

MONOGRAFÍA

MARCADORES BIOLÓGICOS EN EL CÁNCER DE MAMA

Claudia Rita Lourdes Brusco*

RESUMEN

El cáncer de mama es, en la actualidad, una de las principales causas de muerte en las mujeres, aunque se ha observado una sustancial reducción de las tasas de mortalidad en las últimas décadas merced a la detección de esta neoplasia en estadios más precoces y a la aplicación de tratamientos médicos adyuvantes cada vez más efectivos. La mejoría de los resultados también implica desafíos respecto de la elección del tratamiento óptimo para cada caso, evitando tanto el sobre como el sub tratamiento o el tratamiento incorrecto, siendo por ello necesario definir características específicas que orienten al médico respecto de una optimización terapéutica individual.

Las características clásicas clínico-patológicas vinculadas con el pronóstico de la paciente –que incluyen el tamaño tumoral, el subtipo y grado histológicos, las metástasis ganglionares y la invasión linfovascular, así como el sistema TNM (tamaño tumoral, ganglios, metástasis)– han permitido integrar estos factores en estadios tumorales con un valor pronóstico fundamental. Pese a ello, se proponen e investigan continuamente nuevos biomarcadores con fines pronósticos y predictivos.

Los marcadores tumorales son sustancias biológicas de distinta naturaleza química, sintetizadas y liberadas por las células tumorales, o producidas por el huésped en respuesta a la presencia del tumor.

*Hospital General de Agudos Dr. Enrique Tornú, CABA.

Correo electrónico de contacto: claudiab3112@yahoo.com.ar

Solo unos pocos han sido incorporados a la práctica clínica debido a la falta de suficiente validación, aunque la incesante identificación de nuevos marcadores ha llevado a una más profunda comprensión de la biología tumoral y subraya la importancia de los marcadores existentes. La presente monografía tiene como propósito exponer tanto los biomarcadores de uso clínico probado en el tratamiento del cáncer mamario como aquellos más recientes aún bajo investigación.

Palabras clave

CÁNCER DE MAMA. BIOMARCADORES. GANGLIOS LINFÁTICOS. RECEPTORES HORMONALES. HER2/NEU. KI67, CICLINAS, MULTIGÉNICOS, GEN P53, CATEPSINA D, PROTEÓMICA, UPA/PAI-1, CA15/3, UPA PAI, TF, MAMOGLOBINA, OSTEOPONTINA, FGFR2, PTEN, SIRTUINS, SNAIL, TWIST, ZEB I. CITOCROMO P450 2D6, PIK3CA, RECEPTOR ALFA DEL ÁCIDO RETINOICO, STAT3, TIMP-1, LIN28, MICRO ARN.

SUMMARY

Breast cancer is nowadays one of the leading mortality causes in women, although there has been a substantial reduction in mortality rates in recent decades due to detection of these tumors at earlier stages and to implementation of increasingly effective adjuvant medical treatments. Improvement in clinical results also involves challenges regarding the choice of optimal treatment for each case, avoiding both overtreatment and undertreatment or inappropriate treatment, being therefore necessary to define specific features to guide the clinician about individual therapeutic optimization. Classical clinical pathological features associated with the prognosis of the patient, including tumor size, histologic subtype and grade, lymph node metastasis and lymphovascular invasion, and TNM (tumor size, lymph node, metastasis) system has allowed integrating these factors in tumor stages with a major prognostic value. Nevertheless, new biomarkers are being proposed and investigated with prognostic and predictive purposes.

Tumor markers are biological substances of different chemical nature, synthesized and released by tumor cells, or produced by the host in response to the presence of tumor. Only a few of them have been incorporated into clinical practice due to lack of enough validation, although the constant identification of new markers has

led to a deeper understanding of tumor biology, highlighting the importance of existing markers. The purpose of this paper is to expose both biomarkers with proven clinical benefits in the treatment of breast cancer as those under current investigation.

Key words

BREAST CANCER BIOMARKERS. LYMPHATIC NODES. HORMONE RECEPTORS. HER2/NEU. Ki67, CYCLINS MULTIGENIC, P53, CATHEPSIN D, PROTEOMICS, UPA/PAI-1, CA15/3, UPA, PAI, TF, MAMOGLOBIN, OSTEOPONTIN, FGFR2, PTEN, SIRTUINS, SNAIL, TWIST, ZEB I. P450 2D6, PIK3CA, RETINOIC ACID ALPHA RECEPTOR, STAT3, TIMP-1, LIN28, MICRO ARN.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es en la actualidad una de las principales causas de muerte en las mujeres, aunque se ha observado una sustancial reducción de las tasas de mortalidad en las últimas décadas. La aplicación de tratamientos médicos ayudantes cada vez más efectivos es uno de los principales factores responsables de esta reducción, pese a la creciente incidencia del cáncer mamario. Como resultado de los programas de rastreo mamográfico de rutina, se ha registrado una mayor detección de cánceres de mama en estadio precoz (<2 cm) con ganglios axilares negativos, que conservan un mejor pronóstico. Si bien ello contribuye significativamente a la mejoría de los resultados, también implica desafíos respecto de la elección del tratamiento en su guante óptimo. La tasa de recidivas luego del tratamiento quirúrgico exclusivo en pacientes con cáncer mamario detectado en estadios precoces es relativamente baja, debiendo tenerse en cuenta la estimación individual del beneficio absoluto de la quimioterapia sistémica al enfrentar las decisiones terapéuticas. Es muy importante evitar el sobretreatmento en pacientes que solo reciben modestos beneficios asociados a significativos

eventos tóxicos colaterales. Por otra parte, deben evitarse también el subtratamiento o el tratamiento incorrecto, lo que hace necesario definir características específicas que orienten al médico respecto de una optimización terapéutica individual.

Las características clásicas clinicopatológicas vinculadas con el pronóstico de la paciente incluyen el tamaño tumoral, el subtipo y grado histológicos, las metástasis ganglionares y la invasión linfovascular, derivadas de un análisis histológico cuidadoso de las muestras obtenidas del cáncer mamario primario. El sistema TNM (tamaño tumoral, ganglios, metástasis) integra estos factores en estadios tumorales que tienen valor pronóstico fundamental (Tabla I). Sin embargo, se proponen e investigan continuamente nuevos biomarcadores con fines pronósticos y predictivos. No obstante, solo unos pocos han sido incorporados a la práctica clínica debido a la insuficiente validación para alcanzar los niveles de evidencia I o II, de acuerdo con el Sistema de Gradación de la Utilidad de los Marcadores Tumorales de la Sociedad Americana de Oncología Clínica⁽¹⁾ (American Society of Clinical Oncology's Tumor Marker Utility Grading System). De acuerdo con este sistema, solo 2 biomarcadores,

el receptor estrogénico (ER) y el receptor tipo 2 para el factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) han sido establecidos y evaluados rutinariamente en cada cáncer mamario. Pero la identificación de nuevos marcadores ha llevado a una más profunda comprensión de la biología tumoral y subraya la importancia de los marcadores existentes. Para

facilitar la futura búsqueda de biomarcadores, se publicó en 2005 una guía con recomendaciones respecto de los estudios de marcadores tumorales de tipo pronóstico (REMARK), que recomienda la descripción de la cantidad de información que debería ser provista al informar los resultados de los estudios con biomarcadores.⁽²⁾

Tabla I. Clasificación TNM del cáncer mamario. 2014*

T (tamaño tumoral)

- Tx El tumor primario no puede ser evaluado.
- T0 Sin evidencias del tumor primario.
- Tis Se refiere al carcinoma *in situ*. El cáncer se limita a los conductos o los lobulillos del tejido mamario y no se ha diseminado al tejido circundante de la mama. Hay tres tipos de carcinoma de mama *in situ*:
- Tis (DCIS): El carcinoma ductal *in situ* (DCIS) es un cáncer no invasivo, pero, si no se lo extirpa, más adelante puede avanzar a un cáncer de mama invasivo. DCIS significa que se han encontrado células cancerosas en los conductos mamarios y que estas no se han diseminado más allá de la capa de tejido donde se originaron.
 - Tis (LCIS): El carcinoma lobular *in situ* (LCIS) describe las células anormales que se encuentran en los lobulillos o las glándulas de la mama. El LCIS no es una neoplasia, pero aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de mama invasivo.
 - Tis (Enfermedad de Paget): La Enfermedad de Paget del pezón es una forma rara de cáncer de mama precoz, no invasivo, que se limita a las células cutáneas del pezón. En algunos casos, la Enfermedad de Paget está asociada con un cáncer de mama invasivo subyacente. Si también hay un cáncer de mama invasivo, se la clasifica en función del estadio del tumor invasivo.
- T1 La parte invasiva del tumor en la mama mide 20 milímetros (mm) o menos en su dimensión más ancha (un poco menos que una pulgada). Este estadio se divide, entonces, en tres subestadios según el tamaño del tumor:
- T1a (el tumor mide más de 1 mm y hasta 5 mm o menos).
 - T1b (el tumor mide más de 5 mm y hasta 10 mm o menos).
 - T1c (el tumor mide más de 10 mm y hasta 20 mm o menos).
- T2 La parte invasiva del tumor mide más de 20 mm pero menos de 50 mm.
- T3 La parte invasiva del tumor mide más de 50 mm.
- T4 El tumor se ha extendido a la pared torácica (llamado T4a) o a la piel (llamado T4b). Si hay signos de ambos casos, se llama T4c, y el cáncer de mama inflamatorio se denomina T4d.

N (ganglios)

- NX Ganglios linfáticos regionales no evaluables.
- N0 Ganglios linfáticos regionales sin metástasis.
- N0(i+): Cuando en un ganglio linfático se encuentran depósitos muy pequeños de células tumorales ? aisladas? (menos de 0,2 mm o menos de 200 células), los ganglios siguen llamándose N0, pero se agrega una ? i+? después de la denominación.

(continúa)

Tabla I. Clasificación TNM del cáncer mamario. 2014 (continuación)

- N1 N1mic: El cáncer de los ganglios linfáticos mide más de 0,2 mm pero menos de 2 mm (microscópico).
 N1: El cáncer se ha diseminado a uno a tres ganglios linfáticos axilares. Esta categoría puede incluir ganglios linfáticos mamaros internos positivos, si se los detecta durante un procedimiento de ganglios linfáticos centinela y no mediante otras evaluaciones clínicas.
- N2 El cáncer se ha diseminado a un número de cuatro a nueve ganglios linfáticos axilares (N2a) o a ganglios linfáticos mamaros internos clínicamente apreciables (N2b) sin diseminación a los ganglios axilares.
- N3 El cáncer se ha diseminado a 10 o más ganglios linfáticos axilares o a los ganglios linfáticos infraclaviculares (N3a), o bien, el cáncer se ha diseminado a los ganglios mamaros internos con compromiso de ganglios axilares (N3b) o a los ganglios linfáticos supraclaviculares (N3c).

M (metástasis a distancia)

- MX La presencia de metástasis a distancia no puede ser evaluada.
- M0 Sin metástasis a distancia.
 M0 (i+): No hay evidencia clínica ni radiográfica de metástasis a distancia, pero se encuentra evidencia microscópica de células tumorales en la sangre, la médula ósea u otros ganglios linfáticos de un tamaño de hasta 0,2 mm en una paciente sin otra evidencia de metástasis.
- M1 Metástasis a distancia presentes.

* Nota: desde la redacción de la presente monografía hasta el día de hoy, la clasificación TNM ha sufrido algunas modificaciones. La actual clasificación de N (ganglios) es la siguiente:

Ganglios linfáticos regionales (N)

Clasificación clínica (cN)

- Nx No se pueden valorar los ganglios regionales
- N0 Ausencia de metástasis linfática regional
- N1 Metástasis ipsilateral axilar movable
- N2
 N2a Metástasis ipsilaterales niveles I y II axilares fijos
 N2b Afectación mamaria interna sin ganglios axilares
- N3
 N3a Metástasis axilares infraclaviculares (grado III) ipsilaterales
 N3b Metástasis en ganglios de mamaria interna ipsilaterales y axilares
 N3c Metástasis ipsilaterales supraclaviculares

Clasificación patológica (pN)

- pNx No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales
- pN0 Sin evidencia histológica de metástasis en ganglios linfáticos regionales
- pN0 (i-) Sin evidencia histológica e inmunohistoquímica (IHC)
- pN0 (i+) Presencia de células tumorales ≤ 0,2 mm mediante H-E o IHC
- pN0 (mol-) Ausencia histológica y molecular de metástasis
- pN0 (mol+) Ausencia histológica e IHC negativa con hallazgos moleculares positivos

pN1 Micrometástasis

- pN1mi Micrometástasis (> 0,2 mm y/o más de 200 células, pero < 2,0 mm)
- pN1a Metástasis en 1-3 ganglios axilares y al menos una de ellas > 2 mm
- pN1b Metástasis en ganglios mamaros internos con afectación micrometastásica-macrometastásica del ganglio centinela sin detección clínica
- pN1c Metástasis en 1-3 ganglios axilares y mamaros internos con afectación micrometastásica-macrometastásica del ganglio centinela sin detección clínica
- pN2 Metástasis en 4-9 ganglios axilares o afectación mamaria interna clínicamente sin afectación axilar
- pN2a Metástasis en 4-9 ganglios axilares (al menos uno > 2 mm)
- pN2b Metástasis en ganglios linfáticos de mamaria interna detectados clínicamente sin afectación ganglios axilares
- pN3
 pN3a Metástasis en ≥ 10 ganglios axilares (al menos uno > 2 mm) o metástasis en ganglios infraclaviculares (ganglio axilar de grado III)
- pN3b Metástasis en > 3 ganglios axilares y mamaros internos detectados clínicamente, o > 3 ganglios axilares o afectación de cadena mamaria interna (micrometástasis-macrometástasis ganglio centinela) sin detección clínica
- pN3c Metástasis linfática supraclavicular ipsilateral.

QUÉ ES UN MARCADOR TUMORAL

Los marcadores tumorales son sustancias biológicas de distinta naturaleza química, sintetizadas y liberadas por las células tumorales o producidas por el huésped en respuesta a la presencia del tumor. Como antecedente histórico, cabe destacar que en 1847 se describió la proteína de Bence-Jones en pacientes con plasmocitomas, constituyéndose en el primer marcador tumoral. Coombes y Neville^(3,4) describieron en 1978 las características que debería reunir un marcador tumoral ideal, a saber:

- Su determinación debe ser sencilla y de bajo costo.
- Debe ser específico para el tumor estudiado.
- Debe ser pasible de detección en los estadios iniciales del desarrollo tumoral.
- Debe presentar niveles plasmáticos y/o urinarios estables, sin fluctuaciones importantes.
- Si el marcador se encuentra presente en individuos normales, debe existir en concentraciones muy inferiores a las asociadas con cualquier estadio del cáncer.

La medición de los niveles de los biomarcadores no es suficiente por sí sola para diagnosticar una neoplasia debido a que sus niveles pueden elevarse en ocasiones en pacientes con condiciones benignas. Además, las concentraciones de un biomarcador no se encuentran elevadas en todas las personas con neoplasias, especialmente en las etapas tempranas de la enfermedad. Además, muchos biomarcadores no son específicos de un tipo particular de tumor.

Deben tenerse en cuenta las siguientes propiedades de un biomarcador:

a) *Especificidad diagnóstica*: se trata del porcentaje de resultados negativos en pacientes que no padecen la enfermedad. Valora la capacidad de una prueba de detectar correctamente individuos sanos. Se trata, entonces, del porcentaje de pacientes sin tumor maligno cuando las concentraciones del marcador tumoral son normales.

b) *Sensibilidad diagnóstica*: es el porcentaje de resultados positivos en pacientes con una determinada patología. Valora la capacidad de una prueba para detectar personas enfermas. Por ello, es el porcentaje de pacientes con valores anormales de un marcador tumoral en presencia de una neoplasia.

c) *Valor predictivo positivo*: indica el porcentaje de pacientes realmente enfermos entre todos los que ostentan un resultado positivo. Valora la probabilidad de que un test positivo diagnostique correctamente a la persona enferma.

d) *Valor predictivo negativo*: indica el porcentaje de pacientes no enfermos entre todos aquellos con resultados negativos. Valora la probabilidad de que una prueba negativa diagnostique adecuadamente a un individuo sano.

IMPORTANCIA DEL USO DE BIOMARCADORES CON FINES PRONÓSTICO-PREDICTIVOS

Los marcadores pronósticos y predictivos tienen alta relevancia en la decisión terapéutica orientada hacia el tratamiento individualizado, pero ejercen roles diferentes. Los factores pronósticos y predictivos pueden derivar tanto de las características de la paciente como del tipo tumoral. Los factores pronósticos intentan predecir en forma objetiva e independiente los resultados clínicos en la paciente independientemente del tratamiento, mientras que los factores predictivos se enfocan en la predicción de la respuesta de la paciente a una intervención terapéutica específica y se asocian con la sensibilidad o resistencia del tumor a esa terapia.

Los marcadores predictivos pueden ser el blanco de una terapia específica en sí misma. Por ejemplo, el oncogen HER2 es el blanco del anticuerpo monoclonal trastuzumab, y la amplificación del HER2 predice una buena respuesta a la terapia anti-HER2. Es importante resaltar que la situación respecto del HER2 es también pronóstica y, como muchos facto-

res, posee significación mixta pronóstica-predictiva. De igual modo, el Ki67, como marcador de proliferación, exhibe un fuerte efecto pronóstico, pero también parece predecir una buena respuesta a la quimioterapia sistémica. En general, los marcadores de pronóstico ayudan a determinar si una paciente requiere tratamiento, y un factor predictivo es de utilidad para decidir cuál tratamiento sería el mejor.

Finalmente, se ha observado la creciente implementación de combinaciones de marcadores para definir pronósticos tratamiento-específicos. Esto es de especial interés para determinar el riesgo residual de recurrencia cuando una paciente es tratada de modo específico y para evaluar la potencial importancia de otras opciones terapéuticas. Se han realizado grandes esfuerzos para discriminar si las pacientes con cáncer mamario temprano ER positivo se beneficiarían realmente de la quimioterapia adicional o si se verían perjudicadas por ella o sus efectos adversos.

CLASIFICACIÓN DE LOS BIOMARCADORES

Según el Consenso Americano de Patólogos de 1999,⁽⁵⁾ los factores de pronóstico y predictivos del cáncer mamario pueden ser clasificados de acuerdo con 3 niveles basados en la fuerza de la evidencia:

a) *Categoría I*: son factores bien sustentados en la literatura, por lo que deben ser utilizados de modo rutinario. Incluyen: el tamaño tumoral, el estatus ganglionar, el grado histológico, el tipo histológico, los receptores hormonales y el recuento de mitosis.

b) *Categoría II*: se trata de factores que, si bien ya han sido evaluados, necesitan aún de una validación estadística más rigurosa, por lo que su uso es optativo. Pueden citarse el HER2/neu, el P53, la permeación vascular o linfática, el Ki67 y el análisis del ADN.

c) *Categoría III*: estos factores no han sido completamente estudiados, o bien no se ha demostrado

aún su valor pronóstico o predictivo. Entre ellos se encuentran: la ploidía, la angiogénesis, el TGF alfa, el BCL-2, la catepsina-D y el Ps2.

