimiento tumoral, las vías de diseminación local y las vías de diseminación a distancia

-La velocidad de crecimiento determinará el tamaño tumoral al diagnóstico.

-Las vías de diseminación son la linfática y la hematógena, responsables de las recidivas locales y de las metástasis a distancia, respectivamente. Los ganglios más frecuentemente afectados son los axilares, seguidos de los de mamaria interna y en tercer lugar los supraclaviculares.

Es bien conocida la relación entre el tamaño del tumor y la presencia de metástasis ganglionares (Schairer C et al., 2004). Menos de un 5% de los tumores microinvasivos presentarán metástasis ganglionares en el momento del diagnóstico, porcentaje que se eleva al 45-50% en tumores con un diámetro superior a 3 cm. En relación a la diseminación hematógena, las localizaciones más frecuentes son: hueso, hígado, pulmón y sistema nervioso central (González-Merlo J et al., 2000).

1.1.5. FACTORES DE RIESGO

Únicamente el 12% de los pacientes con cáncer de mama tienen un factor de riesgo identificable (Fiorica J, 2001). Para poder determinar el grado de asociación entre la exposición a un determinado factor y el riesgo de padecer una enfermedad se utiliza el término Riesgo Relativo (RR) (Singletary SE, 2003).

Son muchos los factores de riesgo estudiados, encontrándose una asociación consistente para alguno de ellos (Rockhill B et al., 1998; Madigan MP et al., 1995) (Tabla 1). Sin embargo, los factores de riesgo más importantes, aquéllos que puedan variar de forma sustancial su incidencia, son factores difícilmente modificables.

FACTORES RIESGO	RR
Edad avanzada	>4
Antecedentes familiares	
Historia familiar cáncer mama<50a	>3
1 antecedente de I grado >50a	>2
2 o más antecedentes (madre, hermana)	>4
Antecedentes Personales	
Historia personal de cáncer	10
Mutación positiva BRCA1/BRCA2	30
Hiperplasia atípica	4-5
Carcinoma ductal in situ o carcinoma lobulillar in situ	8-10
Historia reproductiva	
Menarquia<12a	1,3
Menopausia tardía	1,3
Edad tardía de primer embarazo (>30a) o nuliparidad	1,4
Tratamiento hormonal sustitutivo	2
Anticonceptivas orales	1,2
Estilo de vida	
Peso corporal	1,6
Sedentarismo	1,2
Alcohol	1,4

Tabla 1. Factores de riesgo y RR

. Factores de riesgo en el cáncer de mama:

A. EDAD:

La incidencia de cáncer de mama aumenta con la edad, en especial a partir de los 50 años, duplicándose prácticamente cada 10 años (McPherson K et al., 2000).

B. RAZA:

La incidencia es más alta en la mayoría de los países desarrollados. Es interesante la observación del cambio de riesgo que experimentan las inmigrantes de bajo riesgo que se asientan en países de alto riesgo. La tasa se incrementa y adquieren un riesgo similar al del resto de la población de su nuevo país, ello es debido a la influencia de factores ambientales y al cambio de estilo de vida (Breast cancer incidence and mortality, 1992; Singletary SE, 2003).

C. MENARQUIA Y MENOPAUSIA

Aquellas pacientes que presenten una menarquia precoz, una menopausia tardía, alteración en los ciclos (ciclos menstruales cortos y mayor número de ciclos a lo largo de la vida fértil) se relacionan con un incremento en el riesgo de presentar cáncer de mama, debido a una mayor exposición a estrógenos y progesterona. Así aquellas mujeres que presentan la menopausia a partir de los 55 años muestran un RR de 1,22 en relación a aquellas que la experimentan antes de los 45 años (Singletary SE, 2003). Las mujeres que han sufrido una ooforectomía a los 35 años han reducido el riesgo en un 40% (Narod SA, 2006).

D. PARIDAD Y LACTANCIA

La nuliparidad y una edad tardía en el nacimiento del primer hijo se comportan como factores de riesgo, incrementando su incidencia. Si la primera paridad está por debajo de los 30 años el riesgo disminuye, y si está por encima el riesgo aumenta. En las mujeres portadoras de mutación BRCA la gestación no parece tener un efecto protector tan establecido (Milne RL et al., 2009). El efecto de los abortos (espontáneos o inducidos) no parece repercutir sobre el riesgo de cáncer de mama ni en la población general ni en las portadoras de BRCA (Bland K et al., 2007).

La relación de la lactancia y cáncer de mama ha sido muy controvertido. Sin embargo, estudios demuestran que la lactancia durante un periodo superior a 12 meses sería un efecto protector importante (Collaborative Group on hormonal factors in Breast Cancer, 2002).

E. ESTILOS DE VIDA

-Dietéticos: Un meta-análisis de varios estudios prospectivos concluyó que no observó ninguna relación entre la ingesta de grasas totales, saturadas, monoinsaturadas o poliinsaturadas y el riesgo de desarrollar cáncer de mama (Hunter DJ et al., 1996). Otro estudio encuentra la ingesta de vitamina C, alfa tocoferol, ácido fólico, alfa y beta carotenos, fibras dietéticas y fibras de frutas y verduras como factor protector (Toniolo P et al., 2001).

-Ejercicio físico: Las pacientes que refieren un mayor nivel de actividad física en contraste con las que refieren el nivel más bajo de actividad tendrían un RR de cáncer de mama ajustado por edad menor de 1 (Moore DB, 2000).

-Ingesta alcohólica y Tabaquismo: Estudios observacionales han mostrado que el consumo de alcohol está asociado con un leve incremento de riesgo de cáncer de mama, RR de 1,32 con ingestas de 35-44g/d (Hamajima N et al., 2002). Asimismo, esta asociación parece más fuerte en el cáncer de mama hormonosensible (Li CI et al., 2010).

El potencial papel del tabaquismo en la etiología del cáncer de mama ha sido motivo de estudio durante mucho tiempo pero sin encontrar una evidente asociación (U.S. Department of Health and Human Services; Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2002). No obstante, recientemente algunos estudios han encontrado que el tabaco puede aumentar el riesgo. Este incremento parece afectar a determinados grupos como mujeres que empezaron a fumar de muy jóvenes (Luo J et al., 2011).

-Fitoestrógenos: La ingesta habitual de compuestos fitoestrogénicos no se asocia a riesgo de cáncer de mama (Ma H et al., 2011) Los resultados son similares entre las mujeres premenopáusicas y postmenopáusicas.

F. PREDISPOSICIÓN GENÉTICA

La carga genética es el factor de riesgo que más puede hacer elevar la probabilidad de padecer cáncer de mama. Las mutaciones de alto riesgo representan únicamente el 5%-10% de todos los cánceres de mama (Campeau PM et al., 2008). Éstas incluyen mutaciones de los genes BRCA1, BRCA2, P53, PTEN y ATM.

Las mutaciones en el BRCA1 y BRCA2 suelen ir asociadas a una historia familiar positiva para cáncer de mama u ovario, edad precoz al diagnóstico, cáncer de mama en varones o múltiples cánceres diagnosticados en un mismo paciente.

Mutaciones en la línea germinal del p53 predisponen al síndrome neoplásico de Li-Fraumeni (incluyendo sarcomas infantiles y tumores cerebrales, así como a cáncer de mama de inicio temprano) y las de la vía del PTEN son responsables de la enfermedad de Cowden (de la cual el cáncer de mama es la característica principal).

G. ANTICONCEPTIVOS HORMONALES

De toda la bibliografía publicada se ha concluido que existe un pequeño incremento del riesgo en las usuarias en general (RR 1,24). El riesgo es mayor en aquellas usuarias de 10 o más años o en aquellas que inician la toma muy jóvenes y durante mucho tiempo y que las preparaciones trifásicas con levonorgestrel tendrían un riesgo ligeramente mayor que el resto.

H. TRATAMIENTO HORMONAL SUSTITUTIVO (THS)

Del análisis de varios trabajos (Estudio Collaborative, Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study, Women's Health Initiative study, Million women Study) se concluye que existe un aumento del RR con el uso de cualquier terapia hormonal, menor en usuarias de menos de 5 años (Tabla 2).

TIPO THS	TIEMPO DE USO DE THS	
	<5 años	>5 años
Estrógenos	1,21 (1,07-1,37)	1,34 (1,23-1,40)
Estrógenos+Gestágenos	1,70 (1,56-1,85)	2,21 (2,06-2,37)
Tibolona	1,32 (1,04-1,69)	1,57 (1,30-1,90)
Otros	1,35 (0,98-1,85)	1,54 (1,62-2,04)

Tabla 2. Million Women Study Collaborators, 2003.

I. TRATAMIENTO HORMONAL REPRODUCTIVO

En la actualidad no hay estudios prospectivos y aleatorizados que demuestren un aumento del riesgo con los distintos tratamientos de inducción de la ovulación.

J. ANTROPOMETRÍA

Se ha estimado que un aumento en el índice de masa corporal (IMC) aumenta el riesgo de cáncer de mama, sin embargo, esta relación no es igual en mujeres pre o postmenopáusicas. En mujeres postmenopáusicas, la obesidad incrementa el riesgo de cáncer de mama; el riesgo es de aproximadamente un 50% más alto en mujeres obesas (IMC >30Kg/m²) que en mujeres delgadas (IMC de 20 Kg/m²). Curiosamente, esta asociación no se observa en las mujeres premenopáusicas en las que la obesidad puede tener un pequeño papel protector (Bland K et al., 1997).

K. ENFERMEDADES DE LA MAMA

Se podría denominar como “riesgo histológico”, que es el riesgo que pueden tener determinados hallazgos histológicos encontrados en el resultado de una biopsia.

Riesgo leve (1,5-2): fibroadenoma complejo, hiperplasia florida, adenosis esclerosante, papiloma solitario.

Riesgo moderado (4-5): Hiperplasia atípica, ductal o lobulillar.

Riesgo alto (8-10): Carcinoma ductal in situ o lobulillar in situ.

La densidad mamaria aumenta el riesgo de forma independiente y dificulta el diagnóstico precoz por mamografía (Olsen AH et al., 2009) pero no se asocia al riesgo de mortalidad por cáncer de mama (Gierach GL et al., 2012).

L. RADIACIONES IONIZANTES

Existe una asociación bien establecida entre la exposición a la radiación ionizante y el riesgo de desarrollar cáncer de mama (John EM et al., 1993).

Se han diseñado modelos matemáticos que permiten cuantificar rápidamente el riesgo de desarrollar un cáncer de mama a una edad determinada. Estos datos no sólo facilitan la información a las pacientes sino que permiten al médico seleccionar las pacientes para estudios clínicos de prevención y establecer una estrategia para el manejo del riesgo.

Los dos modelos más conocidos son:

-El modelo de Gail: Estima el riesgo de cáncer in situ e invasor de mama (Gail et al., 1989). Incluye variables como la edad, edad de menarquia y del primer embarazo, historia familiar de primer grado con cáncer de mama, antecedentes de biopsias mamarias previas y la raza. Una modificación de este modelo fue propuesta por Costantino et al. en 1999, el cual calcula el riesgo de cáncer invasor solamente e incluye variables como tipo de histología de las biopsias previas respecto a la presencia o no de atípías y variaciones en la raza de las pacientes. No obstante, presenta ciertas limitaciones: no considera la edad del diagnóstico de los parientes con cáncer de mama, ni a los familiares de segundo grado, no especifica bilateralidad ni se refiere a antecedentes de cáncer de ovario (Costantino JP et al., 1999).

-El modelo de Claus: Diseñado para mujeres con antecedentes familiares de cáncer de mama (Claus et al., 1994). A diferencia del modelo de Gail, éste incluye antecedentes familiares tanto de primer como de segundo grado, y la edad de diagnóstico de ellos.

Es importante destacar que estos dos modelos no deben ser utilizados en pacientes con antecedentes personales de cáncer de mama o en portadoras de mutaciones genéticas.

Otros modelos: BRCA-program para determinar la probabilidad de ser portadora de mutaciones de BRCA1/2. Pacientes con probabilidad mayor al 5% de mutaciones para BRCA1/2 deben ser referidas a la unidad de alto riesgo genético y si la probabilidad de mutación BRCA1 y/o BRCA2 es mayor al 10%, hay que considerar la realización del test genético (Morrow et al., 2003).

1.1.6. HISTOPATOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA

Los tumores malignos infiltrantes de la mama pueden ser epiteliales, mesenquimáticos, mixtos, procesos linfoproliferativos o metástasis de tumores originados en otros órganos (Tavassoli FA et al., 2003; Tresserra F et al., 2008). La clasificación de la OMS contempla 18 tipos histológicos de cáncer infiltrante de mama siendo los más frecuentes:

A. TUMORES EPITELIALES

-Carcinoma ductal infiltrante (CDI)

Es el tipo histológico más frecuente (40-70%). Se caracteriza por una proliferación de células ductales que varían en tamaño, contenido citoplasmático y grado de diferenciación (Figura 7). En varias ocasiones se asocia a carcinoma intraductal. Las células del CDI suelen expresar E-cadherina que puede determinarse mediante inmunohistoquímica lo que permite diferenciarlo de otros tipos histológicos

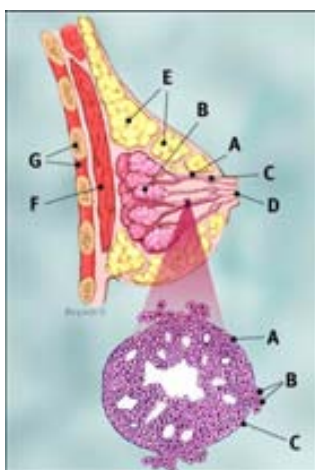


Figura 7. Carcinoma ductal infiltrante (www.breastcancer.org)

-Carcinoma lobulillar infiltrante (CLI)

Es el segundo tipo histológico en frecuencia y suele ser multicéntrico y bilateral. Representa entre el 5 y el 15% de los carcinomas invasivos. Se origina en los acinos glandulares (Figura 8). Se clasifica en sólido o clásico, alveolar y pleomórfico. No expresa E-cadherina (Tresserra F et al., 2010).

Este carcinoma se destaca por presentar dificultades diagnósticas desde el punto de vista clínico y radiológico, clínicamente se muestra como una masa palpable y en la mamografía aparece una distorsión arquitectural.

Existen diferencias en el patrón de metástasis a distancia, ya que son más frecuentes en hueso, tracto gastrointestinal, ovarios y útero.

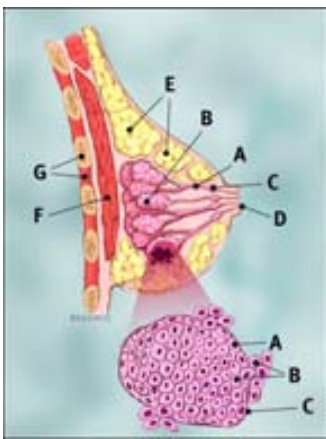


Figura 8. Carcinoma lobulillar infiltrante (www.breastcancer.org)

-Otros: Carcinoma medular, carcinoma tubular, carcinoma cribiforme infiltrante, carcinoma mucinoso, carcinoma papilar infiltrante,

B. TUMORES MESENQUIMÁTICOS

Se incluyen en este apartado los angiosarcomas, liposarcomas, osteosarcomas, leiomiomas.

C. METÁSTASIS

La mama puede presentar metástasis de tumores originados en otra localización. Los más frecuentes son los procesos linfoproliferativos, melanoma, pulmón, ovario, riñón y tiroides (Tresserra F et al., 2010).

1.1.7. FACTORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS

Cuando la neoplasia se diagnostica, aproximadamente el 40% de los casos presentan afectación ganglionar, y del 60% que no la presentan, el 20-35% presentarán recidivas tumorales (Weidner et al., 1995). Es por ello que adquiere una gran importancia el estudio de toda una serie de características que indicarán si el tumor se comportará de una forma agresiva o no, y poder establecer así un estrategia terapéutica adecuada.

Los **factores pronósticos** nos informan sobre la evolución de la enfermedad sin tratamiento, reflejando la mayor o menor agresividad del tumor. Los **factores predictivos** nos informan sobre la probabilidad de respuesta o resistencia tumoral a un tratamiento determinado (Buyse et al., 2010).

Clásicamente se han considerado como factores pronósticos clinicopatológicos la edad, el tamaño tumoral, el grado y tipo histológico y la afectación ganglionar, siendo éste último el de mayor importancia.

No obstante, en la última década gracias al avance científico y al desarrollo de nuevas técnicas de investigación se han descubierto un gran número de marcadores biológicos que nos permiten la posibilidad de ofrecer un tratamiento más específico, y son varios los estudios dirigidos a determinar su validación definitiva.

Se han establecido 3 categorías que clasifican los marcadores tumorales según su evidencia de utilidad clínica y recomendación de uso en la práctica (Figura 9).

• Categoría 1.- FP convencionales de utilidad demostrada en clínica. Importancia pronóstica comprobada.	
Dependientes del tumor:	
Ganglios axilares	Invasión vascular y linfática
Tamaño tumoral	Receptores hormonales
Tipo histológico	Oncogén HER2
Grado histológico	Ki 67
Dependientes de la enferma:	
Edad	
• Categoría 2.- FP reconocidos y bien estudiados clínica y biológicamente. Pendientes de validar su utilidad clínica.	
Índice de proliferación celular: Índice mitótico. Captación timidina. Fase S.	
p53	
Angiogénesis	
Activador/Inhibidor del Plasminógeno: uPA, PAI 1	
• Categoría 3.- FP pendientes de validar.	
Células circulantes en sangre periférica.	
Micrometástasis medulares.	
Perfil genético	

Figura 9. Factores pronósticos y predictivos (Modolell et al., 2012).

Se puede considerar que actualmente la medicina evoluciona hacia terapias más personalizadas y con ello los factores predictivos moleculares y biológicos van adquiriendo más importancia frente a los factores pronósticos clásicos.

1.1.7.1. FACTORES CLÁSICOS

A. EDAD

Las mujeres mayores postmenopáusicas tienen mayores concentraciones de receptores estrogénicos en el tumor y presentan características de buen pronóstico (bien diferenciados, índice bajo de proliferación). En cambio, las mujeres menores de 35 años presentan tumores con factores patológicos adversos (grado histológico alto, invasión linfovascular), tamaño tumoral grande, mayor afectación ganglionar, receptores hormonales negativos (Keegan TH et al., 2012).

B. TAMAÑO TUMORAL

Es un ítem importante para la clasificación TNM y para la selección del tratamiento adyuvante. El tumor debe ser medido al menos en dos dimensiones y la mayor es utilizada para la estadificación.

La relación entre el tamaño y el pronóstico es prácticamente lineal, a mayor tamaño peor pronóstico. El tamaño también afecta el compromiso axilar, existe afectación axilar en aproximadamente el 15% de las pacientes con tumores menores de 1,1cm, en relación al 60% de los tumores mayores de 5,5cm (Henson et al., 1991).

La última edición del AJCC Cancer Staging Manual establece que el tamaño microscópico del componente infiltrante del tumor es el único dato que se debe tener en cuenta para el estadiaje T del cáncer de mama, ya que se han demostrado diferencias importantes entre el tamaño macroscópico y microscópico, así como que la medición del componente infiltrante es la única que se correlaciona con el pronóstico (Abner AL et al., 1998).

C. TIPOS HISTOLÓGICOS

La histología por si sola no define el pronóstico de las pacientes y depende del del estadio al diagnóstico. En relación con estos criterios y según el tipo histológico, los tumores pueden agruparse en categorías de distinto pronóstico (Tabla 3)

PRONÓSTICO EXCELENTE	PRONÓSTICO BUENO	PRONÓSTICO INTERMEDIO	PRONÓSTICO MALO
-Carcinoma tubular -Carcinoma cribiforme -Carcinoma mucinoso -Carcinoma tubulo-lobulillar -Carcinoma metaplásico con componente tipo fibromatosis -Carcinoma adenoide quístico	-Carcinoma tubular mixto -Carcinoma lobulillar clásico	-Carcinoma medular -Carcinoma lobulillar, variante	-Carcinoma ductal infiltrante -Carcinoma lobulillar pleomórfico -Carcinoma micropapilar infiltrante -Carcinoma inflamatorio

Tabla 3. Clasificación histológica según pronóstico

D. MÁRGENES DE RESECCIÓN

La presencia de células neoplásicas en el margen de resección aumenta el riesgo de recidiva local tras tratamiento conservador. Se define como afectación de márgenes, la presencia de células tumorales en contacto directo con la tinta china con la que se marca el borde.

E. NECROSIS TUMORAL

La necrosis tumoral es un fenómeno que va asociado a tumores de alto grado y por lo tanto de mal pronóstico. Su presencia parece ser que disminuye la supervivencia y por ello se ha incluido en algunos sistemas de gradación (Tavassoli et al., 1999; Tresserra F et al., 2008).

F. GRADO HISTOLÓGICO

Tumores poco diferenciados presentan más riesgo de metástasis y peor supervivencia global, independientemente del tamaño tumoral o el estado de los ganglios axilares (Pinder SE et al., 1998).

Algunas evidencias sugieren que además de ser un factor pronóstico, el grado de diferenciación puede ser un factor predictivo de respuesta a la quimioterapia, utilizándose para tomar decisiones de tratamiento adyuvante. (Harris JR et al., 2004). La combinación del tipo histológico y del grado, proporciona una mejor estimación del pronóstico, que el grado histológico sólo (Tavassoli FA et al., 2003).

El método de gradación de los carcinomas de mama, debe realizarse en todos los tipos histológicos del carcinoma infiltrante de mama, a excepción del carcinoma medular. La clasificación mas utilizada es la escala de Scarff-Bloom Richardson modificada por Elston y Ellis y el Índice Pronóstico de Nottingham (NPI) (Bloom HJG et al., 1957; Elston CW et al., 1991; D'Eredita G et al., 2001; Elston CW, 2005) (Figura 10).

Escala Scarf-Bloom-Richardson (Bloom HJG et al., 1957):

-Formación túbulos: 1-3

-Pleomorfismo nuclear y citoplasmático: 1-3

-Índice mitótico: 1-3

- Grado I (bien diferenciado): entre 3 y 5
- Grado II (moderadamente diferenciado): entre 6 y 7
- Grado III (pobremente diferenciado): entre 8 y 9.

Índice Pronóstico Nottingham NPI (D'Eredita G et al., 2001):

Consta de SBR modificado Elston y Ellis, y tiene en cuenta el tamaño y los ganglios.

$NPI = 0.2 \times \text{tamaño tumoral (cm)} + \text{estadio ganglionar (1,2,3)} + \text{grado histológico (1,2,3)}$.

- Estado ganglionar: $n0=1$, $N1-3=2$, $N>3=3$
- Grado histológico: $G1=1$, $GII=2$, $GIII=3$.

NPI Score	Pronóstico	Supervivencia 15 años
2,0-2,4	Excelente	87%
2,4-3,4	Buena	80%
3,4-5,4	Moderada	42%
>5,4	Pobre	13%

51

Figura 10. Sistemas de gradación

G. COMPONENTE INTRADUCTAL

Debido al componente intraductal, estas pacientes tienen mayor frecuencia de márgenes afectos y más recidivas locales. En estos casos es importante extirpar la lesión con un margen de seguridad suficientemente amplio (al menos 1cm). Inicialmente se observó que pacientes con dicho componente presentaban mayor índice de recidivas, pero en estudios recientes se ha demostrado que si los bordes quirúrgicos están libres, la presencia de un CIS no es un factor pronóstico independiente de recidiva local, sino que además va asociado a un aumento de la supervivencia resultando ser un factor pronóstico independiente favorable (Wong H et al., 2010; Carabias et al., 2011).

Una situación a tener en cuenta es la existencia de un componente intraductal extenso definido como la presencia de carcinoma intraductal en más de un 25% del área del tumor infiltrante y en la periferia del mismo. Cuando un carcinoma infiltrante tiene un componente intraductal, la medida que debe establecerse para la clasificación TNM es solamente la del componente infiltrante (Tresserra F et al., 2008).

H. AFECTACIÓN GANGLIONAR

La afectación ganglionar axilar continúa siendo uno de los principales factores pronósticos. Se considera que todas las mujeres con compromiso axilar deben recibir tratamiento sistémico adyuvante (Goldhirsch A et al., 2003) ya que aproximadamente el 70% de las pacientes con ganglios positivos recidivan a los 10 años frente al 30% de las pacientes con ganglios negativos (Hilsenbeck SG et al., 1998).

En el 2002 la AJCC (American Joint Committee on Cancer) incluyó el número de ganglios en la clasificación TNM, siendo importante la distinción entre ausencia de afectación, de 1 a 3 ganglios afectados, de 4 a 9, y más de 10 ganglios linfáticos.

Clásicamente, el estudio axilar se realizaba mediante la linfadenectomía axilar (LA) pero hoy en día, se ha visto desplazada por el tratamiento conservador mediante la detección del ganglio centinela (GC). Como consecuencia de la mayor exhaustividad con la que se estudia el GC ha aumentado el número de metástasis de pequeño tamaño hasta el punto que ha comportado nuevas definiciones en el sistema TNM de estadificación por la AJCC.

Los cambios en la 6ª edición agrupan las metástasis en tres grupos según sus distintas implicaciones pronósticas (macrometástasis, >2mm; micrometástasis, 0,2-2mm y células tumorales aisladas (CTA), <0,2mm). La nueva clasificación TNM también incluye las metástasis en ganglios infra y supraclaviculares como N3, y tienen en cuenta la afectación metastásica de los ganglios linfáticos de la cadena mamaria interna ya que conlleva un peor pronóstico disminuyendo la supervivencia a los 10 años.

Los focos microscópicos metastásicos pueden detectarse entre el 9 y el 13% de los casos de "axila negativa", exclusivamente con hematoxilina-eosina, y entre el 15 y el 20% de los casos con técnicas inmunohistoquímicas (Fitzgibbons PL et al., 2000).

Recientemente, se ha introducido la posibilidad de su estudio intraoperatorio, OSNA (One-step-nucleic acid amplification) con una concordancia del 95,5% con el estudio histológico "convencional" (Schem C et al., 2009). La técnica OSNA es un nuevo método de detección de células tumorales en el GC que consiste en la medición cuantitativa de copias de mRNA de la citoqueratina 19 (mRNA-CK19). Dicho mRNA-CK19 se utiliza como marcador en el cáncer de mama debido a su alta expresión en células tumorales y baja expresión en las células normales del ganglio linfático (Tsujiimoto M et al., 2007). La duración del método OSNA es de 30 minutos aproximadamente, lo que permite su realización intraoperatoria. sin necesidad de un estudio postoperatorio, con una cirugía de un solo tiempo.

La identificación de micrometástasis varía mucho de unas instituciones a otras, llegando a un rango del 0% al 25%. El uso de OSNA puede aumentar la detección de micrometástasis en el GC respecto al estudio histológico convencional. El estudio de Snook et al., 2011, muestra hasta un 50% de casos positivos de micrometástasis en OSNA con histología convencional negativa. Algunos grupos (Osako T et al., 2011) han estudiado la utilización de la técnica OSNA para la evaluación de los ganglios obtenidos en la linfadenectomía publicando cifras de detección extra de un 30% (respecto a un 1,6% en histología convencional).

A pesar del valor pronóstico de la estadificación axilar la morbilidad que comporta la LA ha obligado a valorar la real necesidad de realizarla en todos los casos con GC afecto, basándose en el supuesto buen pronóstico de todas las metástasis de pequeño volumen. Hasta ahora la presencia de micrometástasis se ha asociado a una ligera disminución de la supervivencia libre de enfermedad y/o global, lo que no se ha demostrado para la presencia de células tumorales aisladas (CTA) (Harris JR et al., 2004).

Está contemplado en la mayoría de las guías que el diagnóstico de CTA en el GC no implica realizar LA, pero el tema es más controvertido para las micrometástasis.

Son numerosos los estudios publicados en la literatura acerca del valor de las micrometástasis con resultados muy dispares por lo que su pronóstico permanece incierto y se desconoce el beneficio adicional de la linfadenectomía y de tratamiento sistémico adyuvante.

El estudio de cohortes holandés MIRROR (De Boer M et al., 2009) muestra un 5% de recaídas axilares entre las 141 pN1mic sin LA con un HR de 1,56 respecto a LA. La administración de quimioterapia adyuvante tras la identificación de células aisladas o de micrometástasis disminuye la tasa de recurrencias y la supervivencia libre de enfermedad en los cinco años posteriores.

El grupo de Milán publicó en el 2009 un estudio prospectivo con 8200 pacientes, en el que encontraron como factores de riesgo independientes para metástasis: tamaño tumoral >2cm, sobreexpresión de HER2, y Ki-67>20%. La presencia de micrometástasis en el GC no constituye un factor de riesgo para metástasis en su estudio (Montagna E et al., 2009).

Actualmente existe una tendencia a omitir la LA en pacientes pN1mi. Esta tendencia parece estar justificada por:

-Ensayo Z0011 de ACOSOG (Giuliano AE et al., 2011). El grupo de pacientes con metástasis en GC fueron randomizadas en dos grupos, las que se sometieron a LA (420 pacientes) y aquellas a las que no se les realizó disección axilar (436 pacientes). El estudio concluyó que no existen diferencias significativas en recaída local ni supervivencia con un seguimiento medio 6,3 años con/sin LA tras GC positivo.

-Estudio del Institut Català d'Oncología (Pernas S et al., 2009): ninguna de las 59 pacientes pN1mi sin LA (76%) presenta recurrencia axilar ni metástasis a los 5 años de seguimiento.

-Estudio de Milán (Galimberti V et al., 2012): 209 pacientes con micrometástasis en GC, recaída axilar 1,6% con 5 años de seguimiento, siendo el tamaño tumoral y el grado histológico los factores pronósticos independientes de recaída axilar.

-El estudio prospectivo multicéntrico AATRM 048/13/2000 (Solá M et al., 2013) que incluye 247 pacientes (T<3.5cm, N0 clínico y M0) randomizadas en LA o control clínico y no muestra diferencias en cuanto a la supervivencia libre de enfermedad ni en muertes asociadas al cáncer de mama.

Todos estos estudios han conllevado que en la guía National Comprehensive Cancer Network (NCCN) ya se valore la posibilidad de evitar LA tras GC en pacientes con metástasis axilares (GC positivo, sin especificar micro o "macro" metástasis).

I. INVASIÓN LINFOVASCULAR (IVL)

La IVL es factor que se correlaciona con un mal pronóstico (Fitzgibbons PL et al., 2000). En el último consenso de St. Gallen se incluyó como factor pronóstico para la selección del tratamiento adyuvante (Goldhirsch A et al., 2005). La supervivencia libre de enfermedad a 7 años con IVL y grado alto es de 67% frente al 92% sin IVL y grado bajo (Leitner SP et al., 1995)

1.1.7.2. FACTORES BIOLÓGICOS Y MOLECULARES

A. RECEPTORES HORMONALES (RH)

Se determinan mediante tinciones de inmunohistoquímica y son un poderoso factor pronóstico y predictivo de respuesta a la hormonoterapia y a la quimioterapia. La expresión de receptores estrógeno (RE) y progesterona (RP) positivos se asocia a menor agresividad tumoral. Es útil repetir la determinación de RH en las metástasis y recidivas locales, ya que el pronóstico en estos casos empeora cuando el tumor inicial fue positivo y posteriormente se negativiza. En el consenso de St. Gallen del 2009 se consideró que la hormonoterapia está indicada en todos los casos en que haya expresión de RE, prescindiendo de los RP. No obstante, los tumores con

elevada expresión de RE y RP son los que más se benefician del tratamiento hormonal.

B. ONCOGEN HER2

Se encuentra amplificado entre el 15% y el 30% de los carcinomas de mama. Es un importante factor predictivo de respuesta a la quimioterapia con antraciclinas y al tratamiento antidiaria con el anticuerpo anti-HER2 (trastuzumab, pertuzumab) y Lapatinib.

El método de detección es inmunohistoquímico (IHQ) y semicuantitativo, obteniéndose una gradación que va del 1 al 3. Se considera positivo si se detecta una alta expresión (+++/+++ en más del 30%). Si la expresión es moderada (++/+++) debe confirmarse mediante técnicas de hibridación in situ con fluorescencia (FISH), o su equivalente CISH (chromogenic in situ hybridation) que tiene la ventaja de ser una tinción permanente en el tiempo y no temporal como el FISH (Wolf A et al., 2007).

C. Ki67

Informa del índice de proliferación celular. La actividad de este antígeno se detecta por el anticuerpo monoclonal MIB-1.

Valores altos se correlacionan con mal pronóstico, asociándose a tumores de alto grado histológico, afectación ganglionar o ausencia de receptores hormonales. En el Consenso St.Gallen 2011 se ha incluido la expresión cuantitativa del Ki67 para definir los subtipos biológicos del cáncer de mama (considerando <14% bajo, > 14% alto) (Goldhirsch A et al., 2011). A parte de su valor pronóstico, estudios recientes sugieren que tiene un valor predictivo de respuesta hormonal adyuvante, la eficacia del tratamiento con Letrozol es mayor en los tumores con elevada expresión de Ki67 (Viale G et al., 2008).

D. PROTEÍNA p53

La mutación de TP53 se observa entre el 20%-30% de los carcinomas de mama, y parece asociarse a un pronóstico adverso, y en algunos estudios a resistencia al tratamiento quimioterápico. Aunque existen autores que no dan valor pronóstico a este marcador en las pacientes con ganglios linfáticos negativos (Rosen et al., 1995) otros estudios demuestran su significación pronóstica con independencia del estatus ganglionar (Molina et al., 1998, Axelrod D et al., 2012) correlacionándose con mayor agresividad tumoral, HER2 + y Ki67 alto. Debido a esta gran disparidad entre diferentes estudios la detección de p53 no ha sido aceptada como marcador de cáncer de mama.

E. ANGIOGÉNESIS

La neoangiogénesis está regulada por el factor del endotelio vascular (VEGF) cuya presencia se relaciona con un peor pronóstico. Su importancia radica no sólo en su interés pronóstico sino también por su carácter predictivo gracias a la incorporación de fármacos antiangiogénicos (Bevacizumab).

Recientes ensayos clínicos han tratado de definir el papel de Bevacizumab, un anticuerpo monoclonal contra VEGF en el tratamiento del cáncer de mama metastásico. Tres grandes ensayos randomizados en pacientes metastásicas, ECOG-E2100, AVADO y RIBBON-1 (Miller K et al., 2007; Miles DW et al., 2010; Robert NJ et al., 2011) han demostrado mejoría en la supervivencia libre de progresión con el empleo de Bevacizumab combinado con diferentes quimioterapias como tratamiento de primera línea. Sin embargo no ha demostrado aumento en la supervivencia global de estas pacientes, y debido a su elevado coste, no ha sido aprobado por la FDA, aunque sí por la EMA.

F. ACTIVADOR/INHIBIDOR DEL PLASMINÓGENO

El plasminógeno es activado por los PAs (activadores del plasminógeno) entre ellos la uPA (activador del plasminógeno urokinasa) y la tPA (activador del plasminógeno tipo tisular), las cuales facilitan el crecimiento y la migración celular. Este proceso

puede ser inhibido por las moléculas PAI-1 y PAI-2. En el cáncer de mama se ha visto que niveles altos de uPA, tPA y PAI-1 se asocia a un peor pronóstico (Leissner P et al., 2006).

G. MICROMETÁSTASIS EN MÉDULA ÓSEA

La presencia de micrometástasis en médula ósea es un factor independiente de mal pronóstico (Braun et al., 2005) ya que las pacientes con micrometástasis medulares tienen tendencia a presentar tumores de mayor tamaño, mayor grado histológico, afectación ganglionar y receptores estrogénicos negativos.

H. CÉLULAS CIRCULANTES EN SANGRE PERIFÉRICA (CTC)

Mediante las técnicas con PCR pueden detectarse células tumorales circulantes y células endoteliales en la sangre periférica. Se ha establecido una relación entre CTC y pronóstico adverso ya que la presencia de cinco o más células circulantes es un factor de peor respuesta a la quimioterapia y menor supervivencia (Cristofanilli M et al., 2005; Pierga JY et al., 2011). Asimismo, se puede detectar la expresión de HER2 en las CTC que justifique un tratamiento con trastuzumab en un tumor primario que no expresa HER2 (Hayashi N et al., 2012).

I. BCL2

El protooncogén bcl-2 codifica una proteína que inhibe la apoptosis. Se expresa en el epitelio glandular normal, pero es sobrepresado en el 25%-50% de los cánceres de mama. Sin embargo, la expresión de bcl-2 en cáncer de mama se asocia a factores pronósticos favorables, tales como menor tamaño tumoral, ER positividad, y el bajo grado nuclear.

Estudios recientes han relacionado el bcl-2 como predictor de respuesta patológica completa a la quimioterapia. Los tumores con baja expresión de bcl-2 presentan mayor respuesta a la quimioterapia neoadyuvante basada en Antraciclinas (Dickinson PD et al., 2011). No obstante, son necesarios más estudios para establecer el bcl-2 como marcador de buena respuesta a la quimioterapia.

J. PERFIL GENÉTICO

En el 2000 Charles Perou et al. publicó en Nature los resultados del estudio de microarrays de DNA en el que mostró que los tumores se podían clasificar en subtipos según su expresión genética, dividiendo los tumores en 2 grupos principales: los que expresaban genes relacionados con RH y los que no los expresaban. Se identificaron 4 subtipos: luminal, basal like, HER2 positivo y normal-like, y cada uno de ellos presenta diferentes implicaciones pronósticas, las cuales serán comentadas detalladamente en un tema más adelante.

K. OTROS FACTORES

Todavía se encuentran en estudio y en fase de validación: el índice mitótico, captación de timidina, Fase S, COX-2, la topoisomerasa IIa y el protooncogen c-Myc.

Podemos decir que los estudios actuales están orientados a analizar las proteínas expresadas por los diferentes genes ya que cada una de ellas puede experimentar numerosas modificaciones en respuesta a microambientes diferentes. Por lo que se ha sugerido que la era Proteómica es el siguiente paso después de la Genómica (Figura 11)

□

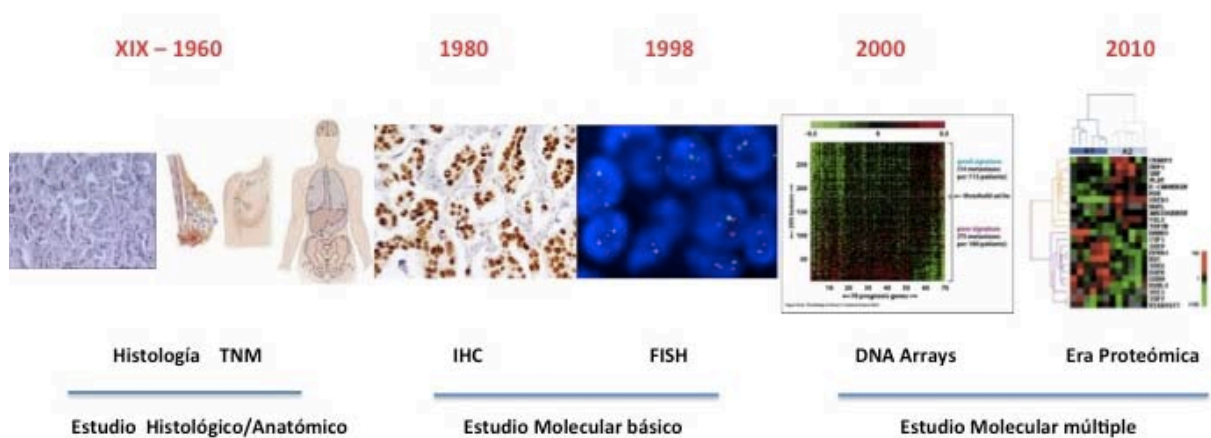


Figura 11. Evolución de los marcadores pronósticos y predictivos

1.2. PERFIL GENÉTICO

1.2.1. CLASIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS TUMORES

El cáncer de mama presenta una gran heterogeneidad tumoral, ésta es la causante de que no todas las pacientes responden igual al tratamiento sistémico. En el año 2000 Charles Perou et al. estudió la diversidad biológica del cáncer de mama mediante la identificación de diversos subtipos tumorales según sus patrones de expresión genética usando microarrays de DNA (Figura 12).

Esta nueva clasificación molecular ayudaría a comprender la biología tumoral del cáncer de mama y su heterogeneidad. Se identificaron 5 subtipos, dos de los cuales derivan de tumores hormonopendientes (subtipos luminal A y luminal B) y 3 de tumores con receptores hormonales negativos (subtipos HER2 positivo, basal like y normal-like) (Perou CM et al., 2000).

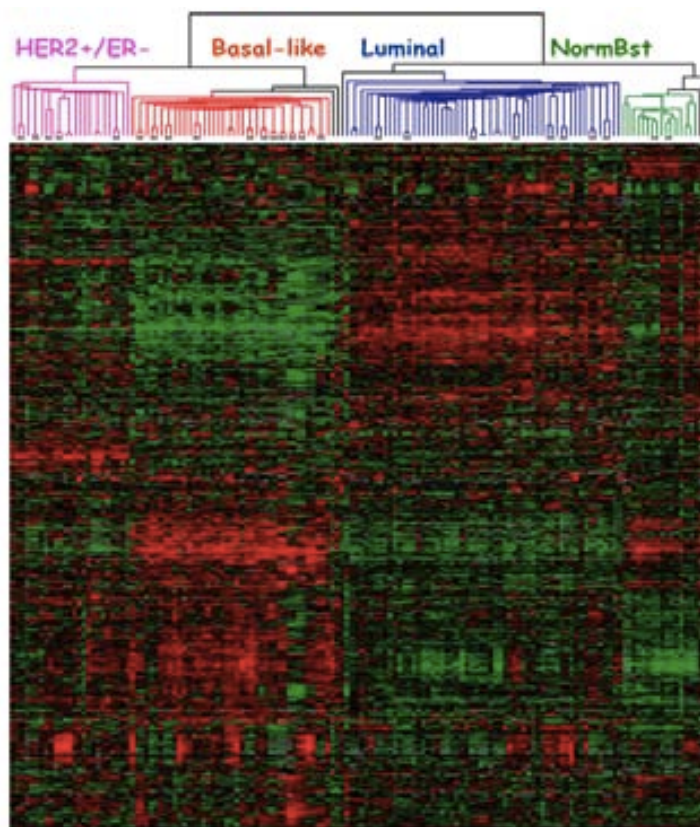


Figura 12. Expresión génica en los distintos subtipos genómicos.
El color verde representa genes con baja expresión y el rojo los genes sobreexpresados.

Pero estos análisis genómicos no se aplican rutinariamente en todos los hospitales, por lo que la clasificación inmunohistoquímica correlacionada con los diversos perfiles moleculares continúa siendo la técnica para evaluar el riesgo de recidiva y estimar el probable efecto de terapias específicas.

Las características clínicopatológicas de cada uno de los grupos son las siguientes (Figura 13):

A. Luminal

- Constituye el 75-80% de los carcinomas de mama.
- Alta expresión de genes asociados a células epiteliales luminales.
- Expresan receptores de estrógeno.
- Se diferencian dos subtipos de distinto pronóstico y evolución:

. Luminal A:

- Receptores de estrógeno y progesterona positivos. HER2 negativos. Ki67 <14%.
- Se caracterizan por su buen pronóstico.
- Alta tasa de respuesta a la hormonoterapia.

. Luminal B

- Expresión moderada baja de receptores de estrógeno y Ki67>14%.
- Según la expresión de HER2 existen dos subgrupos: los Luminal B HER2- y Luminal B HER2+

B. HER2 positivos

- Receptores estrógenicos negativos. Expresión de HER2.
- Se asocian a un peor pronóstico que los luminales.

C. Basal-like o Triple Negativos

- Expresión de genes característicos de las células mioepiteliales basales.
- Receptores estrógeno y progesterona negativos. HER2 negativo.
- Se asocia a un mal pronóstico clínico.
- Más común en mujeres jóvenes.
- Asociado a mutaciones de p53 y BRCA1.

D. Normal-like

-Deriva de las células mioepiteliales.

-No tiene correlación clínica por lo que no se utiliza a nivel práctico.

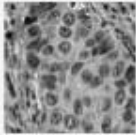
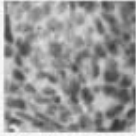
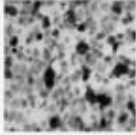
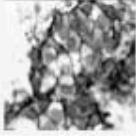
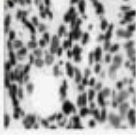
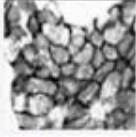
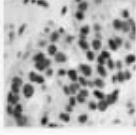

• LUMINAL A : RE +++, RPg +++, HER2 -		
ER+++		Alta expresión genes RE.
HER2-		Baja expresión genes proliferación. Bajo grado. Alta tasa respuesta a hormonoterapia. Escaso beneficio quimioterapia. Subgrupo de mayor pronóstico.
• LUMINAL B, HER - : RE + RPg +/-, HER2 -		
ER+		Moderada/baja expresión de genes RE.
HER2-		Mayor expresión genes de proliferación. Ki67 alto.
Ki67+		Beneficio de la QT + HT. Riesgo medio.
• LUMINAL B, HER + : RE + RPg +/-, HER2 +		
ER+		Moderada expresión de genes RE.
HER2+		Mayor expresión genes de HER2. Cualquier nivel Ki67. Beneficio de la QT, HT, anti HER2. Riesgo medio/alto.
• HER2 + : HER2 +++, RE -		
ER-		Alta expresión de genes relacionados con la amplificación de HER2. Receptores hormonales negativos. Mal pronóstico.
HER2+++		Alta tasa de respuestas a QT con antraciclínicas y taxanos. Tratamiento anti HER2.
• BASAL-LIKE - Triple negativo : RE -, RPg -, HER2 -		
ER-		EGFR + CK 5/6
HER2-		Expresión genes proliferación. Mutaciones P53. Relacionado con BRCA1.
PgR-		Grado alto. Mal pronóstico. Quimiosensibles.

Figura 13. Características de los subtipos según la clasificación molecular (Modolell et al., 2012)

Posteriores estudios (Sørli T et al., 2001; Prat A et al. 2010) confirmaron que cada tipo molecular tenía una evolución clínica y pronóstico diferente, siendo los tumores luminal A los de mejor pronóstico y los triples negativos los de peor.

Herschkowitz JI et al. describieron en el 2007 un posible nuevo subtipo denominado claudin-low, que se incluiría en el grupo de triples negativos y caracterizado por la baja expresión de genes de moléculas de adhesión. Este nuevo subtipo podría tratarse de tumores derivados de las stem cells tumorales (Foulkes W et al., 2010).

Recientemente, el mismo grupo de Perou ha perfeccionado la correlación clínicopatológica de la clasificación molecular definiendo la importancia pronóstica de los receptores de progesterona (Prat A et al., 2012). Este estudio muestra que las pacientes con tumores luminales con receptores de progesterona bajos presentan un peor pronóstico que los tumores luminales con receptores progesterona elevados, concluyendo que la nueva definición inmunohistoquímica de tumores luminal A serían: receptores estrógenos positivos, HER2 negativo, Ki67<14% y receptor progesterona >20%.

1.2.2. FIRMAS GENÉTICAS

Hasta ahora los criterios utilizados para identificar que pacientes se beneficiarían de una quimioterapia eran la edad, tamaño tumoral, afectación ganglionar, grado histológico y estado de receptores hormonales. Pero hoy en día, la tecnología de DNA microarray permite clasificar los tumores según su expresión genética y definir con más exactitud cuales son quimiosensibles o no. Actualmente existen varias firmas genómicas capaces de predecir la respuesta a un determinado tratamiento.

-MammaPrint®

En el 2002 Van 't Veer et al. del Netherlands Cancer Institute identificaron 70 genes que permitían clasificar los tumores en buen y mal pronóstico, la firma estaba basada en pacientes menores de 61 años, con ganglios negativos y tumores menores de 5 cm. Posteriormente, esta serie fue ampliada con 295 pacientes (Van

de Vijver MJ et al. 2002). Este estudio demuestra que cuando la firma genética es de mal pronóstico se asocia a un mayor riesgo de metástasis a distancia. Las pacientes en las que la firma predecía un buen pronóstico tenían una supervivencia global a los 10 años de 94,5% mientras que las de mal pronóstico del 54,6%.

En el estudio MINDACT, cuando MammaPrint resultaba de bajo riesgo y la valoración según criterios pronósticos tradicionales era de alto riesgo clínico, y no se administró tratamiento adyuvante con quimioterapia, la SLE fue del 92% (Rutgers E et al., 2010). El estudio MINDACT se cerró en el 2011 y está pendiente de resultados analíticos.

Una de las limitaciones era que sólo se determinaba en tejido en fresco o congelado, pero ahora también es posible en tejido parafinado.

Se puede considerar que MammaPrint aporta información pronóstica pero no tiene un valor predictivo de los tratamientos realizados.

-Oncotype DX®

Fue el primer test validado clínicamente (Paik S et al., 2004). Se basa en la detección de 21 genes correspondientes a pacientes en estadios I y II, ganglios negativos y receptores estrogénicos positivos, candidatas a ser tratadas con tamoxifeno. Según el "recurrence score" (RS) permite estratificar a las pacientes en tres niveles de riesgo de recidiva: riesgo bajo (RS<18), riesgo medio (RS 18-30) y riesgo alto (RS ≥30).

Se observó que en pacientes con RS elevado el uso de la quimioterapia mostraba un impacto estadísticamente significativo tanto en la SLE como SG. Este beneficio era muy bajo o nulo en las pacientes que presentaban un RS de bajo riesgo. Las pacientes clasificadas en riesgo bajo, medio y alto, presentaron unas tasas de recurrencias a distancia a 10 años de 6,8%, 14,3% y 30,5% respectivamente, independientemente de la edad y del tamaño tumoral.

Se determina en tejido parafinado. A diferencia de MammaPrint, Oncotype DX tiene un valor pronóstico y predictivo del uso de Tamoxifeno y quimioterapia. Se ha

validado para valorar la probabilidad de recurrencia a distancia en pacientes con cáncer de mama, con ganglios negativos y receptores hormonales positivos en tratamiento con tamoxifeno (Gruvberger S et al., 2001).

Tanto ASCO como NCCN han agregado el Oncotype DX a sus pautas de tratamiento. Pero la validación más importante se obtendrá con los resultados del estudio prospectivo TAILORx que comenzó en 2006 y ha reclutado aproximadamente 7000 pacientes.

-PAM 50®

La firma genética PAM 50® (Prediction Analysis of Microarray) es una plataforma genética de 50 genes que clasifica el tumor en: Luminal A, Luminal B, Basal, HER2 y Normal like.

Las pacientes Luminal A y pN negativos no son candidatas a recibir quimioterapia.

El estudio TRANSATAC que compara Oncotype DX versus PAM50 concluye una mayor información de los grupos intermedios de Oncotype DX por el PAM50 (Nielsen TO et al., 2010). Se practica tanto en RE+ como RE-.

-Otras firmas genéticas: Rotterdam Signature Test, Breast Cancer Gene Expression (BCGE), MapQuant Dx® Genomic

En la tabla siguiente se exponen las diferentes plataformas genéticas con sus características más importantes:

Tests genéticos	Oncotype	Mammaprint	PAM50	Rotterdam Signature Test	BCGE Avaria H/I Test
Laboratorio	Genomic Health	Agendia	Arup Laboratories	No comercializado	Biotheranostics
Genes	21 genes	70 genes	50 genes	76 genes	Ratio de 2 genes HOXB13/IL17R
Muestra	Parafina	Fresco, congelado, parafina	Parafina	Fresco, congelado	Parafina
Técnica	Q-RT-PCR	DNA microarrays	Q-RT-PCR	RNA microarrays	Q-RT-PCR
Indicación	RE+ N-	RE+, RE- N-	RE+, RE- N+, N-	RE+, RE- N-	RE+ N-
Utilidad	Valor pronóstico y predictivo Tamoxifeno y QT	Valor pronóstico	Valor pronóstico y predictivo QT	Valor pronóstico	Valor pronóstico y predictivo Tamoxifeno
FDA	No	Sí	No	-	No
Disponibilidad	Europa USA	Europa USA	USA	-	USA

Tabla 4. Firmas genéticas

1.3. NEOADYUVANCIA

1.3.1. QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE

El concepto de la neoadyuvancia radica en que el cáncer de mama no sólo es una enfermedad locoregional, sino también sistémica. Halsted consideró que se trataba de una enfermedad puramente locoregional, y estableció como tratamiento las mastectomías radicales con linfadenectomía axilar completa (Halsted W, 1907). No obstante, la cirugía no siempre ha podido tratar todos los cánceres de mama, incluso en estadios precoces. En los años 90, Bernard Fisher demostró la diseminación precoz hematógena de micrometástasis a distancia y justificó el uso de un tratamiento quirúrgico más conservador asociado a la radioterapia y a la quimioterapia (Fisher B et al., 1989). Esta nueva vía de investigación permitió la introducción del concepto del tratamiento neoadyuvante.

La quimioterapia neoadyuvante (QNA) consiste en la administración de citostáticos en pacientes con carcinoma de mama antes del tratamiento quirúrgico y fue utilizada por primera vez en 1973 en aquellos pacientes con enfermedad localmente avanzada e inoperables. En los casos de tumores iniciales el objetivo principal es reducir el tamaño tumoral para aumentar las posibilidades de realizar un tratamiento quirúrgico más conservador y estético; y el control de las micrometástasis. En los casos de tumores localmente avanzados el objetivo es mejorar la supervivencia global y conseguir un control local de la enfermedad. La quimioterapia neoadyuvante consigue respuestas tumorales en más de dos tercios de las pacientes con cáncer de mama operable, observándose una tasa de progresión de la enfermedad durante el tratamiento del 5%.

Se puede considerar que la QNA aporta diferentes ventajas: mayor porcentaje de tratamiento quirúrgico conservador, igual pronóstico que el tratamiento adyuvante y un control precoz de la enfermedad micrometastásica. Pero más allá de un beneficio clínico, la QNA representa una evaluación "in vivo" de la biología tumoral y proporciona un factor pronóstico de supervivencia en determinados subtipos tumorales.

Sinónimos utilizados en la literatura para quimioterapia neoadyuvante son quimioterapia primaria, quimioterapia preoperatoria o quimioterapia de inducción.

1.3.1.1. INDICACIONES DE LA QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE

Actualmente, las indicaciones de la QNA son:

-Pacientes con carcinoma localmente avanzado y carcinoma inflamatorio:

En estos casos es el tratamiento estándar. Son tumores con baja supervivencia por lo que su objetivo es conseguir un control local de la enfermedad y mejorar la supervivencia global (hasta el 25% a 10 años).

-Pacientes con cáncer de mama operable pero que presentan un tamaño tumoral grande en relación al volumen de la mama:

Mejora la tasa de cirugía conservadora por la disminución del tamaño tumoral. Debe considerarse en aquellos tumores que cumplan todos los criterios de cirugía conservadora excepto por el tamaño del tumor.

No obstante, la QNA es óptima para todos aquellos casos que reciban quimioterapia adyuvante, por lo que en cualquier paciente candidata a recibir quimioterapia debe considerarse la posibilidad de QNA incluso si fuese factible realizar cirugía conservadora de entrada.

En cambio, no estaría indicada la QNA en los siguientes casos:

-Aquellos con incierta evidencia de beneficio de la adyuvancia sistémica, con lo que se realizaría cirugía de entrada.

