

## MONOGRAFÍA

---

# MARCADORES BIOLÓGICOS EN CÁNCER DE MAMA

Federico Leroux

---

### RESUMEN

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea; tumores similares en cuanto a sus factores de pronóstico clásicos se comportan de forma distinta en su evolución. Cabe suponer que la diferencia entre ellos se establece a nivel molecular. La clasificación histopatológica actual, el tamaño tumoral, el número de ganglios positivos, la invasión vásculo-linfática, sufren limitaciones en su relevancia clínica, al no ser parámetros suficientes para predecir el curso de la enfermedad. Los avances en la biología molecular han permitido incorporar marcadores biológicos en la práctica clínica que facilitan la predicción del riesgo de cáncer, el pronóstico y la respuesta a las terapias sistémicas. En este trabajo se desarrollan los principales marcadores biológicos en cáncer de mama.

#### Palabras clave

HER-2/neu. Receptores hormonales. Ki-67. Factores de pronóstico. Factores de predicción. Marcadores biológicos. Cáncer de mama.

### SUMMARY

Breast cancer is an heterogeneous disease; similar tumors, in terms of classical prognostic factors, have a different behavior in their evolution. Probably, the difference should be in a molecular level. The current histopathological classification, the tumor size, the number of positive lymph nodes, the vascular-lymphatic invasion, have limits in their clinical relevance, because they are not always able to predict which will be the outcome of the illness. The improvements in molecular biology have led to implement biomarkers in the clinical practice, that make easier the prediction of breast cancer risk, the illness prognosis and treatment efficacy. In this paper, the main biomarkers applied in breast cancer are reviewed.

#### Key words

HER-2/neu. Hormone receptors. Ki-67. Prognostic factors. Predictive factors. Biomarkers. Breast cancer.

---

## INTRODUCCIÓN

Durante la segunda mitad del siglo XX, los investigadores entendieron que el cáncer de mama era una enfermedad en la cual el proceso de extensión se podía producir desde etapas iniciales. Esto condujo a numerosos ensayos clínicos aleatorios, buscando evaluar la utilidad de distintos tratamientos sistémicos. Si bien se logró demostrar una innegable mejoría en el pronóstico de las pacientes con cáncer de mama, se trataron pacientes que no iban a recaer sin tratamiento o que recayeron a pesar del tratamiento. Es por esto que se inició una búsqueda de factores tanto de predicción como de pronóstico, que permitieran identificar a aquellas pacientes de mayor riesgo y aquellas que se beneficiarían de un tratamiento adyuvante.

Existen diferencias fundamentales entre un factor de pronóstico y uno de predicción. Los factores de pronóstico incluyen cualquier característica del tumor o de la paciente que puede usarse para predecir la historia natural de la neoplasia y por ende el período libre de enfermedad, recidiva y sobrevida, de las pacientes. En cambio, los factores de predicción indican la respuesta probable o en su defecto, la falta de respuesta probable a una terapia determinada.

Las características generales que hacen a un marcador biológico deben incluir la reproducibilidad de su estudio, la facilidad de la recolección de la muestra a estudiar y la distinta asociación con la enfermedad, según si es evaluado un paciente sano o enfermo. El marcador biológico

de predicción ideal debe estar fuertemente relacionado al crecimiento tumoral y debe dejar en manifiesto si la respuesta al tratamiento será adecuada o no. En los últimos años la comunidad científica ha dedicado grandes esfuerzos al descubrimiento de marcadores biológicos tanto de predicción como de pronóstico, que permitan mejorar el tratamiento del cáncer de mama.

En el manuscrito del Consenso Americano de Patólogos de 1999, se revisaron los factores de pronóstico y predicción del cáncer mamario y los categorizaron en tres niveles basados en la fortaleza de la evidencia de los datos publicados (Tabla I):

- Categoría I: factores bien respaldados en la literatura, debiendo ser usados de manera rutinaria.
- Categoría II: factores que se han estudiado, pero que precisan una validación estadística más rigurosa, uso opcional.
- Categoría III: factores que no han sido del todo estudiados o que no han demostrado su valor de pronóstico / predicción.<sup>1</sup>

En la actualidad, 13 años más tarde, dado el nivel de evidencia acumulada, el marcador biológico HER-2/neu y en menor medida Ki-67 deberían ser tenidos en cuenta en la categoría I.

Los factores de pronóstico y predicción no sólo pueden cambiar en el tiempo, como consecuencia del avance en la investigación básica, sino que también pueden ser tenidos en cuenta de distinta manera según qué comité de exper-

Categoría I	Categoría II	Categoría III
Tamaño tumoral	HER-2/neu	Ploidía
Estatus ganglionar	p53	Angiogénesis
Grado histológico	Permeación vascular o linfática	TGF $\alpha$
Tipo histológico	Ki-67	bcl-2
Receptores hormonales	Análisis de ADN (fracción de fase)	Catepsina D
Recuento de número de mitosis		ps2

**Tabla I.** Clasificación de factores de pronóstico y predicción en cáncer de mama, según el Consenso del Colegio Americano de Patólogos (1999).

tos los evalúa (Tabla II).

## RECEPTORES HORMONALES

### Biología

El estrógeno y la progesterona son hormonas esenciales para el crecimiento de la glándula mamaria. Ya en la década del noventa, sus receptores fueron establecidos como factores de predicción y pronóstico en el cáncer de mama,<sup>23</sup> siendo publicada la primera investigación válida con respecto a este tema a fines de la década del setenta.<sup>4</sup> En consecuencia, en la actualidad el

estado de receptores hormonales en cáncer de mama forma parte de la evaluación de rutina para esta neoplasia. Ambos pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares, de la cual forman parte también otros receptores de hormonas esteroideas, el receptor de la vitamina D, el receptor del ácido retinoico y el receptor de la hormona tiroidea. Las proteínas que componen este grupo están estructuralmente relacionadas, presentando una notable conservación tanto en su secuencia de aminoácidos como en sus dominios funcionales o módulos. Todos estos receptores son factores de transcripción inducibles, los cuales se hacen activos en presencia de su

Fuente	Factores de pronóstico	Factores de predicción
NIH (1990)	Ganglios axilares Tamaño tumoral Receptores hormonales Grado nuclear Tipo histológico Proliferación Fase S Catepsina D	No tratado
St. Gallen's (1995)	Ganglios axilares Tamaño tumoral Grado histológico Edad Receptores hormonales	Menopausia Receptores hormonales
ACP (1995)	TNM Tipo histológico Grado histológico de posible valor Proliferación Mitosis Fase S Ki-67 MIB 1 c-erb-2 p53 Angiogénesis Invasión vascular	No tratado
ASCO (1996)	Ninguna determinación de laboratorio	Receptores hormonales
St. Gallen's (1998)	Ganglios axilares Tamaño tumoral Grado histológico Grado nuclear Edad Receptores hormonales Invasión linfática / vascular	Receptores hormonales

Tabla II. Factores de pronóstico y predicción según comités de expertos.

Fuente	Factores de pronóstico	Factores de predicción
ACP (1999)	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 $\alpha$ bcl 2 ps2 Catepsina D	No separados de los factores de pronóstico
NIH (2000)	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	Receptores hormonales  Sin papel clínico establecido c-erb-2

**Tabla II (continuación).** Factores de pronóstico y predicción según comités de expertos.

ligando específico.<sup>5</sup> Los cuatro módulos son a partir del extremo amino terminal: dominio modulador, dominio de unión al ADN, región bisagra y el dominio de unión al ligando.

El receptor de estrógeno (RE) fue identificado hace aproximadamente 50 años, en 1962 cuando Jensen y colaboradores describieron la presencia de sitios de unión de estrógeno en diferentes tejidos de órganos blanco.<sup>6</sup> Las acciones biológicas del estrógeno están tradicionalmente mediadas a través de 2 isoformas: el receptor de estrógeno  $\alpha$  de 67 KDa de peso molecular y el  $\beta$  de 57 KDa de peso molecular. Los receptores  $\alpha$  y el  $\beta$  están codificados en genes distintos. Dife-

rentes estudios demostraron que los roles que cumplen ambas isoformas son completamente diferentes en el cáncer de mama. El RE  $\alpha$  es un promotor de tumor, mientras que el RE  $\beta$  es un supresor tumoral.<sup>7</sup> También se constató que mientras el tejido mamario normal sufre el proceso de oncogénesis, las cantidades de receptores de estrógeno  $\alpha$  aumentan mientras que las  $\beta$  disminuyen.<sup>8</sup> Otro estudio demuestra el aumento de expresión de receptor  $\alpha$  en pacientes con riesgo incrementado de cáncer de mama.<sup>9</sup> La capacidad del receptor  $\beta$  para disminuir la carcinogénesis estaría dada por su habilidad para disminuir la expresión de c-myc, ciclina A,

ciclina D1 y ciclina E, y aumentar los niveles de p21 y p27.<sup>10,11</sup> Es por todo esto, que la presencia del receptor  $\beta$  está asociada a un mejor pronóstico y mayor tiempo libre de enfermedad.<sup>12</sup>

El receptor de progesterona (RP) también pertenece a la superfamilia de receptores nucleares. Su transcripción está regulada por el estrógeno, por lo cual su expresión es un marcador de la acción del estrógeno en la mama. También posee dos isoformas, receptor de progesterona A (peso molecular 94 KDa) y receptor de progesterona B (peso molecular 116 KDa). En el tejido mamario normal, están expresados ambos en concentraciones equimolares, indicando que son necesarios para la normal señalización fisiológica de la progesterona.<sup>13,14</sup> Funcionalmente las dos isoformas no son equivalentes. Las diferencias en las secuencias amino terminal afectan la selectividad de unión a los sitios blancos. Mientras que el receptor B actúa como un factor de transcripción, el receptor A, al tener poca o nula acción intrínseca, cumple un rol modulador del receptor B. Algunos estudios han demostrado que la relación entre la cantidad de ambos receptores está alterada en la carcinogénesis mamaria.<sup>15,16</sup>

Si bien la unión del estrógeno o la progesterona a su receptor resulta en una serie de cambios en las funciones celulares, el mecanismo de acción de dichas hormonas puede diferenciarse en dos tipos distintos: el efecto genómico y el no genómico.

Mediante la vía genómica, el estrógeno ejerce su influencia a través de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$ . En general, para que esto ocurra forman homodímeros o heterodímeros según qué isoformas se unan. Si se unen dos receptores  $\alpha$  o  $\beta$ , hablamos de homodímeros, mientras que si se unen isoformas distintas, hablaremos de heterodímeros. La activación del complejo hormona receptor y su posterior dimerización provocará una respuesta hormonal determinada al activar o inhibir genes mediante su acción sobre elementos

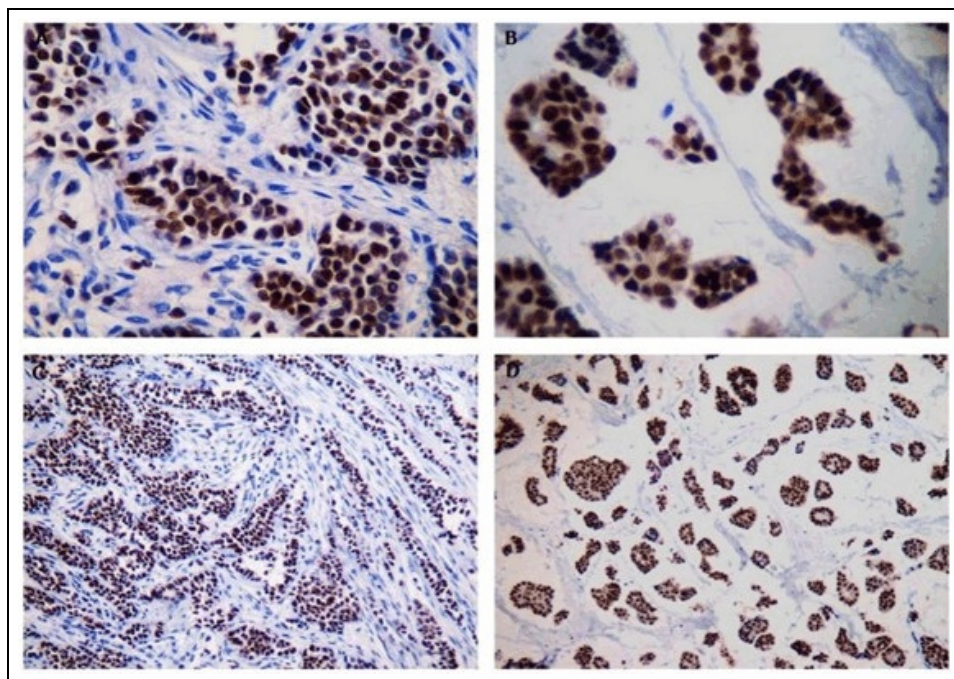
respondedores (regiones promotoras de genes determinados). La respuesta genómica típicamente ocurre en horas. La vía genómica de la progesterona es similar, al igual que otros esteroides, a la descrita para estrógeno.

En la vía no genómica, el estrógeno actúa a través de receptores ubicados en la membrana plasmática o sus cercanías. La acción no genómica del estrógeno está dada por estimulación de la MAPK (mitogen activated protein kinase) mediante la activación de la tirosina quinasa, inducción de la síntesis de AMPc, unión a proteínas G y resulta en el aumento del calcio intracelular, el óxido nítrico o la activación de múltiples cascadas de quinasas intracelulares. Procesos celulares complejos como la proliferación, la apoptosis, la motilidad celular y la diferenciación, son modulados a través de esta vía mucho más rápida que la anterior, pues ocurre en minutos.

## Determinación

En la década de los ochenta los receptores hormonales se determinaban por el método bioquímico de carbón-dextrán. El problema estaba dado por las dificultades técnicas del método, lo caro que resultaba, la necesidad de reactivos radioactivos y la relativa gran cantidad de material fresco-congelado necesaria para poder realizar la prueba. En la década del noventa, el advenimiento de la inmunohistoquímica (IHQ) y los anticuerpos monoclonales permitió superar esas dificultades. En comparación con las técnicas bioquímicas, la IHQ es más fácil de realizar, menos costosa, más segura, aplicable a una variedad de muestras fijadas e incluidas y, no menos importante, más eficaz en la capacidad de predicción de respuesta al tratamiento con tamoxifeno. La reacción positiva a RE y RP se observa mediante un precipitado en el núcleo de las células (Figura1).

Así es que se empezaron a determinar los receptores hormonales en tejidos fijados en for-



**Figura 1.** Inmunohistoquímica para receptores hormonales.

**A y C:** Tinción para receptores de estrógeno.

**B y D:** Tinción para receptores de progesterona.

La reacción positiva se visualiza por la coloración marrón en el núcleo de las células.

maldehído e incluidos en parafina, observando una buena correlación e incluso superando el primer método.<sup>17</sup> La determinación de receptores hormonales se puede realizar en cortes del tumor primario o metastásico que estén bien preservados e incluso se puede realizar en material proveniente de biopsias histológicas con aguja gruesa, siempre y cuando la muestra sea suficiente.