Los factores de pronóstico y predictivos han variado con el tiempo debido al avance de las investigaciones básicas, aunque también pueden tenerse en cuenta de modo distinto según el comité de expertos que los evalúe, tal como se describe a continuación:

NIH 1990

Factores de pronóstico: ganglios axilares, tamaño tumoral, receptores hormonales, grado nuclear, tipo histológico, proliferación, fase S, catepsina D.

Factores predictivos: no tratados.

St Gallen's 1995

Factores de pronóstico: ganglios axilares, tamaño tumoral, grado histológico, edad, receptores hormonales.

Factores predictivos: receptores hormonales.

American College of Pathologists (ACP) 1995

Factores de pronóstico: TNM (Tumor, Node, Metastases), tipo histológico, grado histológico de posible valor, proliferación, mitosis, fase S, Ki67-MIB 1, C-erb-2, P53, angiogénesis, invasión vascular.

Factores predictivos: no tratados.

American Society of Clinical Oncology (ASCO) 1996

Factores de pronóstico: ninguna determinación de laboratorio.

Factores predictivos: receptores hormonales.

St Gallen's 1998

Factores de pronóstico: ganglios axilares, tamaño tumoral, grado histológico, grado nuclear, edad, receptores hormonales, invasión linfática/vascular.

Factores predictivos: receptores hormonales.

ACP 1999

Factores de pronóstico: grado histológico, tipo histológico, número de mitosis, receptores hormonales. Factores sin validar: C-erb-2, marcadores de proliferación, invasión vascular y linfática, P53. Factores menos investigados: ploidía, densidad de la microvascularización, EGFr, TGF alfa, BCL-2, pS2, catepsina D.

Factores predictivos: no fueron separados de los factores de pronóstico.

National Institutes of Health (NIH) 2000

Factores de pronóstico: edad, tamaño tumoral, ganglios axilares, tipo histológico, grado patológico estandarizado, receptores hormonales. Sin papel clínico establecido: C-erb-2, P53, invasión vascular, angiogénesis, micrometástasis en ganglios axilares o médula ósea.

Factores predictivos: receptores hormonales. Sin papel clínico establecido: C-erb-2.

Biomarcadores clásicos

Ganglios linfáticos axilares

Se acepta, en general, que las metástasis ganglionares linfáticas axilares son el factor pronóstico aislado más importante para el cáncer de mama primario, dado que existe una clara correlación entre la cantidad de ganglios linfáticos afectados y la evolución clínica de la paciente. En un estudio llevado a cabo en el Breast Center at Baylor College of Medicine en un grupo de pacientes de un banco de tumores, se halló que la supervivencia libre de enfermedad a 5 años en las pacientes sin compromiso ganglionar era de casi el 80% y que, sin tratamiento adyuvante, el 20% de las participantes con 16 o más ganglios linfáticos comprometidos permanecían libres de enfermedad a los 5 años.⁽⁶⁾

La evaluación habitual de los ganglios axilares implica la identificación y el examen anatomopatológico de al menos 6 a 10 ganglios de los niveles I-II

de la axila. Ravdin y colaboradores⁽⁷⁾ demostraron que la edad, la fracción de la fase S en la citometría de flujo y la concentración de receptores estrogénicos podrían aportar mayor información al tamaño del tumor para predecir el estado ganglionar. En la práctica clínica es inevitable la disección quirúrgica de la axila, excepto en pacientes con carcinoma ductal *in situ* puro no extendido, que logran un pequeño beneficio de la cirugía axilar por la baja incidencia de compromiso ganglionar que poseen. La evaluación del estatus ganglionar linfático axilar es un parámetro bien reconocido en el control de las neoplasias mamarias (grado de evidencia A).

La cirugía mínimamente invasiva de la axila, como la biopsia de ganglio linfático centinela, es, en la actualidad, una práctica habitual. La biopsia de ganglio centinela es una estrategia alternativa a la disección axilar sistemática que brinda una evaluación histológica bastante detallada de la axila. Esta puede realizarse por inyección de colorante azul o la inyección de radiocoloides con posterior localización mediante una sonda gamma.^(8,9) La biopsia del ganglio centinela permite obtener entre uno y tres ganglios axilares que pueden ser sometidos a una detallada evaluación anatomopatológica; también incluye habitualmente una citología por impronta intraoperatoria. Luego de la cirugía pueden obtenerse cortes seriados en bloques de parafina, incluyendo una tinción inmunohistoquímica para marcadores de células epiteliales, mejorando la capacidad para detectar enfermedad micrometastásica.

Los ganglios linfáticos regionales pueden clasificarse como macrometástasis (>2 mm), micrometástasis (0,2-2 mm) y células tumorales aisladas (<0,2 mm). Algunos estudios retrospectivos^(10,11) sugieren que las pacientes con micrometástasis en el ganglio centinela tienen el mismo pronóstico que las pacientes con ganglios negativos, mientras que otros⁽¹²⁾ sugieren que el pronóstico es peor. Los estudios poblacionales muestran que el pronóstico de las micrometástasis es intermedio entre el de la

enfermedad sin compromiso ganglionar y los casos N1.⁽¹³⁾

Tamaño tumoral

Se trata de uno de los factores de pronóstico de recidiva a distancia más confiables, en especial en pacientes sin compromiso ganglionar. En general, la tasa de recidiva de la neoplasia se incrementa a medida que aumenta el tamaño del tumor.⁽¹⁴⁾ Se estima que el riesgo de recidiva a distancia es de aproximadamente un 25% en pacientes con tumores inferiores a 2 cm que no han sido sometidas a tratamiento sistémico, aumentando hasta el 35% cuando el tamaño tumoral oscila entre 2 y 2,9 cm, hasta el 45% en tumores de 3 a 3,9 cm, y elevándose a más del 50% en tumores de 4 a 4,9 cm. Según un estudio del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center,⁽¹⁵⁾ las pacientes con tumores de menos de 1 cm ostentan tasas de recidiva a 20 años del 12%, mientras que el National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project⁽¹⁶⁾ asigna una probabilidad de presentar metástasis a distancia del 10% a los tumores de menos de 1 cm. El análisis retrospectivo de más de 10.000 mujeres por la misma fuente⁽¹⁶⁾ halló que 1.259 pacientes con tumores menores de 1 cm mejoraban la supervivencia con tratamiento sistémico, independientemente del estado de los receptores estrogénicos.

La evaluación del tamaño tumoral es un reconocido parámetro para determinar la estrategia a seguir en el cáncer de mama (grado de evidencia A), aunque en aquellos casos menores de 1 cm puede ser necesario determinar otros factores para obtener un pronóstico más fidedigno de las pacientes.

Grado nuclear e histológico

La graduación histológica ha sido criticada por tratarse de una valoración algo subjetiva, por su escasa reproducibilidad y por el escaso acuerdo interobservadores.⁽¹⁷⁾ La existencia de diversos sistemas de graduación no estandarizados dificulta, además,

su utilización como herramienta de pronóstico. Sin embargo, en manos de patólogos experimentados, este parámetro suele correlacionar bien con la evolución clínica.⁽¹⁸⁾ Los sistemas más utilizados son la clasificación de Scarff-Bloom-Richardson (SBR)⁽¹⁹⁾ y la gradación nuclear de Fisher,⁽¹⁸⁾ ambos modificados recientemente. El sistema SBR tiene en cuenta el grado de diferenciación, la extensión pleomórfica y el índice mitótico, asignando a cada ítem entre 1 y 3 puntos: la diferenciación alude a la similitud morfológica del tumor con tejidos diferenciados (tubular, glandular o papilar); la extensión pleomórfica se refiere la forma de la célula y los núcleos; y el índice mitótico tiene en cuenta la cantidad de mitosis por campo de gran aumento en una muestra de tumor, siendo reflejo de la tasa de proliferación de la neoplasia. Las puntuaciones de cada ítem se suman y clasifican como grados 1, 2 y 3. El sistema Nottingham Combined Histologic Grade (NCHG) no tiene en cuenta el grado de diferenciación, pero divide los tumores en 5 grupos según su puntaje; los grados más elevados correlacionan con las tasas de metástasis mayores.⁽²⁰⁾ El sistema de Fisher⁽²¹⁾ sopesa el grado nuclear junto con la presencia de estructuras tubulares o glandulares: el grado nuclear abarca el tamaño y la forma del núcleo, nucléolo, el patrón de cromatina y la tasa de mitosis. Un estudio⁽²¹⁾ describió, tras 8 años, que las pacientes con un buen grado nuclear tenían una supervivencia del 86%, mientras que aquellas con peor grado ostentaban una supervivencia del 64%.

Se han evaluado también otros factores histológicos como la existencia de un carcinoma ductal *in situ* diseminado, invasión linfática, necrosis tumoral y células inflamatorias, demostrándose en ocasiones correlación con la evolución clínica, aunque sin validación. Un estudio⁽²²⁾ que evaluó muestras parafinadas de 177 pacientes describió que la invasión linfovascular se asociaba significativamente con la existencia de metástasis ganglionares linfáticas, un tamaño tumoral mayor, desarrollo de me-

tástasis a distancia, recidiva regional y menores intervalo libre de enfermedad y supervivencia total. El sistema de graduación de elección es el NCHG,⁽²³⁾ que es considerado un factor pronóstico independiente.⁽²⁴⁾ El grado histológico y el NCHG poseen grados de evidencia A.

Subtipos histológicos

Existen tipos histológicos que implican diferentes pronósticos. El cáncer de mama inflamatorio se caracteriza por un rápido inicio con edema y eritema cutáneos, aumento de la mama típicamente generalizado, sin masa dominante y pronóstico pésimo.⁽²⁵⁾ La mayoría de los estudios describen una mediana de supervivencia a 5 años menor al 5% en pacientes con cáncer inflamatorio de mama que recibieron únicamente tratamiento local, con una supervivencia mediana de solo 12 a 36 meses.⁽²⁶⁾

El carcinoma lobulillar invasor parece tener una biología diferenciada. Un estudio con más de 4.000 pacientes mostró que esta neoplasia afectaba más probablemente a pacientes de edad avanzada, que tuviesen un tamaño tumoral más grande, que fuesen receptor estrogénico positivas o receptor para la progesterona positivas, que se asociase con una fracción de fase S baja y que fueran erb-B2, P53 y receptor del factor de crecimiento epidérmico negativas.⁽²⁷⁾

Algunos tipos histológicos especiales (papilar puro, tubular y mucinosos) corresponden a pacientes con un mejor pronóstico, en comparación con el cáncer ductal infiltrante sin tipo especial.⁽²⁸⁾ Los tumores sin compromiso ganglionar de menos de 3 cm y el tipo papilar, mucinoso o tubular puro tienen un riesgo de recidiva a largo plazo menor al 10%.⁽²⁹⁾ Los cánceres medulares tienen mejor pronóstico que los ductales infiltrantes.⁽³⁰⁾ La subtipificación de los cánceres invasores ostenta un grado de recomendación A.

Características de la paciente

Situación frente a la menopausia y edad

Los cánceres de las mujeres posmenopáusicas de edad avanzada tienen concentraciones crecientes de receptor estrogénico, y los tumores son generalmente mejor diferenciados y presentan tasas de proliferación más bajas, con un pronóstico significativamente mejor. Los cánceres que ocurren en mujeres jóvenes menores de 35 años tienen, por el contrario, una evolución clínica peor.⁽³¹⁾ En estas últimas se observan con mayor frecuencia aumento del tamaño tumoral, afectación ganglionar, negatividad para el receptor estrogénico, alta proliferación medida por la fracción de fase S y alteraciones del P53.

Factores raciales

La supervivencia de las mujeres negras, y en menor grado de las hispanas, es peor que la de las blancas. Las primeras presentan enfermedades más avanzadas (tumores de mayor tamaño, positividad ganglionar) y sus tumores tienen mayor agresividad biológica (receptores hormonales negativos e índices de proliferación más altos).⁽³²⁾

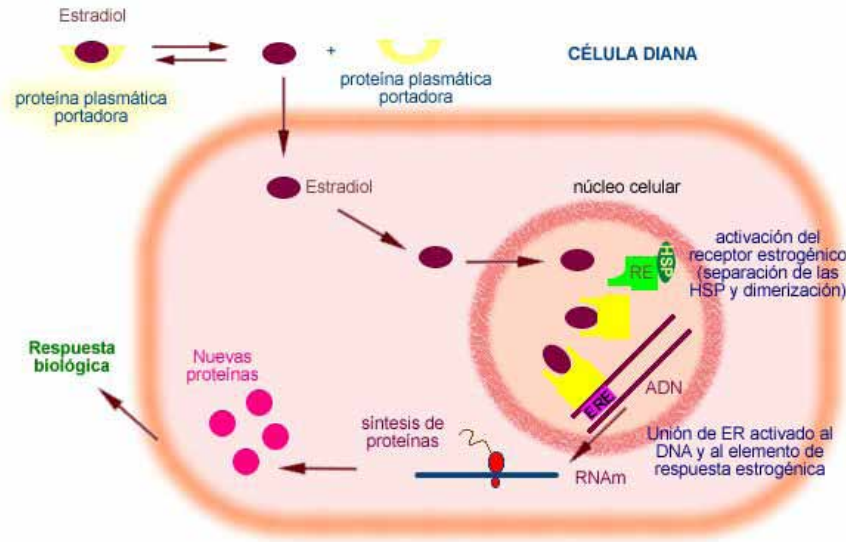
Índices de proliferación

Existen muchas técnicas para evaluar la tasa de proliferación celular: el índice mitótico, el índice de marcación por timidina, la fracción en fase S por citometría de flujo, el índice BrdU y técnicas de inmunohistoquímica con anticuerpos frente a antígenos específicos del ciclo celular, proliferación del antígeno nuclear celular, varias ciclinas y mitosis. El índice mitótico, la fracción de fase S inmunohistoquímica sobre el Ki-67 y el MIB-1 son las más estudiadas.

Índice mitótico

Este consiste en contar la cantidad de cuerpos mitóticos mediante microscopía óptica en muestras de tumor parafinado y teñido con hematoxilina-eosina. Se expresa normalmente como la cantidad de cuerpos mitóticos por campo de gran aumento.

Figura 1. Receptor estrogénico



Índice de marcación con timidina

Se trata del recuento de núcleos marcados en microsecciones autorradiografiadas después de incubar una muestra fresca del tumor con timidina tritiada. El índice determina la cantidad de células que sintetizan ADN durante la incubación, ofreciendo una estimación de la proporción de células en las fases S y G2/M del ciclo celular. Se ha descrito una supervivencia aumentada en pacientes con cáncer de mama sin afección ganglionar y con tumores de proliferación lenta.⁽³³⁾

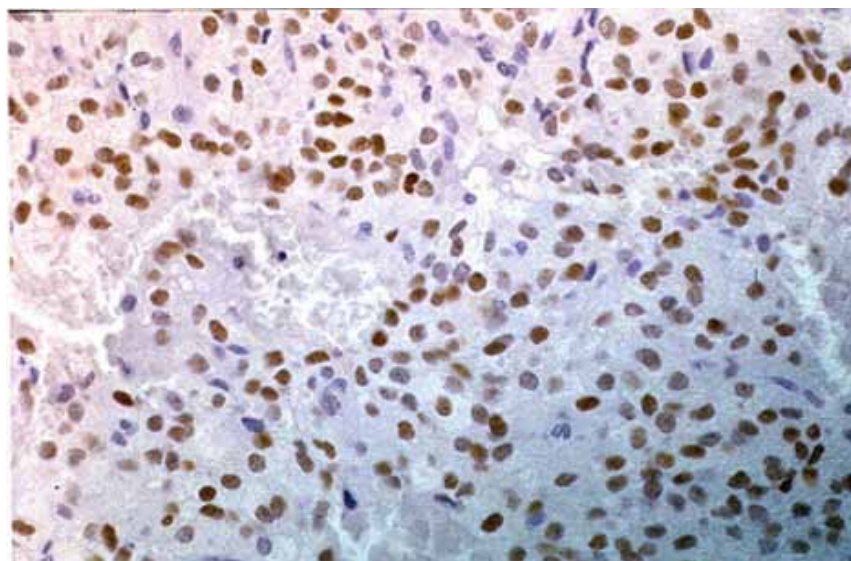
Fracción en fase S por citometría de flujo

Consiste en la determinación de las células que se encuentran en la fase S del ciclo celular, cuando se sintetiza ADN. Calcula la proporción de células con el ADN replicado parcialmente (con más ADN que la cantidad normal de una célula en fase G1 y menos del doble de la cantidad normal, como ocurre en las fases G2/M). Existe sólida evidencia de correlación positiva entre una mala evolución y una fracción de fase S alta.⁽³⁴⁾

Receptores hormonales

Tanto los estrógenos como la progesterona son hormonas fundamentales para el crecimiento de la glándula mamaria. Durante la década de los noventa, sus receptores fueron considerados como factores predictivos y de pronóstico en el cáncer de mama, aunque la primera publicación de importancia al respecto había tenido lugar en la década de 1970.⁽³⁵⁾ Hoy día, el estatus de los receptores hormonales en el cáncer de mama forma parte de la rutina de evaluación de esta neoplasia. Los dos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares, la cual está también integrada por otros receptores de hormonas esteroides, como el receptor de la vitamina E, el del ácido retinoico y el de la hormona tiroidea. Las proteínas que integran este grupo están relacionadas estructuralmente y presentan similitudes notables, tanto en la secuencia de aminoácidos como en sus dominios funcionales. Estos receptores son todos factores de transcripción inducibles que se tornan activos en contacto con su ligando específico⁽³⁶⁾ que poseen cuatro dominios o

Figura 2. Receptores para la progesterona positivos (Ca. lobulillar *in situ*)



módulos a partir del extremo amino terminal: dominio modulador, dominio de unión al ADN, región bisagra y dominio de unión al ligando.

Receptor estrogénico

La identificación del receptor estrogénico data de hace aproximadamente 50 años, cuando fue descrito en 1962 por Jensen y colaboradores. Estos investigadores describieron la presencia de sitios de unión de estrógeno en diversos tejidos u órganos blanco⁽³⁷⁾ (Figura 1). Los estrógenos median sus acciones biológicas a través de dos isoformas del receptor: el receptor alfa (67 kDa) y el beta (57 kDa). Los receptores alfa y beta son codificados por genes distintos, y cumplen papeles completamente diferentes en el cáncer de mama. El receptor estrogénico alfa se comporta como promotor de tumor, mientras que el beta es un supresor tumoral.⁽³⁸⁾ Toda vez que el tejido mamario sufre oncogénesis, las cantidades de receptores estrogénicos alfa aumentan y las del beta disminuyen.⁽³⁹⁾ También se ha demos-

trado que las pacientes con mayor riesgo de cáncer mamario presentan aumento de la expresión del receptor alfa.⁽⁴⁰⁾ El receptor beta disminuiría la carcinogénesis merced a su capacidad de disminuir la expresión de c-myc, ciclina A, ciclina D1 y ciclina E, y de aumentar los niveles de p21 y p27.⁽⁴¹⁾ Por ello, el receptor beta se asocia con un mejor pronóstico y mayor tiempo libre de enfermedad.⁽³⁸⁾

Receptor para la progesterona

El receptor de progesterona también pertenece a la superfamilia de receptores nucleares. Dado que su transcripción se halla regulada por los estrógenos, su expresión es considerada como un marcador de la actividad estrogénica en la mama (Figura 2). Este receptor posee también 2 isoformas: el receptor de progesterona A (94 kDa Dalton) y el B (116 kDa). Ambos se encuentran expresados en el tejido mamario normal en concentraciones equimolares, lo cual implica que son esenciales para la normal señalización fisiológica de la progesterona.⁽⁴²⁾ Las 2 isoformas difieren en cuanto a su funcionalidad,

ya que las diferencias en las secuencias amino terminales alteran la sensibilidad de unión a los sitios blanco. Así, el receptor B se comporta como un factor de transcripción; el A, al tener escasa o nula acción intrínseca, desempeña un papel modulador del B. Se ha señalado que la relación entre la proporción de ambos receptores se encuentra alterada en las neoplasias mamarias.⁽⁴³⁾ El punto de corte para definir a un tumor como positivo o negativo puede variar, y algunos investigadores consideran que un tumor con una expresión de receptores hormonales menor del 10% es negativo. Estos puntos de corte (entre 1 y 10%) permiten destacar al subgrupo denominado *borderline*.