-Tumor primario/ganglios no medibles

-Pacientes que no la van a cumplir

-La no existencia de equipo multidisciplinario

1.3.1.2. IMPACTO PRONÓSTICO

A. PRIMEROS ESTUDIOS CON ANTRACICLINAS: NSABP B-18 y EORTC 10902

La quimioterapia ha demostrado en el cáncer de mama quirúrgico un claro beneficio en términos de supervivencia global, tanto si es administrado antes como después de la cirugía del tumor primario (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 2005).

El estudio NSABP B-18 (1523 pacientes con cáncer de mama operable randomizadas a recibir 4 ciclos de adriamicina y ciclofosfamida prequirúrgico o postquirúrgico) demostró para el tratamiento de quimioterapia neoadyuvante una mejoría en la tasa de cirugías conservadoras de mama frente a la adyuvancia (67,8% versus 59,8%) sin observarse diferencias en cuanto a la supervivencia, gracias a la reducción tumoral o downstaging (Wolmark N et al., 2001) (Figura 14).

Downstaging: efecto de la disminución del estadio tumoral en la pieza quirúrgica respecto al registrado en la valoración inicial en el contexto de respuesta al tratamiento antineoplásico

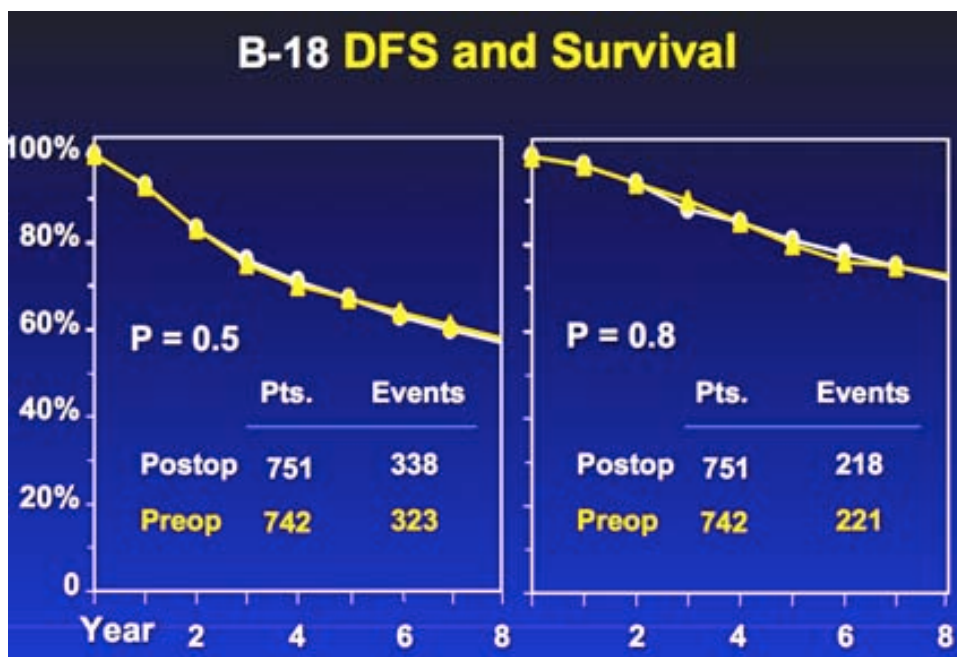


Figura 14. Estudio NSABP B-18 (Wolmark N et al., 2001). No diferencias significativas en las supervivencias entre quimioterapia neoadyuvante y adyuvante.

El estudio EORTC 10902 (Van der Hage JA et al., 2001) con 698 pacientes y utilizando un esquema FEC también mostró un beneficio del tratamiento conservador y menor frecuencia de afectación ganglionar en el grupo de quimioterapia primaria. No se observaron diferencias en cuanto a la supervivencia.

Estos datos han sido confirmados posteriormente por nuevas publicaciones científicas que han demostrado además una mejor tolerancia a la quimioterapia (Cochrane Database, 2007) y una tendencia favorable en cuanto a supervivencia libre de enfermedad para el tratamiento preoperatorio (HR=0,81, p=0,053) (Rastogi P et al., 2008).

En el caso de los tumores de mama localmente avanzados o tumores inflamatorios, el tratamiento neoadyuvante es el tratamiento estándar de primera línea, ya que mejora las posibilidades de control local y la tasa de supervivencia (hasta del 25% a 10 años) (Chia S et al., 2008) pero también representa una opción terapéutica para aquellas pacientes con cáncer de mama inicial mediante el tratamiento precoz de las metástasis subclínicas. Asimismo, permite una evaluación “in vivo” de la biología tumoral valorando su quimiosensibilidad e identificando los factores predictivos para establecer determinadas estrategias terapéuticas (De Wys WD et al., 1972; Ketcham AS et al., 1959).

El estudio NSABP B-18 demostró también que entre las pacientes que recibieron quimioterapia preoperatoria existía una asociación entre respuesta tumoral patológica/clínica y pronóstico a largo plazo, con mejor pronóstico aquellas que presentaban respuesta tumoral completa (Figura 15). Una buena respuesta tras dos o tres ciclos de quimioterapia se considera un factor predictivo de remisión completa y por lo tanto, como predictor de mejor pronóstico a largo plazo (Von Mickwitz G et al., 2005).

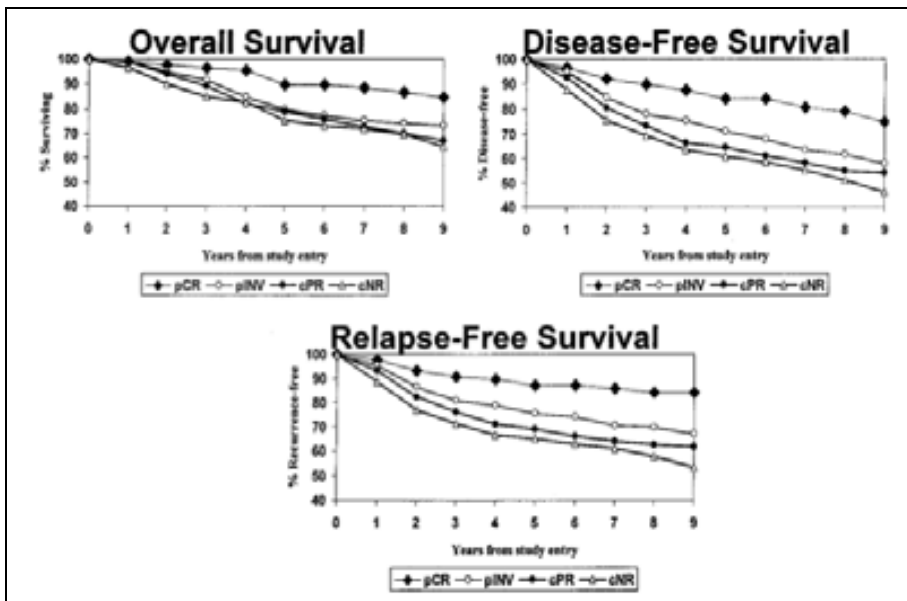


Figura 15. Pronóstico de pacientes tratadas con neoadyuvancia según la respuesta tumoral (Wolmark N et al., 2001).

De estos resultado se concluye que la respuesta anatomopatológica completa (pCR) o la presencia de mínima enfermedad residual tras quimioterapia neoadyuvante, tanto en la mama como en la axila, se correlaciona con una mayor supervivencia libre de enfermedad y global (Gralow JR et al., 2008; Symmans WF et al., 2007).

B. METAANÁLISIS DE MIEOG

El metaanálisis de Mieog *et al.* realizado en 2007 analiza la efectividad del tratamiento con quimioterapia primaria versus la adyuvancia mediante una revisión en Cochrane de 14 artículos reagrupando a 5500 pacientes en total:

- 10 estudios (4620 pacientes) evaluaron la SG y SLE y no encontraron diferencias entre los dos grupos.
- 11 estudios (5041 pacientes) valoraron la tasa de recidiva locoregional. Tras la exclusión de 3 estudios (porque las pacientes no fueron operadas), no existieron diferencias significativas, los resultados varían entre 2-24%.
- 10 estudios (5292 pacientes) mostraron un aumento de la tasa de cirugía conservadora (25% de downstaging).
- 4 estudios (1290 pacientes) mostraron correlación entre la pCR y la supervivencia.

-4 estudios (2799 pacientes) mostraron una disminución de la tasa de complicaciones infecciosas tras quimioterapia neoadyuvante.

1.3.1.3. ESQUEMA TERAPÉUTICO

A pesar de los claros beneficios de la neoadyuvancia, no existe todavía ningún consenso sobre que esquema terapéutico es el mejor. Los regímenes de tratamiento varían desde monoterapias a tratamientos combinados o secuenciales. Fisher et al., establecieron en 1997 la indicación de quimioterapia neoadyuvante en base a regímenes de antraciclinas pero su tasa de respuesta completa es tan sólo del 12-26% (Fisher B et al., 1997; Schneeweiss A et al., 2004).

La adicción de taxanos al régimen de antraciclinas va acompañado de una mayor pCR y supervivencia (Kaufmann M et al., 2006). No obstante, el estudio NSABP B-27 (Bear HD et al., 2003; Bear HD et al., 2006) que compara diferentes esquemas de neoadyuvancia no consiguió demostrar una relación entre pCR y aumento en la supervivencia ya que a pesar de un incremento en la tasa de respuesta completa con pautas de doxorubicina/Ciclofosfamida (AC)-docetaxel versus AC no había diferencias significativas en cuanto a supervivencia global ni libre de enfermedad. Dichas discrepancias entre estudios seguramente son debidas a que el cáncer de mama presenta una gran heterogeneidad tumoral y el impacto pronóstico de la pCR se basa en los diferentes perfiles tumorales.

En el 2005 el estudio GEPARUO (Von Minckwitz et al., 2005) evaluó en 913 pacientes diferentes esquemas de taxanos: esquema concomitante Doxorubicina y Docetaxel (AD) versus su utilización secuencial (AC⇒D). La tasa de pCR y de cirugía conservadora fueron superiores en el grupo secuencial (14,3% vs 7% y 63,4% vs 58,1%, respectivamente).

El estudio NOAH (Neoadjuvant Herceptin), realizado desde el 2007 al 2010 en 228 pacientes permitió la aprobación del trastuzumab en situación neoadyuvante. (Gianni L et al., 2010). El tratamiento complementario con trastuzumab en pacientes con sobreexpresión de HER2 aumenta la pCR de un 20-30% a un 40-60% (Buzdar AU et al., 2005; Untch M et al., 2010). Todos estos estudios también

analizaron la cardiotoxicidad del trastuzumab, y se observó que no producía una toxicidad cardíaca mayor. La toxicidad del trastuzumab además es reversible en comparación a la de las antraciclinas.

Los nuevos estudios en fase III van dirigidos a valorar los nuevos tratamientos antidiana (Lapatinib, Bevacizumab, Everolimus) en neoadyuvancia. En el estudio GEOPAR-QUINTO, el Lapatinib no ha demostrado ser más eficaz que el trastuzumab (Untch M et al., 2012). Mientras que el estudio Neo-ALTTO donde se analiza el bloqueo doble con trastuzumab y lapatinib, mostró una mayor tasa de pRC que la utilización de trastuzumab solo (51,3% vs 29,5%). El bloqueo de rama doble es más efectivo en las pacientes que no expresan receptores hormonales y en general a los bloqueos de un solo fármaco en pacientes HER2+ (Baselga J et al., 2012).

Las pacientes triple negativo sí que podrían beneficiarse del Bevacizumab en neoadyuvancia (Von Minckwitz G et al., 2012).

La utilidad de los bifosfonatos en neoadyuvancia todavía no se ha demostrado (Chavez-MacGregor M et al., 2011).

La prolongación de la quimioterapia más allá de 3-4 meses aumenta la tasa de respuestas pero a expensas también de un aumento de la toxicidad (Bear HD et al., 2006). El número de ciclos que actualmente se utiliza y con buena tolerancia es de 6-8 ciclos.

En St. Gallen 2011 se concluyó que:

- Todo esquema de neoadyuvancia debería incluir antraciclinas y taxanos
- Los regímenes utilizados en adyuvancia también pueden ser usados en neoadyuvancia.
- Tumores HER2 positivos deberían incluir tratamiento diana anti-HER2.

En la práctica clínica el tratamiento quimioterápico es seleccionado según los factores predictivos clínicos y patológicos aunque éstos determinan con poca exactitud el grado de actividad de los diferentes fármacos.

Los regímenes más habituales son:

- AC (adriamicina-ciclofosfamida) cada 21 días x 4 ciclos ⇒ docetaxel cada 21 días x 4.
- TAC (docetaxel-adriamicina-ciclofosfamida) cada 21d x 6 ciclos.
- FEC (ciclofosfamida-epirrubicina-5-fluorouracilo) cada 21d x 4 y Paclitaxel semanal x 12 semanas. Todo ello junto a trastuzumab semanal x 24s (en pacientes HER2 positivo).

1.3.2. VALORACIÓN RADIOLÓGICA

La respuesta tumoral durante la quimioterapia ha sido siempre valorada mediante la exploración clínica, la mamografía y la ecografía. Pero estas técnicas resultan insatisfactorias en cuanto se correlacionan con la respuesta anatomopatológica. La resonancia magnética dinámica (RMN) con contraste es superior que las pruebas anteriores por lo que se ha convertido en la técnica de elección para valorar la respuesta radiológica tumoral. Los criterios de evaluación de la respuesta se basan fundamentalmente en la medida del tamaño tumoral (considerando válida la de mayor diámetro), pero este dato es poco objetivo en aquellos tumores con morfología irregular o enfermedad multifocal, por lo que algunos estudios sugieren que sería de mayor utilidad la valoración del volumen tumoral (Hylton NM et al., 2012; Marinovich ML et al., 2012).

Según los criterios de la RECIST (Response evaluation criteria in solid tumor) se diferencia:

- Respuesta completa: desaparición de todas las lesiones. Se acepta <10mm para las adenopatías.
- Respuesta parcial: disminución de >30%.
- Enfermedad estable: ni respuesta ni progresión.
- Progresión de la enfermedad: aumento de >20% del tamaño inicial o aparición de nuevas lesiones.

Se recomienda el marcaje de la lesión previo a la QNA por la posibilidad de la desaparición de los focos. El objetivo del marcaje es facilitar posteriormente el tratamiento quirúrgico y mejorar los márgenes de exéresis.

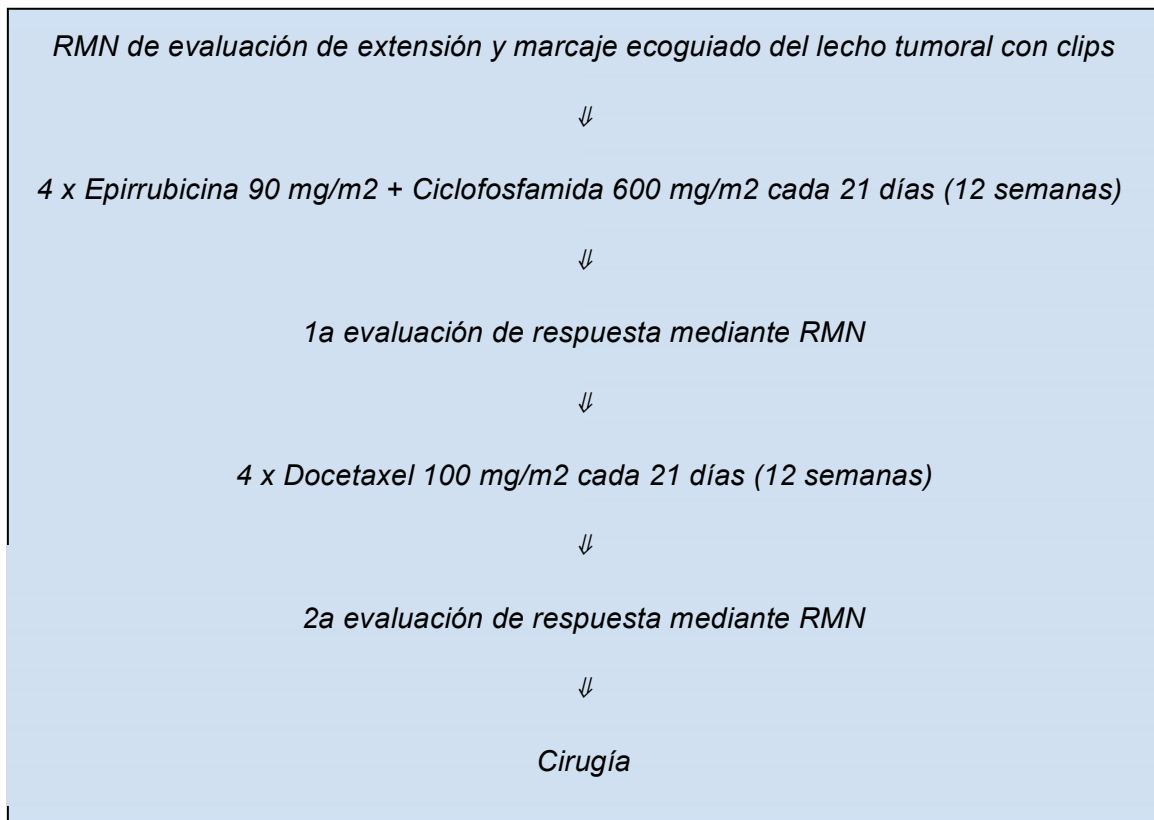
La “European Society of Breast Imaging” recomienda la RMN antes de iniciar la quimioterapia primaria, pero no establece cual es el momento óptimo para realizar la RMN de control durante el tratamiento. Se han descrito varios puntos de corte en cuanto a tamaño y volumen tumoral para diferenciar buena de pobre respuesta, pero no se ha establecido ninguno como referencia, sólo se recomienda el cambio de régimen de quimioterapia en aquellas pacientes que no presentan ningún cambio en la RMN o en casos de progresión. Varios estudios indican que la RMN es más precisa para predecir la pCR en aquellos tumores HER2 positivo y triples negativos en relación a los luminales/HER2 negativo (Hayashi Y et al., 2013; Gómez-Raposo C et al., 2012).

La RMN dinámica puede sobreestimar la pCR en casos con patrón de crecimiento de tipo lobulillar o cuando el tumor residual tiene pequeñas dimensiones. Por otro lado, puede subestimar la pCR si existe neoplasia in situ o por cambios postquimioterapia.

La aparición o el aumento de microcalcificaciones durante la quimioterapia no implica progresión tumoral ni aumento del componente in situ asociado, traduciendo únicamente alteraciones metabólicas locales, por necrosis o por producción de metabolitos propicios a la formación de microcalcificaciones.

Aunque los ganglios linfáticos se identifican bien en RMN, este método tiene poca especificidad para la detección de enfermedad ganglionar, a menos que la invasión por tumor sea obvia, con rotura capsular e infiltración de la grasa adyacente. No obstante, la respuesta patológica local se correlaciona directamente con la respuesta patológica ganglionar, siendo paralelas, por lo que la estimación de la respuesta local por RMN es predictiva de la respuesta patológica ganglionar (Sentis M., 2005).

El protocolo de evaluación radiológica de la respuesta tumoral más habitual es el siguiente:



A continuación (Figura 16) se muestran imágenes de la respuesta tumoral a la neoadyuvancia controlada por RMN. Se observa como el tamaño del tumor y de la adenopatía disminuyen considerablemente.

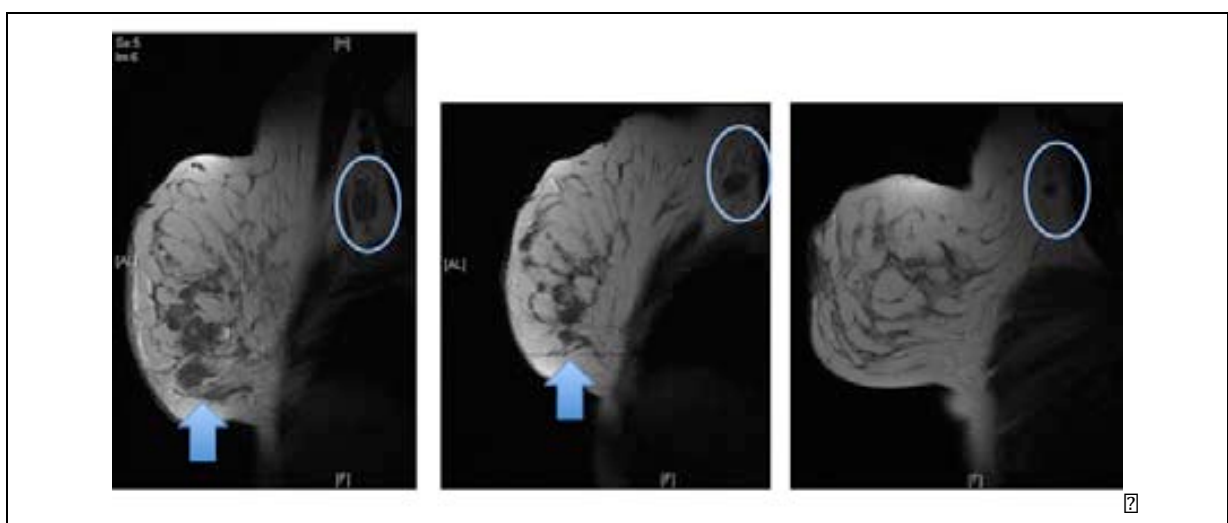


Figura 16. Valoración radiológica por RMN (Institut Universitari Dexeus).

La falta de estandarización de la RMN dinámica en cuanto a la medida del tumor ha hecho que se estudien técnicas radiológicas funcionales como son la difusión por RMN y el FDG-PET.

A. RMN y coeficiente de difusión

La difusión aporta información acerca del movimiento browniano aleatorio de las moléculas de agua libre en el espacio intersticial y a través de la membrana celular cuando son expuestas a un campo magnético. Este movimiento es relativamente libre en los tejidos sanos, estando limitado en zonas tumorales, con mayor densidad proteica y celular. Se representa en imágenes funcionales, con poco detalle morfológico, pudiendo ser cuantificado a través de la medición del coeficiente de difusión aparente (CDA).

Los pocos estudios realizados en cáncer de mama informan que cambios de CDA implican cambios en el tamaño tumoral. Una CDA baja previa al tratamiento se correlaciona con una mejor respuesta. (Hee S et al., 2010).

La RMN con difusión mejora el rendimiento diagnóstico de la RMN dinámica con contraste, y parece tener al menos tanto valor diagnóstico como ésta (Woodhams R et al, 2010).

B. FDG-PET

Es un nuevo método diagnóstico que valora las características metabólicas de los tumores. PET significa tomografía por emisión de positrones. Equipo responsable de generar la imagen metabólica. Ésta se logra tras la inyección endovenosa de glucosa marcada con fluor-18, las células tumorales se caracterizan por ser muy ávidas de glucosa.

Permite fusionar las características metabólicas con las morfológicas de diversos tumores. Un acúmulo mayor de FDG es predictivo de mala respuesta (Dunnwald LK et al., 2011).

En un estudio en Institut Universitari Dexeus, publicado en forma de abstract en St. Gallen 2013 se estudió la correlación de la RMN y el FDG-PET con la respuesta

anatomopatológica. Se observó mayor disminución de los niveles de FDG y reducción tumoral mayor al 40% a los 3 meses de quimioterapia en las pacientes con pRC (González-Cao et al., 2013).

1.3.3. VALORACIÓN ANATOMOPATOLÓGICA

La “American Joint Committee on Cancer Staging Manual” utiliza la nomenclatura “y” para indicar el estadio patológico tras tratamiento neoadyuvante.

El sistema de gradación que analiza la respuesta anatomopatológica a la quimioterapia es un indicador de la SG y SLE. Una respuesta patológica completa se asocia a una supervivencia a 5 años del 87%, pero como la mayoría de las pacientes no alcanzan una regresión completa, la mayoría de los estudios van dirigidos a relacionar la extensión de enfermedad residual con el impacto pronóstico.

No obstante, no existe todavía un método estándar para valorar dicha respuesta. Existen múltiples clasificaciones y todas ellas difieren al analizar la respuesta completa (Figura 17). Algunas consideran ausencia total de tumor, otras incluyen en regresión completa la presencia de enfermedad no invasiva (carcinoma ductal in situ) y otras incluyen en la gradación la afectación o no en la axila.

Honkoop Classification	
pCR	No cancer in breast or axillary nodes
Minimal Residual Disease	Only microscopic RD in breast or axillary nodes
Macroscopic Residual Disease	Macroscopic RD in breast or axillary nodes

Chevallier Classification	
Grade 1	No cancer in breast or axillary nodes
Grade 2	Only <i>in situ</i> carcinoma remains, nodes are negative
Grade 3	Invasive carcinoma with stromal fibrosis
Grade 4	No or few modifications of stromal fibrosis

Sataloff Classification				
Primary Tumor		Axillary Nodes		
T-A	Total or near-total therapeutic effect	N-A	N-	Evidence of therapeutic effect
T-B	> 50% therapeutic effect	N-B	N-	No evidence of therapeutic effect
T-C	< 50% therapeutic effect	N-C	N+	Evidence of therapeutic effect
T-D	No therapeutic effect	N-D	N+	No evidence of therapeutic effect

Figura 17. Sistemas de gradación anatomopatológica (Honkoop AH et al., 1998; Chevallier B et al., 1993; Sataloff DM et al., 1995).

Recientemente, un meta-análisis sobre neoadyuvancia fue presentado en el congreso de San Antonio 2012 (Cortázar P et al., 2012). Los autores de estos estudios (BIG, GBG, EORTC, NSABP) establecieron una definición común de la pCR en relación a los resultados del meta-análisis. De un total de 12993 pacientes y 12 ensayos, se observó que no había diferencias significativas en cuanto al pronóstico entre las pacientes que presentaban o no carcinoma *in situ* postneoadyuvancia (Figura 18).

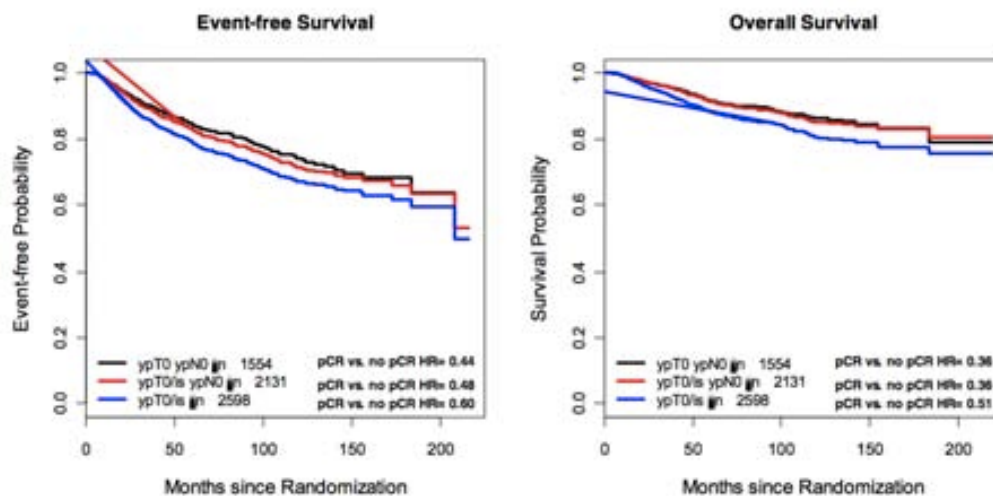


Figura 18. Pronóstico en función de la definición de pCR (Cortázar P et al., 2012).

En términos generales, se define como pCR la ausencia total de enfermedad invasiva tanto en la mama como en la axila. La presencia de carcinoma ductal in situ no parece influir en la SLE ni SG. La pCR se identificaría, por lo tanto, como: **ypT0/is, ypT0 ypN0 o ypT0/is ypN0.**

En cambio, la presencia de afectación ganglionar tras quimioterapia predice un peor pronóstico y se incluye como enfermedad residual (Mazouni C et al., 2007; Galow JR et al., 2008).

La gradación de Miller y Payne (MyP) y Residual Cancer Burden (Carga Tumoral Residual) han mejorado la clasificación de enfermedad residual. La clasificación de MyP (Figura 19) se basa en el grado de pérdida de células tumorales durante el tratamiento y a diferencia de las anteriores clasificaciones no tiene en cuenta el tamaño tumoral ni a nivel macroscópico ni microscópico.

<p>Miller y Payne (Ogston KN et al., 2003):</p> <ul style="list-style-type: none"> -Grado 1 (pNR): ausencia de respuesta -Grado 2 (pPR): reducción <30% -Grado 3 (pPR): reducción 30-90% -Grado 4 (casi pCR): reducción >90% -Grado 5 (pCR): ausencia de cáncer infiltrante residual <p style="text-align: center;">Puede haber carcinoma in situ</p> <ul style="list-style-type: none"> - N-A: axila negativa verdadera - N-B: ganglios axilares positivos sin respuesta terapéutica - N-C: ganglios axilares positivos pero con evidencia de respuesta terapéutica - N-D: ganglios axilares positivos inicialmente pero negativizados tras tratamiento
--

Figura 19. Clasificación Miller y Payne

Pero la clasificación Miller y Payne no tiene en cuenta de forma conjunta la afectación ganglionar, sino que la estadifica por separado, por lo que a esta información se le complementa la clasificación de Residual Cancer Burden (RCB) que sí la incluye (Ogston KN et al., 2003). Desarrollada por un grupo de patólogos del MD Anderson, se basa en el cálculo de una fórmula matemática que incluye el

tamaño del lecho tumoral, el porcentaje del área global de celularidad tumoral, el porcentaje de tumor que es *in situ*, el número de ganglios afectados y el tamaño en mm de la metástasis mayor. Las variables usadas para calcular la RCB se obtienen del informe anatomopatológico y se introducen en un programa que está disponible de forma gratuita en internet: http://www.mdanderson.org/breastcancer_RCB (Figura 20), (Symmans WF et al., 2007).

Tresserra F et al., 2012, analizaron la correlación entre estos dos sistemas de gradación, concluyendo que la correlación en la respuesta completa era buena pero existían discrepancias a la hora de clasificar la ausencia de respuesta entre ambos sistemas, ya que algunos casos eran reducción menor según RCB o algo de reducción según MyP y los casos de ausencia de respuesta según MyP fueron respuestas parciales según RCB. Estas discrepancias, podrían ser debidas a la inclusión del estado ganglionar en el sistema RCB.

Residual Cancer Burden (Symmans WF et al., 2007):

- RCB-0 (pCR): ausencia de tumor mamario y ganglionar.
- RCB-I (pPR): respuesta parcial.
- RCB-II (pPR): respuesta parcial.
- RCB-III (pNR): quimioresistencia.

Residual Cancer Burden Calculator

(1) **Primary Tumor Bed**

Primary Tumor Bed Area: (mm) X (mm)

Overall Cancer Cellularity (as percentage of area): (%)

Percentage of Cancer That is *in situ* Disease: (%)

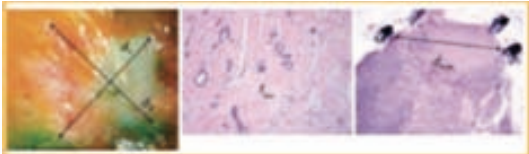
(2) **Lymph Nodes**

Number of Positive Lymph Nodes:

Diameter of Largest Metastasis: (mm)

Residual Cancer Burden:

Residual Cancer Burden Class:



Variables:

Diámetro del tumor primario ($\sqrt{d_x d_y} = d_{p(m)}$)

Fracción de celularidad cancerosa invasiva (f_{inv})

Diámetro de la metástasis más grande (d_{max})

LN: Número de metástasis en ganglios

$$RCB = 1.4(f_{inv} d_{p(m)})^{0.77} + (4(1 - 0.75^{0.77}) d_{max})^{0.77}$$

Figura 20. Residual Cancer Burden

1.4. ONCOLOGÍA MOLECULAR

1.4.1. BIOLOGÍA MOLECULAR Y CARCINOGENÉISIS

Como hemos comentado anteriormente, el cáncer de mama se inicia por la mutación de una sola célula normal y su evolución posterior continúa con el acúmulo de nuevas mutaciones que llevan a la selección de un subtipo celular tumoral. La inestabilidad genómica, ya sea hereditaria o no, es la causante de los cambios genéticos: pérdida de genes, amplificación de genes, mutaciones puntuales y traslocaciones cromosómicas. El ciclo celular viene regulado por el equilibrio de oncogenes, genes supresores tumorales y genes responsables de la reparación del DNA, por lo que mutaciones a este nivel provocarán una desregulación de las vías de señalización del control celular promoviendo el crecimiento de células tumorales (Osborne C et al., 2004; Schlotter CM et al., 2008).

Las 3 principales vías reguladoras de las funciones celulares son: **la vía Ras/Raf/MAPK**, **la vía Jak/Stat** y **la vía PI3K/Akt/mTOR** (Figura 21). Las 3 vías regulan funciones como el crecimiento y supervivencia celular, la proliferación, la división y la apoptosis, así como funciones de migración y metabolismo.

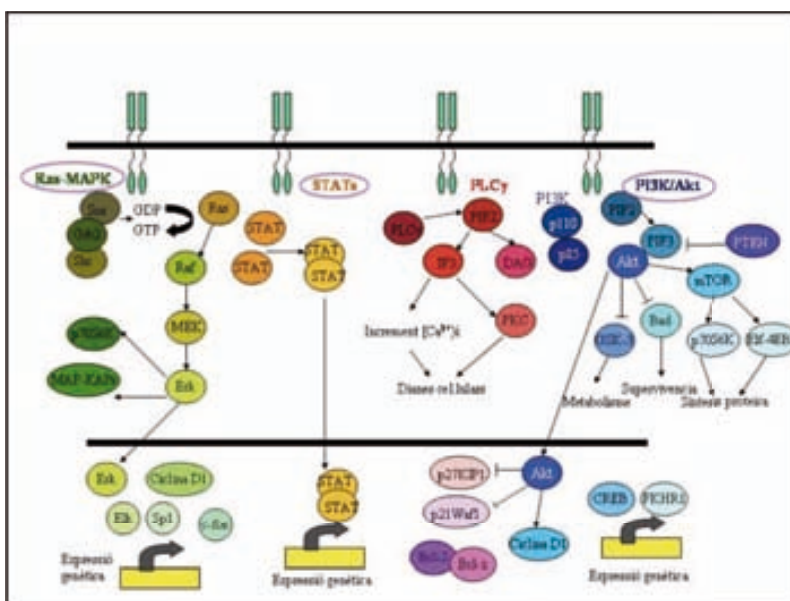


Figura 21. Principales vías de señalización celular

A. ONCOGENES

Son aquellos genes cuya activación contribuye al desarrollo de células tumorales. Su activación puede realizarse a través de diferentes vías:

- Amplificación del propio gen provocando un aumento de su función. Un ejemplo sería la amplificación de HER2.
- Mutación puntual que aumenta la función de la oncoproteína. Sería el caso del oncogen Ras, c-myc...
- Translocación cromosómica.

El papel de los oncogenes se ve potenciado por otros cambios genéticos y epigenéticos. Se han identificado varios oncogenes pero son pocos los considerados imprescindibles para la progresión del cáncer de mama, siendo el más importante hasta ahora el oncogen HER2.

B. GENES SUPRESORES DE TUMOR

Las células normales presentan material genético capaz de regular su ciclo, son los genes supresores de tumores. La pérdida de su funcionalidad promueve la carcinogénesis.

Los genes supresores de tumores suelen ser reguladores inhibidores del crecimiento celular o de otras funciones que pueden afectar a mecanismos de invasión y metástasis. Alteraciones en estos genes pueden deberse por mutaciones hereditarias (una minoría de los cánceres de mama), por mutaciones somáticas o por mecanismos de metilación (Osborne C et al., 2004).

Hasta ahora, los genes supresores de tumor no se han considerado útiles en la práctica clínica, a excepción de los genes de susceptibilidad hereditaria (BRCA1, BRCA2). Son genes supresores de tumores: p53, p27, BRCA1, BRCA2, PTEN.

Todos estos genes capaces de regular el crecimiento y supervivencia de las células tumorales son los considerados **biomarcadores moleculares tumorales**.

1.4.2. BIOMARCADORES MOLECULARES PREDICTIVOS

El cáncer de mama presenta una gran heterogeneidad tumoral que determina diferentes subtipos moleculares. De esta forma, tumores idénticos y con misma histología pero impulsados por diferentes vías biológicas pueden presentar diferentes respuestas al tratamiento médico y diferente pronóstico.

Estudios recientes informan que alteraciones en la expresión de microRNA podrían estar implicadas en la resistencia del tumor a las terapias actuales. Esto sugiere un papel de los microRNA como biomarcadores predictivos, y que su regulación en las células tumorales puede ser útil para mejorar la respuesta al tratamiento (Hwang JH et al., 2010; Yang H et al., 2008).

En el cáncer de mama es importante conocer el estado de los *receptores hormonales y la amplificación del gen HER2* para indicar el tratamiento apropiado de cada paciente, en el cáncer de colon avanzado la presencia de la mutación del gen *KRAS* y en el cáncer de pulmón no microcítico la presencia de mutaciones activadoras del gen *EGFR*.

Un correcto conocimiento de los diferentes marcadores y de sus vías moleculares permitirá un mejor diagnóstico de la enfermedad y de sus tratamientos.

En este estudio se evaluará el papel de los siguientes biomarcadores predictivos:

- **TP53 (“Tumor protein p53”)**

Se trata del gen supresor de tumores más estudiado, sobretodo en cáncer de colon y pulmón. Las mutaciones de p53 van asociadas a un peor pronóstico y son comunes en los cánceres de mama tipo basales (Jiang J et al., 2011).

Un posible mecanismo de resistencia a los inhibidores de la PARP podrían ser mutaciones de p53. Además la pérdida de 53BP1 (proteína que se une a p53) puede tener diferentes implicaciones en tumores con déficit de BRCA1 frente a tumores triple negativos esporádicos (Bouwman P et al., 2010).

- **BRCA1/RAP80**

BRCA1

El gen BRCA1 se encuentra en el cromosoma 17, es un gen supresor de tumores que permiten la reparación del DNA. Su mutación germinal implica un aumento en el riesgo de desarrollar tumores de mama (cáncer de mama heredo-familiar). Pero también está implicado en el 90% de casos de cánceres esporádicos y no como consecuencia de una mutación, como ocurre en el familiar, sino “por disfunción”. El mecanismo concreto por el cual el BRCA1 regula el proceso de carcinogénesis no está todavía bien definido, pero se sabe que está implicado en múltiples funciones celulares como la regulación del ciclo celular, la transcripción, el crecimiento y la diferenciación celular.

El gen BRCA1 codifica una fosfoproteína que presenta una región conocida como BRCT que juega un papel principal en el control del ciclo celular en respuesta al daño del DNA. Se podría decir que BRCA1 localiza los puntos dañados del DNA y activa el proceso específico de reparación (mediante las protein kinasas ATR y ATM, que fosforilan a BRCA1).

BRCA1 regula los mecanismos “downstream” de respuesta celular formando parte del complejo DDR (respuesta a daño de DNA) que forman las proteínas BARD1 (BRCA1 associated ring domain protein), BRCA2, PALPB2 (partner and localizer of BRCA2), E2F1, RAD51, XRCC3, RPA (replication protein A) y ERCC1 (excision repair cross-complementing 1) (Matsuoka S et al., 2007) (Figura 22).

En resumen, las células deficientes de BRCA1 son incapaces de detener el ciclo celular, acumulando daños en el DNA y favoreciendo la inestabilidad de microsatélites. Estudios preclínicos en cáncer gástrico y de pulmón sugieren que los efectos citotóxicos de algunos tratamientos médicos podrían ser reparados por BRCA1, por lo que la sobreexpresión de BRCA1 causaría resistencia a tratamientos que producen daño en el DNA (platino, adriamicina, etopósido) mientras que células con bajos niveles de BRCA1 estarían relacionados con resistencia a a agentes que actúan sobre los microtúbulos, taxanos (Rosell R et al., 2007).

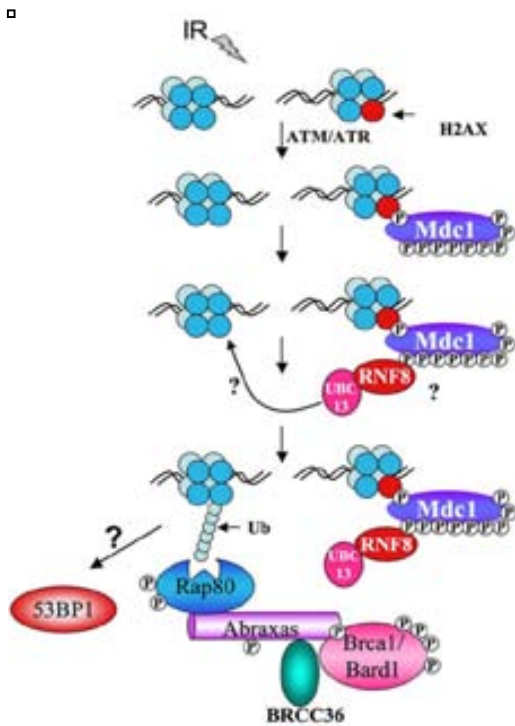


Figura 23. Complejo BRCA1-RAP80-Abraxas

- **PIK3CA/PTEN (Figura 24)**

PIK3CA

Mutaciones del PIK3CA son las responsables de la activación de la vía PI3K/AKT/mTOR. Una amplicación de PIK3CA se ha observado en cáncer de ovario, cérvix y tiroides, mientras que su mutación se ha encontrado predominantemente en cáncer de hígado, colon y mama. Se trata de la vía más frecuentemente mutada en el cáncer de mama y suelen encontrarse en los tumores RH+ y HER2+ (Saal LH et al., 2005).

Se ha observado que la resistencia a los inhibidores de HER2 y tratamientos hormonales podría estar mediada por mutaciones de PI3K (Wang L et al., 2011; Miller TW et al., 2011; Cizkova M et al., 2012). Estudios preclínicos sugieren que la mutación de PI3K podría predecir la respuesta a inhibidores de PI3K y de mTOR (Janku F et al., 2012).

PTEN

PTEN es un gen supresor de tumores y se expresa en la mayoría de los tejidos (pulmón, mama, páncreas..). Actúa inhibiendo el ciclo celular. Mutaciones y deleciones de PTEN pueden inactivar su actividad enzimática conduciendo a una proliferación celular incrementada o muerte celular reducida a través de la vía PI3K/Akt/mTOR, favoreciendo así la carcinogénesis (Parsons R, 2004; Mohseni M et al., 2010).

La mutación del PTEN también causa una variedad de predisposición hereditaria al cáncer (Sd. Cowden).

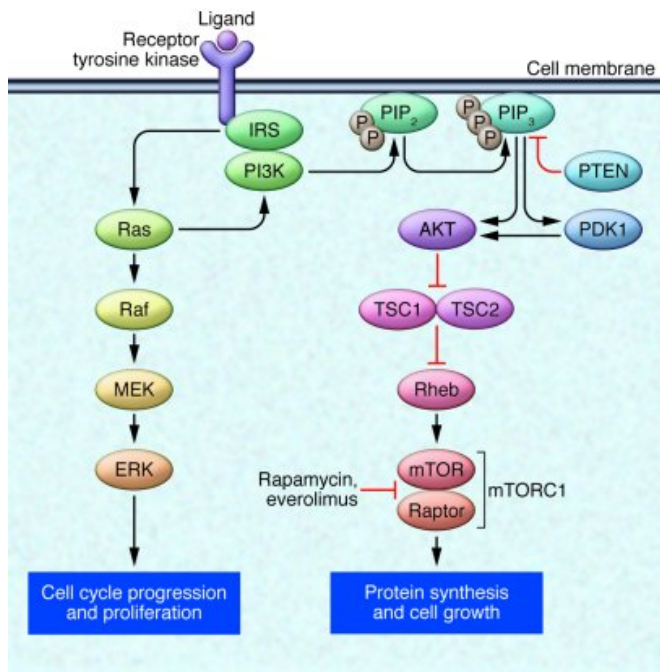


Figura 24. Vía PI3K/PTEN (Mohseni M et al., 2010).

- **KRAS**

El oncogen KRAS es de hecho el gen más frecuentemente mutado en varios tipos de cánceres y forma parte de la vía de señalización RAS/MAPK (Bos JL, 1989). Las vías RAS y PI3K són vías que trabajan en paralelo y su efecto puede cruzarse, provocando que el máximo beneficio de los tratamientos sólo se obtiene si se inhiben las dos vías (Bardelli A et al., 2010) (Figura 25).

Se trata de un biomarcador de mal pronóstico y pobre respuesta a terapias dirigidas en algunos cánceres (páncreas y colon).

Recientemente se ha visto que las mutaciones en los codones 12 y 13 de KRAS (95% de las mutaciones humanas observadas) se oponen a la eficacia de la terapia anti-EGFR (Valtorta E et al., 2013).

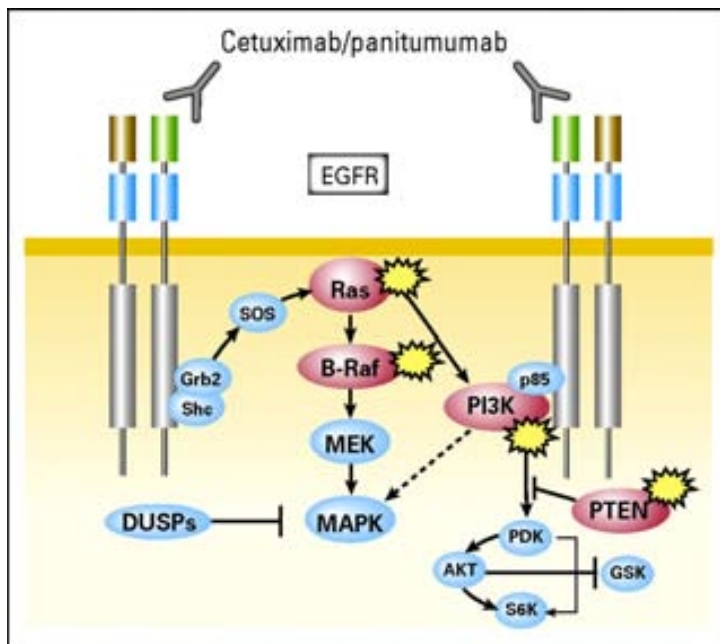


Figura 25. Interacción entre las vías RAS y PI3K (Bardelli A et al., 2010).

- **FGFR1**

Está demostrado que la vía de señalización de los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) pueden promover el desarrollo de tumores y metástasis regulando directamente la proliferación celular y la angiogénesis tumoral.

La amplificación de FGFR1 (“Fibroblast growth factor receptor 1”) ocurre en el 10% de los cánceres de mama y se asocia con un mal pronóstico, se ha observado que suprime la expresión del receptor de progesterona. Los cánceres de mama que presentan FGFR1 amplificado muestran una mayor activación de las vías de señalización MAPK y PI3K-Akt. La amplificación de FGFR1 se encuentra en 16-27% de los tumores luminales B.

En modelos preclínicos la amplificación de FGFR1 da resistencia a las terapias endocrinas (Turner N et al., 2010). Hay fármacos que inhiben FGFR y podrían ser muy activo en este conjunto de cáncer de mama (Larrieu-Lahargue et al., 2012).

- **GAS6/AXL**

AXL es un regulador fundamental de la transición epitelio-mesénquima y se une al ligando GAS6. En un principio AXL fue descubierto en pacientes con leucemia mieloide crónica, y desde entonces se ha asociado a diferentes tipos de cáncer y a un peor pronóstico (Gustafsson A et al., 2009; Linger RM et al., 2008).

La sobreexpresión de GAS6 se ha relacionado con procesos de trombosis y en el cáncer de mama es regulado por la progesterona actuando a través del receptor de progesterona B (Mc Cormack O et al., 2008). Un tratamiento que bloquease GAS6 y AXL beneficiaría a las pacientes con cáncer de mama bloqueando el efecto de la progesterona y disminuyendo el riesgo de trombosis.

- **YAP/Beta TRCP/PTPN12**

YAP

YAP (Yes associated proteína) es un coactivador de la transcripción que interactúa con varios factores de transcripción y modula su actividad. YAP también es un coactivador de los receptores de estrógeno y progesterona. La baja expresión de YAP se asocia con receptores hormonales negativos (Tufail R et al., 2012).

Beta TRCP

Es un oncogen. La sobreexpresión de Beta TRCP está ligada a la degradación de YAP y provoca, a su vez, la pérdida de PTPN12 (Zhao B et al., 2010).

PTPN12

PTPN12 es una tirosina fosfatasa con actividad de gen supresor de tumores. Comúnmente se inactiva en el cáncer de mama triple negativo o subtipo basal. La pérdida de PTPN12 sobrerregula varias tirosina kinasas, como EGFR, erb2, PDGFR (Sun T et al., 2011) (Figura 26).

La pérdida de PTPN12 puede ser inducida por beta-TRCP, por lo que estos tumores pueden sobreexpresar AXL, ya que beta-TRCP también inactiva YAP, un regulador de AXL.

Niveles bajos de PTPN12 se asocian a tumores de peor pronóstico, con mayor tamaño tumoral, mayor grado histológico, mayor afectación ganglionar y metástasis.

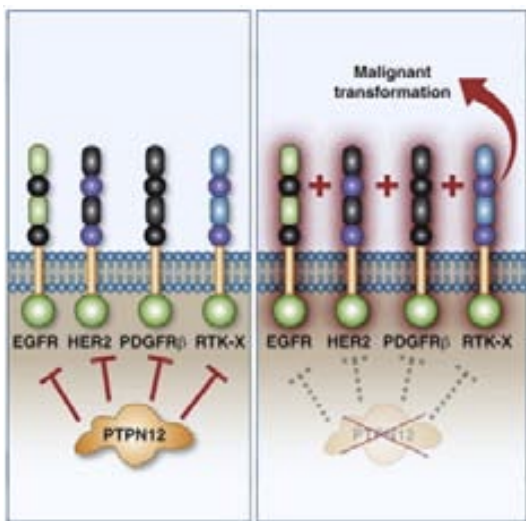


Figura 26. La pérdida de PTPN12 actúa a nivel de varias vías importantes en el cancer de mama (HER2, EGFR).

- **EZH2**

Recientemente se ha observado que la vía MEK-ERK-Elk1 es una de las vías de regulación en la carcinogénesis, y está relacionada con una sobreexpresión de EZH2. EZH2 está sobreexpresada en un número significativo de cánceres triples negativos y su amplificación provoca una disminución de BRCA1 (González ME et al., 2011). Estos tumores son sensibles al platino (Silver DP et al., 2010).

- **HIF-1alpha**

La homeostasis del oxígeno tiene un papel importante en el desarrollo y crecimiento de tejidos. En los tumores sólidos las células pueden adaptar su metabolismo a bajos niveles de oxígeno aumentando la expresión de genes

relacionados con la angiogénesis, el metabolismo de la glucosa, la supervivencia celular y la proliferación. Esta respuesta celular a la hipoxia es regulada por una proteína llamada Hipoxia inducible factor (HIF 1).

Está formada por 2 subunidades: alfa y beta, que se expresan bajo condiciones de normoxia. Durante la carcinogénesis la subunidad HIF-1alpha se encuentra aumentada. También la vía PI3K/AKT puede regular los niveles de HIF1 independientemente de los niveles de oxígeno (Du J et al., 2011).

- **BIM**

BIM pertenece a la familia de proteínas pro-apoptóticas Bcl-2 y es regulada a través de la vía RAF/MAPK o AKT/PI3K. En el cáncer de pulmón se ha observado que la pérdida de BIM se correlaciona con mayor agresividad tumoral (Sakakibara-Konishi J et al., 2012).

- **ROR1**

Receptor-tyrosine-kinase-like orphan receptor 1 (ROR1) es sobreexpresado en las células cancerígenas, pero no por células normales. ROR1 promueve la carcinogénesis a través de la vía de activación de PI3K.

Un alto nivel de ROR en el adenocarcinoma de mama se asocia a mayor agresividad de la enfermedad (Zhang S et al., 2012).

- **ZNF217**

ZNF217 es un oncogen que promueve la transición epitelio-mesénquima en células epiteliales de mama. Niveles altos de ZNF217 están asociados a mal pronóstico y al desarrollo de metástasis. La sobreexpresión de ZNF217 en las células de cáncer de mama estimula la migración e invasión en modelos in vitro y promueve también el desarrollo de metástasis ganglionares y en pulmón en modelos in vivo con ratones (Vendrell JA et al., 2012).

En la figura siguiente se muestran los diferentes biomarcadores moleculares a estudiar con sus respectivas vías de señalización.

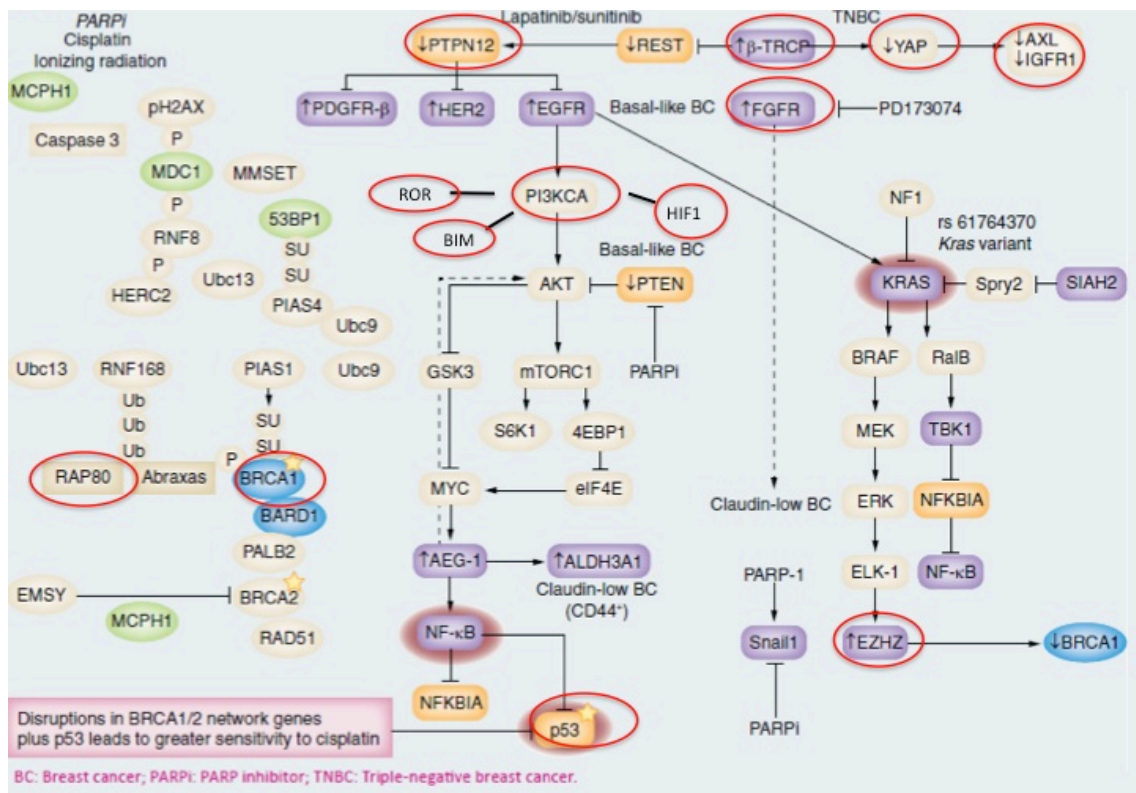


Figura 27. Resumen de los biomarcadores moleculares a estudiar y sus vías de señalización.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Actualmente la indicación principal del tratamiento neoadyuvante son tumores localmente avanzados o aquellos casos en que debido a la relación tamaño tumoral/volumen mama una cirugía conservadora de entrada no es posible, mientras que los casos de cáncer de mama precoz son tratados en primera línea mediante cirugía. Revisando la literatura observé que no existían grandes trabajos dirigidos a estudiar directamente la neoadyuvancia en tumores pequeños por lo que se planteó como primera hipótesis:

Si el tamaño tumoral influía o no en la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante, existiendo la misma quimiosensibilidad en tumores iniciales que en tumores localmente avanzados.