### Significado clínico

La asociación entre el estado de los receptores hormonales con las manifestaciones en el comportamiento tumoral ha sido ampliamente reportada. Tumores con receptores hormonales positivos muestran mayor diferenciación, ADN diploide, bajo potencial de proliferación y menor propensión a la diseminación visceral. Mientras que en ausencia de los receptores, se aprecian

neoplasias poco diferenciadas, aneuploides, con alta fracción proliferativa y mayor frecuencia de metástasis a distancia.<sup>18-21</sup>

Los receptores hormonales positivos están correlacionados con un mejor pronóstico en términos de supervivencia libre de enfermedad y de supervivencia global. La diferencia absoluta es del 8% a 10% en supervivencia libre de enfermedad para mujeres con tumores de mama receptores positivos, en comparación con aquellas con receptores negativos.<sup>22</sup>

El estatus hormonal tumoral positivo no sólo funciona como factor de pronóstico, sino también permite determinar altamente un valor de predicción de respuesta satisfactoria al tratamiento hormonal, tanto en tumores primarios como metastásicos.<sup>23-25</sup> Es decir, la expresión de receptores de estrógeno y progesterona positivos se correlaciona con tumores de bajo grado histológico que responden a tratamiento hormonal,

sobre todo en pacientes posmenopáusicas. Así se puede estipular cuál será la probabilidad de respuesta al tratamiento endocrino: el 77% de las pacientes con tumores RE y RP positivos responden a terapia hormonal, 27% responden cuando son RE positivos y RP negativos, 46% responden cuando son RE negativos y RP positivos, 10% cuando ambos son negativos, finalmente el 11% de las pacientes no responden cuando ambos receptores son positivos.<sup>26-28</sup>

En ausencia de RE es habitual detectar un bajo nivel de RP, lo que sustenta la hipótesis que postula que la síntesis de RP depende de la actividad del estrógeno. Los receptores de progesterona presentan implicancia pronóstica similar a los RE, y se determinan en conjunto porque proporcionan una mejora en el valor de predicción del método.

## HER-2/neu

### Biología

HER-2/neu es un receptor proteico transmembrana con actividad tirosina quinasa, de un peso molecular de 185 KDa. Su secuencia de ADN conforma un protooncogén ubicado en brazo largo del cromosoma 17 (17q21). Descubierta en 1984 por Weinberg y colaboradores,<sup>29</sup> pertenece a la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico<sup>30</sup> constituida por un total de cuatro miembros: HER-1 (erb-B1), HER-2 (erb-B2), HER-3 (erb-B3), HER-4 (erb-B4). Su denominación hace referencia al acrónimo "human epidermal growth factor receptor".

Estructuralmente, el receptor HER-2/neu posee tres secciones: un dominio extracelular de unión a ligando, un dominio intracelular con función tirosina quinasa involucrada en la transducción de señales y otro transmembrana. A diferencia del resto de los receptores de su familia, carece de un ligando natural.

Para activarse requiere la formación de dímeros. Según si se produce con otros receptores

de la misma familia o no, se formarán heterodímeros u homodímeros respectivamente.<sup>31</sup> La heterodimerización produce una señalización más potente. La amplificación del gen determina la sobreexpresión del receptor en la membrana celular, lo que conduce a una mayor posibilidad de dimerización, consecuente activación y amplificación de la señal. Esto determinará una activación celular excesiva, incremento en la proliferación, cambios en la adhesividad celular y la resistencia a apoptosis<sup>32</sup> a través de distintas vías de señalización intracelular como por ejemplo RAS MAPK (rats sarcoma and mitogen activated protein kinase), AKT/PI3K (phosphoinositide 3 kinase) AKT/pTEN (phosphatase and tensine homolog).

Otro mecanismo de activación está dado por la acumulación de formas truncadas de HER-2/neu. El origen de esos fragmentos puede ser el resultado de una proteólisis del dominio extracelular del receptor o por un fenómeno de traducción en sitios alternativos, configurando una variante de proteína original. Se ha demostrado que existen procesos proteolíticos que escinden el receptor desprendiendo el dominio extracelular, una proteína soluble de 105 KDa. En estas condiciones el fragmento retenido, denominado p95, por su peso de 95 KDa, está fosforilado y mantiene activo su mecanismo tirosina quinasa.<sup>33</sup> La función biológica de las proteínas p95 no ha sido caracterizada exhaustivamente, aunque se demostró que su sobreexpresión provoca el desarrollo de tumores resistentes a trastuzumab.<sup>34</sup>

Aunque un tumor primario no exprese la proteína HER-2/neu, las metástasis que resulten de la extensión neoplásica pueden hacerlo; por el contrario, si un tumor primario expresa la proteína, esta capacidad se mantiene en todas las metástasis del tumor.<sup>35,36</sup>

### Determinación

La identificación de tumores HER-2/neu po-

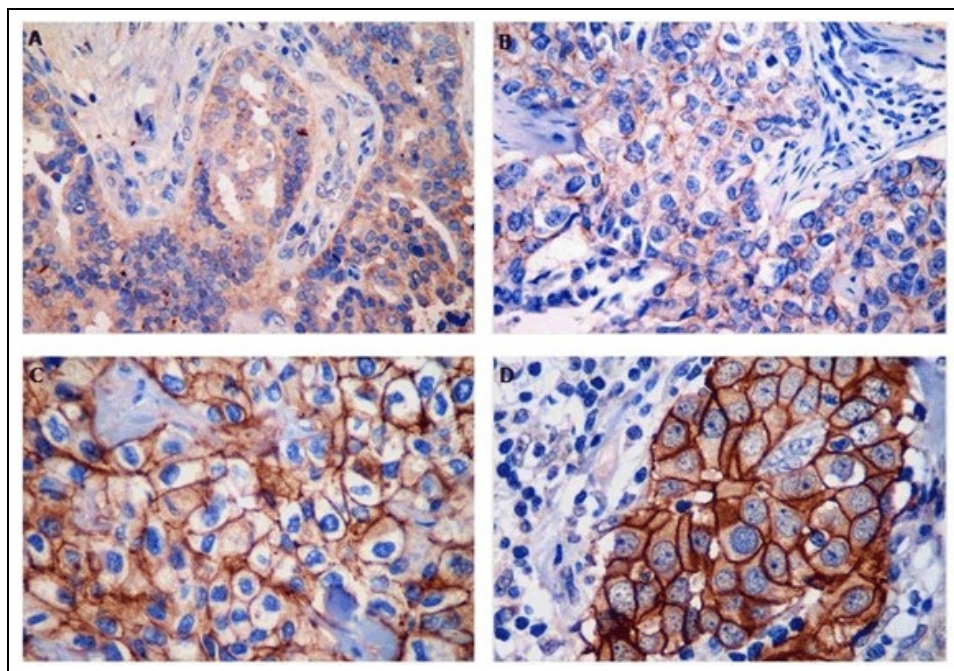
Inmunohistoquímica	CISH	FISH
Bajo costo	Costo medio	Alto costo
Microscopia luz Evaluación morfológica Resultado cualitativo-semicuantitativo	Microscopia luz Evaluación morfológica Resultado cuantitativo	Microscopia fluorescencia Evaluación no morfológica Resultado cuantitativo

**Tabla III.** Métodos empleados en la determinación de HER-2/neu.

sitivos, ya sea a través de la amplificación de su genoma o el hallazgo de la sobreexpresión de la proteína, caracteriza del 10% al 30% del total de los carcinomas invasivos de mama.<sup>37,38</sup> Las técnicas usadas para detectar anomalías en la amplificación del gen HER-2/neu o la sobreexpresión de su proteína incluyen IHQ, "fluorescence in-situ hybridization" (FISH), "chromogenic in-situ hybridization" (CISH), "real time-PCR" (PCR-RT) y el enzima-inmunoensayo (ELISA) (Tabla III).<sup>39,40</sup>

La IHQ realiza la valoración de la expresión

proteica en tejido fijado con formol e incluido en parafina, así como en tejido congelado. Es un método cualitativo y semicuantitativo, que evalúa la presencia del receptor a nivel de las células tumorales mediante la utilización de anticuerpos monoclonales. Los resultados por IHQ se expresan de 0 a 3 cruces (Figura 2), siendo considerado positivo (3+) cuando hay una tinción de membrana intensa y uniforme en más del 10% de las células tumorales<sup>41</sup> y negativo (0; 1+) cuando es menor. El valor 2+ (equívoco) deberá ser revaluado por FISH. Aproxima-



**Figura 2.** Inmunohistoquímica para HER-2/neu. Nótese el aumento de intensidad de la tinción marrón en la membrana celular.

**A:** HER-2/neu 0. **B:** HER-2/neu 1+. **C:** HER-2/neu 2+. **D:** HER-2/neu 3+.



damente el 25% de los casos IHQ de 2+, tienen amplificación génica comprobada por FISH y, por lo tanto, obtendrán beneficio con la terapia blanco específica. Cabe destacar que la sobreexpresión de HER-2/neu es variable en los distintos tipos tumorales, pudiendo ser su expresión heterogénea dentro de un mismo tumor, hecho que suele ser subestimado.<sup>42</sup>

La ponderación genética se efectúa sobre una muestra fijada, empleando técnicas de FISH o CISH. Ambos métodos son universalmente aceptados, aunque se discute si son indistintos a todo efecto.<sup>43</sup> En el ensayo de FISH se determina el número de copias del gen HER-2/neu y consecuentemente su nivel de amplificación, aunque generalmente se usa para confirmar los resultados previamente obtenidos por IHQ; también se emplea como prueba inicial de diagnóstico. En comparación a la IHQ proporciona información a diferente nivel y cada uno posee ventajas y desventajas (Tabla III).<sup>44,45</sup> Se informan como FISH positivos los tumores cuyas células presentan 2 copias o más del gen HER-2 por cada copia del cromosoma 17, o bien muestran 4 copias o más si no se utiliza el cromosoma 17 como control.<sup>46</sup> Para el CISH, el consenso es informarlo como positivo si más del 50% de las células evaluadas tienen 5 copias o más del gen HER-2/neu por cada núcleo.

Por otra parte, se debe considerar que el ensayo ELISA ha sido aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU. (FDA) para la determinación de HER-2 en la circulación de pacientes con cáncer mama. La detección del HER-2/neu sérico parecería deparar resultados prometedores al poder medir en sangre p95. Pero requiere mayor estudio para determinar su utilidad real en la identificación de pacientes que puedan verse beneficiados por la terapia blanco específica.

### Significado clínico

Se ha demostrado que el receptor de factor

de crecimiento epidérmico HER-2/neu está involucrado en la patogénesis de la transformación maligna y la progresión tumoral en distintos tipos de cánceres, incluido el de mama. Su sobreexpresión se asocia a alto grado histológico, nuclear, mitótico, invasión linfohemática peritumoral, necrosis, hormonoindpendencia y p53 mutada, determinando fenotipos tumorales más agresivos.<sup>47-49</sup> En consecuencia, su presencia se asocia con un pronóstico desfavorable, con una menor respuesta al tratamiento, determinando una menor supervivencia global y menor supervivencia libre de enfermedad, en comparación con aquellos tumores HER-2/neu negativos.

Desde que Salomon y colaboradores en 1987 hicieron referencia al HER-2/neu como un factor de pronóstico en el cáncer de mama, múltiples trabajos han profundizado el análisis. Rilke y colaboradores en 1991, evaluando muestras archivadas de más de 1.000 pacientes, pudieron relacionar a HER-2/neu con otros parámetros de mal pronóstico. En el estudio NSABP B-06 (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-06) se observó una diferencia significativa en la supervivencia global según los tumores primarios hubieran sido HER-2/neu positivo o no. El análisis estadístico mostró que HER-2/neu se comportaba como factor de pronóstico independiente para supervivencia. Las pacientes con neoplasias HER-2/neu positivas evolucionaron claramente peor, con una mortalidad que duplicó a la de las pacientes que presentaban neoplasias sin sobreexpresión de dicho marcador.<sup>50</sup>

### Quimioterapia

La sobreexpresión o amplificación de HER-2/neu permite identificar aquellas pacientes que se beneficiarían del uso de esquemas basados en antraciclinas en comparación con CMF (ciclofosfamida, metotrexato y fluorouracilo). Aunque de pequeña magnitud, este efecto positivo es significativo. Por eso las antraciclinas se convirtieron en el estándar de tratamiento.<sup>51,52</sup> En

poblaciones HER-2/neu negativas no habría diferencias entre ambos esquemas. Un metaanálisis de Gennari y colaboradores, publicado en el año 2008, mostró que los resultados para supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad luego de la quimioterapia con antraciclinas o sin ellas, diferían en favor de la primera sólo en el grupo con HER-2/neu positivo. Cuando se trató con antraciclinas a pacientes con HER-2/neu positivo la mejoría para el riesgo de recaída fue de casi el 30%, mientras que para la supervivencia fue de 27%. En contraposición con los resultados obtenidos con antraciclinas, los beneficios de la administración de CMF son menores en los tumores HER-2/neu positivos.<sup>53</sup>

El beneficio de esquemas con taxanos en pacientes HER-2/neu positivo es controversial. Algunos estudios sugieren mejora en la respuesta al docetaxel o paclitaxel, mientras que otros sugieren relativa resistencia.<sup>54,55</sup> Un estudio reciente menciona un beneficio más pronunciado al agregar paclitaxel adyuvante después de 4 ciclos de doxorubicina y ciclofosfamida, en pacientes con axila positiva y sobreexpresión de HER-2/neu.<sup>56</sup>

## Endocrinoterapia

Aproximadamente el 50% de las pacientes con cáncer de mama HER-2/neu positivo expresan también receptores hormonales y aproximadamente el 10% de los carcinomas receptores hormonales positivos también lo son para HER-2/neu.<sup>57,58</sup>

Estudios preliminares sugieren que la sobreexpresión del gen en tumores con receptores hormonales positivos, implicaría cierta resistencia a la terapia hormonal, principalmente al tamoxifeno.<sup>59,60</sup> Distintos ensayos mencionan que la activación de los receptores HER-2/neu podría amplificar la señal producida por los receptores hormonales, en aquellas neoplasias con estatus hormonal positivo, sorteando el efecto inhibitorio de los antiestrógenos y las terapias de

deprivación hormonal, estableciendo un crecimiento neoplásico independiente del estímulo del estrógeno.<sup>61,62</sup>

Un estudio del Gruppo Universitario Napolitano 1 (GUN-1) postula una influencia negativa del tratamiento con tamoxifeno por 2 años en el cáncer de mama HER-2/neu positivo.<sup>63</sup>

El estudio Trans-ATAC permitió verificar en el subgrupo de pacientes HER-2/neu positivo una superioridad del anastrozol sobre el tamoxifeno, comparable a la observada en la población HER-2/neu negativa. Conclusiones similares se obtuvieron en el estudio BIG 1-98, donde se determinó que los beneficios de los inhibidores de la aromatasas, en este caso letrozol, sobre el tamoxifeno, fueron independientes a la sobreexpresión de HER-2/neu.<sup>64</sup> Se ha propuesto que la influencia negativa de los tumores HER-2/neu positivos con respecto al tratamiento hormonal, estaría limitada a aquellos agentes cuyo mecanismo de acción dependa de la competencia con el receptor (por ejemplo, tamoxifeno). Este fenómeno no ocurriría en aquellos que producen la depleción del ligando (inhibidores de la aromatasas).