La unión de los estrógenos y la progesterona a sus respectivos receptores determina cambios en las funciones celulares, pese a que el mecanismo de acción de dichas hormonas es de dos tipos diferentes: el efecto genómico y el no genómico. A través de la vía genómica, los estrógenos actúan mediante los receptores alfa y beta y, para que eso ocurra, forman homodímeros o heterodímeros; si se unen isoformas distintas, se tratará de heterodímeros. La activación del complejo hormona-receptor y su ulterior hibridización desencadenará una respuesta hormonal determinada mediante la activación o inhibición de genes merced a su acción sobre los elementos de respuesta (regiones promotoras de genes determinados). La respuesta genómica ocurre en horas. La vía genómica de la progesterona es similar a la estrogénica y a la de otros esteroides.

En la vía no genómica, los estrógenos actúan por intermedio de receptores ubicados en la membrana plasmática o próximos a ella, y está dada por estimulación de la MAPK (*mitogen activated protein kinase*) a través de la activación de la tiroxina cinasa, la inducción de la síntesis de AMP cíclico, la unión a las proteínas G, resultando en el incremento del calcio intracelular, el óxido nítrico o la activación de varias cascadas de cinasas intracelulares. Varios procesos celulares complejos, como la proliferación, apoptosis, motilidad celular y la diferenciación, son

modulados por esta vía, que es mucho más rápida que la anterior.

Inicialmente, los receptores hormonales eran determinados por el método bioquímico del carbón-dextrán. Dada su complejidad técnica y la gran cantidad de material fresco y congelado necesario para llevar a cabo la prueba, su determinación recayó en la inmunohistoquímica y los anticuerpos monoclonales. La inmunohistoquímica es de realización técnica más simple, menos costosa, más segura y es aplicable a varias muestras fijadas e incluidas; además, resulta más eficaz para predecir la respuesta al tratamiento con tamoxifeno. La reacción positiva a los receptores estrogénicos y progestacionales se hace evidente a través de un precipitado en el núcleo celular.

De este modo, los receptores hormonales comenzaron a ser determinados en tejidos fijados con formaldehído e incluidos en parafina, con buena correlación.⁽⁴⁴⁾ De este modo, dichos receptores pueden determinarse en cortes del tumor primario o metastásico bien preservados, y aun en material de biopsias histológicas realizadas con aguja gruesa.

Es bien conocida la asociación entre el estatus de los receptores hormonales y el comportamiento tumoral. Así, los tumores con receptores hormonales positivos son más diferenciados, presentan ADN diploide, bajo potencial de proliferación y menor tendencia a la diseminación visceral. La ausencia de receptores correlaciona con neoplasias poco diferenciadas, aneuploidía, con alta fracción proliferativa y mayor propensión a las metástasis a distancia.⁽⁴⁵⁾

Los tumores con receptores hormonales positivos presentan un mejor pronóstico en cuanto a la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global. Se ha señalado una diferencia absoluta del 8-10% en cuanto a la supervivencia libre de enfermedad entre mujeres con cánceres de mama con receptores positivos, en comparación con aquellos con receptores negativos.⁽⁴⁶⁾

El estatus de los receptores hormonales en el tumor no solo desempeña un papel como factor

pronóstico sino que se comporta también como un factor altamente predictivo de la respuesta adecuada al tratamiento hormonal, tanto en tumores primarios como en las metástasis.⁽⁴⁷⁾ Así, la expresión positiva de los receptores estrogénicos y progestacionales guarda relación con tumores de bajo grado histológico que responden al tratamiento hormonal, especialmente en pacientes posmenopáusicas. Se estima que el 77% de las pacientes con tumores receptor estrogénico positivos y receptor progestacional positivos responden a la terapia hormonal, mientras que el 27% responde cuando se trata de tumores receptor estrogénico positivos y receptor para la progesterona negativos; el 46% responde en el caso de tumores receptor estrogénico negativo y receptor progestacional positivo, 10% cuando ambos receptores son negativos; por último, el 11% de las pacientes no responde cuando los 2 receptores son positivos.⁽⁴⁸⁾

Los tumores receptor estrogénico negativos suelen ostentar bajos niveles de receptores a la progesterona, lo cual avala la hipótesis de que la síntesis del receptor de la progesterona depende de la actividad estrogénica. Los receptores de la progesterona se asocian con implicaciones de pronóstico similares a las de los receptores estrogénicos, y son determinadas en conjunto, ya que mejoran el valor predictivo del método.

Receptores del factor de crecimiento

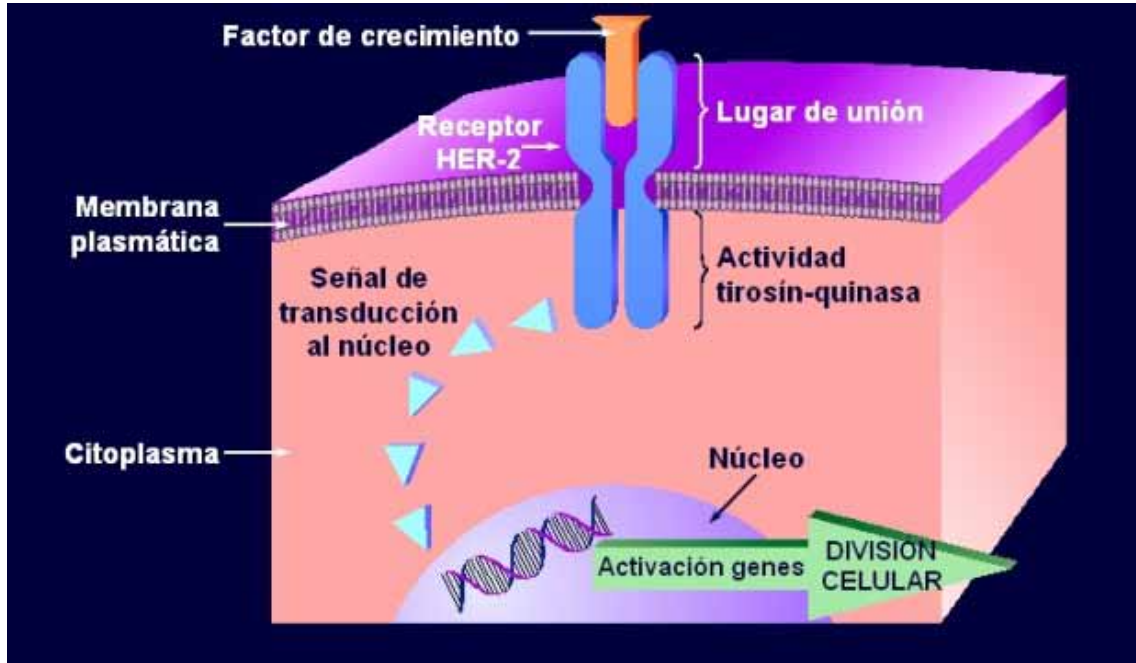
HER2/neu

Se trata de un receptor transmembrana de tipo proteico, con actividad tirosina cinasa (185 kDa); su ADN conforma un protooncogen, el cual se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma 17 (17q 21). Este receptor pertenece a la misma familia que el factor de crecimiento epidérmico,⁽⁴⁹⁾ integrada por HER1 (erb-B1), HER2 (erb-B2), HER3 (erb-B3) y HER4 (erb-B4), a la que debe su denominación (*Human Epidermal Growth Factor*). El receptor HER2/neu posee un dominio extracelular de unión

al ligando, otro intracelular con función tirosina cinasa involucrado en la transducción de señales, y un tercero transmembrana. HER2/neu carece de un ligando natural, y su activación requiere la formación de dímeros que serán homo u heterodímeros según se produzca con otros receptores de la misma familia o no; cabe señalar que la heterodimerización logra una señalización más poderosa (Figura 3). Cuando ocurre amplificación del gen, se observa sobreexpresión del receptor en la membrana celular, que resulta en una mayor posibilidad de dimerización y posterior activación y amplificación de la señal. Estos procesos llevarán a la activación celular en exceso, aumento de la proliferación, modificaciones de la adhesividad celular y resistencia a la apoptosis⁽⁵⁰⁾ merced a distintas vías de señalización intracelulares como RAS MAPK, AKT/Pi3K y AKT/pTEN. La activación puede producirse también por la acumulación de formas truncadas del HER2/neu, pudiendo ser el origen de esos fragmentos el resultado de la proteólisis del dominio extracelular del receptor, u obedecer a un fenómeno de transducción en sitios alternativos, determinando así una variante de la proteína original. Algunos procesos proteolíticos pueden escindir el receptor, separando el dominio extracelular, una proteína de 105 kDa; el fragmento retenido, llamado p95, se encuentra fosforilado, por lo que mantiene activo su mecanismo tirosina cinasa; ⁽⁵¹⁾ se sabe que su sobreexpresión ocasiona tumores resistentes al trastuzumab.⁽⁵²⁾ Un tumor primario puede no expresar la proteína HER2/neu, pero las metástasis resultantes de su extensión pueden hacerlo, mientras que si un tumor primario expresa la proteína, dicha propiedad se mantiene en todas las metástasis de ese tumor.⁽⁵³⁾

Los tumores HER2/neu positivos se identifican merced a la amplificación de su genoma o a la observación de sobreexpresión de esa proteína, dando cuenta del 10-30% de todos los carcinomas invasores mamarios.⁽⁵⁴⁾ Las anomalías en la amplificación del gen HER2/neu o la sobreexpresión de su proteína

Figura 3. Receptor HER2/neu



son detectadas mediante técnicas como la inmunohistoquímica (IHQ), FISH (*Fluorescence In-Situ Hybridization*), CISH (*Chromogenic In-Situ Hybridization*), PCR-RT (PCR en tiempo real) y ELISA.⁽⁵⁵⁾

La IHQ permite valorar la expresión proteínica en tejidos fijados con formaldehído e incluidos en parafina y en muestras congeladas. Se trata de un método cualitativo y semicuantitativo que valora la presencia del receptor en las células tumorales merced al empleo de anticuerpos monoclonales, expresándose sus resultados en cruces (0-3 cruces): se considera positivo (3 cruces) cuando se observa tinción intensa y uniforme de la membrana en más del 10% de las células neoplásicas,⁽⁵⁶⁾ mientras que es negativo (0-1 cruces) cuando es menor; un valor de 2 cruces exige reevaluación por el método FISH. Se considera que un cuarto de los tumores con IHQ de 2 cruces poseen amplificación génica comprobable por FISH, y, por tanto, se beneficiarán con un tratamiento blanco específico. La sobreexpresión del HER2/neu varía en

los distintos tipos tumorales, por lo que su expresión puede ser heterogénea dentro de un mismo tumor, situación habitualmente subestimada.⁽⁵⁷⁾

La evaluación genética se lleva a cabo en muestras fijadas empleando las técnicas FISH o CISH. Si bien ambos son métodos universalmente aceptados, se desconoce si su valor es indistinto.⁽⁵⁸⁾ El método FISH valora la cantidad de copias del gen HER2/neu, así como su nivel de amplificación; se utiliza generalmente para confirmar los resultados previos derivados de IHQ, y se lo emplea también como ensayo inicial para el diagnóstico. FISH proporciona, en comparación con IHQ, información de diferente nivel, ostentando cada uno ventajas y desventajas.⁽⁵⁹⁾ Se consideran tumores FISH positivos a aquellos cuyas células muestran 2 o más copias del gen HER2 por cada copia del cromosoma 17 y a los que exhiben cuatro o más copias cuando no se emplea el cromosoma 17 como control.⁽⁵⁶⁾ Por su parte, se consideran tumores CISH positivos a los

que muestran más del 50% de las células evaluadas con 5 o más copias del gen HER en cada núcleo.

Métodos empleados para determinar el HER2/neu

El método ELISA fue aprobado por la FDA estadounidense (Food and Drug Administration) para determinación del HER2/neu en el torrente sanguíneo de las pacientes con cáncer mamario. Si bien la determinación sérica del HER2/neu permite medir en sangre la proteína p95, es necesario profundizar los estudios para la determinar su verdadera utilidad en la identificación de pacientes que podrían beneficiarse con un tratamiento blanco específico.

El receptor HER2/neu interviene en la patogénesis y la progresión tumoral en diversos cánceres, entre ellos el mamario. La sobreexpresión de este receptor se asocia con un alto grado histológico, nuclear, mitótico, así como con invasión linfohemática peritumoral, necrosis, independencia hormonal y mutación del P53, por lo que resulta en un fenotipo tumoral más agresivo.⁽⁶⁰⁾ La presencia de HER2/neu se asocia con un pronóstico poco favorable, menor respuesta a la terapia, menor supervivencia global y menor supervivencia libre de enfermedad, en comparación con los tumores HER2/neu negativos.

Un estudio⁽⁶¹⁾ evaluó muestras archivadas de más de 1.000 pacientes, pudiendo relacionar a HER2/neu con otros factores de mal pronóstico. El ensayo NSABP B-06 mostró una diferencia significativa en la supervivencia global de las pacientes de acuerdo con la positividad o negatividad del HER2/neu en los tumores primarios. Los investigadores hallaron que HER2/neu se comportaba como un factor independiente de pronóstico respecto de la supervivencia; las mujeres con cánceres HER2/neu positivos evolucionaron significativamente peor, ostentando tasas de mortalidad que duplicaban a las de las pacientes con tumores que no sobreexpresaban ese marcador.

Se acepta que la sobreexpresión o la amplificación del receptor HER2/neu permite identificar a las mujeres que se beneficiarán con tratamientos

basados en antraciclinas, en comparación con el esquema CMF (ciclofosfamida, metotrexato y fluorouracilo). Dada la significación de este efecto positivo, las antraciclinas devinieron el estándar terapéutico en estos casos,⁽⁶²⁾ mientras que en los cánceres HER2/neu negativos no se observan diferencias entre las dos terapias. Gennari y colaboradores mostraron en un meta-análisis que los resultados respecto de la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad después de la quimioterapia con antraciclinas o sin ellas favorecían a la primera solo en los casos de tumores HER2/neu positivos. El tratamiento con antraciclinas de mujeres con neoplasias HER2 positivas produjo una mejoría respecto del riesgo de recidiva y en la supervivencia cercana al 30%. Los beneficios obtenidos con el empleo del CMF son inferiores en los tumores HER2/neu positivos.⁽⁶³⁾

Existen controversias respecto del potencial beneficio del empleo de esquemas con taxanos en cánceres HER2/neu positivos. Mientras que algunos ensayos han sugerido mejorías en la respuesta a docetaxel o paclitaxel,⁽⁶⁴⁾ otros demostraron resistencia. Un reciente ensayo⁽⁶⁴⁾ describió un mayor beneficio luego del agregado de paclitaxel adyuvante después de 4 ciclos de doxorubicina más ciclofosfamida en mujeres con ganglios axilares positivos y sobreexpresión del HER2/neu.

Consideraciones respecto de la terapia endocrina

La mitad de los cánceres mamarios HER2/neu positivos expresan también receptores hormonales, y el 10% de los tumores con receptores hormonales positivos lo son también para el receptor HER2/neu.⁽⁶⁵⁾ Se cree que la sobreexpresión del gen en neoplasias con receptores hormonales positivos conlleva cierta resistencia a la hormonoterapia, especialmente al tamoxifeno.⁽⁶⁶⁾ Se ha sugerido que la activación de los receptores HER2/neu determinaría la amplificación de la señal derivada de los receptores hormonales en cánceres hormono-positivos, evitando el efecto inhibitor de los antiestrógenos y los

tratamientos de supresión hormonal al establecer un crecimiento tumoral independiente del estímulo estrogénico.⁽⁶⁷⁾

Investigadores del GUN-1 (Gruppo Universitario Napolitano)⁽⁶⁶⁾ describieron la influencia negativa de la terapia con tamoxifeno durante 2 años en las neoplasias mamarias HER2/neu positivas. El ensayo Tran-ATAC⁽⁶⁴⁾ describió la superioridad terapéutica de anastrozol frente al tamoxifeno en el subgrupo de pacientes HER2/neu positivas, similar a la observada en la población HER2/neu negativa. Estos hallazgos concuerdan con los descritos en el ensayo BIG 1-98, el cual reveló que los beneficios de los inhibidores de la aromatasas (letrozol frente a tamoxifeno) eran independientes de la sobreexpresión del HER2/neu.⁽⁶⁸⁾ Se cree que la deficiente respuesta de los tumores HER2/neu positivos al tratamiento hormonal se limitaría a los fármacos cuyo mecanismo de acción depende de la competencia con el receptor, como sucede con el tamoxifeno, mientras que ello no ocurriría en los casos que originan depleción del ligando, como los inhibidores de la aromatasas.

Trastuzumab

Este anticuerpo monoclonal recombinante IgG ostenta una elevada especificidad, sensibilidad y afinidad por el receptor HER2/neu. Su efectividad sobre los tumores HER2/neu positivos obedecería a la inducción de toxicidad mediada por anticuerpo, la prevención de la formación del segmento truncado p95, el bloqueo de la proliferación inducida por HER2 y la inhibición de la angiogénesis mediada por HER2. Trastuzumab fue aprobado en 1998 por la FDA para el tratamiento de cánceres mamarios avanzados HER2/neu positivos, en 2006 para adyuvancia en casos con compromiso ganglionar axilar, y en 2008 para los casos sin afección ganglionar. Numerosos ensayos multicéntricos (NSABP B-31, NCCTG N9831, HERA, BCIRG 006 y FIN-HER) han convalidado la efectividad de trastuzumab. Un meta-análisis de Viani y colaboradores, llevado a cabo sobre los estudios antes des-

critos,⁽⁶⁹⁾ concluyó que la adición de trastuzumab a la terapia adyuvante se asociaba con la reducción significativa de la mortalidad (48%) y las recurrencias (47%). Un meta-análisis de Dahabreh y colaboradores⁽⁷⁰⁾ halló un significativo aumento de la supervivencia libre de enfermedad con el empleo de trastuzumab (HR = 0,62), así como la disminución significativa de la tasa de mortalidad (HR = 0,66) y la tasa de recurrencia locorregionales (HR = 0,58) y a distancia (HR = 0,60). Se ha descrito que la asociación de anastrozol con trastuzumab logra mejores resultados que anastrozol en monoterapia, en pacientes con tumores que coexpresan receptores hormonales y HER2/neu.