Partiendo de esta base y teniendo en cuenta que no todas las pacientes presentan la misma quimiosensibilidad se decidió ampliar el estudio y analizar diferentes variables relacionadas con la reducción tumoral. Así se estableció que **si se consiguiera identificar los diferentes parámetros predictivos que nos permitesen establecer que tumores se beneficiarían de una neoadyuvancia se evitarían tratamientos ineficaces.**

Y, precisamente, con el objetivo de evitar tratamientos ineficaces se planteó la última hipótesis del estudio. En la práctica clínica el tratamiento neoadyuvante se basa en esquemas estándares y muchos de estos fármacos tienen una alta toxicidad. En los últimos años la base genética del cáncer de mama ha sido un área de intensa investigación, y el descubrimiento de los genes implicados en el cáncer y las técnicas de biología molecular han permitido caracterizar los tumores desde el punto de vista clínico.

Por lo que centré el trabajo en la idea que **si pudiéramos tener una terapia que fuera dirigida hacia las vías y mecanismos específicos que causan el cáncer, estos tratamientos serían mucho menos tóxicos y tal vez más efectivos que las actuales terapias en uso, por lo que la identificación de firmas genéticas predictoras de respuesta a quimioterapia nos ofrecería la posibilidad de ofrecer a los pacientes el tratamiento de quimioterapia de modo “personalizado”.**

Con estas tres líneas de investigación se empezó a seleccionar y estudiar las pacientes tratadas con quimioterapia neoadyuvante. Los resultados preliminares han sido presentados en diversos congresos nacionales: XXXI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria (Barcelona, 2012), 31 Reunión Nacional de la Sección de Ginecología Oncológica y Patología Mamaria de la SEGO (Sevilla, 2012) y han dado pie a dos artículos: “Quimioterapia Neoadyuvante en Cáncer de mama precoz” (Revista Senología y Patología Mamaria 2013; 26:11-17) y “Gene expression profile to define molecular subtype and pathological response in breast cancer” pendiente de publicación.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO PRINCIPAL

-Analizar los factores de predicción de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante en el cáncer de mama.

3.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

-Determinar las características clínicas y anatomopatológicas de las pacientes tratadas con QNA.

-Evaluar la quimiosensibilidad en el cáncer de mama inicial.

-Analizar y comparar la respuesta anatomopatológica a la quimioterapia neoadyuvante según los diferentes factores predictivos clínicopatológicos.

-Estudiar el pronóstico en función de los factores predictivos y de la respuesta anatomopatológica.

-Estudiar el valor predictivo/pronóstico independiente de los siguientes marcadores moleculares:

-Niveles de expresión de FGFR1, BRCA1, RAP80, BIM, betaTRCP, PTPN12, YAP, HIF1alfa, GAS6, AXL, ZNF217, EZH2 y ROR1.

-Mutaciones PI3KCA, Tp53.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se incluyeron en el estudio aquellas pacientes valoradas por el Comité de Ginecología Oncológica y Patología Mamaria del Institut Universitari Dexeus (CGOM) con diagnóstico de cáncer de mama y tratadas en primer lugar mediante quimioterapia neoadyuvante.

Desde enero del 2000 a octubre 2012 se trataron con quimioterapia primaria 146 pacientes. La indicación del tipo de tratamiento quirúrgico (radical o conservador) posterior a la QNA, de la radioterapia u hormonoterapia se decidió desde CGOM.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Haber sido diagnosticada y tratada en la Unidad de Patología Mamaria del Institut Universitari Dexeus.
- Pacientes con diagnóstico histológico de carcinoma infiltrante de mama que recibieron QNA según esquema basado en Taxanos y/o Antraciclinas.
- Compromiso de la paciente a realizar el seguimiento oncológico según los protocolos del CGOM.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Aquellas pacientes que no aceptaron los protocolos de tratamiento y seguimiento del CGOM.
- Pacientes que no se les pudo realizar el tratamiento completo de QNA.
- Pacientes que realizaron neoadyuvancia con hormonoterapia.

De las 146 pacientes iniciales, se incluyeron finalmente 129 en el estudio, ya que en las 17 pacientes restantes no se pudo obtener todos los datos, al no haberse realizado el tratamiento completo en nuestro centro, sólo parte del mismo. A todas las pacientes se les realizó una biopsia para obtener un diagnóstico histológico previo a cualquier decisión terapéutica. Asimismo, todas las pacientes fueron informadas de los diferentes procedimientos y opciones de tratamiento y firmaron los consentimientos informados pertinentes.

4.2. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

Se han incluido 129 pacientes diagnosticadas de carcinoma infiltrante de mama y tratadas con QNA entre enero del año 2000 y octubre del 2012. Se trata de un estudio analítico en el que se valora la respuesta a la QNA, retrospectivo desde 2000-2008 y prospectivo desde 2009-2012.

La evaluación preoperatoria (características clínicas de las pacientes y el diagnóstico por imagen), la descripción del tipo de cirugía, los resultados anatomopatológicos, los protocolos de quimioterapia neoadyuvante y tratamientos adyuvantes (quimioterapia, radioterapia y hormonoterapia), las respuestas obtenidas a la neoadyuvancia (clínica, radiológica e histológica) y el seguimiento de las pacientes han sido recogidos en una base de datos.

Los protocolos de control mamario en el Institut Universitari Dexeus son los siguientes:

- Primera mamografía de control a los 35 años. Posteriormente, control mamográfico (y ecográfico si precisa) anual a partir de los 40 años.
- Paciente <40 años sin factor de riesgo ni patología clínica con controles clínicos anuales.
- Diagnóstico de un nódulo a la exploración o mediante mamografía/ecografía se realizará punción-aspiración con aguja fina (PAAF) para su estudio citológico.
- En caso de discordancia radiológica/citológica o de sospecha se realizará una biopsia por punción (BPP) para su estudio histológico.
- Pacientes con factores de riesgo controles según los criterios de la consulta de riesgo oncológico (riesgo moderado o riesgo alto).

A todas las pacientes del estudio se les realizó una mamografía y ecografía mamaria que informaba del número, tamaño y localización de la lesión. Con anterioridad al 2007 el diagnóstico se realizaba con PAAF y confirmación anatomopatológica mediante biopsia quirúrgica, y posteriormente mediante

biopsia con aguja gruesa (BAG) o biopsia asistida por vacío (BAV). Se marcó la lesión con un clip, con el fin de identificar posteriormente la zona del tumor en aquellos casos con respuesta. Una vez el diagnóstico de malignidad fue establecido se realizó una resonancia magnética de mama para descartar multicentricidad, ecografía axilar para valoración ganglionar y estudio de extensión. En nuestro centro el estudio de extensión consiste en una radiografía de tórax, gammagrafía ósea y ecografía hepática. A partir del 2009 se introdujo el PET-TAC como técnica de imagen para completar estudio de extensión.

En todos los casos se realizó una reevaluación radiológica del tamaño tumoral al finalizar la QNA. El tratamiento quirúrgico postneoadyuvancia se realizó al mes de finalizar la quimioterapia, y el tipo de cirugía (tumorectomía versus mastectomía) se decidió en función de la relación tamaño tumoral/volumen mama y la respuesta radiológica.

Los criterios de exclusión para tratamiento conservador de la mama fueron:

- Tumores multicéntricos
- Tumores difusos
- Resultados estéticos no aceptables
- Imposibilidad de realizar radioterapia posterior (enfermedades del colágeno, problema social..).
- Irradiación previa en mama o tórax.
- Carcinoma de Paget con tumor infiltrante alejado de la zona retroareolar.

En pacientes RH positivas, la hormonoterapia se indicó con una duración total de 5 años (Tamoxifeno en premenopausia e Inhibidores de la Aromatasa en menopausia).

El seguimiento de las pacientes por parte de la unidad de mama se resume en la tabla siguiente.

MESES	3	6	9	12	18	24	36****
Exploración clínica	+	+	+	+	+	+	+
Analítica y marcadores tumorales (Hemograma, fosfatasa alcalina, glucemia., CEA, CA 15.3)		+		+	+	+	+
Mamografía				+		+	+
Ecografía mamaria* Ecografía axilar**				+		+	+
RMN***				+			

Tabla 5. Protocolo de seguimiento en Institut Universitari Dexeus.

* En casos de tratamiento conservador

** En casos de biopsia selectiva ganglio centinela

*** En casos de alto riesgo

**** A partir de los 3 años: control anual

El control por parte del oncólogo clínico incluye:

-Revisión cada 3 meses los 2 primeros años, semestral hasta 5 años y después anual.

- Pruebas a realizar:
- Densitometría ósea anual.
 - Ecocardiograma o ventriculografía en pacientes de riesgo.
 - Gammagrafía ósea.
 - Ecografía hepática/TAC abdominal.
 - TAC torácico
 - PET-TAC.

4.3. ESQUEMA TERAPÉUTICO

En neoadyuvancia se utilizó el esquema quimioterápico basado en Taxanos y/o Antraclicinas. Puesto que las pacientes a estudio se remontan hasta el 2000, y debido a los diferentes protocolos de investigación clínica durante estos años y a los problemas de tolerancia de algunos fármacos, existe una cierta disparidad en relación a los esquemas terapéuticos en los siguientes casos:

- Variabilidad de las dosis de antraclicinas (dosis de 60-90mg/m²)
- Epirrubicina reemplazada por Doxorubicina, con ausencia de 5-fluororacilo.
- Ciclos de Docetaxel reemplazados por Paclitaxel.
- Utilización concomitante de antraclicinas y taxanos.

Con el objetivo de estudiar la influencia de la QNA en la respuesta anatomopatológica se decidió reagrupar las pacientes en tres grupos:

- Sólo Antraclicinas: se administraron una media de 4 ciclos de QNA (dosis de 60-90mg/m²).
- Grupo Antraclicinas+Taxanos: 4 ciclos de Antraclicinas seguidos de 4 ciclos de Docetaxel (100mg/m²) o 12 semanas de Paclitaxel (80mg/m²).
- Grupo sólo Taxanos: 6 ciclos de Docetaxel 100mg/m².

A partir del año 2006 se añadió trastuzumab en neoadyuvancia en aquellas pacientes HER2 positivo (4mg/kg la primera dosis seguido de 2mg/kg semanal). Dicho tratamiento se interrumpió en el momento de la cirugía y posteriormente se reinició de forma adyuvante, con una duración total de un año.

4.4. DESCRIPCIÓN DE VARIABLES

Se revisaron los diversos datos demográficos y clínicos, incluyendo los factores pronósticos y predictivos conocidos como edad, tamaño tumoral, afectación ganglionar, tipo histológico, grado histológico, receptores hormonales y HER2. La correlación de la respuesta anatomopatológica a la QNA fue analizada en relación a los diferentes factores clínicos.

4.4.1. TAMAÑO TUMORAL

La estadificación tumoral se realizó siguiendo la clasificación TNM del 2010 (Edge SB et al., 2010). Las indicaciones de QNA en nuestro centro fueron:

- Tumores localmente avanzados: T3 y T4.
- Tumores pequeños: Tamaño tumoral de $\geq 1,5\text{cm}$ HER2 positivo, triple negativo o afectación ganglionar y tamaño tumoral $\geq 2\text{cm}$.

Así para evaluar la utilidad de la QNA en tumores pequeños se han identificado dos grupos de pacientes según el tamaño tumoral:

- Cáncer de mama inicial: T1c-T2.
- Cáncer localmente avanzado: T3-T4.

4.4.2. VALORACIÓN DE LA RESPUESTA A LA QNA

La valoración de la respuesta a la quimioterapia se realizó posterior al último ciclo de quimioterapia mediante exploración clínica y radiológica.

La valoración radiológica se determinó por ecografía mamaria hasta el 2005, y posteriormente con RMN mama, tomando como valor el diámetro de mayor tamaño (según los criterios de la RECIST). Se consideró:

- Respuesta completa (ausencia de tumor).
- Respuesta parcial ($< 50\%$ tumor).
- No respuesta ($> 50\%$).

La respuesta anatomopatológica se valoró en la pieza quirúrgica postquimioterapia. Todas las muestras tumorales fueron revisadas de nuevo por nuestro patólogo para clasificarlas según los criterios de Miller y Payne (MyP). En el estudio se diferenció:

-Buena respuesta: MyP 4/5.

-Mala respuesta anatomopatológica: MyP 1-3.

4.4.3. FACTORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS

A. AFECTACIÓN GANGLIONAR

A partir del 2008 se inició el estudio axilar quirúrgico mediante GC prequimioterapia neoadyuvante, ya que con anterioridad al 2008 se realizaba linfadenectomía axilar en todos los casos. La técnica quirúrgica de GC se basa en la inyección del radioisótopo (Tc99+coloide) a nivel peritumoral o intratumoral si se realiza Roll (radioguided occult lesion localization) y su análisis histopatológico se realiza mediante técnicas de inmunohistoquímica.

Las indicaciones de tratamiento axilar conservador fueron:

-Tumores únicos hasta 5cm o tumores multifocales hasta 3cm.

-Estudio axilar negativo (clínico, ecográfico y citológico).

-Gestantes a partir del 2º trimestre.

En los casos de linfadenectomía axilar, se indica el número total de ganglios extraídos y el número de ganglios afectados. Se realiza la exéresis de los tres niveles de Berg y de los ganglios infraclaviculares.

B. HISTOLOGÍA

Se identificó el tipo histológico carcinoma ductal infiltrante, lobulillar infiltrante y un tercer grupo catalogado como “otros” que incluye el resto de variantes histológicas (papilar, medular, mucinoso..).

C. RECEPTORES HORMONALES Y HER2

La determinación de receptores hormonales de estrógenos (clon 6F11, Novocastra, United Kingdom), de progesterona (clon 16, Novocastra, United

Kigddom) y HER2 (Clon CB11, Oracle, Leica Biosystems®, United Kingdom) se realizó mediante técnicas de inmunohistoquímica, utilizando en todos los casos los anticuerpos prediluidos por el fabricante.

La positividad de los receptores hormonales se estableció con más del 10% de células teñidas. En el caso de HER2, la valoración fue semicuantitativa; se consideró positivo el caso de 3+ y negativo el de 0 o 1+. En los casos de 2+ se realizó valoración mediante técnica FISH (HER2 DNA PathVysion®, Abbott®, Illinois, USA) para determinar si era positivo o negativo.

D. Ki 67

Se valoró en preparaciones de parafina mediante inmunohistoquímica usando anticuerpos clon MIB1. El valor de Ki67 se definió como el porcentaje de células que presentaban tinción nuclear. Para el estudio, se agrupó en dos rangos, Ki67 alto $\geq 14\%$ y bajo $< 14\%$.

E. GRADO HISTOLÓGICO

Se analizó el grado histológico prequimioterapia según la clasificación de Scarf-Bloom-Richardson modificada por Elston y Ellis.

- Grado I o bajo grado: 3-5 puntos.
- Grado II o grado intermedio: 6-7 puntos.
- Grado III o alto grado: 8-9 puntos.

4.4.4. CLASIFICACIÓN TUMORAL

A. SUBTIPOS TUMORALES

Se identificaron los diferentes subtipos tumorales:

- Receptores hormonales positivos/HER2 negativo: aquellos tumores con RH positivos y HER2 negativo.
- HER2 positivo: pacientes con HER2 positivo, independientemente del status de los receptores hormonales (pueden ser positivos o negativos).
- Triple Negativo: RP, RE y HER2 negativos.

B. SUBTIPOS MOLECULARES

Para la clasificación de los diferentes subtipos moleculares se ha utilizado la nueva correlación inmunohistoquímica publicada por Prat A et al. (Prat A et al., 2012).

-Luminal A: RE positivo, RP>20%, HER2 negativo, Ki67<14% .

-Luminal B:

-Luminal B/HER2-: RE positivo, RP<20%, HER2 negativo, Ki67>14%.

-Luminal B/HER2+: RH positivos, HER2 positivo

-HER2 positivos: RH negativos, HER2 positivo.

-Triple Negativo: RH negativos, HER2 negativo.

4.5. ESTUDIO MOLECULAR

De las 129 pacientes, se evaluaron 92 muestras preterapéuticas del tumor para el estudio de expresión génica (Figura 28). Se analizó:

- La expresión de FGFR1, BRCA1, RAP80, BIM, betaTRCP, PTPN12, YAP, HIF1alfa, GAS6, AXL, ZNF217, EZH2 y ROR1.
- Las mutaciones PI3KCA y Tp53.

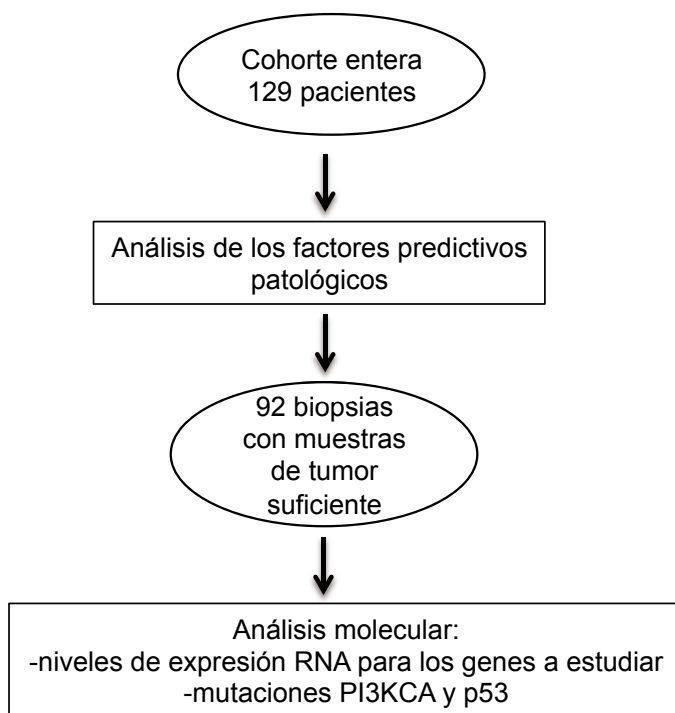


Figura 28. Diagrama del estudio.

4.5.1. OBTENCIÓN, SELECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Los pacientes recogidos en este estudio provenían del Instituto Universitario Dexeus. La selección de las muestras a estudiar y el trabajo técnico de laboratorio fue realizado por nuestro patólogo y el equipo del Laboratorio de Oncología Pangaea Biotech. Todas las muestras se encontraban fijadas en solución convencional de formalina con posterior inclusión en parafina. Para llevar a cabo la valoración, se utilizaron los criterios definidos en el punto 4.5.1.1.

4.5.1.1. VALORACIÓN DEL PATÓLOGO

Las muestras teñidas con hematoxilina/eosina fueron valoradas al microscopio de campo claro por el patólogo responsable. Se realizó una valoración cuantitativa (porcentaje de infiltración tumoral, estroma, necrosis e infiltrado inflamatorio), cualitativa y de tipo de disección.

VALORACIÓN CUANTITATIVA

- **Adecuado:** Se consideró adecuado para el análisis de mutaciones y expresión de mRNA cuando había un 20% de células tumores en la muestra.
- **Material escaso:** En el caso de mutaciones, fue considerado material escaso una cantidad <20% de células tumorales pero con una cantidad mínima de 8 células tumorales. El material de las muestras para mRNA fue considerado escaso cuando el porcentaje de células tumorales es >5% y <20%.
- **Material insuficiente:** Se consideró material insuficiente cuando el tejido presentaba menos de 8 células tumorales en el caso de la detección de mutaciones y menos del 5% de infiltración tumoral para los casos de expresión de mRNA.

Para las determinaciones moleculares, se procesaron las muestras "adecuadas".

CALIDAD MUESTRA

El patólogo responsable indicó si en el tejido a examinar era posible distinguir las células tumorales de las zonas no neoplásicas, o si por artefactos u otras incidencias de fijación o de procesamiento del tejido no era posible realizar dicho análisis.

- Valorable: Es posible distinguir las células tumorales de las áreas no tumorales y es posible realizar un informe anatomopatológico con el diagnóstico adecuado.
- No valorable: No es posible distinguir las células tumorales de las áreas no tumorales y no es posible realizar un informe anatomopatológico con el diagnóstico adecuado.

4.5.1.2. MACRODISECCIÓN/MICRODISECCIÓN

En el mismo corte donde se realiza la valoración de la muestra, se selecciona la zona a macro/microdisecar (Figura 29). Cuando el porcentaje de infiltración tumoral fue inferior al 85% se procedió a microdisecar, en los casos en los que fue superior, se macrodisecó.



Figura 29. Imagen de una valoración sobre una muestra de H/E

En el caso de la microdisección, se utilizó el sistema laser de Palm, Oberlensheim, Germany). En el caso de la macrodisección, se utilizó una punta de pipeta y rascando la zona de interés (Figura 30).

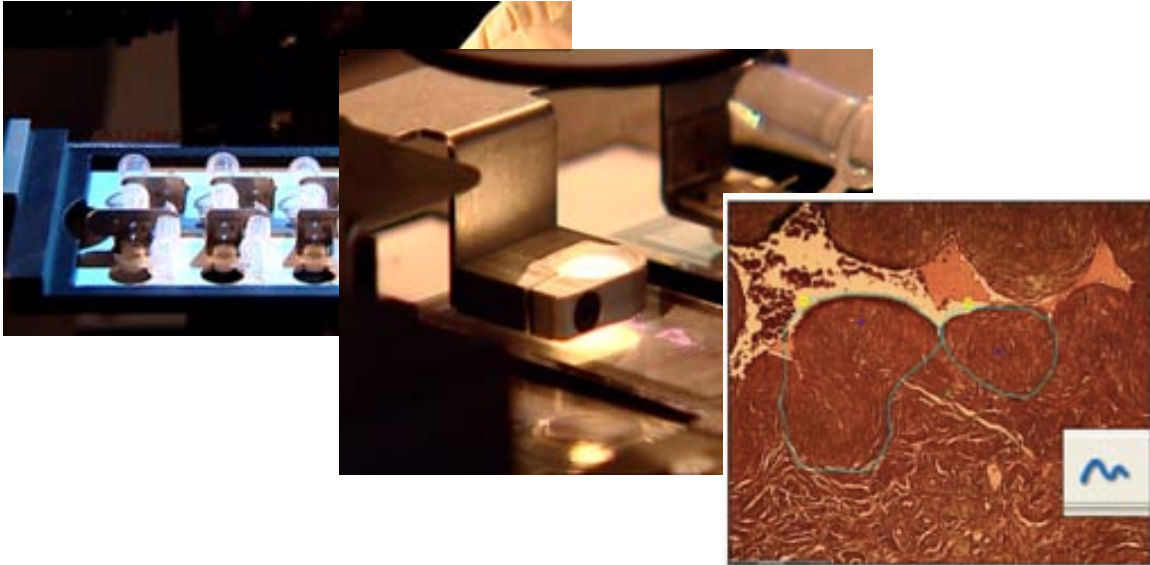


Figura 30. Imagen de la platina de microdisector y de un dibujo realizado sobre una muestra

Para el análisis de mutaciones, el producto de microdissección obtenido se resuspendió en 20 μL de PCR búfer (Ecogen, Barcelona, España), con proteinasa K y se incubaron entre 4 horas y toda la noche a 60 ° C. Posteriormente, la proteinasa se inactivó a 95°C durante 10 min.

Para el estudio de expresión de mRNA, el producto de microdisecados fue resuspendido en 200 μl de solución de digestión (SDS, EDTA y Tris) e incubado a 60°C durante 16 horas.

4.5.2. ANÁLISIS DE MUTACIONES

4.5.2.1. Análisis de las mutaciones de Tp53

Para el análisis de las mutaciones del gen Tp53, se utilizó la técnica de High Resolution Melting (HRM), con la que se hizo un screening de los exone 5, 6, 7 y 8 del gen.

A partir de un 1-2 μl del extracto celular inactivado, se procedió a mezclarlo con 10 μl de MeltDoctor HRM Master Mix (Applied Biosystems), 0.3 μM de primers y, en el caso del exón 5b, 1 mM final de MgCl_2 . Los primers utilizados para el

análisis de los exones 6 y 8 fueron los descritos en el artículo de Krypuy et al. (Krypuy M et al., 2007). Para el análisis del exón 7 y 5 se utilizaron primers diseñados en el laboratorio de Pangaea Biotech, ya que los descritos por Krypuy et al. presentaban una baja calidad de amplificación en las secuencias derivadas del HRM. El listado de primers se recoge en la Tabla 6.

Exon	Forward	Reverse
5a	CACTTGTGCCCTGACTTTCA	AGCCATGGCAGGACGCG
5b	CTCCTGCCCCGGCACCCGC	CTAAGAGCAATCAGTGAGGAATCAGA
6	AGACGACAGGGCTGGTTGC	CAACCACCCTTAACCCCTCCT
7	CTTGGGCCTGTGTTATCTCC	GGGTCAGAGGCAAGCAGA
8	GACCTGATTTCTTACTGCCTCTTG	AATCTGAGGCATAACTGCACCCTT

Tabla 6. Secuencia de los primers utilizados para cada exón

DNAs procedentes de diversas líneas, y de las que se conoce el estatus de TP53, fueron utilizadas como controles positivos para cada uno de los exones. (Tabla 7).

Cell line	Genomic description ^a	Protein description ^a	exon
AU565	c.524G>A	p.R175H	5
NCI-H1781	c.469G>T	p.V157F	5
PC-3	c.414del1	p.K139fs*31	5
Calu-6	c.586C>T	p.R196X	6
BxPC-3	c.659A>G	p.Y220C	6
DLD-1	c.722C>T	p.S241F	7
PC-9	c.743G>A	p.R248Q	7
NCI-H23	c.738G>C	p.M246I	7
HT-29	c.818G>A	p.R273H	8
NCI-H1975	c.818G>A	p.R273H	8
H510	c.844C>G	p.R282G	8
SK-MES-1	c.892G>T	p.E298X	8
NCI-H460	wt	wt	
A549	wt	wt	

Tabla 7. Líneas celulares utilizadas como controles internos de la técnica

Se realizaron 50 ciclos de amplificación utilizando las siguientes condiciones; un ciclo a 95°C durante 15 min; 50 ciclos a 95°C durante 10 seg; condiciones de “annealing” durante 5 a 20 seg (Tabla 8); y 72°C durante 20 seg. El ciclo

final de elongación fue a 72°C durante 7 min. Cuando no se observa amplificación por HRM, se repite el proceso en un termociclador convencional

La disociación se realizó en un 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), con un instrumento HRM-capable real-time PCR. Las condiciones utilizadas fueron las siguientes: 95°C durante 1 seg, 72°C durante 90 seg, y un HRM step rising de 72°C a 95°C subiendo 0.1°C por seg.

Las curvas de disociación fueron analizadas usando el software Applied Biosystems HRM v2.0. Los productos de HRM de las muestras mutadas y de las dudosas se secuenciaron para confirmar el resultado.

EXON	HRM		Standard PCR	
	Annealing time	Annealing temperature and cycles	Annealing time	Annealing temperature
5A	5 sec	65°-55° touchdown 1°C/cycle for 10 cycles	30 sec	55°
5B	5 sec	65°-60° touchdown 0.5°C/cycle for 10 cycles	30 sec	60°
6	5 sec	68°-58° touchdown 1°C/cycle for 10 cycles	30 sec	59°
7	5 sec	65°-60° touchdown 0.5°C/cycle for 10 cycles	30 sec	60°
8	20 sec	63.5°-58.5° touchdown 0.5°C/cycle for 10 cycles	30 sec	62°

Tabla 8. Condiciones de PCR

4.5.2.2. Análisis de las mutaciones de PIK3CA

La búsqueda para las mutaciones de PIK3CA en los exones 9 y 20 incluyeron los puntos de acceso 542 y 545 (exón 9) y 1047 (exón 20), que es donde se encuentran la gran mayoría de las mutaciones.

La amplificación se hizo en un volumen final de 12.5- µl donde se incluyó 1 µl del extracto celular, 6.25 µl de TaqMan® Genotyping Master Mix (Applied Biosystems®), 0.6pmol de cada primer y 0.2pmol de cada sonda. Las muestras fueron amplificadas durante 50 ciclos a 15 segundos a 92°C y 1:30 minutos a 60°C en un equipo 7900HT Fast Real time PCR System (Applied Biosystems®).

El DNA de la línea celular NCI-H460 se utilizó como control mutado (mutación puntual E545K) y DNA de H1975 como control wt. Además, en el ensayo se incluyeron otros controles internos positivos para las posiciones E545K, E542K, H1947R.

Las mutaciones detectadas por el ensayo de discriminación alélica se confirmaron por secuencia directa, utilizando el kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de secuenciación se analizaron en el ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) utilizando el software Sequencing Analysis 5.3.

Los primers y las sondas fueron las siguientes:

POSICIÓN		PRIMERS	SONDAS
E542K (G1624A) EXON 9	F	AAGAACAGCTCAAAGCAATTTCTAC	MUT: 5'-FAM-CCTCTCTCTAAAATC-3' WT: 5'-VIC-TCCTCTCTCTGAAATC-3'
	R	ACTCCATAGAAAATCTTTCTCCTGCT	
E545K (G1633A) EXON 9	F	CAAAGCAATTTCTACACGAGATCCT	MUT: 5'-FAM-TCTGAAATCACTAAGCAGGA-3' WT: 5'-VIC-TGAAATCACTGAGCAGGA-3'
	R	CACTTACCTGTGACTCCATAGAAAATCTT	
H1047R (A3140G) EXON 20	F	GCAAGAGGCTTTGGAGTATTCA	MUT: 5'-FAM-TGATGCACGTCATGGT-3' WT: 5'-VIC-ATGATGCACATCATGGT-3'
	R	GAAGATCCAATCCATTTTTGTTGTC	

Tabla 9. Primers y sondas para las mutaciones de PIK3CA

Tecnología Taqman y Real Time-PCR

La PCR es una técnica que sirve para amplificar un fragmento de DNA. La PCR a tiempo real monitoriza la reacción de amplificación según se va generando mediante un detector que mide la fluorescencia emitida por las sondas.

La sonda TaqMan es una sonda de 18/22 pares de bases que tiene en el extremo 5' un fluorocromo emisor (reporter) y en el extremo 3' un fluorocromo receptor (quencher). Si el gen está presente, la sonda se une a una secuencia del mismo y se hidrolizará por la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa, comportando la separación de los fluorocromos reporter y quencher y

consecuentemente un aumento de la fluorescencia. Se podría decir, que la fluorescencia detectada es mayor cuando aumenta la degradación de las sondas que se incrementan a medida que se unen a los genes detectados.

4.5.3. ANÁLISIS DE RNA

4.5.3.1. EXTRACCIÓN DEL RNA

A partir de la muestra obtenida mediante microdissección o macrodissección, se procedió a extraer el RNA mediante lisis celular. Para ello se sometieron las células a un calentamiento y paralelamente a un tratamiento con EDTA y SDS. Posteriormente se realizó una extracción utilizando el método de fenol/cloroformo. Con este proceso se obtuvo el RNA, con el cual se podrían haber arrastrado moléculas de DNA. Para eliminar el DNA contaminante, se realizó un tratamiento con DNAasa previamente a la retrotranscripción.

4.5.3.2. REAL-TIME PCR Y CUANTIFICACIÓN

El cDNA se sintetizó mediante la enzima retrotranscriptasa M-MLV. Posteriormente, el cDNA se amplificó utilizando una PCR a tiempo real y secuencia Taqman. (ABI Prism 7900HT Sequence Detection System de Applied Biosystems®) utilizando sondas y primers específicos para cada uno de los genes a analizar (Tabla 10). El número de copias del gen se cuantificó transformando la fluorescencia en un valor numérico conocido como Ct.

Tanto las sondas como los primers fueron diseñados utilizando el programa Primer Express 2.0 Software de Applied Biosystems®. Cumplían todos los requisitos establecidos por Applied Biosystems® respecto al diseño, sensibilidad, especificidad y linealidad.

En el caso de los genes B-TRCP, HIF1a, ZNF217, BIM y EZH2, en lugar de diseñar primers y sondas, se utilizaron assays 20X comerciales (Applied Biosystems®). La secuencia de los mismos se recoge en la Tabla 10.

GENES	PRIMERS		SONDAS
BRCA1	F	5'GGCTATCCTCTCAGAGTGACATTTTA 3'	6FAM 5'CCACTCAGCAGAGGG 3' MGB
	R	5'GCTTTATCAGGTTATGTTGCATGGT 3'	
RAP80	F	5' ACATCAAGTCTTCAGAAACAGGAGC 3'	6FAM 5' TCAGGGTGCCTTCACCA 3' MGB
	R	5' TGCAGCCTGCCTCTTCCAT 3'	
FGFR1	F	5' CCACACTGCGCTGGTTGA 3'	6FAM 5' AACCTGACCACAGAATT ' MGB
	R	5' GGCATAACGGACCTTGTAGCC 3'	
AXL	F	5' CAGCGCAGCCTGCATGT 3'	6FAM 5' CAGGGCTGAACAAGAC 3' MGB
	R	5' GCGTTATGGGCTTCGCAG 3'	
B-TRCP	Hs01046327_m1		
GAS 6	F	5' TGGAGGAGCTGTGCAGCC 3'	6FAM 5' TGTTGAGAACGACCC 3' MGB
	R	5' CTTGGGTAAAAATAATCCGTCTCG 3'	
PTPN12	F	5' ATATCCCACAGCCACTGGAG 3'	6FAM 5' AAGAACAGATACAAGGACATAC ' MGB
	R	5' TCGGCTGTGATCAAATGGC 3'	
YAP	F	5' TTGGGAGATGGCAAAGACATC 3'	6FAM 5' TCAGAGATACTTCTTAAATCACA' MGB
	R	5' GCCATGTTGTTGTCTGATCGA 3'	
HIF1a	Hs00153153_m1		
EZH2	Hs01016789_m1		
ROR1	F	5' CAAGTCCAGGATACTCAGATGAGTATG 3'	6FAM 5' AGAAGATGGATTCTGTCAGC 3' MGB
	R	5' TGCACATGCAATCCCTCTGTA 3'	
ZNF217	Hs00919915_m1		
BIM	Hs00708019_s1		

Tabla 10. Genes a estudiar con sus primers y sus sondas.

La cuantificación de la expresión de genes se calculó utilizando el método de Ct comparativo. Como calibradores se utilizó la β -actina como gen endógeno y como RNAs controles un pool de RNAs comerciales (hígado y pulmón; Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU). Todas las muestras se analizaron por triplicado.

A partir de los valores numéricos obtenidos de la real time-PCR se realizaron los siguientes cálculos matemáticos:

1-Promedio y desviación estándar (no superior a 0.30) de las tres réplicas de cada uno de los genes, tanto endógeno como genes analizados.

2-dCt de cada una de las muestras para cada uno de los genes sometido a estudio: promedio del gen diana menos el promedio del gen endógeno (dCt).

$$\mathbf{dCt\ muestra\ a\ estudio = Ct\ gen\ diana - Ct\ gen\ end\acute{o}geno.}$$

3-Media de los calibradores: media de los dCt de los calibradores (hígado y pulmón).

4-ddCt para cada una de las muestras y los calibradores: así la cantidad de gen diana a estudio es igual a:

$$\mathbf{2^{-(dCtmuestra\ a\ estudio - dCt\ media\ h\acute{i}gado\ y\ pulm\acute{o}n).}}$$

En la tabla siguiente se muestran los datos anatomopatológicos de las diferentes muestras analizadas para el estudio molecular :

ID PANGAEA	Nº BIOPSY	ORGAN	EXTERNAL DIAGNOSIS	QUANTITY	QUALITY	RNA/DNA	AP Evaluation	% TI	% S	% N	% IC	Type of diseccion
MC1	99-287	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	30	70	5	20	MICRO
MC2	00-978	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	30	70	0	5	MACRO
MC3	00-1102	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	60	40	0	10	MICRO
MC4	00-1582	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	70	30	0	10	MACRO
MC5	00-4732	Breast	-	scant	val	NO RNA	Infiltrating Carcinoma	15	85	0	10	MICRO
MC6	01-1921 B	Breast	-	scant	val	-	Infiltrating Carcinoma	20	80	0	10	MICRO
MC7	01-2649	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	70	30	0	20	MICRO
MC8	01-3592	Breast	-	scant	val	NO RNA	Infiltrating Carcinoma	30	70	0	20	MICRO
MC9	02-897	Breast	-	scant	val	NO RNA	Infiltrating Carcinoma	70	30	0	5	MACRO
MC10	02-1812	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	80	20	0	10	MACRO
MC11	03-2878	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	60	40	0	10	MICRO
MC12	03-4353	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	80	20	5	15	MICRO
MC13	04-161	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	70	30	0	10	MICRO
MC14	05-4059	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	80	20	0	10	MACRO
MC15	05-4803	Breast	-	scant	val	NO RNA	Infiltrating Carcinoma	35	65	0	15	MICRO
MC16	06-513	Breast	-	scant	val	-	Infiltrating Carcinoma	40	60	0	20	MICRO
MC17	06-3647	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	60	40	0	10	MICRO
MC18	06-7657	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	40	60	5	30	MICRO
MC19	07-114	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	50	50	0	15	MICRO
MC20	07-946	Breast	-	scant	val	-	Infiltrating Carcinoma	30	70	0	10	MICRO
MC21	07-1173	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	80	20	5	10	MACRO
MC22	07-4669	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	80	20	20	20	MICRO
MC23	07-5436	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	30	70	0	10	MICRO
MC24	07-8618	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	20	80	0	10	MICRO
MC25	07-8645	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	40	60	0	10	MICRO
MC26	08-950	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	40	60	0	10	MICRO
MC27	08-2063	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	20	80	0	10	MACRO
MC28	08-4730	Breast	-	scant	val	-	Infiltrating Carcinoma	70	30	5	15	MICRO
MC29	08-6841	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating	60	40	5	10	MICRO

							Carcinoma					
MC30	08-7497	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	60	40	0	10	MICRO
MC31	08-8244	Breast	-	scant	val	-	Infiltrating Carcinoma	60	40	0	10	MICRO
MC32	08-8568	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	20	80	0	5	MACRO
MC33	08-9069	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	35	65	5	10	MICRO
MC34	08-9369	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	90	10	0	10	MICRO
MC35	09-439	Breast	-	scant	val	-	Infiltrating Carcinoma	20	80	5	40	MICRO
MC36	09-3670	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	40	60	5	15	MACRO
MC37	09-3757	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	80	20	0	5	MACRO
MC38	09-5058	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	70	30	0	10	MACRO
MC39	09-5916	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	60	40	0	10	MICRO
MC40	09-6060	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	60	40	0	10	MICRO
MC41	09-6404	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	30	70	0	10	MICRO
MC42	09-6682	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	65	35	0	15	MICRO
MC43	09-7770	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	30	70	0	10	MACRO
MC44	10-4140	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	60	40	0	5	MACRO
MC45	10-4240	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	80	20	5	10	MACRO
MC46	10-4249	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	70	30	0	5	MACRO
MC47	10-4301	Breast	-	scant	val	-	Infiltrating Carcinoma	20	80	0	5	MICRO
MC48	10-7204	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	70	30	0	15	MACRO
MC49	10-8512	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	30	70	0	5	MACRO
MC50	11-978	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	80	20	0	5	MACRO
MC51	11-2317	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	90	10	0	5	MACRO
MC52	11-3455	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	70	30	0	15	MACRO
MC53	10-2214	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	35	65	0	10	MACRO
MC54	10-5101	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	70	30	10	10	MACRO
MC55	10-5692	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	80	20	0	5	MACRO
MC56	10-543 B	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	70	30	15	10	MACRO
MC57	09-9360	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	40	60	20	5	MICRO
MC58	10-912	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	80	20	0	5	MICRO
MC59	10-7180	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	85	15	0	5	MACRO
MC60	10-8639	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	70	30	0	20	MICRO
MC61	10-8712	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	70	30	0	0	MACRO
MC62	11-9577	Breast	-	adec	val	-	CDI	40	60	2	18	MICRO
MC63	11-8903	Breast	-	adec	val	-	CLI	40	60	-	-	MICRO
MC64	11-	Breast	-	adec	val	-	CDI	50	50	-	30	MICRO

	10016											
MC65	11-1555	Breast	-	adec	val	-	CLI	30	70	-	-	MICRO
MC66	11-4692	Breast	-	adec	val	-	CDI	50	50	-	20	MACRO
MC67	00-693	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	30	70	0	30	MICRO
MC68	03-3750	Breast	-	scant	val	NO RNA	Infiltrating Carcinoma	20	80	0	15	MICRO
MC69	04-5158	Breast	-	scant	val	NO RNA/DNA	Infiltrating Carcinoma	10	90	0	5	MICRO
MC70	06-4932	Breast	-	scant	val	NO RNA	Infiltrating Carcinoma	10	90	0	10	MICRO
MC71	09-1251	Breast/Skin	-	scant	val	NO RNA	Infiltrating Carcinoma	10	90	0	10	MICRO
MC72	98-3712	Breast	-	scant	val	NO RNA	Infiltrating Carcinoma	40	50	0	10	MICRO
MC73	08-3709	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	70	30	0	10	MACRO
MC74	10-3093 B	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	70	30	0	10	MACRO
MC75	05-4344	Breast	-	-	-	-	Not Tumor	-	-	-	-	-
MC76	11-4396	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	60	40	10	10	MACRO
MC77	10-1853	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	40	60	0	5	MACRO
MC78	10-2334	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	50	50	0	10	MACRO
MC79	11-6523	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	40	60	0	5	MACRO
MC80	11-4135	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	90	10	20	10	MACRO
MC81	09-8129	Breast	-	scant	val	NO RNA	Infiltrating Carcinoma	40	60	0	5	MICRO
MC82	09-6586	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	70	30	10	10	MACRO
MC83	09-10526 A	Breast	-	scant	val	-	CDI	20	80	0	30	MICRO
MC84	12-2610	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	70	30	0	10	MICRO
MC85	12-8948	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	85	17	0	3	MICRO
MC86	12-5891 A1	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	90	10	-	-	MACRO
MC87	12-5144	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	90	10	-	-	MACRO
MC88	12-4194	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	87	10	-	3	MACRO
MC89	12-4820	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	87	10	-	3	MACRO
MC90	11-10818	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	90	10	-	-	MACRO
MC91	B11-3893	Breast	-	adec	val	-	Infiltrating Carcinoma	40	60	-	-	MACRO
MC92	12-5408	Breast	-	adec	val	-	CDI	45	55	0	0	MICRO

Tabla 11. Datos de las diferentes muestras preterapéuticas.

4.6. SUPERVIVENCIA GLOBAL Y LIBRE DE ENFERMEDAD

Se correlacionó la supervivencia con los diferentes factores clínicos (respuesta MyP, tratamiento quimioterápico recibido, tamaño tumoral, subtipo tumoral, estudio molecular...).

Durante el seguimiento oncológico se analizaron las recidivas locales, metástasis a distancia o la aparición de una segunda neoplasia.

La fecha de origen para analizar la supervivencia se definió como la fecha de la biopsia diagnóstica. Se consideró SG el tiempo transcurrido desde la fecha del diagnóstico hasta la fecha de fallecimiento por cualquier causa. Y la SLE se analizó como el tiempo desde el diagnóstico hasta la fecha de recidiva local o a distancia. Las pacientes que han permanecido vivas sin haber presentado progresión de la enfermedad o aquellas pacientes perdidas durante el seguimiento han sido censadas a su último control médico.

4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los datos se ha realizado en la población total de estudio, y cuando los resultados lo han requerido se ha realizado un análisis de los diferentes subgrupos en función de las principales variables de estudio.

Para la descripción de las variables cuantitativas se empleó el formato convencional mediana, media +/- desviación estándar, máximos y mínimos. Para una mejor interpretación en la evaluación de los niveles de expresión de mRNA, los valores de la expresión de genes también fueron divididos en terciles y medianas. Para la descripción de variables cualitativas se utilizaron las proporciones de población.

Para analizar las variables cuantitativas se utilizó la T-Student o la prueba análoga no paramétrica de Wilcoxon, para las variables categóricas la Chi-

cuadrada de Pearson o el el test exacto de Fisher.

Las curvas de supervivencia se han estimado utilizando el modelo de Kaplan-Meier. Los diferentes grupos de interés han sido comparados entre ellos mediante el test Log-Rank.

Se han utilizado modelos multivariados de regresión de Cox, para analizar el impacto de las variables a estudio, ajustadas por los factores pronósticos, en el contexto de la supervivencia. Para el análisis de la respuesta patológica se han ajustados modelos de regresión logística.

Todas las comparaciones fueron bilaterales con un nivel de significación $\alpha < 0.05$. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa IBM SPSS Statistics.20.0.

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA POBLACIÓN

5.1.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICOPATOLÓGICAS

Entre enero del 2000 y enero del 2011 se diagnosticaron 1897 pacientes con cáncer de mama en nuestro centro. En 129 (7%) se inició tratamiento con quimioterapia neoadyuvante.

La **edad** media al diagnóstico fue de 47,47+- 8,9 años (rango 31-73), con un grupo de pacientes jóvenes (menores de 35 años) que representaba el 5,42% del total (Figura 31). En relación al estado hormonal, 87 pacientes (67,4%) eran premenopáusicas y 42 menopáusicas (32,6%).

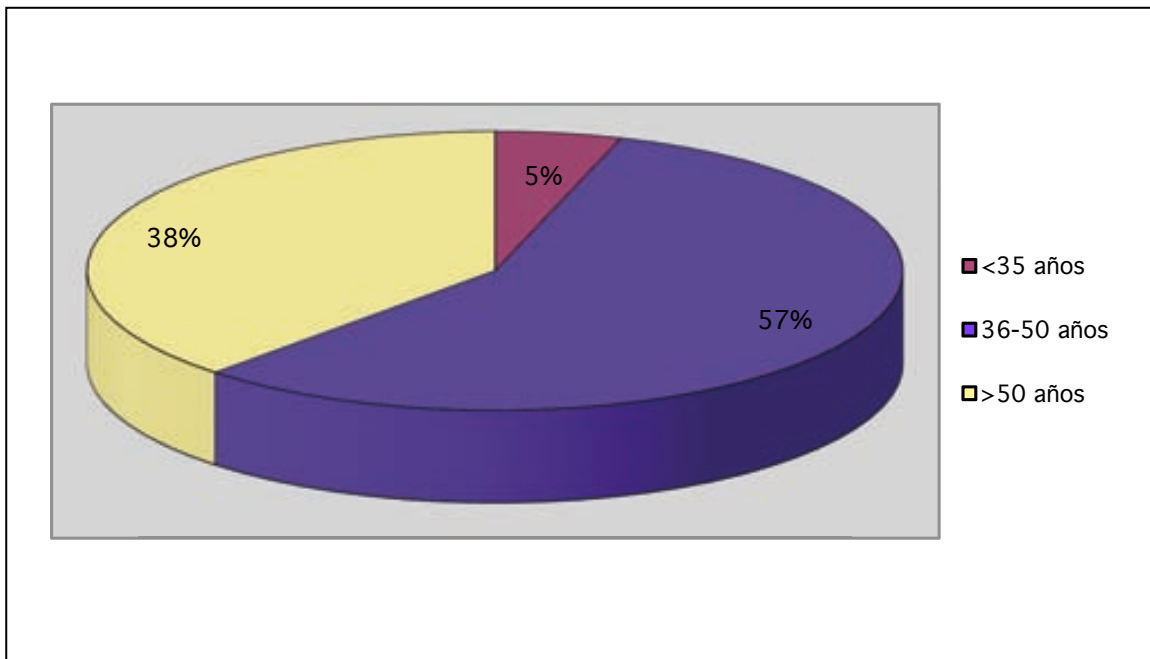


Figura 31. Distribución de la población por edad.

En la tabla 12 se muestran las diferentes características clinicopatológicas globales.

	Casos (%) (rango)
N (pacientes)	129
Edad media (años)	47,47 (31-73)
Estado hormonal	
Premenopausia	87 (67,4)
Menopausia	42 (32,6)
Tamaño tumoral medio (cm)	
Exploración	3,78 (0-10)
Ecografía	3,24 (0-8)
RMN	3,66 (1-8,5)
NR	28
Multifocalidad	
Sí	28 (21,7)
No	101 (78,3)
Multicéntrico	
Sí	22 (17,1)
No	107 (82,9)
Estadificación Tumoral	
T1c	8 (6,2)
T2	85 (65,9)
T3	17 (13,2)
T4	19 (14,7)
Afectación ganglionar	79 (61,2)
Histología	
Carcinoma ductal invasivo	116 (90,6)
Carcinoma lobulillar invasivo	10 (7,8)
Otros	2 (1,6)
NR	1
Grado prequimioterapia	
I	48 (38,1)
II	53 (42,1)
III	25 (19,8)
NR	3
Receptores Hormonales	
Positivo	105 (81,4)
Negativo	24 (18,6)
RE	
Positivo	100 (77,5)
Negativo	29 (22,5)
RP	
Positivo	84 (65,1)
Negativo	45 (34,9)
HER2	
Positivo	44 (34,1)
Negativo	85 (65,9)
Ki 67	
Alto (> o = 14%)	64 (66)
Bajo (<14%)	33 (34)
NR	32
Subtipo tumoral	
RH positivo/HER2 negativo	71 (55)
HER2 positivo	44 (34,1)
Triple negativo	14 (10,9)

Tabla 12. Datos descriptivos globales

El **tamaño tumoral** medio fue de 3,78cm \pm 2,01 (0-10) a la exploración clínica, 3,24cm \pm 1,34 (0-8) por ecografía y 3,66 \pm 1,64 (1-8,5) por RMN. Según la clasificación TNM, 8 pacientes (6,2%) presentaban T1c, 85 T2 (65,9%), 17 T3 (13,2%) y 19 T4 (14,7%) (Figura 32). Once pacientes (8,5%) presentaron un tumor clasificado como T4b, correspondiente a una infiltración cutánea no inflamatoria, 1 caso T4c (0,8%) y 7 pacientes T4d (5,4%).

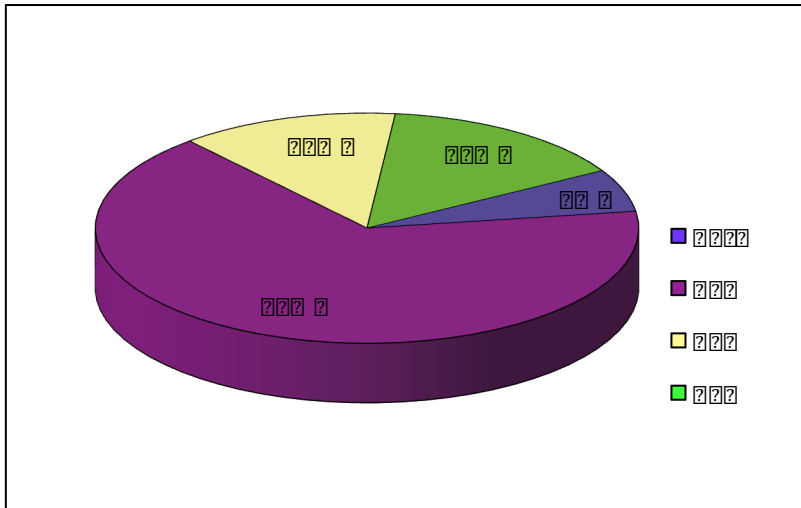


Figura 32. Distribución del tamaño tumoral según la estadificación TNM

Las **características histológicas** de los tumores que se encontraron con mayor frecuencia fueron las siguientes:

- carcinoma ductal infiltrante en 116 casos (90,6%).
- grado prequimioterapia II en 53 pacientes (42,1%).

Tras analizar los factores pronósticos y predictivos, 79 pacientes (61,2%) presentaron afectación ganglionar, 44 casos (34,1%) fueron HER2 positivo y 105 (81,4%) tuvieron receptores hormonales positivos, 100 casos RE positivos (77,5%) y 84 RP positivo (65,1%). De las 97 pacientes en las que se estudió el Ki67, en 64 (66%) se observó un Ki 67 alto.

En relación a los **subtipos tumorales**, 71 pacientes (55%) eran RH positivos/HER2 negativo, 44 (34%) HER2 positivos y 14 pacientes (11%) presentaron tumores triple negativo (Figura 33).

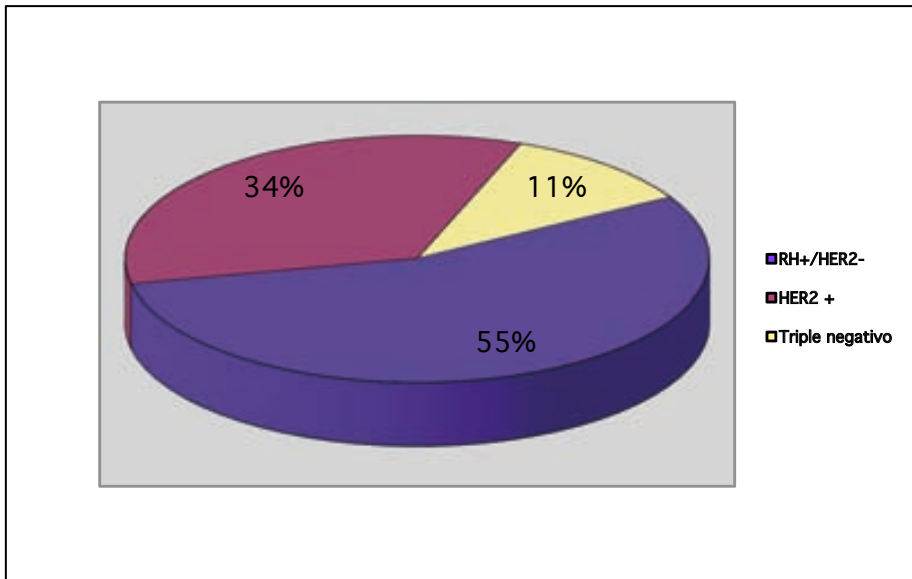


Figura 33. Distribución de los subtipos tumorales en la población.

5.1.2. CARACTERÍSTICAS DEL TRATAMIENTO NEOADYUVANTE Y VALORACIÓN DE LA RESPUESTA TUMORAL

Los esquemas de quimioterapia neoadyuvante son presentados en la tabla 13. Se observa que la mayoría de pacientes (71,3%) recibieron una quimioterapia secuencial basada en antraciclinas y taxanos, 33 pacientes (25,6%) un régimen basado en antraciclinas solas (sin taxanos) y un grupo reducido de 4 pacientes (3,1%) siguió un esquema basado sólo en taxanos (Figura 34).

-En el grupo de antraciclinas solas, la mediana de ciclos administrados fue de 4.

-En el grupo sólo taxanos fue de 6.