## Inmunoterapia

El trastuzumab es un anticuerpo monoclonal recombinante IgG de una alta especificidad, sensibilidad y afinidad por el receptor HER-2/neu. Entre sus mecanismos de acción se describen: la inducción de la toxicidad mediada por anticuerpo, prevención de la formación del segmento truncado p95, bloqueo de la proliferación inducida por HER-2, inhibición de la angiogénesis mediada por HER-2. Desarrollado en 1990 y aprobado por la FDA en 1998 para carcinoma avanzado, en 2006 para tratamiento adyuvante en pacientes con compromiso ganglionar y en 2008 sin compromiso ganglionar, se convirtió en un cambio de paradigma en el tratamiento sistémico del cáncer de mama.

Múltiples estudios multicéntricos *randomi-*

zados han sido realizados hasta la fecha. Entre ellos los más importantes son el NSABP B-31, NCCTG N9831, BCIRG 006, HERA y el FINHER. Viani y colaboradores publicaron un metaanálisis donde se realizó una revisión de los estudios enunciados previamente,<sup>65</sup> concluyendo que el agregado de trastuzumab en la terapia adyuvante producía una reducción significativa de la mortalidad (48%), y de las recurrencias (47%). Dahabreh y colaboradores, en otro metaanálisis demostraron un incremento significativo de la sobrevida libre de enfermedad (HR 0,62; IC 95%: 0,56-0,58), un descenso significativo de la tasa de mortalidad (HR 0,66; IC 95%: 0,57-0,77) y en la tasa de recurrencias locales/regionales (HR 0,58; IC 95%: 0,54-0,68) y a distancia (HR 0,60; IC 95%: 0,43-0,77). Es decir, demostraron un aumento en la supervivencia global del 34% con el uso complementario del trastuzumab.<sup>66</sup>

Trabajos recientes comprobaron que la asociación de anastrozol con trastuzumab mejora los resultados frente a anastrozol solo, en pacientes con coexpresión de ambos receptores: hormonales y HER-2/neu.

Entre otros agentes terapéuticos HER-2/neu selectivos se encuentran el pertuzumab, inhibidor de la dimerización de los receptores de la familia HER, el trastuzumab-DM1 que consiste en el agregado del agente de quimioterapia DM1 (derivado antimicrotubular de alta potencia) y el lapatinib, bloqueador del dominio intracelular del receptor.

## Ki-67

### Biología

La proliferación fuera de control es característica en los tumores malignos, y puede ser evaluada por múltiples métodos: recuento de figuras mitóticas en estudios histológicos, incorporación de nucleótidos marcados, evaluación de la fracción de células en fase S por citometría

de flujo.<sup>67-69</sup> Pero actualmente la forma más usada es la medición mediante IHQ del antígeno Ki-67, un marcador nuclear expresado en todas las fases del ciclo celular, excepto G0.<sup>70</sup> En tejido mamario normal se expresa en niveles muy bajos (menor al 3%).<sup>71,72</sup>

Ki-67 fue identificada por Gerdes y colaboradores en 1991,<sup>73</sup> como una proteína nuclear no histona. Poco tiempo después, su anticuerpo fue descrito por el mismo grupo, al inmunizar un ratón que poseía una línea celular con linfoma de Hodgkin. El gen de Ki-67 está en el brazo largo del cromosoma 10 (10q25).<sup>74</sup> En 1993, Schulter y colaboradores publicaron la secuencia completa de ADN que codifica para dicha proteína. Por *splicing* alternativo se traducen dos isoformas de la proteína, una con un peso molecular de 359 KDa y otra más pequeña con un peso molecular de 320 KDa. La vida media de Ki-67 fue estimada en 60 a 90 minutos.<sup>75,76</sup> Existen diferencias en su expresión, que parecerían deberse más al aumento en su síntesis que a la acumulación de proteína no degradada.

La proteína Ki-67 es un marcador útil de proliferación celular. La falta de precisión para identificar células en G0 del ciclo celular no ha afectado substancialmente la capacidad de Ki-67 para identificar poblaciones celulares en proliferación.

Existen relaciones con otros marcadores biológicos de cáncer de mama. Por ejemplo, con bcl-2 mantiene una relación inversa.<sup>77</sup> Los tumores con p53 mutada muestran niveles más altos de proliferación que impactan en las mediciones de Ki-67.<sup>78,79</sup> Numerosos estudios han demostrado la relación existente entre Ki-67 y la expresión de HER-2/neu. Si bien existe una relación positiva,<sup>80-82</sup> no está siempre bien definida.<sup>83,84</sup> Con respecto a los receptores de estrógeno, se ha demostrado una relación inversa: a mayor estatus positivo para receptores hormonales, menor proliferación y consecuente menor expresión de Ki-67.<sup>85-87</sup> Si comparamos las características histológicas de los tumores, es inobje-

table la relación existente entre el grado tumoral y la expresión de Ki-67.<sup>88-91</sup> Esta situación es esperable, dado que el índice mitótico es tenido en cuenta para determinar el grado tumoral.

### Determinación

Comparado con otros marcadores de proliferación el estudio de Ki-67 es fácil de realizar, económico y de resultados reproducibles. En contraste con lo que ocurría con el anticuerpo convencional utilizado en cortes de tejido fresco y congelado en 1992, se logró marcar cortes histológicos fijados en formol e incluidos en parafina con los nuevos anticuerpos MIB-1 y MIB-3.<sup>92</sup> Si bien en la actualidad están disponibles muchos anticuerpos para la marcación de Ki-67, MIB-1 es el más usado. Éste tiene la particularidad de detectar un epítipo único en Ki-67, asegurando su especificidad, que al estar repetido 16 veces en la proteína, mejora su sensibilidad.<sup>93</sup> Otra ventaja de MIB-1 como reactivo para inmunohistoquímica es su buen rendimiento en un vasto tipo de condiciones y diluciones, en comparación con otros marcadores de proliferación, como el antígeno de proliferación celular nuclear.<sup>94</sup> La expresión de Ki-67 es informada como el porcentaje de células marcadas con el anticuerpo, con tinción nuclear como criterio más común de estatus positivo.

Recientemente, el anticuerpo monoclonal de conejo SP6, parecería demostrar mejoras en la sensibilidad<sup>95</sup> y en el análisis de imágenes.<sup>96</sup> Si bien ha habido avances e innovaciones, debido al largo y validado camino realizado, el anticuerpo monoclonal MIB-1 debería ser considerado como el *gold standard* de los métodos de análisis de proliferación celular mediante Ki-67.

El punto de corte para determinar cuándo un valor de Ki-67 es alto y cuándo es bajo todavía es controversial. Si Ki-67 es usado para excluir pacientes de protocolos de quimioterapia por ser tumores poco proliferantes y así evitar el tratamiento, un punto de corte en 10% sería

adecuado. Mientras que si el mismo es usado para determinar sensibilidad a quimioterapia es preferible aumentar el punto de corte a 25%.

### Significado clínico

Con relación al valor de pronóstico, Azambujay colaboradores<sup>97</sup> realizaron un metaanálisis en el que se confirmó que la expresión de Ki-67 en cáncer de mama implica un peor pronóstico. Este impacto desfavorable se ve tanto en la supervivencia global como en la supervivencia libre de enfermedad, siendo este resultado independiente del estado linfático axilar y del tratamiento instaurado.

Múltiples estudios reportan el valor de predicción de Ki-67 a la quimioterapia en cáncer de mama temprano o localmente avanzado: a mayor Ki-67, mayor respuesta.<sup>98-100</sup> Si bien existe una asociación entre niveles altos de Ki-67 y una buena respuesta al tratamiento neoadyuvante, como se dijo anteriormente, no hay que perder de vista que los valores altos de Ki-67 se asocian a un pobre pronóstico general.

La disponibilidad de técnicas que permiten tomar muestras histológicas ha permitido que investigadores evalúen si los cambios del valor de Ki-67 después de cierto tiempo de tratamiento neoadyuvante, pueden brindar más información de predicción o de pronóstico, que el valor basal aislado de Ki-67. En particular, es muy útil la relación existente entre los cambios en los valores de Ki-67 a las 2 semanas de instituido el tratamiento, dado que ocurren antes que la respuesta clínica. Algunos estudios<sup>101,102</sup> han demostrado que un descenso mayor al 25% o un valor residual menor al 10%, predicen un mayor tiempo de supervivencia libre de enfermedad. Esto ha sido demostrado en el ensayo clínico IMPACT.<sup>103,104</sup> En este estudio se comparó la respuesta a tamoxifeno o anastrozol, o una combinación de ambos en mujeres posmenopáusicas con tumores receptores hormonales positivos. Los descensos de Ki-67 en una biopsia to-

mada a las 2 semanas de iniciado el tratamiento, predijeron el mejor resultado a largo plazo.

Por último, existe evidencia que sugiere que niveles altos de Ki-67 tendrían un valor de predicción en la elección de inhibidor de aromatasas por sobre el tamoxifeno, como terapia endocrina adyuvante en pacientes posmenopáusicas con cáncer de mama hormonosensible.

### **p53**

Es un gen supresor de tumor situado en el cromosoma 17 (17p13.1). Sus mutaciones constituyen la alternativa genética más frecuente en neoplasias malignas: el 50% o más de los tumores humanos contienen mutaciones de este gen,<sup>105,106</sup> indicando que la proteína p53 actúa como un custodio esencial contra el desarrollo del cáncer. El p53 es un factor de transcripción que cuando detecta ADN dañado, activa la expresión de genes que inhiben la división celular, deteniendo a la célula en la fase G1 del ciclo celular, dándole tiempo a la célula para que repare los daños del ADN. Alternativamente, si resulta imposible la reparación, puede dar instrucciones para que la célula experimente muerte celular programada. Su ausencia permite que se acumulen mutaciones en el ADN celular, conduciendo a una posible transformación neoplásica de la célula.

La evaluación de este marcador biológico se puede realizar mediante IHQ u otras técnicas de biología molecular como la amplificación de su secuencia de ADN.

La forma nativa reside en el núcleo de la célula y tiene una vida media muy corta, 20 minutos aproximadamente.<sup>107</sup> La forma mutada característicamente tiene una vida media aumentada, provocando la acumulación nuclear. En consecuencia, la detección de niveles altos de p53 por IHQ demostraría la presencia de un tumor que alberga una mutación de la p53.<sup>108</sup> A pesar de esto, es por lo menos controversial la posibilidad de que dicha técnica provea resul-

tados lo suficientemente precisos como para tener utilidad clínica, dado que detecta ambas p53 (la mutada y la nativa) pudiendo no detectar posibles deleciones del gen. Métodos para definir con mayor precisión anomalías genéticas podrían permitir un análisis más preciso de la asociación de p53 con los resultados clínicos, tanto como factor de predicción o factor de pronóstico. Por el momento tales metodologías son caras, engorrosas y no disponibles como técnicas de rutina, limitando el estudio de la p53 como marcador para la práctica clínica diaria.

La expresión de la mutación del gen p53 se ha correlacionado con el estatus negativo de los receptores hormonales, aneuploidía tumoral, mayor porcentaje de células neoplásicas en fase S del ciclo celular por citometría de flujo y un elevado Ki-67,<sup>109</sup> encontrándose en 20-30% de los tumores de mama. Un estudio de 2.000 mujeres con diagnóstico reciente de cáncer de mama, sugiere que las anomalías genéticas de la p53, definidas por secuenciado, están asociadas con un peor pronóstico.<sup>110</sup>

Un trabajo de Shelley B. Bull y colaboradores, donde se evaluaron 543 casos de cáncer de mama, con un seguimiento de 85 meses, encontró que las mutaciones de p53 eran más frecuentes en tumores HER-2/neu positivo, habiendo un mayor riesgo de recurrencia y mortalidad en pacientes HER-2/neu positivo y p53 mutada, en comparación con las pacientes con una o ninguna de las alteraciones.<sup>111</sup>

Isola y colaboradores observaron una alta correlación entre la sobreexpresión de p53 y fase S alta del ciclo celular. La sobreexpresión de p53 medida por IHQ en cortes fijados en parafina puede ser un factor de pronóstico independiente para supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global en los pacientes de cáncer de mama con ganglios negativos y positivos.<sup>112</sup>

También se observa una alta relación entre la sobreexpresión de p53 mutante y alta actividad proliferativa; y la sobreexpresión de p53 como predicción de resistencia a quimioterapia y

radioterapia; sin embargo, dichos hallazgos son contradictorios.<sup>113,114</sup>

### **bcl-2**

El gen bcl-2 codifica una familia de proteínas de 25 KDa, que se localizan en la membrana externa mitocondrial, en la envoltura nuclear y en el retículo endoplásmico de las células. La proteína bcl-2 bloquea la salida del citocromo C, el cual es un precipitante mayor de la muerte celular programada. La sobreexpresión de bcl-2 se identificó por primera vez en una translocación cromosómica recíproca en el linfoma de células B en el ser humano, pero no sólo se ha visto asociación de bcl-2 con neoplasias hematopoyéticas, sino también en múltiples tumores sólidos, incluyendo el cáncer de mama.

La familia de bcl-2 se divide en dos grupos de proteínas, las proapoptósicas como bax, bad y bak y las antiapoptósicas como bcl-2, bcl-xL, mcl-1 y A1.<sup>115</sup> Las proteínas proapoptósicas y antiapoptósicas forman heterodímeros en los que se produce una inhibición recíproca de ambas subunidades. Esta dimerización se ve influenciada por la fosforilación de los residuos terminales de aminoácidos de los miembros proapoptósicos, bax, bad y bak. Así pues, la apoptosis está muy relacionada con la fosforilación de las proteínas de la familia bcl-2. El protooncogén bcl-2 bloquea una vía común de apoptosis, impidiendo que el ADN dañado actúe como una señal de activación de muerte celular programada. La proteína bcl-2 no transforma las células por sí misma, pero las hace susceptibles de ser transformadas por otros oncogenes.