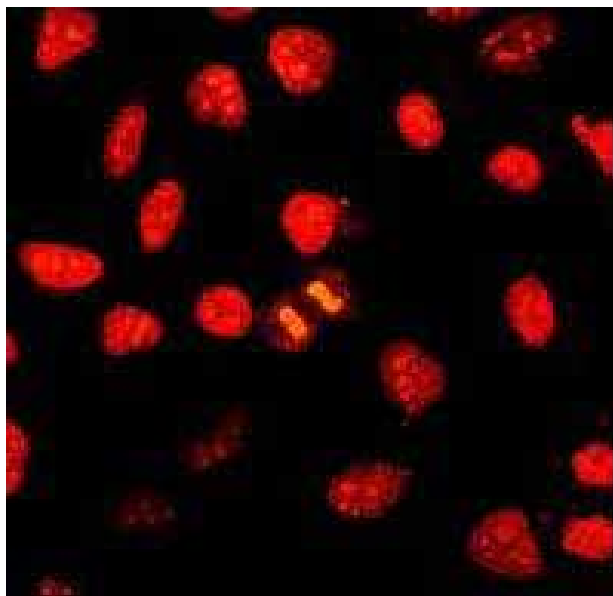
Otros agentes terapéuticos selectivos para HER2/neu incluyen pertuzumab (un inhibidor de la dimerización de los receptores HER), trastuzumab-DM1 (que añade el derivado anti microtubular DM1) y lapatinib (bloqueador del dominio intracelular HER2/neu).

Nuevos biomarcadores

Ki67

El marcador de proliferación Ki67 fue identificado en primer término por Gerdes y colaboradores en 1983 utilizando un anticuerpo monoclonal murino contra un antígeno nuclear hallado en líneas celulares de linfoma Hodgkin. El Ki67 es una proteína nuclear no histona cuya propiedad de expresarse universalmente en células proliferativas y hallarse ausente en células quiescentes llevó a su estudio como marcador de proliferación. La proteína Ki67 es expresada durante las fases G1, S y G2 del ciclo celular, con un pico durante la mitosis y virtual ausencia durante la fase G0.⁽⁷¹⁾

Los niveles de expresión de Ki67 son informados como porcentaje de los núcleos celulares tumorales teñidos positivamente, sin que se haya definido una metodología estándar o un punto de corte para este marcador (Figura 4).

Figura 4. Marcación del Ki67 por inmunofluorescencia

Se estima que valores de Ki67 mayores al 14% correlacionarían con grados nucleares elevados, receptores hormonales negativos y HER2 positivo. Se ha estudiado ampliamente la correlación de Ki67 y otros biomarcadores en el cáncer mamario invasor. No es de sorprender que, dado que el sistema de graduación de Nottingham define la tasa mitótica como uno de sus 3 criterios,⁽⁷²⁾ exista una buena correlación con el grado tumoral. La relación con el receptor estrogénico se ha descrito mayormente como una correlación inversa con una menor actividad proliferativa de los tumores receptor estrogénico positivos.⁽⁷³⁾

Muchos estudios investigaron también el posible papel pronóstico para el marcador proliferativo Ki67 en el cáncer mamario. Una revisión de 40 ensayos que involucraba a más de 11.000 pacientes⁽⁷⁴⁾ describió una fuerte evidencia de la capacidad del Ki67 como variable única para distinguir entre buenos y malos resultados en el grupo de pacientes con ganglios axilares negativos. Desafortunadamente, esta capacidad no fue significativa en el análisis de

variables múltiples en todos los estudios incluidos. Otro meta-análisis que incluyó la supervivencia libre de enfermedad proveniente de 29 estudios confirmó el efecto adverso sobre la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad en casos de tinción positiva para el Ki67, tanto en cánceres mamarios con ganglios axilares positivos como negativos.⁽⁷⁵⁾ Un análisis de 15.790 casos incluidos en 43 estudios informó asociación entre la positividad para el Ki67 y una menor supervivencia global; pese a eso, la tinción para Ki67 no se recomienda como marcador pronóstico de uso rutinario.⁽⁷⁶⁾

En la actualidad, se encuentran en estudio nuevas estrategias consistentes en la combinación de marcadores establecidos con nuevos factores. Una de ellas es el inmunopanel de receptor estrogénico, receptor a la progesterona, HER2 y Ki67, que demostró capacidad para distinguir entre los subtipos Luminal A y B de modo similar a la firma de 50 genes original.⁽⁷⁷⁾ Tanto en tumores mamarios tempranos como localmente avanzados, los niveles basales de Ki67 predijeron la respuesta a la quimioterapia, aunque no en el caso de tratamientos endocrinos.⁽⁷⁸⁾ Hallazgos de Weigel y colaboradores indican que la medición posterior a la quimioterapia neoadyuvante es un fuerte predictor de supervivencia libre de recurrencias y supervivencia global. Sin embargo, un alto puntaje previo al tratamiento se asocia con mayores probabilidades de lograr una pCR (respuesta completa patológica), siendo predictor de resultados a largo plazo en estas pacientes.⁽⁷⁹⁾

En el ensayo BIG I-98 de letrozol vs. tamoxifeno, el beneficio absoluto del primero sobre el segundo fue mayor cuanto más elevados eran los niveles de Ki67.⁽⁸⁰⁾

Recientes estudios acerca de la terapia endocrina neoadyuvante han evaluado el uso de mediciones seriadas de Ki67, hallando que la detección de cambios en sus niveles predice los beneficios terapéuticos y subraya el papel de la medición precoz del Ki67 durante el tratamiento con un predictor su-

perior de resultados a largo plazo, en comparación con la expresión pretratamiento. En este contexto, los resultados del ensayo IMPACT mostraron que la disminución del Ki67 era mayor en las semanas 2 y 12 del tratamiento con letrozol, en comparación con tamoxifeno o la combinación de las 2 drogas.⁽⁸¹⁾ El ensayo IMPACT mostró, de igual modo, mayor eficiencia de letrozol vs. tamoxifeno y la combinación de ambos, tal como se había observado en el estudio adyuvante ATAC, donde las pacientes asignadas solo a anastrozol habían mostrado una prolongada supervivencia libre de recurrencias.⁽⁸²⁾ Los mayores niveles de Ki67 luego de 2 semanas de tratamiento endocrino se vincularon con menores tasas de supervivencia libre de recurrencia, y los valores pretratamiento no agregaron información extra de pronóstico.⁽⁸³⁾ Este concepto fue evaluado posteriormente en cuanto al tratamiento endocrino perioperatorio por el ensayo POETIC, cuyo principal propósito era determinar si la medición de Ki67 luego de dos semanas de tratamiento prequirúrgico con letrozol era más predictivo que en ausencia de tratamiento.

Ciclina D1

La ciclina D1 se encuentra sobreexpresada en el ARN mensajero y al nivel proteico en más del 50% de los cánceres mamarios, incluyendo 15% en los cuales ocurre amplificación génica.⁽⁸⁴⁾ Las células en fase G1 del ciclo celular reaccionan a la estimulación con factor de crecimiento a través de la inducción de una ciclina del tipo D.⁽⁸⁵⁾ Así, la ciclina D1 se une a la cinasa ciclina dependiente, produciéndose la fosforilación de varios sustratos, incluyendo la proteína RB.⁽⁸⁶⁾ Esto contribuye a la regulación de la transición entre las fases G1 y S del ciclo celular. La ciclina D1 regula la proliferación de las células respondedoras a los estrógenos,⁽⁸⁷⁾ y se ha descrito una fuerte correlación positiva con los niveles de expresión de receptores estrogénicos y de la progesterona.⁽⁸⁸⁾ Cabe resaltar que, mientras que existe una

fuerte evidencia de que la sobreexpresión de la ciclina D1 es un factor pronóstico de mejores resultados en el cáncer mamario invasor, particularmente en pacientes receptor estrogénico positivas,⁽⁸⁹⁾ su amplificación se asocia con recidivas tempranas y mal pronóstico.⁽⁹⁰⁾ Se ha descrito un posible valor predictivo de la ciclina D1 en pacientes con tumores hormonales positivos; la sobreexpresión, así como la amplificación, son predictores de mala respuesta a los tratamientos antiestrógenos.

Ciclina E

La ciclina E actúa de modo similar a la D1 como regulador positivo de la transición del ciclo celular, con niveles pico de expresión proteica y formación de complejos enzimáticos con la cinasa 2 ciclina dependiente en la fase G1.⁽⁹¹⁾ Se ha detectado amplificación del gen de la ciclina E en varias líneas celulares de cáncer mamario, y existe fuerte evidencia de que la ciclina E juega un papel en la génesis tumoral.⁽⁹²⁾ La proteína de longitud completa es alterada por el clivaje postraslacional, resultando en formas interactivas de bajo peso molecular únicamente detectables en células tumorales, que correlacionan con un mayor estadio y grado de cáncer mamario.⁽⁹³⁾

La significación clínica de la ciclina E ha sido estudiada por varios grupos de investigación. Un ensayo midió la expresión de la ciclina E en 395 casos de cáncer mamario primario y correlacionó los datos con factores establecidos de pronóstico y resultado clínico. Tanto el bajo peso molecular como los niveles totales de ciclina E surgieron como los discriminadores más potentes de la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad, superando a los biomarcadores clásicos clínicos y patológicos en los análisis de variable única y múltiples.⁽⁹⁴⁾ El papel de la ciclina E en el ciclo celular sugiere que el incremento de sus niveles podría alterar la respuesta a la quimioterapia y a la terapia endocrina. Se ha demostrado que la elevación de sus niveles aumen-

Tabla II. Parámetros multigénicos en cáncer de mama

Firma génica	Cantidad de genes evaluados	Tejido	Aplicación
Mammaprint®	70	Fresco congelado	Pronóstico para recurrencias dentro de los 5 años en todas las pacientes con ganglios positivos y negativos
Oncotype DX®	21	Fijado en formol e incluido en parafina	Riesgo residual de metástasis a distancia en pacientes RE positivas tratadas con tamoxifeno o inhibidores de la aromatasas; y predictiva de los beneficios de la quimioterapia en pacientes RE positivas con ganglios negativos
Índice de grado genómico	97	Originalmente fresco congelado, validado por fijación en formol e inclusión en parafina	Pronóstico, predicción de recidivas en pacientes RE positivas tratadas con endocrinoterapia
Índice de grado molecular	5	Fijado en formol e incluido en parafina	Predice pobres resultados pese a la endocrinoterapia en pacientes RE positivas
Firma de Rotterdam	76	Fresco congelado	Pronóstico para el desarrollo de metástasis a distancia dentro de los 5 años

ta la sensibilidad de las células neoplásicas mamarias a cisplatino y paclitaxel⁽⁹⁵⁾ pero, por otra parte, facilita la resistencia a los antiestrógenos.⁽⁹⁶⁾

Parámetros multigénicos

El perfilado de la expresión génica de los tumores permite medir miles de transcritos de ARN mensajero en un solo ensayo utilizando *microarrays* de ADN (Tabla II). Un reciente consenso St Gallen estableció que el uso de ensayos validados de perfilado multigénico contribuye a la clasificación fenotípica de los cánceres mamarios en los que la indicación de la quimioterapia adyuvante no es clara.⁽⁹⁷⁾ Los resultados de estos estudios en el cáncer mamario indican la existencia de varias neoplasias molecularmente diferentes, que parecen originar distintos tipos celulares.

Perou y colaboradores fueron los primeros en distinguir 4 clases moleculares de cáncer mamario: cánceres luminales, que dan cuenta de la mayoría de los tumores receptor estrogénico positivos, expresan citoqueratinas 8 y 18, y se dividen en Luminal A (en su mayoría de bajo grado) y Luminal B (que tienden a ser de alto grado con peor pronóstico); los cánceres HER2 positivos, los cuales muestran amplificación y sobreexpresión del gen *erb-B2*, no expresan receptores hormonales y son de peor pronóstico; los cánceres basaloideos o similares a basales (*basal-like*), que se superponen sustancialmente con tumores receptor estrogénico negativos, receptor progesterona negativos y HER2 negativos (triple negativos), con peor pronóstico y con expresión de citoqueratinas de la capa epitelial basal (CK 5/6, CK 17).⁽⁹⁸⁾

Se han desarrollado varias pruebas genómicas basadas en el perfilado genómico con el fin de predecir mejor los resultados clínicos que los marcadores patológicos y clínicos estándar. La firma MammaPrint® evalúa 70 genes y fue desarrollada utilizando muestras congeladas de un grupo de 78 pacientes seleccionadas retrospectivamente con cánceres mamarios con ganglios axilares negativos y menores que 5 cm, no tratadas con quimioterapia adyuvante y menores de 55 años. Los 70 genes que correlacionaban más significativamente con los resultados clínicos (metástasis a distancia en 5 años) demostraron clasificar con precisión tumores en categorías de buen y mal pronóstico. La firma fue validada retrospectivamente en un grupo de 295 pacientes que incluían casos con ganglios axilares positivos y negativos. Esta validación mostró que la firma génica superaba en desempeño a los factores de pronóstico clínico tradicionales.⁽⁹⁹⁾ Desafortunadamente, algunas de las pacientes habían recibido terapia sistémica adyuvante, algunas de las cuales fueron también incluidas en el grupo de entrenamiento. Un segundo estudio de validación utilizando las series TRANSBIG también confirmó la capacidad pronóstica de la firma génica,⁽¹⁰⁰⁾ y una comparación con el software Adjuvant! Online reveló que la prueba génica podía predecir más precisamente los resultados en los casos discordantes.⁽¹⁰¹⁾ La FDA aprobó el uso clínico de MammaPrint® como prueba pronóstica en mujeres de 61 años o menos, con receptores estrogénicos positivos o negativos y ganglios axilares negativos.

La firma Oncotype DX® fue diseñada para predecir mejor el riesgo de recurrencias a distancia en pacientes con cánceres mamarios tempranos con receptor estrogénico positivo bajo tratamiento con tamoxifeno. Esta prueba se basa en la medición mediante PCR en tiempo real de la expresión de 16 genes con conocida significación en el cáncer mamario y 5 genes de referencia. Se calcula un puntaje de recurrencias con un algoritmo matemático que

fue desarrollado y establecido utilizando muestras de los brazos asignados a tamoxifeno del estudio NSABP-B20 y B-14.⁽¹⁰²⁾ El puntaje de recurrencia es una medición continua del riesgo, pero se la ha utilizado en general para identificar 3 grupos con riesgos bajo, intermedio o alto de recurrencias a distancia, los cuales se asociaron con tasas de recurrencia a 10 años menor que 10%, 10-30% y mayor que 30%, respectivamente, en pacientes tratadas con tamoxifeno. El puntaje de recurrencia fue descrito como predictivo de supervivencia global y de recurrencias a distancia independientemente de la edad y el tamaño tumoral.

Un grupo de investigación confirmó el desempeño del puntaje de recurrencia en pacientes tratadas con un inhibidor de la aromatasa o tamoxifeno, revelando que la información pronóstica del puntaje de recurrencia y las características clínicas (por ejemplo, estatus ganglionar, grado y tamaño tumorales) eran casi completamente independientes uno del otro.⁽¹⁰³⁾ Esto último permite generar un algoritmo simple que integra los 2 grupos de características y que es más preciso que cualquiera de ellos por separado. Un alto puntaje de recurrencia predice los beneficios de la quimioterapia en tumores mamarios tempranos con receptores hormonales positivos.⁽¹⁰⁴⁾

Se ha desarrollado una firma de grado genómico para definir las características moleculares de la diferenciación tumoral que podrían correlacionar con la progresión y las metástasis mejor que el grado histológico,⁽¹⁰⁵⁾ la cual consiste en una firma de 97 genes capaz de discriminar tumores grado 2 en subgrupos de bajo y alto grado genómicos con resultados comparables a los tumores de bajo y alto grado histológico. La firma de grado genómico fue evaluada en diferentes escenarios, hallándose que se asociaba mejor con los resultados que los parámetros clínicos establecidos⁽¹⁰⁵⁾ y la predicción de recidivas bajo tratamiento endocrino.⁽¹⁰⁶⁾ Esta firma resalta la importancia de la diferenciación y, par-

ticularmente, de los genes de proliferación en los cánceres mamarios receptor estrogénico positivos.

Se han desarrollado muchas otras firmas génicas, entre las que se encuentra la prueba de proporción de la expresión génica en el cáncer mamario, que solo mide la proporción de HOXB13 respecto de IL17BR.⁽¹⁰⁷⁾ Una alta tasa de excreción de ARN mensajeros se asoció con alto riesgo de recurrencia en pacientes tratadas con tamoxifeno. La precisión de esta prueba podría aumentar al incluir genes asociados con proliferación del índice de grado molecular, que es un ensayo PCR en tiempo real consistente en 5 genes capaces de identificar un subgrupo de pacientes receptor estrogénico positivos con peor pronóstico pese a la terapia endocrina.

La firma Rotterdam[®] de 76 genes fue creada con la finalidad de predecir el desarrollo de enfermedad metastásica dentro de los 5 años utilizando una cohorte de pacientes no seleccionados respecto de la edad, tamaño tumoral, grado y estatus de receptores hormonales.⁽¹⁰⁵⁾

Estas firmas están compuestas de diferentes sets de genes, con poca superposición génica, pero existe predominancia de los genes asociados con proliferación. La elección debería realizarse sobre la base del contexto clínico (por ejemplo, pronóstico puro o pronóstico en presencia de tratamiento endocrino; todas las edades o solo pacientes jóvenes) y según el material de biopsia disponible (por ejemplo, MammaPrint[®] requiere tejido fresco, pero otras, incluyendo el puntaje de recurrencia, pueden utilizar tejidos fijados).

Células tumorales circulantes y ADN tumoral específico

Existe, en la actualidad, un gran interés en identificar biomarcadores que puedan obtenerse con métodos mínimamente invasores y que persistan luego de la cirugía. La existencia de células tumorales circulantes en la sangre de pacientes con neoplasias fue informada por primera vez en 1869, pero

solo en la última década la metodología molecular ha permitido detectarlas de modo reproducible. En paralelo, los avances en la inmunohistoquímica hicieron posible identificar células tumorales diseminadas en médula ósea. Para el cáncer mamario, un alto recuento de células tumorales circulantes al momento del diagnóstico de metástasis sería un factor de pronóstico significativamente negativo; y si la cantidad de estas células no disminuye, las pacientes probablemente progresarían aun bajo quimioterapia.⁽¹⁰⁸⁾ Las mediciones de células tumorales circulantes probablemente predecirán en el futuro la eficacia y la resistencia la terapia, pudiendo ser beneficiosas en el monitoreo de la respuesta al tratamiento. Pese a que se han publicado varios informes acerca de la significación de las células tumorales circulantes, el grupo de marcadores de la Sociedad Americana de Oncología Clínica concluyó que las decisiones terapéuticas no deberían ser influenciadas por dichas mediciones.⁽¹⁰⁹⁾ Las investigaciones se centran en la actualidad en la identificación de biomarcadores específicos de las células tumorales circulantes, por ejemplo HER2.⁽¹¹⁰⁾

Otra posible estrategia para simplificar aún más el tratamiento del cáncer mamario es el estudio de ADN circulante libre de células (cfDNA), que podría tener tanto origen nuclear como mitocondrial. Se han detectado niveles aumentados en varios tipos de cánceres, y se describió una asociación entre los niveles de cfDNA y malignidad, así como con tamaño tumoral.⁽¹¹¹⁾ También se investigó la posibilidad de rastrear mutaciones PIK3CA en el cfDNA,⁽¹¹²⁾ así como la presencia de especies de micro ARN tumor específico en el tumor y la sangre de las pacientes con cáncer mamario, habiéndose descrito patrones específicos de expresión,⁽¹¹³⁾ algunos de los cuales fueron vinculados a variables clinicopatológicas.⁽¹¹⁴⁾ Pese a todo, se necesitan más estudios para validar la función específica de los micro ARN y su uso como biomarcadores.