-El grupo antraciclinas/taxanos recibió de mediana 4 ciclos de antraciclinas seguidos de 4 ciclos de docetaxel o 12 semanas de paclitaxel. Las duraciones mínima (3 ciclos) y máxima (12 ciclos) corresponden, respectivamente, a las pacientes en las que la quimioterapia debió ser interrumpida precozmente (mala tolerancia, progresión de la enfermedad) y a aquéllas en las que el docetaxel fue sustituido por paclitaxel (la equivalencia es normalmente 3 ciclos de paclitaxel por un ciclo de docetaxel).

Desde el 2006, 93 pacientes (72%) recibieron QNA, 30 (32,2%) de ellas eran HER2 positivo y se les administró un esquema neoadyuvante con trastuzumab.

	Casos (%) (rango)
N pacientes	129 (100)
Esquema de QT	
Antraciclinas solas	33 (25,6)
Taxanos solos	4 (3,1)
Antraciclinas+taxanos	92 (71,3)
Trastuzumab neoadyuvante	
Si	30 (68,2)
No	14 (31,8)
Mediana de ciclos	
Antraciclinas solas	4 (3-4)
Taxanos solos	6 (1-6)
Antraciclinas+taxanos	(3-12)
Docetaxel	4+4
Paclitaxel	4+12

Tabla 13. Características de los diferentes esquemas

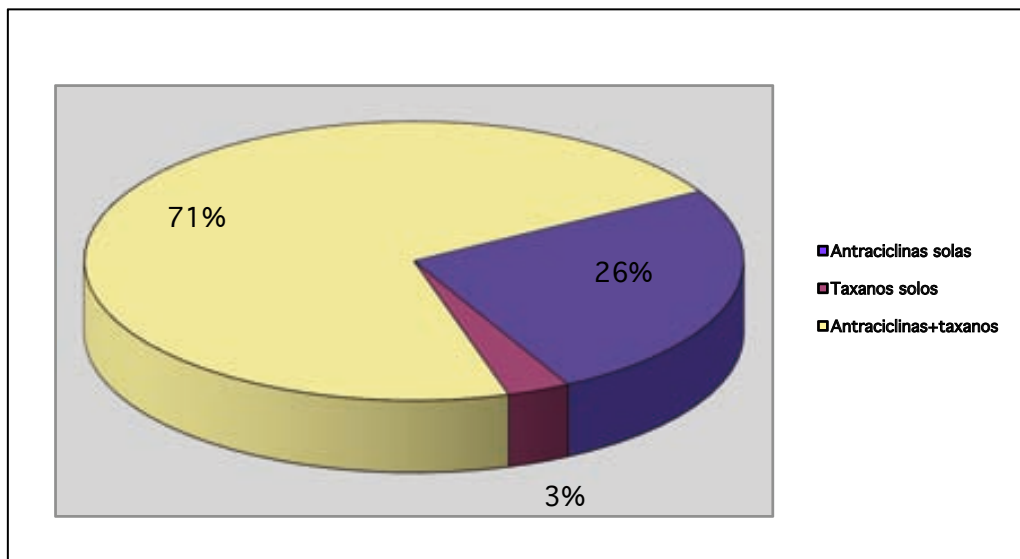


Figura 34. Tipo de quimioterapia neoadyuvante

La valoración de la respuesta clínicoradiológica se realizó tras el último ciclo de quimioterapia y la respuesta anatomopatológica se valoró en la pieza quirúrgica (Tabla 14). En la exploración clínica se encontró un tamaño tumoral medio de 1,6cm +- 1,76 (0-7), con una respuesta clínica completa en 76 casos (62,3%).

En cuanto a la respuesta radiológica, el tamaño tumoral medio por ecografía fue de 1,6cm +- 2,1 (0-1,8) y por RMN de 1,87cm +- 3,7 (0-2,5). Se observó

una respuesta radiológica completa en 34 casos (31,2%), parcial en 64 (50%) y no respuesta en 30 pacientes (23,4%).

La respuesta anatomopatológica mostró una tasa de **pCR del 29,5%** (38 pacientes MyP 5) y **49,6% con muy buena respuesta** (64 pacientes MyP 4/5). El tamaño tumoral histológico medio fue de 1,3cm +- 1,44 (0-7,5).

	Exploración clínica	Valoración radiológica		Valoración anatomopatológica
		Ecografía	RMN	
N casos	122	109	75	129
Tamaño tumoral residual (cm)				
Medio	1,6	1,6	1,87	1,3
Min-Max	0-7	0-1,8	0-2,5	0-7,5
Respuesta Completa casos (%)	76 (62,3)	34 (31,2)		38 (29,5)

Tabla 14. Respuesta tumoral

Se observó una buena correlación entre respuesta radiológica completa y la pCR (31,2% y 29,5%, respectivamente). La exploración clínica completa no fue específica de pCR pero si mostró una correlación con una buena respuesta radiológica (parcial y completa) y anatomopatológica (MyP 4/5). De las 76 pacientes (62,3%) que presentaron una respuesta clínica completa, 65 (85,5%) tuvieron también una buena respuesta radiológica (31 pacientes respuesta completa, 34 pacientes respuesta >50%) y 51 (67%) presentaron MyP 4/5. Y de las 64 pacientes con MyP 4/5, 47 (73,4%) presentaron respuesta clínica completa.

5.1.3. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO Y ADYUVANTE

El tratamiento quirúrgico realizado fue conservador en la mama en 74 casos (57,4%) y mastectomía en 55 pacientes (42,6%).

De las 129 pacientes tratadas, a 99 pacientes (76,7%) se les realizó una linfadenectomía axilar. Se observó afectación ganglionar postquimioterapia en 58 pacientes (45%). El número de ganglios axilares extraídos y el número de ganglios afectados oscilaba de 6 a 35 y de 1 a 17, respectivamente. En el 2008 se inició de forma protocolizada el estudio de la axila mediante la técnica del

ganglio centinela prequimioterapia en aquellas pacientes tratadas con neoadyuvancia. A partir de ese año se han tratado 77 pacientes de las cuales se ha realizado ganglio centinela a 42 (54,4%) con resultado negativo en 30 casos (71,4% de las pacientes en las que se hizo GC). El 45,6% de las pacientes tratadas a partir del 2008 (35 casos) requirió una linfadenectomía axilar en primera instancia.

Como tratamiento adyuvante, en 49 pacientes (38%) se administró una quimioterapia adyuvante, 116 (89,9%) recibieron radioterapia y 102 pacientes (79,1%) iniciaron hormonoterapia.

5.2. RESPUESTA PATOLÓGICA Y TAMAÑO TUMORAL

- **Análisis univariado**

En la Tabla 15 se presentan los diversos datos descriptivos ajustados al tamaño tumoral.

En 93 pacientes se diagnosticó un T1c-T2 (72,1%) y 36 casos (27,9%) presentaron un T3-T4. La edad media al diagnóstico en las pacientes T1c-T2 y T3-T4 fue de 47,25 años +- 8,9 (31-68) y 48,06 +-8,8 (35-73) respectivamente. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

En el grupo T1c-T2, el tamaño tumoral medio por ecografía fue 2,92cm +-0,77 (1,5-4,9), y en las pacientes con T3-T4 4,48cm +-2,17 (0-8). Los tumores localmente avanzados presentaban factores pronósticos desfavorables (mayor afectación ganglionar, Ki67 elevado, receptores hormonales negativos y HER2 positivo). De las pacientes con T1c-T2, 48 casos (51,6%) presentaban afectación ganglionar al diagnóstico frente 31 (86,1%) pacientes con T3-T4 (p=0,00). El HER2 era positivo en 25 (26,9%) casos T1c-T2 y en 19 (52,8%) tumores T3-T4 (p=0,005).

En el grupo T1c-T2, 23 pacientes (24,7%) recibieron Antraciclinas, 4 Taxanos (4,3%) y 66 (71%) Antraciclinas y Taxanos, comparado con 10 (27,8%), 0 y 26 casos (71,3%) respectivamente en el grupo T3-T4 (p=0,43).

	T1c-T2 (%) (rango)	T3-T4 (%) (rango)	p
N pacientes	93 (72,1)	36 (27,9)	
Edad media (años)	47,25 (31-68)	48,06 (35-73)	
Tamaño tumoral (cm)			
Exploración clínica	2,9 (0-6)	6,05 (1-10)	
Ecografía	2,92 (1,5-4,9)	4,48 (0-8)	
NR	1 caso	1 caso	
RMN	3,32 (1,3-8,5)	5,37 (1-8)	
NR	5 casos	5 casos	
Afectación ganglionar	48 (51,6)	31 (86,1)	0,00
Histología			
Ductal Infiltrante	86 (92,5)	30 (85,7)	0,48
Lobulillar infiltrante	6 (6,5)	4 (11,4)	
Otros	1 (1,1)	1 (2,9)	
Grado histológico			
I	31 (33,7)	17 (50)	0,93
II	44 (47,8)	9 (26,5)	
III	17 (18,5)	8 (23,5)	
NR	1	2	
Receptores Hormonales			
Positivos	77 (82,8)	28 (77,8)	0,51
Negativos	16 (17,2)	8 (22,2)	
HER2			
+	25 (26,9)	19 (52,8)	0,005
-	68 (73,1)	17 (47,2)	
Ki 67			0,55
Alto	49 (64,5)	15 (71,4)	
Bajo	27 (35,5)	6 (28,6)	
Quimioterapia			
Antraciclinas	23 (24,7)	10 (27,8)	0,43
Taxanos	4 (4,3)	0	
Antraciclinas+Taxanos	66 (71)	26 (72,2)	
Exploración clínica			
Se palpa	29 (31,5)	23 (63,9)	0,001
No se palpa	63 (68,5)	13 (36,1)	
Respuesta patológica			
MyP 1-3	46 (49,5)	19 (52,8)	0,73
MyP 4/5	47 (50,5)	17 (47,2)	
Tratamiento Quirúrgico			
Tumorectomía	70 (75,3)	4 (11,1)	0,00
Mastectomía	20 (24,7)	32 (88,9)	
Tratamiento axilar			
GC	30 (32,3)	0	0,00
Linfadenectomía	63 (67,7)	36 (100)	
Subtipo tumoral			
RH positivos/HER2-	57 (61,3)	14 (38,9)	0,021
HER2+	25 (26,9)	19 (52,8)	
Triple negativos	11 (11,8)	3 (8,3)	

Tabla 15. Datos descriptivos según el tamaño tumoral

A la exploración clínica postquimioterapia, el 68,5% de los tumores iniciales presentaron una respuesta clínica completa, frente al 36,1% de los estadios

avanzados ($p=0,001$). No obstante, al analizar el grado de regresión tumoral anatomopatológico entre ambos grupos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Por lo que la exploración clínica fue menos precisa en los tumores avanzados.

Al estudiar la respuesta patológica, diferenciando buena respuesta (MP 4/5) versus mala respuesta (MP 1-3) se observó que existía la misma quimiosensibilidad en tumores iniciales que en tumores localmente avanzados, 47 pacientes (50,5%) en el grupo T1c-T2 presentaron MP 4/5 frente a 17 (47,2%) del grupo T3-T4 ($p=0,73$) (Figuras 35 y 36).

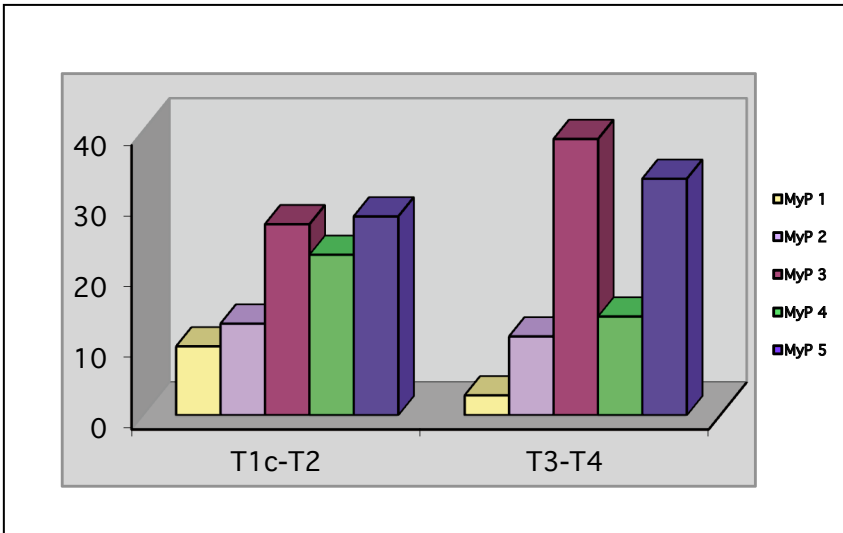


Figura 35. Regresión tumoral según tamaño tumoral.

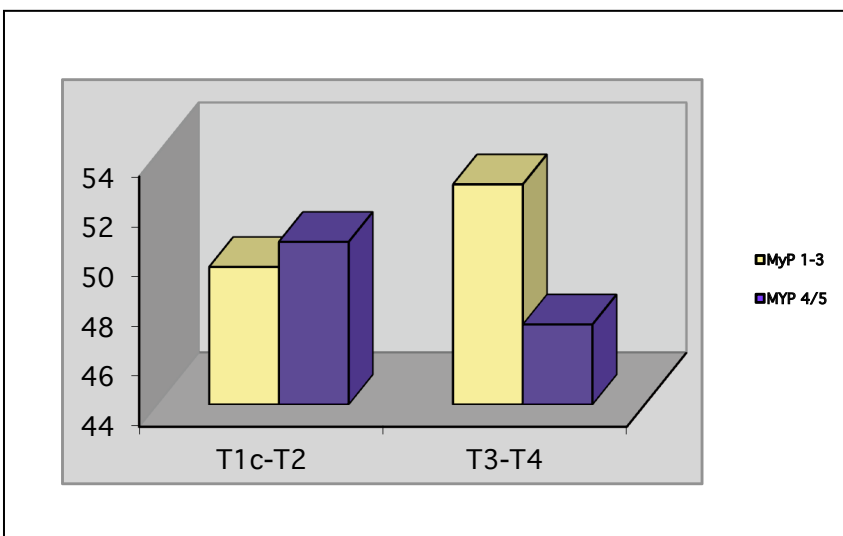


Figura 36. Miller y Payne agrupado según tamaño tumoral.

En el grupo T1c-T2 se realizó con más frecuencia un tratamiento quirúrgico conservador: tumorectomía en 70 pacientes (75,3%) frente 4 casos (11,1%) en T3-T4 ($p=0,00$).

Los estadios iniciales presentaban en mayor porcentaje el subtipo receptores hormonales positivos/HER2- (61,3% versus 38,9%) mientras que en los T3-T4 se observaba tumores HER2 positivo (26,9% vs 52,8%) ($p=0,021$).

5.3. FACTORES PREDICTIVOS CLÍNICOPATOLÓGICOS

- **Análisis univariado**

Se observó una buena respuesta patológica (MyP 4/5) en 64 pacientes (49,6%). Se realizó un análisis univariado para determinar los factores predictivos clásicos relacionados con una buena respuesta anatomopatológica a la QNA. Los resultados son presentados en la tabla 16.

Ni la **edad** ni el **tamaño tumoral** se asociaron al grado de regresión tumoral ($p=0,68$, $p=0,73$).

El **tipo histológico** CLI presentó la misma respuesta patológica que el CDI, 57 casos de CDI (49,1%) presentaron MyP 4/5 frente 5 casos CLI (50%) ($p=0,99$). Pero si se analiza el grado de MyP de forma independiente, se observó que CDI presentó un mayor grado de regresión 5 que el CLI, 35 casos (30,17%) CDI frente 2 casos (20%) ($p<0,05$, Figura 37).

Los tumores con **grado histológico** elevado presentaron una tendencia a una mayor respuesta, 14 casos grado III (56%) tuvieron MyP 4/5 frente 20 (41,7%) con grado I ($p=0,4$).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al número de ganglios afectados postquimioterapia y el grado de regresión tumoral,

pero si existe una tendencia a una mayor respuesta patológica tumoral cuando existe menor afectación ganglionar prequimioterapia:

-28 pacientes (56%) sin afectación ganglionar obtuvieron un grado de regresión tumoral MP 4/5 frente 36 casos (45,6%) con afectación ganglionar.

	Miller y Payne casos (%)		p
	MyP 1-3	MyP 4/5	
Edad (años)			
<35	3 (42,9)	4 (57,1)	0,68
>= 35	62 (50,8)	60 (49,2)	
Estadificación tumoral			
T1c-T2	46 (49,5)	47 (50,5)	0,73
T3-T4	19 (52,8)	17 (47,2)	
Histología			
Ductal Infiltrante	59 (50,9)	57 (49,1)	0,99
Lobulillar infiltrante	5(50)	5 (50)	
Otros	1 (50)	1 (50)	
Grado Prequimioterapia			
I	28 (58,3)	20 (41,7)	0,4
II	25 (47,2)	28 (52,8)	
III	11 (44)	14 (56)	
Afectación ganglionar	43 (54,4)	36 (45,6)	0,24
Ki67			
alto	28 (43,8)	36 (56,3)	0,11
bajo	20 (60,6)	13 (39,4)	
Receptores Hormonales			
+	57 (54,3)	48 (45,7)	0,06
-	8 (33,3)	16 (66,7)	
RP			
+	49 (58,3)	35 (41,7)	0,014
-	16 (35,6)	29 (64,4)	
RE			
+	55 (55)	45 (45)	0,05
-	10 (34,5)	19 (65,5)	
HER2			
+	15 (34,1)	29 (65,9)	0,008
-	50 (58,8)	35 (41,2)	
Quimioterapia			
Antraciclinas	18 (54,5)	15 (45,5)	0,48
Taxanos	3 (75)	1 (25)	
Antraciclinas+Taxanos	44 (47,8)	48 (52,2)	
Subtipo tumoral			
RH+/HER2-	43 (60,6)	28 (39,4)	0,022
HER2+	15 (34,1)	29 (65,9)	
Triples Negativos	7 (50,4)	7 (50)	

Tabla 16. Respuesta histológica – Análisis univariado.

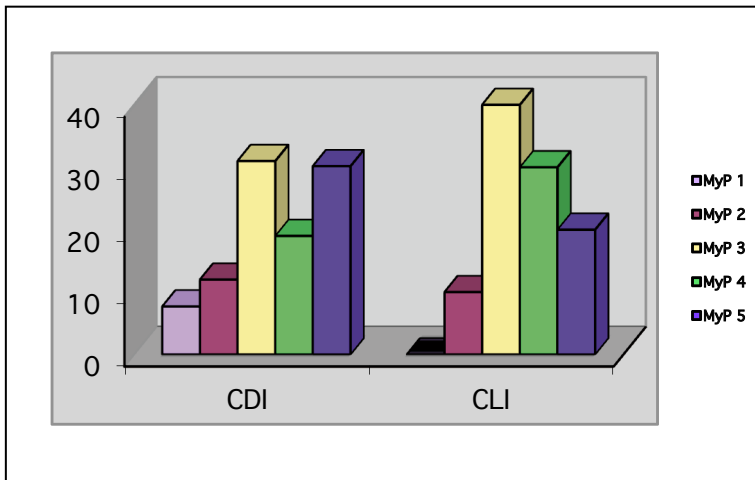


Figura 37. Regresión tumoral según tipo histológico

El estudio del **Ki67** no mostró diferencias significativas ($p=0,11$), en cambio, el estudio de los **receptores hormonales, RE y RP, y HER2** resultaron ser factores predictivos de buena respuesta:

- la ausencia de receptores de progesterona se asoció a una mejor respuesta (64,4% de MyP 4/5 frente 41,7% en RP-) ($p=0,014$). Se observó también con los RE, el 65,5% de tumores RE negativos presentaron MyP 4/5, frente 45% RE+ ($p=0,05$).
- la sobreexpresión de HER2 fue predictivo de MyP 4/5, con tasas del 65,9% versus 41,2% en HER2- ($p=0,008$).

Analizando los diferentes **esquemas de quimioterapia**, se observó una tendencia a una mejor respuesta con la adición de taxanos, aunque dichas diferencias no fueron estadísticamente significativas. En 48 pacientes (52,2%) tratadas con antraciclinas+taxanos se obtuvo un MyP 4/5, frente 15 pacientes (45,5%) tratadas con sólo antraciclinas ($p=0,48$).

En relación a los **subtipos tumorales**, se observó MyP 4/5 en 28 pacientes RH+/HER2- (39,4%), 29 HER2+ (65,9%), y 7 triple negativo (50%) ($p=0,02$, Figura 38). La tasa de pCR (MyP5) según los subtipos tumorales fue la siguiente: 12,6% en RH+/HER2-, 54,5% HER2+ y 35,7% en triple negativos, $p<0,05$ (Figura 39).

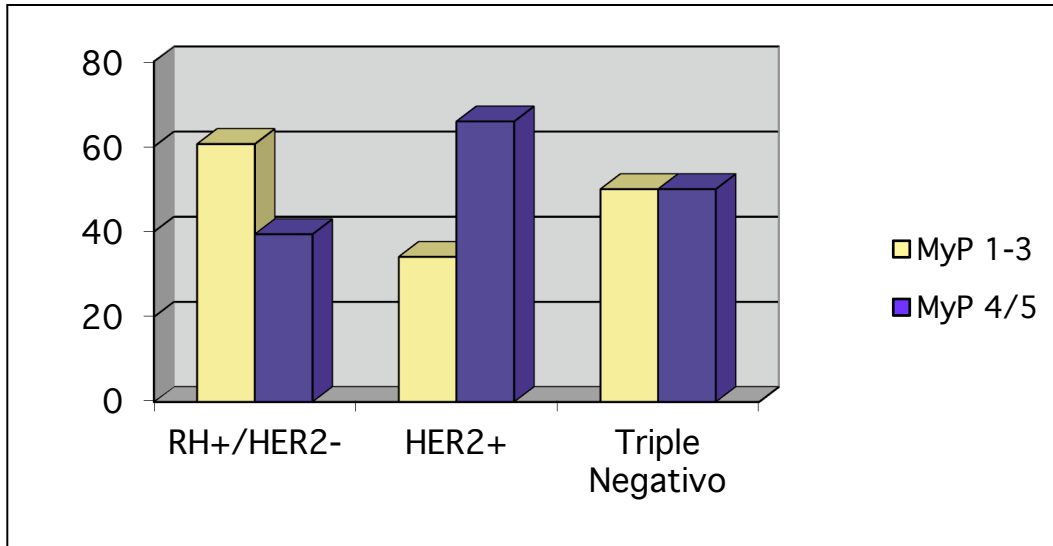


Figura 38. Regresión anatomopatológica según subtipo tumoral.

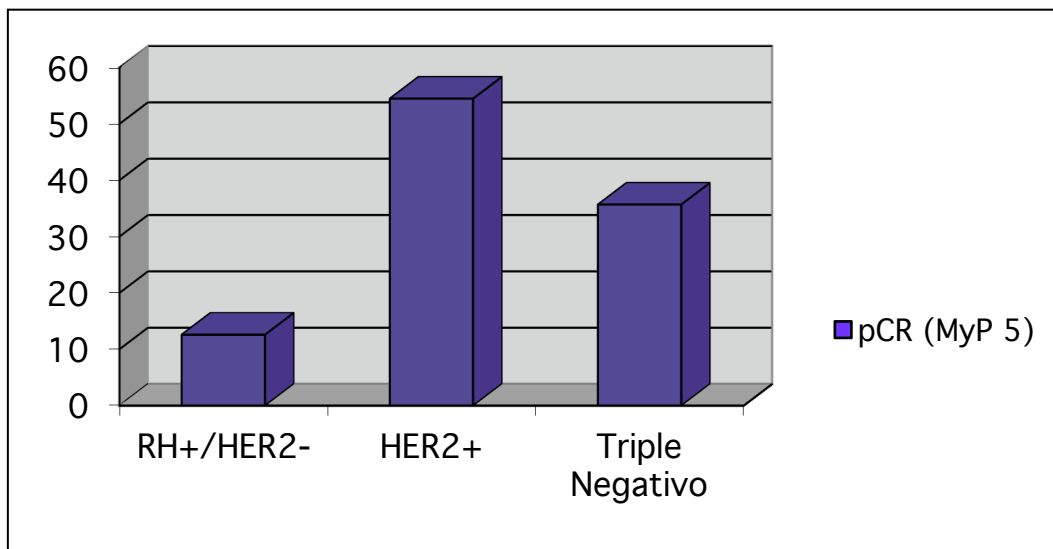


Figura 39. pCR (MyP 5) según subtipo tumoral

- **Análisis multivariado**

Para establecer los posibles factores asociados, las variables del análisis univariado fueron posteriormente estudiadas mediante un análisis multivariado (Tabla 17).

	β	Odds Ratio	IC 95%	p
Subtipo tumoral				
HER2+	1,31	3,73	1,52 – 9,13	0,004
Triple -	0,44	1,56	0,4-6,07	0,51
RH +/HER2 -	-	1		
Grado prequimioterapia				
II vs I	-0,56	0,57	0,18-1,76	0,57
III vs I	-0,58	0,944	0,30-2,91	0,944
Estadificación tumoral				
T1c-T2	0,45	1,57	0,63 – 3,88	0,32
T3-T4	-	1		

Tabla 17. Buena respuesta histológica (MyP 4/5) - Análisis multivariado

Se observó que **el único factor estadísticamente significativo asociado a la respuesta patológica fue el subtipo tumoral**. Siendo los tumores HER2 positivos los que respondían mejor, OR 3,73 (1,52-9,13, p=0,004). El tamaño tumoral inicial o el grado histológico no resultó ser un factor asociado de la respuesta anatomopatológica.

5.4. PRONÓSTICO

5.4.1. RECIDIVAS, METÁSTASIS Y MORTALIDAD

Se analizaron los factores pronósticos de progresión (Tabla 18).

Se observaron 6 **recidivas locales** (4,7%):

-En 4 casos (66,6%) se había obtenido una respuesta anatomopatológica MyP 3 y en las 2 (33,3%) restantes una pCR (Figura 40).

-Se observó que 2 casos (33,3%) presentaron tumor RH+/HER2-, 3 (50%) HER2+ y 1 (16,7%) Triple negativo (Figura 41).

-Todas ellas presentaban afectación ganglionar al diagnóstico y sólo una de ellas (paciente HER2 positivo) presentó respuesta completa a nivel ganglionar.

-El tiempo medio de aparición fue de 54 meses. Analizando las dos pacientes que recidivaron con MyP 5 se observó que presentaban el subtipo tumoral RH+/HER2- y la recidiva fue posterior a los 5 años del diagnóstico.

Paciente	Miller Payne	Subtipo tumoral	Afectación ganglionar previa	Afectación ganglionar posterior
1	5	RH+/HER2-	Sí	Sí
2	3	HER2+	Sí	Sí
3	5	RH+/HER2-	Sí	Sí
4	3	Triple-	Sí	Sí
5	3	HER2+	Sí	Sí
6	3	HER2+	Sí	No

Tabla 18. Factores pronósticos de recidiva

Se diagnosticaron **metástasis** en 27 pacientes (20,9%), y el tiempo medio de aparición fue de 35 meses, siendo la metástasis más precoz a los 8 meses y la más tardía a los 96 meses. Como factores pronósticos se observó que (Tabla 19):

-Sólo 8 pacientes (29,6%) presentaron MyP 4/5, 4 (50%) eran RH+/HER2- y 4 (50%) tumores HER2+. Las 19 pacientes restantes (70,3%) que presentaron metástasis habían obtenido una mala respuesta (MyP 1-3) (Figura 40).

-13 eran tumores RH+/HER2- (48%), 10 (37%) HER2+ y 4 (15%) Triples negativos (Figura 41).

-En 22 pacientes (81,5%) se observó afectación ganglionar al diagnóstico y sólo 3 (11%) tenían pCR ganglionar (los 3 casos fueron tumores HER2+).

Paciente	Miller Payne	Subtipo tumoral	Afectación ganglionar previa	Afectación ganglionar posterior
1	5	HER2+	Sí	Sí
2	3	Triple -	Sí	Sí
3	3	HER2+	Sí	Sí
4	2	RH+/HER2-	Sí	Sí
5	2	RH+/HER2-	Sí	Sí
6	2	Triple-	Sí	Sí
7	3	RH+/HER2-	Sí	Sí
8	4	RH+/HER2-	No	No
9	3	RH+/HER2-	Sí	Sí
10	3	RH+/HER2-	Sí	Sí
11	3	HER2+	Sí	No
12	2	HER2+	No	No
13	4	HER2+	Sí	No
14	1	HER2+	No	No
15	5	RH+/HER2-	Sí	Sí
16	4	RH+/HER2-	Sí	Sí
17	3	RH+/HER2-	Sí	Sí
18	1	RH+/HER2-	Sí	Sí
19	5	HER2+	Sí	No
20	4	RH+/HER2-	Sí	Sí
21	3	HER2+	Sí	Sí
22	3	Triple-	Sí	Sí
23	3	RH+/HER2-	No	Sí
24	3	RH+/HER2-	Sí	Sí
25	3	HER2+	Sí	Sí
26	3	Triple-	Sí	Sí
27	5	HER2+	No	No

Tabla 19. Factores pronósticos de metástasis

La **tasa de mortalidad** en el estudio fue de 10,9% (14 pacientes) y la mediana de tiempo 64,3 meses. Como factores pronósticos se encontró que:

- 4 pacientes (28,5%) habían presentado MyP 4/5 (Figura 40). Y de éstas, 2 (50%) eran RH+/HER2- y 2 (50%) HER2+.

- De las 14 pacientes, 7 (50%) eran RH+/HER2-, 5 (35,7%) HER2+ y 2 (14,3%) triple negativo (Figura 41).

-En 11 casos (78,6%) existía afectación ganglionar previa, y sólo 1 paciente (7,1%) presentó pCR ganglionar (tumor HER2 positivo).

En las dos figuras siguientes se resume el porcentaje de recidivas, metástasis y éxitos según la respuesta anatomopatológica y el subtipo tumoral.

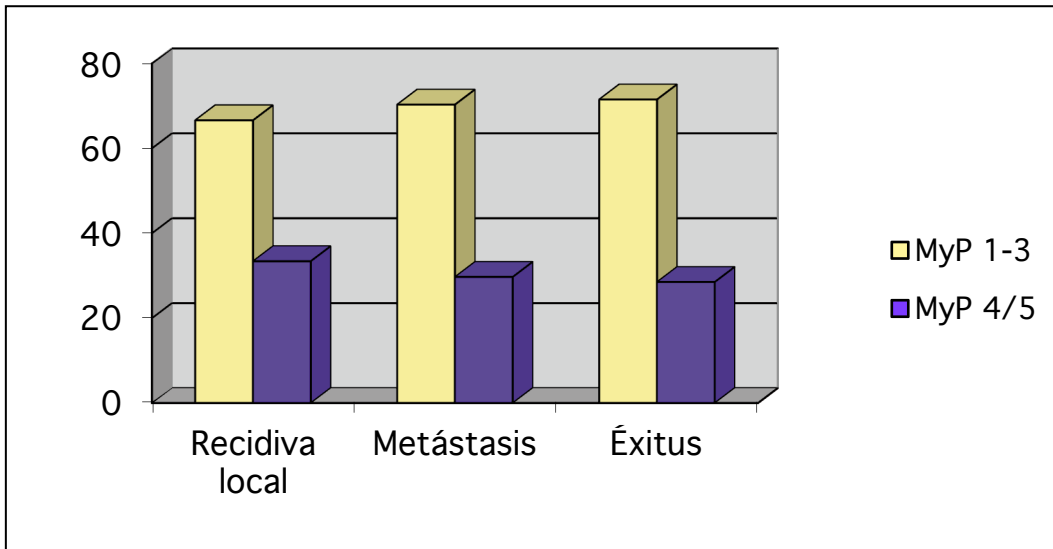


Figura 40. Pronóstico según respuesta anatomopatológica

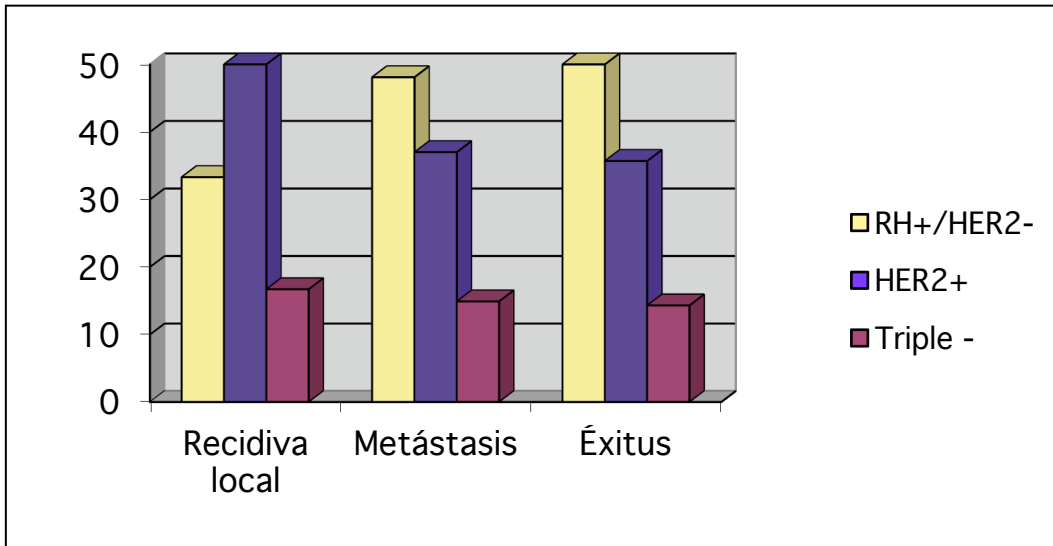


Figura 41. Pronóstico según subtipo tumoral.

5.4.2. SUPERVIVENCIA

La mediana de seguimiento fue de 40 meses (10-144 meses). La SG a los 5 años según el tamaño tumoral (T1c-T2 versus T3-T4) fue de 90% en los T1c-T2 y 83% en T3-T4 ($p=0,48$). La SLE fue de 79,6% y 45% respectivamente ($p=0,005$) (Figura 42).

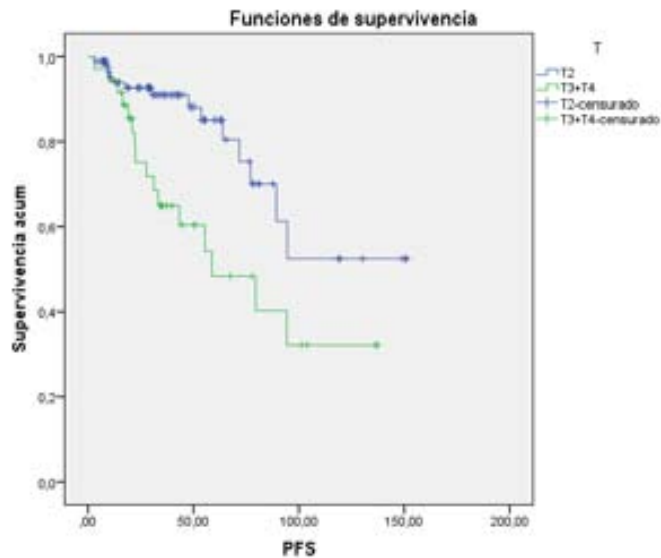


Figura 42. SLE en función del tamaño tumoral

La supervivencia global a 5 años en las pacientes con MP 4/5 fue de 95% y en MP 1-3 de 90% ($p=0,103$), y la supervivencia libre de enfermedad en ambos grupos fue de 88% y 55% respectivamente ($p=0,06$) (Figura 43).

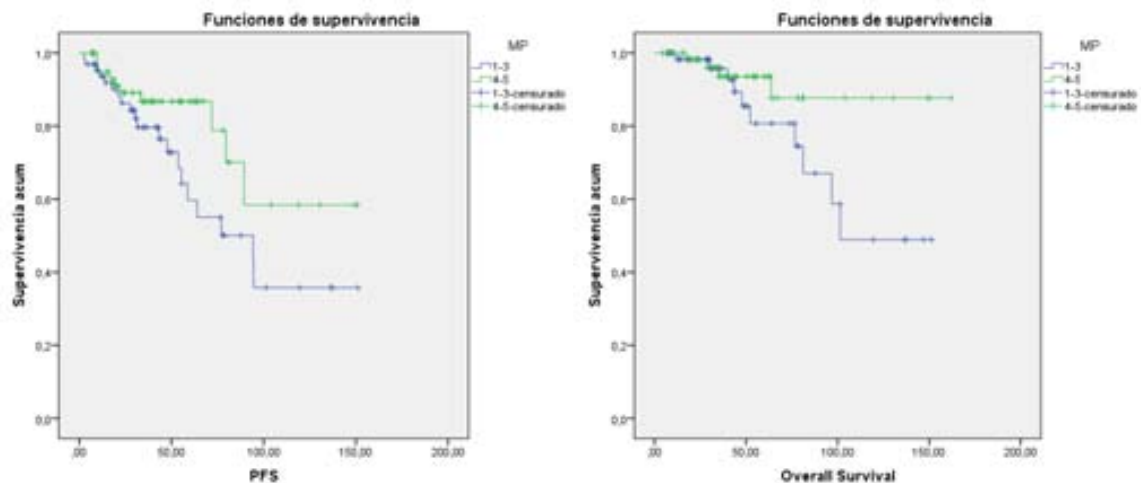


Figura 43. SG y SLE en función de la respuesta tumoral

Los tumores triples negativos mostraron una peor supervivencia en relación a los tumores RH+/HER2- y HER2+. La SLE a los 5 años fue del 82% en HER2+, 80% en RH+/HER2- y del 60% en triples negativos ($p=0,42$). La SG en cada uno de los grupos fue del 90%, 83% y 78%, respectivamente ($p=0,42$).

El impacto pronóstico de la respuesta anatomopatológica MyP fue más importante en los tumores triple negativos ($p=0,035$).

La SLE a 5 años ajustado al subtipo tumoral y a la respuesta MyP fue de (Figura 44):

- 50% en HER2+/no respuesta, 82% HER2+/respuesta ($p=0,31$).

- 68% RH+/HER2-/no respuesta, 85% RH+/HER2-/respuesta ($p=0,39$).

- 25% triple negativo/no respuesta, y 100% triple negativo/respuesta ($p=0,03$).

La SG a los 5 años fue de 82%, 95% ($p=0,3$), 80%, 90% ($p=0,51$), 50% y 100% ($p=0,22$) en los diferentes grupos, respectivamente.

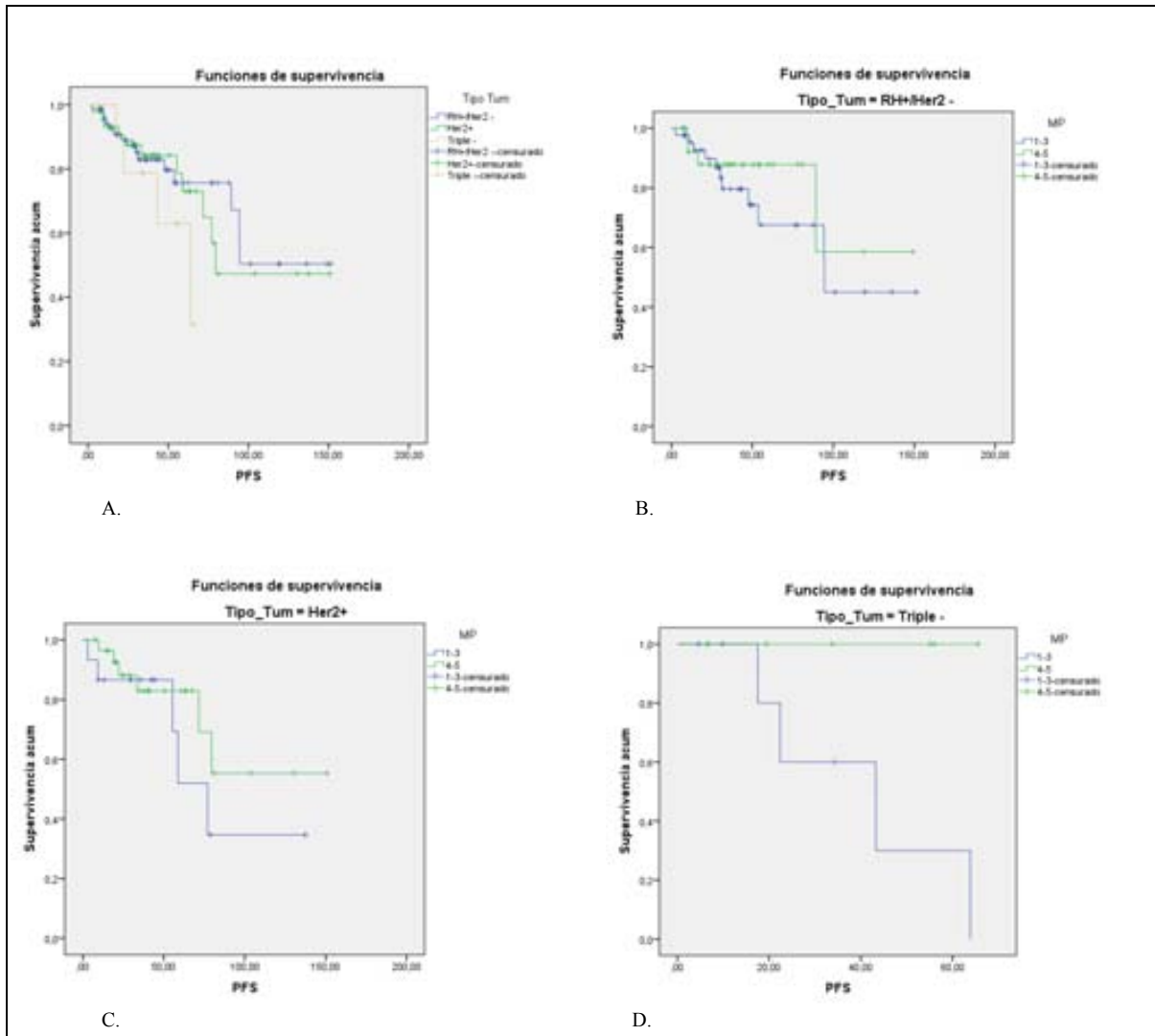


Figura 44. Impacto pronóstico de la respuesta patológica Miller y Payne en la SLE según el subtipo tumoral. A: SLE según los subtipos tumorales. B: tumores RH+/HER2-. C: tumores HER2+. D: tumores triple negativos.

En el análisis multivariado, se observó como la afectación ganglionar, el estado de los receptores hormonales y la respuesta patológica MyP fueron factores asociados a la progresión de la enfermedad (Tabla 20).

	β	Odds Ratio	IC 95%	p
MyP 4/5	-2,67	0,069	0,008-0,59	0,015
RH positivos	-1,41	0,242	0,086-0,684	0,007
Afectación ganglionar	1,2	3,33	1,26-8,76	0,015
MyP 1-3 + RH negativos	2,4	11,05	1,09-111,486	0,043

Tabla 20. Análisis multivariado para SLE

-Una buena regresión tumoral y receptores hormonales positivos fueron factores protectores con una OR de 0,069 y 0,242, respectivamente.

-La afectación ganglionar (OR 3,33) o la presencia conjunta de receptores hormonales negativos y mala respuesta anatomopatológica (OR 11,05) fueron factores favorecedores de recidiva local o metástasis.

5.5. FACTORES PREDICTIVOS MOLECULARES

De las 129 pacientes incluídas en el trabajo, 92 fueron elegibles para el estudio de factores predictivos moleculares en la biopsia preterapéutica mientras que 37 fueron descartadas por no disponerse de tumor suficientemente representativo en la biopsia previa.

Las características clínicas e inmunohistoquímicas de las 92 pacientes en las que se realizó el estudio molecular eran comparables con las características de la cohorte entera (129 pacientes), como se observa en la Tabla 21.

	Cohorte entera casos (%) (rango)	Cohorte estudio molecular casos (%) (rango)
N (pacientes)	129	92
Edad media (años)	47,47 (31-73)	47,57 (31-68)
Estado hormonal		
Premenopausia	87 (67,4)	67 (72,8)
Menopausia	42 (32,6)	25 (27,2)
Tamaño tumoral medio (cm)		
Exploración	3,78 (0-10)	3,48 (0-10)
Ecografía	3,24 (0-8)	3,11 (0-8)
RMN	3,66 (1-8,5)	3,63 (1-8)
NR	28	0
Afectación ganglionar	79 (61,2)	53 (57,6)
Histología		
Carcinoma ductal invasivo	116 (90,6)	82 (90,1)
Carcinoma lobulillar invasivo	10 (7,8)	7 (7,7)
Otros	2 (1,6)	2 (2,2)
NR	1	1
Grado prequimioterapia		
I	48 (38,1)	35 (38,5)
II	53 (42,1)	37 (40,7)
III	25 (19,8)	19 (20,9)
NR	3	1
Receptores Hormonales		
Positivo	105 (81,4)	74 (80,4)
Negativo	24 (18,6)	18 (19,6)
RE		
Positivo	100 (77,5)	70 (76,1)
Negativo	29 (22,5)	22 (23,9)
RP		
Positivo	84 (65,1)	60 (65,2)
Negativo	45 (34,9)	32 (34,8)
HER2		
Positivo	44 (34,1)	28 (30,4)
Negativo	85 (65,9)	64 (69,6)
Ki 67		
Alto (> o = 14%)	64 (66)	54 (66,7)
Bajo (<14%)	33 (34)	27 (33,3)
NR	32	11
Quimioterapia		
Antraciclinas	33 (25,6)	23 (25)
Antraciclinas+Taxanos	92 (71,3)	66 (71,7)
Taxanos	4 (3,1)	3 (3,3)
Respuesta patológica		
MyP 1-3	65 (50,4)	45 (48,9)
MyP 4/5	64 (49,6)	47 (51,1)
Respuesta patológica completa		
MyP 5	38 (29,5)	26 (28,3)
Subtipo tumoral		
RH positivo/HER2 negativo	71 (55)	53 (57,6)
HER2 positivo	44 (34,1)	28 (30,4)
Triple negativo	14 (10,9)	11 (12)
Subtipo molecular		
Luminal A		23 (25)
Luminal B HER2-	-----	30 (32,6)
Luminal B HER2+		21 (22,8)
HER2+/RH-		7 (7,6)
Triple Negativo		11 (12)

Tabla 21. Características de la cohorte de pacientes con estudio molecular.

5.5.1. ESTUDIO DE EXPRESIÓN de los genes FGFR1, BRCA1, RAP80, BIM, betaTRCP, PTPN12, YAP, HIF1alfa, GAS6, AXL, ZNF217, EZH2 y ROR1.

La tabla siguiente (Tabla 22) muestra los datos descriptivos de cada gen, con el número N de muestras válidas y perdidas; y los valores distribuidos por percentiles (P).

	AXL	BRCA1	RAP80	BIM	EZH2	ROR1	FGFR1	PTPN12	YAP	GAS6	BTRCP	HIF1a	ZNF217	
N	Válidos	61	49	58	61	47	34	65	66	68	60	51	60	64
	Perdido	68	80	71	68	82	95	64	63	61	69	78	69	65
P	25	1,847	5,233	2,358	3,307	3,246	,974	1,576	2,364	1,674	1,181	,756	,609	4,064
	30	2,057	6,624	2,744	3,825	3,904	1,126	1,958	2,551	1,772	1,488	,811	,659	4,865
	33	2,283	7,610	2,976	4,107	3,992	1,256	2,116	2,714	1,866	1,574	,926	,698	4,914
	50	3,733	11,29	3,771	5,388	6,143	2,071	2,946	3,198	2,430	3,013	1,254	,901	6,856
	66	5,486	14,19	4,221	7,004	8,258	3,019	4,225	4,003	3,141	4,081	1,946	1,057	9,466
	70	5,926	15,86	4,293	7,179	8,619	3,147	4,463	4,332	3,274	4,607	2,312	1,127	10,692
75	6,518	19,74	5,028	7,335	8,994	3,521	5,256	4,472	3,503	5,374	2,598	1,250	12,800	

Tabla 22. Resumen descriptivo de cada gen.

A. Correlación con subgrupos tumorales

Los niveles de expresión fueron diferentes entre los subgrupos tumorales definidos por inmunohistoquímica para los siguientes genes (Tabla 23):

-En el grupo **receptores hormonales positivos en relación a los tumores RH negativos** se observaron niveles más elevados de (Figura 45):

-AXL (niveles >3,74 en 59% vs 15%, p=0,006).

-FGFR1 (>2,95 en el 58% de RH+ frente 15% RH-, p=0,006).

-RAP80 (tercil medio/alto 54% vs 25%, p=0,007; tercil bajo en 22% RH+ vs 75% RH-, p=0,000).

-GAS6 (niveles >3,02 en el 56% de RH+ vs 25% RH-, p=0,05).

-B-TRCP (>1,26 en 60% vs 9%, p=0,003),

-ZNF217 (>6,87 en 60% vs 8%, p=0,001; tercil alto 42% vs 0%, p=0,005).

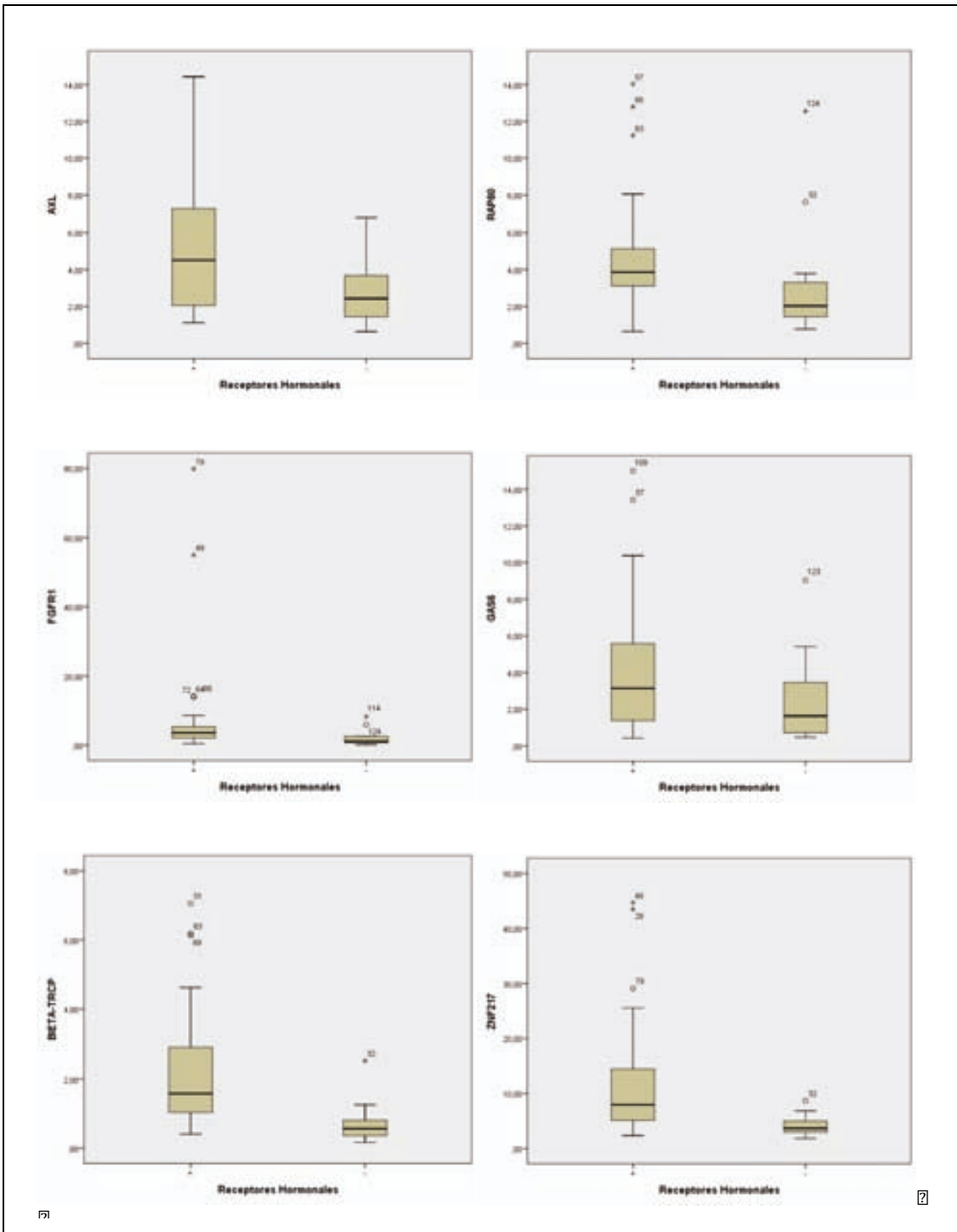


Figura 45. Expresión génica según el status de los receptores hormonales.

	NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA %													
	BRCA bajo t	RAP80 bajo t	BIM bajo t	EZH2 bajo t	ROR1 bajo t	FGFR1 alta m	PTPN12 bajo t	YAP alta m	GAS6 alta m	BTRCP bajo t	HIF alto t	ZNF bajo t	AXL alta m	
RH+	29 12/41	22 10/46	31 15/49	32 12/37	32 8/25	58 30/52	28 15/53	55 30/55	56 27/48	20 8/40	31 15/48	23 12/52	58 28/48	
RH-	62 5/8	75 9/12	50 6/12	40 4/10	33 3/9	15 2/13	54 7/13	31 4/13	25 3/12	82 9/11	33 4/12	75 9/12	15 2/13	
RH+ HER2-	32 9/28	24 8/33	26 9/35	24 6/25	26 5/19	62 23/37	18 7/38	59 24/41	63 22/35	17 5/29	24 8/33	22 8/37	57 20/35	
HER2+	31 5/16	27 4/15	41 7/17	43 6/14	50 4/8	44 8/18	56 10/18	35 6/17	31 5/16	43 6/14	50 9/18	33 6/18	50 8/16	
TN	60 3/5	70 7/10	56 5/9	50 4/8	29 2/7	10 1/10	50 5/10	40 4/10	33 3/9	75 6/8	22 2/9	79 7/9	20 2/10	
Total	49	58	61	47	34	65	66	68	60	51	60	64	61	

Tabla 23. Niveles de expresión génica según los subtipos definidos por inmunohistoquímica (marcado en rojo lo estadísticamente significativo).

t: tercil, m: mediana

-En los **tumores luminales** (excluyendo HER2 positivo) **versus no luminales** (HER2+ y Triple negativo) (Figura 46):

-RAP80 (tercil bajo en 24% RH+/HER2- vs 27% en HER2+ y 70% triple negativo, $p=0,022$).

-FGFR1 ($>2,96$ en 62% RH+/HER2-, 44% HER2+, 10% TN, $p=0,012$).

-B-TRCP ($>1,26$ en 63% RH+/HER2- versus 43% HER2+ y 12% TN, $p=0,04$. Tercil alto en 48% frente 14% y 12%, $p=0,013$).

-ZNF217 ($>6,87$ en 62%, versus 44% y 11%, $p=0,02$. Tercil alto en 46% luminales vs 28% HER2+ y 0% TN, $p=0,016$).

-PTPN12 (tercil medio/alto en 82% vs 44% HER2+, 50% TN, $p=0,011$).