Debido al papel central que desempeña bcl-2 en el mantenimiento de la homeostasis tisular, varios investigadores estudiaron la expresión de bcl-2 en tejidos mamarios tumorales. La ausencia de bcl-2 se relacionó significativamente con tumores indiferenciados y estatus positivo para HER-2/neu y p53. Su presencia se asocia con un fenotipo favorable desde el punto de vis-

ta pronóstico y se correlaciona con la presencia de receptores de estrógeno, siendo un factor de predicción de respuesta al tratamiento con tamoxifeno. La observación clínica demostró que es más probable que un tumor bcl-2 positivo y estatus hormonal positivo presente mayor respuesta al tamoxifeno que los tumores sin sobreexpresión de bcl-2 y estatus hormonal positivo.<sup>116</sup> Hellemans y colaboradores reportaron una supervivencia global acortada en pacientes con tumores bcl-2 negativo y con ganglios positivos.<sup>117</sup> Además, tanto la quimioterapia como la radioterapia ejercen su efecto destructivo del tumor a través de la inducción de la apoptosis, en consecuencia la expresión de bcl-2 es un determinante importante de la resistencia a la quimioterapia y a la radioterapia en muchos tipos tumorales.<sup>118,119</sup> Hay un interés particular en bcl-2 como marcador de respuesta a los taxanos, debido a que tanto paclitaxel como docetaxel pueden efectuar la fosforilación y consecuente inactivación de la proteína bcl-2, conformando un estímulo proapoptósico.

### **CICLINA D**

Durante muchos años los eventos bioquímicos que controlan la progresión de las células a través del ciclo celular fueron completamente desconocidos. Pero en la actualidad, las investigaciones han revelado detalles del proceso. Los eventos claves del ciclo celular están controlados por quinasas dependientes de ciclinas. El término ciclina fue usado para describir una familia de proteínas que tienen una elevación cíclica en su expresión, dependiendo el momento del ciclo celular. Poseen capacidad reguladora de la actividad de las quinasas dependientes de ciclinas.<sup>120</sup> El paso de la célula de G1 a S está impedido por una molécula llamada proteína del retinoblastoma (pRb) que se une y mantiene inactiva a otra molécula, necesaria para la replicación del ADN llamada E2F. En G1 la ciclina D y la ciclina E aumentan su concentración de ma-

nera continua y se combinan con las quinasas dependientes de ciclinas. A partir de esa combinación, las quinasas fosforilarán a pRB. Al final de G1 esta fosforilación estará completa ocasionando la inactivación de pRB, que llevará a la liberación de E2F. La proteína E2F es un factor de transcripción que estimula la expresión de genes necesarios para la producción de enzimas que replicarán el ADN, por lo que la célula avanzará a la siguiente fase, la fase S.

La sobreexpresión de ciclina D1 fue observada en carcinoma ductal in situ, sugiriendo un posible rol en el desarrollo de cáncer de mama.<sup>121,122</sup> Ha sido demostrado que ciclina D1 puede activar la actividad transcripcional del receptor de estrógeno en ausencia de estradiol, siendo esto inhibido por el tamoxifeno.<sup>123</sup> Existe evidencia, demostrada en líneas celulares de cáncer de mama estudiadas in vitro, que los retinoides reducen los niveles de expresión de ciclina D1.<sup>124</sup> Esto es de gran interés dado que fenretinide, retinoide sintético, ha mostrado reducir de manera significativa el riesgo de un segundo cáncer de mama, sugiriendo un posible rol como quimioprevención en mujer jóvenes de alto riesgo.<sup>125</sup>

### CICLINA E

Ciclina E es una proteína de 50 KDa expresada en la fase tardía del ciclo celular G1. La actividad del complejo enzimático ciclina E-CDK2 es inhibida por las proteínas p21 y p27.

La elevación de los niveles de ciclina E ha sido observada en múltiples neoplasias.<sup>126</sup> En cáncer de mama, la elastasa<sup>127</sup> y la calpasa 2,<sup>128</sup> fraccionan ciclina E a fragmentos de menor peso molecular (33 a 45 KDa). Estos fragmentos de menor peso molecular tienen mayor afinidad por CDK2 y resisten la inhibición de p21 y p27, provocando un avance constante en el ciclo celular, pudiendo perpetuar la proliferación celular y en consecuencia ocasionar la transformación neoplásica de la célula.<sup>129</sup> Además, los fragmen-

tos de menor peso molecular confieren resistencia al tamoxifeno y aumentan la inestabilidad genómica.<sup>130</sup> Esto convierte a la ciclina E y a los fragmentos de menor peso molecular, como posibles marcadores de pronóstico y predicción en cáncer de mama.

La ciclina E ha sido valorada por IHQ en tejidos fijados y su ARN ha sido cuantificado por RT-PCR en muestras frescas.<sup>131</sup> Los fragmentos de menor peso molecular han sido evaluados por Western Blot (WB) en tejidos frescos congelados.<sup>132</sup> La discordancia en el valor de pronóstico asignado a la ciclina E entre la IHQ y el WB está relacionada a los distintos anticuerpos usados en cada método, dado que los reactivos que detectan ciclina E puede que no lo hagan con los fragmentos de menor peso.

Se han alcanzado resultados imponentes, estudiando sólo a los fragmentos de menor peso mediante WB.<sup>133</sup> Pero WB no es practicable en el uso clínico rutinario. Son necesarios anticuerpos monoclonales para realizar estudios avanzados de este marcador en tejidos archivados, y de esta manera hacer de este estudio una práctica de rutina posible.

El valor de pronóstico de ciclina E en la literatura es controversial, en parte por las diferencias metodológicas en los distintos trabajos y también debido a la falta de estudios de alto nivel. Además ciclina E está vinculada a la proliferación y su significado de pronóstico independiente está poco claro. De todos modos, los niveles elevados de la proteína ciclina E están asociados a mal pronóstico de manera consistente. En un reciente metaanálisis de sobreexpresión de ciclina E, se evaluaron 2.534 pacientes de 12 estudios; determinando el riesgo de recurrencia en análisis univariado fue de 2,32; mientras que en el análisis multivariado fue de 1,72.<sup>134</sup>

### CATEPSINA D

El conocimiento de los mecanismos de modificación maligna ha mejorado significativa-

mente durante las últimas décadas. En el cáncer de mama, como en muchos otros, lo que normalmente lleva a la muerte no es el tumor primario sino su diseminación. Para que las células tumorales se extiendan fuera del sitio primario a sitios a distancia, es necesaria la destrucción de la matriz extracelular. Esto también es importante para favorecer la angiogénesis, cuya vascularización permitirá el crecimiento tumoral y el acceso de las células neoplásicas a la circulación general, posibilitando la diseminación de la enfermedad.

Hay muchas vías implicadas en la degradación y el recambio de la matriz extracelular, involucrando numerosas proteasas. El descubrimiento de la catepsina D, como una enzima proteolítica asociada a los procesos tumorales, surgió como consecuencia de una serie de estudios dirigidos a investigar la naturaleza de las proteínas inducidas por hormonas y factores de crecimiento en el cáncer de mama. En la década del ochenta se realizaron las primeras investigaciones demostrando que esta glicoproteína de 52 KDa de peso molecular, poseía actividad tanto proteolítica como mitogénica. La enzima intracelularmente es dirigida a los lisosomas y es almacenada para luego ser secretada al medio exterior, donde se autoactiva en un pH de 4,5. Es capaz de degradar la membrana celular, la matriz extracelular y los proteoglicanos. A pH ácido la catepsina D actúa como una proteasa y a pH neutro como ligando de diferentes receptores, preferentemente del factor de crecimiento insulínico tipo II (IGFR-II).<sup>135</sup> Si bien éste es uno de los mecanismos mitogénicos posibles, no es el único. Alternativamente, la catepsina D, al igual que otras proteasas, podría actuar indirectamente como un mitógeno a través de la activación proteolítica de precursores de factores de crecimiento o de sus receptores, permitiendo la liberación de factores de crecimiento secuestrados en la matriz extracelular.<sup>136,137</sup>

En cáncer de mama, la invasión axilar ha sido valorada como un factor de pronóstico clá-

sico. Sin embargo, el 30% de los tumores con axila negativa también recaen.<sup>138</sup> Es por eso, que es necesario desarrollar otros factores de pronóstico independientes. Los primeros trabajos evidenciaron la asociación entre incrementos citosólicos de catepsina D y un mayor riesgo de recidiva y muerte en los tumores mamarios tempranos sin afectación ganglionar axilar. Así, cifras superiores a 60 pmol/mg fueron, junto al tamaño, factores de pronóstico independientes de un menor intervalo libre de enfermedad y una mayor propensión a recidivas locales/regionales.<sup>139</sup> Tetu y colaboradores<sup>140</sup> valoraron mediante tinción IHQ la expresión de la catepsina D en las células epiteliales y estromales de manera independiente. Estos autores encontraron que la expresión de catepsina D en las células estromales (43,6% positiva) a diferencia de las células epiteliales (38,9% positiva) se asociaba significativamente con varios factores de peor pronóstico y con una disminución del intervalo libre de enfermedad y de la supervivencia.

Muchos otros trabajos avalan mediante sus hallazgos la justificación del pobre pronóstico de los tumores de mama axila negativa con alta expresión de catepsina D.<sup>141</sup> Todavía no hay evidencia suficiente para establecer una relación entre dicho marcador y los tumores de mama axila positiva.

La catepsina D puede ser considerada como un marcador de la dependencia del estrógeno en los tumores mamarios; por eso, se han realizado múltiples intentos para evaluar si puede ser usado como factor de predicción del tratamiento hormonal. Los estudios de Tetu y colaboradores<sup>142,143</sup> reportaron que la expresión de catepsina D por las células estromales estaba fuertemente asociada con un peor pronóstico en el subgrupo de pacientes que recibieron quimioterapia adyuvante, no así en el subgrupo de pacientes que recibió hormonoterapia. Si bien esto permitiría sugerir un posible beneficio al usar hormonoterapia en las pacientes con expresión aumentada de catepsina D, los autores son pru-



dentes en tanto y en cuanto no conocen el mecanismo por el cual se produce esta consecuencia, pudiendo haber un error metodológico en el diseño del estudio.

Billgren y colegas<sup>144</sup> evaluaron el posible beneficio del tratamiento con tamoxifeno en pacientes con sobreexpresión de catepsina D y receptores hormonales positivos, no pudiendo alcanzar un resultado con adecuado significado estadístico ( $p=0,09$ ).

### ACTIVADORES DEL PLASMINÓGENO

Se han descripto dos tipos de activadores del plasminógeno (PA), uno de tipo tisular (tPA) y el otro de tipo urokinasa (uPA). Ambos hidrolizan el plasminógeno para generar plasmina, una serina proteasa capaz de degradar la fibrina y componentes de la matriz extracelular como fibronectina, laminina y proteoglicano. La plasmina también puede activar diversas metaloproteasas iniciando una cascada proteolítica, de tal manera que la activación de pequeñas cantidades de PA conduce a la obtención de elevadas concentraciones de proteasas activas. El sistema está regulado por inhibidores específicos como los denominados PAI 1 y PAI 2 (inhibidores de PA). Además, el uPA se une a un receptor específico en la membrana plasmática (uPAR) lo que le permite localizar esta actividad enzimática en la región pericelular. De este modo, mientras el tPA participa principalmente en los procesos fibrinolíticos intravasculares dada su capacidad para unirse a la fibrina, el uPA, tras unirse a su receptor uPAR, está implicado en el remodelado tisular y en la migración celular. Además de facilitar la invasión de las células tumorales, se ha observado que los activadores del plasminógeno también participan en la degradación de la matriz extracelular perivascular, facilitando así la angiogénesis. En los procesos tumorales, la forma de activador del plasminógeno que se sobreexpresa más frecuentemente es la del tipo urokinasa, contribuyendo a la degradación de las

barreras tisulares durante la progresión tumoral.

Numerosos métodos de estudio han sido ensayados para estudiar a estos marcadores. Entre ellos se encuentran IHQ, RT-PCR y ELISA.<sup>145-147</sup> El único método validado para determinar valor de pronóstico de uPA es el ELISA realizado en tejido fresco o congelado o en fracción cistosólica de muestra remanente, luego de haber sido estudiado el estado de receptores hormonales por técnicas bioquímicas (en desuso en la actualidad).<sup>148</sup> La IHQ no es precisa para estos marcadores. Si bien el uso de ELISA en muestras obtenidas a partir de punciones histológicas podría ser de beneficio clínico, el valor de pronóstico de dicha estrategia todavía tiene que ser confirmado.<sup>149</sup>

Los niveles intratumorales elevados del uPA se han asociado con una menor supervivencia en pacientes con cáncer de mama u otros tumores.<sup>150</sup> Tanto uPA como PAI 1 medidos por ELISA en un mínimo de 300 mg de tejido fresco o congelado podrían ser usados para la determinación del pronóstico en pacientes con diagnóstico reciente de cáncer de mama axila negativa. En el carcinoma de mama, la sobreexpresión del uPA es esencial para la proliferación de las células tumorales, la invasión del tejido circundante y la formación de metástasis óseas.<sup>151</sup> Algunos estudios inclusive sugieren que estos dos marcadores tienen un fuerte valor de pronóstico en pacientes con axila negativa, independientemente del tamaño tumoral, el grado histológico y el nivel de receptores hormonales.<sup>152,153</sup>

Un análisis realizado por Receptor and Biomarker Group of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer, evaluó 8.377 pacientes con cáncer de mama, realizando seguimiento de 79 meses. Los resultados confirmaron la fuerte asociación entre la sobreexpresión de uPA y PAI 1 y la menor supervivencia libre de enfermedad, como la menor supervivencia global. En el subgrupo de pacientes no tratadas, axila negativa, también se confirmó

la utilidad del marcador para identificar cohortes de bajo riesgo.<sup>154</sup>

En cuanto al valor de predicción, en un estudio de Pritchard K.<sup>155</sup> se concluyó que los esquemas de quimioterapia que contienen antraciclinas tienen un resultado superior en comparación con CMF, si el tumor tiene sobreexpresión de uPA o PAI 1, mientras que no habría diferencias entre ambas terapias en pacientes con bajos niveles de uPA y PAI 1.

Estudios recientes han demostrado que la inhibición del uPA en sistemas celulares derivados de tumores mamarios con alta capacidad invasiva, conduce a la disminución de los niveles de la proteasa en el exterior celular y de la actividad proliferativa en estas células.<sup>156</sup> Este hecho sugiere que las terapias antimetastásicas dirigidas a la inactivación específica del uPA podrían ser muy beneficiosas para la paciente, ya que además presentan efectos secundarios muy limitados al no bloquear la actividad fibrinolítica de la plasmina en el torrente circulatorio, ni la actividad de otras proteasas necesarias para el correcto funcionamiento del organismo.