Gen P53

Se han investigado las alteraciones del gen P53 a través de la medición de la cantidad de proteína acumulada en el tejido mediante técnicas de inmunohistoquímica, asumiendo que una mutación del mismo provoca acumulación de proteína P53 anómala en las células. También se han empleado las determinaciones de mutaciones o deleciones del gen P53 mediante PCR.

A través de varios estudios, se demostró que las mutaciones P53 se asocian con un peor pronóstico en el análisis de variables únicas. Un meta-análisis publicado en 1999 señalaba que las mutaciones P53 implicaban peor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global (RR = 1,7). Un estudio noruego que involucró aproximadamente a 1.800 pacientes reveló que la presencia de mutaciones P53 se asociaba con peor supervivencia en el análisis de variables múltiples, siendo estos resultados especialmente significativos entre las pacientes con ganglios axilares negativos y expresión positiva del receptor estrogénico.

El P53 ostenta limitaciones como factor de pronóstico, entre las que cabe señalar que la determinación del mismo por IHQ detecta tanto la proteína mutada como la proteína normal (*wild-type*), lo cual sugiere que tal vez no refleje de modo totalmente confiable las alteraciones de P53 para su aplicación clínica. Además, la mayoría de los estudios no tuvieron en cuenta el tratamiento realizado por las pacientes, surgiendo así sesgos estadísticos. Aunque es posible la asociación de las mutaciones P53 con un peor pronóstico, los métodos que permiten una precisa determinación de las mismas son costosos y de disponibilidad restringida.⁽¹¹⁵⁾

Así, la evidencia disponible no avala recomendar la determinación de P53 en forma rutinaria en la práctica clínica.

Catepsina D

La catepsina D puede ser evaluada mediante inmunohistoquímica o ELISA en el citosol, aunque no hay acuerdo respecto de un punto de corte como factor pronóstico. Fue valorada por un estudio realizado a comienzos de los años noventa con 2.810 pacientes, de las cuales 1.412 eran mujeres con ganglios negativos que no había recibido tratamiento adyuvante. Empleando un punto de corte de 42,2 pmol/mg, la catepsina D se comportó como factor pronóstico débil tanto para las pacientes con ganglios positivos como para aquellas con ganglios negativos (HR = 1,39). Un estudio posterior con 1.851 pacientes, de las cuales 1.182 eran mujeres con ganglios axilares negativos, confirmó –empleando un punto de corte de 10 pmol/mg– que la catepsina D se asociaba con mayor riesgo de recaída (HR = 1,7), tanto en el análisis de variable única como en el de variables múltiples.⁽¹¹⁶⁾

Lo expuesto indica que los datos disponibles no resultan suficientes para recomendar la medición de la catepsina D en la toma de decisiones clínicas habituales.

Proteómica

La proteómica implica la evaluación del perfil proteico en el suero mediante análisis múltiple ELISA o análisis de espectroscopía de masas. Este último es el más utilizado y, antes de realizarlo, se suelen separar las proteínas uniéndolas a superficies (SELDI: *Surface-enhanced laser desorption and ionization*) o a matrices (MALDI: *matrix-associated laser desorption and ionization*).

Existen pocos datos en la literatura acerca de la utilización de perfiles proteómicos como factor pronóstico, y los disponibles son análisis retrospectivos. Un análisis de la expresión de 26 proteínas mediante IHQ permite identificar un *set* de 21 proteínas cuya expresión conjunta (perfil de mal pronóstico) se asociaba con una peor supervivencia libre de me-

tástasis en el análisis retrospectivo de una muestra de 552 mujeres con cáncer de mama precoz.

En síntesis, dado que los estudios sobre proteómica son, en su mayoría, análisis retrospectivos de poblaciones heterogéneas sometidas a diferentes tratamientos, se requiere validación en estudios prospectivos con adecuado diseño, lo cual no permite recomendar su uso en el tratamiento de pacientes con neoplasias mamarias.

uPA/PAI-1

La urocinasa activadora del plasminógeno (*urokinase plasminogen activator/uPA*) y el inhibidor del activador del plasminógeno (*plasminogen activator inhibitor/PAI-1*) forman parte del sistema de activación del plasminógeno, incluyendo además el receptor de uPA y otros inhibidores (PAI-2 y PAI-3). Se ha señalado que este sistema se vincula con los procesos de invasión, angiogénesis y metástasis tumorales. La determinación se realiza mediante ELISA y requiere de al menos 300 mg de tejido tumoral congelado o fresco.

La elevación de los niveles de uPA/PAI-1 predice mal pronóstico en las pacientes con ganglios axilares negativos, independientemente del tamaño y grado tumorales y de la expresión de receptores hormonales. Un estudio con 8.377 pacientes llevado a cabo por la European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC)⁽¹¹⁷⁾ confirmó el valor pronóstico de este biomarcador. La administración de quimioterapia CMF en un ensayo clínico con pacientes con ganglios axilares negativos y concentraciones elevadas de uPA/PAI-1 redujo a la mitad las recidivas, en comparación a la no administración de quimioterapia.⁽¹¹⁸⁾

De este modo, en mujeres con ganglios axilares negativos y, especialmente, con receptores estrogénicos positivos, las bajas concentraciones de uPA/PAI-1 se asocian con bajo riesgo de recidiva. Por el contrario, en mujeres con ganglios axilares negativos y niveles altos de este biomarcador se observa

alto riesgo de recidiva, que puede ser disminuido mediante quimioterapia tipo CMF. La complejidad de su determinación y la necesidad de abundante tejido fresco o congelado tornan esta técnica poco difundida, por lo que no suele recomendarse su realización en la práctica clínica habitual.

CA15/3

También conocido como antígeno carbohidrato CA15/3, es una proteína epitelial polimórfica de alto peso molecular perteneciente a la familia de las mucinas, expresada en el polo apical del epitelio, ductos y alvéolos de la glándula mamaria. Se presenta como antígeno circulante en bajas concentraciones, y se observan valores aumentados –aunque no exclusivamente– en los carcinomas mamarios.

Ostenta un valor predictivo positivo del 45-75%, ya que también se halla presente en patologías benignas de la mama, ovario, endometriosis, enfermedad inflamatoria pélvica y hepatitis. Su valor predictivo negativo es de 65-95% en los estadios iniciales de la enfermedad.

Solo el 21% de las pacientes en los estadios tempranos de la enfermedad presentan niveles altos de este marcador, por lo cual no sirve para el diagnóstico ni como *screening* de neoplasia mamaria, siendo su principal aplicación el seguimiento del tratamiento del cáncer mamario. En el cáncer no tratado su incremento se relaciona exponencialmente con la masa del tumor y el estadio de la neoplasia. Se observan niveles elevados de este biomarcador en el 70-80% de las pacientes con cáncer mamario metastásico. Los valores más elevados se hallan asociados a metástasis hepáticas y óseas. Ligeros y transitorios aumentos en la concentración del biomarcador se asocian con enfermedades benignas.

uPA, PAI y TF

La serina proteasa uPA es una proteasa asociada a tumor que parece jugar un papel tanto en la

invasión como en las metástasis de los tumores sólidos. Tanto uPA como su inhibidor PAI-1 fueron los primeros marcadores tumorales con valor clínico confirmado en estudios con nivel evidencia 1 (evidencia basada en ensayos clínicos aleatorizados o meta-análisis de ensayos clínicos con alta recomendación para las decisiones terapéuticas), y son factores de pronóstico independientemente de los factores utilizados tradicionalmente. De este modo, uPA y su inhibidor PAI-1 pueden ser apropiados para la evaluación rutinaria del pronóstico en pacientes con cáncer mamario.⁽¹¹⁹⁾ Su sobreexpresión en el tejido tumoral se asocia con aumento del riesgo de recidivas y disminución de la supervivencia.⁽¹²⁰⁾ El antígeno TF es un carbohidrato glicosilado aberrantemente y es un antígeno asociado al cáncer, hallado en aproximadamente el 80% de los adenocarcinomas, incluyendo el cáncer mamario.⁽¹²¹⁾ TF ha sido también involucrado en la adhesión y migración de las células tumorales.⁽¹²²⁾

La concentración de uPA resulta más predictiva de enfermedad en mujeres premenopáusicas (83-87%), mientras que el antígeno TF se comporta como mejor predictor de atipias y cáncer mamario en mujeres posmenopáusicas (81-83%).⁽¹²³⁾ Sin embargo, la combinación de TF con uPA en el fluido aspirado desde el pezón predijo el cáncer mamario en mujeres tanto pre como posmenopáusicas con 84-92% de precisión.⁽¹²⁴⁾ La combinación de uPA, PAI-1 y TF exhibe mayores capacidades predictivas para detectar cáncer mamario, con precisión de 97-100% en fluido aspirado del pezón.

Mamoglobina

El gen de la mamoglobina humana (h-MAM) fue descrito por Watson y Fleming en 1996. La mamoglobina A (MGBA) es una proteína expresada casi exclusivamente en el epitelio glandular de la mama normal y en el cáncer mamario.⁽¹²⁵⁾ La expresión de MGBA es mayor en el suero de pacientes con cáncer mamario que en las mujeres control,

indicando que podría ser utilizada potencialmente como biomarcador sérico para el diagnóstico del cáncer mamario.⁽¹²⁶⁾ Galvis-Jiménez y colaboradores generaron anticuerpos contra la mamoglobina en conejos utilizando cuatro péptidos sintéticos, y todos los anticuerpos obtenidos fueron capaces de discriminar pacientes con cáncer mamario de los controles. El mejor anticuerpo tenía una sensibilidad del 86,3% y una especificidad del 96%.⁽¹²⁷⁾

Un estudio de Lee y colaboradores⁽¹²⁸⁾ halló que la tasa de positividad en plasma para el ARN mensajero de la h-MAM era del 23,4% en los estadios precoces del cáncer, mientras que el valor aumentaba hasta 82,9% en los estadios avanzados. Esta diferencia sugiere que la detección del ARN mensajero de la h-MAM en plasma parece asociarse con un pronóstico desfavorable y una menor tasa de supervivencia libre de eventos en pacientes con cáncer mamario.

Se ha sugerido que h-MAM podría indicar también la presencia de metástasis ganglionares. Utilizando técnica de PCR en tiempo real, Liu y colaboradores evaluaron la expresión del ARN mensajero de h-MAM en la médula ósea de pacientes con cáncer mamario y metástasis ganglionares axilares asociadas. La expresión de h-MAM en la médula ósea fue mayor en el grupo con metástasis axilares (52,5%) que en el grupo sin enfermedad metastásica (23,5%).⁽¹²⁹⁾ Un ensayo de Luo y colaboradores demostró, por su parte, que la expresión de la mamoglobina era capaz de detectar el 72% de las metástasis ganglionares linfáticas mediante inmunohistoquímica; en combinación con otro biomarcador (GCDFP-15; *gross cystic disease fluid protein-15*), la expresión de mamoglobina detectó el 83% de las metástasis.⁽¹³⁰⁾ Sin embargo, estos biomarcadores no son útiles para la detección del cáncer mamario triple negativo basaloide o *basal-like*.⁽¹³¹⁾

Es sabido que las células de las neoplasias mamarías no expresan uniformemente mamoglobina; su expresión varía entre diferentes subtipos de

tumores: los tumores de bajo grado con receptores estrogénicos positivos expresan altas cantidades de mamoglobina, mientras que los tumores con receptor estrogénico negativo y alto grado expresan baja cantidad de moléculas de ARN mensajero de mamoglobina por célula. Por ello, la probabilidad de detección de este marcador puede variar según el tipo de tumor mamario, por esta enorme variación en los niveles de mamoglobina y su asociación con ciertas características de la neoplasia.⁽¹³²⁾

Osteopontina

Se trata de una glicoproteína fosforilada capaz de unirse a las integrinas de la superficie celular; dadas sus propiedades adhesivas, se ha hipotetizado respecto de su papel en la invasión y metástasis neoplásicas, puesto que estos procesos dependen de interacciones adhesivas entre las células tumorales y la matriz extracelular.⁽¹³³⁾ Un meta-análisis⁽¹³⁴⁾ reveló que la osteopontina ha sido asociada con 34 cánceres, entre ellos el mamario. Estudios recientes correlacionaron la expresión de osteopontina con la invasión tumoral y las metástasis del cáncer mamario; altos niveles de osteopontina podrían sugerir la presencia de un tumor más agresivo y de mal pronóstico.⁽¹³⁵⁾ Un estudio sugirió que la osteopontina promueve la transformación de las células madre mesenquimáticas en fibroblastos asociados al cáncer, que llevan a la progresión tumoral, la angiogénesis y las metástasis.⁽¹³⁶⁾

La osteopontina presenta 3 variedades: la osteopontina-a, la osteopontina-b y la osteopontina-c.⁽¹³⁷⁾ Esta última es expresada selectivamente en neoplasias mamarias, mientras que las dos primeras lo son tanto en el cáncer mamario como en el tejido mamario normal, lo que torna más útil a la osteopontina-c como potencial biomarcador para el cáncer mamario.⁽¹³⁸⁾ De hecho, Pang y colaboradores demostraron altos niveles de osteopontina-c en pacientes con cáncer mamario, en comparación con mujeres controles, y su elevada expresión se co-

rrelaciona con metástasis ganglionares, avanzado estadio de recurrencia tumoral.⁽¹³⁹⁾

Recientes informes indican también que la osteopontina es crucial para la transición epitelio-mesénquima a través de la activación de Twist luego de la fosforilación de la serina, la cual induce un fenotipo de cáncer mamario agresivo.⁽¹⁴⁰⁾

Se ha demostrado que el incremento de los niveles de osteopontina en el tejido tumoral y en la sangre de las pacientes se asocia con malos resultados en el escenario del cáncer mamario metastásico. Sin embargo, se sabe mucho menos acerca de la significación pronóstica de la osteopontina en el cáncer mamario precoz y durante la progresión de la neoplasia mamaria. Un grupo de investigadores canadienses⁽¹⁴¹⁾ evaluó la significación pronóstica de osteopontina en 667 mujeres posmenopáusicas con cáncer mamario temprano respondedor al tratamiento hormonal en un ensayo aleatorizado, pero no halló correlación entre los niveles de osteopontina y valores pronóstico, como la supervivencia libre de eventos, la supervivencia libre de recidivas, la supervivencia global, la supervivencia libre de recidivas óseas o no-óseas, aunque encontró una elevada concentración de osteopontina alrededor del momento de la recurrencia.⁽¹⁴¹⁾ Lo expuesto indica que la osteopontina podría ser un biomarcador para el monitoreo de la presencia de metástasis, requiriéndose más estudios para evaluar su potencial para el seguimiento de las recurrencias.

FGFR2

La familia del receptor del factor de crecimiento de los fibroblastos (FGFR) incluye cuatro receptores que poseen un dominio intracelular tirosina cinasa y son capaces de homo o heterodimerizarse en presencia de ligandos del factor de crecimiento para los fibroblastos (FGF). Cabe señalar que los receptores 1-3 presentan una isoforma alternativa con un dominio III Ig-símil para ligandos (isoformas IIIb y IIIc); estas isoformas son expresadas en forma di-

ferencial en el epitelio y las células mesenquimáticas. Las isoformas son responsables de la afinidad diferencial por la unión del FGF y la especificidad del FGF.⁽¹⁴²⁾

Varios estudios han analizado el papel de los polimorfismos FGFR2 sobre la susceptibilidad al cáncer mamario, su progresión y capacidad de metastatizar. Una investigación llevada a cabo por Hunter y colaboradores evaluó la asociación genómica con el cáncer mamario, fenotipeando 528.173 polimorfismos de nucleótido único (SNP) en 1.145 casos de cáncer mamario invasor en mujeres blancas posmenopáusicas. Los autores identificaron un grupo de cuatro SNPs con intrón 2 del FGFR2 que se asociaban con alto riesgo de desarrollar cáncer mamario.⁽¹⁴³⁾ Easton y colaboradores analizaron 4.398 casos de neoplasias mamarias y 4.306 controles, validando un *set* de 30 SNPs en 21.860 casos y 22.578 controles provenientes de 22 estudios. Los investigadores identificaron importantes SNPs adicionales en el intrón 2 del FGFR2.⁽¹⁴⁴⁾

FGFR2 se asocia con la génesis tumoral. Kim y colaboradores observaron que FGFR2 es esencial para el mantenimiento de las células iniciadoras de tumores (TIC) y para promover la génesis tumoral. Los autores hallaron CD29^{high}/CD24⁺ TICs en ratones a los que se les había inducido cáncer mamario, observando alta potencia de auto-renovación cuando las células aisladas fueron inyectadas en ratones NOD/SCID. También observaron que FGFR2 es expresado de preferencia en TICs con un aumento aproximado de 22 veces los niveles de ARN mensajero. La citometría de flujo reveló que existía un incremento de 5,4-10,2 veces en los niveles de la expresión de la proteína FGFR2 en las TICs. La inhibición FGFR2 farmacológica produjo una fuerte disminución de la renovación de TICs y el crecimiento tumoral. Más aún, los autores observaron un aumento en los niveles de ARN mensajero del FGFR2 de 32 a 293 veces en dos de 26 muestras de cáncer mamario, en comparación con los controles, y las

TICs FGFR2-enriquecidas provenientes de muestras de muestras humanas fueron capaces de inducir tumores sustanciales en los ratones NOD/SCID.⁽¹⁴⁵⁾ Los ensayos *in vitro* revelaron que la elevada expresión de FGFR2 correlacionaba con altas tasas de proliferación, motilidad e invasividad en linajes celulares derivados de cáncer mamario metastásico;⁽¹⁴⁶⁾ es interesante señalar que las células que expresaban altos niveles de FGFR2 eran tan invasivas como las células que sobreexpresaban *erb-b2* y los linajes metastásicos.

PTEN

El homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) es un gen supresor de tumores que se encuentra deletado o mutado en muchos cánceres humanos,⁽¹⁴⁷⁾ incluyendo el cáncer mamario.⁽¹⁴⁸⁾ La pérdida del PTEN lleva al cese de la apoptosis y la regulación del ciclo celular.⁽¹⁴⁹⁾ Un estudio retrospectivo de 78 pacientes posmenopáusicas con tumores en estadios I/II con receptores esteroides positivos y tratadas con tamoxifeno de modo su guante demostró la pérdida del PTEN en 16 de 43 pacientes (37,2%) con carcinomas ductales y en 9 de 35 pacientes (25,7%) con carcinoma lobular. Además, los autores observaron que el 96% de las pacientes con recurrencia no expresaban PTEN, y aquellas que lo expresaban presentaban recidivas solo en el 26,4% de los casos.⁽¹⁵⁰⁾ Cabe resaltar que también hallaron una correlación positiva entre la expresión del PTEN y una mayor supervivencia libre de recidivas, especialmente en tumores receptor estrogénico positivos y PTEN positivos.⁽¹⁵¹⁾ Un estudio de Zhang y colaboradores evaluó muestras provenientes de 146 pacientes con cáncer mamario, hallando expresión del PTEN en solo 57,5% de las muestras neoplásica, en comparación con las muestras normales, las cuales expresaban PTEN en su totalidad. Estos autores también observaron que las muestras que no expresaban PTEN correlacionaban con aumento del tamaño tumoral y con estadios avanzados.