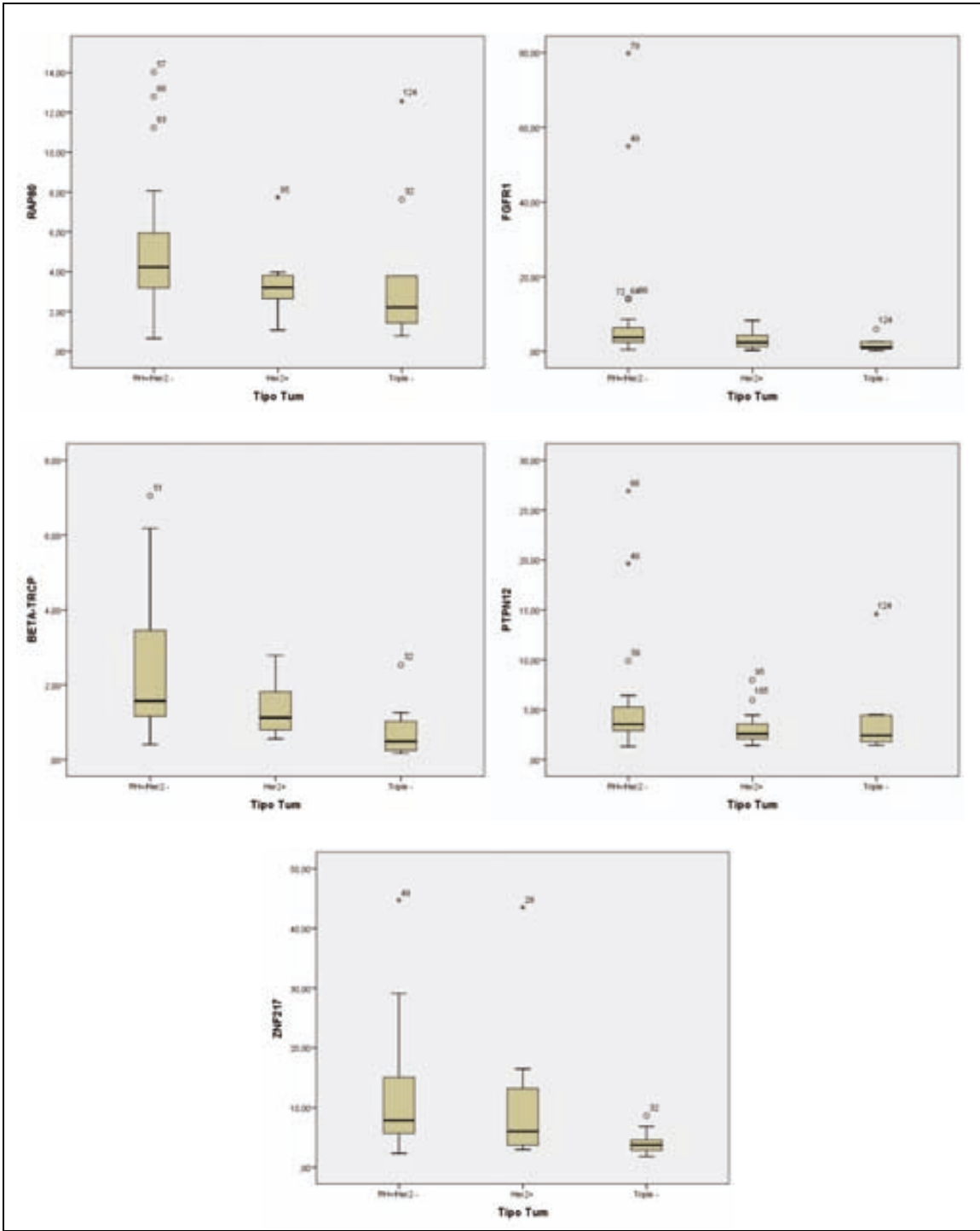


Figura 46. Expresión génica según el subtipo tumoral: RH+/HER2- vs HER2+ y Triple-

-En el **subgrupo Luminal A versus el no Luminal A** (Figura 47, tabla 24):

-AXL (>3,74 en 69% en Luminal A versus 50% Luminal B/HER2-, 61% Luminal B/HER2+, 0% HER2+/RH- y 20% TN, p=0,056; tercil alto en 69% vs 27%, 31%, 0%, 10%, p=0,017).

-FGFR1 (>2,96 en 79% Luminal A versus 52%, 47%, 33% y 10%, respectivamente, p=0,022).

-YAP (>2,44 en 93% vs 38%, 43%, 0% y 40%, p=0,003).

-GAS6 (>3,02 en 79% vs 52%, 38%, 0%, 33%, p=0,05).

-BTRCP (>1,26 en 73% vs 56%, 54%, 0%, 12%, p=0,039; tercil medio/alto en 91% vs 78%, 73%, 0%, 25%, p=0,003).

-ZNF217 (tercil bajo en 21% LA vs 22%, 27%, 68%, 78%, p=0,016).

-RAP80 (tercil bajo, <3,03, en 8% vs 33%, 15%, 100%, 70%, p=0,00).

-PTPN12 (tercil medio/alto en 93% vs 74%, 47%, 33%, 50%, p=0,029).

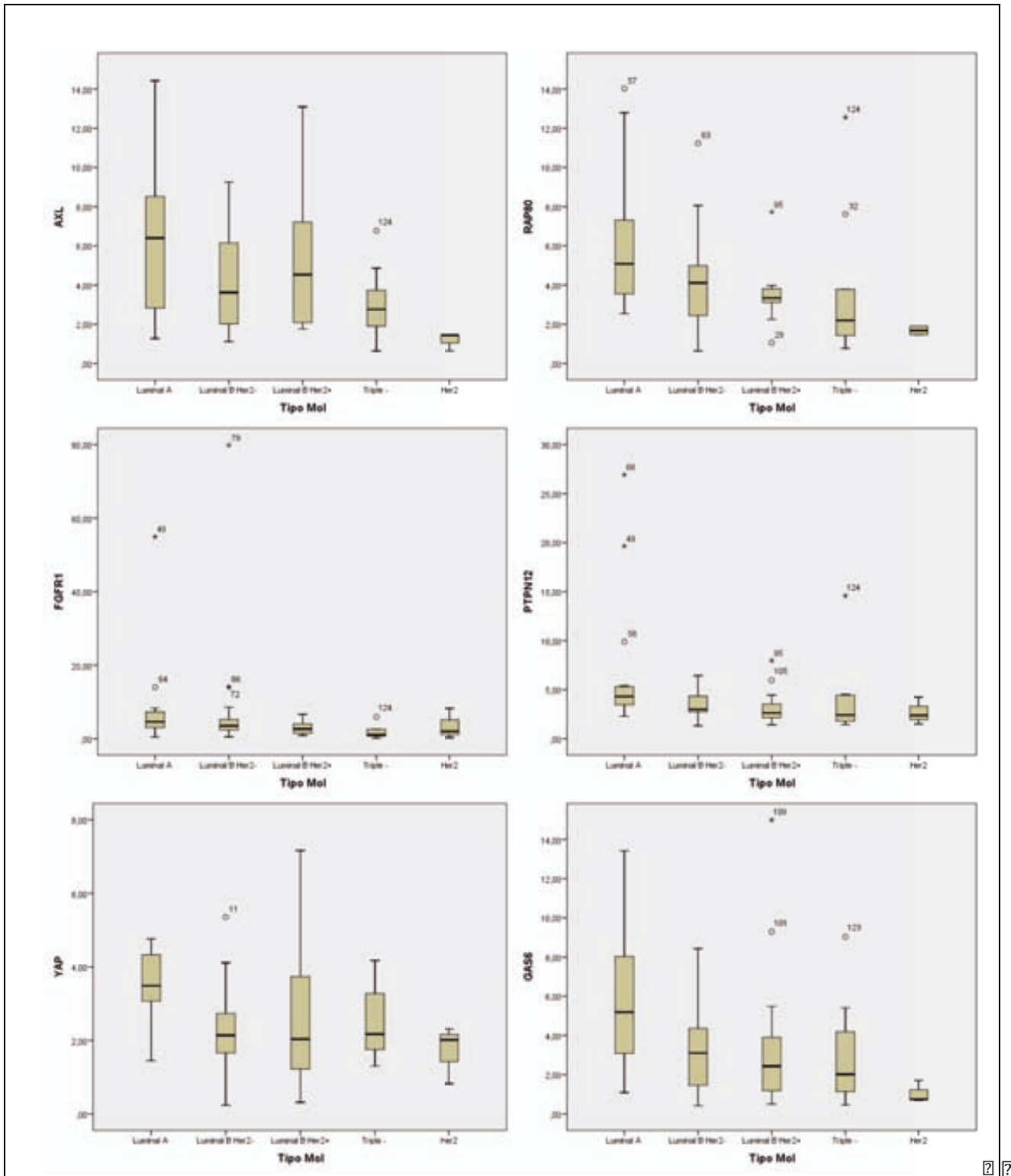


Figura 47. Expresión génica según el subtipo molecular (luminal A vs no Luminal A).

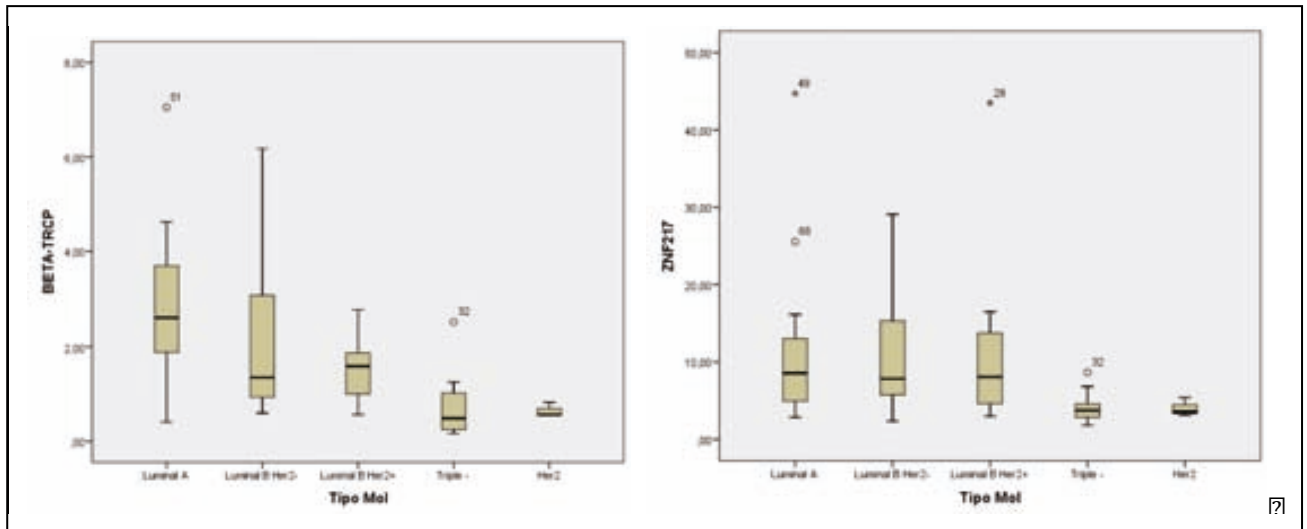


Figura 47. Expresión génica según el subtipo molecular (luminal A vs no Luminal A).

-**No se observaron diferencias estadísticamente significativas** entre los grupos definidos por inmunohistoquímica en los niveles de:

- BRCA1 (tercil bajo en 29% RH+, 62% en RH-, $p=0,16$)
- BIM (tercil bajo en 56% TN versus 41% HER2+ y 26% RH+/HER2-, $p=0,38$).
- EZH2 (tercil bajo en 50% TN vs 24% RH+/HER2-, 43% HER2+, $p=0,7$).
- ROR1 (tercil bajo en 50% de tumores HER2+, 29% TN y 26% en RH+/HER2, $p=0,47$)
- HIF1alpha (tercil alto en el 50% de HER2+, 24% RH+/HER2- y 22% TN, $p=0,13$).

Dentro del grupo con afectación ganglionar se observó un mayor porcentaje de niveles elevados de ZNF217 (73% de pacientes con ganglios afectados presentó niveles tercil medio-alto) aunque esta asociación no llega a ser estadísticamente significativa ($p=0,2$).

NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA % - casos													
	BRCA bajo t	RAP80 bajo t	BIM bajo t	EZH2 alta m	ROR1 bajo t	FGFR1 bajo t	PTPN12 bajo t	YAP alta m	GAS6 alta m	BTRCP alto t	HIF alto t	ZNF bajo t	AXL alto t
LA	25 2/8	8 1/12	23 3/13	56 5/9	17 1/6	21 3/14	7 1/15	93 14/15	79 11/14	73 8/11	36 4/11	21 3/14	69 9/13
LB HER2-	35 7/20	33 7/21	27 6/22	62 10/16	31 4/13	17 4/23	26 6/23	38 10/26	52 11/21	33 6/18	18 4/22	22 5/23	27 6/22
LB HER2+	23 3/13	15 2/13	43 6/14	42 5/12	50 3/6	47 7/15	53 8/15	43 6/14	38 5/13	18 2/11	47 7/15	27 4/15	31 4/13
HER2+ RH-	67 2/3	100 2/2	33 1/3	50 1/2	50 1/2	67 2/3	67 2/3	0 0/3	0 0/3	0 0/3	67 2/3	67 2/3	0 0/3
TN	60 3/5	70 7/10	56 5/9	37 3/8	29 2/7	60 6/10	50 5/10	40 4/10	33 3/9	12 1/8	22 2/9	78 7/9	10 1/10
Total	49	58	61	47	34	65	66	68	60	51	60	64	61
pCR MyP 5	53 9/17	32 6/19	43 9/21	40 6/24	27 3/11	45 10/22	41 9/22	15 5/34	20 6/30	18 3/17	37 7/19	28 6/21	5 1/20

Tabla 24. Niveles de expresión génica según los diferentes subtipos moleculares y su correlación con la respuesta anatomopatológica (marcado en rojo lo estadísticamente significativo).

t: tercil, m: mediana

B. Correlación con la respuesta patológica

Una correlación significativa con la respuesta anatomopatológica completa (MyP 5) se encontró en (Tabla 24):

-AXL: niveles mayores que la mediana, >3,74, predicen mala respuesta (17% presentaron MyP 5 vs 41% de los tumores con niveles bajos, $p=0,031$); sólo un 5% de respondedores con tercil alto ($p=0,003$).

-FGFR1: niveles >2,96 se correlacionan con mala respuesta (15% MyP 5 vs 43% con niveles bajos, $p=0,018$), tercil medio/alto 79% no respuesta ($p=0,04$).

-YAP: niveles altos (>2.44) se correlaciona con no respuesta (15% MyP 5 vs 38% con niveles inferiores, $p=0,028$); tercil bajo 43% MyP 5 ($p=0,023$).

-BRCA1: tercil bajo predice buena respuesta (53% MyP 5 vs 22% MyP 5 en tercil medio/alto, $p=0,027$).

5.5.2. ESTUDIO DE MUTACIONES PIK3CA, Tp53 (Tabla 25)

Para el análisis de DNA, se obtuvieron como muestras válidas 83 (64,3%) para la mutación de PIK3CA y 72 (55,8%) para Tp53.

A. Correlación con subgrupos tumorales

Para los diferentes subgrupos tumorales se observó que:

- Mutaciones de PIK3CA se encontraron en 24% de tumores RH+/HER2-, 12% HER2+ y 0% TN ($p=0,16$).
- Se observó una asociación entre la presencia de mutación p53 y la ausencia de RH. El 46% de tumores RH- presentaron la mutación frente al 12% en RH+ ($p=0,004$).
- Se detectó mayor porcentaje de mutación Tp53 en los tumores HER2+/RH-: 0% LA, 15% LB/HER2-, 18% LB/HER2-, 29% TN y 67% HER2+/RH- ($p=0,008$).

B. Correlación con la respuesta patológica

- La mutación PIK3CA predice una mala respuesta (sólo 7% MyP 5 en el grupo mutado frente el 35% del grupo no mutado, $p=0,029$).
- No se observaron diferencias significativas en relación a la Tp53. Se observó MyP 5 en 38% tumores con mutación frente 32% en tumores no mutados ($p=0,66$).

	MUTACIONES % - casos	
	Mutación PIK3CA	Mutación Tp53
RH+	20 14/69	12 7/59
RH-	7 1/14	46 6/13
LA	29 6/21	0 0/16
LB/HER2-	21 6/29	15 4/26
LB/HER2+	11 2/19	18 3/17
HER2+/RH-	17 1/6	67 4/6
TN	0 0/8	29 2/7
Total	83	72
pCR (MyP 5)	7 1/15	38 5/13

Tabla 25. Distribución de las mutaciones según los subtipos tumorales y su correlación con la respuesta anatomopatológica.

5.5.3. SUPERVIVENCIA

Se encontró una correlación significativa con la supervivencia para la expresión de:

- **FGFR1** (niveles definidos por mediana y terciles) (Figura 48):
 - SG a los 8 años: 0% con niveles elevados versus 78% niveles inferiores a la mediana (p=0,043).
 - SG a los 4 años: 0% tercil alto vs 75% tercil bajo/medio (p=0,05)
 - No diferencias significativas en cuanto a SLE

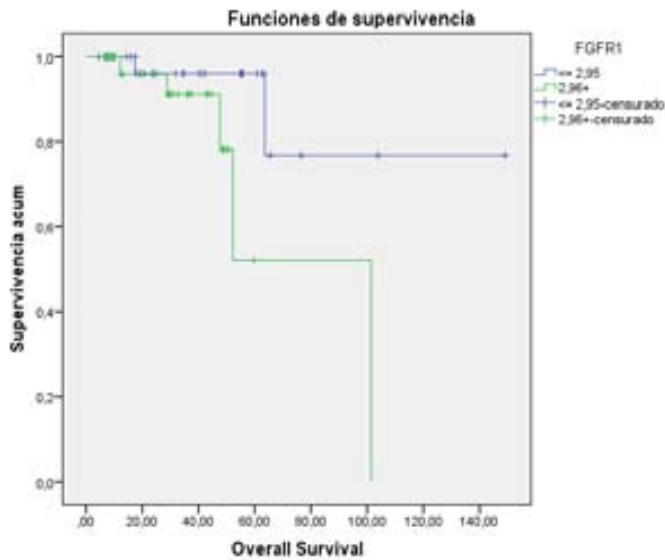


Figura 48. Supervivencia global según expresión de FGFR1

- **BTRCP** (mediana y terciles) (Figura 49):
 - SG 5 años: tercil alto/medio 98% vs bajo 75% (p=0,06).
 - SLE 5 años: tercil alto/medio 85% vs 50% tercil bajo (p=0,049)

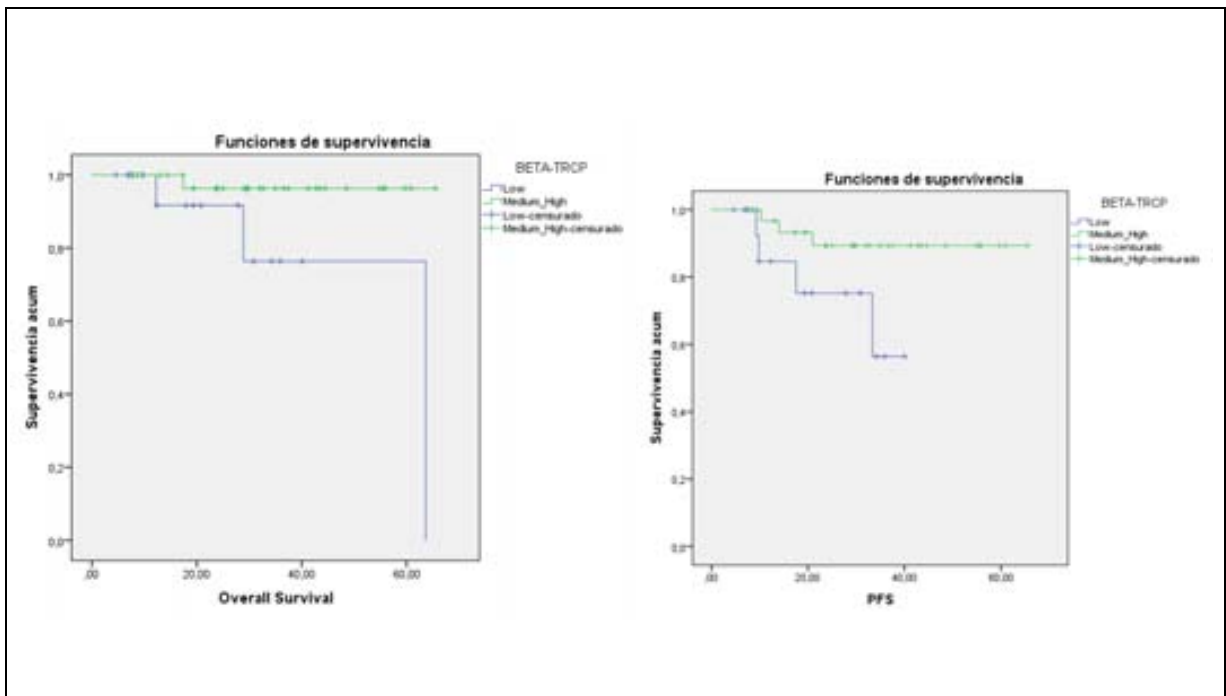


Figura 49. Supervivencia asociada a BTRCP

- **HIFalfa** (definido por terciles) (Figura 50):
 - SG 9 años: tercil alto/medio 69% vs 100% tercil bajo ($p=0,071$).
- **Mutación Tp53** (Figura 50):
 - SLE a los 10 años: 30% tumores mutados vs 60% no mutación ($p=0,028$).

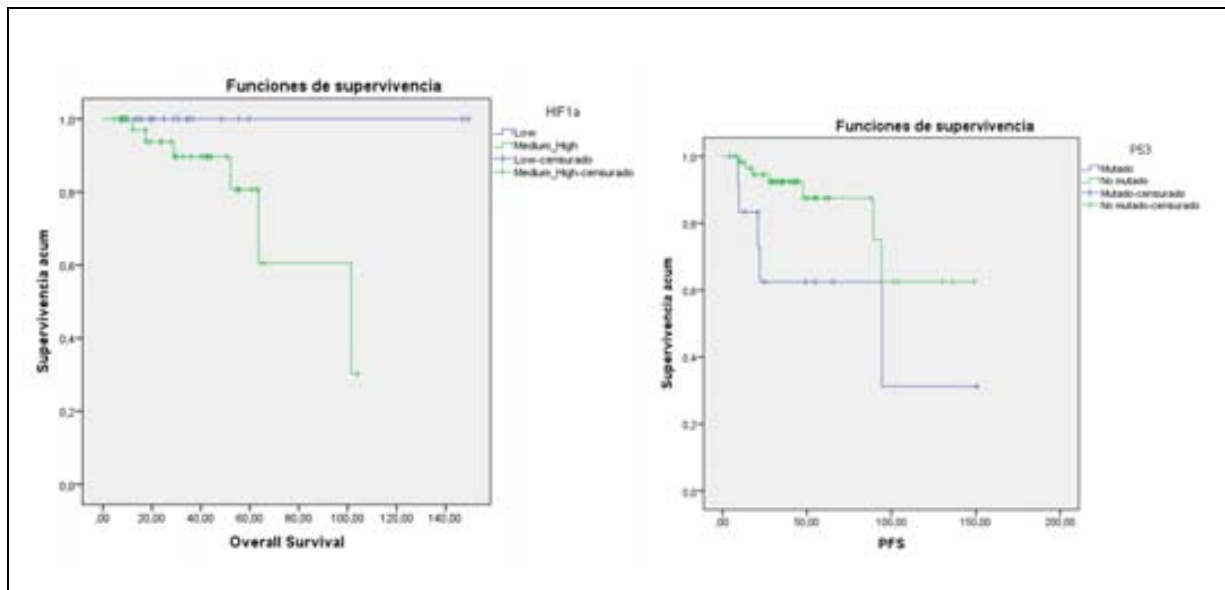


Figura 50. Supervivencia según niveles de HIF1alfa y presencia de mutación Tp53.

6. DISCUSIÓN

La neoadyuvancia es una de las modalidades terapéuticas del cáncer de mama con mayor interés en la actualidad, ya que no sólo permite ampliar las indicaciones de cirugía conservadora sino analizar también el comportamiento biológico de los diferentes tumores. Es interesante estudiar a través de las observaciones del anatomopatólogo las características que muestran las células cancerosas resistentes y de ello obtener conclusiones de interés práctico.

El objetivo sigue siendo poder determinar mejor las pacientes indicadas a una QNA y predecir las posibilidades de respuesta al tratamiento. La utilización de estos predictores permite la optimización del tratamiento. Así las pacientes de riesgo podrán beneficiarse de tratamientos más intensos o incluso de terapias específicas, mientras que los grupos de bajo riesgo podrían beneficiarse de terapias menos agresivas. La finalidad es disminuir la morbilidad de los tratamientos sin modificar el pronóstico.

En esta discusión se pretende correlacionar los resultados obtenidos en el estudio con los publicados en la literatura e intentar demostrar, así, los objetivos anteriormente expuestos:

-Determinar las características clínicas y anatomopatológicas de las pacientes tratadas con QNA.

-Evaluar la quimiosensibilidad en el cáncer de mama inicial.

-Analizar y comparar la respuesta anatomopatológica a la QNA según diferentes factores predictivos clínicopatológicos.

-Estudiar el pronóstico en función de los factores predictivos y de la respuesta anatomopatológica.

-Estudiar el valor predictivo/pronóstico independiente de determinados marcadores moleculares.

6.1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

6.1.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICOPATOLÓGICAS

En nuestros datos, con una edad media de pacientes de 47 años (un 5,42% menores de 35 años y un 57% entre los 36-50 años) y un 67,4% de pacientes premenopáusicas, se constató una cohorte más joven que la población habitualmente afecta por un carcinoma de mama (GLOBOCAN 2008). Esto es, probablemente, debido a que en estas pacientes la conservación mamaria es realmente importante. De igual manera, se observó una proporción importante de lesiones voluminosas, con un tamaño tumoral medio por ecografía de 3,24cm. Es evidente que un tamaño tumoral mayor en relación al volumen de la mama incita a una QNA, especialmente cuando no hay otra contraindicación para una cirugía conservadora.

Las características histológicas de los tumores coincidieron con las indicaciones conocidas para una quimioterapia (Gnant M et al., 2011). Se encontró en mayor porcentaje carcinoma ductal infiltrante (90,6%) y alto grado (61,9% grado II/III). Como factores de mal pronóstico se observó afectación ganglionar en 61,2%, 22,5% RE-, 34,9% RP-, HER2+ 34,1% y Ki 67 alto en 66%.

6.1.2. TRATAMIENTO NEOADYUVANTE Y VALORACIÓN DE LA RESPUESTA TUMORAL

Debido al carácter retrospectivo del estudio y al largo periodo de evaluación, no existe una completa homogeneidad en los protocolos de quimioterapia, aunque el 71% de las pacientes recibieron un esquema basado en antraciclinas y taxanos.

Los esquemas de neoadyuvancia han variado a lo largo de los años, desde monoterapias a tratamientos combinados o secuenciales. En 1997, Fisher et al. establecieron la indicación de QNA en base a regímenes de antraciclinas pero

la tasa de respuesta completa fue tan sólo del 12-26% (Fisher B et al., 1997). Tras los resultados de los estudios NSABP B-27, ECTO, GEPARDUO y el ensayo Aberdeen, existe el consenso a favor de una QNA secuencial por antraciclinas y taxanos (Bear HD et al., 2006; Gianni L et al., 2005; Von Minckwitz et al., 2005; Smith IC et al., 2002).

De igual forma, 14 pacientes HER2+ (31,8%), tratadas con anterioridad al 2006, no recibieron trastuzumab en esquema neoadyuvante. Actualmente, el beneficio del trastuzumab en términos de respuesta tumoral en pacientes con sobreexpresión de HER2 ha sido claramente demostrado, aumentando la pCR de un 20-30% a un 40-60% (Gianni L et al., 2010; Buzdar AU et al., 2005).

En cuanto a la tasa de respuesta tumoral, se encontró una tasa de respuesta completa clínica del 62,3% (cCR) y una tasa de respuesta patológica completa mamaria (pCR) del 29,5%, con un porcentaje de buena respuesta del 49,6% (MyP 4/5). Tras la QNA, el 55% de los casos (71 pacientes) no presentaban afectación ganglionar. Estos datos son comparables a los presentados en la literatura (Tabla 26).

Estudio	N	Quimioterapia	Tasa cCR	Tasa pCR	Tasa N-
Powles et al., 1995	105	MMM+Tamoxifeno	NC	10%	NC
NSABP B-18 (Fisher B et al. 1997)	747	4 AC	36%	9%	42%
EORTC 10902 (Van der Hage JA et al., 2001)	350	4 FEC	6.6%	4%	38%
Aberdeen (Smith IC et al., 2002)	162	4 CVAP+4TXT vs 8CVAP	56% vs 33%	31% vs 15%	58% vs 67%
ECTO (Gianni L et al., 2005)	448	AP+CMF	49%	23%	60%
NSABP B-27 (Bear HD et al., 2006)	803	4AC+4TXT	63,6%	26,1%	49,2%
Nuestro estudio	129	Heterogeneo	62,3%	29,5%	55%

Tabla 26. Tasa de respuesta en nuestra serie en relación a la literatura

MMM: metotrexate, mitoxantrona +/- mitomicina; AC: doxorubicina, ciclofosfamida; FEC: 5-FU, epirrubicina, ciclofosfamida; CVAP: ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina, prednisolona, AP: doxorubicina, paclitaxel; CMF: ciclofosfamida, metotrexate, 5-FU.

La exploración clínica ha sido considerada poco útil para la evaluación de la respuesta tumoral, ya que subestima frecuentemente el volumen residual. Por otra parte, los fenómenos de edema, necrosis y fibrosis postquimioterapia pueden distorsionar la evaluación del tamaño (Peintinger F et al., 2006; Van der Hage JA et al., 2001). En la serie de Feldman, se encontró tumor residual por histología en el 45% de las pacientes que habían presentado cCR, e inversamente, 60% de pacientes con pCR presentaron tumor residual palpable (Feldman LD et al., 1986). No obstante, nuestra serie presentó una buena correlación entre la exploración clínica y la respuesta patológica (67% con respuesta clínica presentaron buena regresión tumoral y 73,4% MyP 4/5 no presentaban tumor palpable). Estos datos coinciden con los publicados por Herrada J et al. que propusieron el examen clínico como el mejor predictor no invasivo del tamaño tumoral histológico basado en la medición del tumor primario, mientras que la ecografía fue más fiable para la valoración de los ganglios axilares (Herrada J et al, 1997). Posteriormente, Pierga JY et al. presentaron la cCR como factor pronóstico independiente de supervivencia, estableciendo la respuesta clínica como un marcador para evaluar la eficacia de la QNA (Pierga JY et al., 2003).

6.1.3. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO

Como ya hemos comentado anteriormente, aquellas pacientes que presentan un tamaño tumoral grande, clínico o radiológico, en relación al volumen de la mama pueden beneficiarse de la QNA. En estos casos el objetivo principal es reducir el tamaño tumoral para aumentar las posibilidades de realizar un tratamiento quirúrgico más conservador y estético. En nuestro estudio se observó una tasa de respuesta radiológica (completa o parcial) del 85,5%, y el 57,4% (74 casos) se beneficiaron de un tratamiento conservador mamario. En la tabla 27 se presentan los resultados de conservación mamaria en nuestra serie en relación a los descritos en la literatura.

Estudio	N	Estadío T	Quimioterapia	Respuesta radiológica (%)	Conservación mamaria
Powles et al., 1995	105	T1-T3	MMM+Tamoxifeno	85%	87%
NSABP B-18 (Fisher B et al. 1997)	747	Operable	4 AC	80%	67%
EORTC 10902 (Van der Hage JA et al., 2001)	350	T1-T	4 FEC	49%	23%
Aberdeen (Smith IC et al., 2002)	162	T3-T4	4 CVAP+4TXT vs 8CVAP	85% vs 64%	67% vs 15%
ECTO (Gianni L et al., 2005)	448	T2-T3	AP+CMF	78%	65%
NSABP B-27 (Bear HD et al., 2006)	803	Operable	4AC+4TXT	90,7%	NC
Nuestro estudio	129	T1c-T4	Heterogeneo	85,5%	57,4%

Tabla 27. Conservación mamaria en nuestra serie en relación a la literatura.

MMM: metotrexate, mitoxantrona +/- mitomicina; AC: doxorubicina, ciclofosfamida; FEC: 5-FU, epirrubicina, ciclofosfamida; CVAP: ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina, prednisolona, AP: doxorubicina, paclitaxel; CMF: cyclofosfamida, metotrexate, 5-FU.

6.2. QUIMIOSENSIBILIDAD EN CÁNCER DE MAMA INICIAL

La QNA representa el tratamiento inicial para el manejo multidisciplinario de las pacientes con cáncer de mama operables con gran tamaño tumoral o localmente avanzado. En estos casos ha demostrado su eficacia frente a la adyuvancia, mostrando resultados equivalentes en cuanto a supervivencia pero permitiendo una mayor tasa de cirugía conservadora (Van der Hage JA et al., 2001; Mauri D et al., 2005). No obstante, en los últimos años, existe un interés creciente en la utilización de QNA en pacientes con tumores iniciales y operables pero que presentan una biología tumoral agresiva (alto grado histológico, elevada proliferación, RH negativos, HER2 positivo).

Sin embargo, no todos los tumores presentan una misma quimiosensibilidad, las diferencias en la respuesta anatomopatológica no se basan en el tamaño tumoral sino en los diferentes perfiles tumorales (Meyers MO et al., 2011; Esserman LJ et al., 2012). En nuestro estudio, aunque los tumores localmente avanzados (T3-T4) presentaban factores pronósticos más desfavorables (mayor porcentaje de receptores hormonales negativos y HER2+) la respuesta a la QNA valorada por Miller y Payne no difería a la de los estadios iniciales (T1c-T2). El 50,5% de casos T1c-T2 presentaron MyP 4/5 frente el 47,2% de T3-T4 ($p=0,73$).

En estas pacientes con tumores pequeños el uso de la QNA se fundamenta en la teoría que el cáncer de mama es una enfermedad sistémica. Halsted defendió que el cáncer de mama presentaba una evolución locoregional, pero en contra de estos principios Fisher propuso una posible diseminación precoz del cáncer de mama (ajena a la vía linfática) mediante la existencia de micrometástasis (Halsted W, 1907; Fisher B et al., 1989).

En estos casos los beneficios clínicos de la QNA se relacionarían con:

- a) inicio precoz del tratamiento sistémico
- b) mayor control de la enfermedad micrometastásica.

Pero más allá del beneficio clínico, la QNA representa una oportunidad para estudiar y monitorizar “en vivo” la sensibilidad al tratamiento y evaluar posibles resistencias. Así, toda paciente que pueda obtener algún beneficio de una quimioterapia en régimen adyuvante, es lógico pensar que presentará el mismo beneficio de forma neoadyuvante.

En el consenso de St. Gallen 2011 se aprobó que el criterio quirúrgico no debía ser la única razón para aplicar una QNA, pero la mayoría de asistentes (70%) continuaban utilizando la neoadyuvancia con este objetivo (Gnant M et al., 2011). El uso de QNA en tumores pequeños no ofrece una ventaja en cuanto al tratamiento quirúrgico conservador, pero en tumores de >2cm el riesgo de micrometástasis ocultas, tanto axilares como a distancia, puede alcanzar el 50% (Carter CL et al., 1989; Bonadonna G et al., 1995). El objetivo sería

disminuir el riesgo de mortalidad asociado a la enfermedad oculta micrometastásica (Kuerer HM et al., 2000).

Recientemente un estudio ha publicado un riesgo suplementario de mortalidad por cáncer del 2-4% por mes de retraso en la cirugía (Smith EC et al., 2013). No obstante, el tratamiento mediante QNA continúa compensando esta diferencia en cuanto se analiza la SG y SLE a 5 y 10 años (Tabla 28).

Estudio	N	Tratamiento	SLE 5a	SG 10a
Ragaz, 1997	204	-Mastectomía → CMFx9	NR	73%
		-CMFx1 → cirugía+CMFx8		74%
Semiglazov, 1994	271	-TMFx2+RT → Mastectomía-TMFx4	81%	86%
		-RT +Cirugía → TMFx6	72%	78%
Mauriac, 1999	272	-Mastectomía → EMV-MTV	88%	NR
		-EVM-MTV → cirugía	84%	
Powles, 1995	212	-MMM-Cirugía-MMM+Tam	78%	NR
		-Cirugía-MMM+Tam	78% (4 años)	
Scholl, 1994	414	-FAC → RT-cirugía	NR	65%
		-RT+cirugía → FAC		60%

Tabla 28. Análisis de la supervivencia entre quimioterapia neoadyuvante y adyuvante (estudios randomizados).

NR: no registrado, CMF: ciclofosfamida, metotrexate, 5-FU, TMF: thiotepa, metotrexate, 5-FU, EVM: epirubicina, vindesina, mitomicina, MTV: mitomicina, thiotepa, vindesina, FAC: doxorubicina, ciclofosfamida, 5-FU.

En un meta-análisis realizado por Mauri et al., en 2005, donde se analizaron 9 estudios randomizados no se encontraron diferencias significativas en cuanto SG y recurrencia a distancia entre las pacientes tratadas con QNA y las que recibieron quimioterapia adyuvante. La recurrencia locorregional, en cambio, fue mayor en el brazo de tratamiento neoadyuvante, con una HR de 1,2, debido probablemente a la mayor tasa de tratamiento quirúrgico conservador (Mauri D et al., 2005).

Teniendo en cuenta que el tamaño tumoral no implica una diferencia en la quimiosensibilidad, de nuestra serie se puede concluir que la QNA es una opción terapéutica a considerar en tumores pequeños con características patológicas adversas por el beneficio que conlleva en cuanto a un tratamiento precoz de las micrometástasis ocultas y a un posible control de la eficacia del protocolo de quimioterapia.

6.3. FACTORES PREDICTIVOS CLÍNICOPATOLÓGICOS

No todas las pacientes se beneficiarán de una QNA. Debido a que el cáncer de mama presenta una gran heterogeneidad intertumoral, no todos los tumores presentan una misma respuesta a la neoadyuvancia. Teóricamente, la identificación, validación y aplicación de determinados factores predictivos en las biopsias pretratamiento ayudará a asegurar que sólo aquellas pacientes que realmente se beneficien reciban un tratamiento apropiado.

A. CLÁSICOS

Se han identificado diferentes variables clínicopatológicas como factores predictivos de la respuesta a la QNA:

-Grado histológico: los tumores de alto grado, elevado índice mitótico y alta proliferación suelen ser predictores de buena respuesta (Tan MC et al., 2009; Vincent-Salomon A et al., 2004). En nuestra serie, el 56% de tumores grado III presentaron MyP 4/5 versus el 41,7% grado I.

-Ki 67: tiene valor predictivo independiente y es un marcador viable en la práctica clínica (Fasching PA et al., 2011). Se observó una tendencia a una mejor respuesta en aquellos tumores con Ki67 elevado (56,3%, $p=0,11$). Darb-Esfahani et al. mostraron que un $Ki67 > 40\%$ era predictor de pCR (Darb-Esfahani S et al., 2009).

-Tamaño tumoral y edad: a diferencia de la serie publicada por Rastogi et al., nuestro estudio no mostró diferencias en cuanto a la tasa de pCR en relación al tamaño tumoral (estadiaje T) (Rastogi P et al., 2008). Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación a la edad (<35 años versus ≥ 35 años).

-Tipo histológico: los carcinomas de tipo lobulillar presentan una peor respuesta. Varios son los estudios que han analizado y comparado la respuesta entre CLI y CDI informando que, independientemente del esquema de quimioterapia utilizado, la tasa de pCR es menor en los casos de CLI (1-3% versus 8-15%) (Delpech Y et al., 2013; Nagao T et al., 2012; Coussy F et al., 2010; Tubiana-Huilin M et al., 2006; Cristofanilli M et al., 2005).

-Afectación ganglionar: se observó una mejor respuesta MyP en aquellas pacientes con menor afectación ganglionar prequimioterapia (56% versus 45,6%). En cambio, no se encontraron diferencias en cuanto al número de ganglios afectados postquimioterapia y el grado de regresión tumoral en la mama. Esto demuestra que la tasa de pCR no es la misma a nivel del tumor mamario como a nivel ganglionar, necesitando de un enfoque diferente. Una pCR en el lecho tumoral no implica forzosamente una respuesta completa axilar.

Kuerer et al. estudiaron esta divergencia en 372 pacientes, 16% presentaron pCR a nivel del tumor mamario versus 12% a nivel axilar. Y de las pacientes que presentaron pCR en el tumor primario, sólo el 72% presentaron una respuesta ganglionar (10% presentaban >3 ganglios afectados) (Kuerer HM et al., 1999). El estudio de Gianni et al. mostró que la QNA aumentó la negatividad de la linfadenectomía en relación a una cirugía primaria (60% versus 39%, $p < 0,001$) (Gianni L et al., 2009).

Se podría decir que la QNA tiene también una eficacia a nivel axilar, aunque ésta es menor que a nivel del tumor primario.

-Receptores hormonales: al igual que otros estudios publicados, la ausencia de RP y RE se correlacionó con una buena respuesta (Bear HD et al., 2006; Faneyte IF et al., 2003).

-Sobreexpresión de HER2: en nuestra serie, el 65,9% de tumores HER2+ presentaron MyP 4/5 frente al 41,2% con HER2 negativo ($p=0,008$). Ya en el 2005 y sin el uso de trastuzumab en neoadyuvancia, Rouzier et al. encontraron una tasa de pCR más elevada en los tumores HER2+ (45%) (Rouzier R et al., 2005). Posteriormente, con la introducción del trastuzumab la tasa de respuesta en HER2+ ha aumentado considerablemente (Buzdar AU et al., 2007; Pierga JY et al., 2010).

Recientemente, se ha planteado también la cuantificación de HER2 en plasma para predecir y monitorizar la respuesta a la QNA (Jeon C et al., 2010).

En el Consenso de St. Gallen 2011 se concluyó que la neoadyuvancia no era una opción óptima en pacientes con índice de proliferación bajo ($Ki-67 < 14\%$) y tumores altamente hormonosensibles como CLI, bajo grado, HER2 negativo y RH positivos (Gnant M et al., 2011).

B. RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA SEGÚN SUBTIPO TUMORAL

En 2010, los resultados del estudio GeparTRIO mostraron como factores predictivos de pCR una edad inferior a 40 años, grado histológico elevado, tamaño tumoral pequeño y ausencia de receptores hormonales (Huober J et al., 2010).

Perou et al. estudiaron la diversidad biológica del cáncer de mama identificando determinados subtipos tumorales según un patrón de expresión génica mediante el uso de microarrays de DNA (Perou CM et al., 2000). Se identificaron 4 subgrupos, tumores luminal A y B (relacionados con la expresión de RH) y tumores HER2+ y triples negativos (derivados de tumores RH

negativos). Estas diferencias moleculares parecen ir asociadas tanto al tipo de respuesta histológica a la QNA como al pronóstico.

En nuestra serie, aunque los tumores con índice de proliferación elevado presentaron una tendencia a una buena respuesta, se observó que el único factor independiente de respuesta patológica a la QNA fue el subtipo tumoral, presentando los tumores HER2+ mejor respuesta (OR 3,73; IC 1,52-9,13, $p=0,004$).

Nuestros resultados corroboran la idea que la respuesta a la neoadyuvancia en términos de pCR está más relacionada con las características intrínsecas de los tumores, que con el tipo histológico o grado tumoral, presentando los tumores triple negativos y HER2+ una mejor respuesta que los tumores receptores hormonales positivos (Liedtke C et al., 2008; Von Minckwitz G et al., 2012; Lips EH et al., 2012).

Rouzier et al. fueron los primeros en describir que los subtipos moleculares del cáncer de mama respondían diferente a la QNA (según el esquema paclitaxel, 5-FU, doxorubicina, ciclofosfamida). Los subgrupos “basal-like” y HER2+ presentaron un 45% de pCR, mientras que los tumores luminales presentaron una tasa del 7% ($p<0,001$) (Rouzier R et al., 2005). Carey et al., presentaron resultados similares con un esquema basado en antraciclinas (doxorubicina, ciclofosfamida) (Carey LA et al., 2007).

En tumores HER2+, Harris et al. mostraron una tasa de pCR del 20% (trastuzumab, vinorelbina) y Untch et al. del 31,7% (4 ciclos de epirrubicina, ciclofosfamida, 4 ciclos de docetaxel-trastuzumab) (Harris LN et al., 2007; Untch M et al., 2010).

Recientemente, Houssami et al., realizaron un meta-análisis de 30 ensayos, un total de 11695 pacientes tratadas con QNA, clasificando la respuesta histológica por subtipo tumoral (Houssami N et al., 2012):

-En su *primer modelo* de estudio clasificó las pacientes en 3 categorías: RH+/HER2-, HER2+; triple negativo. La mediana de pCR fue de 19,2% (Figura 51).

	pCR%	OR	Nuestro Estudio	
			pCR%	OR
Model 1 (30 studies, 11,695 subjects), pooled pCR% all subtypes	18.9	-		
Hormone receptor positive ^b : HR+/HER2- (4979 subjects)	8.7	<i>P</i> < 0.0001	Referent	
HER2 positive ^c : HER2+ (2488 subjects)	28.2		4.14	
Triple negative ^d : ER-/PR-/HER2- (2418 subjects)	31.0		4.73	
Unknown (not classified; 1810 subjects)	16.9		2.15	
Model 1 (30 studies, 9885 subjects, excludes unknown) pooled pCR%	19.2	-	29.5	
Hormone receptor positive ^b :HR+/HER2- (4979 subjects)	8.8	<i>P</i> < 0.0001	12.6	Referente
HER2 positive ^c : HER2+ (2488 subjects)	28.5		54.5	3.73
Triple negative ^d : ER-/PR-/HER2- (2418 subjects)	31.3		35.7	1.56

Figura 51. Asociación del subtipo tumoral con la pCR (correlación entre el meta-análisis de Houssami y nuestro estudio)

-En su *segundo modelo* clasificó las pacientes en 4 grupos: RH+/HER2-, RH+/HER2+, RH-/HER2+, triple negativo. La mediana de pCR fue de 19%. La tasa de pCR fue de 8,3% RH+/HER2-, 18,7% RH+/HER2+ (OR 2,6), 38.9% RH-/HER2+ (OR 7,1) y 31% triple negativo (OR 5) (Figura 52).

	pCR%	OR	95% CI	
Model 1 (30 studies, 11,695 subjects), pooled pCR% all subtypes	18.9	-	-	-
Hormone receptor positive ^b : HR+/HER2- (4979 subjects)	8.7	<i>P</i> < 0.0001	Referent	
HER2 positive ^c : HER2+ (2488 subjects)	28.2		4.14	3.60 4.77
Triple negative ^d : ER-/PR-/HER2- (2418 subjects)	31.0		4.73	4.12 5.44
Unknown (not classified; 1810 subjects)	16.9		2.15	1.76 2.63
Model 1 (30 studies, 9885 subjects, excludes unknown) pooled pCR%	19.2	-	-	-
Hormone receptor positive ^b :HR+/HER2- (4979 subjects)	8.8	<i>P</i> < 0.0001	Referent	
HER2 positive ^c : HER2+ (2488 subjects)	28.5		4.16	3.61 4.78
Triple negative ^d : ER-/PR-/HER2- (2418 subjects)	31.3		4.73	4.12 5.44
Model 2 (20 studies, 8095 subjects), pooled pCR% all subtypes	18.5	-	-	-
Hormone receptor positive ^b :HR+/HER2- (3279 subjects)	8.2	<i>P</i> < 0.0001	Referent	
HER2 positive/HR+: HER2+/HR+ (884 subjects)	18.4		2.54	2.04 3.16
HER2 positive/HR-: HER2+/HR- (762 subjects)	38.5		7.03	5.74 8.61
Triple negative: ER-/PR-/HER2- (1583 subjects)	30.7		4.99	4.20 5.92
Unknown (not classified) (1587 subjects)	15.9		2.13	1.69 2.68
Model 2 (20 studies, 6508 subjects, excludes unknown), pooled pCR%	19.0	-	-	-
Hormone receptor positive ^b :HR+/HER2- (3279 subjects)	8.3	<i>P</i> < 0.0001	Referent	
HER2 positive/HR+: HER2+/HR+ (884 subjects)	18.7		2.55	2.05 3.18
HER2 positive/HR-: HER2+/HR- (762 subjects)	38.9		7.05	5.75 8.64
Triple negative: ER-/PR-/HER2- (1583 subjects)	31.1		5.00	4.21 5.94

Figura 52. Asociación del subtipo molecular con la pCR (modificado de Houssami N et al., 2012).

En ambos modelos los tumores derivados de receptores hormonales negativos presentaban mayor quimiosensibilidad en relación a los tumores receptores hormonales positivos.

6.4. SUPERVIVENCIA E IMPACTO PRONÓSTICO DE LA RESPUESTA HISTOLÓGICA

La pCR o la presencia de mínima enfermedad residual tras QNA se ha correlacionado con una mayor supervivencia, convirtiendo la pCR en un importante factor pronóstico y “end point” de múltiples estudios (Houssami N et al., 2012; Esserman LJ et al., 2012; Vargo JA et al., 2011). En nuestra serie, las pacientes con MyP 4/5 tuvieron una mejor SLE que las pacientes con MyP 1-3 (88% versus 55%). De esta forma, las pacientes que presentan una buena respuesta a QNA no sólo se benefician de un posible tratamiento quirúrgico conservador sino que también presentan un mejor pronóstico.

Minckwitz et al. mostraron que el impacto pronóstico de la pCR difería según el subtipo tumoral. Así, las pacientes con tumores Luminal A presentaban una SLE a 5 años del 85%, independientemente del tipo de respuesta histológica, mientras que la tasa de supervivencia en pacientes con tumores triple negativo o HER2+ era significativamente diferente según la respuesta a QNA. La SLE en tumores triple negativo fue de 90% en el grupo con pCR versus 50% en el grupo que no presentaban pCR (Figura 53) (Von Minckwitz G et al., 2012). Por lo que las pacientes con tumores RH positivos, aunque presentan una menor tasa de pCR, su pronóstico a 5 años es favorable, mientras que los tumores triple negativo y ERr2 presentan una alta tasa de pCR, pero su pronóstico es peor cuando no alcanzan una respuesta completa tras QNA (Esserman LJ et al., 2012; Liedtke C et al., 2008).

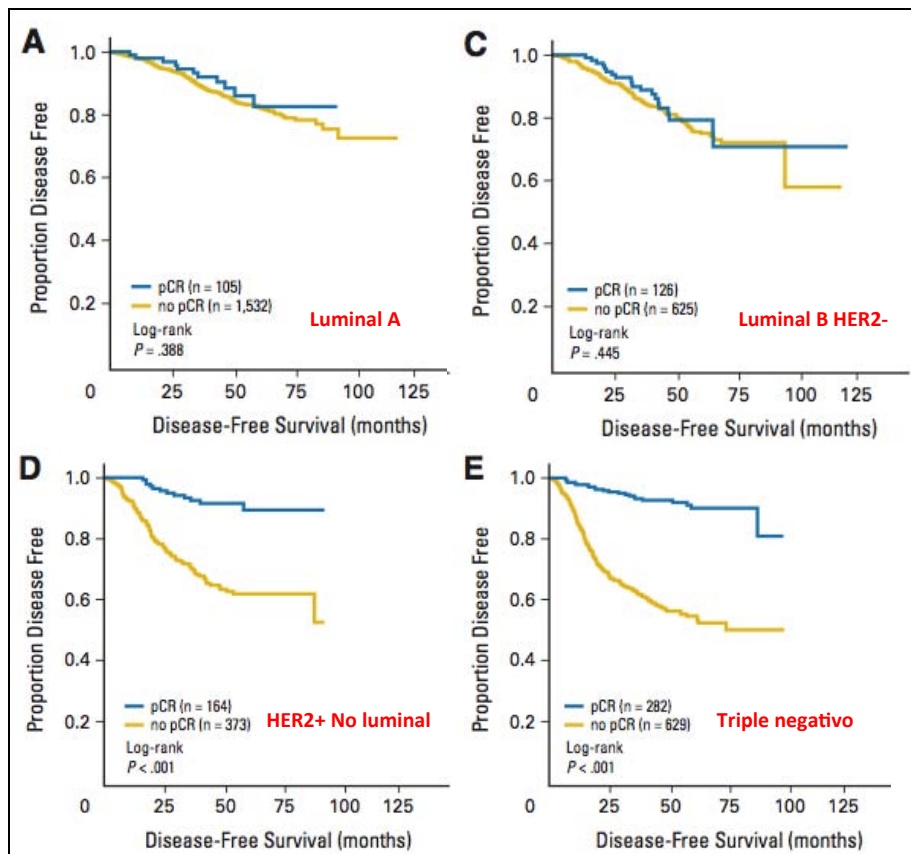


Figura 53. Curvas de SLE en función de la pCR y el subtipo tumoral (modificado de Von Minckwitz G et al., 2012).

En nuestros resultados, el impacto pronóstico de la respuesta MyP fue más importante en los tumores triple negativos. La SLE a 5 años en pacientes con buena respuesta fue de 82% en HER2+ y 100% triple negativo. En caso de no respuesta, el pronóstico fue peor, SLE de 50% y 25%, respectivamente. Sin embargo, aunque el subtipo RH+/HER2- presentó una baja tasa respuesta, se observó una tendencia a un mejor pronóstico entre las pacientes con buena respuesta (SLE de 85% en pacientes con MyP 4/5 y 68% con MyP 1-3).

A diferencia de Minckwitz et al. que establecieron que la pCR no estaba asociada al pronóstico en el subgrupo Luminal A, nuestros datos mostraron que todas las pacientes con buena respuesta tenían una mayor SLE que aquéllas que no respondían, también en el subgrupo receptores hormonales positivos. Nuestros resultados coinciden con los presentados recientemente por Cortazar P et al. en San Antonio Breast Cancer 2012, donde la pCR proporcionaba un

mejor pronóstico, incluso en el subgrupo luminal (Cortázar P et al., 2012). En este meta-análisis, con 12993 pacientes, la obtención de pCR tenía valor pronóstico en todos los grupos tumorales, concluyendo que toda paciente que presente una pCR tiene un pronóstico más favorable (Figura 54).