### **ANTÍGENO CARBOHIDRATO 15-3**

Se han identificado diversos antígenos mediante anticuerpos monoclonales dirigidos a glucoproteínas pertenecientes a la familia de las mucinas. Sus integrantes más destacados son el antígeno carbohidrato 15-3 (CA 15-3), el antígeno mucino asociado a cáncer de mama (MCA), el antígeno carbohidrato 549 (CA 549) y el antígeno carbohidrato 27-29 (CA 27-29). Dadas su semejanza estructural y la similar sensibilidad y especificidad de las pruebas que los investigan, se considera que estos anticuerpos detectan epítopes distintos de un antígeno común. CA 15-3 es una mucina, de alto peso molecular, entre 300 y 450 KDa codificada por el gen MUC 1. Normalmente está localizada en la superficie apical de células epiteliales, pero está sobreexpresada en células tumorales y es liberada a la

circulación sistémica. Si bien son marcadores serológicos muy usados en el seguimiento del cáncer de mama dado sus cualidades similares, el uso de más de uno de ellos no brindaría ninguna ventaja.<sup>157,158</sup> Sin embargo, la evaluación conjunta con CEA puede ofrecer información complementaria.

### **CA 15-3 y diagnóstico temprano de cáncer de mama**

CA 15-3 siempre ha tenido un rol limitado en cáncer de mama temprano, debido a que frente a la escasa carga tumoral posee mala sensibilidad. Solamente un 10% de las pacientes con cáncer de mama primario tienen valores de CA 15-3 aumentados (mayores a 35 U/ml), lo que significa que no puede ser utilizado como test de cribado. Es por eso que niveles bajos de estos marcadores en pacientes con sospecha de cáncer de mama, nunca deben provocar la exclusión del diagnóstico. Si bien la utilidad en cáncer de mama temprano está en serias dudas, algunos autores sugieren realizar una evaluación inicial de este marcador tumoral, para tener un valor de base con el cual comparar las mediciones posteriores al establecimiento de una terapéutica. Asimismo, niveles de CA 15-3 superiores a 50 U/ml y/o CEA mayor a 20 ng/ml en pacientes con enfermedad localizada, sugiere la existencia de enfermedad metastásica oculta.

La sensibilidad del CA 15-3 en enfermedad avanzada ha sido ampliamente estudiada por diferentes autores, siendo la misma mayor en comparación con cáncer de mama temprano.<sup>159</sup> Existe una relación entre la magnitud del aumento de estos marcadores y el sitio de la recurrencia.<sup>160</sup> CA 15-3 carece de utilidad en la valoración de la recurrencia local/regional, donde el examen clínico es mejor. Sin embargo, se encuentran niveles anormales de CA 15-3 en el 70% de las pacientes con cáncer de mama metastásico,<sup>161</sup> porcentaje que aumenta hasta 80% si se realiza el estudio conjunto con el marcador

CEA, especialmente cuando los sitios de cáncer secundario son el hueso o el hígado. En cuanto a la especificidad del método, cabe aclarar que un 10% de las pacientes sin enfermedad también presentarían valores elevados de CA 15-3. Existe un número de falsos positivos atribuido a otros procesos que no correspondan al cáncer de mama. La mastopatía benigna y otros tipos de neoplasias no mamarias (pulmón, ovario, próstata, páncreas) también pueden producir aumento de los niveles de estos antígenos, haciendo que la especificidad del CA 15-3 no sea elevada. Estos resultados sugieren que CA 15-3 identificará 2 de cada 3 pacientes con cáncer de mama metastásico, con un porcentaje aceptable de falsos positivos.

### **CA 15-3 como factor de pronóstico**

Se han realizado múltiples intentos para obtener evidencia de la pericia de CA 15-3 como predicción de supervivencia global disminuida o supervivencia libre de enfermedad disminuida, pero los resultados han sido conflictivos, y el significado estadístico se pierde en los análisis multivariados. Gion y colaboradores<sup>162</sup> demostraron, en un estudio que incluyó 360 pacientes, el alto valor significativo de CA 15-3 como factor de pronóstico. Son muchos los estudios que han alcanzado conclusiones similares, pero también hay incertidumbre por resultados en dirección opuesta.<sup>163-165</sup> La mayoría de los estudios con poblaciones grandes y seguimientos prolongados concuerdan en el valor de pronóstico independiente de CA 15-3 (éste asociado su estudio a CEA o no). Pero todavía no se ha demostrado que el uso de estos marcadores tumorales lleve a un impacto en los indicadores de supervivencia.

### **CA 15-3 como monitor de terapia**

La evaluación del tratamiento del cáncer de mama metastásico queda reflejada en los valores de CA 15-3, y de esta forma puede diag-

nosticarse una progresión, estabilidad o regresión del tumor dependiendo de los niveles de CA 15-3. Pacientes en remisión frecuentemente tendrán valores en descenso, mientras que aquellas pacientes con progresión de enfermedad tendrán valores en aumento.<sup>166-168</sup> Si bien no existe un consenso absoluto, el Grupo Europeo de marcadores tumorales en sus recomendaciones sugiere que CA 15-3 debería ser evaluado previamente a cada ciclo de quimioterapia o cada 3 meses en caso de hormonoterapia, siendo cambios significativos aquellos aumentos superiores al 25%. Sin embargo, algunos trabajos muestran cómo el aumento de CA 15-3, si bien predice la aparición de recurrencia con una anticipación promedio de 5 meses con respecto a otros estudios o la aparición de síntomas, no repercute en variables como supervivencia global o supervivencia libre de enfermedad.

### **BRCA 1 y BRCA 2**

Aunque en un 90% de los casos el cáncer en general y el de mama en particular se presenten de forma esporádica, existe un 5-10% de los casos en los que el cáncer de mama aparece en varios miembros de una misma familia a lo largo de varias generaciones. Este porcentaje es debido a mutaciones en genes de alta penetrancia. Si bien son numerosos: p53, ATM, PTEN, STK11,<sup>169</sup> los dos que se relacionan más con el cáncer de mama hereditario, 1 de cada 3 casos,<sup>170</sup> son el BRCA 1 localizado en el cromosoma 17 (17q21) y el BRCA 2, localizado en el cromosoma 13 (13q12). La presencia de estos defectos genéticos es suficiente para que los individuos portadores presenten una susceptibilidad muy alta para desarrollar cáncer de mama y otros tumores relacionados, como cáncer de ovario o próstata; es por eso que deben ser considerados como verdaderos marcadores biológicos de riesgo.

Los BRCA son genes que presentan muchas semejanzas desde el punto de vista genético, a

pesar de no tener evolutivamente nada en común. BRCA 1 consta de 24 exones que codifican para una proteína de 1.863 aminoácidos, mientras que BRCA 2 tiene el doble de tamaño, con 27 exones que dan lugar a una proteína de 3.418 aminoácidos. Ambos son genes supresores de tumores que codifican proteínas que funcionan en el proceso de reparación del ADN. Por lo tanto, una mutación o una delección de un gen supresor tumoral provocarían una pérdida de su función, aumentando el riesgo de oncogénesis como consecuencia. La probabilidad de desarrollar un cáncer de mama a lo largo de la vida en portadoras de mutación en BRCA 1 es superior al 60% y mayor del 50% en portadoras de la mutación en BRCA 2.<sup>171</sup>

La prevalencia de las mutaciones BRCA 1 y BRCA 2 varía de acuerdo con el país y el grupo étnico. La frecuencia más alta se encuentra en la población judía asquenazí (2,5% en la población general).<sup>172</sup> Otros grupos con alta prevalencia de mutaciones incluyen países como Islandia, Canadá (especialmente franco-canadienses), Polonia y Holanda.<sup>173</sup>

Los criterios para indicar una prueba genética varían de acuerdo con el país y con la población estudiada. Según las recomendaciones del National Comprehensive Cancer Network (NCCN) en sus últimas guías (septiembre 2012) deberían recibir asesoramiento genético todas las pacientes que cumplan con uno o más de los siguientes criterios:

- Presencia de dos o más tumores primarios de mama en una o dos personas de la misma familia.
- Presencia de uno o más tumores primarios de ovario de la misma familia.
- Familiar de primer o segundo grado con tumor de mama y edad menor a 45 años.
- Familiar de sexo masculino con cáncer de mama.
- Población de riesgo (por ejemplo, judía asquenazí).
- Pertenencia a familia con susceptibilidad ge-

nética conocida.

- Pacientes diagnosticadas con cáncer seroso de ovario de alto grado, cáncer peritoneal primario, cáncer de las trompas de Falopio.
- Combinación en la misma familia de cáncer de mama y por lo menos uno más de los siguientes: cáncer de tiroides, carcinoma gástrico difuso, cáncer de endometrio, cáncer de páncreas.

### CTC (células tumorales circulantes)

Datos obtenidos de diferentes estudios apoyan la afirmación de que la diseminación hematológica de las células de cáncer de mama, ocurre independientemente de la diseminación linfática. Las metástasis y la invasión son las principales causas de morbimortalidad relacionada con el cáncer de mama. Sin embargo, en la práctica clínica no se evalúan de rutina las células tumorales circulantes (CTC).

Los métodos de detección de CTC basados en el ADN libre circulante, tales como RT-PCR, o mejor aún, RT-PCR cuantitativa, muestran una mayor sensibilidad que los basados en la citometría. La presencia de CTC detectadas mediante RT-PCR conferiría peor pronóstico en pacientes con cáncer de mama metastásico.<sup>174</sup> El método más innovador y único aprobado por FDA en pacientes con cáncer de mama metastásico es la detección inmunomagnética. Esta técnica se basa en la búsqueda de un fenotipo celular circulante tipo EpCAM (molécula de adhesión de célula epitelial) positivo, CK (citoqueratina 8, 18 y 19) positivo, DAPI (marcación nuclear) positivo y CD45 (marcación de leucocitos) negativo.

En pacientes con enfermedad metastásica, el uso de las células tumorales circulantes como marcador biológico sería de gran utilidad para la estratificación del riesgo y el monitoreo temprano de la respuesta al tratamiento.<sup>175</sup> Massimo Cristofanilli y colaboradores fueron los primeros en reportar que en cáncer de mama metastási-

co, más de 5 células tumorales circulantes por muestra estaban asociadas a un peor pronóstico, que aquellas muestras con menos de 5 células tumorales circulantes. En el estudio de dichos autores, realizado con 177 mujeres con cáncer de mama, se registró que cerca de la mitad presentaban metástasis o diseminación, y que la progresión era mayor en las mujeres con 5 células tumorales circulantes o más.<sup>176</sup> En cambio, en pacientes con cáncer de mama precoz su significado es desconocido. En la guía de recomendaciones para uso de marcadores tumorales, American Society of Clinical Oncology (ASCO), concluye que la medición de las CTC no debe ser usada para el diagnóstico de cáncer, ni para la selección de tratamiento en particular, agregando que su uso en cáncer de mama metastásico todavía no puede ser recomendado, siendo necesarias más pruebas que demuestren su validez y su significado en la clínica.<sup>177</sup>

### MICROARRAYS

Los *microarray* o microarreglos, se podrían definir como ensayos en miniatura capaces de analizar miles de marcadores genéticos simultáneamente. Son una consecuencia de la biología molecular y conforman un análisis de expresión génica a gran escala. Básicamente un microarreglo es una colección de fragmentos de ADN o de oligonucleótidos de secuencia conocida unidos covalentemente sobre una superficie, que con frecuencia suele ser un portaobjetos. La parte más innovadora de esta tecnología reside en que la plataforma utilizada es una superficie de 2,5x7,5 cm en la que se imprimen de forma ordenada miles de puntos, cada uno de ellos correspondiente a un gen. Los microarreglos son un avance revolucionario ya que permiten evaluar en un espacio reducido, la expresión de un gran número de genes.<sup>178</sup> Esto ha permitido dos avances fundamentales: la subclasificación de tumores con histología similar en base a su perfil de expresión y la identificación

de perfiles de expresión asociados a un pronóstico determinado.

El primer descubrimiento crítico en cáncer de mama utilizando esta metodología fue realizado por Perou y colaboradores<sup>179</sup> quienes estudiaron los perfiles de expresión genética de las células epiteliales de la glándula mamaria y células neoplásicas. Evaluaron un total de 40 tumores de mama y utilizando un *microarray* de ADN, los autores propusieron una clasificación molecular del cáncer de mama, basada en un método de agrupación jerárquica de los genes. No fue sino hasta el año 2002 cuando Vant Veer y colaboradores<sup>180</sup> demostraron la asociación existente entre el perfil genético del cáncer de mama y el comportamiento clínico, señalando que existen grupos de pacientes que podrían beneficiarse del tratamiento de quimioterapia y no de la hormonoterapia. Esta experiencia fue ampliada en el año 2003 por Sorlie y colaboradores.<sup>181</sup>

La determinación de ADN por microarreglos, ha permitido reconocer las características genéticas del tumor, la identificación de posibles alteraciones mayores o menores, permitiendo caracterizar las neoplasias, y predecir comportamiento.<sup>182</sup> Es decir, una vez determinado el perfil de expresión de un tejido normal, se pueden establecer comparaciones entre perfiles de expresión de tejido control y patológico, y así establecer verdaderas firmas moleculares que son la esperanza en la mejora del diagnóstico, la predicción de la recurrencia y en la selección de terapias individuales para cada paciente.

El análisis de expresión genética por microarreglos permite la identificación de un panel de genes útiles para elaborar una clasificación que logre predecir de manera más clara el comportamiento clínico y el pronóstico del tumor e incluso de sus metástasis.<sup>183</sup>

### Clasificación molecular

Desde hace mucho tiempo se conoce la

complejidad del cáncer de mama y muchas decisiones terapéuticas se han tomado en base a factores de pronóstico que no representan la verdadera cualidad del tumor. Por ser una enfermedad clínicamente heterogénea, su clasificación histopatológica no termina de representar la diversidad evolutiva de la enfermedad. Con el advenimiento de los microarreglos se ha logrado identificar distintos perfiles moleculares, proporcionando una clasificación del tumor que posee consideraciones de pronóstico mucho más precisas que la clasificación histopatológica.

Perou y colaboradores<sup>184</sup> fueron quienes iniciaron el camino de la clasificación molecular al realizar un examen de los patrones de expresión en cáncer de mama. De esta manera, a partir de sus investigaciones, quedó demostrada la existencia de al menos cuatro genotipos moleculares:

- Luminal (caracterizado por la expresión de citoqueratina 8 y citoqueratina 18).
- Basal (caracterizado por la expresión de citoqueratina 5 y citoqueratina 17).
- Normal (caracterizado por la expresión de genes de células adiposas y otras células de origen no epitelial).
- HER-2 (caracterizado por la expresión del oncogén *erb-B2* y varios genes cercanos).

Los tumores con receptores hormonales positivos, clasificados como un solo grupo en el trabajo original, fueron posteriormente separados en al menos dos grupos distintos: el subtipo luminal A (con altos niveles de expresión de citoqueratina 8 y citoqueratina 18) y el subtipo luminal B.<sup>185</sup> Los primeros generalmente tienen alta expresión de receptores hormonales y de genes que regulan su expresión, muy baja o ausencia de expresión de HER-2/neu y baja expresión de genes de proliferación, incluyendo Ki-67. Por el contrario los tumores luminal B tienden a ser de alta proliferación (alta expresión de Ki-67), suelen tener p53 mutada y en general baja expresión de receptor de estrógeno y de

genes relacionados con su expresión. Representan aproximadamente el 10% de los cánceres de mama luminales.