Sirtuins

La familia de genes Sirtuins (SIRT) está presente en una amplia variedad de organismos, desde bacterias hasta humanos, y se los relaciona con diferentes procesos fisiológicos, incluyendo la longevidad, la apoptosis, la diferenciación y resistencia a las respuestas de estrés.⁽¹⁵²⁾ Se habían descrito 7 Sirtuins en células de mamíferos, todas ellas localizadas en distintas regiones subcelulares. Por ejemplo, SIRT3, SIRT4 y SIRT5 se localizan en la mitocondria, mientras que SIRT1, SIRT6 y SIRT7 se hallan en el núcleo, y SIRT2 principalmente en el citosol.⁽¹⁵³⁾ Pese a estas diferencias en la localización celular, todas las proteínas SIRT se caracterizan por un dominio SIRT conservado que posee actividad catalítica y es responsable de su unión al NAD+.

SIRT3, la principal deacetilasa mitocondrial, es responsable de la acción sobre numerosas enzimas involucradas en diferentes vías oxidativas, y también regula la producción, metabolismo y señalización celular mediadas por ATP. Asimismo, se demostró que la pérdida de SIRT3 se asocia con aumento de los niveles intracelulares de especies de oxígeno reactivo (ROS) y enfermedades por envejecimiento, incluyendo neoplasias; por todo ello, se ha postulado a SIRT3 como gen supresor de tumores.⁽¹⁵⁴⁾ Debido a sus implicaciones en las funciones biológicas descritas, se lo ha estudiado intensamente, y los datos disponibles hasta la fecha indican que esta molécula podría jugar un rol crucial en el contexto de la biología tumoral, especialmente en los cánceres mamarios en cuanto a la conducta clínica y el estadio de la enfermedad. Además, un reciente estudio informó que el 40% de los cánceres mamarios presentan al menos una copia delecionada de este gen, remarcando su participación en la génesis de los tumores mamarios y su progresión,⁽¹⁵³⁾ otros investigadores han arribado a la misma conclusión.⁽¹⁵⁴⁾ Respecto de su relación con la progresión tumoral y las metástasis, un ensayo mostró que la expresión del SIRT3 se asociaba significativamente con

metástasis y que esta proteína se hallaba altamente expresada en un grupo de tumores con compromiso ganglionar positivo, indicando una ventaja de estos tumores respecto de la supervivencia.⁽¹⁵⁴⁾ Dicho estudio no halló correlación entre el grado tumoral y la invasión linfovascular. Se piensa que una investigación más profunda de esta molécula podría conducir al descubrimiento de nuevas proteínas importantes en el diagnóstico del cáncer, con potencial adicional para evaluar el pronóstico de las mujeres portadoras de cáncer mamario, especialmente su potencial metastásico y probablemente la tasa de supervivencia.

Snail, Twist y Zeb I

Se ha sugerido que la transición epitelial a mesenquimática (EMT) jugaría un papel en la generación de células madre neoplásicas (CSC) que poseen mayor capacidad para invadir y metastatizar a distancia a través de cambios en sus propiedades adhesivas.⁽¹⁵⁵⁾ Se ha propuesto también que las CSC estarían involucradas en el desarrollo de resistencia a las drogas.⁽¹⁵⁶⁾

La EMT, así como su reversa (transición mesenquimática a epitelial), son eventos muy importantes y esenciales para la vida, especialmente en el desarrollo de los organismos. La EMT promueve el cambio de varias isoformas epiteliales a isoformas mesenquimáticas, confiriendo propiedades de despegamiento y motilidad celulares con la pérdida de E-caderina y aumento de la expresión de N-caderina. Este evento es regulado principalmente por factores de transcripción que responden a varias señales intra y extracelulares. Los factores de transcripción más estudiados respecto de la EMT son Twist, Snail1 y Snail2.⁽¹⁵⁷⁾

La EMT no es solo un evento fisiológico; varios estudios han observado EMT durante la progresión del cáncer, particularmente al ocurrir metástasis. Las células del adenocarcinoma mamario generalmente comienzan el proceso EMT al perder sus

marcadores epiteliales y las proteínas de adhesión celular, adquiriendo marcadores mesenquimáticos e incrementando su motilidad y potencial invasivo.

Un estudio analizó la expresión de Snail1 en muestras provenientes de 21 mujeres con cáncer mamario que no habían recibido quimioterapia o radioterapia; 17 muestras fueron clasificadas como carcinomas ductales infiltrantes y las otras 4 como carcinomas lobulares infiltrantes. Las células normales no expresaban Snail1, pero este fue detectado en 8 de 17 carcinomas ductales sin filtrantes, lo cual correlacionaba con la pérdida de la expresión de E-caderina. En contraste, no se halló expresión de Snail1 en ninguna de las muestras de carcinomas lobulares infiltrantes. Cabe resaltar que la mayoría de los carcinomas ductales infiltrantes grado 3, más de la mitad de aquellos de grados 2 y ninguno de los de grado 1 expresaban Snail1. Además, Snail1 es expresado en carcinomas ductales infiltrantes pobremente diferenciados.⁽¹⁵⁸⁾

Ensayos *in vitro* determinaron que Snail1 es necesario para la iniciación de la EMT y su respuesta a TGFbeta1 (factor transformador del crecimiento beta). Twist1 es también necesario para el mantenimiento de la EMT. Los ensayos describieron que los linajes mamarios normales y tumorales experimentaban EMT tras la exposición a TGFbeta1. Además, se halló una fuerte correlación entre una alta expresión del ARN mensajero de Twist1, reducida expresión del ARN mensajero de Snail1 y recurrencia metastásica en células tumorales que invadía médula ósea provenientes de 30 pacientes con neoplasias mamarias estadios II o III. Uno de estos estudios de cohortes también indicó que la existencia de una elevada tasa Twist1/Snail1 luego de la quimioterapia es terapéuticamente relevante.⁽¹⁵⁹⁾

Un estudio demostró que la sobreexpresión de Zeb1, un factor de transcripción también asociado con la EMT, era capaz de inducirla en células que no expresaban Zeb1, y que los niveles de este último era mayores en células que experimentaban EMT,

en comparación con los controles. La expresión de Zeb1 es también responsable de conferir propiedades de motilidad e invasividad.⁽¹⁶⁰⁾

En la actualidad se cree que la EMT es responsable de las metástasis neoplásicas y la resistencia a las drogas debido a que induce el cambio de la célula hacia un estado indiferenciado, transformándola en un perfil multirresistente a drogas con alta plasticidad. Así, Snail, Twist y Zeb1 son buenos biomarcadores de la EMT en cánceres mamarios y, por tanto, de metástasis y resistencia a drogas.

Potenciales biomarcadores para la resistencia a la quimioterapia sistémica

Los potenciales biomarcadores para la predicción de la resistencia a la quimioterapia sistémica incluyen al citocromo P450 2D6 (CYP2D6), a la fosfatidilinositol-4,5-bisfosfonatos-3-cinasa (PIK3CA), al receptor alfa para el ácido retinoico (RARA), al transductor de señales y activador de transcripción 3 (STAT3), al inhibidor tisular de la metaloproteinasa 1 (TIMP-1) y al Lin28.

Citocromo P450 2D6

Un tercio de todas las pacientes tratadas con tamoxifeno presentan recaídas dentro de los 15 años de seguimiento, lo cual representa un cuarto de todas las pacientes con cáncer mamario; ⁽¹⁶¹⁾ esto resalta la importancia de identificar marcadores primitivos de la resistencia al tamoxifeno.

El tamoxifeno es un modulador selectivo de los receptores estrogénicos (SERM) que bloquea la unión de los estrógenos a su receptor, por lo que se lo utiliza para tratar cánceres mamarios que expresan dichos receptores. Se une débilmente al receptor estrogénico y es considerado una prodroga, ya que, para cumplir su función, debe ser metabolizado a potentes metabolitos antiestrogénicos por varias enzimas citocromo P450.⁽¹⁶²⁾ En la actualidad, se con-

sidera que el endoxifeno es el más importante metabolito del tamoxifeno, y es producido casi exclusivamente por la citocromo P450 2D6 (CYP2D6).⁽¹⁶³⁾

Los genes CYP450 son polimórficos, resultando de ello diferentes genotipos que han sido divididos de acuerdo con su actividad enzimática como metabolizadores pobres, intermedios, extensivos y ultra rápidos.⁽¹⁶⁴⁾ Las diferentes actividades enzimáticas podrían explicar algunas de las variabilidades clínicas en las concentraciones plasmáticas de tamoxifeno y de sus metabolitos en diferentes pacientes.⁽¹⁶⁵⁾

Se ha demostrado que algunas variantes genéticas de CYP2D6 se asocian con menores concentraciones de endoxifeno, el metabolito activo del tamoxifeno, lo cual podría potencialmente afectar el resultado clínico de las pacientes con cáncer mamario luego del tratamiento con tamoxifeno.⁽¹⁶⁶⁾ Un estudio llevado a cabo por el Breast International Group I-98 trial investigó la relevancia clínica de los polimorfismos de CYP2D6 sin hallar asociación entre los fenotipos del metabolismo CYP2D6 y el intervalo libre de cáncer mamario en pacientes que habían recibido monoterapia con tamoxifeno sin quimioterapia previa, lo cual sugiere que la evaluación farmacogenética de CYP2D6 no es útil para determinar si corresponde tratar con tamoxifeno a las pacientes posmenopáusicas con cáncer mamario. Este estudio fue cuestionado por algunos investigadores como Stanton, Pharoah y Nakamura por presentar resultados improbables de genotipados de CYP2D6 que generan serias dudas sobre las conclusiones. Por ejemplo, el genotipado fue llevado a cabo a partir de tejidos tumorales fijados con formol e incluidos en parafina, situación que podría comprometer la viabilidad del ADN extraído, especialmente con genes complejos como el CYP2D6 que exhibe variable cantidad de copias y es flanqueado por dos pseudogenes muy similares.

En síntesis, el genotipo CYP2D6 de las pacientes podría ser utilizado como potencial biomarcador

para predecir la respuesta al tamoxifeno de las pacientes, requiriéndose un gran estudio aleatorizado, prospectivo, a gran escala y en controlado que confirme los hallazgos.

PIK3CA

La fosfatidilinositol-4,5-bisfosfonatos 3-cinasa (PIK3CA) es la subunidad alfa catalítica en la vía de señales PI3K/PTEN/Akt y controla actividades celulares como el crecimiento, proliferación, motilidad, supervivencia, diferenciación y tráfico intracelular. La PIK3CA es el oncogen más frecuentemente mutado en todos los cánceres humanos.⁽¹⁶⁷⁾ Un estudio analizó el ADN tumoral circulante de 52 pacientes con cáncer mamario, 30 de las cuales presentaban alteraciones genómicas. Estas 30 pacientes tenían metástasis de su neoplasia mamaria y habían recibido terapia sistémica. Los autores recolectaron muestras sanguíneas por 2 años cada 3 semanas y observaron que 25 de 52 pacientes presentaban mutaciones de PIK3CA. También hallaron correlación entre la terapia farmacológica, estadio de la enfermedad y niveles de PIK3CA. Cabe destacar que los niveles de PIK3CA se encontraban elevados en los casos de enfermedad progresiva.⁽¹⁶⁸⁾

El papel carcinogénico de PIK3CA llevó a estudiar su implicación en el cáncer mamario y en la resistencia a drogas, así como su valor pronóstico. El Cancer Genome Atlas analizó los datos de los exones completos de 510 tumores de 507 pacientes, observando que solo 3 genes presentaban mutaciones somáticas presentes en más del 10% de las muestras, entre los que se hallaba PIK3CA. Los investigadores encontraron que el 45% de las muestras Luminal A y el 29% de las muestras Luminal B presentaban mutaciones PIK3CA, al igual que el 39% de las muestras HER2 positivas. El 49% de los cánceres basaloideos o *basal-like* analizados mostraban amplificaciones PIK3CA, pero ninguno de ellos portaba mutaciones PIK3CA.⁽¹⁶⁹⁾ Pese a que las mutaciones PIK3CA en los tumores receptor estro-

génico positivos/HER2 negativos son consideradas “de buen pronóstico”, esas mutaciones en tumores receptor estrogénico positivos/HER2 positivos implican resistencia tumoral al tratamiento con trastuzumab.⁽¹⁷⁰⁾

Un estudio de Cizkova y colaboradores evaluó la relación entre el tratamiento con trastuzumab y la mutación PIK3CA en 80 cánceres mamarios HER2 positivos tratados con trastuzumab por un año; estos autores hallaron que las pacientes sin mutaciones PIK3CA tratadas con trastuzumab presentaban mejor supervivencia, en comparación con el grupo de pacientes con mutaciones PIK3CA y tratado con trastuzumab; este hallazgo sugiere que las mutaciones PIK3CA son un mal factor en cánceres mamarios HER2 positivos tratados con trastuzumab,⁽¹⁷¹⁾ aunque no se halló correlación en pacientes tratadas con tamoxifeno.⁽¹⁷²⁾

Receptor alfa del ácido retinoico (RARA)

Otro marcador para predecir la respuesta al tamoxifeno es el receptor alfa para el ácido retinoico (RARA). Se sabe que el receptor estrogénico protege las células neoplásicas mamarias contra la apoptosis inducida por la transcripción de BCL-2, un gen antiapoptótico que lleva a la proliferación y supervivencia celulares. El RARA y el receptor estrogénico ejercen efectos opuestos sobre la proliferación y supervivencia de las células neoplásicas mamarias, dado que el RARA inhibe la proliferación e induce la apoptosis.⁽¹⁷³⁾ Los efectos del RARA pueden ser explicados por su interacción con el receptor estrogénico y sus sitios de unión genómica compartidos.⁽¹⁷⁴⁾ Johansson y colaboradores identificaron un nexo entre la resistencia endocrina y la resistencia por RARA utilizando células sensibles a tamoxifeno (MCF7) y tamoxifeno-resistentes (LCC2). Dichos investigadores demostraron que las células resistentes a tamoxifeno presentan mayores niveles de RARA. Así, las pacientes con recidivas tempranas también muestran niveles de proteína RARA más

elevados que las pacientes libres de recidivas. Más aún, los autores utilizaron un pequeño ARN de interferencia para regular negativamente la expresión de RARA, el cual disminuyó la proliferación tanto de las células MCF7 como de las LCC2; sobre la base de estos resultados, concluyeron que el RARA está involucrado en la resistencia al tamoxifeno,⁽¹⁷⁵⁾ y que sería un potencial biomarcador para predecir la respuesta al tamoxifeno.

STAT3

El transductor de señal y activador de transcripción 3 (STAT3)⁽¹⁷⁶⁾ es un transductor de señales en varias vías, incluyendo las interleucinas, interferones, factor de crecimiento si hormonas.⁽¹⁷⁷⁾ Un estudio *in vitro* realizado por Xiayan y colaboradores mostró que el STAT3 se asocia con resistencia al tamoxifeno en células CD44+/CD24-/low. La sobreexpresión STAT3 o su autofosforilación inhiben la apoptosis mediada por tamoxifeno, y la abolición de STAT3 mediante siRNA suprime la resistencia al tamoxifeno en la su población de células CD44-/CD24o-low.⁽¹⁷⁸⁾

Distintos estudios han observado la expresión de STA3 fosforilado en varias muestras de cáncer mamario. En 45 muestras de neoplasias mamarias invasivas estadio III, se observó que el 22% expresaba STA3 fosforilado, lo que correlacionaba con la positividad HER2.⁽¹⁷⁹⁾ El análisis por *microarray* de 346 muestras de cáncer mamario con ganglios axilares negativos y receptores estrogénicos positivos identificó la presencia de STAT3 citoplasmáticos y nuclear en el 69% y 23% de las muestras, respectivamente. También se observó STAT fosforilado citoplasmático y nuclear en el 23% y 44% de las muestras, respectivamente.⁽¹⁸⁰⁾ Estos datos indican que STAT3 podría ser utilizado como un potencial biomarcador para predecir la respuesta a tamoxifeno.

Inhibidor tisular de la metaloproteína I (TIMP-1)

El inhibidor tisular de la metaloproteína I (TIMP-1) es miembro de la familia de los inhibidores tisulares de metaloproteínas (TIMP); estas proteínas regulan la actividad de las metaloproteínas de matriz (MMP). Sin embargo, el TIMP-1 presenta varias funciones fisiológicas adicionales, incluyendo la regulación de la proliferación, angiogénesis y apoptosis celulares.⁽¹⁸¹⁾ Estas funciones implican que el TIMP-1 podría jugar un papel en el desarrollo y crecimiento.⁽¹⁸²⁾

El TIMP-1 desempeña un importante papel en la resistencia a los quimioterápicos utilizados en el tratamiento del cáncer mamario, y esta función atrajo una considerable atención por parte de los investigadores. El TIMP-1 ha sido asociado con disminución de la sensibilidad a la epirrubicina y al paclitaxel al incrementar la degradación de la ciclina B1 y activar la vía de señales PI3K/Akt/NF-k beta.⁽¹⁸³⁾ También media la resistencia a los inhibidores de la topoisomerasa a través de la regulación positiva y/o fosforilación de topoisomerasa.⁽¹⁸⁴⁾ Así, se sugiere que el TIMP-1 media la resistencia a la quimioterapia, siendo necesarios más estudios para evaluar su potencial como predictor de respuesta a las drogas.

Lin28

Se trata de un gen regulador de células madre altamente expresado en células indiferenciadas, que, por lo tanto, ha sido implicado fuertemente en el desarrollo de tumores, en parte debido a su papel como oncogen y por la promoción de proliferación y transformación celulares. Un reciente estudio⁽¹⁸⁵⁾ halló que el Lin28 está sobreexpresado en varios tumores, incluyendo colon, mama, pulmón y cérvix, confirmando que se trata de una oncoproteína. Se ha postulado que un posible mecanismo regulatorio a través del cual esta proteína puede afectar células madre normales y malignas es merced a la

regulación negativa post transcripcional del micro ARN Let-7, una molécula importante involucrada en el desarrollo normal del metabolismo.⁽¹⁸⁶⁾ Lv y colaboradores demostraron que esta proteína se halla altamente expresada en el cáncer mamario localmente recurrente y metastásico. Recientes estudios con líneas celulares indicaron que aquellas que expresan altos niveles de Lin28 presentan mayores tasas de supervivencia que las líneas celulares reguladas negativamente por Lin28 expuestas a la radiación en dosis de 2 a 4 Gy.⁽¹⁸⁷⁾ También se demostró que la radio resistencia ocurría a través de la inhibición de la apoptosis, hecho confirmado por los reducidos niveles de PARP cribado, caspasa-3 y caspasa-9 en células que expresaban establemente Lin28. Por tanto, es posible hipotetizar que la utilización de Lin28 como blanco terapéutico podría ser una estrategia excelente para aquellos tumores resistentes a los tratamientos actuales.