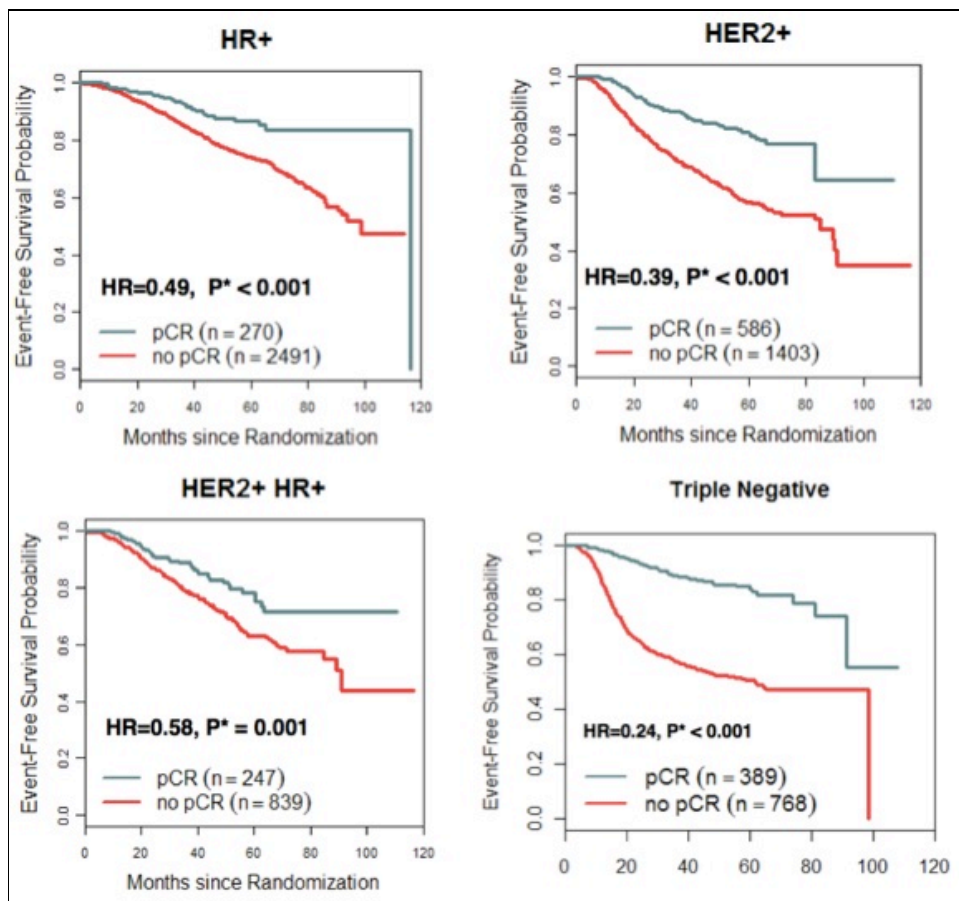


Figura 54. Curvas de SLE en función de la pCR y el subtipo tumoral (Luminales, HER2+, Luminales HER2+, Triple negativo (modificado de Cortázar P et al., 2012).

Se debe tener en cuenta que, en nuestro estudio, la importancia del impacto pronóstico de una buena respuesta o pCR y el poder estadístico pueden verse disminuídos debido a la ausencia de una completa homogeneidad en los protocolos de quimioterapia (existe un determinado grupo de pacientes que sólo recibieron antraciclinas) y de tratamientos diana en determinadas pacientes. De esta forma, pacientes que no presentaron respuesta podrían haber presentado pCR si hubieran recibido taxanos o Herceptin neoadyuvante

en aquellos casos HER2+.

Varios investigadores han concluido también que una elevada proliferación tumoral, la afectación ganglionar y receptores hormonales negativos están relacionados con un peor pronóstico en aquellas pacientes tratadas inicialmente con cirugía, con o sin tratamiento sistémico adyuvante (Soerjomataram I et al., 2008; Dunnwald LK et al., 2007). Pero, en cambio, no existe mucha información en cuanto a los factores pronósticos de recurrencia en pacientes tratadas con QNA.

El estudio de Mamounas et al., 2012, representa uno de los mayores publicados hasta la fecha. En él se concluye que junto con la edad y las características clínicas tumorales previas a la QNA (tamaño tumoral y afectación ganglionar), la respuesta patológica tenía un impacto importante en la tasa y patrones de recurrencia (Mamounas EP et al., 2012). No obstante, una de las limitaciones de este estudio fue la ausencia de información sobre el estado de los receptores hormonales y HER2, los cuales no pudieron analizarse como factores de recurrencia.

Recientemente, Minckwitz et al., 2013, han establecido los niveles de Ki67 post-tratamiento como valor pronóstico, observando que niveles altos tras QNA en pacientes RH+ y enfermedad residual se correlacionaban con mayor riesgo de recurrencia y mortalidad (Von Minckwitz G et al., 2013).

En nuestra serie, los únicos factores independientes asociados a la progresión fueron el tipo de respuesta anatomopatológica (OR 0,069 para MyP 4/5, $p=0,015$), la afectación ganglionar (OR 3,33, $p=0,015$) y el estado de los receptores hormonales (OR 0,242 para RH+, $p=0,007$).

6.5. FACTORES PREDICTIVOS MOLECULARES

Actualmente, se dispone de la hormonoterapia, la quimioterapia, terapias diana e inmunoterapia para el tratamiento del cáncer de mama. No obstante, muchos de estos fármacos tienen una elevada toxicidad, por lo que es importante adquirir marcadores que ayuden a decidir que pacientes son necesarios tratar y qué terapia es la más apropiada en cada caso. Para ello resulta imprescindible conocer la biología del cáncer de mama. Es en este campo donde la QNA aporta gran información ya que permite valorar clínica e histológicamente el comportamiento biológico tumoral y la actividad del tratamiento.

Hoy en día, los factores predictivos clínicos y patológicos de respuesta comentados anteriormente son los que se emplean en la práctica habitual. Rouzier et al., en el 2005, desarrollaron un modelo predictor clinicopatológico (un nomograma basado en un modelo de regresión logística) para evaluar la posible respuesta a la QNA basada en antraciclinas. Este modelo tenía en cuenta la edad de la paciente, el tamaño tumoral (estadiaje T), el grado histológico tumoral, el estatus de los receptores hormonales y el número de ciclos de quimioterapia (Rouzier R et al., 2005). Pero estos predictores no son específicos de un subtipo tumoral o de un tratamiento concreto y determinan con poca exactitud el grado de actividad de los diferentes fármacos. Esto es debido a que han sido desarrollados a partir de cohortes de pacientes que presentan lesiones heterogéneas, por lo que tan sólo un enfoque molecular puede identificar predictores más específicos.

Las diferencias de los tumores en cuanto a quimiosensibilidad y pronóstico se fundamentan en diferencias en su perfil molecular. El desarrollo de predictores genómicos no sólo permite identificar el comportamiento del tumor más allá del estatus de RH y HER2, sino seleccionar un medicamento específico frente a uno empírico, proporcionando un tratamiento adaptado a cada subtipo tumoral, y por lo tanto, a cada paciente.

El estudio de las múltiples vías moleculares y el uso de microarrays permite establecer diferentes perfiles de expresión de genes. Así, por ejemplo, se ha

visto que genes de la vía de mTOR (particularmente los genes peroxisoma receptor, Lipoprotein Lipasas y Alcohol Dehydrogenase) y genes de la vía PI3K (BCL-2, wdr7, erb2, Tubulin) están implicados en la respuesta a taxanos (Chang JC et al., 2005; Potti A et al., 2006), o como pacientes con mutación en el gen KRAS no se benefician del tratamiento con inhibidores de factores de crecimiento epidérmico como el cetuximab o el panitumumab por lo que es necesario determinar si KRAS está mutado antes de iniciar el tratamiento con dichos fármacos (Jimeno A et al., 2009;).

A pesar de la complejidad de los perfiles moleculares tumorales y el conocimiento heterogéneo de la biología de la enfermedad, actualmente se considera que analizar perfiles moleculares únicos de *genes clave* en distintos tumores (entendiendo como *clave* aquellos genes que están altamente expresados o regulados a la baja en cada subtipo) e implicados en resistencia a fármacos es una vía de investigación importante con una rápida y sencilla aplicación clínica ya que permite definir el pronóstico y establecer posibles dianas farmacológicas (Ocaña A et al., 2010; Van de Vijver MJ et al., 2002) (Figura 55).

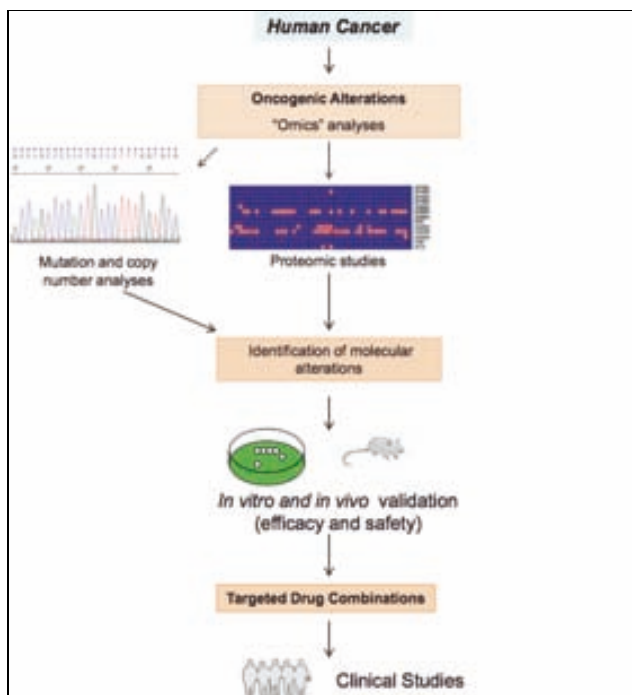


Figura 55. Tratamiento antitumoral basado en los diferentes perfiles moleculares (Modificado de Ocaña A et al., 2010).

Por otro lado, el análisis de marcadores moleculares prequimioterapia refleja también el potencial papel de las biopsias pretratamiento. La necesidad de obtener factores pronósticos y predictivos de las biopsias ha aumentado en los últimos años ya que muchas de las decisiones terapéuticas se basan en sus resultados. Por lo que una correcta técnica resulta de vital importancia para evitar la degradación del RNA, desde la obtención de la muestra con gran representación de tejido tumoral hasta la fijación y crioconservación.

En definitiva, se puede decir que el uso de la genómica ha permitido un avance considerable en el conocimiento de la biología de la célula tumoral y ha permitido a los clínicos obtener más información de manera más eficiente.

6.5.1. EXPRESIÓN DE LOS GENES: FGFR1, BRCA1, RAP80, BIM, betaTRCP, PTPN12, YAP, HIF1alfa, GAS6, AXL, ZNF217, EZH2 y ROR1.

A. Correlación con subgrupos tumorales:

Es bien conocido que los subtipos moleculares de cáncer de mama responden diferente a la quimioterapia según la activación de diferentes vías. Esto sugiere que los genes implicados en la quimiosensibilidad son expresados de modo diferente en cada subtipo tumoral.

En nuestra serie, se observó que los los genes AXL, FGFR1, RAP80, GAS6, BTRCP y ZNF217 presentaban de forma significativa niveles más elevados en los tumores hormonodependientes ($p < 0.05$). Estos datos se correlacionan con los encontrados en la literatura (Brunello E et al., 2012; Turner N et al., 2010; Mackiewicz M et al., 2011). La expresión de GAS6 y AXL, por ejemplo, se ha visto aumentada en los carcinomas de endometrio y próstata, confirmando la expresión de estos genes diana en tumores hormonorespondedores (Sun et al, 2003, 2004; Sainaghi et al, 2005). Esto es importante ya que estos genes presentan también un efecto protrombótico, y precisamente, el subgrupo de pacientes hormonodependientes ya presentan de por si mayor riesgo de trombosis debido a la quimioterapia y al tamoxifeno. Por lo que,

hipotéticamente, un tratamiento que bloquee las diana GAS6 y AXL podría beneficiar a este subgrupo de pacientes disminuyendo el riesgo de trombosis (Mc Cormack O et al., 2008). Se ha observado también que el factor de transcripción ZNF217 es un oncogen que se encuentra en el 20-30% de los cánceres primarios de mama y sus niveles son mayores en los tumores con receptores de estrógeno positivos y se encuentra disminuido en los tumores basales (Littlepage LE et al., 2012).

El análisis de determinados genes (AXL, FGFR1, YAP, BTRCP, PTPN12) podría ayudar a identificar de forma más específica los diferentes subtipos moleculares. Niveles altos de FGFR1, BTRCP y PTPN12 se encontraron claramente en los tumores luminales (excluyendo HER2+) frente los no luminales ($p < 0,05$). La sobreexpresión de YAP se encontró en el 93% de tumores luminal A versus 38% de tumores luminal B/HER2- ($p = 0,003$). En cambio, los tumores triple negativos y HER2+/RH- presentaron niveles bajos de RAP80 y en ningún caso se observó niveles altos de AXL, YAP, GAS6 y BTRCP en tumores HER2+/RH- ($p < 0,05$).

YAP se ha caracterizado como un coactivador de los receptores de estrógeno y progesterona, por lo que se entiende que una expresión reducida de YAP se asocie significativamente a tumores con receptores hormonales negativos (Tufail R et al., 2012). En nuestro estudio se encontró además que se correlacionaba también con HER2+, observando una menor expresión en aquellos tumores HER2+/RH-.

Aunque la sobreexpresión de FGFR1 se ha correlacionado con tumores receptores hormonales positivos (Massabeau C et al., 2012; Brunello E et al., 2012), algunos autores han asociado su mayor expresión con el subtipo luminal B (Turner N et al., 2010). No obstante, nosotros encontramos un mayor porcentaje en los tumores Luminales A (79% de luminal A versus 52% luminal B/HER2-, $p = 0,022$).

Varios estudios han descrito la importancia de BRCA1 en la reparación del DNA y su implicación en los casos de mama esporádicos por “disfunción”.

Niveles bajos de mRNA de BRCA1 se han relacionado con carcinomas de alto grado que no expresan receptores hormonales ni HER2 (Rakha EA et al., 2008). Weigman VJ et al. analizaron los niveles de BRCA1 y RAP80 en 180 tumores, mostrando que los tumores basal-like presentaban una pérdida de expresión de estos genes (Weigman VJ et al., 2012). En nuestra serie, se observó la correlación con RAP80, pero, en cambio, no se encontraron diferencias en relación a los niveles de BRCA1.

En la figura 56 se resume la distribución de los diferentes genes estudiados.

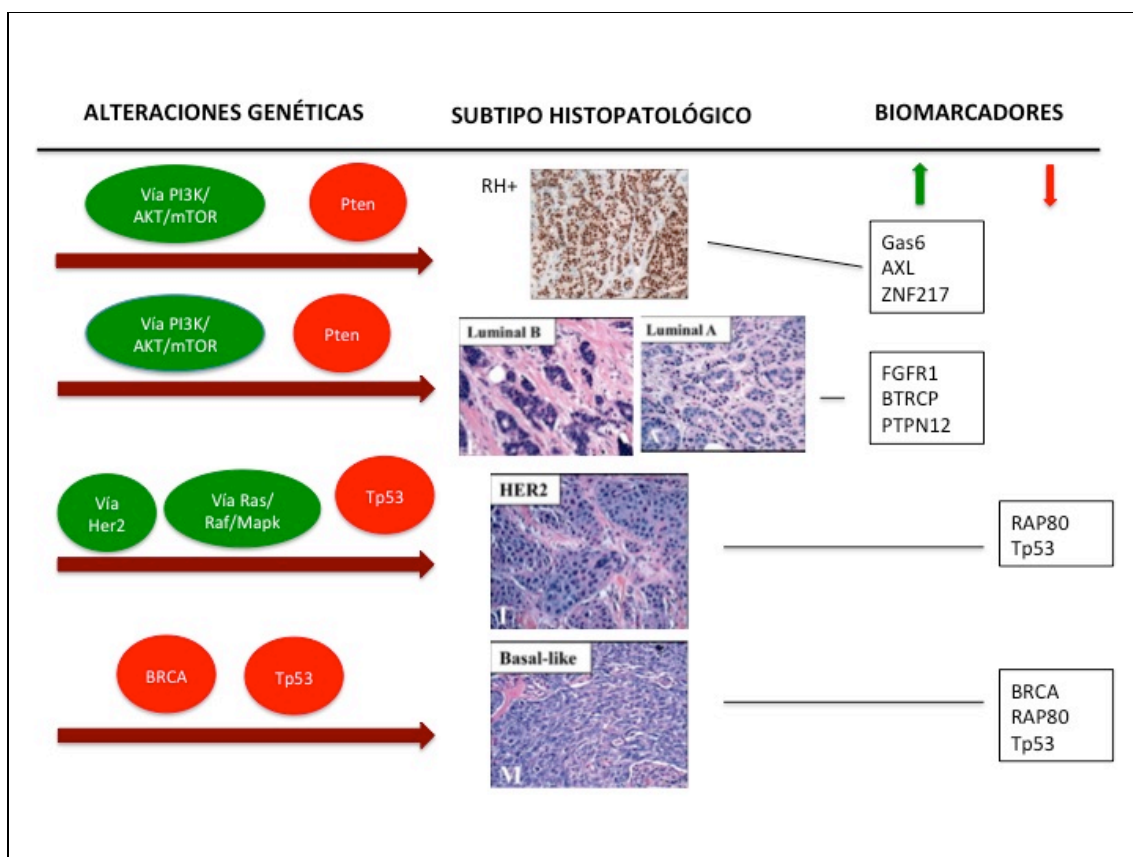


Figura 56. Heterogeneidad histológica y molecular en el cáncer de mama. Las alteraciones genéticas comunes varían entre los subtipos tumorales (en rojo los genes o vías inactivadas, en verde los genes activados o amplificados). Los biomarcadores mencionados son los encontrados altamente o escasamente expresados en nuestro estudio según cada subtipo.

B. Correlación con Respuesta QNA:

Ignatiadis M et al. publicaron en 2012 la serie más grande hasta ahora, con 996 pacientes y 17 genes estudiados, mostrando que las diferentes vías moleculares estaban asociadas a la pCR en los diferentes subtipos moleculares (Ignatiadis M et al., 2012).

En nuestro estudio se observó que niveles bajos de BRCA1 eran predictores de una pCR. BRCA1 es un gen supresor de tumores que está implicado en múltiples funciones celulares normales, como la recombinación, la reparación del daño en el DNA, la regulación del ciclo celular, la transcripción, el crecimiento y la diferenciación celular (Margeli M et al., 2010). En consecuencia, la presencia o ausencia de la función de BRCA1 puede tener un efecto significativo en la respuesta celular a la quimioterapia y también puede tener un valor predictivo, sobre todo en los pacientes tratados con agentes que dañan el DNA, como las antraciclinas o cisplatino. Estudios preclínicos sugieren que una expresión reducida de BRCA1 incrementa la sensibilidad a agentes que producen un daño en el DNA. En cambio, una expresión elevada de BRCA aumenta la sensibilidad de los agentes antimicrotúbulos (Vincristina o paclitaxel) (Lafarge S et al., 2001; Rosell R et al., 2007).

Todavía existe bastante controversia en relación si los tumores con inactivación de BRCA1 presentan características clínicas y patológicas determinadas y si obtienen mayor beneficio de los citostáticos que producen daño en el DNA. Nakai K et al., analizando 32 muestras de tumores, no consiguieron establecer una correlación entre los niveles de BRCA y la respuesta a la QNA (Nakai K et al., 2012). Estos datos contrastan con los de Margeli M et al., 2010, con los resultados obtenidos de los modelos in vitro y con los resultados de nuestra experiencia, con una pCR del 53% en tumores con niveles bajos de BRCA1 tras una quimioterapia basada en antraciclinas ($p=0,027$).

Una alta expresión de AXL y YAP se correlacionaron con mala respuesta a la quimioterapia. A diferencia de lo publicado en la literatura, niveles altos de FGFR1 también se asociaron a una mala respuesta. En un estudio de 59

pacientes con cáncer de mama avanzado, se analizó la expresión de FGFR1, y mostraron que el 64% de tumores negativos para FGFR1 eran resistentes a la radioquimioterapia preoperatoria frente el 41% de tumores FGFR1 positivos (Massabeau C et al., 2012). No obstante, estas diferencias no fueron significativas y dicho estudio presentaba la limitación de un pequeño tamaño muestral (sólo 22 pacientes con material biológico disponible) y la ausencia de un análisis genómico para la expresión de FGFR1 (su diagnóstico se realizó mediante inmunohistoquímica).

Nuestros datos van en relación a la distribución de estos genes por subtipo molecular, ya que todos ellos se encontraron sobreexpresados en tumores luminales, los cuales van asociados a una menor quimiosensibilidad.

6.5.2. MUTACIONES PIK3CA, Tp53.

Otros posibles marcadores moleculares son las mutaciones de PIK3CA y Tp53:

PIK3CA se encuentra mutado en aproximadamente en el 25-47% de los cánceres de mama. Líneas de investigación in vitro sugieren que una hiperactivación de la vía PIK3CA se relaciona con una quimioresistencia a través de la estimulación de las vías celulares Akt y mTOR. Por ejemplo, en el cáncer de ovario líneas celulares con sobreexpresión de Akt son más resistentes al paclitaxel que las que tienen niveles bajos (Yuan TL et al., 2008; Page C et al., 2000). Aunque se ha mostrado que los tumores con mutaciones PIK3CA son menos agresivos y suelen presentarse en estados iniciales (Kalinsky K et al., 2009), Papaxoinis et al., describieron que la mutación era un factor pronóstico negativo en pacientes tratadas con quimioterapia, debido probablemente a esta quimioresistencia (Papaxoinis G et al., 2009). No obstante, todavía existe poca información sobre si la mutación de PIK3CA es un predictor de pCR y varios estudios clínicos en cáncer de mama no han podido todavía demostrar dicha asociación (Liedtke C et al., 2008; Hilton J et al., 2012).

En nuestra serie los tumores RH+/HER2- presentaron mayor porcentaje de mutaciones (24%, $p=0,16$) y se observó una correlación significativa con la respuesta patológica, siendo la mutación PIK3CA un predictor de mala respuesta ($p=0,029$).

La Tp53 tiene un papel importante en el proceso de reparación de DNA. Se detectó que la mutación de Tp53 fue más frecuente en el subgrupo tumoral HER2+/RH- ($p=0,008$). Modelos preclínicos han sugerido que los tumores de mama con mutación Tp53 podrían ser resistentes a antraciclinas, y más sensibles a taxanos (O'Connor PM et al., 1997). En 2011, Bonnefoi H et al., publicaron los resultados de su estudio prospectivo, 928 pacientes tratadas con régimen estándar de antraciclinas y 928 pacientes con régimen basado en taxanos. Analizaron las mutaciones de Tp53 en cada uno de los grupos pero sin observar diferencias en cuanto a la respuesta, concluyendo que el estatus de Tp53 no identificaba las pacientes que se beneficiarían de una quimioterapia (Bonnefoi H et al., 2011). Al igual que este estudio, nosotros tampoco hemos podido demostrar el papel de Tp53 como factor predictivo de respuesta a la QNA.

6.5.3. SUPERVIVENCIA

También se analizó la relación con la supervivencia con el fin de establecer posibles factores pronósticos (se ajustó la significación a $p<0,1$).

La sobreexpresión de FGFR1 a pesar de ser más frecuente en tumores de buen pronóstico (luminales), se relacionó con una menor SG, debido probablemente a presentar mayor resistencia al tratamiento. En cáncer de pulmón, se ha observado que los tumores con amplificación de FGFR1 presentaban una menor SLE y mayor riesgo de recurrencia (Kim HR et al., 2013). En el cáncer de mama, esta sobreexpresión promueve una resistencia a la terapia endocrina por medio de una supresión de los receptores de progesterona (Turner N et al., 2010).

No existe mucha información sobre el gen BTRCP, y todavía no está claro su papel como factor pronóstico, pero algunos estudios han descrito que niveles altos de BTRCP podrían bloquear VEGFR2 y disminuir el proceso de angiogénesis que se produce durante la carcinogénesis, por lo que podría ser un marcador de buen pronóstico (Shaik S et al., 2012). En nuestra serie, niveles altos de BTRCP se encontraron en tumores luminales, y su sobreexpresión se correlacionó con una mejor SG y SLE.

También observamos una alta expresión de ZNF217 en tumores RH+, y en un muy bajo porcentaje en triple negativos, pero no encontramos diferencias en cuanto a la supervivencia. No obstante, observamos una tendencia no significativa a una mayor afectación ganglionar entre los tumores con alta expresión de ZNF217. Algunos estudios sugieren que se trata de un factor de mal pronóstico ya que está implicado en la vía EMT (transición epitelio-mesénquima). Vendrell et al., concluyeron que niveles altos de ZNF217 en cáncer de mama proporcionaban un importante biomarcador de mal pronóstico con mayor riesgo de desarrollo de metástasis (Vendrell JA et al., 2012).

En nuestro trabajo, encontramos una relación entre pCR y BRCA1 pero no se correlacionó con el pronóstico. En una serie retrospectiva de 70 pacientes con cáncer de ovario epitelial esporádico tratadas con cisplatino, aquellas con niveles bajos de BRCA1 tuvieron una supervivencia significativamente mejor que las de niveles altos (Quinn JE et al., 2007). En la misma línea, en pacientes con cáncer de vejiga localmente avanzado tratados con quimioterapia basada en cisplatino, los niveles bajos de BRCA1 eran predictores de una mejor respuesta, y la supervivencia fue mayor que con niveles altos (Font A et al., 2011).

La adaptación a la hipoxia es vital para la progresión de cualquier tumor, y toda respuesta celular a la hipoxia viene mediada por la expresión de genes, principalmente de los factores inductores de hipoxia (HIF). HIF1 estimula los procesos de angiogénesis, glicólisis y eritropoyesis por lo que es de esperar que una amplificación de HIF1 se asocie a un pronóstico adverso (Bos R et al., 2004). En nuestra serie, tumores con tercil alto/medio presentaron peor SG que

los de tercil bajo.

Recientes datos indican que mutaciones en Tp53, además de anular las propiedades de los supresores de tumores, confieren también una actividad prooncogénica tipo “gain of function” a la proteína mutada que contribuiría a una progresión tumoral (Xu J et al., 2011). Así, los mecanismos de mutación Tp53 pueden incluir una regulación positiva aberrante de genes que promueven progresión tumoral o resistencia a tratamientos (Oren M et al., 2010; Do PM et al., 2012). Análisis retrospectivos de ensayos clínicos randomizados, mediante la expresión de p53 por inmunohistoquímica o secuenciación del gen Tp53, han identificado una asociación significativa con un peor pronóstico en pacientes tratados con doxorrubicina y ciclofosfamida adyuvante (Lara JF et al., 2011; Fernández-Cuesta L et al., 2012). En nuestro estudio se ha confirmado una asociación entre mutación Tp53 y pronóstico, y muestra que la presencia de mutación define un grupo pronóstico diferente con una menor SLE.

Nuestros datos sugieren que el estudio de la biología tumoral mediante diferentes marcadores moleculares y a través de la QNA puede ser de gran utilidad, aunque son necesarios más estudios prospectivos y con mayor tamaño muestral para validar su papel pronóstico.

7. CONCLUSIONES

1. El cáncer de mama presenta una gran heterogeneidad intertumoral, por lo que la respuesta a la QNA se basa en las características intrínsecas de cada tumor.
2. Identificamos como factores predictivos de respuesta anatomopatológica: la ausencia de receptores de estrógeno ($p=0,05$), receptores de progesterona ($p=0,014$), la sobreexpresión de HER2 ($p=0,008$) y el subtipo tumoral ($p=0,022$).
3. El único factor independiente asociado a la respuesta patológica fue el subtipo tumoral, siendo los tumores HER2+ más sensibles a la quimioterapia (OR 3,73, IC 95% 1,52-9,13; $p=0,004$). El tamaño tumoral no fue predictivo de respuesta, y como resultado de nuestro estudio, la QNA en nuestro centro es utilizada en tumores iniciales HER2+ y triple negativos.
4. Los pacientes con buena respuesta tuvieron mejor pronóstico en todos los subtipos tumorales, también en el grupo RH+/HER2-.
5. En el análisis multivariado, la afectación ganglionar, el estado de los receptores hormonales y la respuesta patológica MyP fueron factores independientes asociados a la progresión de la enfermedad.
6. La expresión de los diferentes genes difieren según el subtipo molecular:
 - Los tumores con receptores hormonales positivos presentaron alta expresión de AXL, GAS6 y FGFR1.
 - Los tumores luminales se caracterizaron por presentar niveles altos de FGFR1, BTRCP, ZNF12 y PTPN12.
 - Niveles bajos de RAP80 se encontraron más frecuentemente en tumores HER2+ y triples negativos.
 - Mutación p53 fue encontrada en tumores receptores hormonales negativos y tumores HER2+.

7. Identificamos como factores predictivos de respuesta patológica:
 - Niveles altos de AXL, FGFR1, YAP, PTPN12 se correlacionaron con mala respuesta.
 - Niveles bajos de BRCA1 con buena respuesta.
 - La mutación PIK3CA se correlacionó con mala respuesta.

8. Los niveles de FGFR1, BTRCP, HIFalfa y mutación Tp53 resultaron ser factores pronósticos:
 - Niveles altos de FGFR1 se asociaron a un peor pronóstico.
 - Niveles altos de BTRCP y HIFalfa con mejor supervivencia.
 - La presencia de mutación en Tp53 fue factor de mal pronóstico.

8. CONCLUSIONS

1. Breast cancer has a great intertumoral heterogeneity, and response to NAC is based on the intrinsic characteristics of each tumor.
2. The following predictors for pathologic response were identified: the absence of estrogen receptor ($p=0.05$), progesterone receptor ($p=0.014$), HER2 overexpression ($p=0.008$) and tumor subtype ($p=0.022$).
3. The only independent factor associated with pathologic response was tumor subtype, being HER2+ tumors the most chemosensitive tumors (OR 3.73, 95% CI 1.52 to 9.13, $P = 0.004$). Tumor size was not a predictor of response. As a result of our study, NAC at our center is currently used in initial positive-HER2 and triple negative tumors.
4. Patients who achieved a good response had better prognosis in all tumor subtypes, also in the positive-HR/negative-HER2 group.
5. In the multivariate analysis, lymph node involvement, hormone receptor status and pathologic response (Miller and Payne) were independent factors associated with disease progression.
6. The gene expression differ according to molecular subtype:
 - Positive-hormone receptor tumors showed high expression of AXL, GAS6 and FGFR1.
 - Luminal tumors were characterized by high levels of FGFR1, BTRCP, ZNF12 and PTPN12.
 - Low levels of RAP80 were found more frequently in positive-HER2 and triple negative tumors.
 - P53 mutation was found in negative-hormone receptor and positive-HER2 tumors.

7. The following predictors of pathologic response were identified:
 - High levels of AXL, FGFR1, YAP, PTPN12 were correlated with a poor response.
 - Low levels of BRCA1 were correlated with a good response.
 - The PIK3CA mutation was correlated with a poor response.

8. FGFR1, BTRCP and HIFalpha levels and Tp53 mutation were identified as prognostic factors:
 - High levels of FGFR1 were found in patients with poor prognosis.
 - High levels of BTRCP and HIFalpha were associated with more favorable outcomes.
 - The presence of mutation in Tp53 was an adverse prognostic factor.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Abner AL, Collins L, Peiro G, Recht A, Come S, Shulman LN, et al. Correlation of tumor size and axillary lymph node involvement with prognosis in patients with T1 breast carcinoma. *Cancer*. 1998 Dec 15;83(12):2502–8.
2. Anderson WF, Jatoi I, Devesa SS. Distinct breast cancer incidence and prognostic patterns in the NCI's SEER program: suggesting a possible link between etiology and outcome. *Breast Cancer Res Treat*. 2005 Mar;90(2):127–37.
3. Ann Clark R, Levine R, Snedeker S. *The Biology of Breast Cancer. Breast Cancer and Environment risk factors*, October, 1997.
4. Axelrod DE, Shah K, Yang Q, Haffty BG. Prognosis for Survival of Young Women with Breast Cancer by Quantitative p53 Immunohistochemistry. *Cancer Clin Oncol*. 2012; 1(1).
5. Baeriswyl V, Christofori G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2009 Oct;19(5):329–37.
6. Bardelli A, Siena S. Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Mar 1;28(7):1254–61.
7. Baselga J, Bradbury I, Eidtmann H, Di Cosimo S, de Azambuja E, Aura C, et al. Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet*. 2012 Feb 18;379(9816):633–40.
8. Bear HD, Anderson S, Smith RE, Geyer CE Jr, Mamounas EP, Fisher B, 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 May 1;24(13):2019–27.
9. Bear HD, Anderson S, Brown A, Smith R, Mamounas EP, Fisher B, et al. The effect on tumor response of adding sequential preoperative docetaxel to preoperative doxorubicin and cyclophosphamide: preliminary results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol*. 2003 Nov 15;21(22):4165–74.
10. Beral V. Million Women Study Collaborators. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*. 2003 Aug 9;362(9382):419–27.
11. Bonadonna G, Valagussa P, Zucali R, Salvadori B. Primary chemotherapy in surgically resectable breast cancer. *Cancer J Clin*. 1995 Aug;45(4):227–43.
12. Bland KI, Edward MC. *LA MAMA. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas (2 Tomos)*. Ed. Panamericana, 3ª edición.

13. Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer*. 1957 Sep;11(3):359–77.
14. Bonnefoi H, Ducraux A, Movarekhi S, Pelte MF, Bongard S, Lurati E, et al. p53 as a potential predictive factor of response to chemotherapy: feasibility of p53 assessment using a functional test in yeast from trucut biopsies in breast cancer patients. *Br J Cancer*. 2002 Mar 4;86(5):750–5.
15. Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*. 1989 Sep 1;49(17):4682–9.
16. Bos R, van Diest PJ, van der Groep P, Shvarts A, Greijer AE, van der Wall E. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and cell cycle proteins in invasive breast cancer are estrogen receptor related. *Breast Cancer Res*. 2004;6(4):R450–459.
17. Bouwman P, Aly A, Escandell JM, Pieterse M, Bartkova J, van der Gulden H, et al. 53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers. *Nat Struct Mol Biol*. 2010 Jun;17(6):688–95.
18. Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med*. 2005 Aug 25;353(8):793–802.
19. Breast cancer incidence and mortality--United States, 1992. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Morb Mortal Wkly Rep*. 1996 Oct 4;45(39):833–7.
20. Brunello E, Brunelli M, Bogina G, Calìò A, Manfrin E, Nottegar A, et al. FGFR-1 amplification in metastatic lymph-nodal and haematogenous lobular breast carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2012;31:103.
21. Buyse M, Sargent DJ, Grothey A, Matheson A, de Gramont A. Biomarkers and surrogate end points--the challenge of statistical validation. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010 Jun;7(6):309–17.
22. Buzdar AU, Ibrahim NK, Francis D, Booser DJ, Thomas ES, Theriault RL, 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 Jun 1;23(16):3676–85.
23. Buzdar AU, Valero V, Ibrahim NK, Francis D, Broglio KR, Theriault RL, et al. Neoadjuvant therapy with paclitaxel followed by 5-fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide chemotherapy and concurrent trastuzumab in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer: an update of the initial randomized study population and data of additional patients treated with the same regimen. *Clin Cancer Res*. 2007 Jan 1;13(1):228–33.

24. Cameron MD, Schmidt EE, Kerkvliet N, Nadkarni KV, Morris VL, Groom AC, et al. Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. *Cancer Res.* 2000 May 1;60(9):2541–6.
25. Campeau PM, Foulkes WD, Tischkowitz MD. Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues. *Hum Genet.* 2008 Aug;124(1):31–42
26. Carabias-Meseguer P, Zapardiel I, Cusidó-Gimferrer M, Godoy-Tundidor S, Tresserra-Casas F, Rodríguez-García I, et al. Influence of the in situ component in 389 infiltrating ductal breast carcinomas. *Breast Cancer Tokyo Jpn.* 2013 Jul;20(3):213–7.
27. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res.* 2007 Apr 15;13(8):2329–34.
28. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer.* 1989 Jan 1;63(1):181–7. .
29. Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A, Hilsenbeck SG, Gutierrez MC, Tham Y-L, et al. Patterns of Resistance and Incomplete Response to Docetaxel by Gene Expression Profiling in Breast Cancer Patients. *J Clin Oncol.* 2005 Feb 20;23(6):1169–77.
30. Chavez-Macgregor M, Brown E, Lei X, Litton J, Meric-Bernstram F, Mettendorf E, et al. Bisphosphonates and pathologic complete response to taxane- and anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. *Cancer.* 2012 Jan 15;118(2):326–32.
31. Chevallier B, Roche H, Olivier JP, Chollet P, Hurteloup P. Inflammatory breast cancer. Pilot study of intensive induction chemotherapy (FEC-HD) results in a high histologic response rate. *Am J Clin Oncol.* 1993 Jun;16(3):223–8.
32. Chia S, Swain SM, Byrd DR, Mankoff DA. Locally advanced and inflammatory breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2008 Feb 10;26(5):786–90.
33. Cizkova M, Susini A, Vacher S, Cizeron-Clairac G, Andrieu C, Driouch K, et al. PIK3CA mutation impact on survival in breast cancer patients and in ER α , PR and ERBB2-based subgroups. *Breast Cancer Res.* 2012;14(1):R28.
34. Claus EB, Risch N, Thompson WD. Autosomal dominant inheritance of early-onset breast cancer. Implications for risk prediction. *Cancer.* 1994 Feb 1;73(3):643–51.
35. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47

- epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet*. 2002 Jul 20;360(9328):187–95.
36. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino J, Wolmark N et al. Meta-analysis Results from the Collaborative Trials in Neoadjuvant Breast Cancer (CTNeoBC). *Cancer Res*. 2012; 72(24):14–20.
 37. Costantino JP, Gail MH, Pee D, Anderson S, Redmond CK, Benichou J, et al. Validation studies for models projecting the risk of invasive and total breast cancer incidence. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Sep 15;91(18):1541–8.
 38. Coussy F. Neoadjuvant Chemotherapy in lobular and ductal carcinoma: comparison of clinical, pathological response rates and survival. SABCs Poster Session 1; 2010.
 39. Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, et al. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005 Mar 1;23(7):1420–30.
 40. Darb-Esfahani S, Loibl S, Müller BM, Roller M, Denkert C, Komor M, et al. Identification of biology-based breast cancer types with distinct predictive and prognostic features: role of steroid hormone and HER2 receptor expression in patients treated with neoadjuvant anthracycline/taxane-based chemotherapy. *Breast Cancer Res*. 2009;11(5):R69.
 41. D'Eredita' G, Giardina C, Martellotta M, Natale T, Ferrarese F. Prognostic factors in breast cancer: the predictive value of the Nottingham Prognostic Index in patients with a long-term follow-up that were treated in a single institution. *Eur J Cancer*. 2001 Mar;37(5):591–6.
 42. De Boer M, van Deurzen CHM, van Dijck JAAM, Borm GF, van Diest PJ, Adang EMM, et al. Micrometastases or isolated tumor cells and the outcome of breast cancer. *N Engl J Med*. 2009 Aug 13;361(7):653–63.
 43. Delpuch Y, Coutant C, Hsu L, Barranger E, Iwamoto T, Barcenas CH, et al. Clinical benefit from neoadjuvant chemotherapy in oestrogen receptor-positive invasive ductal and lobular carcinomas. *Br J Cancer*. 2013 Feb 5;108(2):285–91.
 44. DeWys WD. Studies Correlating the Growth Rate of a Tumor and Its Metastases and Providing Evidence for Tumor-related Systemic Growth-retarding Factors. *Cancer Res*. 1972 Feb 1;32(2):374–9.
 45. Dickinson PD, Abdel-Fatah TMA, Green AR, Moseley P, Reis-Filho JS, Ellis IO, et al. Bcl2 expression and prediction of outcomes to anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in ER-positive breast cancer and to nonanthracycline adjuvant therapy. *J Clin Oncol*. 2011; 29(15):589.
 46. Do PM, Varanasi L, Fan S, Li C, Kubacka I, Newman V, et al. Mutant p53 cooperates with ETS2 to promote etoposide resistance. *Genes Dev*. 2012 Apr 15;26(8):830–45.

47. Du J, Xu R, Hu Z, Tian Y, Zhu Y, Gu L, et al. PI3K and ERK-induced Rac1 activation mediates hypoxia-induced HIF-1 α expression in MCF-7 breast cancer cells. *PLoS One*. 2011;6(9):e25213.
48. Dunnwald LK, Doot RK, Specht JM, Gralow JR, Ellis GK, Livingston RB, et al. PET tumor metabolism in locally advanced breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy: value of static versus kinetic measures of fluorodeoxyglucose uptake. *Clin Cancer Res*. 2011 Apr 15;17(8):2400–9.
49. Dunnwald LK, Rossing MA, Li CI. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2007;9(1):R6.
50. 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 randomised trials. *Lancet*. 2005 May 14;365(9472):1687–717.
51. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, NY: Springer 2010: 347–76.
52. Elston CW. Classification and grading of invasive breast carcinoma. *Verhandlungen Dtsch Ges Für Pathol*. 2005;89:35–44.
53. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991 Nov;19(5):403–10.
54. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*. 2008 Mar 13;358(11):1148–59.
55. Esserman LJ, Berry DA, Cheang MCU, Yau C, Perou CM, Carey L, et al. Chemotherapy response and recurrence-free survival in neoadjuvant breast cancer depends on biomarker profiles: results from the I-SPY 1 TRIAL (CALGB 150007/150012; ACRIN 6657). *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Apr;132(3):1049–62.
56. Ewing J. *Neoplastic Diseases: a treatise on tumors*. 3rd ed. Philadelphia (PA): W.B. Saunders Company; 1928.
57. Faneyte IF, Schrama JG, Peterse JL, Remijnse PL, Rodenhuis S, van de Vijver MJ. Breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy: predictive markers and relation with outcome. *Br J Cancer*. 2003 Feb 10;88(3):406–12.
58. Fasching PA, Heusinger K, Haeberle L, Niklos M, Hein A, Bayer CM, et al. Ki67, chemotherapy response, and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment. *BMC Cancer*. 2011;11:486.

59. Feldman LD, Hortobagyi GN, Buzdar AU, Ames FC, Blumenschein GR. Pathological assessment of response to induction chemotherapy in breast cancer. *Cancer Res.* 1986 May;46(5):2578–81.
60. Fiorica J. Prevention and treatment of breast cancer. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2001 Dec;28(4):711–26.
61. Fernandez-Cuesta L, Oakman C, Falagan-Lotsch P, Smoth K, Quinaux E, Buyse M, et al. Prognostic and predictive value of TP53 mutations in node-positive breast cancer patients treated with anthracycline- or anthracycline/taxane-based adjuvant therapy: results from the BIG 02-98 phase III trial. *Breast Cancer Res.* 2012;14(3):R70.
62. Fisher B, Brown A, Mamounas E, Wieand S, Robidoux A, Margolese RG, 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 Jul;15(7):2483–93.
63. Fisher B, Saffer E, Rudock C, Coyle J, Gunduz N. Effect of local or systemic treatment prior to primary tumor removal on the production and response to a serum growth-stimulating factor in mice. *Cancer Res.* 1989 Apr 15;49(8):2002–4.
64. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 2000 Jul;124(7):966–78.
65. Font A, Taron M, Gago JL, Costa C, Sánchez JJ, Carrato C, et al. BRCA1 mRNA expression and outcome to neoadjuvant cisplatin-based chemotherapy in bladder cancer. *Ann Oncol.* 2011 Jan;22(1):139–44.
66. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2010 Nov 11;363(20):1938–48.
67. Fukuda S, Takao S, Kuwayama M, Shimazu Y, Miyazaki K. Rapid detection of norovirus from fecal specimens by real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *J Clin Microbiol.* 2006 Apr;44(4):1376–81.
68. Gail MH, Brinton LA, Byar DP, Corle DK, Green SB, Schairer C, et al. Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *J Natl Cancer Inst.* 1989 Dec 20;81(24):1879–86.
69. Galimberti V, Botteri E, Chifu C, Gentilini O, Luini A, Intra M, et al. Can we avoid axillary dissection in the micrometastatic sentinel node in breast cancer? *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Feb;131(3):819–25.
70. Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, Manikhas A, Lluch A, Tjulandin S, 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

- randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *Lancet*. 2010 Jan 30;375(9712):377–84.
71. Gianni L, Baselga J, Eiermann W, Guillem Porta V, Semiglazov V, Lluch A, et al. 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 Dec 15;11(24 Pt 1):8715–21.
 72. Gianni L, Baselga J, Eiermann W, Porta VG, Semiglazov V, Lluch A, et al. Phase III trial evaluating the addition of paclitaxel to doxorubicin followed by cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil, as adjuvant or primary systemic therapy: European Cooperative Trial in Operable Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2009 May 20;27(15):2474–81.
 73. Gierach GL, Ichikawa L, Kerlikowske K, Brinton LA, Farhat GN, Vacek PM, et al. Relationship between mammographic density and breast cancer death in the Breast Cancer Surveillance Consortium. *J Natl Cancer Inst*. 2012 Aug 22;104(16):1218–27.
 74. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, Beitsch PD, Whitworth PW, Blumencranz PW, et al. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. *J Am Med Assoc*. 2011 Feb 9;305(6):569–75.
 75. Gnant M, Harbeck N, Thomssen C. St. Gallen 2011: Summary of the Consensus Discussion. *Breast Care Basel Switz*. 2011;6(2):136–41.
 76. Gonzalez-Cao M. Tumor response evaluation to neoadjuvant chemotherapy by functional imaging technologies. Poster, Saint Gallen 2013.
 77. González-Merlo J. *Oncología ginecológica*. 2^a edición. Madrid: Masson; 2000.
 78. Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn H-J. Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *J Clin Oncol*. 2003 Sep 1;21(17):3357–65.
 79. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn H-J, et al. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol*. 2005 Oct;16(10):1569–83.
 80. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn H-J, et al. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol*. 2011 Aug;22(8):1736–47.
 81. Gómez-Raposo C, Andreu M, Suárez-García I, Esteban MI, Carballo M, Sereno-Moyano MF, et al. Relevance of breast cancer subtypes for magnetic resonance imaging response monitoring during neoadjuvant chemotherapy. *Clin Transl Oncol*. 2012 Jun;14(6):486–8.

82. Gonzalez ME, DuPrie ML, Krueger H, Merajver SD, Ventura AC, Toy KA, et al. Histone methyltransferase EZH2 induces Akt-dependent genomic instability and BRCA1 inhibition in breast cancer. *Cancer Res.* 2011 Mar 15;71(6):2360–70.
83. Gralow JR, Burstein HJ, Wood W, Hortobagyi GN, Gianni L, von Minckwitz G, et al. Preoperative therapy in invasive breast cancer: pathologic assessment and systemic therapy issues in operable disease. *J Clin Oncol.* 2008 Feb 10;26(5):814–9.
84. Gruvberger S, Ringnér M, Chen Y, Panavally S, Saal LH, Borg A, et al. Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns. *Cancer Res.* 2001 Aug 15;61(16):5979–84.
85. Gupta GP, Massagué J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell.* 2006 Nov 17;127(4):679–95.
86. Gustafsson A, Martuszezwska D, Johansson M, Ekman C, Hafizi S, Ljungberg B, et al. Differential expression of Axl and Gas6 in renal cell carcinoma reflecting tumor advancement and survival. *Clin Cancer Res.* 2009 Jul 15;15(14):4742–9.
87. Halsted WS. I. The Results of Radical Operations for the Cure of Carcinoma of the Breast. *Ann Surg.* 1907 Jul;46(1):1–19.
88. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996 Aug 9;86(3):353–64.
89. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57–70.
90. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646–74.
91. Harris JR. Diseases of the breast: [includes fully searchable text with image bank!]. Philadelphia, Pa. [u.a.: Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins; 2010.
92. Harris LN, You F, Schnitt SJ, Witkiewicz A, Lu X, Sgroi D, et al. Predictors of resistance to preoperative trastuzumab and vinorelbine for HER2-positive early breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2007 Feb 15;13(4):1198–207.
93. Hayashi N, Nakamura S, Tokuda Y, Shimoda Y, Yagata H, Yoshida A, et al. Prognostic value of HER2-positive circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer. *Int J Clin Oncol.* 2012 Apr;17(2):96–104.
94. Hayashi Y, Takei H, Nozu S, Tochigi Y, Ichikawa A, Kobayashi N, et al. Analysis of complete response by MRI following neoadjuvant chemotherapy predicts pathological tumor responses differently for molecular subtypes of breast cancer. *Oncol Lett.* 2013 Jan;5(1):83–9.

95. Hamajima N, Hirose K, Tajima K, Rohan T, Calle EE, Heath CW Jr, et al. Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br J Cancer*. 2002 Nov 18;87(11):1234–45.
96. Houssami N, Macaskill P, von Minckwitz G, Marinovich ML, Mamounas E. Meta-analysis of the association of breast cancer subtype and pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy. *Eur J Cancer*. 2012 Dec;48(18):3342–54.
97. Henson DE, Ries L, Freedman LS, Carriaga M. Relationship among outcome, stage of disease, and histologic grade for 22,616 cases of breast cancer. The basis for a prognostic index. *Cancer*. 1991 Nov 15;68(10):2142–9.
98. Herrada J, Iyer RB, Atkinson EN, Sneige N, Buzdar AU, Hortobagyi GN. Relative value of physical examination, mammography, and breast sonography in evaluating the size of the primary tumor and regional lymph node metastases in women receiving neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 1997 Sep;3(9):1565–9.
99. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*. 2007;8(5):R76.
100. Hilsenbeck SG, Ravdin PM, de Moor CA, Chamness GC, Osborne CK, Clark GM. Time-dependence of hazard ratios for prognostic factors in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1998;52(1-3):227–37.
101. Hilton J, Weberpals J, Lorimer I, Amin S, Islam S, Pelletier L, et al. BRCA1 protein levels and PIK3CA mutations as predictive biomarkers for response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer: An exploratory analysis. *Oncol Lett*. 2012 Jul;4(1):141–5.
102. Honkoop AH, van Diest PJ, de Jong JS, Linn SC, Giaccone G, Hoekman K, et al. Prognostic role of clinical, pathological and biological characteristics in patients with locally advanced breast cancer. *Br J Cancer*. 1998 Feb;77(4):621–6.
103. Hunter DJ, Spiegelman D, Adami HO, Beeson L, van den Brandt PA, Folsom AR, et al. Cohort studies of fat intake and the risk of breast cancer--a pooled analysis. *N Engl J Med*. 1996 Feb 8;334(6):356–61.
104. Huober J, von Minckwitz G, Denkert C, Tesch H, Weiss E, Zahm DM, et al. Effect of neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy in different biological breast cancer phenotypes: overall results from the GeparTrio study. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Nov;124(1):133–40.
105. Hylton NM, Blume JD, Bernreuter WK, Pisano ED, Rosen MA, Morris EA, et al. Locally advanced breast cancer: MR imaging for prediction of response

- to neoadjuvant chemotherapy--results from ACRIN 6657/I-SPY TRIAL. *Radiology*. 2012 Jun;263(3):663–72.
106. Hwang J-H, Voortman J, Giovannetti E, Steinberg SM, Leon LG, Kim Y-T, et al. Identification of microRNA-21 as a biomarker for chemoresistance and clinical outcome following adjuvant therapy in resectable pancreatic cancer. *PLoS One*. 2010;5(5):e10630.
 107. Ignatiadis M, Singhal SK, Desmedt C, Haibe-Kains B, Criscitiello C, Andre F, et al. Gene modules and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer subtypes: a pooled analysis. *J Clin Oncol*. 2012 Jun 1;30(16):1996–2004.
 108. Izquierdo A, González JR, Moreno V, Galceran J, Marcos-Gragera R, Clèries R, et al. [Time trend of breast cancer incidence in Catalonia]. *Med Clínica*. 2006 Mar 4;126(8):286–9.
 109. Janku F, Wheler JJ, Westin SN, Moulder SL, Naing A, Tsimberidou AM, et al. PI3K/AKT/mTOR inhibitors in patients with breast and gynecologic malignancies harboring PIK3CA mutations. *J Clin Oncol*. 2012 Mar 10;30(8):777–82.
 110. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *Cancer J Clin*. 2010 Oct;60(5):277–300.
 111. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *Cancer J Clin*. 2011 Apr;61(2):69–90.
 112. Jeon C. The predictive value of serum Her2/neu for response to Anthracycline-based and Trastuzumab-based neoadjuvant chemotherapy of advanced primary breast cancer. *SABCS Poster Session 3*; 2010.
 113. Jiang Z, Jones R, Liu JC, Deng T, Robinson T, Chung PED, et al. RB1 and p53 at the crossroad of EMT and triple-negative breast cancer. *Cell Cycle*. 2011 May 15;10(10):1563–70.
 114. Jimeno A, Messersmith WA, Hirsch FR, Franklin WA, Eckhardt SG. KRAS mutations and sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal cancer: practical application of patient selection. *J Clin Oncol*. 2009 Mar 1;27(7):1130–6.
 115. Kalinsky K, Jacks LM, Heguy A, Patil S, Drobnjak M, Bhanot UK, et al. PIK3CA mutation associates with improved outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2009 Aug 15;15(16):5049–59.
 116. Kaplan RN, Rafii S, Lyden D. Preparing the “soil”: the premetastatic niche. *Cancer Res*. 2006 Dec 1;66(23):11089–93.
 117. Kaufmann M, Hortobagyi GN, Goldhirsch A, Scholl S, Makris A, Valagussa P, et al. Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: an update. *J Clin Oncol*. 2006 Apr 20;24(12):1940–9.

118. Keegan THM, DeRouen MC, Press DJ, Kurian AW, Clarke CA. Occurrence of breast cancer subtypes in adolescent and young adult women. *Breast Cancer Res.* 2012;14(2):R55.
119. Ketcham AS, Wexler H, Mantel N. The effect of removal of a “primary” tumor on the development of spontaneous metastases. I. Development of a standardized experimental technic. *Cancer Res.* 1959 Oct;19:940–4.
120. Kim HR, Kim DJ, Kang DR, Lee JG, Lim SM, Lee CY, et al. Fibroblast growth factor receptor 1 gene amplification is associated with poor survival and cigarette smoking dosage in patients with resected squamous cell lung cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2013 Feb 20;31(6):731–7.
121. Krypuy M, Ahmed AA, Etemadmoghadam D, Hyland SJ, Australian Ovarian Cancer Study Group, DeFazio A, et al. High resolution melting for mutation scanning of TP53 exons 5-8. *BMC Cancer.* 2007;7:168.
122. Kuerer HM, Hunt KK, Newman LA, Ross MI, Ames FC, Singletary SE. Neoadjuvant chemotherapy in women with invasive breast carcinoma: conceptual basis and fundamental surgical issues. *J Am Coll Surg.* 2000 Mar;190(3):350–63.
123. Kuerer HM, Newman LA, Smith TL, Ames FC, Hunt KK, Dhingra K, et al. Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol.* 1999 Feb;17(2):460–9.
124. Lafarge S, Sylvain V, Ferrara M, Bignon YJ. Inhibition of BRCA1 leads to increased chemoresistance to microtubule-interfering agents, an effect that involves the JNK pathway. *Oncogene.* 2001 Oct 4;20(45):6597–606.
125. Larrieu-Lahargue F, Welm AL, Bouche-careilh M, Alitalo K, Li DY, Bikfalvi A, et al. Blocking Fibroblast Growth Factor receptor signaling inhibits tumor growth, lymphangiogenesis, and metastasis. *PloS One.* 2012;7(6):e39540.
126. Leissner P, Verjat T, Bachelot T, Paye M, Krause A, Puisieux A, et al. Prognostic significance of urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 mRNA expression in lymph node- and hormone receptor-positive breast cancer. *BMC Cancer.* 2006;6:216.
127. Leitner SP, Swern AS, Weinberger D, Duncan LJ, Hutter RV. Predictors of recurrence for patients with small (one centimeter or less) localized breast cancer (T1a,b N0 M0). *Cancer.* 1995 Dec 1;76(11):2266–74.
128. Li CI, Chlebowski RT, Freiberg M, Johnson KC, Kuller L, Lane D, et al. Alcohol consumption and risk of postmenopausal breast cancer by subtype: the women’s health initiative observational study. *J Natl Cancer Inst.* 2010 Sep 22;102(18):1422–31.
129. Liedtke C, Cardone L, Tordai A, Yan K, Gomez HL, Figureoa LJB, et al. PIK3CA-activating mutations and chemotherapy sensitivity in stage II-III breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2008;10(2):R27.

130. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Mar 10;26(8):1275–81.
131. Linger RMA, Keating AK, Earp HS, Graham DK. TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer. *Adv Cancer Res*. 2008;100:35–83.
132. Lips EH, Mukhtar RA, Yau C, de Ronde JJ, Livasy C, Carey LA, et al. Lobular histology and response to neoadjuvant chemotherapy in invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Nov;136(1):35–43.
133. Littlepage LE, Adler AS, Kouros-Mehr H, Huang G, Chou J, Krig SR, et al. The transcription factor ZNF217 is a prognostic biomarker and therapeutic target during breast cancer progression. *Cancer Discov*. 2012 Jul;2(7):638–51.
134. López-Abente G, Pollán M, Aragonés N, Pérez Gómez B, Hernández Barrera V, Lope V, et al. [State of cancer in Spain: incidence]. *An Sist Sanit Navar*. 2004 Aug;27(2):165–73.
135. Luo J, Margolis KL, Wactawski-Wende J, Horn K, Messina C, Stefanick ML, et al. Association of active and passive smoking with risk of breast cancer among postmenopausal women: a prospective cohort study. *BMJ*. 2011;342:d1016.
136. Ma H, Sullivan-Halley J, Smith AW, Neuhaus ML, Alfano CM, Meeske K, et al. Estrogenic botanical supplements, health-related quality of life, fatigue, and hormone-related symptoms in breast cancer survivors: a HEAL study report. *BMC Complement Altern Med*. 2011;11:109.
137. Madigan MP, Ziegler RG, Benichou J, Byrne C, Hoover RN. Proportion of breast cancer cases in the United States explained by well-established risk factors. *J Natl Cancer Inst*. 1995 Nov 15;87(22):1681–5.
138. Mackiewicz M, Huppi K, Pitt JJ, Dorsey TH, Ambs S, Caplen NJ. Identification of the receptor tyrosine kinase AXL in breast cancer as a target for the human miR-34a microRNA. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Nov;130(2):663–79.
139. Mamounas EP, Anderson SJ, Dignam JJ, Bear HD, Julian TB, Geyer CE Jr, et al. Predictors of locoregional recurrence after neoadjuvant chemotherapy: results from combined analysis of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18 and B-27. *J Clin Oncol*. 2012 Nov 10;30(32):3960–6.
140. Margeli M, Cirauqui B, Castella E, Tapia G, Costa C, Gimenez-Capitan A, et al. The prognostic value of BRCA1 mRNA expression levels following neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *PloS One*. 2010;5(3):e9499.
141. Marinovich ML, Sardanelli F, Ciatto S, Mamounas E, Brennan M, Macaskill P, et al. Early prediction of pathologic response to neoadjuvant therapy in

- breast cancer: systematic review of the accuracy of MRI. *Breast*. 2012 Oct;21(5):669–77.
142. Martinez-Alonso M, Vilapriño E, Marcos-Gragera R, Rue M. Breast cancer incidence and overdiagnosis in Catalonia (Spain). *Breast Cancer Res*. 2010;12(4):R58.
 143. Massabeau C, Sigal-Zafrani B, Belin L, Savignoni A, Richardson M, Kirova YM, et al. The fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1), a marker of response to chemoradiotherapy in breast cancer? *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Jul;134(1):259–66.
 144. Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER 3rd, Hurov KE, Luo J, et al. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*. 2007 May 25;316(5828):1160–6.
 145. Mauri D, Pavlidis N, Ioannidis JPA. Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2005 Feb 2;97(3):188–94.
 146. Mauriac L, MacGrogan G, Avril A, Durand M, Floquet A, Debled M, et al. Neoadjuvant chemotherapy for operable breast carcinoma larger than 3 cm: a unicentre randomized trial with a 124-month median follow-up. Institut Bergonié Bordeaux Groupe Sein (IBBGS). *Ann Oncol*. 1999 Jan;10(1):47–52.
 147. Mazouni C, Peintinger F, Wan-Kau S, Andre F, Gonzalez-Angulo AM, Symmans WF, et al. Residual ductal carcinoma in situ in patients with complete eradication of invasive breast cancer after neoadjuvant chemotherapy does not adversely affect patient outcome. *J Clin Oncol* 2007 Jul 1;25(19):2650–5.
 148. Meyers MO, Klauber-Demore N, Ollila DW, Amos KD, Moore DT, Drobish AA, et al. Impact of breast cancer molecular subtypes on locoregional recurrence in patients treated with neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2011 Oct;18(10):2851–7.
 149. Mc Cormack O, Chung WY, Fitzpatrick P, Cooke F, Flynn B, Harrison M, et al. Growth arrest-specific gene 6 expression in human breast cancer. *Br J Cancer*. 2008 Mar 25;98(6):1141–6.
 150. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*. 2000 Sep 9;321(7261):624–8.
 151. Mieog JSD, van der Hage JA, van de Velde CJH. Neoadjuvant chemotherapy for operable breast cancer. *Br J Surg*. 2007 Oct;94(10):1189–200.
 152. Miller TW, Rexer BN, Garrett JT, Arteaga CL. Mutations in the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role in tumor progression and

- therapeutic implications in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2011;13(6):224.
153. Miller K, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA, et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2007 Dec 27;357(26):2666–76.
 154. Miles DW, Chan A, Dirix LY, Cortés J, Pivot X, Tomczak P, et al. Phase III study of bevacizumab plus docetaxel compared with placebo plus docetaxel for the first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010 Jul 10;28(20):3239–47.
 155. Milne RL, Osorio A, Ramón y Cajal T, Baiget M, Lasa A, Diaz-Rubio E, et al. Parity and the risk of breast and ovarian cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Jan;119(1):221–32.
 156. Minn AJ, Kang Y, Serganova I, Gupta GP, Giri DD, Doubrovin M, et al. Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. *J Clin Invest.* 2005 Jan;115(1):44–55.
 157. Modolell A. *Manual de práctica clínica en Senología.* SESPM.
 158. Montagna E, Viale G, Rotmensz N, Maisonneuve P, Galimberti V, Luini A, et al. Minimal axillary lymph node involvement in breast cancer has different prognostic implications according to the staging procedure. *Breast Cancer Res Treat.* 2009 Nov;118(2):385–94.
 159. Moore MA. The role of chemoattraction in cancer metastases. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol.* 2001 Aug;23(8):674–6.
 160. Moore DB, Folsom AR, Mink PJ, Hong CP, Anderson KE, Kushi LH. Physical activity and incidence of postmenopausal breast cancer. *Epidemiol Camb Mass.* 2000 May;11(3):292–6.
 161. Morrow M. *Managing breast cancer Risk.* BC decker Inc. 2003.
 162. Mohseni M, Park BH. PIK3CA and KRAS mutations predict for response to everolimus therapy: now that's RAD001. *J Clin Invest.* 2010 Aug;120(8):2655–8.
 163. Nagao T, Kinoshita T, Hojo T, Tsuda H, Tamura K, Fujiwara Y. The differences in the histological types of breast cancer and the response to neoadjuvant chemotherapy: the relationship between the outcome and the clinicopathological characteristics. *Breast.* 2012 Jun;21(3):289–95.
 164. Nakai K, Mitomi H, Alkam Y, Arakawa A, Yao T, Tokuda E, et al. Predictive value of MGMT, hMLH1, hMSH2 and BRCA1 protein expression for pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in basal-like breast cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2012 Apr;69(4):923–30.

165. Narod SA. Modifiers of risk of hereditary breast cancer. *Oncogene*. 2006 Sep 25;25(43):5832–6.
166. Naumov GN, MacDonald IC, Weinmeister PM, Kerkvliet N, Nadkarni KV, Wilson SM, et al. Persistence of solitary mammary carcinoma cells in a secondary site: a possible contributor to dormancy. *Cancer Res*. 2002 Apr 1;62(7):2162–8.
167. Nielsen TO, Parker JS, Leung S, Voduc D, Ebbert M, Vickery T, et al. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2010 Nov 1;16(21):5222–32.
168. O'Connor PM, Jackman J, Bae I, Myers TG, Fan S, Mutoh M, et al. Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res*. 1997 Oct 1;57(19):4285–300.
169. Ocaña A, Pandiella A. Personalized therapies in the cancer “omics” era. *Mol Cancer*. 2010;9:202.
170. 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 Oct;12(5):320–7.
171. Olsen AH, Bihrmann K, Jensen M-B, Vejborg I, Lynge E. Breast density and outcome of mammography screening: a cohort study. *Br J Cancer*. 2009 Apr 7;100(7):1205–8.
172. Osako T, Iwase T, Kimura K, Yamashita K, Horii R, Akiyama F. Accurate staging of axillary lymph nodes from breast cancer patients using a novel molecular method. *Br J Cancer*. 2011 Oct 11;105(8):1197–202.
173. Osborne C, Wilson P, Tripathy D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist*. 2004;9(4):361–77.
174. Page C, Lin HJ, Jin Y, Castle VP, Nunez G, Huang M, et al. Overexpression of Akt/AKT can modulate chemotherapy-induced apoptosis. *Anticancer Res*. 2000 Feb;20(1A):407–16.
175. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004 Dec 30;351(27):2817–26.
176. Park SH, Moon WK, Cho N, Song IC, Chang JM, Park I-A, et al. Diffusion-weighted MR imaging: pretreatment prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. *Radiology*. 2010 Oct;257(1):56–63.

177. Pectasides D, Wirtz RM, Kotoula V, Papadimitriou C, Gogas H, Aravantinos G, et al. Prognostic significance of PI3K mRNA expression in patients with operable high-risk breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009 May; 27 (15S):577.
178. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev*. 1989 Aug;8(2):98–101.
179. Parsons R. Human cancer, PTEN and the PI-3 kinase pathway. *Semin Cell Dev Biol*. 2004 Apr;15(2):171–6.
180. Peintinger F, Kuerer HM, Anderson K, Boughey JC, Meric-Bernstam F, Singletary SE, et al. Accuracy of the combination of mammography and sonography in predicting tumor response in breast cancer patients after neoadjuvant chemotherapy. *Ann Surg Oncol*. 2006 Nov;13(11):1443–9.
181. Pernas S, Gil M, Benítez A, Bajen MT, Climent F, Pla MJ, et al. Avoiding axillary treatment in sentinel lymph node micrometastases of breast cancer: a prospective analysis of axillary or distant recurrence. *Ann Surg Oncol*. 2010 Mar;17(3):772–7.
182. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747–52.
183. Pierga J-Y, Hajage D, Bachelot T, Delaloge S, Brain E, Campone M, et al. High independent prognostic and predictive value of circulating tumor cells compared with serum tumor markers in a large prospective trial in first-line chemotherapy for metastatic breast cancer patients. *Ann Oncol*. 2012 Mar;23(3):618–24.
184. Pierga J-Y, Mouret E, Laurence V, Diéras V, Savigioni A, Beuzeboc P, et al. Prognostic factors for survival after neoadjuvant chemotherapy in operable breast cancer. the role of clinical response. *Eur J Cancer*. 2003 May;39(8):1089–96.
185. Pierga J-Y, Delaloge S, Espié M, Brain E, Sigal-Zafrani B, Mathieu M-C, et al. A multicenter randomized phase II study of sequential epirubicin/cyclophosphamide followed by docetaxel with or without celecoxib or trastuzumab according to HER2 status, as primary chemotherapy for localized invasive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Jul;122(2):429–37.
186. Pinder SE, Murray S, Ellis IO, Trihia H, Elston CW, Gelber RD, et al. The importance of the histologic grade of invasive breast carcinoma and response to chemotherapy. *Cancer*. 1998 Oct 15;83(8):1529–39.
187. Pollán M, Pastor-Barriuso R, Ardanaz E, Argüelles M, Martos C, Galcerán J, et al. Recent changes in breast cancer incidence in Spain, 1980-2004. *J Natl Cancer Inst*. 2009 Nov 18;101(22):1584–91.
188. Pollán M, Michelena MJ, Ardanaz E, Izquierdo A, Sánchez-Pérez MJ, Torrella A, et al. Breast cancer incidence in Spain before, during and after

- the implementation of screening programmes. *Ann Oncol.* 2010 May;21 Suppl 3:iii97–102.
189. Potti A, Dressman HK, Bild A, Riedel RF, Chan G, Sayer R, et al. Genomic signatures to guide the use of chemotherapeutics. *Nat Med.* 2006 Nov;12(11):1294–300.
 190. Powles TJ, Hickish TF, Makris A, Ashley SE, O'Brien ME, Tidy VA, et al. Randomized trial of chemoendocrine therapy started before or after surgery for treatment of primary breast cancer. *J Clin Oncol.* 1995 Mar;13(3):547–52.
 191. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010;12(5):R68.
 192. Prat A, Cheang MCU, Martín M, Parker JS, Carrasco E, Caballero R, et al. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. *J Clin Oncol.* 2013 Jan 10;31(2):203–9.
 193. Quinn JE, James CR, Stewart GE, Mulligan JM, White P, Chang GKF, et al. BRCA1 mRNA expression levels predict for overall survival in ovarian cancer after chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2007 Dec 15;13(24):7413–20.
 194. Rakha EA, El-Sheikh SE, Kandil MA, El-Sayed ME, Green AR, Ellis IO. Expression of BRCA1 protein in breast cancer and its prognostic significance. *Hum Pathol.* 2008 Jun;39(6):857–65.
 195. Ragaz J. Preoperative (neoadjuvant-PRE) versus postoperative (POST) adjuvant chemotherapy (CT) for stage I-II breast cancer (SI-II BC). Long-term analysis of British Columbia randomized trial (abstract 499). *Proc Am Soc Clin Oncol* 16:142a, 1997. *Proc Am Soc Clin Oncol.* 1997;16:142a.
 196. Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD, Geyer CE, Kahlenberg MS, Robidoux A, et al. Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. *J Clin Oncol.* 2008 Feb 10;26(5):778–85.
 197. Robert NJ, Diéras V, Glaspy J, Brufsky AM, Bondarenko I, Lipatov ON, et al. RIBBON-1: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab for first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative, locally recurrent or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2011 Apr 1;29(10):1252–60.
 198. Rockhill B, Weinberg CR, Newman B. Population attributable fraction estimation for established breast cancer risk factors: considering the issues of high prevalence and unmodifiability. *Am J Epidemiol.* 1998 May 1;147(9):826–33.

199. Rosell R, Skrzypski M, Jassem E, Taron M, Bartolucci R, Sanchez JJ, et al. BRCA1: a novel prognostic factor in resected non-small-cell lung cancer. *PLoS One*. 2007;2(11):e1129.
200. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2005 Aug 15;11(16):5678–85.
201. Rouzier R, Lajos P, Delaloge S, Gonzalez-Angulo A, Andre F, Hess KR et al. Nomograms to predict pathological complete response and metastasis-free survival after preoperative chemotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005 Nov 20;23(33):8331-8339.
202. Rutgers E, Piccart-Gebhart MJ, Bogaerts J, Delaloge S, Veer LV 't, Rubio IT, et al. The EORTC 10041/BIG 03-04 MINDACT trial is feasible: results of the pilot phase. *Eur J Cancer*. 2011 Dec;47(18):2742–9.
203. Saal LH, Holm K, Maurer M, Memeo L, Su T, Wang X, et al. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res*. 2005 Apr 1;65(7):2554–9.
204. Sakakibara-Konishi J, Oizumi S, Kikuchi J, Kikuchi E, Mizugaki H, Kinoshita I, et al. Expression of Bim, Noxa, and Puma in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*. 2012;12:286.
205. Sainaghi PP, Castello L, Bergamasco L, Galletti M, Bellosta P, Avanzi GC. Gas6 induces proliferation in prostate carcinoma cell lines expressing the Axl receptor. *J Cell Physiol*. 2005 Jul;204(1):36–44.
206. Sataloff DM, Mason BA, Prestipino AJ, Seinige UL, Lieber CP, Baloch Z. Pathologic response to induction chemotherapy in locally advanced carcinoma of the breast: a determinant of outcome. *J Am Coll Surg*. 1995 Mar;180(3):297–306.
207. Schairer C, Mink PJ, Carroll L, Devesa SS. Probabilities of death from breast cancer and other causes among female breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Sep 1;96(17):1311–21.
208. Schem C, Maass N, Bauerschlag DO, Carstensen MH, Löning T, Roder C, et al. One-step nucleic acid amplification—a molecular method for the detection of lymph node metastases in breast cancer patients; results of the German study group. *Virchows Arch Int J Pathol*. 2009 Feb;454(2):203–10.
209. Scholl SM. Neoadjuvant versus adjuvant chemotherapy in premenopausal patients with tumors considered too large for breast conserving surgery: Preliminary results of a randomised trial: S6. *Eur J Cancer*. 1994;30A(5):645–52.
210. Schneeweiss A, Huober J, Sinn H-P, von Fournier D, Rudlowski C, Beldermann F, et al. Gemcitabine, epirubicin and docetaxel as primary

- systemic therapy in patients with early breast cancer: results of a multicentre phase I/II study. *Eur J Cancer*. 2004 Nov;40(16):2432–8.
211. Schlotter CM, Vogt U, Allgayer H, Brandt B. Molecular targeted therapies for breast cancer treatment. *Breast Cancer Res*. 2008;10(4):211.
 212. Semiglazov VF, Topuzov EE, Bavli JL, Moiseyenko VM, Ivanova OA, Seleznev IK, et al. Primary (neoadjuvant) chemotherapy and radiotherapy compared with primary radiotherapy alone in stage IIb-IIIa breast cancer. *Ann Oncol*. 1994 Sep;5(7):591–5.
 213. Sentís M. Abstract European Congress of Radiology 2005.
 214. Shaik S, Nucera C, Inuzuka H, Gao D, Garnaas M, Frechette G, et al. SCF(β -TRCP) suppresses angiogenesis and thyroid cancer cell migration by promoting ubiquitination and destruction of VEGF receptor 2. *J Exp Med*. 2012 Jul 2;209(7):1289–307.
 215. Silver DP, Richardson AL, Eklund AC, Wang ZC, Szallasi Z, Li Q, et al. Efficacy of Neoadjuvant Cisplatin in Triple-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Mar 1;28(7):1145–53.
 216. Singletary SE. Rating the Risk Factors for Breast Cancer. *Ann Surg*. 2003 Apr;237(4):474–82.
 217. 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 Mar 15;20(6):1456–66.
 218. Smith EC, Ziogas A, Anton-Culver H. Delay in surgical treatment and survival after breast cancer diagnosis in young women by race/ethnicity. *JAMA Surg*. 2013 Jun;148(6):516–23.
 219. Snook KL, Layer GT, Jackson PA, de Vries CS, Shousha S, Sinnott HD, et al. Multicentre evaluation of intraoperative molecular analysis of sentinel lymph nodes in breast carcinoma. *Br J Surg*. 2011 Apr;98(4):527–35.
 220. Soerjomataram I, Louwman MWJ, Ribot JG, Roukema JA, Coebergh JWW. An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2008 Feb;107(3):309–30.
 221. Solá M, Alberro JA, Fraile M, Santesteban P, Ramos M, Fabregas R, et al. Complete axillary lymph node dissection versus clinical follow-up in breast cancer patients with sentinel node micrometastasis: final results from the multicenter clinical trial AATRM 048/13/2000. *Ann Surg Oncol*. 2013 Jan;20(1):120–7.
 222. Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 11;98(19):10869–74.

223. Sporn MB. The war on cancer. *The Lancet*. 1996 May;347(9012):1377–81.
224. Sun WS, Fujimoto J, Tamaya T. Coexpression of growth arrest-specific gene 6 and receptor tyrosine kinases Axl and Sky in human uterine endometrial cancers. *Ann Oncol*. 2003 Jun;14(6):898–906.
225. Sun T, Aceto N, Meerbrey KL, Kessler JD, Zhou C, Migliaccio I, et al. Activation of multiple proto-oncogenic tyrosine kinases in breast cancer via loss of the PTPN12 phosphatase. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):703–18.
226. 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 Oct 1;25(28):4414–22.
227. Talmadge JE, Fidler IJ. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res*. 2010 Jul 15;70(14):5649–69.
228. Tan MC, Al Mushawah F, Gao F, Aft RL, Gillanders WE, Eberlein TJ, et al. Predictors of complete pathological response after neoadjuvant systemic therapy for breast cancer. *Am J Surg*. 2009 Oct;198(4):520–5.
229. Tavassoli FA. General Considerations. *Pathology of the breast*. 2 edición. Stamford: Appleton and Lange; 1999.
230. Tavassoli FA. *Tumors of the breast and female genital organs. WHO classification of the tumors*. Lyon; 2003.
231. Toniolo P, Van Kappel AL, Akhmedkhanov A, Ferrari P, Kato I, Shore RE, et al. Serum carotenoids and breast cancer. *Am J Epidemiol*. 2001 Jun 15;153(12):1142–7.
232. Tresserra F, Martínez MA. Factores pronósticos en el cáncer de mama. Parte I Factores morfológicos. *Rev Senología Patol Mam*, 2008;21:170-4.
233. Tresserra F, Ardiaca C, Vázquez S. *Manual de práctica clínica en Senología*. SESPMP, 2012; capítulo 12
234. Tresserra F, Martínez MÁ, González-Cao M, Rodríguez I, Viteri S, Baulies S, et al. Respuesta patológica a la quimioterapia neoadyuvante: correlación entre 2 sistemas de gradación histológica. *Rev Senol Patol Mamar*. 2013; 26(3):77-84.
235. Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, Kaneko T, Iwase T, Akiyama F, et al. One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2007 Aug 15;13(16):4807–16.
236. Tufail R, Jorda M, Zhao W, Reis I, Nawaz Z. Loss of Yes-associated protein (YAP) expression is associated with estrogen and progesterone receptors negativity in invasive breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Feb;131(3):743–50.

237. Turner N, Pearson A, Sharpe R, Lambros M, Geyer F, Lopez-Garcia MA, et al. FGFR1 amplification drives endocrine therapy resistance and is a therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res.* 2010 Mar 1;70(5):2085–94.
238. Tubiana-Hulin M, Stevens D, Lasry S, Guinebretière JM, Bouita L, Cohen-Solal C, et al. Response to neoadjuvant chemotherapy in lobular and ductal breast carcinomas: a retrospective study on 860 patients from one institution. *Ann Oncol.* 2006 Aug;17(8):1228–33.
239. Untch M, Rezai M, Loibl S, Fasching PA, Huober J, Tesch H, et al. Neoadjuvant treatment with trastuzumab in HER2-positive breast cancer: results from the GeparQuattro study. *J Clin Oncol.* 2010 Apr 20;28(12):2024–31.
240. Untch M, Loibl S, Bischoff J, Eidtmann H, Kaufmann M, Blohmer J-U, et al. Lapatinib versus trastuzumab in combination with neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy (GeparQuinto, GBG 44): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012 Feb;13(2):135–44.
241. U.S. Department of Health and Human Services.: The Health Consequences of Smoking: A Report of the Surgeon General. Atlanta, Ga: U.S. Department of Health and Human Services, CDC, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health.
242. Valtorta E, Misale S, Sartore-Bianchi A, Nagtegaal ID, Paraf F, Lauricella C, et al. KRAS gene amplification in colorectal cancer and impact on response to EGFR-targeted therapy. *Int J Cancer.* 2013 Sep 1;133(5):1259–65.
243. Van der Hage JA, van de Velde CJ, Julien JP, Tubiana-Hulin M, Vandervelden C, Duchateau L. Preoperative chemotherapy in primary operable breast cancer: results from the European Organization for Research and Treatment of Cancer trial 10902. *J Clin Oncol.* 2001 Nov 15;19(22):4224–37.
244. Van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AAM, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature.* 2002 Jan 31;415(6871):530–6.
245. Van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AAM, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med.* 2002 Dec 19;347(25):1999–2009.
246. Vargo JA, Beriwal S, Ahrendt GM, Soran A, Johnson RR, McGuire K, et al. Molecular class as a predictor of locoregional and distant recurrence in the neoadjuvant setting for breast cancer. *Oncology.* 2011;80(5-6):341–9.
247. Verdecchia A, Francisci S, Brenner H, Gatta G, Micheli A, Mangone L, et al. Recent cancer survival in Europe: a 2000-02 period analysis of EURO CARE-4 data. *Lancet Oncol.* 2007 Sep;8(9):784–96.

248. Veeck J, Esteller M. Breast cancer epigenetics: from DNA methylation to microRNAs. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2010 Mar;15(1):5–17.
249. Vendrell JA, Thollet A, Nguyen NT, Ghayad SE, Vinot S, Bièche I, et al. ZNF217 is a marker of poor prognosis in breast cancer that drives epithelial-mesenchymal transition and invasion. *Cancer Res*. 2012 Jul 15;72(14):3593–606.
250. Viale G, Giobbie-Hurder A, Regan MM, Coates AS, Mastropasqua MG, Dell'Orto P, et al. Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki-67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from Breast International Group Trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole. *J Clin Oncol*. 2008 Dec 1;26(34):5569–75.
251. Vincent-Salomon A, Rousseau A, Jouve M, Beuzeboc P, Sigal-Zafrani B, Fréneaux P, et al. Proliferation markers predictive of the pathological response and disease outcome of patients with breast carcinomas treated by anthracycline-based preoperative chemotherapy. *Eur J Cancer*. 2004 Jul;40(10):1502–8.
252. Virchow R. Cellular pathologie. Berlin: Hirschwald A, editor.; 1858.
253. Von Minckwitz G, Raab G, Caputo A, Schütte M, Hilfrich J, Blohmer JU, et al. Doxorubicin with cyclophosphamide followed by docetaxel every 21 days compared with doxorubicin and docetaxel every 14 days as preoperative treatment in operable breast cancer: the GEPARDUO study of the German Breast Group. *J Clin Oncol*. 2005 Apr 20;23(12):2676–85.
254. Von Minckwitz G, Eidtmann H, Rezai M, Fasching PA, Tesch H, Eggemann H, et al. Neoadjuvant chemotherapy and bevacizumab for HER2-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2012 Jan 26;366(4):299–309.
255. Von Minckwitz G, Untch M, Blohmer J-U, Costa SD, Eidtmann H, Fasching PA, et al. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. 2012 May 20;30(15):1796–804.
256. Von Minckwitz G, Schmitt WD, Loibl S, Müller BM, Blohmer JU, Sinn BV, et al. Ki67 Measured after Neoadjuvant Chemotherapy for Primary Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 2013 Aug 15;19(16):4521–31.
257. Wang L, Zhang Q, Zhang J, Sun S, Guo H, Jia Z, et al. PI3K pathway activation results in low efficacy of both trastuzumab and lapatinib. *BMC Cancer*. 2011;11:248.
258. Weigman VJ, Chao H-H, Shabalin AA, He X, Parker JS, Nordgard SH, et al. Basal-like Breast cancer DNA copy number losses identify genes involved in genomic instability, response to therapy, and patient survival. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Jun;133(3):865–80.

259. Wang B, Matsuoka S, Ballif BA, Zhang D, Smogorzewska A, Gygi SP, et al. Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response. *Science*. 2007 May 25;316(5828):1194–8.
260. Weidner N. Prognostic factors in breast carcinoma. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 1995 Feb;7(1):4–9.
261. Woodhams R, Kakita S, Hata H, Iwabuchi K, Kuranami M, Gautam S, et al. Identification of residual breast carcinoma following neoadjuvant chemotherapy: diffusion-weighted imaging--comparison with contrast-enhanced MR imaging and pathologic findings. *Radiology*. 2010 Feb;254(2):357–66.
262. Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007 Jan 1;25(1):118–45.
263. Wong H, Lau S, Yau T, Cheung P, Epstein RJ. Presence of an in situ component is associated with reduced biological aggressiveness of size-matched invasive breast cancer. *Br J Cancer*. 2010 Apr 27;102(9):1391–6.
264. Wolmark N, Wang J, Mamounas E, Bryant J, Fisher B. 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.
265. Xu J, Reumers J, Couceiro JR, De Smet F, Gallardo R, Rudyak S, et al. Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors. *Nat Chem Biol*. 2011 May;7(5):285–95.
266. Yang H, Kong W, He L, Zhao J-J, O'Donnell JD, Wang J, et al. MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN. *Cancer Res*. 2008 Jan 15;68(2):425–33.
267. Yan J, Kim Y-S, Yang X-P, Albers M, Koegl M, Jetten AM. Ubiquitin-interaction motifs of RAP80 are critical in its regulation of estrogen receptor alpha. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(5):1673–86.
268. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*. 2008 Sep 18;27(41):5497–510.
269. Zhang S, Chen L, Cui B, Chuang H-Y, Yu J, Wang-Rodriguez J, et al. ROR1 is expressed in human breast cancer and associated with enhanced tumor-cell growth. *PLoS One*. 2012;7(3):e31127.
270. Zhao B, Li L, Tumaneng K, Wang C-Y, Guan K-L. A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP). *Genes Dev*. 2010 Jan 1;24(1):72–85.

10. ABREVIATURAS

- AC adriamicina ciclofosfamida
- AD: doxorrubicina y docetaxel
- AJCC: American Joint Committee on Cancer
- ASCO: American Society of Clinical Oncology
- BAG: biopsia con aguja gruesa
- BAV: biopsia asistida por vacío
- BPP: biopsia por punción
- BSGC: biopsia selectiva del ganglio centinela
- CDA: coeficiente de difusión aparente
- CDI: carcinoma ductal infiltrante
- CGOM: Comité de Ginecología Oncológica y Patología Mamaria
- CLI: carcinoma lobulillar infiltrante
- CMF: ciclofosfamida, metotrexate, 5-FU
- CTA: células tumorales aisladas
- DES: dietilestilbestrol
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico
- EUROCARE: European Cancer Registries Study on cancer Patients survival
- FGF: factores de crecimiento de fibroblastos
- FGFR1: fibroblast growth factor receptor 1
- FEC: 5-fluororacilo-epirrubicina-ciclofosfamida
- FISH: Hibridación fluorescente in situ
- GC: ganglio centinela
- HR: hartz ratio
- IMC: índice de masa corpuscular
- IVL: invasión linfovascular
- LA: linfadenectomía axilar
- mRNA: RNA mensajero
- MyP: Miller y Payne.
- MMM: metotrexate, mitoxantrona +/- mitomicina
- NCCN: National Comprehensive Cancer Network
- OSNA: One-step-nucleic acid amplification
- PAAF: punción-aspiración con aguja fina
- PAs: Activadores del plasminógeno

- pCR: respuesta patológica completa
- QT: quimioterapia
- QNA: quimioterapia neoadyuvante
- RCB: residual cáncer burden
- RE: receptores de estrógeno
- RP: receptores progesterona
- RH: receptores hormonales
- RMN: resonancia magnética nuclear
- Roll: radioguided occult lesión localization
- RP: receptores de progesterona
- RR: riesgo relativo
- RS: recurrence score
- SEER: Surveillance, Epidemiology and End Results
- SG: supervivencia global
- SLE: supervivencia libre de enfermedad
- TAC: docetaxel-adriamicina-ciclofosfamida
- TN: triple negativo
- TP53: tumor protein p53
- WHO: World Health Organization
- VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

11. SUMMARY

PREDICTIVE FACTORS OF RESPONSE TO NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY IN BREAST CANCER

INTRODUCTION

Chemotherapy in breast cancer has clearly improved overall survival, whether it is administered before or after primary tumor surgery (1). The NSABP B-18 trial showed that neoadjuvant chemotherapy treatment (NAC) increased the rate of breast conserving surgery by tumor downstaging compared with adjuvant treatment, keeping the benefit in terms of survival (2). Beyond the clinical benefits, NAC represents an opportunity to study and evaluate the “in vivo” tumor biology and chemosensitivity.

Pathological complete response (pCR) has become an end point for clinical research in neoadjuvant settings. Several studies have showed a strong correlation between pCR after NAC and prognosis. Patients who achieve a pCR have better outcome than patients who do not (3-5). Therefore, there is an increasingly interest in identifying factors associated with the presence or absence of pCR. Classical pathological characteristics such as tumor histology, tumor grade, lymph node involvement and hormone receptor and Her2 status have been associated with response to NAC.

Gene expression profiling has shown that breast cancer is a heterogeneous disease. There is a great diversity within tumors that determines different molecular tumor profiles, with different chemosensitivity and different outcomes (6). Rouzier et al. described that breast cancer molecular subtypes responded differently to NAC. The basal-like and positive-HER2 tumors had 45% of pCR, whereas the luminal tumors had a 6% rate ($p < 0.001$) (7).

During the last years the concept of molecular biology has revolutionized our understanding of carcinogenesis. Tumor biology implies biological mechanisms at different steps, which requires the involvement of several signalling pathways interconnected and can influence the response to treatment. The 3 main regulatory pathways in breast cancer are: Ras/Raf/MAPK, Jak/Stat and PI3K/Akt/mTOR. All them regulate cell growth and survival, proliferation, division and apoptosis (8). This knowledge has enabled to understand that

breast cancer disease is specific to each patient, and thus, apply more personalized therapies.

Recent studies reported that alterations in microRNA expression could be involved in tumor resistance to current therapies. This implies a role of microRNA as predictive biomarkers, and their regulation in tumor cells may be useful for improving the response to treatment (9,10). For example, in advanced colon cancer it is important to know the presence of KRAS mutation to indicate a proper treatment and in non-small cell lung cancer the presence of activating mutations in the EGFR gene.

It's suggested that the genes involved in sensitivity/resistance to treatment are expressed differently in each tumor subtype (11, 12). Tumors with identical pathological features but driven by different biological signalling pathways can have different responses to NAC. For example, mTOR and PI3K pathway have been associated with response to taxanes, while genes involved in DNA repair (bcl2, ERCC4) were related to resistance to anthracyclines (13-15).

Based on these findings, gene expression parameters have been investigated for their association with molecular tumor subtypes and chemosensitivity to identify potential surrogate markers for prognostic assessment and “targeted” therapy.

In the present study, we investigated 13 promising expression genes in a well characterized cohort of patients treated by NAC. We aimed to analyse the value of certain surrogate factors (BRCA, RAP80, FGFR1, GAS6, AXL, YAP, BTRCP, PTPN12, EZH2, HIF-1alpha, BIM, ROR1, ZNF217) for their ability to predict specific breast cancer subtype, pCR, risk of recurrence and outcome.

PATIENTS AND METHODS

We recorded the experience of NAC in our single center from January 2000 to January 2011, a consecutive serie of 129 patients were selected from our prospective Breast Cancer Database. From the entire cohort, we analyzed tumor pretherapeutic core biopsies for a gene expression profiling data in 92 patients (Figure 1). Patients were diagnosed with T1c-T4/N0-N1 tumors and were considered to be candidates for neoadjuvant therapy according to the decision of the Breast Cancer Committee of our institution. Patients with metastatic

disease, bilateral breast cancer or male breast cancer were excluded. The study was approved by the Ethics Committee of our institution.

Clinical and pathological data such as patient age, tumor size, lymph node involvement, histological type, histological tumor grade, hormone receptor (HR) and HER2 status were collected. Pretreatment tumor size was assessed by clinical examination and radiographic measurements. Correlation with specific tumor subtypes, pathological response and long-term outcome were analyzed according to gene expression levels.

- Treatment and pathological assessment

An anthracycline with or without taxane-based scheme was used. Since 2006, trastuzumab was added to neoadjuvant treatment positive-HER2 patients (the treatment was stopped at the time of surgery and restarted as adjuvant line, with a 1-year duration). All drugs were administered intravenously.

Patients underwent either mastectomy or breast-conservative surgery depending on tumor response to NAC. After surgery, adjuvant treatment (breast radiotherapy, regional nodal radiation, hormonotherapy and adjuvant chemotherapy) was given according to our treatment guidelines.

Pathological response was assessed in postchemotherapy surgical specimens according to the Miller and Payne classification (MP) (16). All tumor specimens were reviewed again by an expert pathologist to sort by MP scale.

- Immunohistochemical staining and definition of tumor subtypes

Hormone receptor status, HER2 status and Ki67 value were analysed on pretreatment core biopsies.

Determination of estrogen receptors (ER) (clone 6F11, Novocastra 1/200, UK), progesterone receptors (PR) (clone 1A6, Novocastra 1/200, UK) and Her2 (Clone CB11, Oracle, Leica Biosystems ®, USA) was performed by immunohistochemistry using in all cases the manufacturer's pre-diluted antibody. ER and PR were considered positive according to standardized guidelines using a cut-off of $\geq 10\%$ of stained tumor cells nuclei. Positive HER2 was considered as strong overexpression (3+) or weakly overexpression (2+) if FISH technique (HER-2 DNA PathVysion®, Abbott ®, Illinois, USA) was positive. All other staining patterns were interpreted as negative (0/1+).

Ki67 was assessed by immunohistochemistry using MIB1 antibodies. Ki67 value was defined as low <14% and high \geq 14%.

Molecular tumor subtypes were categorized according to the new immunohistochemistry correlation published by Prat et al. (17): luminal A (ER positive/PR>20%/HER2 negative/ Ki67<14%), luminal B/HER2- (ER+/PR<20%/HER2-/Ki67>14%), luminal B/HER2+ (ER+/PR+/HER2+), positive-HER2 (ER-/PR-/HER2+) and triple negative (ER-/PR-/HER2-).

- Analysis of gene expression profiles

Intratumoral mRNA expression levels were assessed in a total of 92 pretherapeutic biopsies for whom sufficient tumor tissue was available. The following genes were analysed: BRCA, RAP80, FGFR1, GAS6, AXL, YAP, BTRCP, PTPN12, EZH2, HIF-1 α , BIM, ROR1, ZNF217.

Samples stained were evaluated and analysed by two responsible pathologists (Hospital Universitari Quirón Dexeus and Pangaea Biotech Oncology Laboratory, Barcelona, Spain). A quantitative (tumor infiltration, stroma, necrosis and inflammatory infiltration rates) and qualitative assessment was performed. The microRNA material was considered insufficient with <5% of tumor-infiltrating, low when tumor cell rate was between 5%-20% and appropriate sample>20%. For the molecular determination only appropriate samples were processed.

Total RNA was extracted from paraffin-embedded tumor tissue after laser-capture microdissection that ensured a minimum of 90% of tumor cells. After deparaffinization with standard xylene and alcohol process, samples were subjected to lysis in a buffer containing tris-chloride, EDTA, sodium dodecyl sulphate, and proteinase K. RNA was then extracted with phenol- chlorophorm-isoamyl alcohol followed by precipitation with isopropanol in the presence of glycogen and sodium acetate. RNA was resuspended in DEPC water (Ambion Inc., Austin, TX) and treated with DNase I to avoid DNA contamination.

cDNA was synthesized using M-MLV reverse transcriptase enzyme. Subsequently, the cDNA was amplified using a PCR and Taqman real-time sequence with primers and probes for each gene. Relative gene expression quantification were calculated according to the comparative Ct method using β -actin as an endogenous control and commercial RNA controls (Liver and Lung;

Stratagene, La Jolla, CA USA) as calibrators. Gene expression will be profiled in triplicate for each gene. The primer and probe sets were designed using Primer Express 2.0 Software (AB). Gene expression was quantified by using the ABI Prism 7900HT Sequence Detection System from Applied Biosystems ®. For gene expression characterization of BTRCP, HIF1a, FNF217, BIM and EZH2, 20X commercial assays were used instead of designing primers and probes.

- Statistical analysis

The description of quantitative variables and mRNA gene expression was performed using mean, median and range. In order to provide an easily interpretable evaluation of the effect of mRNA expression, gene levels were divided into median and terciles. The qualitative variables were presented by means of the description of proportions.

Quantitative variables were compared with Wilcoxon Mann-Whitney or Student's t-test, and categorical variables were analyzed with either the Pearson chi-square or Fisher's exact test. Survival was estimated using Kaplan-Meier curves, and differences were determined by log-rank test.

The following variables were used as predictive and prognostic factors to NAC: hormone receptor status, T stage, lymph node involvement, age, histologic grade, tumor subtype and gene modules. An univariate analysis was performed for each of the variables by using the log-rank test. Subsequently, a multivariate analysis was performed to assess the associated value by using the Cox proportional hazards model.

All statistical analysis were performed using the IBM SPSS Statistics 20.0 program. All tests were two-sided and the significance level was set at 0.05.

RESULTS

Patient characteristics

Patient and tumor characteristics for the entire cohort (129 patients) and for the 92 cases in whom gene expression analysis was performed are shown in Table 1. Clinicopathological data was similar across the groups.

In the entire cohort, the mean age at diagnosis was 47.48 years \pm 8.9 (range, 31-73). The majority of the patients were premenopausal (87 patients, 67.4%). Median tumor size was 3.2cm (range, 0-8) by ultrasound and 3.66cm (range, 1-8.5) by MRI. At diagnosis, 8 patients (6%) had a T1c tumor, 85 (66%) T2 stage, 17 (13%) a T3 stage and 19 (15%) a T4 tumor. Lymph node involvement was found in 79 patients (61%). The vast majority of tumors were invasive ductal carcinoma (116 cases, 91%), graded II or III (78 cases, 62%), positive-hormone receptors (105 patients, 78%) and negative HER2 status (85 patients, 66%).

After chemotherapy, all patients underwent surgical treatment: lumpectomy was performed in 74 patients (57%) and mastectomy in 55 patients (43%). The tumor subtypes based on HR and HER2 status were as follows: 71 patients (55%) had HR positive/HER2 negative tumors, 44 (34%) HER2 positive and 14 (11%) patients had triple negative tumors.

Based on ER, PR, HER2 status and Ki67%, the 92 patients from tissue microarray group were classified as luminal A (23 patients, 25%), luminal B/HER2- (30 patients, 32%), luminal B/HER2+ (21 patients, 23%), HER2+/HR- (7 patients, 8%) and triple negative (11 patients, 12%) (Table 1).

Predictive factors associated with pathological response

A pCR (MyP 5) was achieved in 38 patients (29.5%), and a good response (MyP 4/5) in 64 patients (50%).

The univariate analysis showed progesterone receptors ($p=0.014$), estrogen receptors ($p=0.05$), HER2 status ($p=0.008$) and tumor subtype ($p=0.022$) as predictive factors for pathological response (Table 2). A forward multivariate analysis was performed and identified that the only significant factor associated with pathological response was tumor subtype, with positive-HER2 tumors responding best, OR 3.73 (1.52-9.13, $p=0.004$). The initial tumor size

and histological grade were not an independent predictive factor for pathologic response (Table 3).

Survival and prognostic factors

The median follow-up was 40 months (range, 10-144 months). Five-year DFS in patients with response (MyP 4/5) was 88% and 55% in non-responders (MyP 1-3) ($p=0.06$). Triple-negative tumors showed poorer survival than positive-HR tumors and HER2 positive tumors, 5-y DFS in each subtype was 60%, 80% and 82% respectively ($p=0.42$).

The prognostic impact of pathologic response was most important in triple-negative tumors ($p = 0.035$). Five year-DFS adjusted by tumor subtype and MyP response was 50% HER2+/non-response, 82% HER+/response ($p=0.31$), 68% HR+/HER2-/non-response, 85% HR+/HER2-/response ($p=0.39$), 25% triple negative/non-response, and 100% triple negative/response ($p=0.03$).

The multivariate analysis identified the following associated prognostic factors related to disease progression: pathologic response (OR 0.069, 95% CI 0.008-0.59, $p=0.015$), positive-HR (OR 0.242, 95% CI 0.086-0.684, $p=0.007$), lymph node involvement (OR 3.33, 95% CI 1.26-8.76, $p=0.015$), MyP 1-3/negative-HR (OR 11.05, 95% CI 1.09-111.486, $p=0.043$) (Table 4).

Gene expression analysis

Median and percentiles of mRNA expression for each gene were calculated in the 92 samples assessed (Supplementary Table S1).

-Gene expression associated with molecular tumor subtype

There was a significant correlation of mRNA expression data calculated according to tumor subtypes for certain genes (Table 5).

In positive-HR tumors compared to negative-HR tumors high levels of the following genes were observed: AXL (>median level in 59% vs 15%, $p=0.006$), FGFR1 (>median level in 58% vs 15%, $p=0.006$), RAP80 (high-intermediate tercile in 54% vs 25%, $p=0.007$), GAS6 (>median level 56% vs 25%, $p=0.05$), BTRCP (>median level in 60% vs 9%, $p=0.003$) and ZNF217 (high tercile in 42% vs 0%, $p=0.005$).

When we analysed gene modules within luminal tumors (excluding positive-HER2 tumors) in relation to non-luminals (HER2 and triple negative tumors) we found statistically differences: RAP 80 (high tercile in 24% HR+/HER2- tumors, 27% in HER2+ and 70% in triple negative, $p=0.022$), FGFR1 (high levels in 62%, 44% and 10%, respectively, $p=0.012$), BTRCP (high tercile in 48%, 14% and 12%, $p=0.013$), ZNF12 (high tercile in 46%, 28% and 0%, $p=0.016$) and PTPN12 (high-intermediate tercile in 82%, 44% and 50%, $p=0.011$) (Table 5).

In the luminal A tumors versus non-luminal A tumors, the univariate analysis showed high levels for the following genes: AXL ($p=0.017$), FGFR1 ($p=0.022$), YAP ($p=0.003$), GAS6 ($p=0.05$), BTRCP ($p=0.003$), PTPN12 ($p=0.029$). Low levels of ZNF217 ($p=0.016$) and RAP80 ($p=0.004$) were found in HER2+/HR- and triple negative tumors (Table 6).

No statistically significant differences were observed among the groups defined by immunohistochemistry for: BRCA1 ($p=0.16$), BIM ($p=0.38$), EZH2 ($p=0.3$), ROR1 ($p=0.47$), HIF1alpha ($p=0.13$).

-Gene expression associated with pCR

Univariate associations between gene expressions and pCR are presented in Table 6. We observed a significant correlation for 4 genes: AXL (high levels predicted non-pCR, $p=0.03$), FGFR1 (high levels predicted non-pCR, $p=0.018$), YAP (low tercile predicted pCR, $p=0.023$), BRCA1 (low tercile predicted pCR, $p=0.027$).

We also evaluated interactions for gene expression to predict pCR adjusted by tumor subtypes, but no significant association was found.

-Gene expression associated with prognosis

In the analysis for survival, low levels of FGFR1 and HIFalpha presented a longer OS ($p=0.043$ and $p=0.07$, respectively), high levels of BTRCP were associated with a lower risk of relapse and longer survival ($p=0.06$ and $p=0.049$, respectively) (Figure 2).

DISCUSSION

Breast cancer presents a great intertumoral heterogeneity and not all tumors have the same chemosensitivity. The identification and application of specific predictive factors in pretreatment biopsies will help ensure that only those patients who really benefit receive appropriate treatment. In our series, although tumors with high histologic grade, invasive ductal carcinoma, negative hormone receptor status and positive HER2 status tended to achieve a good response, the only associated predictor for pCR was tumor subtype, presenting positive-HER2 tumors best response. Similar to other studies, our results support the idea that pCR is more strongly related to tumor subtypes, rather than tumor pathological features (8, 18, 19).

Pathological complete response is considered a surrogate marker for prognosis. Minckwitz et al. clearly showed that pCR was associated with long-term outcome in HER2 and triple negative tumors, but not in luminal A subgroups (18). Conversely, our data showed that all patients who achieved a good response presented a better outcome regardless tumor subtype. This findings are in agreement with Cortazar et al. who demonstrated pCR provided a better prognosis, even in the luminal subset (20). In the multivariate analysis including the entire cohort, pathologic response, lymph node involvement and HR status were associated factors for progression disease.

Today, clinical and classical pathological factors are still used to predict pCR in routine practice (21). But all these predictors are not specific tumor subtype or chemotherapy regimen given. It is well known that cell cycle is controlled by the balance of different oncogenes, tumor suppressor genes and genes responsible for DNA repair. Mutations at this level can cause a dysregulation of the cell signalling pathways promoting the carcinogenesis. Therefore, a molecular approach could identify more specific predictive markers. The assessment of specific over- and under-expressed genes not only allows the identification of tumor biology beyond HR and HER2 status but also the selection of a targeted therapy.

According to Rouzier et al. differences in terms of chemosensitivity and prognosis are related to differences in molecular profile, so it is suggested that genes involved in chemosensitivity can be expressed differently in each tumor

subtype (7, 11, 22). In our serie, we found a different gene distribution by tumor subtypes (Figure 3). Similarly to findings reported by Littlepage et al., we found high ZNF217 mRNA levels in positive-HR tumors, and a low expression in triple negative tumors (23).

The genes AXL, FGFR1, RAP80, GAS6, BTRCP were overexpressed in positive-HR tumors. These data correlate with those found in other type of tumors (22-26). For example, AXL and GAS6 overexpression has been found in endometrial and prostate carcinomas which are hormone-sensitive tumors (27, 28). It becomes important as these genes also have a thombotic effect, and this subgroup of patients already present an increased risk of thrombosis due to tamoxifen and chemotherapy. So a targeted treatment blocking AXL and GAS6 could benefit these patients by reducing the risk of thrombosis (29).

In current practice the analysis of certain genes (AXL, FGFR1, YAP, BTRCP, PTPN12) could help identify more specifically the different molecular subtypes. We clearly determined high levels of FGFR1, PTPN12, and BTRCP in luminal tumors versus non-luminal tumors. In contrast, triple negative and HER2+/HR- tumors were associated with low RAP80 mRNA levels.

YAP overexpression was found in 93% of luminal A tumors versus 38% in luminal B/HER2- tumors (p=0.003). YAP is considered an ER and PR coactivator, and it is understandably that a reduced expression of YAP is significantly associated with negative-HR tumors (30). Moreover, our results confirmed that YAP levels were also inversely correlated with the overexpression of HER2, having HER2 positive tumors low YAP mRNA levels.

Several studies have reported the importance of BRCA1 in DNA repair and its implication in sporadic breast cancer by "dysfunction". A low expression of BRCA1 and RAP80 have been associated with high-grade carcinomas which do not express hormone receptors or HER2 (31, 32). In our series, the correlation with RAP80 was observed, but, however, no differences were found in relation to BRCA1 levels.

If an heterogeneity in the distribution of genes is observed, these genes are also likely to correlate with different patterns of response. Ignatiadis M et al., with the largest series published to date (996 patients and 17 genes studied) showed that different molecular pathways were associated with pCR in different

molecular subtypes (11). Our analysis also intended to explore the association in the gene expression studied and an increased pCR.

We identified that low BRCA1 levels were predictors of pCR. Although the prognosis impact of BRCA1 in breast cancer has been largely identified in clinical studies, its predictive value has been little studied. We know BRCA1 is a tumor suppressor gene which is involved in DNA repair. Consequently, BRCA over- or under-expression may have a significant effect on NAC response and a predictive value in patients treated with DNA-damaging agents, such as anthracyclines and cisplatin (33, 34). However, controversial data still exists. Nakai et al., by analyzing 32 tumor samples, failed to correlate BRCA levels with pCR. These findings are in contrast with those presented by preclinical models, Margely et al. and our serie (53% of pCR in low BRCA level tumors, $p=0.027$).

Moreover, a high expression of AXL and YAP were associated with a poor response. Negative FGFR1 tumors diagnosed by immunohistochemistry has been suggested to be associated with lower pCR (35). Here, we observed an inverse association, high expression predicted a poor response. Our results are in relation to the distribution of these genes by molecular subtype, since all of them were found overexpressed in luminal tumors which are associated with a poor chemosensitivity.

High FGFR1 levels have been associated with luminal tumors, but we correlated them with a non-pCR and poor outcome. Overexpression of FGFR1 have been associated with luminal tumors but we correlated it with non-pCR and poor outcome, probably due to a chemoresistance. In lung cancer, it has been suggested that tumors with amplification of FGFR1 present a poor DFS and high recurrence risk (36). In breast cancer, such overexpression might promote resistance to endocrine therapy through a progesterone receptor suppression (25).

By contrast, there is little information about BTRCP gene, and it is still unclear its role as a prognostic factor. Some studies have reported high levels of BTRCP might block VEGFR2 and decrease the angiogenesis process, so it could be a marker of good prognosis (37). In our series, the overexpression was correlated with a better OS and DFS. In the same line of regulation HIF gene could act. The adaptation to hypoxia is vital for tumor progression, and cell

response to hypoxia is mediated by HIF1. It stimulates the angiogenesis so an overexpression is associated with an adverse outcome. In our study, high levels presented a poorer OS (38).

Our study has some limitations. It does not include a complete homogeneous neoadjuvant treatment (anthracycline-based neoadjuvant regimen with or without taxans), although 71% of patients received an anthracycline/taxan-based chemotherapy. Furthermore, some HER2-positive patients did not received neoadjuvant trastuzumab.

Despite these limitations, our data suggest the study of tumor biology by different molecular markers through NAC may be useful in clinical practice to define specific tumor subtypes with different chemosensitivity and prognosis. But further larger prospective studies are needed to validate their prognostic and predictive role.

REFERENCES

1. 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 randomised trials. *Lancet*. 2005 May 14;365(9472):1687–717.
2. Wolmark N, Wang J, Mamounas E, Bryant J, Fisher B. 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.
3. Galow JR, Burstein HJ, Wood W, Hortobagyi GN, Gianni L, von Minckwitz G, et al. Preoperative therapy in invasive breast cancer: pathologic assessment and systemic therapy issues in operable disease. *J Clin Oncol*. 2008 Feb 10;26(5):814–9.
4. 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 Oct 1;25(28):4414–22.
5. Von Minckwitz G, Untch M, Blohmer J-U, Costa SD, Eidtmann H, Fasching PA, et al. Definition and impact of pathologic complete response on

- prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. 2012 May 20;30(15):1796–804.
6. Polyak K. Heterogeneity in breast cancer. *J Clin Invest* 2011; 121:3786-3788.
 7. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2005 Aug 15;11(16):5678–85.
 8. Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2005 Dec;4(12):988-1004. Review.
 9. Hwang J-H, Voortman J, Giovannetti E, Steinberg SM, Leon LG, Kim Y-T, et al. Identification of microRNA-21 as a biomarker for chemoresistance and clinical outcome following adjuvant therapy in resectable pancreatic cancer. *PloS One*. 2010;5(5):e10630.
 10. Yang H, Kong W, He L, Zhao J-J, O'Donnell JD, Wang J, et al. MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN. *Cancer Res*. 2008 Jan 15;68(2):425–33.
 11. Ignatiadis M, Singhal SK, Desmedt C, Haibe-Kains B, Criscitiello C, Andre F, et al. Gene modules and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer subtypes: a pooled analysis. *J Clin Oncol*. 2012 Jun 1;30(16):1996–2004.
 12. Krijgsman O, Roepman P, Zwart W et al. A diagnostic gene profile for molecular subtyping of breast cancer associated with treatment response. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 133: 37-47.
 13. Chang JC, Eric C. Wooten, Anna Tsimelzon et al. Patterns of Resistance and Incomplete Response to Docetaxel by Gene Expression Profiling in Breast Cancer Patients. *J Clin Oncol* 2005; 23:1169
 14. Anil Potti, Holly K Dressman, Andrea Bild et al. Genomic signatures to guide the use of chemotherapeutics. *Nature Med* 2006; 12:1294-1300
 15. Hansen RK, Parra I, Lemieux P et al. Hsp27 overexpression inhibits doxorubicin-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 56:187-196.
 16. 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 Oct;12(5):320–7.
17. Prat A, Cheang MCU, Martín M, Parker JS, Carrasco E, Caballero R, et al. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. *J Clin Oncol*. 2013 Jan 10;31(2):203–9.
 18. Von Minckwitz G, Untch M, Blohmer J-U, Costa SD, Eidtmann H, Fasching PA, et al. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. 2012 May 20;30(15):1796–804.
 19. Houssami N, Macaskill P, Von Minckwitz G et al. Meta-analysis of the association of breast cancer subtype and pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy. *European J Cancer* 2012; 48: 3342-3354.
 20. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino J, Wolmark N et al. Meta-analysis Results from the Collaborative Trials in Neoadjuvant Breast Cancer (CTNeoBC). *Cancer Res*. 2012; 72(24):14–20.
 21. Rouzier R, Lajos P, Delaloge S, Gonzalez-Angulo A, Andre F, Hess KR et al. Nomograms to predict pathological complete response and metastasis-free survival after preoperative chemotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005 Nov 20;23(33):8331-8339.
 22. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Mar 10;26(8):1275–81.
 23. Littlepage LE, Adler AS, Kouros-Mehr H, Huang G, Chou J, Krig SR, et al. The transcription factor ZNF217 is a prognostic biomarker and therapeutic target during breast cancer progression. *Cancer Discov*. 2012 Jul;2(7):638–51.
 24. Brunello E, Brunelli M, Bogina G, Caliò A, Manfrin E, Nottegar A, et al. FGFR-1 amplification in metastatic lymph-nodal and haematogenous lobular breast carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2012;31:103.
 25. Turner N, Pearson A, Sharpe R, Lambros M, Geyer F, Lopez-Garcia MA, et al. FGFR1 amplification drives endocrine therapy resistance and is a therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res*. 2010 Mar 1;70(5):2085–94.