Los estudios que siguieron confirmaron una gran diferencia en la expresión génica entre los tumores con receptores hormonales positivos y los negativos, sugirieron además la existencia de otros subgrupos.<sup>186</sup> Yanagawa y colaboradores,<sup>187</sup> en un trabajo de reciente publicación, proponen subdividir a los tumores luminal A y luminal B (HER-2/neu negativo), en diploides sin inestabilidad cromosómica y aneuploides con inestabilidad cromosómica. Consideran que dentro del subgrupo a dividir existe una heterogeneidad manifiesta a nivel genómico, que podría repercutir en la evolución clínica.

La importancia de esta clasificación molecular reside en la definición de grupos clínicamente distintos. Así, el grupo con genotipo basal y el grupo HER-2/neu positivo, se asocian con el tiempo de supervivencia más corto, mientras que los tumores del subtipo luminal A son los que tienen el mejor pronóstico de todos. El pronóstico y la sensibilidad a la quimioterapia de los distintos subgrupos son distintos. Si bien los tumores luminales tienen mejor supervivencia global en comparación con los otros, los basales y los HER-2/neu son más sensibles a la quimioterapia.<sup>188</sup> A la hora de interpretar el pronóstico es conveniente tener en cuenta que existe una fuerte asociación entre el subtipo molecular y la variedad histopatológica. Es decir, los subtipos luminales tienen un grado histológico bajo o intermedio, mientras que los basales en su mayoría son de alto grado.<sup>189</sup> Estas asociaciones pueden explicar las aparentes contradicciones que existen al aseverar que el subtipo basal tiene peor pronóstico, a pesar de tener mejor sensibilidad a la quimioterapia. Los luminales son tumores de bajo grado y poseen estatus hormonal positivo, por lo que son sensibles a la endocrinoterapia y tendrán mejor pronóstico que los basales, inclusive frente a la ausencia de otras terapias.

Últimamente un nuevo grupo biomarcadores ha sido valorado, generando cambios en la clasificación molecular, al crear un nuevo subgrupo. Las proteínas pertenecientes al grupo de claudinas conforman una familia de 24 miembros cuyo peso molecular varía de 17 a 27 KDa. Sus cambios de expresión, ya sea en aumento o disminución, se han asociado con distintos tipos de tumores. En cáncer de mama, recientemente se caracterizó un nuevo grupo denominado tumor de mama bajo en claudinas.

Durante el proceso complejo de la oncogénesis se observa primero una disminución de la adhesión celular, permitiendo a las células disociarse unas de otras y luego un incremento de la motilidad celular, permitiendo la migración a través de distintos tejidos. La adquisición de estas características se encuentra asociada a la pérdida de función de las uniones estrechas donde las claudinas juegan un rol protagonista. La disminución de las claudinas 1 y 4 en cáncer de mama sugiere que estas proteínas cumplen una función relevante y su pérdida tiene un efecto positivo en la progresión tumoral, dando lugar a aumento en la capacidad invasiva, motilidad celular y supervivencia celular.<sup>190</sup> Es por eso que los tumores bajos en claudinas se caracterizan por estar conformados por células de estirpe mesenquimática y células pluripotenciales de la mama, tienen un mal pronóstico y resistencia a la quimioterapia.<sup>191</sup>

Las características clínicas, histológicas del cáncer de mama, han sido utilizadas y lo siguen siendo, como elementos importantes para la definición de los diferentes factores de pronóstico y predicción; sin embargo, la identificación de las características inmunohistoquímicas del tumor nos permiten diferenciar alteraciones genéticas que proporcionan la posibilidad de clasificar el cáncer de mama de una manera más adecuada en lo que se refiere a pronóstico y efectividad en el tratamiento.<sup>192</sup>

## ANÁLISIS MULTIPARAMÉTRICO DE EXPRESIÓN GÉNICA

### Oncotype DX®

Es el nombre comercial de un ensayo de investigación molecular que ha demostrado tener validez de pronóstico y predicción independiente. Esta prueba mediante RT-PCR en tejido fijado e incluido en parafina, analiza el perfil de expresión de 21 genes (16 genes relacionados al cáncer de mama y 5 genes de referencia). Fue validada inicialmente en 668 pacientes dentro de un estudio, el ensayo clínico B-14 realizado por la NSABP (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project).

El nivel de expresión de estos 21 genes es analizado por algoritmos matemáticos que permiten obtener un índice de recurrencia (*recurrence score*). De esta manera se estima el riesgo de recurrencia y se predice la respuesta al tratamiento tanto hormonal como de quimioterapia de pacientes con cáncer de mama, receptores hormonales positivos, en estadios I o II y axila negativa.<sup>193</sup>

Las pacientes se clasifican en tres grupos, el primero incluye las que presentan un índice de recurrencia menor a 18 (riesgo bajo), un grupo con índice de recurrencia entre 18 y 30 (riesgo intermedio) y el tercer grupo con índice de recurrencia mayor o igual a 31 (riesgo alto).<sup>194</sup>

La validez del pronóstico de Oncotype DX® permite establecer una probabilidad de recurrencia a distancia de 2,1%, 9,2% y 22,1% a los 5 años y 6,8%, 14,3% y 30,0% a los 10 años, en los grupos de bajo, intermedio y alto riesgo, respectivamente.<sup>195</sup> En cuanto a la validez de predicción, quedó demostrado que las pacientes con alto riesgo obtenían un mayor beneficio de la quimioterapia (RR: 0,26) y disminución absoluta de recurrencia a 10 años de 27% con relación a las pacientes con bajo riesgo que no obte-

nían beneficio de la quimioterapia (RR: 1,31) y no obtenían una disminución absoluta de recurrencia a distancia a 10 años significativa (1,1%). Estos datos permiten concluir que las pacientes del grupo de bajo riesgo se benefician únicamente con el tratamiento hormonal, ya que no presentaron mejoría en el tiempo de recurrencia si se asociaba la endocrinoterapia con quimioterapia. En cambio, en el grupo de alto riesgo, el mayor beneficio se obtuvo con la asociación de ambos tratamientos. El grupo problema es el intermedio, en el que el uso adicional de quimioterapia no demostró datos estadísticos significativos ni suficientes para su implementación, quedando el uso concomitante de ambos tratamientos sistémicos supeditado a cada caso en particular.<sup>196</sup>

### **MammaPrint®**

MammaPrint® es una plataforma de evaluación de perfiles genéticos comercializada por Agendia. Fue la primera de estas pruebas en ser aprobada por la FDA. Desarrollada en el Instituto del Cáncer en Holanda, está indicada en aquellas pacientes con cáncer de mama, estadio I o II, receptores hormonales positivos o negativos y axila libre de enfermedad. Usando un microarreglo en el que se encuentran 70 genes seleccionados por su relación con el pronóstico de la neoplasia de interés, establece si la paciente tiene un riesgo alto de desarrollar metástasis a lo largo de 10 años (probabilidad de 50%) o bajo (probabilidad entre 10% y 15%), con la finalidad de determinar la necesidad y adecuación de la indicación de quimioterapia. La principal limitación de este tipo de análisis radica en el método de almacenamiento de la muestra; requiere tejido fresco, con un mínimo de 30% de carcinoma invasor, que debe ser congelado inmediatamente tras su obtención para evitar la degradación del ARN y ser remitido al fabricante en un tiempo no mayor a 5 días.

### **Firma de Rotterdam (Rotterdam signature®)**

Wang y sus colaboradores<sup>197</sup> seleccionaron un conjunto de 76 genes, denominado firma de Rotterdam, capaz de predecir la recaída en enfermas de diferente edad, grado, tamaño tumoral y estado de receptores hormonales, sin afectación ganglionar. Esto lo diferencia de Oncotype DX (estudia sólo pacientes con receptores hormonales negativos) y de MammaPrint (usado sólo en pacientes jóvenes). Realizando estudios de validación, lograron concluir que un 40% y 41% de las pacientes con riesgo intermedio o alto definido por el consenso de St. Gallen o del NIH, hubieran sido correctamente clasificadas como de bajo riesgo de recaída y, por tanto, habría evitado un sobretratamiento sistémico.

Este método todavía no está comercialmente disponible. De manera similar a lo que ocurre con MammaPrint, la recolección de la muestra puede ser engorrosa dado que el método requiere secciones completas de tejido congelado, y actualmente no es aplicable a muestras histológicas tomadas en las biopsias con aguja gruesa.

## **CONCLUSIONES**

El cáncer de mama se ha convertido en una enfermedad de importancia creciente en todo el mundo, conformando un problema de salud pública. En la Argentina, cada año mueren aproximadamente 5.400 mujeres (MSAL 2009). Asimismo, existe una tendencia ascendente en cuanto a su incidencia en los últimos 30 años, justificada en su mayor parte al aumento progresivo en la detección como consecuencia de las técnicas de tamizado.

El cáncer de mama ha sido objeto de infinidad de estudios acerca de los posibles factores que influyen en su aparición, su historia natural y evolución, así como también los mecanismos



que explican la resistencia natural a un tratamiento determinado. Históricamente se ha transitado un camino terapéutico colmado de avances; el tratamiento quirúrgico Halsted con sus cirugías radicales dejó paso a tratamientos más conservadores, en gran medida gracias al diagnóstico precoz que permitió detectar lesiones de menor tamaño y al advenimiento tanto de tratamientos sistémicos como de la radioterapia. Las contribuciones de la inmunohistoquímica y la genética, con la determinación de marcadores biológicos, el desarrollo de los tratamientos quimioterápicos, con combinaciones de diferentes drogas y el uso de endocrinoterapia e inmunoterapia, dieron como resultado mayores sobrevivencias, períodos más prolongados libres de enfermedad y seguimientos más efectivos y seguros para las pacientes portadoras de la enfermedad.

Puesto que tumores semejantes y homogéneos en cuanto a sus factores de pronóstico clásicos se comportan de forma distinta en su evolución, cabe suponer que la diferencia entre ellos se establece a nivel molecular:

- El estatus positivo de los receptores hormonales está correlacionado con un mejor pronóstico en términos de supervivencia libre de enfermedad y de supervivencia global; además, es un determinante de indicación de terapia endocrina.
- La sobreexpresión de HER-2/neu se asocia con un pronóstico desfavorable, con una menor respuesta al tratamiento, determinando una menor supervivencia global y menor supervivencia libre de enfermedad; asimismo permite identificar a aquellas pacientes que se beneficiarían del uso de esquemas basados en antraciclinas, trastuzumab e inhibidores de la aromatasa.
- La sobreexpresión de Ki-67 implica un peor pronóstico tanto en la supervivencia global como en la supervivencia libre de enfermedad; sus niveles altos tendrían un valor de predicción en la elección de inhibidor de aromatasa por sobre el tamoxifeno.

La clasificación histopatológica actual y los factores de pronóstico clásicos sufren limitaciones en su relevancia clínica, al no reflejar la variabilidad de las neoplasias en su comportamiento biológico, ni tener un buen valor de predicción de la respuesta o resistencia a los distintos tratamientos. La identificación de otros marcadores biológicos, actualmente en estudio como CTC, catepsina D, ciclinas, ps2, p53, uTP, entre otros, permitirá adecuar las intervenciones terapéuticas a medida de cada paciente.

## REFERENCIAS

1. Contesso G, Mouriessse H. Facteurs anatomo-pathologiques du pronostic des cancers du sein. *Path Biol* 1999; 38: 834-835.
2. Clark GM. Prognostic and predictive factors, in Harris J, Lippman ME, Morrow M, et al. (eds): *Diseases of the Breast*. Philadelphia, PA, Lippincott-Raven, 1996; pp.461-485.
3. ASCO Tumor Marker Expert Panel. Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2843-2877.
4. Knight WAI, Livingston RB, Gregory EJ, et al. Estrogen receptors an independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer. *Cancer Res* 1997; 37: 4669-4671.
5. Ellman S, Heinrich S. Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 2405-2426.
6. Jensen A, Jacobson H. *Recent Prog Horm Res* 1962; 18: 387-414.
7. Chen GG, Zeng Q, Tse GM. Estrogen and its receptors in cancer. *Med Res Rev* 2008; 28: 954-974.
8. Leygue E, Dotzlaw H, Watson PH, Murphy LC. Altered estrogen receptor alpha and beta messenger RNA expression during human breast tumorigenesis. *Cancer Res* 1998; 58: 3197-3201.
9. Lawson JS, Field AS, Champion S, Tran D, Ishikura H, Trichopoulos D. Low oestrogen receptor alpha expression in normal breast tissue underlies low breast cancer incidence in Japan. *Lancet* 1999; 354: 1787-1788.
10. Paruthiyil S, Parmar H, Kerekatte V, Cunha GR, Firestone GL, Leitman DC. Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer Res* 2004; 64: 423-428.
11. Ström A, Hartman J, Foster JS, Kietz S, Wimalasena J, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta inhibits 17 beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 1566-1571.
12. Chen GG, Zeng Q, Tse GM. Estrogen and its receptors in cancer. *Med Res Rev* 2008; 28: 954-974.
13. Shyamala G, Yang X, Cardiff RD, Dale E. Impact of progesterone receptor on cell-fate decisions during mammary