Micro ARNs

Los micro ARNs (miRNAs) fueron inicialmente descritos en 1993 por Víctor Ambros y colaboradores durante un estudio del gen Lin-14 en el desarrollo de un microorganismo.⁽¹⁸⁸⁾ Los miRNAs son pequeñas moléculas de ARN no codificante que contienen alrededor de 22 nucleótidos. Pueden hallarse en plantas, animales y algunos virus, y jugar un importante papel en la regulación de la traslación génica.⁽¹⁸⁹⁾

Se han identificado más de 1.800 miRNAs en humanos hasta la fecha, algunos de los cuales han sido implicados en el cáncer mamario. La expresión de un único miRNA puede oscilar entre diferentes tipos celulares, resultando en una firma miRNA. De igual modo, cada tumor posee una firma miRNA característica,⁽¹⁹⁰⁾ que puede ser explotada para el diagnóstico de cáncer mamario y la evaluación del pronóstico y la respuesta a las drogas.

Varios estudios han identificado miRNAs específicos elevados en sangre y tejidos de pacientes con

cáncer mamario. Una revisión de Andorfer y colaboradores identificó miRNAs cuyas expresiones se hallaban significativamente reguladas en tumores mamarios humanos. Los investigadores concluyeron que miR-21, miR-155, miR-210, miR29-c, miR-196a, miR-213, miR-191, miR-203, miR-29b y miR-93 se hallaban regulados positivamente en forma significativa en tejidos tumorales, en comparación con mujeres sanas, mientras que miR-125b, miR-145, miR-100, miR-10b, Let-7a-2, miR-205, miR497 y miR-193 se encontraban regulados negativamente; miR-31 y miR-130b se encontraban regulados tanto positiva como negativamente.⁽¹⁹¹⁾

El desafío actual consiste en comprender cuáles son las consecuencias de estas diferencias para la mejoría de las herramientas clínicas diagnósticas, pronósticas y de seguimiento del tratamiento de pacientes con cáncer mamario. Se sabe que miR-195 se encuentra elevado en el suero de pacientes con cáncer mamario. Este miRNA demostró resultados promisorios, dado que pudo diferenciar el cáncer mamario de otros cánceres y de los controles, lo que indica que es muy específico para las neoplasias mamarias. También se halló disminución de los niveles de miR-195 y let-7a luego de la resección tumoral, sugiriendo que estos biomarcadores derivan del tumor y podrían ser utilizados para el diagnóstico de cáncer mamario.⁽¹⁹²⁾ Un reciente meta-análisis también señaló a miR-21, miR-155, miR-222 y miR-10b como candidatos confiables a biomarcadores para la detección del cáncer mamario.⁽¹⁹³⁾

Algunos miRNAs han demostrado ejercer un importante papel en la formación y regulación de las células madre mesenquimáticas, que, se sabe, contribuyen a la progresión del cáncer mamario. Una familia de miRNAs let-7 y miR-30, así como miR-200, miR-128, miR-34c y miR-16, demostraron encontrarse regulados negativamente en el proceso EMT, mientras que la familia miR-181 y miR-495 se encuentra sobreexpresado.⁽¹⁹⁴⁾

Respecto de la resistencia a drogas en el cáncer

mamario, la regulación positiva de miR-21 parece inducir resistencia a trastuzumab a través de la reducción de su gen blanco PTEN.⁽¹⁹⁵⁾ Se ha demostrado que los estrógenos pueden modular la expresión de miRNAs en las células neoplásicas mamarias,⁽¹⁹⁶⁾ induciendo 21 miRNA, incluyendo 8 miembros de la familia let-7, miRNA-98 y miRNA-21 y suprimiendo 7 miRNAs en células MCF-7. Por otra parte, estos miRNAs podrían tener implicaciones en la resistencia a la terapia endocrina.⁽¹⁹⁷⁾

CONCLUSIONES

Incontables investigadores han bregado a lo largo del tiempo y a través de innumerables estudios por identificar potenciales factores que pudieran influir sobre la génesis, historia natural y evolución del cáncer mamario, así como sobre los mecanismos involucrados en la resistencia natural a la terapia. La mastología ha progresado incesantemente desde los tratamientos quirúrgicos radicales hasta terapias más conservadoras, merced, en gran parte, al diagnóstico precoz que fue posible gracias a las nuevas tecnologías que detectan lesiones de menor tamaño y a las terapias sistémicas. Métodos auxiliares como la inmunohistoquímica, la genética y la biología molecular han facilitado el desarrollo de marcadores biológicos, dando por resultado mayores supervivencias, períodos más prolongados libres de enfermedad y la posibilidad de efectuar seguimientos más eficaces y seguros para las pacientes con cáncer mamario.

Pese a su homogeneidad y semejanza en cuanto a los factores clásicos de pronóstico, los tumores de mama exhiben diversas evoluciones, por lo que es dable suponer que las diferencias radican al nivel molecular.

Así, la positividad de los receptores hormonales correlaciona con un mejor pronóstico en cuanto a la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global, siendo además determinante de

la indicación de terapias endocrinas. La sobreexpresión de HER2/neu, en cambio, se asocia con mal pronóstico y menor respuesta a la terapia, determinando de este modo una menor supervivencia global y también una menor supervivencia libre de enfermedad. Este marcador permite identificar a las pacientes que se beneficiarían con el uso de esquemas basados en antraciclinas, trastuzumab e inhibidores del aromatasa.

Por otra parte, la sobreexpresión de Ki67 implica un peor pronóstico, tanto en relación con la supervivencia global como con la supervivencia libre de enfermedad. Elevados niveles de este marcador serían de valor predictivo en la elección de un inhibidor de la aromatasa por sobre el tamoxifeno.

Los factores clásicos de pronóstico, así como la clasificación histopatológica vigente, poseen una limitada relevancia clínica puesto que no reflejan la variabilidad de los tumores en cuanto su comportamiento biológico, y tampoco ostentan un adecuado valor predictivo de la respuesta o resistencia a los distintos tratamientos. Muy pocos de los muchos noveles marcadores de pronóstico evaluados hasta la fecha son lo suficientemente poderosos por sí solos como para ameritar su uso clínico. Algunas de las firmas multigénicas son más poderosas; algunas de ellas han ganado la aprobación por parte de la FDA, pero se están llevando a cabo estudios aleatorizados prospectivos para evaluar su real aplicabilidad clínica.

El desarrollo de las nuevas terapias moleculares dirigidas se acompaña de la necesidad de identificar nuevos marcadores capaces de predecir respuestas específicas, lo que constituye un desafío para los científicos y clínicos en los próximos años a fin de seleccionar los más promisorios. La identificación de las características moleculares de los cánceres individuales permitirá hallar nuevos biomarcadores que ayudarán a seleccionar terapias adaptadas a cada paciente portadora de cáncer mamario.

REFERENCIAS

1. Harris L, Fritsche H, Mennel R y col. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007 Nov 20; ; 25(33): 5287-312.
2. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W y col. Reporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies (REMARK). *Nat Clin Pract Urol* 2005 Aug; 2(8): 416-22.
3. Neville AM, Patel S, Capp M y col. The monitoring role of plasma CEA alone and in association with other tumor markers in colorectal and mammary carcinoma. *Cancer* 1978 Sep; 42(3 Suppl): 1448-51.
4. Coombes RC, Ellison ML, Neville AM. Biochemical markers in bronchogenic carcinoma. *Br J Dis Chest* 1978 Oct; 72(4): 263-87.
5. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D y col. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000 Jul; 124(7): 966-78.
6. Hilsenbeck S, Ravdin P, de Moor C y col. Time-dependence of hazard ratios for prognostic factors in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 52: 227-237.
7. Ravdin P, De Laurentis M, Vendely T y col. Prediction of axillary lymph node status in breast cancer patients by use of prognostic indicators. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 1771-1775.
8. Giuliano M. Intradermal blue dye to identify sentinel lymph node in breast cancer. *Lancet* 1997; 350: 958.
9. Albertini J, Lynan G, Cox C y col. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in the patient with breast cancer. *JAMA* 1996; 276: 1818-1822.

10. Rosen P, Saigo P, Braun D y col. Occult axillary lymph node metastases from breast cancers with intramammary lymphatic node metastases from breast cancers with intramammary lymphatic tumor emboli. *Am J Surg Pathol* 1982; 6: 639-641.
11. Clayton F, Hopkins C. Pathologic correlates of prognosis in lymph node-positive breast carcinomas. *Cancer* 1993; 71: 1780-1790
12. Cote R, Rosen P, Lesser M y col. Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J Clin Oncol* 1991; 9: 1749-1756.
13. Chen S, Hoehne F, Giuliano A. The prognostic significance of micrometastases in breast cancer: a SEER population-based analysis. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 3378-3384.
14. Carter C, Allen C, Henson D. Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24740 breast cancer cases. *Cancer* 1989; 63: 181-187.
15. Rosen P, Groshen S, Saigo P y col. Pathological prognostic factors in stage I (T1N0M0) breast carcinoma: a study of 644 patients with median follow-up of 18 years. *J Clin Oncol* 1989; 7: 1239-1251
16. Fisher B, Dignam J, Tan-Chiu E y col. Prognosis and treatment of patients with breast tumors of one centimeter or less and negative axillary lymph nodes. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 112-120.
17. Krag D, Weaver D, Alex J y col. Surgical resection and radiolocalization of sentinel lymph node in breast cancer using a gamma probe. *Surg Oncol* 1993; 2: 335-339.
18. Fisher E, Redmond C, Fisher B. Histologic grading of breast cancer. *Pathol Annu* 1980; 15: 239-251.
19. Bloom H, Richardson W. Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 1957; 11: 359-377.
20. Le Doussal V, Tubiana-Hulin M, Hacene K y col. Nuclear characteristics as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1989; 14: 207-216.
21. Fisher E, Sass R, Fisher B. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Project for breast cancers (protocol #4). X. Discriminants for tenth year treatment failure. *Cancer* 1984; 53: 712-723
22. Mohammed R, Martin S, Gill M y col. Improved methods of detection of lymphovascular invasion demonstrate that it is the predominant method of vascular invasion in breast cancer and has important clinical consequences. *Am J Surg Pathol* 2007; 31: 1825-1833.
23. Fitzgibbons P, Page D, Weaver D y col. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch pathol Lab Med* 2000; 124: 966-978.
24. Page D, Gray H, Allred D y col. Prediction of node-negative breast cancer outcome by histologic grading and S-phase analysis by flow cytometry: An Eastern Cooperative Oncology Group Companion Study. EST 4189. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2059-2069.
25. Lee B, Tannenbaum N. Inflammatory carcinoma of the breast: a report of 28 cases from the breast cancer clinic of Memorial Hospital. *Surg Gynecol Obstet* 1924; 39: 580-585.
26. Jaiyesimi I, Buzdar A, Hortobagyi G. Inflammatory breast cancer: a review. *J Clin Oncol* 1992; 10: 1014-1024.
27. Arpino G, Bradou V, Clark G y col. Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome. *Breast Cancer Res* 2004; 6: R149-R156.

28. Peters G, Wolff M, Haagensen CD. Tubular carcinoma of the breast. Clinical pathologic correlations based on 100 cases. *Ann Surg* 1981; 193: 138-149.
29. Diab S, Clark G, Osborne G y col. Tumor characteristics and clinical outcome of tubular and mucinous breast carcinomas. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1442-1448.
30. Fisher E, Kenny J, Sass R. Medullary cancer of the breast revisited. *Breast Cancer Res Treat* 1990; 16: 215-229.
31. Nixon A, Neuberg D, Hayes D y col. Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *J Clin Oncol* 1994; 12: 888-894.
32. Elledge R, Clark G, Chamness G y col. Tumor biologic factors and breast cancer prognosis among white, hispanic and black women in the United States. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 705-712.
33. Silvestrini R, Daidone M, Valagussa P y col. Cell kinetics as a prognostic indicator in node-negative breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1989; 25: 1165-1171.
34. Hedley D, Clark G, Cornelisse G y col. Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in carcinoma of the breast. Cytometry Consensus Conference. *Cytometry* 1993; 14: 482-485.
35. Hilsenbeck S, Ravdin P, De Moor C y col. Time dependence on hazard ratios for prognostic factors in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 52: 227-237.
36. Ellman S, Heinrich S. Estrogen and progesterone receptors. From molecular structures to clinical targets. *Celular and Molecular life sciences* 2009; 66: 2405-2426.
37. Jensen A, Jacobson H. Recent Prog Horm Res 1962; 18: 387-414.
38. Chen G, Zeng Q, Tse G. Estrogen and its receptor in cancer. *Med Res Rev* 2008; 28: 954-974.
39. Leygue E, Dotzlaw H, Watson PH y col. Altered estrogen receptor alpha and beta messenger RNA expression during human breast tumorigenesis. *Cancer Res* 1998 Aug 1; 58(15): 3197-201.
40. Lawson JS, Field AS, Champion S y col. Low oestrogen receptor alpha expression in normal breast tissue underlies low breast cancer incidence in Japan. *Lancet* 1999 Nov 20; 354(9192): 1787-8.
41. Paruthiyil S, Parmar H, Kerekatte V y col. Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer Res* 2004 Jan 1; 64(1): 423-8.
42. Shyamala G, Yang X, Cardiff RD y col. Impact of progesterone receptor on cell-fate decisions during mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Mar 28; 97(7): 3044-9.
43. Graham JD, Yeates C, Balleine RL y col. Characterization of progesterone receptor A and B expression in human breast cancer. *Cancer Res* 1995 Nov 1; 55(21): 5063-8.
44. Wilbur DC, Willis J, Mooney RA y col. Estrogen and progesterone receptor detection in archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue from breast carcinoma: a comparison of immunohistochemistry with the dextran-coated charcoal assay. *Mod Pathol* 1992 Jan; 5(1): 79-84.
45. Insa A, Lluch A, Prosper F y col. Prognostic factors predicting survival from first recurrence in patients with metastatic breast cancer: analysis of 439 patients. *Breast Cancer Res Treat* 1999 Jul; 56(1): 67-78.

46. McGuire WL, Clark GM. Prognostic factors and treatment decisions in axillary-node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 1992 Jun 25; 326(26): 1756-61.
47. Clark GM, McGuire WL, Hubay CA y col. The importance of estrogen and progesterone receptor in primary breast cancer. *Prog Clin Biol Res* 1983; 132E: 183-90.
48. Mohammed RH, Lakatua DJ, Haus E y col. Estrogen and progesterone receptors in human breast cancer. Correlation with histologic subtype and degree of differentiation. *Cancer* 1986 Sep 1; 58(5): 1076-81.
49. King CR, Kraus MH, Aaronson SA. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* 1985 Sep 6; 229(4717): 974-6.
50. Hudis CA. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med* 2007 Jul 5; 357(1): 39-51.
51. Scaltriti M, Rojo F, Ocaña A. Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007 Apr 18; 99(8): 628-38.
52. Anido J, Scaltriti M, Bech Serra JJ y col. Biosynthesis of tumorigenic HER2 C-terminal fragments by alternative initiation of translation. *EMBO J* 2006 Jul 12; 25(13): 3234-44.
53. Tandon AK, Clark GM, Chamness GC y col. HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *J Clin Oncol* 1989 Aug; 7(8): 1120-8.
54. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG y col. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987 Jan 9; 235(4785): 177-82.
55. Ross JS, Fletcher JA. HER-2/neu (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1999 Jul; 112(1 Suppl 1): S53-67.
56. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN y col. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131(1): 18-43.
57. Hanna W, O'malley FP, Barnes P y col. Updated recommendations from the Canadian National Consensus Meeting on HER2/neu testing in breast cancer. *Curr Oncol* 2007 Aug; 14(4): 149-53.
58. Consensus Panel and Risk Categories. 10th International Conference Primary Therapy of Early Breast Cancer. St Gallen 2007.
59. Tsuda H. HER-2 (c-erbB-2) test update: present status and problems. *Breast Cancer* 2006; 13(3): 236-48.
60. Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 2001 Sep; 37 Suppl 4: S9-15.
61. Constantino J, Fisher B, Gunduz N y col. Tumor size, ploidy, S-phase and Erb2 markers in patients with node-negative, ER positive tumors: Findings from NSABP B-14. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1994; 13: 59.
62. Allred D, Clarke G, Tandon A y col. HER2/neu in node-negative breast cancer. Prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma. *J Clin Oncol* 1992; 10: 599-605.
63. Gennari A, Sormani MP, Pronzato P y col. HER2 status and efficacy of adjuvant anthracyclines in early breast cancer: a pooled analysis of randomized trials. *J Natl Cancer Inst* 2008 Jan 2; 100(1): 14-20.

64. Hayes DF, Thor AD, Dressler LG y col. HER2 and response to paclitaxel in node-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2007 Oct 11; 357(15): 1496-506.
65. Dowsett M1, Allred C, Knox J y col. Relationship between quantitative estrogen and progesterone receptor expression and human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) status with recurrence in the Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination trial. *J Clin Oncol* 2008 Mar 1; 26(7): 1059-65.
66. Carlomagno C, Perrone F, Gallo C y col. c-erb B2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases. *J Clin Oncol*. 1996 Oct; 14(10): 2702-8.
67. Johnston SR. Hormone resistance. *Cancer Treat Res* 2009; 147: 1-33.
68. Rasmussen BB, Regan MM, Lykkesfeldt AE y col. Adjuvant letrozole versus tamoxifen according to centrally-assessed ERBB2 status for postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer: supplementary results from the BIG 1-98 randomised trial. *Lancet Oncol* 2008 Jan; 9(1): 23-8.
69. Viani GA, Afonso SL, Stefano EJ y col. Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials. *BMC Cancer* 2007 Aug 8; 7: 153.
70. Dahabreh IJ, Linardou H, Siannis F y col. Trastuzumab in the adjuvant treatment of early-stage breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Oncologist* 2008 Jun; 13(6): 620-30.
71. Lopez F1, Belloc F, Lacombe F y col. Modalities of synthesis of Ki67 antigen during the stimulation of lymphocytes. *Cytometry* 1991; 12(1): 42-9.
72. Trihia H1, Murray S, Price K y col. Ki-67 expression in breast carcinoma: its association with grading systems, clinical parameters, and other prognostic factors--a surrogate marker? *Cancer* 2003 Mar 1; 97(5): 1321-31.
73. Haerslev T1, Jacobsen GK, Zedeler K. Correlation of growth fraction by Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry with histopathological parameters and prognosis in primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 37(2): 101-13.
74. Urruticoechea A1, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol* 2005 Oct 1; 23(28): 7212-20.
75. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G Jr y col. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer* 2007 May 21; 96(10): 1504-13.
76. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE y col. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast* 2008 Aug; 17(4): 323-34.
77. Cheang MC, Chia SK, Voduc D y col. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009 May 20; 101(10): 736-50.
78. Faneyte IF, Schrama JG, Peterse JL y col. Breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy: predictive markers and relation with outcome. *Br J Cancer* 2003 Feb 10; 88(3): 406-12.
79. Jones N, Ougham H, Thomas H y col. Markers and mapping revisited: finding your gene. *New Phytol* 2009; 183(4): 935-66.