26. Mackiewicz M, Huppi K, Pitt JJ, Dorsey TH, Ambs S, Caplen NJ. Identification of the receptor tyrosine kinase AXL in breast cancer as a target for the human miR-34a microRNA. *Breast Cancer Res Treat.* 2011 Nov;130(2):663–79.
27. Sun WS, Fujimoto J, Tamaya T. Coexpression of growth arrest-specific gene 6 and receptor tyrosine kinases Axl and Sky in human uterine endometrial cancers. *Ann Oncol.* 2003 Jun;14(6):898–906.
28. Sainaghi PP, Castello L, Bergamasco L, Galletti M, Bellosta P, Avanzi GC. Gas6 induces proliferation in prostate carcinoma cell lines expressing the Axl receptor. *J Cell Physiol.* 2005 Jul;204(1):36–44.
29. Mc Cormack O, Chung WY, Fitzpatrick P, Cooke F, Flynn B, Harrison M, et al. Growth arrest-specific gene 6 expression in human breast cancer. *Br J Cancer.* 2008 Mar 25;98(6):1141–6.
30. Tufail R, Jorda M, Zhao W, Reis I, Nawaz Z. Loss of Yes-associated protein (YAP) expression is associated with estrogen and progesterone receptors negativity in invasive breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Feb;131(3):743–50.
31. Rakha EA, El-Sheikh SE, Kandil MA, El-Sayed ME, Green AR, Ellis IO. Expression of BRCA1 protein in breast cancer and its prognostic significance. *Hum Pathol.* 2008 Jun;39(6):857–65.
32. Weigman VJ, Chao H-H, Shabalín AA, He X, Parker JS, Nordgard SH, et al. Basal-like Breast cancer DNA copy number losses identify genes involved in genomic instability, response to therapy, and patient survival. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Jun;133(3):865–80.
33. Margeli M, Cirauqui B, Castella E, Tapia G, Costa C, Gimenez-Capitan A, et al. The prognostic value of BRCA1 mRNA expression levels following neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *PloS One.* 2010;5(3):e9499.
34. Rosell R, Skrzypski M, Jassem E, Taron M, Bartolucci R, Sanchez JJ, et al. BRCA1: a novel prognostic factor in resected non-small-cell lung cancer. *PloS One.* 2007;2(11):e1129.
35. Massabeau C, Sigal-Zafrani B, Belin L, Savignoni A, Richardson M, Kirova YM, et al. The fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1), a marker of

- response to chemoradiotherapy in breast cancer? *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Jul;134(1):259–66.
36. Kim HR, Kim DJ, Kang DR, Lee JG, Lim SM, Lee CY, et al. Fibroblast growth factor receptor 1 gene amplification is associated with poor survival and cigarette smoking dosage in patients with resected squamous cell lung cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2013 Feb 20;31(6):731–7
37. Shaik S, Nucera C, Inuzuka H, Gao D, Garnaas M, Frechette G, et al. SCF(β -TRCP) suppresses angiogenesis and thyroid cancer cell migration by promoting ubiquitination and destruction of VEGF receptor 2. *J Exp Med.* 2012 Jul 2;209(7):1289–307.
38. Bos R, van Diest PJ, van der Groep P, Shvarts A, Greijer AE, van der Wall E. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and cell cycle proteins in invasive breast cancer are estrogen receptor related. *Breast Cancer Res.* 2004;6(4):R450–459.

TABLES

Table 1. Patient characteristics

NA: not assessed

	Entire cohort (%) (range)	Patients with RNA assessment (%) (range)
N (patients)	129	92
Mean age (years)	47.47 (31-73)	47.57 (31-68)
Hormonal status		
premenopausal	87 (67.4)	67 (72.8)
menopausal	42 (32.6)	25 (27.2)
Median tumor size (cm)		
Exploration	3.78 (0-10)	3.48 (0-10)
Ultrasound	3.24 (0-8)	3.11 (0-8)
MRI	3.66 (1-8.5)	3.63 (1-8)
NA	28	0
Lymph node involvement	79 (61.2)	53 (57.6)
Tumor histology		
Invasive ductal carcinoma	116 (90.6)	82 (90.1)
Invasive lobular carcinoma	10 (7.8)	7 (7.7)
Others	2 (1.6)	2 (2.2)
NA	1	1
Prechemotherapy tumor grade		
I	48 (38.1)	35 (38.5)
II	53 (42.1)	37 (40.7)
III	25 (19.8)	19 (20.9)
NA	3	1
Hormone receptors		
Positive	105 (81.4)	74 (80.4)
Negative	24 (18.6)	18 (19.6)
ER		
Positive	100 (77.5)	70 (76.1)
Negative	29 (22.5)	22 (23.9)
PR		
Positive	84 (65.1)	60 (65.2)
Negative	45 (34.9)	32 (34.8)
HER2		
Positive	44 (34.1)	28 (30.4)
Negative	85 (65.9)	64 (69.6)
Ki 67		
High (> 14%)	64 (66)	54 (66.7)
Low (<14%)	33 (34)	27 (33.3)
NA	32	11
Pathological response		
MP 1-3	65 (50.4)	45 (48.9)
MP 4/5	64 (49.6)	47 (51.1)
pCR		
MP 5	38 (29.5)	26 (28.3)
Tumor subtype		
Positive-HR/negative-HER2	71 (55)	53 (57.6)
HER2 positive	44 (34.1)	28 (30.4)
Triple negative	14 (10.9)	11 (12)
Molecular subtype		
Luminal A	-----	23 (25)
Luminal B HER2-		30 (32.6)
Luminal B HER2+		21 (22.8)
HER2+/RH-		7 (7.6)
Triple Negative		11 (12)

Table 2. Predictive factors for pathological response (univariate analysis)

	Miller Payne cases (%)		p
	MP 1-3	MP 4/5	
Age (years)			
<35	3 (42.9)	4 (57.1)	0.68
>= 35	62 (50.8)	60 (49.2)	
Tumor stage			
T1c-T2	46 (49.5)	47 (50.5)	0.73
T3-T4	19 (52.8)	17 (47.2)	
Tumor histology			
Invasive ductal carcinoma	59 (50.9)	57 (49.1)	0.99
Invasive lobular carcinoma	5 (50)	5 (50)	
Others	1 (50)	1 (50)	
Prechemotherapy tumor grade			
I	28 (58.3)	20 (41.7)	0.4
II	25 (47.2)	28 (52.8)	
III	11 (44)	14 (56)	
Lymph node involvement	43 (54.4)	36 (45.6)	0.24
Ki 67			
High (> o = 14%)	28 (43.8)	36 (56.3)	0.11
Low (<14%)	20 (60.6)	13 (39.4)	
Hormone receptors			
Positive	57 (54.3)	48 (45.7)	0.06
Negative	8 (33.3)	16 (66.7)	
PR			
Positive	49 (58.3)	35 (41.7)	0.014
Negative	16 (35.6)	29 (64.4)	
ER			
Positive	55 (55)	45 (45)	0.05
Negative	10 (34.5)	19 (65.5)	
HER2			
Positive	15 (34.1)	29 (65.9)	0.008
Negative	50 (58.8)	35 (41.2)	
Tumor subtype			
Positive-HR/negative-HER2	43 (60.6)	28 (39.4)	0.022
HER2 positive	15 (34.1)	29 (65.9)	
Triple negative	7 (50.4)	7 (50)	

Table 3. Predictive factors for pathological response (multivariate analysis)

	β	Odds Ratio	IC 95%	p
Tumor subtype				
HER2+	1.31	3.73	1.52 - 9.13	0.004
Triple -	0.44	1.56	0.4-6.07	0.51
RH +/-HER2 -	-	1		
Prechemotherapy tumor grade				
II vs I	-0.56	0.57	0.18-1.76	0.57
III vs I	-0.58	0.944	0.30-2.91	0.944
Tumor stage				
T1c-T2	0.45	1.57	0.63 – 3.88	0.32
T3-T4	-	1		

Table 4. Prognostic factors for time to progression (multivariate analysis)

	β	Odds Ratio	IC 95%	p
MP 4/5	-2.67	0.069	0.008-0.59	0.015
Positive-HR	-1.41	0.242	0.086-0.684	0.007
Lymph node involvement	1.2	3.33	1.26-8.76	0.015
MP 1-3 + negative-HR	2.4	11.05	1.09-111.486	0.043

Table 5. Gene expression levels according to tumor subtypes defined by immunohistochemistry.

t: tercile, m: median

RNA EXPRESSION LEVELS % - cases													
	BRCA low t	RAP80 low t	BIM low t	EZH2 low t	ROR1 low t	FGFR1 high m	PTPN12 low t	YAP high m	GAS6 high m	BTRCP low t	HIF high t	ZNF low t	AXL high m
RH+	29 12/41	22 10/46	31 15/49	32 12/37	32 8/25	58 30/52	28 15/53	55 30/55	56 27/48	20 8/40	31 15/48	23 12/52	58 28/48
RH-	62 5/8	75 9/12	50 6/12	40 4/10	33 3/9	15 2/13	54 7/13	31 4/13	25 3/12	82 9/11	33 4/12	75 9/12	15 2/13
p	0.16	0.000	0.32	0.66	0.99	0.006	0.16	0.12	0.05	0.003	0.89	0.005	0.006
RH+ HER2-	32 9/28	24 8/33	26 9/35	24 6/25	26 5/19	62 23/37	18 7/38	59 24/41	63 22/35	17 5/29	24 8/33	22 8/37	57 20/35
HER2+	31 5/16	27 4/15	41 7/17	43 6/14	50 4/8	44 8/18	56 10/18	35 6/17	31 5/16	43 6/14	50 9/18	33 6/18	50 8/16
TN	60 3/5	70 7/10	56 5/9	50 4/8	29 2/7	10 1/10	50 5/10	40 4/10	33 3/9	75 6/8	22 2/9	79 7/9	20 2/10
p	0.72	0.001	0.38	0.3	0.79	0.012	0.011	0.21	0.06	0.013	0.36	0.016	0.11
Total	49	58	61	47	34	65	66	68	60	51	60	64	61

Table 6. Gene expression levels for different molecular subtypes and correlation with pCR.

????? ?

RNA EXPRESSION LEVELS % -cases													
	BRCA low t	RAP80 low t	BIM low t	EZH2 high m	ROR1 low t	FGFR1 low t	PTPN12 low t	YAP high m	GAS6 high m	BTRCP low t	HIF high t	ZNF low t	AXL high t
LA	25 2/8	8 1/12	23 3/13	56 5/9	17 1/6	21 3/14	7 1/15	93 14/15	79 11/14	73 8/11	36 4/11	21 3/14	69 9/13
LB HER2-	35 7/20	33 7/21	27 6/22	62 10/16	31 4/13	17 4/23	26 6/23	38 10/26	52 11/21	33 6/18	18 4/22	22 5/23	27 6/22
LB HER2+	23 3/13	15 2/13	43 6/14	42 5/12	50 3/6	47 7/15	53 8/15	43 6/14	38 5/13	18 2/11	47 7/15	27 4/15	31 4/13
HER2+ RH-	67 2/3	100 2/2	33 1/3	50 1/2	50 1/2	67 2/3	67 2/3	0 0/3	0 0/3	0 0/3	67 2/3	67 2/3	0 0/3
TN	60 3/5	70 7/10	56 5/9	37 3/8	29 2/7	60 6/10	50 5/10	40 4/10	33 3/9	12 1/8	22 2/9	78 7/9	10 1/10
p	0.5	0.00	0.79	0.7	0.9	0.05	0.02	0.003	0.05	0.003	0.13	0.016	0.017
Total	49	58	61	47	34	65	66	68	60	51	60	64	61
pCR (MP 5)	53 9/17	32 6/19	43 9/21	40 6/24	27 3/11	45 10/22	41 9/22	15 5/34	20 6/30	18 3/17	37 7/19	28 6/21	5 1/20
p	0.027	0.07	0.059	0.69	0.72	0.04	0.12	0.028	0.15	0.37	0.55	0.74	0.003

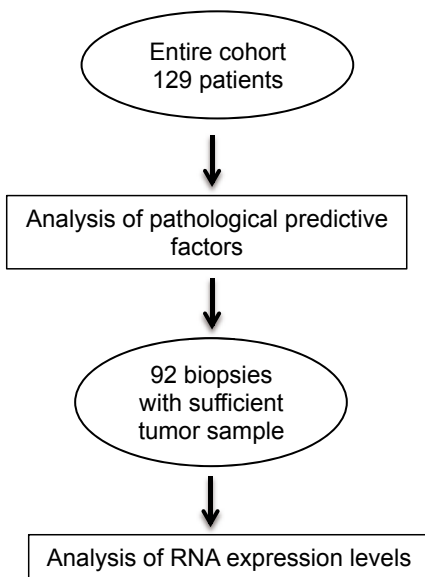
?

?

FIGURES

Figure 1. Study flow chart. Out of 129 patients included in the study, only 92 had sufficient tumor sample in pretherapeutic biopsies to perform the gene expression assessment???

?



?

Figure 2. OS and DFS according to mRNA levels.

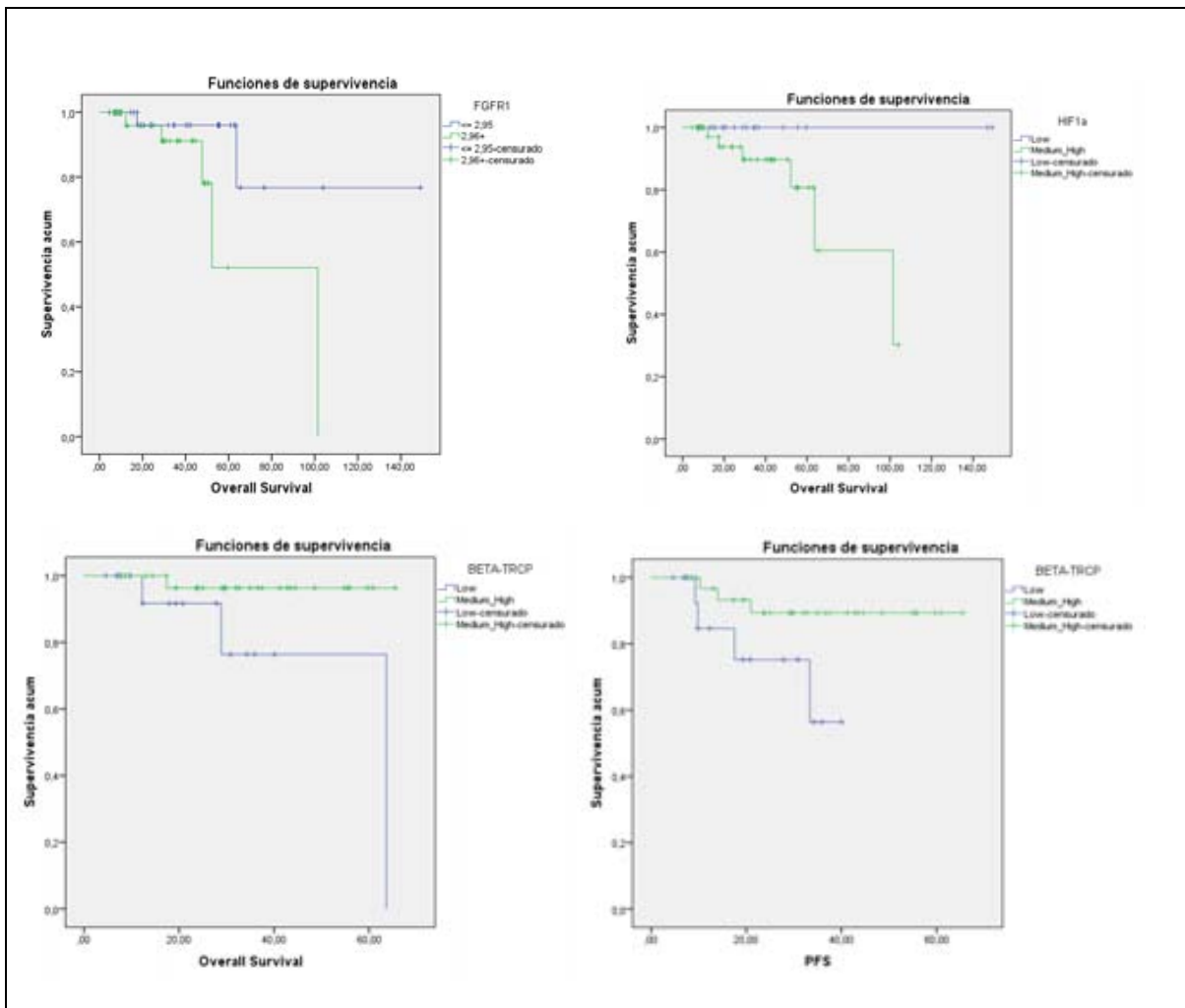
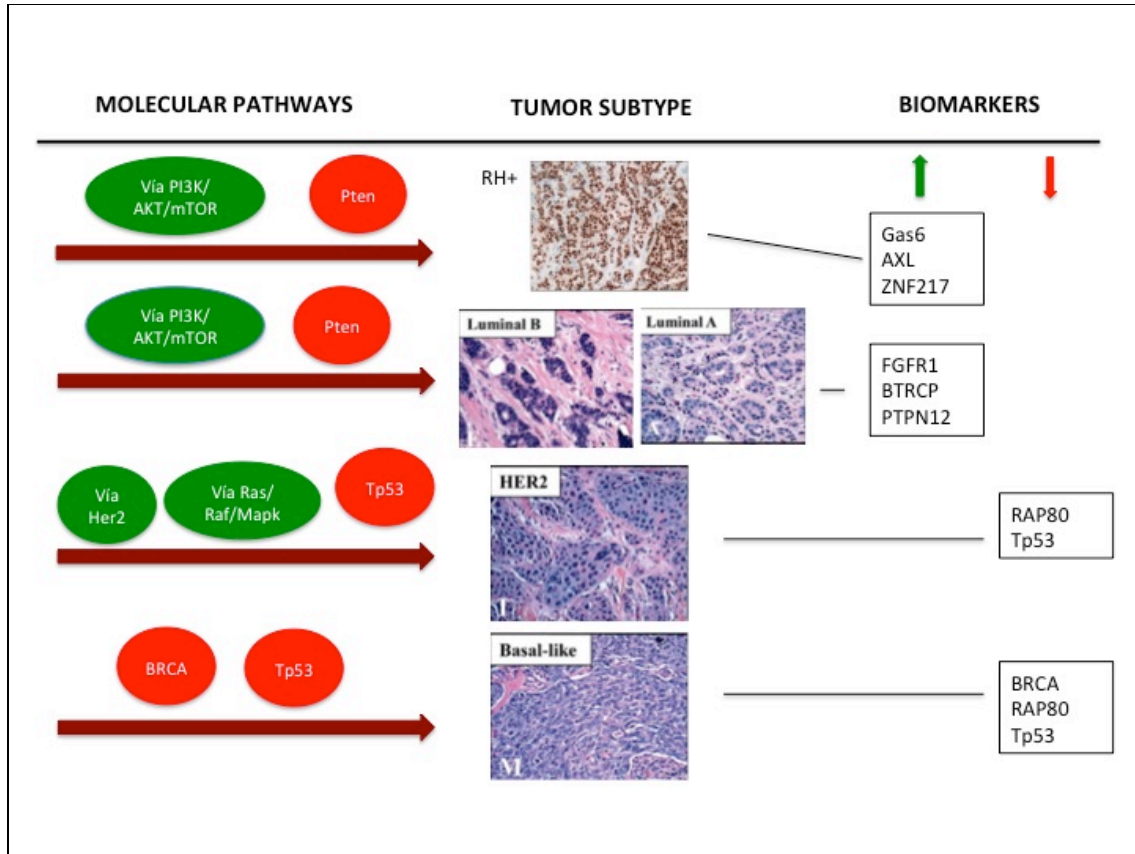


Figure 3. Heterogeneity in gene distribution by tumor subtype found in our study.

Red inactivated genes or pathways. Green activated or amplified genes.



SUPPLEMENTARY TABLES

Supplementary Table S1. Descriptive data for each gene

	AXL	BRCA1	RAP80	BIM	EZH2	ROR1	FGFR1	PTPN12	YAP	GAS6	BTRCP	HIF1a	ZNF217	
N	Valid	61	49	58	61	47	34	65	66	68	60	51	60	64
	Lost	68	80	71	68	82	95	64	63	61	69	78	69	65
P	25	1.847	5.233	2.358	3.307	3.246	.974	1.576	2.364	1.674	1.181	.756	.609	4.064
	30	2.057	6.624	2.744	3.825	3.904	1.126	1.958	2.551	1.772	1.488	.811	.659	4.865
	33	2.283	7.610	2.976	4.107	3.992	1.256	2.116	2.714	1.866	1.574	.926	.698	4.914
	50	3.733	11.29	3.771	5.388	6.143	2.071	2.946	3.198	2.430	3.013	1.254	.901	6.856
	66	5.486	14.19	4.221	7.004	8.258	3.019	4.225	4.003	3.141	4.081	1.946	1.057	9.466
	70	5.926	15.86	4.293	7.179	8.619	3.147	4.463	4.332	3.274	4.607	2.312	1.127	10.692
	75	6.518	19.74	5.028	7.335	8.994	3.521	5.256	4.472	3.503	5.374	2.598	1.250	12.800

P: percentile

12. ANEXO



ORIGINAL

Quimioterapia neoadyuvante en cáncer de mama precoz

Sonia Baulies Caballero^{a,*}, Maite Cusidó Gimferrer^a, Nadwa Kanjou Augé^b,
Francisco Tresserra Casas^c, María González Cao^d, Ignacio Rodríguez García^e,
Belén Úbeda Hernández^f, Carmen Ara Pérez^a y Rafael Fábregas Xaudaró^a

^a Unidad de Ginecología Oncológica y Mastología, Departamento de Obstetricia, Ginecología y Reproducción Humana, Institut Universitari Dexeus, Barcelona, España

^b Servicio de Ginecología, Hospital del Mar, Barcelona, España

^c Departamento de Anatomía Patológica, Institut Universitari Dexeus, Barcelona, España

^d Departamento de Oncología Médica, Institut Universitari Dexeus, Barcelona, España

^e Unidad de Epidemiología y Estadística, Institut Universitari Dexeus, Barcelona, España

^f Unidad de Diagnóstico Ginecológico por la Imagen, Institut Universitari Dexeus, Barcelona, España

Recibido el 13 de octubre de 2012; aceptado el 7 de enero de 2013

PALABRAS CLAVE

Cáncer de mama;
Quimioterapia
neoadyuvante;
Factores predictivos;
Tumor precoz;
Respuesta tumoral

Resumen

Objetivos: La quimioterapia neoadyuvante (QNA) es el tratamiento de elección en las pacientes con cáncer de mama localmente avanzado. El objetivo de este estudio es evaluar la utilidad de QNA en tumores pequeños pero con factores pronósticos desfavorables.

Material y métodos: Se compara la respuesta a la QNA en pacientes con tamaño tumoral T3-T4 frente a T1c-T2. Desde enero de 2000 a enero de 2011, 110 pacientes han recibido QNA. Se han revisado los datos demográficos, el tamaño tumoral, los factores pronósticos, la respuesta radiológica y anatomopatológica a la QNA, según la clasificación de Miller y Payne (MP), y la supervivencia en ambos grupos.

Resultados: Se revisaron 76 casos en el grupo T1c-T2 y 34 en el T3-T4. En el grupo T3-T4 se observó en mayor porcentaje tumores con factores pronósticos desfavorables (afectación ganglionar, receptores hormonales negativos y Her2Neu positivo). En el grupo T1c-T2, 23 casos (30,3%) recibieron antraciclinas y 53 (69,7%) antraciclinas y taxanos, mientras que en el grupo T3-T4, 10 (29,4%) y 24 (70,6%) casos recibieron dichas pautas, respectivamente. En el grupo T1c-T2 se observó en mayor porcentaje el subtipo tumoral receptores hormonales positivos frente a tumores Her2Neu positivos en los T3-T4. En relación con la respuesta a la QNA no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la valoración radiológica o anatomopatológica, 38 pacientes (50%) T1c-T2 presentaron MP 4/5 frente a 16 (47,1%) en T3-T4.

Conclusiones: En las pacientes con cáncer de mama precoz existe la misma respuesta anatomopatológica a la QNA que en el grupo T3-T4. En nuestro estudio, el único factor independiente asociado a la respuesta patológica tumoral es el subtipo tumoral, presentando los tumores Her2Neu positivos mejor respuesta.

© 2012 SESPM. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: sonbau@dexeus.com (S. Baulies Caballero).

KEYWORDS

Breast cancer;
Neoadjuvant
chemotherapy;
Predictive factors;
Early tumor;
Tumor response

Neoadjuvant chemotherapy in early-stage breast cancer**Abstract**

Aims: In locally advanced breast tumors, neoadjuvant chemotherapy (NC) is the standard treatment. The aim of this study was to analyze the utility of NC in small tumors with unfavorable prognostic factors.

Material and methods: We compared the response to NC in patients with T3-T4 tumors versus those with T1c-T2 tumors. From January 2000 to January 2011, 110 patients received NC. Demographic data, tumor size, prognostic factors, radiological and histopathological response according to the Miller-Payne classification and survival were reviewed.

Results: We reviewed 76 patients in the T1c-T2 group and 34 in the T3-T4 groups. Tumors with poorer prognostic factors (negative hormone receptors, positive Her2Neu and metastatic nodal involvement) were observed in the T3-T4 group. In the T1c-T2 group, 23 patients (30.3%) received anthracyclines and 53 (69.7%) received anthracyclines plus taxanes. In the T3-T4 group, 10 (29.4%) and 24 (70.6%) patients received these chemotherapy regimens respectively. A higher percentage of the hormone receptor-positive tumor subtype was observed in the T1c-T2 group compared with Her2Neu-positive tumors in the T3-T4 group. No statistically significant differences in radiologic or histopathologic assessment were found: Miller-Payne grades 4/5 were found in 38 patients (50%) in the T1c-T2 group versus 16 (47.1%) in the T3-T4 group.

Conclusions: Pathologic response to NC is the same in early-stage tumors as in locally-advanced breast cancer. In this study, the only independent factor associated with pathological tumor response was the tumor subtype, with the greatest response being found in Her2Neu-positive tumors.

© 2012 SESPM. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La quimioterapia ha demostrado en el cáncer de mama quirúrgico un claro beneficio en términos de supervivencia global (SG), tanto si es administrada antes como después de la cirugía del tumor primario¹.

El estudio NSABP B-18 demostró para el tratamiento de quimioterapia neoadyuvante (QNA) una mejoría en la tasa de cirugías conservadoras de mama frente a la adyuvancia, gracias a la reducción tumoral o down-staging, manteniendo el beneficio en términos de supervivencia².

En el caso de los tumores de mama localmente avanzados el tratamiento neoadyuvante es el procedimiento estándar, no obstante, la neoadyuvancia representa también una opción terapéutica para aquellas pacientes con cáncer de mama inicial cuando existe ya una indicación de quimioterapia, puesto que mejora las posibilidades de control local y la tasa de supervivencia³ mediante el tratamiento precoz de las metástasis subclínicas. Asimismo, permite una evaluación *in vivo* de la biología tumoral, valorando su quimiosensibilidad^{4,5}.

La respuesta anatomopatológica completa (pRC) o la presencia de mínima enfermedad residual tras QNA se correlaciona con una mayor supervivencia libre de enfermedad (SLE) y SG^{6,7}. La pRC se define como la total ausencia de tumor infiltrante, grado de regresión tumoral Miller y Payne (MP) 5 y sin afectación ganglionar. La tasa de respuesta completa tras tratamientos neoadyuvantes basados en combinaciones de antraciclinas y taxanos es tan solo del 14-26%⁸. El tratamiento complementario con trastuzumab en pacientes con sobreexpresión de Her2Neu aumenta la pRC a un 40-60%^{9,10}.

En términos de quimiosensibilidad, la diferencia entre tumores se basa en las desigualdades de sus perfiles moleculares. Así, los tumores basal-like y Her2Neu positivos son más sensibles a quimioterapia que los subtipos luminales. Esto sugiere que los genes implicados en sensibilidad a quimioterapia son expresados de modo diferente en cada subtipo tumoral^{11,12}.

El objetivo de este estudio es analizar la utilidad de la QNA en aquellos tumores pequeños con expresión de factores pronósticos desfavorables y que ya tienen una indicación de quimioterapia.

Material y métodos

Se trata de un estudio retrospectivo en el que se compara la respuesta a la QNA en estadios iniciales (T1c-T2) frente a tumores localmente avanzados (T3-T4). Entre enero del año 2000 y enero del año 2011 se han tratado con QNA 110 pacientes. Se revisaron los diversos datos demográficos y clínicos, incluyendo los factores pronósticos conocidos, como tamaño tumoral, afectación ganglionar, tipo y grado histológico, receptores hormonales y Her2Neu. Se analizó, asimismo, la respuesta radiológica y anatomopatológica según el tamaño tumoral.

En neoadyuvancia se utilizó el esquema quimioterápico basado en taxanos y/o antraciclinas. En el grupo de antraciclinas se administraron 4 o 6 ciclos de QNA (dosis de 75-90 mg/m²), y en el grupo de antraciclinas + taxanos se administraron 4 ciclos de antraciclinas seguidos de 4 ciclos de docetaxel (100 mg/m²) o 12 semanas de paclitaxel (80 mg/m²). A partir del año 2010 se añadió trastuzumab

en neoadyuvancia en aquellas pacientes con Her2Neu positivo (4 mg/kg la primera dosis, seguido de 2 mg/kg semanal).

La valoración de la respuesta a la quimioterapia se realizó mediante ecografía mamaria hasta el 2005, y posteriormente con RMN de mama, considerando respuesta completa (ausencia de tumor), respuesta parcial (< 50% tumor) o no respuesta (> 50%). La respuesta anatomopatológica se valoró en la pieza quirúrgica posquimioterapia según los criterios MP¹³. En el estudio se diferenció buena respuesta (MP 4/5) o mala respuesta anatomopatológica (MP 1-3).

La determinación de receptores hormonales de estrógenos (clon 6F11, Novocastra, Reino Unido), de progesterona (clon 16, Novocastra, Reino Unido) y de Her2Neu (clon CB11, Oracle, Leica Biosystems, Reino Unido) se realizó mediante técnicas de inmunohistoquímica, utilizando en todos los casos los anticuerpos prediluidos por el fabricante. Se consideró el Her2Neu positivo y la sobreexpresión 3+ o 2+ si la técnica FISH (HER-2 DNA PathVysion, Abbott, Illinois, EE. UU.) era positiva.

Las indicaciones de QNA fueron:

- Tumores localmente avanzados: T3 y T4.
- Tumores pequeños: tamaño tumoral de $\geq 1,5$ cm con Her2Neu positivo, triples negativos o afectación ganglionar y tamaño tumoral ≥ 2 cm.

A partir de 2008 se inició el estudio axilar mediante la biopsia selectiva del ganglio centinela pre-QNA. Las indicaciones de tratamiento axilar conservador fueron:

- Tumores únicos hasta 5 cm o tumores multifocales hasta 3 cm.
- Estudio axilar negativo (clínico, ecográfico y citológico).

Para analizar las variables cuantitativas se utilizó la t de Student, y para las variables categóricas, la Chi-cuadrado de Pearson o el test exacto de Fisher.

La SLE se ha estimado utilizando los modelos de supervivencia de Kaplan-Meier, que se comparan con el Log-Rank test.

Todos los análisis se realizaron utilizando el programa IBM SPSS® Statistics 20.0. Todas las comparaciones fueron bilaterales, con un nivel de significación $\alpha < 0,05$.

Resultados

Entre enero de 2000 y enero de 2011 se diagnosticaron 1.897 pacientes con cáncer de mama en nuestro centro. En 110 (5,8%) se inició tratamiento con QNA. El seguimiento medio fue de 87 meses y la mediana de 91,4 meses. La edad media de las pacientes que recibieron QNA fue de 47,13 años. Tras analizar los factores pronósticos, 49 pacientes (44,5%) presentaron afectación ganglionar, 37 (33,6%) fueron Her2Neu positivo y 91 (82,7%) tuvieron receptores hormonales positivos (tabla 1).

A 33 pacientes (30%) se les administró un esquema con solo antraciclinas y 77 (70%) recibieron una combinación de antraciclinas y taxanos.

El tratamiento quirúrgico posneoadyuvancia realizado fue conservador (tumorectomía) en 61 casos (55,5%) y mastectomía en 49 pacientes (44,5%).

Tabla 1 Datos descriptivos de la serie

	Casos (%)
N (pacientes)	110
Edad media (años)	47,13
Tamaño tumoral (cm)	
<i>Exploración clínica</i>	5,25
<i>Ecografía</i>	4,6
NR	2 casos
RMN	4,53
NR	10 casos
Tamaño tumoral	
T1c-T2	76 (69)
T3-T4	34 (31)
Afectación ganglionar	49 (44,5)
Histología	
<i>Ductal infiltrante</i>	92 (83,6)
<i>Lobulillar infiltrante</i>	9 (8,2)
Otros	9 (8,2)
Grado histológico	
I	39 (36,4)
II	48 (44,9)
III	20 (18,7)
NR	3 casos
Receptores hormonales	
<i>Positivo</i>	91 (82,7)
<i>Negativo</i>	19 (17,3)
Her2Neu	
<i>Positivo</i>	37 (33,6)
Quimioterapia	
<i>Antraciclinas</i>	33 (30)
<i>Antraciclinas + taxanos</i>	77 (70)
Respuesta radiológica	
<i>Completa</i>	25 (23,4)
<i>Parcial</i>	56 (52,3)
<i>No respuesta</i>	26 (24,3)
NR	3 casos
Miller y Payne	
1-3	56 (50,9)
4/5	54 (49,1)
Tratamiento quirúrgico	
<i>Tumorectomía</i>	61 (55,5)
<i>Mastectomía</i>	49 (44,5)
Subtipo	
<i>RH positivos/Her2Neu negativo</i>	62 (56,4)
<i>Her2Neu positivo</i>	37 (33,6)
<i>Triple negativo</i>	11 (10)

NR: no registrado; RH: receptores hormonales; RMN: resonancia magnética nuclear.

De las 110 pacientes tratadas con neoadyuvancia, a 90 pacientes (81,8%) se les realizó una linfadenectomía axilar. El número de ganglios axilares extraídos y el número de ganglios afectados oscilaba de 6 a 35 y de 1 a 12, respectivamente. En 2008 se inició de forma protocolizada el estudio

de la axila mediante la técnica del ganglio centinela en neoadyuvancia. A partir de ese año se han tratado 60 pacientes, de las cuales se ha realizado ganglio centinela a 28 (46,7%), con resultado negativo en 20 casos (71,4%). El 53,3% de las pacientes (32 casos) requirió una linfadenectomía axilar en primera instancia.

En relación con los subtipos tumorales, 62 pacientes (56,4%) presentaron tumores receptores hormonales positivos, 37 (33,6%) Her2Neu positivo y 11 (10%) triple negativo.

En la tabla 2 se presentan los diversos datos descriptivos ajustados al tamaño tumoral. En 76 pacientes se diagnosticó un T1c-T2 y 34 casos presentaron un T3-T4. La edad media al diagnóstico en las pacientes T1c-T2 y T3-T4 fue de 46,68 ($\pm 8,62$) y 47,59 años ($\pm 8,40$), respectivamente. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

En el grupo T1c-T2, el tamaño tumoral medio por ecografía fue de 2,94 cm ($\pm 0,72$), y en las pacientes con T3-T4, de 4,83 cm ($\pm 1,91$). Los tumores localmente avanzados presentaban factores pronósticos desfavorables (mayor afectación ganglionar, receptores hormonales negativos y Her2Neu positivo). De las pacientes con T1c-T2, 25 casos (32,9%) presentaban afectación ganglionar al diagnóstico frente a 24 (70,6%) pacientes con T3-T4 ($p < 0,05$). El Her2Neu era positivo en 19 (25%) casos T1c-T2 y en 18 (52,9%) tumores T3-T4 ($p < 0,05$).

En el grupo T1c-T2, 23 pacientes (30,3%) recibieron antraciclinas y 53 (69,7%) antraciclinas y taxanos, comparado con 10 (29,4%) y 24 casos (70,6%), respectivamente, en el grupo T3-T4.

En cuanto al grado de regresión tumoral radiológica y patológica, entre T1c-T2 y T3-T4 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Al estudiar la respuesta patológica, diferenciando buena respuesta (MP 4/5) versus mala respuesta (MP 1-3), se observa que existe la misma quimiosensibilidad en tumores iniciales que en tumores localmente avanzados, 38 pacientes (50%) en el grupo T1c-T2 presentaron MP 4/5 frente a 16 (47,1%) del grupo T3-T4. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al número de ganglios afectados posquimioterapia y el grado de regresión tumoral, pero sí hay una tendencia a una mayor respuesta patológica tumoral cuando existe menor afectación ganglionar prequimioterapia: 36 pacientes (59%) sin afectación ganglionar obtuvieron un grado de regresión tumoral MP 4/5, mientras que 18 casos (36,7%) con afectación ganglionar presentaron MP 4/5.

En el grupo T1c-T2 se realizó tumorectomía en 58 pacientes (76,3%) frente a 3 casos (8,8%) en T3-T4 ($p < 0,05$).

Los estadios iniciales presentaban en mayor porcentaje el subtipo receptores hormonales positivos (64,5 versus 38,2%), mientras que en los T3-T4 se observaban tumores Her2Neu positivos (25 versus 52,9%) ($p < 0,05$).

Se realizó un análisis multivariante para valorar el grado de regresión tumoral anatomopatológica ajustado al tipo de quimioterapia, al tamaño tumoral y al subtipo tumoral. Se observó que el único factor independiente asociado a la respuesta patológica tumoral era el subtipo tumoral, presentando los tumores Her2Neu positivos una mejor respuesta ($p < 0,05$).

La SG a 5 años en las pacientes con MP 4/5 fue del 95% y en MP 1-3 del 70% ($p = 0,093$), y la SLE en ambos grupos fue de 82 y 50%, respectivamente ($p = 0,022$) (fig. 1).

Tabla 2 Datos descriptivos según el tamaño tumoral

	T1c-T2 (%)	T3-T4 (%)	p
N (pacientes)	76	34	
Edad media (años)	46,68	47,59	NS
Tamaño tumoral (cm)			
<i>Exploración clínica</i>	2,85	4,8	
<i>Ecografía</i>	2,94	6,27	
NR	1 caso	1 caso	
<i>RMN</i>	3,33	5,74	
NR	5 casos	5 casos	
Afectación ganglionar	25 (32,9)	24 (70,6)	$p < 0,05$
Histología			
<i>Ductal infiltrante</i>	64 (84,2)	28 (82,4)	NS
<i>Lobulillar infiltrante</i>	5 (6,6)	4 (11,8)	
<i>Otros</i>	7 (9,2)	2 (5,8)	
Grado histológico			
I	24 (32)	15 (46,9)	NS
II	39 (52)	9 (28,1)	
III	12 (16)	8 (25)	
NR	1	2	
Receptores hormonales			
<i>Positivos</i>	49 (64,5)	13 (38,2)	$p < 0,05$
<i>Negativos</i>	27 (35,5)	21 (61,8)	
Her2Neu			
<i>Positivo</i>	19 (25)	18 (52,9)	$p < 0,05$
Quimioterapia			
<i>Antraciclinas</i>	23 (30,3)	10 (29,4)	NS
<i>Antraciclinas + taxanos</i>	53 (69,7)	24 (70,6)	
Respuesta radiológica			
<i>Completa</i>	21 (28,4)	4 (12,1)	NS
<i>Parcial</i>	36 (48,6)	20 (60,6)	
<i>No respuesta</i>	17 (23)	9 (27,3)	
NR	2	1	
Miller y Payne			
1-3	38 (50)	18 (52,9)	NS
4/5	38 (50)	16 (47,1)	
Tratamiento quirúrgico			
<i>Tumorectomía</i>	58 (76,3)	3 (8,8)	$p < 0,05$
<i>Mastectomía</i>	18 (23,7)	31 (91,2)	
Subtipo			
<i>RH positivos/Her2Neu negativo</i>	49 (64,5)	13 (38,2)	$p < 0,05$
<i>Her2Neu positivo</i>	19 (25)	18 (52,9)	
<i>Triple negativo</i>	8 (10,5)	3 (8,8)	

NR: no registrado; NS: no significativo; RH: receptores hormonales; RMN: resonancia magnética nuclear.

La SG y SLE a los 5 años según el tamaño tumoral (T1c-T2 versus T3-T4) fue de 83,2 y 80,2% en los T1c-T2 y de 79,6 y 37% en los T3-T4, respectivamente (SG $p = 0,544$, SLE $p = 0,005$) (fig. 2).

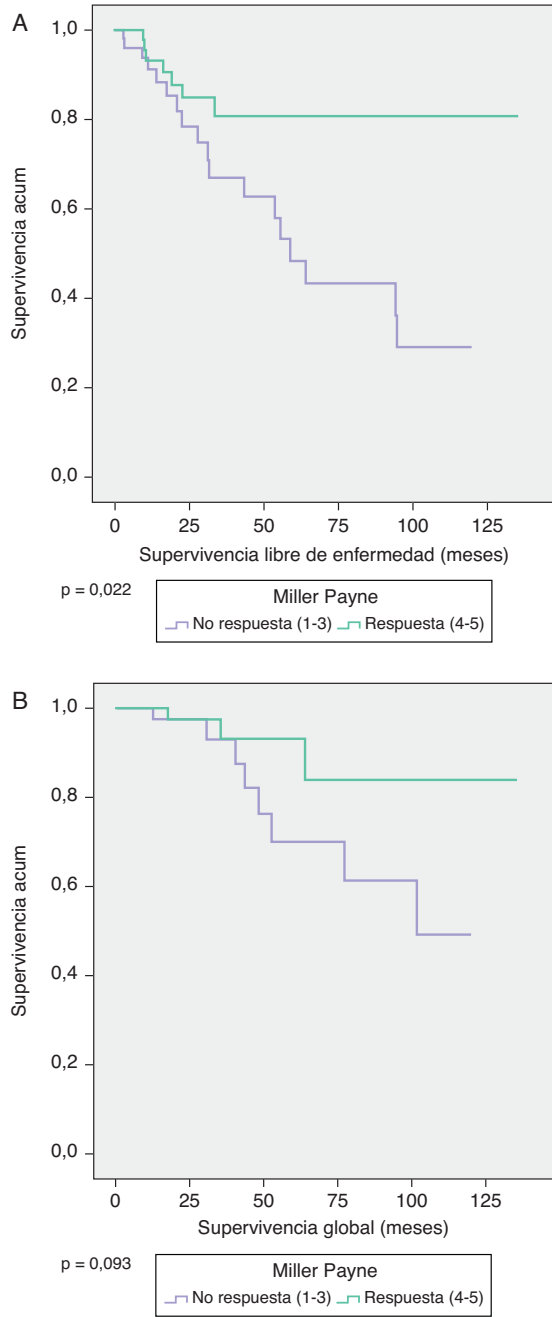


Figura 1 Impacto pronóstico de la respuesta completa anatomopatológica. A. Supervivencia libre de enfermedad según Miller y Payne. B. Supervivencia global según Miller y Payne.

Discusión

La QNA representa el tratamiento inicial para el manejo multidisciplinario de las pacientes con cáncer de mama operables con gran tamaño tumoral o localmente avanzado. Múltiples estudios^{14,15} ya han demostrado su eficacia

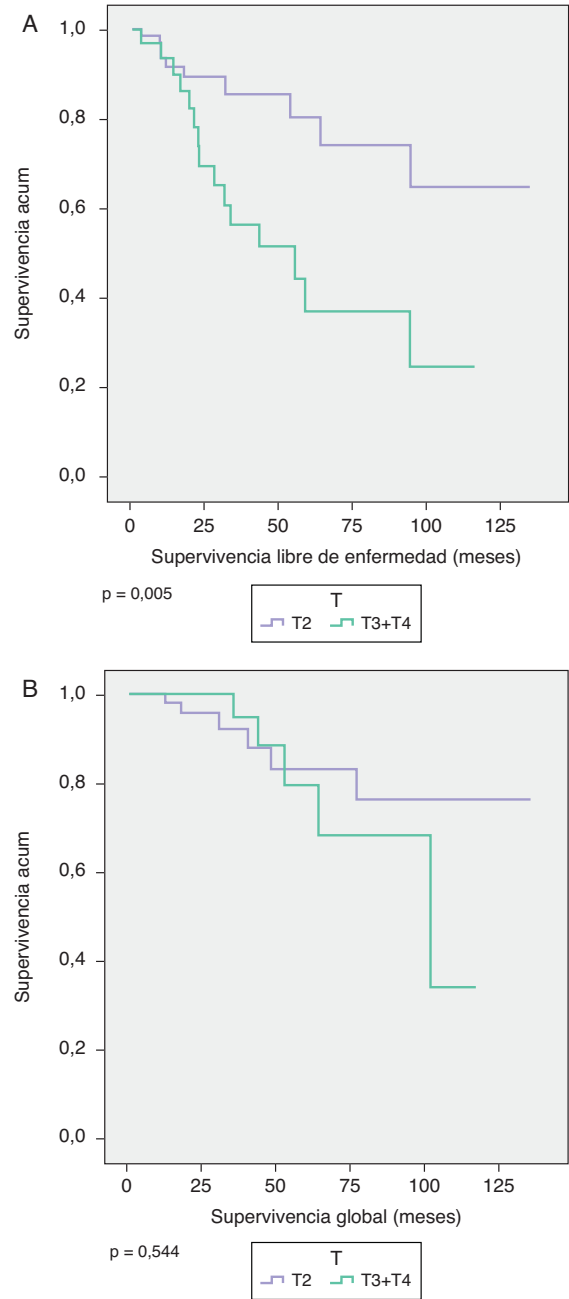


Figura 2 Impacto pronóstico según el tamaño tumoral. A. Supervivencia libre de enfermedad según el tamaño tumoral. B. Supervivencia global según el tamaño tumoral.

frente a la adyuvancia, mostrando resultados equivalentes en cuanto a supervivencia, pero permitiendo una mayor tasa de cirugía conservadora. Sin embargo, no todos los tumores presentan una misma quimiosensibilidad, las diferencias en la respuesta anatomopatológica no se basan en el tamaño tumoral, sino en las desigualdades de los perfiles moleculares^{16,17}.

En nuestra serie, al estudiar la respuesta anatomopatológica diferenciando buena respuesta (MP 4/5) versus mala respuesta (MP 1-3), se observa que existe la misma quimiosensibilidad en estadios iniciales que en tumores localmente avanzados, y al realizar el análisis multivariante se concluye que el único factor independiente asociado a la respuesta patológica tumoral es el subtipo tumoral, presentando los tumores Her2Neu positivos una mejor respuesta.

En relación con el valor pronóstico de la respuesta anatomopatológica, las pacientes con MP 4/5 presentaban una supervivencia global del 95%, frente al 70% de aquellas con MP 1-3. Dichos resultados coinciden con la literatura, en la que pacientes con pRC tanto a nivel de tumor como en axila presentan mayor tasa de SLE y SG en relación con las pacientes con enfermedad residual posquimioterapia^{6,11,18}. No obstante, el estudio NSABP B-27^{19,20}, que compara diferentes esquemas de neoadyuvancia, no consiguió demostrar una relación entre pRC y aumento en la supervivencia, ya que a pesar de un incremento en la tasa de respuesta completa con pautas de doxorubicina/ciclofosfamida (AC)-docetaxel versus AC, no había diferencias significativas en cuanto a SG ni SLE. Dichas discrepancias entre estudios seguramente son debidas a que el impacto pronóstico de la pRC se basa en las diferencias de los perfiles moleculares²¹. Von Minckwitz et al. demostraron claramente que la respuesta completa no está asociada al pronóstico en los subgrupos luminales A, mientras que en los subgrupos Her2Neu positivo o triples negativos la respuesta completa puede discriminar pacientes con mejor o peor pronóstico²².

Buzdar et al.²³ mostraron un mayor efecto terapéutico en las pacientes con Her2Neu positivo al añadir trastuzumab a la QNA, obteniendo una mejoría en las tasas de respuesta completa del 26,3 al 65,2%.

El objetivo primordial en la neoadyuvancia es identificar y seleccionar a las pacientes que se beneficiarán de los diferentes tipos de esquemas para evitar tratamientos ineficaces. En nuestro estudio, aunque los tumores localmente avanzados (T3-T4) presentaban factores pronósticos más desfavorables (mayor porcentaje de receptores hormonales negativos y Her2Neu positivos), la respuesta a la QNA valorada por MP no difería de la de los estadios iniciales (T1c-T2).

La QNA consigue respuestas tumorales en más de dos tercios de las pacientes con cáncer de mama operable, observándose una tasa de progresión de la enfermedad durante el tratamiento de menos del 5%. En nuestro estudio concluimos que el único factor independiente asociado a la respuesta patológica tumoral es el subtipo tumoral, presentando los tumores Her2Neu positivos una mejor respuesta. Por lo tanto, la neoadyuvancia puede darse en tumores pequeños, ya que el tamaño tumoral no implica una diferencia en la quimiosensibilidad, y en las pacientes con cáncer de mama precoz existe la misma respuesta radiológica y anatomopatológica a la QNA que en el grupo T3-T4.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. 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 randomised trials. *Lancet*. 2005;365:1687-717.
2. Wolmark N, Wang J, Mamounas E, Bryant J, Fisher B. 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.
3. Chia S, Swain SM, Byrd DR, Mankoff DA. Locally advanced and inflammatory breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26:786-90.
4. DeWys WD. Studies correlating the growth rate of a tumor and its metastases and providing evidence for tumor-related systemic growth-retarding factors. *Cancer Res*. 1972;32:374-9.
5. Ketcham AS, Wexler H, Mantel N. The effect of removal of a "primary" tumor on the development of spontaneous metastases. I. Development of a standardized experimental technique. *Cancer Res*. 1959;19:940-4.
6. Gralow JR, Burstein HJ, Wood W, Hortobagyi GN, Gianni L, von Minckwitz G, et al. Preoperative therapy in invasive breast cancer: Pathologic assessment and systemic therapy issues in operable disease. *J Clin Oncol*. 2008;26:814-9.
7. Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2007;25:4414-22.
8. Schneeweiss A, Huober J, Sinn H, von Fournier D, Rudlowski C, Beldermann F, et al. Gemcitabine, epirubicin and docetaxel as primary systemic therapy in patients with early breast cancer: Results of a multicentre phase I/II study. *Eur J Cancer*. 2004;40:2432-8.
9. Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, Manikhas A, Lluch A, Tjulandini S, et al. Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone in patients HER2-positive locally advanced breast cancer (The NOAH Trial): A randomised controlled superiority trial with a parallel Her2-negative cohort. *Lancet*. 2010;375:377-84.
10. Untch M, Rezai M, Loibl S, Fasching PA, Huober J, Tesch H, et al. Neoadjuvant treatment with trastuzumab in Her2-positive breast cancer. Results from the GeparQuattro study. *J Clin Oncol*. 2010;28:2024-31.
11. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26:1275-81.
12. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2005;11:5678-85.
13. Ogston KN, Miller ID, Payne S, Hutcheon AW, Sarkar TK, Smith I, et al. A new histological grading system to assess response of breast cancer to primary chemotherapy: Prognostic significance and survival. *Breast*. 2003;12:320-7.
14. Van der Hage JA, van de Velde CJ, Julien JP, Tubiana-Hulin M, Vandervelden C, Duchateau L. Preoperative chemotherapy in primary operable breast cancer: Results from the European Organization for Research and Treatment of Cancer trial 10902. *J Clin Oncol*. 2001;19:4224-37.
15. Mauri D, Pavlidis N, Loannidis JP. Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: A metaanalysis. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97:188-94.
16. Meyers MO, Klauber-Demore N, Ollila DW, Amos KD, Moore DT, Drobish AA, et al. Impact of breast cancer molecular subtypes on locoregional recurrence in patients treated with neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2011;18:2851-7.

17. Esserman LJ, Berry DA, Cheang MC, Yau C, Perou CM, Carey L, et al. Chemotherapy response and recurrence-free survival in neoadjuvant breast cancer depends on biomarker profiles: Results from the I-SPY 1 TRIAL. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;132:1049–62.
18. Kaufmann M, Hortobagyi GN, Goldhirsch A, Scholl S, Makris A, Valagussa P, et al. Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: An update. *J Clin Oncol.* 2006;24:1940–9.
19. Bear HD, Anderson S, Smith RE, Geyer Jr CE, Mamounas EP, Fisher B, 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;24:2019–27.
20. Bear HD, Anderson S, Brown A, Smith R, Mamounas EP, Fisher P, et al. The effect on tumor response of adding sequential preoperative docetaxel to preoperative doxorubicin and cyclophosphamide: Preliminary results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol.* 2003;21:4165–74.
21. Esserman LJ, Berry DA, Demichele A, Carey L, Davis SE, Buxton M, et al. Pathologic complete response predicts recurrence-free survival more effectively by cancer subset: Results from the I-SPY 1 TRIAL. *J Clin Oncol.* 2012;30:3242–9.
22. Von Minckwitz G, Untch M, Blohmer JU, Costa SD, Eidtmann H, Fasching PA, et al. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *J Clin Oncol.* 2012;30:1796–9.
23. Buzdar AU, Ibrahim NK, Francis D, Booser DJ, Thomas ES, Theriault RL, et al. Significant 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;23:3676–85.