- gland development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 3044-3049.
14. McGowan EM, Clarke CL. Effect of overexpression of progesterone receptor A on endogenous progestin-sensitive endpoints in breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 1999; 13: 1657-1671.
  15. Graham JD, Yeates C, Balleine RL, Harvey SS, Milliken JS, Bilous AM, Clarke CL. Characterization of progesterone receptor A and B expression in human breast cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 5063-5068.
  16. Mote PA, Bartow S, Tran N, Clarke CL. Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 72: 163-172.
  17. Wilbor DC, Willis J, Mooney RA, et al. Estrogen and progesterone receptor detection in archival formalin fixed paraffin-embedded tissue from breast carcinomas: A comparison of immunohistochemical with the dextran coated charcoal assay. *Mod Pathol* 1982; 5: 79-84.
  18. Sahin AA, Valero V. Prognostic factors for invasive breast cancer. In: *Breast Cancer*. Ed. Eva Singletary. Springer, New York, 1999; pp.93-119.
  19. Insa A, Lluch A, Prosper F, et al. Prognostic factors predicting survival from first recurrence in patients with metastatic breast cancer: analysis of 439 patients. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 56: 67-78.
  20. Barbi GP, Marroni P, Bruzzi F, et al. Correlation between steroid hormone receptors and prognostic factors in human breast cancer. *Oncology* 1987; 44: 265.
  21. Shingakowinta A, Potter HG, Buroker TR, et al. Estrogen receptor and the natural course of breast cancer. *Ann Surg* 1976; 183: 84-88.
  22. McGuire WL, Clark GM. Prognostic factors and treatment decisions in axillary node negative breast cancer. *N Engl J Med* 1992; 326: 1756-1761.
  23. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: An overview of the randomized trials. *Lancet* 2005; 365: 1687-1717.
  24. Clark GM, McGuire WL, Hubay CA, et al. The importance of estrogen and progesterone receptor in primary breast cancer. *Prog Clin Biol Res* 1983; 132E: 183-190.
  25. Ravdin PM, Green S, Dorr TM, et al. Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen: Results of a prospective Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1992; 10: 1284-1291.
  26. Mohammed RH, Lakata AJ, Haus E, et al. Estrogen and progesterone receptors in human breast cancer: correlation with histologic subtype and degree of differentiation. *Cancer* 1986; 58: 1076-1081.
  27. Butler JA, Bretsky S, Mendex BC, et al. Estrogen receptor protein of breast cancer and predictor of recurrence. *Cancer* 1985; 55: 1178-1181.
  28. Whittliff J, Pasic R, Bland K. Receptores de hormonas esteroideas y peptídicas en el tejido mamario. Bland y Cope land, La Mama, Ed. Panamericana, 1993; pp.1090-1125.
  29. Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, et al. The new oncogene: an erb-B related gene encoding a 185.000-Mr tumor antigen. *Nature* 1984; 312: 513-516.
  30. King CR, Kraus MH, Aaronson SA. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* 1985; 229: 974-976.
  31. Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res* 2003; 284: 99-110.
  32. Hudis CA. Trastuzumab-mechanism of action and use in clinical practice. *N Eng J Med* 2007; 357: 39-51.
  33. Scaltriti M, Rojo F, Ocana A, Anido J, et al. Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 628-638.
  34. Anido J, Scaltriti M, et al. Biosynthesis of tumorigenic HER2 C-terminal fragments by alternative initiation of translation. *EMBO J* 2006; 25: 3234-3244.
  35. Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, et al. HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *J Clin Oncol* 1999; 13: 1120-1128.
  36. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer-correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1999; 271: 177-182.
  37. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235: 177-182.
  38. Menard S, Casalini P, Campiglio M, Pupa S, Agresti R, Tagliabue E. HER2 overexpression in various tumor types, focusing on its relationship to the development of invasive breast cancer. *Ann Oncol* 2001; 12(Suppl 1): S15-S19.
  39. Ross JS, Fletcher JA. HER-2/neu (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1999; 112(suppl): S53-S67.
  40. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Correlation of c-erb B2 gene amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. *Cancer Res* 1988; 48: 1238-1243.
  41. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of clinical Oncology / College of American Pathologists guideline recommendation for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 118-145.
  42. Hanna W, et al. Updated recommendations from the Canadian National Consensus Meeting on HER2/neu testing in breast cancer. *Curr Oncol* 2007; 14(4): 149-153.
  43. Consensus panel and Risk Categories 10th International Conference Primary Therapy of early breast cancer. St. Gallen, 2007.
  44. Tsuda H. HER-2 (c-erbB-2) test update: present status and problems. *Breast Cancer* 2006; 13(3): 236-248.
  45. Hauser-Kronberg C, Dandachi N. Comparison of chromogenic in situ hybridization with others methodologies for HER2 status assessment in breast cancer. *J Mol Histology* 2004; 35: 647-653.
  46. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of clinical Oncology / College of American Pathologists guideline recommendation for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 118.
  47. Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prog-

- nosis. *Eur J Cancer* 2001; 37(Suppl 4): S9-15.
48. Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res* 2003; 284: 99-110.
  49. Lipton A, Ali SM, Leitzel K, et al. Serum HER-2/neu and response to the aromatase inhibitor letrozole versus tamoxifen. *J Clin Oncol* 2003; 21: 1967-1972.
  50. Constantino J, Fisher B, Gunduz N, et al. Tumor size, ploidy, S-phase, and erb B-2 markers in patients with node-negative, ER-positive tumors: findings from NSABP B-14. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1994; 13: 59.
  51. Allred DC, Clark GM, Tandon AK, et al. HER-2/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.
  52. Berns EM, Foekens JA, van Staveren IL, et al. Oncogene amplification and prognosis in breast cancer: Relationship with systemic treatment. *Gene* 1995; 159: 11-18.
  53. Gennari A, Sormani MP, Pronzato P, et al. HER2 status and efficacy of adjuvant anthracyclines in early breast cancer: a pooled analysis of randomized trials. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100(1): 14-20.
  54. Hayes DF, Thor AD, Dressler L, et al. HER2 predicts benefit from adjuvant paclitaxel after AC in node-positive breast cancer: CALGB 9344. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5s (suppl; abstr 510).
  55. Volm MD, Yee H, Symmans WF, et al. HER 2 status predicts response to preoperative paclitaxel in patients with breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1999; 18:104a (abstr 394).
  56. Hayes DF, Thor AD, Dressler L, et al: HER2 predicts benefit from adjuvant paclitaxel after AC in node-positive breast cancer: CALGB 9344. *J Clin Oncol* 2006; 24:5s, (suppl; abstr 510).
  57. Dowsett M, Allred C, Knox J, et al. Relationship between quantitative estrogen and progesterone receptor expression and HER2 status with recurrence with Arimidex, Tamoxifen alone or in combination trial. *J Clin Oncol* 2008; 26: 1059-1065.
  58. Mauriac L, Keshaviah A, Debled M, et al. Predictors of early relapse in postmenopausal woman with hormone receptor positive breast cancer in the BIG 1-98 trial. *Ann Oncol* 2007; 18: 859-867.
  59. Carlomagno C, Perrone F, Gallo C, et al. C-erbB2 overexpression decreases the benefit of adjuvant Tamoxifen in early stage breast cancer without axillary lymph node metastases. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2702-2708.
  60. Bianco AR, De Laurentis M, Carlomagno C, et al. 20 years update of the Napoles gun trial of adjuvant breast cancer therapy; evidence of interaction between c-erbB2 expression and tamoxifen efficacy. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1998; 17: abstract 97.
  61. Johnston SRD. Hormone resistance. Hormone receptors in breast cancer. New York: Springer Science, 2008.
  62. Pietras R, Arboleda J, Reese D, et al. HER2 tyrosine kinase pathways targets estrogen and promotes hormone independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene* 1995; 10: 2435.
  63. Carlomagno C, Perrone F, Gallo C, et al. C-erb B2 overexpression decrease the benefit of adjuvant tamoxifen in early breast cancer without axillary lymph node metastases. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2702-2708.
  64. Rasmussen B, Regan M, Lykkesfeldt A, et al. Central assessment of ER, PgR and HER in BIG 1-98 evaluating letrozole compared to tamoxifen as initial adjuvant endocrine therapy for postmenopausal women with hormone receptor positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; ASCO Annual Meeting Proc 25 (18S June 20 Suppl.): 538.
  65. Viani G, Alfonso S, Stefano E. Adjuvant trastuzumab in the treatment of HER2 positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trial. *BMC Cancer* 2007; 7: 153.
  66. Dahabreh IJ, Linardou H, Siannis F, et al. Trastuzumab in the adjuvant treatment of early-stage breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Oncologist*. 2008;13(6): 620-30.
  67. Tubiana M, Pejovic MH, Chavaudra N, Contesso G, Malaise EP. The long-term prognostic significance of the thymidine labeling index in breast cancer. *Int J Cancer* 1984; 33(4): 441-445.
  68. Dressler LG, Seamer L, Owens MA, Clark GM, McGuire WL. Evaluation of a modeling system for S-phase estimation in breast cancer by flow cytometry. *Cancer Res* 1987; 47(20): 5294-5302.
  69. Tovey SM, Witton CJ, Bartlett JM, Stanton PD, Reeves JR, Cooke TG. Outcome and human epidermal growth factor receptor (HER) 1-4 status in invasive breast carcinomas with proliferation indices evaluated by bromodeoxyuridine labeling. *Breast Cancer Res* 2004; 6(3): R246-251.
  70. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133 (4): 1710-1715.
  71. Harper-Wynne C, Ross G, Sacks N, et al. Effects of the aromatase inhibitor letrozole on normal breast epithelial cell proliferation and metabolic indices in postmenopausal women: A pilot study for breast cancer prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 614-621.
  72. Clarke RB, Howell A, Potten CS, et al. Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast. *Cancer Res* 1997; 57: 4987-4991.
  73. Gerdes J, Li L, Schlueter C, et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 1991; 138: 867-873.
  74. Fonatsch C, Duchrow M, Rieder H, et al. Assignment of the human Ki-67 gene (MK167) to 10q25-qter. *Genomics* 1991; 11: 476-477.
  75. Bruno S, Darzynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif* 1992; 25: 31-40.
  76. Heidebrecht HJ, Buck F, Haas K, et al. Monoclonal antibodies Ki-63 and Ki-65 yield new data on the "Ki-67" proteins. *Cell Prolif* 1996; 29: 413-425.
  77. Bottini A, Berruti A, Bersiga A, et al. Relationship between tumour shrinkage and reduction in Ki67 expression after primary chemotherapy in human breast cancer. *Br J Cancer* 2001; 85: 1106-1112.
  78. Moriki T, Takahashi T, Kataoka H, et al. Proliferation marker MIB-1 correlates well with proliferative activity evaluated

- by BrdU in breast cancer: An immunohistochemical study including correlation with PCNA, p53, c-erbB-2 and estrogen receptor status. *Pathol Int* 1996; 46: 953-961.
79. Liu S, Edgerton SM, Moore DH 2nd, et al. Measures of cell turnover (proliferation and apoptosis) and their association with survival in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1716-1723.
  80. Trihia H, Murray S, Price K, et al. Ki-67 expression in breast carcinoma: Its association with grading systems, clinical parameters, and other prognostic factors—a surrogate marker? *Cancer* 2003; 97: 1321-1331.
  81. Bottini A, Berruti A, Bersiga A, et al. Relationship between tumour shrinkage and reduction in Ki67 expression after primary chemotherapy in human breast cancer. *Br J Cancer* 2001; 85: 1106-1112.
  82. Rudolph P, Olsson H, Bonatz G, et al. Correlation between p53, c-erbB-2, and topoisomerase II alpha expression, DNA ploidy, hormonal receptor status and proliferation in 356 node-negative breast carcinomas: Prognostic implications. *J Pathol* 1999; 187: 207-216.
  83. Spyrtos F, Ferrero-Pous M, Trassard M, et al. Correlation between MIB-1 and other proliferation markers: Clinical implications of the MIB-1 cutoff value. *Cancer* 2002; 94: 2151-2159.
  84. Nicholson RI, McClelland RA, Finlay P, et al. Relationship between EGF-R, c-erbB-2 protein expression and Ki67 immunostaining in breast cancer and hormone sensitivity. *Eur J Cancer* 1993; 29A: 1018-1023.
  85. Moriki T, Takahashi T, Kataoka H, et al. Proliferation marker MIB-1 correlates well with proliferative activity evaluated by BrdU in breast cancer: An immunohistochemical study including correlation with PCNA, p53, c-erbB-2 and estrogen receptor status. *Pathol Int* 1996; 46: 953-961.
  86. Prosperi E. Multiple roles of the proliferating cell nuclear antigen: DNA replication, repair and cell cycle control. *Prog Cell Cycle Res* 1997; 3: 193-210.
  87. Molino A, Micciolo R, Turazza M, et al. Ki-67 immunostaining in 322 primary breast cancers: Associations with clinical and pathological variables and prognosis. *Int J Cancer* 1997; 74: 433-437.
  88. Spyrtos F, Ferrero-Pous M, Trassard M, et al. Correlation between MIB-1 and other proliferation markers: Clinical implications of the MIB-1 cutoff value. *Cancer* 2002; 94: 2151-2159.
  89. Pierga JY, Leroyer A, Viehl P, et al. Long term prognostic value of growth fraction determination by Ki-67 immunostaining in primary operable breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 37: 57-64.
  90. Liu S, Edgerton SM, Moore DH 2nd, et al. Measures of cell turnover (proliferation and apoptosis) and their association with survival in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1716-1723.
  91. Wintzer HO, Zipfel I, Schulte-Monting J, et al. Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. *Cancer* 1991; 67: 421-428.
  92. Cattoretti G, Becker MH, Key G, et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 1992; 168(4): 357-363.
  93. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000; 182 (3): 311-322.
  94. McCormick D, Yu C, Hobbs C, Hall PA. The relevance of antibody concentration to the immunohistological quantification of cell proliferation-associated antigens. *Histopathology* 1993; 22(6): 543-547.
  95. Wong SC, Chan JK, Lo ES, et al. The contribution of bi-functional Skip Dewax pretreatment solution, rabbit monoclonal antibodies, and polymer detection systems in immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131(7): 1047-1055.
  96. Zabaglio L, Salter J, Anderson H, et al. Comparative validation of the SP6 antibody to Ki67 in breast cancer. *J Clin Pathol* 2010; 63(9): 800-804.
  97. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G Jr. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer* 2007; 96: 1504-1513.
  98. Euler U, Tulusan AH: An attempt to identify biological markers predicting response to primary chemotherapy with epirubicin/cyclophosphamid in locally advanced breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003; 21: 888 (abstr 3569).
  99. Faneyte IF, Schrama JG, Peterse JL, et al. Breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy: Predictive markers and relation with outcome. *Br J Cancer* 2003; 88: 406-412.
  100. Pohl G, Rudas M, Taucher S, et al. Expression of cell cycle regulatory proteins in breast carcinomas before and after preoperative chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 78: 97-103.
  101. Bottini A, Berruti A, Bersiga A, et al. Relationship between tumour shrinkage and reduction in Ki67 expression after primary chemotherapy in human breast cancer. *Br J Cancer* 2001; 85: 1106-1112.
  102. Billgren AM, Rutqvist LE, Tani E, et al. Proliferating fraction during neoadjuvant chemotherapy of primary breast cancer in relation to objective local response and relapse-free survival. *Acta Oncol* 1999; 38: 597-601.
  103. Dowsett M, Smith I. Greater Ki67 response after 2 weeks neoadjuvant treatment with anastrozole than with tamoxifen or anastrozole plus tamoxifen in the IMPACT trial: A potential predictor of relapse-free survival. San Antonio Breast Cancer Conference, Breast Cancer Research and Treatment, San Antonio, TX, December 3-6, 2003.
  104. Smith I, Dowsett M, Ebbs S, et al. Neoadjuvant treatment of postmenopausal breast cancer with anastrozole, tamoxifen or both in combination: The IMPACT multicentre double blind randomised trial. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5108-5116.
  105. Vousden K, Prives C. P53 and prognosis: new insights and further complexity. *Cell* 2005; 120: 7-10.
  106. Mills A. p53: link to the past, bridge to the future. *Genes Dev* 2005; 19: 2091-2099.
  107. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 4855-4878.
  108. Harris C, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 1993; 329: 1318-1327.
  109. Lipponen P, Ji H, Aaltomaa S. p53 protein expression in breast carcinoma as related to histopathology characteristics and prognosis. *Int J Cancer* 1993; 55: 51-56.