80. Viale G, Regan MM, Maiorano E y col. Prognostic and predictive value of centrally reviewed expression of estrogen and progesterone receptors in a randomized trial comparing letrozole and tamoxifen adjuvant therapy for postmenopausal early breast cancer: BIG 1-98. *J Clin Oncol* 2007 Sep 1; 25(25): 3846-52.
81. Dowsett M, Smith IE, Ebbs SR y col. Proliferation and apoptosis as markers of benefit in neoadjuvant endocrine therapy of breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2006 Feb 1; 12(3 Pt 2): 1024s-1030s.
82. Howell A, Locker GY. Defining the roles of aromatase inhibitors in the adjuvant treatment of early-stage breast cancer. *Clin Breast Cancer.* 2005 Oct; 6(4): 302-9.
83. Dowsett M, Smith IE, Ebbs SR y col. Prognostic value of Ki67 expression after short-term pre-surgical endocrine therapy for primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007 Jan 17; 99(2): 167-70.
84. Ormandy CJ, Musgrove EA, Hui R y col. Cyclin D1, EMS1 and 11q13 amplification in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2003 Apr; 78(3): 323-35.
85. Musgrove EA, Hamilton JA, Lee CS y col. Growth factor, steroid, and steroid antagonist regulation of cyclin gene expression associated with changes in T-47D human breast cancer cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 1993 Jun; 13(6): 3577-87.
86. Matsushime H, Quelle DE, Shurtleff SA y col. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1994 Mar; 14(3): 2066-76.
87. Zwijsen RM, Wientjens E, Klompaker R y col. CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell* 1997 Feb 7; 88(3): 405-15.
88. Jares P, Rey MJ, Fernández PL y col. Cyclin D1 and retinoblastoma gene expression in human breast carcinoma: correlation with tumour proliferation and oestrogen receptor status. *J Pathol* 1997 Jun; 182(2): 160-6.
89. Bilalović N, Vranić S, Basić H y col. Immunohistochemical evaluation of cyclin D1 in breast cancer. *Croat Med J* 2005 Jun; 46(3): 382-8.
90. Bièche I, Olivi M, Noguès C y col. Prognostic value of CCND1 gene status in sporadic breast tumours, as determined by real-time quantitative PCR assays. *Br J Cancer* 2002 Feb 12; 86(4): 580-6.
91. Koff A1, Giordano A, Desai D y col. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* 1992 Sep 18; 257(5077): 1689-94.
92. Bortner DM1, Rosenberg MP. Induction of mammary gland hyperplasia and carcinomas in transgenic mice expressing human cyclin E. *Mol Cell Biol* 1997 Jan; 17(1): 453-9.
93. Wingate H, Puskas A, Duong M y col. Low molecular weight cyclin E is specific in breast cancer and is associated with mechanisms of tumor progression. *Cell Cycle* 2009 Apr 1; 8(7): 1062-8.
94. Keyomarsi K, Tucker SL, Buchholz TA y col. Cyclin E and survival in patients with breast cancer. *N Engl J Med* 2002 Nov 14; 347(20): 1566-75.
95. Smith ML, Seo YR. Sensitivity of cyclin E-over expressing cells to cisplatin/taxol combinations. *Anticancer Res* 2000 Jul-Aug; 20(4): 2537-9.
96. Akli S, Keyomarsi K. Low-molecular-weight cyclin E: the missing link between biology and clinical outcome. *Breast Cancer Res* 2004; 6(5): 188-91.

97. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD y col. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol* 2009 Aug; 20(8): 1319-29.
98. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM y col. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Sep 2; 100(18): 10393-8.
99. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ y col. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002 Dec 19; 347(25): 1999-2009.
100. Buyse M, Loi S, van't Veer Ly col. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2006 Sep 6; 98(17): 1183-92.
101. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med*. 2009 Feb 19; 360(8): 790-800.
102. Paik S, Shak S, Tang G y col. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004 Dec 30; 351(27): 2817-26.
103. Dowsett M. Predictive and prognostic factors. 1 2010 Dec 20; 12 Suppl 4: S2.
104. Paik S, Tang G, Shak S y col. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2006 Aug 10; 24(23): 3726-34.
105. Loi S, Piccart M, Sotiriou C. The use of gene-expression profiling to better understand the clinical heterogeneity of estrogen receptor positive breast cancers and tamoxifen response. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007 Mar; 61(3): 187-94.
106. Desmedt C, Giobbie-Hurder A, Neven P y col. The Gene expression Grade Index: a potential predictor of relapse for endocrine-treated breast cancer patients in the BIG 1-98 trial. *BMC Med Genomics* 2009 Jul 2; 2: 40.
107. Ma XJ, Salunga R, Dahiya S y col. A five-gene molecular grade index and HOXB13: IL17BR are complementary prognostic factors in early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* 2008 May 1; 14(9): 2601-8.
108. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ y col. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004 Aug 19; 351(8): 781-91.
109. Harris L, Fritsche H, Mennel R y col. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007 Nov 20; 25(33): 5287-312.
110. Fehm T, Solomayer EF, Meng S y col. Methods for isolating circulating epithelial cells and criteria for their classification as carcinoma cells. *Cytotherapy* 2005; 7(2): 171-85.
111. Kohler C, Radpour R, Barekati Z y col. Levels of plasma circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers for breast tumors. *Mol Cancer* 2009 Nov 17; 8: 105.
112. Board RE, Wardley AM, Dixon JM y col. Detection of PIK3CA mutations in circulating free DNA in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010 Apr; 120(2): 461-7.
113. Mattie MD, Benz CC, Bowers J y col. Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Mol Cancer* 2006 Jun 19; 5: 24.
114. Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ y col. Circulating microRNAs as novel minimally in-

- vasive biomarkers for breast cancer. *Ann Surg* 2010 Mar; 251(3): 499-505.
115. Olivier M, Langerod A, Carrieri P y col. The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 1157-67.
 116. Billgren AM, Tani E, Liedberg A y col. Prognostic significance of tumor cell proliferation analyzed in fine needle aspirates from primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 71: 161-70.
 117. Zemzoum I, Kates RE, Ross JS y col. Invasión factors uPA/PAI-1 and HER2 status provide independent and complementary information on patient outcome in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 1022-8.
 118. Jänicke F, Prechtel A, Thomssen C y col. Randomized adjuvant chemotherapy trial in highrisk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 913-20.
 119. Duffy MJ. Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies. *Clinical chemistry* 2002; 48: 1194-7.
 120. Janicke F, Schmitt M, Pache L y col. Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 1993; 24: 195-208.
 121. Springer GF. T and Tn, general carcinoma autoantigens. *Science* 1984; 224: 1198-206.
 122. Glinsky VV, Glinsky GV, Rittenhouse-Olson K y col. The role of Thomsen-Friedenreich antigen in adhesion of human breast and prostate cancer cells to the endothelium. *Cancer research* 2001; 61: 4851-7.
 123. Deutscher SL, Dickerson M, Gui G y col. Carbohydrate antigens in nipple aspirate fluid predict the presence of atypia and cancer in women requiring diagnostic breast biopsy. *BMC cancer* 2010; 10: 519.
 124. Qin W, Gui G, Zhang K y col. Proteins and carbohydrates in nipple aspirate fluid predict the presence of atypia and cancer in women requiring diagnostic breast biopsy. *BMC cancer* 2012; 12: 52. doi: 10.1186/1471-2407-12-52.
 125. Watson MA, Fleming TP. Isolation of differentially expressed sequence tags from human breast cancer. *Cancer research* 1994; 54: 4598-602.
 126. Huang Y, Zhang HQ, Wang J y col. Cloning expression, monoclonal antibody preparation and serologic study of mammaglobin in breast cancer. *Neoplasma* 2011; 58: 436-40.
 127. Galvis-Jimenez JM, Curtidor H, Patarroyo MA y col. Mammaglobin peptide as a novel biomarker for breast cancer detection. *Cancer biology & therapy* 2013; 14: 327-32.
 128. Lee GW, Kim JY, Koh EH y col. Plasma human mammaglobin mRNA associated with poor outcome in patients with breast cancer. *Genetics and molecular research* GMR. 2012; 11: 4034-42.
 129. Liu Y, Ma L, Liu X y col. Expression of human mammaglobin as a marker of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *Experimental and therapeutic medicine* 2012; 3: 550-4.
 130. Luo MH, Huang YH, Ni YB y col. Expression of mammaglobin and gross cystic disease fluid protein-15 in breast carcinomas. *Human pathology* 2013; 44: 1241-50.
 131. Huo L, Zhang J, Gilcrease MZ y col. Gross cystic disease fluid protein-15 and mammaglobin A expression determined by immunohistochemis-

- try is of limited utility in triple-negative breast cancer. *Histopathology* 2013; 62: 267-74.
132. Span PN, Waanders E, Manders P y col. Mammaglobin is associated with low-grade, steroid receptor-positive breast tumors from postmenopausal patients, and has independent prognostic value for relapse-free survival time. *Journal of Clinical Oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2004; 22: 691-8.
 133. Brown LF, Papadopoulos-Sergiou A, Berse B y col. Osteopontin expression and distribution in human carcinomas. *The American Journal of Pathology* 1994; 145: 610-23.
 134. Weber GF, Lett GS, Haubein NC. Categorical meta-analysis of Osteopontin as a clinical cancer marker. *Oncology reports* 2011; 25: 433-41.
 135. Thorat D, Sahu A, Behera R y col. Association of osteopontin and cyclooxygenase-2 expression with breast cancer subtypes and their use as potential biomarkers. *Oncology letters* 2013; 6: 1559-64.
 136. Mi Z, Bhattacharya SD, Kim VM y col. Osteopontin promotes CCL5-mesenchymal stromal cell-mediated breast cancer metastasis. *Carcinogenesis* 2011; 32: 477-87.
 137. He B, Mirza M, Weber GF. An osteopontin splice variant induces anchorage independence in human breast cancer cells. *Oncogene* 2006; 25: 2192-202.
 138. Mirza M, Shaughnessy E, Hurley JK y col. Osteopontin-c is a selective marker of breast cancer. *International Journal of Cancer- Journal International du Cancer*. 2008; 122: 889-97.
 139. Pang H, Lu H, Song H y col. Prognostic values of osteopontin-c, E-cadherin and beta-catenin in breast cancer. *Cancer epidemiology* 2013. doi: 10.1016/j.canep.2013.08.005.
 140. Li NY, Weber CE, Mi Z y col. Osteopontin up-regulates critical epithelial-mesenchymal transition transcription factors to induce an aggressive breast cancer phenotype. *Journal of the American College of Surgeons* 2013; 217: 17-26.
 141. Bramwell VH, Tuck AB, Chapman JA y col. Assessment of osteopontin in early breast cancer: correlative study in a randomised clinical trial. *Breast Cancer Research (BCR)* 2014; 16: R8.
 142. Tenhagen M, van Diest PJ, Ivanova IA y col. Fibroblast growth factor receptors in breast cancer: expression, downstream effects, and possible drug targets. *Endocr Relat Cancer* 2012; 19: R115-29.
 143. Huang Y, Zhang HQ, Wang J y col. Cloning expression, monoclonal antibody preparation and serologic study of mammaglobin in breast cancer. *Neoplasma* 2011; 58: 436-40.
 144. Galvis-Jimenez JM, Curtidor H y col. Mammaglobin peptide as a novel biomarker for breast cancer detection. *Cancer biology & therapy* 2013; 14: 327-32.
 145. Kim S, Dubrovskaya A, Salamone RJ y col. FGFR2 promotes breast tumorigenicity through maintenance of breast tumor-initiating cells. *PLoS one* 2013; 8: e51671.
 146. Moffa AB, Tannheimer SL, Ethier SP. Transforming potential of alternatively spliced variants of fibroblast growth factor receptor 2 in human mammary epithelial cells. *Mol Cancer Res* 2004; 2: 643-52.
 147. Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA y col. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 1997; 15: 356-62.
 148. Tokunaga E, Oki E, Kimura Y y col. Coexistence of the loss of heterozygosity at the PTEN lo-

- cus and HER2 overexpression enhances the Akt activity thus leading to a negative progesterone receptor expression in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 101: 249-57.
149. Nakajima H, Sakaguchi K, Fujiwara I y col. Apoptosis and inactivation of the PI3-kinase pathway by tetrocarcin A in breast cancers. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 356: 260-5.
 150. Milovanovic Z, Dzodic R, Susnjar S y col. PTEN protein expression in postmenopausal steroid receptor positive early breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen. *J BUON* 2011; 16: 46-51.
 151. Zhang HY, Liang F, Jia ZL y col. PTEN mutation, methylation and expression in breast cancer patients. *Oncol Lett* 2013; 6: 161-8.
 152. Ashraf N, Zino S, Macintyre A y col. Altered sir-tuin expression is associated with node-positive breast cancer. *British Journal of Cancer* 2006; 95: 1056-61.
 153. Finley LW, Carracedo A, Lee J y col. SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1alpha destabilization. *Cancer cell* 2011; 19: 416-28.
 154. Kim HS, Patel K, Muldoon-Jacobs K y col. SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. *Cancer cell* 2010; 17: 41-52.
 155. Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 2010; 29: 4741-51.
 156. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF y col. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-11.
 157. Chaffer CL, Brennan JP, Slavin JL y col. Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: role of fibroblast growth factor receptor-2. *Cancer Res* 2006; 66: 11271-8.
 158. Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrio D y col. Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene* 2002; 21: 3241-6.
 159. Tran DD, Corsa CA, Biswas H y col. Temporal and spatial cooperation of Snail1 and Twist1 during epithelial-mesenchymal transition predicts for human breast cancer recurrence. *Mol Cancer Res* 2011; 9: 1644-57.
 160. Chaffer CL, Marjanovic ND, Lee T y col. Poised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity. *Cell* 2013; 154: 61-74.
 161. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G. 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.
 162. Desta Z, Ward BA, Soukhova NV y col. Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2004; 310: 1062-75.
 163. Johnson MD, Zuo H, Lee KH y col. Pharmacological characterization of 4-hydroxy-N-desmethyl tamoxifen, a novel active metabolite of tamoxifen. *Breast cancer research and treatment* 2004; 85: 151-9.
 164. Beverage JN, Sissung TM, Sion AM y col. CYP2D6 polymorphisms and the impact on tamoxifen therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2007; 96: 2224-31.

165. Rodriguez-Antona C, Ingelman-Sundberg M. Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. *Oncogene* 2006; 25: 1679-91.
166. Lim JS, Chen XA, Singh O y col. Impact of CYP2D6, CYP3A5, CYP2C9 and CYP2C19 polymorphisms on tamoxifen pharmacokinetics in Asian breast cancer patients. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2011; 71: 737-50.
167. German S, Aslam HM, Saleem S y col. Carcinogenesis of PIK3CA. *Heredit Cancer Clin Pract* 2013; 11: 5.
168. Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M y col. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2013; 368: 1199-209.
169. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012; 490: 61-70.
170. Fu X, Osborne CK, Schiff R. Biology and therapeutic potential of PI3K signaling in ER+/HER2-negative breast cancer. *Breast* 2013; doi:10.1016/j.breast.2013.08.001.
171. Cizkova M, Dujaric ME, Lehmann-Che J y col. Outcome impact of PIK3CA mutations in HER2-positive breast cancer patients treated with trastuzumab. *British Journal of Cancer* 2013; 108: 1807-9.
172. Ramírez-Ardila DE, Helmijr JC y col. Hotspot mutations in PIK3CA associate with first-line treatment outcome for aromatase inhibitors but not for tamoxifen. *Breast cancer research and treatment* 2013; 139: 39-49.
173. Niederreither K, Dolle P. Retinoic acid in development: towards an integrated view. *Nature Reviews Genetics* 2008; 9: 541-53.
174. Hua S, Kittler R, White KP. Genomic antagonism between retinoic acid and estrogen signaling in breast cancer. *Cell* 2009; 137: 1259-71.
175. Johansson HJ, Sanchez BC, Mundt F y col. Retinoic acid receptor alpha is associated with tamoxifen resistance in breast cancer. *Nature communications* 2013; 4: 2175.
176. Akira S, Nishio Y, Inoue M y col. Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell* 1994; 77: 63-71.
177. Subramaniam A, Shanmugam MK, Perumal E y col. Potential role of signal transducer and activator of transcription (STAT)3 signaling pathway in inflammation, survival, proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1835: 46-60.
178. Wang X, Wang G, Zhao Y y col. STAT3 mediates resistance of CD44(+)/CD24(-/low) breast cancer stem cells to tamoxifen in vitro. *J Biomed Res* 2012; 26: 325-35.
179. Díaz N, Minton S, Cox C y col. Activation of stat3 in primary tumors from high-risk breast cancer patients is associated with elevated levels of activated SRC and survivin expression. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 20-8.
180. Dolled-Filhart M, Camp RL, Kowalski DP y col. Tissue microarray analysis of signal transducers and activators of transcription 3 (Stat3) and phospho-Stat3 (Tyr705) in node-negative breast cancer shows nuclear localization is associated with a better prognosis. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 594-600.
181. Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Science signaling* 2008; 1: re6. doi: 10.1126/scisignal.127re6.
182. Wurtz SO, Schrohl AS, Sorensen NM y col. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in

- breast cancer. *Endocrine-related cancer* 2005; 12: 215-27.
183. Fu ZY, Lv JH, Ma CY y col. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 decreased chemosensitivity of MDA-435 breast cancer cells to chemotherapeutic drugs through the PI3K/AKT/NF-small ka, CyrillicB pathway. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 2011; 65: 163-7.
 184. Hekmat O, Munk S, Fogh L y col. TIMP-1 Increases Expression and Phosphorylation of Proteins Associated with Drug Resistance in Breast Cancer Cells. *Journal of Proteome Research* 2013; 12: 4136-51.
 185. Viswanathan SR, Powers JT, Einhorn W y col. Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nature Genetics* 2009; 41: 843-8.
 186. Lv K, Liu L, Wang L y col. Lin28 mediates paclitaxel resistance by modulating p21, Rb and Let-7a miRNA in breast cancer cells. *PLoS one* 2012; 7: e40008. doi: 10.1371/journal.pone.0040008.
 187. Wang L, Yuan C, Lv K y col. Lin28 mediates radiation resistance of breast cancer cells via regulation of caspase, H2A.X and Let-7 signaling. *PLoS one* 2013; 8: e67373. doi: 10.1371/journal.pone.0067373.
 188. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* 1993; 75: 843-54.
 189. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136: 215-33. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002.
 190. Lu J, Getz G, Miska EA y col. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435: 834-8. doi: 10.1038/nature03702.
 191. Andorfer CA, Necela BM, Thompson EA y col. MicroRNA signatures: clinical biomarkers for the diagnosis and treatment of breast cancer. *Trends in Molecular Medicine* 2011; 17: 313-9.
 192. Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ y col. Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Annals of Surgery* 2010; 251: 499-505.
 193. Lv M, Zhu X, Chen W y col. Searching for candidate microRNA biomarkers in detection of breast cancer: a meta-analysis. *Cancer biomarkers: section A of Disease markers* 2013; 13: 395-401.
 194. Schwarzenbacher D, Balic M, Pichler M. The role of microRNAs in breast cancer stem cells. *International Journal of Molecular Sciences* 2013; 14: 14712-23.
 195. Hong L, Han Y, Zhang Y y col. MicroRNA-21: a therapeutic target for reversing drug resistance in cancer. *Expert opinion on therapeutic targets* 2013; 17: 1073-80.
 196. McCafferty MP, McNeill RE, Miller N y col. Interactions between the estrogen receptor, its cofactors and microRNAs in breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 2009; 116: 425-32.
 197. Bhat-Nakshatri P, Wang G, Collins NR y col. Estradiol-regulated microRNAs control estradiol response in breast cancer cells. *Nucleic acids research* 2009; 37: 4850-61.