110. Olivier M, Langerod A, Carrieri P, et al. The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 1157-1167.
111. Bull S, Ozcelik H, et al. The Combination of p53 mutation and neu/erbB-2 amplification is associated with poor survival in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 86-96.
112. Isola J, Visakorpi T, Holli K, et al. Association of overexpression of tumor suppressor protein p53 with rapid cell proliferation and poor prognosis in node negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1109-1114.
113. Hamilton A, Piccart M. The contribution of molecular markers to the prediction of response in the treatment of breast cancer: A review of the literature on Her-2, p-53 and bcl2. *Ann Oncol* 2000; 11: 647-63.
114. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists. Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 124: 966-78.
115. Dechao L, et al. Reactive oxygen species (ROS) control the expression of Bcl-2 family proteins by regulating their phosphorylation and ubiquitination. *Cancer Sci* 2004; 95: 644-50.
116. Walsh T, King M. Ten genes for inherited breast cancer. *Cancer Cell* 2007; 11: 103-105.
117. Lacroix M, Toillon R, Leclercq G. p53 and breast cancer, an update. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13: 293-325.
118. Dole M, et al. Bcl-2 inhibits chemotherapy induced apoptosis in neuroblastoma. *Cancer Res* 1994; 54: 3253-9.
119. Yang Q, Sakurai T, et al. Expression of Bcl-2 but not Bax or p53 correlates with in vitro resistance to a series of anti-cancer drugs in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 61: 211-216.
120. Evans T, Rosenthal E, et al. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at the end of each cell division. *Cell* 1983; 33: 389-96.
121. Simpson JF, Quan DE, O'Malley F, Odom-Maryon T, Clarke PE. Amplification of CCND1 and expression of its protein product, cyclin D1, in ductal carcinoma in situ of the breast. *Am J Pathol* 1997; 151: 161-168.
122. Gillett CE, Lee AH, Millis RR, Barnes DM. Cyclin D1 and associated proteins in mammary ductal carcinoma in situ and atypical ductal hyperplasia. *J Pathol* 1998; 184: 396-400.
123. Neuman E, Ladha MH, Lin N, Upton TM, Miller SJ, et al. (1997) Cyclin D1 stimulation of estrogen receptor transcriptional activity independent of cdk4. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 5338-5347.
124. Kim HT, Kong G, Denardo D, Li Y, Uray I, et al. Identification of biomarkers modulated by the retinoid LGD1069 (bexarotene) in human breast cells using oligonucleotide arrays. *Cancer Res* 2006; 66: 12009-12018.
125. Veronesi U, Mariani L, Decensi A, Formelli F, Camerini T, et al. Fifteen-year results of a randomized phase III trial of fenretinide to prevent second breast cancer. *Ann Oncol* 2006; 17: 1065-1071.
126. Hwang HC, Clurman BE. Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene* 2005; 24: 2776-2786.
127. Porter DC, Zhang N, Danes C, et al. Tumor specific proteolytic processing of cyclin E generates hyperactive lower-molecular-weight forms. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 6254-6269.
128. Libertini SJ, Robinson BS, Dhillon NK, et al. Cyclin E both regulates and is regulated by calpain 2, a protease associated with metastatic breast cancer phenotype. *Cancer Res* 2005; 65: 10700-10708.
129. Wingate H, Zhang N, McGarhen MJ, et al. The tumor-specific hyperactive forms of cyclin E are resistant to inhibition by p21 and p27. *J Biol Chem* 2005; 280: 15148-15157.
130. Akli S, Keyomarsi K: Low-molecular-weight cyclin E. The missing link between biology and clinical outcome. *Breast Cancer Res* 2004; 6: 188-191.
131. Sieuwerts AM, Look MP, Meijer-van Gelder ME, et al. Which cyclin E prevails as prognostic marker for breast cancer? Results from a retrospective study involving 635 lymph node-negative breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 3319-3328.
132. Keyomarsi K, Tucker SL, Buchholz TA, et al. Cyclin E and survival in patients with breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347: 1566-1575.
133. Keyomarsi K, Tucker SL, Buchholz TA, et al. Cyclin E and survival in patients with breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347: 1566-1575.
134. Wang L, Shao ZM. Cyclin e expression and prognosis in breast cancer patients: A meta-analysis of published studies. *Cancer Invest* 2006; 24: 581-587.
135. Rochefort H, Garcia M, Glondu M, Laurent V, Liaudet E, Rey JM, et al. Cathepsin D in breast cancer: mechanisms and clinical applications, a 1999 overview. *Clin Chim Acta* 2000; 291: 157-70.
136. Liaudet-Coopman E, Beaujouin M, Derocq D. Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis. *Cancer Lett* 2006; 237: 167-79.
137. Laurent-Matha V, Maruani-Herrmann S, Prébois C. Catalytically inactive human cathepsin D triggers fibroblast invasive growth. *J Cell Biol* 2005; 168: 489-99.
138. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists. Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 124: 966-78.
139. Ardavanis A, Scorilas A, Loukeri A, et al. Cathepsin D may help in discriminating node negative breast cancer patients at risk for local-regional recurrence. *Anticancer Res* 1998; 18: 2885-90.
140. Tetu B, Brisson J, Lapointe H, Wang CS, Bernard P, Blanchette C. Cathepsin D expression by cancer and stromal cells in breast cancer: an immunohistochemical study of 1348 cases. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 55: 137-47.
141. Foekens JA, Look MP, Bolt-de Vries J, et al. Cathepsin-D in primary breast cancer: prognostic evaluation involving 2810 patients. *Br J Cancer* 1999; 79: 300-307.
142. Tetu B, Brisson J, Cote C, Brisson S, Potvin D, Roberge N. Prognostic significance of cathepsin-D expression in node-positive breast carcinoma: an immunohistochemical study. *Int J Cancer* 1993; 55: 429-35.
143. Tetu B, Brisson J, Wang CS, Lapointe H, Beaudry G, Blanchette C. Expression of cathepsin D, stromelysin-2, and urokinase by reactive stromal cells on breast carcinoma prognosis. *Cancer* 2001; 92: 2957-2964.

144. Billgren A-M, Rutqvist LE, Johansson H, Hagerstrom T, Skoog L. The role of cathepsin D and PAI-1 in primary invasive breast cancer as prognosticators and predictors of treatment benefit with adjuvant tamoxifen. *Eur J Cancer* 2000; 36: 1374-80.
145. Duffy MJ. Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: From pilot to level 1 evidence studies. *Clin Chem* 2002; 48: 1194-1197.
146. Foekens JA, Schmitt M, van Putten WL, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 and prognosis in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1994; 12: 1648-1658.
147. Visscher DW, Sarkar F, LoRusso P, et al. Immunohistologic evaluation of invasion-associated proteases in breast carcinoma. *Mod Pathol* 1993; 6: 302-306.
148. Look MP, van Putten WL, Duffy MJ, et al. Pooled analysis of prognostic impact of urokinase type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 116-128.
149. Schmitt M, Sturmheit AS, Welk A, et al. Procedures for the quantitative protein determination of urokinase and its inhibitor, PAI-1, in human breast cancer tissue extracts by ELISA. *Methods Mol Med* 2006; 120: 245-265.
150. Sidenius N, Blasi F. The urokinase plasminogen activator system in cancer: recent advances and implication for prognosis and therapy. *Cancer Metastasis Rev* 2003; 22: 205-22.
151. Morgan, H. y Hill, P. A. Human breast cancer cell-mediated bone collagen degradation requires plasminogen activation and matrix metalloproteinase activity. *Cancer Cell Int* 2005; 5: 1.
152. Harbeck N, Schmitt M, Kates RE, et al. Clinical utility of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 determination in primary breast cancer tissue for individualized therapy concepts. *Clin Breast Cancer* 2002; 3:196-200.
153. Zemzoum I, Kates RE, Ross JS, et al. Invasion factors uPA/PAI-1 and HER2 status provide independent and complementary information on patient outcome in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21:1022-1028.
154. Look MP, van Putten WL, Duffy MJ, et al. Pooled analysis of prognostic impact of urokinase type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 116-128.
155. Kathleen I. Pritchard. High levels of uPA and PAI-1 predict a good response to anthracyclines. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 121: 625-626.
156. Arens N, Gandhari M, Bleyl U, Hildenbrand, R. In vitro suppression of urokinase plasminogen activator in breast cancer cells –a comparison of two antisense strategies. *Int J Oncol* 2005; 26: 113-9.
157. Bon G, Von Mensdorff-Ponilly, et al. Clinical and technical evaluation of ACS BR serum assay of MUC 1 gene derived glycoprotein in breast cancer and comparison with CA15-3 assay. *Clin Chem* 1997; 43: 585-593.
158. Price M, Rye P, Petrakou R, et al. Summary report on the ISOBM TD 4 workshop: analysis of 56 monoclonal antibodies against the MUC 1 mucin. *Tumor Biol* 1998; 19: 1-20.
159. Gion M, Mione R, Leon AE, Lüftner D, Molina R, Possinger K, Robertson JF. CA 27.29: a valuable marker for breast cancer management. A confirmatory multicentric study on 603 cases. *Eur J Cancer* 2001; 37: 355-363.
160. Vizcarrá E, Lluch A, Cibrian R, Jarque F, Garcia-Conde J. CA 15.3, CEA and TPA tumor markers in the early diagnosis of breast cancer relapse. *Oncology* 1994; 51: 491-496.
161. Jager W, Eibner K, Löffler B, Gleixner S, Kramer S. Serial CEA and CA 15.3 during follow-up of breast cancer patients. *Anticancer Res* 2000; 20: 5179-5182.
162. Gion M, Boracchi P, Dittadi R, et al. Prognostic role of serum CA15.3 in 362 node-negative breast cancers: An old player for a new game. *Eur J Cancer* 2002; 38:1181-1188.
163. Molina R. Tumor markers in breast cancer; in Diamonds EP, Fritsche HA, Lilja H, Chan DW, Schwartz M (eds): *Tumor Markers, Physiology, Pathobiology, Technology and Clinical Applications*. Washington, AACCC Press, 2002; pp.165-179.
164. ASCO Expert Panel. Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2843-2877.
165. Duffy MJ, Duggan C, Keane R, Hill ADK, McDermott E, Crown J, O'Higgins N. High preoperative CA 15-3 concentrations predict adverse outcome in node-negative and node positive breast cancer: a study of 600 patients with histologically confirmed breast cancer. *Clin Chem* 2004; 50: 559-563.
166. van Dalen A, Heering KJ, Barak V, Peretz T, Cremaschi A, Geroni P, Gion M, Saracchini S, Molina R, Namer M, Stieber P, Sturgeon C, Leonard RCF, Einarsson R. Treatment response in metastatic breast cancer. A multicenter study comparing UICC criteria and tumor marker changes. *Breast* 1996; 5: 82-88.
167. Soletormos G, Nielsen D, Schioler V, Skovsgaard T, Dombrowsky P. Tumor markers cancer antigen 15.3, carcinoembryonic antigen, and tissue polypeptide antigen for monitoring metastatic breast cancer during first-line chemotherapy and follow-up. *Clin Chem* 1996; 42: 564-575.
168. Stieber P, Molina R, Chan DW, Fritsche HA, Beyrau R, Bonfrer JM, Filella X, Gomet TG, Hoff T, Jager W, van Kamp GJ, Nagel D, Peisker K, Sokoll Jd, Troalen F, Untch M, Domke I. Clinical evaluation of the Elecsys CA15.3 test in breast cancer patients. *Clin Lab* 2003; 49: 15-24.
169. Wooster R, Weber BL. Breast and ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 2339-47.
170. Chen S, Pamigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1329-33.
171. Antoniou AC, Easton DF. Risk prediction models for familial breast cancer. *Future Oncol* 2006; 2: 257-74.
172. Warner E, Foulkes W, Goodwin P, Meschino W, Blondal J, Paterson C, et al. Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in unselected Ashkenazi Jewish women with breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1241-1247.
173. Hall MJ, Reid JE, Burbidge LA, Pruss D, Deffenbaugh AM, Frye C, et al. Women of different ethnicities undergoing testing for hereditary breast-ovarian cancer. *Cancer* 2009; 115(10): 2222-2233.
174. Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, et al. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1420-30.
175. Andreopoulou E, Cristofanilli M. Circulating tumor cells as

- prognostic marker in metastatic breast cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2010; 10: 171-7.
176. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 781-91.
  177. Harris L, Fritsche H, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 5287-5312.
  178. Quackenbush J. Microarray analysis and tumor classification. *N Engl J Med* 2006; 354: 2463-2472.
  179. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature* 2000; 406: 747-752.
  180. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415: 530-536.
  181. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8418-8423.
  182. Pusztai L, Mazouni C, Anderson K, Wu Y, Symmans WF. Molecular classification of breast cancer: Limitations and potential. *Oncologist* 2006; 11: 868-877.
  183. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population based study. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 10393-10398.
  184. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature* 2000; 406: 747-752.
  185. Sorlie T, Perou AM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10869-10874.
  186. Pusztai L, Ayers M, Stec J, et al. Gene expression profiles obtained from fine-needle aspirations of breast cancer reliably identify routine prognostic markers and reveal large-scale molecular differences between estrogen-negative and estrogen-positive tumors. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2406-2415.
  187. Yanagawa M, Ikemot K, Kawauchi S. Luminal A and luminal B (HER2 negative) subtypes of breast cancer consist of a mixture of tumors with different genotype. *BMC Res Notes* 2012; 5: 376.
  188. Esteva FJ, Sahin AA, Cristofanilli M, et al. Prognostic role of a multigene reverse transcriptase-PCR assay in patients with node-negative breast cancer not receiving adjuvant systemic therapy. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3315-3319.
  189. Gianni L, Zambetti M, Clark K, et al. Gene expression profiles in paraffin-embedded core biopsy tissue predict response to chemotherapy in women with locally advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 7265-7277.
  190. Tókes A, Kulka J, Paku S. Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast Cancer Res* 2005; 7: R296-R305.
  191. Prat A, Parker J, Karginova O. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010; 12: R68.
  192. Quackenbush J. Microarray analysis and tumor classification. *N Engl J Med* 2006; 354: 2463-2472.
  193. Cronin M, Sangli C, Liu M, et al. Analytical validation of the Oncotype DX genomic diagnostic test for recurrence prognosis and therapeutic response prediction in node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Chem* 2007; 53: 1084-1091.
  194. Paik S, Tang G, Shak S, et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3726-3734.
  195. Sparano J, Paik S. Development of the 21-gene assay and its application in clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol* 2008; 26: 721-728.
  196. Lyman G, Cosler L, Kuderer N, Hornberger J. Impact of a 21-gene RT-PCR assay on treatment decisions in early-stage breast cancer. *Cancer* 2007; 109: 1011-1018.
  197. Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, et al. Gene expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* 2005; 365: 671-679.