

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



**IMPACTO PRONÓSTICO DE LAS CÉLULAS TUMORALES
RESIDUALES AISLADAS EN SANGRE PERIFÉRICA EN
CÁNCER DE MAMA DE ALTO RIESGO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Miguel Ángel Quintela Fandiño

Bajo la dirección de los doctores

Ricardo Hitt Sabag

Hernán Cortés Funes

Rafael Enríquez de Salamanca

Madrid, 2005

ISBN: 84-669-2813-8

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



**Impacto pronóstico de las células tumorales residuales aisladas en
sangre periférica en cáncer de mama de alto riesgo.**

TESIS DOCTORAL

Miguel Ángel Quintela Fandiño

2005

Agradecimientos.

A mi familia. Por su cariño. Por su incondicional, altruísta y constante apoyo en mi carrera.

A Ricardo Hitt y a Antonio Jimeno, por enseñarme a abrir las puertas para desarrollar mis ideas.

A Joaquín Martínez y a Soledad Gamarra, por compartir sus conocimientos y por su impagable trabajo y esfuerzo en este proyecto.

Al doctor Rafael Enríquez de Salamanca, tanto por su ayuda como por sus consejos de impagable valor.

A Cecilia Guzmán y a Roche Pharma España, por la financiación de este trabajo.

Índice	Página
I. Introducción.	11
1.- Cáncer de mama.	11
1.1.- Importancia demográfica del cáncer de mama en España.	11
1.2.- Generalidades.	11
1.2.1.-Riesgo.	11
1.2.2.-Tendencia temporal de la incidencia del cáncer de mama	12
1.2.3.-Factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de mama.	12
1.2.3.1.-Agregación familiar.	12
1.2.3.2.-Predisposición hereditaria.	13
1.2.3.3.-Factores hormonales.	14
1.2.3.4.-Estilo de vida y factores dietéticos.	14
1.2.3.5.-Enfermedades benignas de la mama.	15
1.2.3.6.-Factores ambientales.	16
1.3. Breve Recuerdo Clínico.	16
1.4. Tipos histológicos.	19
1.4.1. La mama normal.	19
1.4.2. Tumores malignos de mama.	20
1.4.2.1. Carcinoma no invasivo (<i>in situ</i>).	20
a) Carcinoma intraductal.	20
b) Carcinoma lobulillar <i>in situ</i> .	22

c) Evolución de las lesiones <i>in situ</i> a carcinomas invasivos.	22
1.4.2.2. Tumores invasivos de la mama.	26
2.-Biología del crecimiento y diseminación tumoral.	29
2.1. Cinética de crecimiento de las células tumorales.	29
2.2. Angiogénesis tumoral.	32
2.3. Progresión y heterogeneidad tumorales.	32
2.4. Mecanismos de invasión y metástasis.	33
3.-Factores de supervivencia y progresión de la célula tumoral mamaria.	37
3.1. Receptores esteroideos.	37
3.1.1. Conceptos básicos.	37
3.2.2. Relevancia clínica.	39
3.2. Receptores de factores de crecimiento.	41
3.2.1. Receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 2 (HER-2).	41
4.-Líneas generales del tratamiento del cáncer de mama.	50
4.1. Introducción. Estadiaje.	51
4.2. Factores pronósticos.	53
4.3. Esquemas de tratamiento.	56
4.4. Necesidad de una mejor estratificación del riesgo individual.	58
5.-Carcinoma de mama de alto riesgo o localmente avanzado.	61
5.1. Definición.	61
5.2. Estrategias para mejorar los resultados del tratamiento.	62
6.-Visión de conjunto. Planteamiento del problema.	71
II. Hipótesis de trabajo.	76

III. Objetivos.	77
IV. Material y métodos.	78
1.-Pacientes.	78
1.1. Selección de pacientes.	78
1.2. Procedimientos terapéuticos.	79
1.2.1. Cirugía.	79
1.2.2. Estadiaje.	79
1.2.3. Quimioterapia adyuvante.	81
1.2.4. Comedicación.	81
1.2.5. Seguimiento clínico.	82
1.2.6. Manejo de la toxicidad.	83
1.2.6.1. Toxicidad no hematológica.	83
1.2.6.1. Toxicidad hematológica.	84
1.2.7. Evaluación final.	85
1.2.8. Estimulación de médula ósea para recolección de precursores hematopoyéticos en sangre periférica.	
Aféresis.	86
1.2.9. Quimioterapia a altas dosis.	87
1.2.10. Terapias ulteriores.	88
1.2.11. Revisiones.	88
1.2.12. Recogida de datos.	89
2.-Determinación de la expresión de K-19, HER-2, EGP2, PS2 y P1B en sangre periférica. Desarrollo del proceso realizado.	91
2.1. Detección de células tumorales circulantes.	91

2.2. PCR y RT-PCR: fundamentos.	92
2.3. Reactivos.	100
2.4. Aparatos.	101
2.5. Extracción de m-RNA.	101
2.6. Retrotranscripción y síntesis de c-DNA.	103
2.7. <i>Primers</i> o cebadores y sondas Taqman.	106
2.8. Amplificación: Desarrollo de la PCR.	107
2.9. Controles positivo y negativo.	109
2.10. Gen de referencia para la cuantificación.	111
2.11. Cuantificación relativa del número de copias de los transcritos a estudio.	113
3.- Consideraciones estadísticas.	115
V. Resultados.	124
1. Tratamientos.	124
1.1. Tratamientos administrados.	124
1.2. Toxicidad registrada.	124
2.-Seguimiento, recaídas y supervivencia.	129
2.1. Seguimiento.	129
2.2. Recaídas.	129
2.3. Supervivencia.	130
3.-Determinaciones de los transcritos K19, HER-2, EGP2, PS2, P1B y GUS.	132
3.1. Eficiencia de la PCR.	132
3.2. Valor del Ct. para GUS en cada muestra: muestras válidas.	133
3.3. Valores por paciente de cada transcrito a estudio respecto al gen de referencia.	134

3.4. Micrometástasis. Intervalo de confianza para la población.	138
4.-Comprobación del impacto de los factores clásicos en la serie.	139
4.1. Pruebas de Kaplan-Meier.	139
4.2. Correlaciones de variables cuantitativas con el tiempo hasta la recaída o muerte.	141
4.3. Tablas de contingencia de variables categóricas y desenlace categórico recaída/no recaída o muerte/no muerte. Prueba de Chi cuadrado.	142
5.-Análisis del impacto pronóstico de la presencia de micrometástasis	144
5.1. Pruebas de Kaplan Meier.	144
5.1.1. Análisis de supervivencia considerando la presencia de micrometástasis como variable categórica.	144
5.1.2. Análisis de supervivencia por cada uno de los genes cuya expresión define categóricamente presencia de micrometástasis	145
5.2. Correlación de los valores cuantitativos de la expresión de cada uno de los genes a estudio con tiempo hasta la recaída y la muerte. Correlación de los valores cuantitativos de la expresión de cada gen del panel con el resto.	148
5.3. Impacto de la presencia de micrometástasis en recaída y muerte con independencia del tiempo al desenlace.	149
5.4. Impacto global de la presencia de micrometástasis en el tiempo a la recaída y a la muerte: análisis multivariante en conjunción con los factores clásicos. Modelo de regresión de Cox.	151

5.4.1. Modelo de Cox considerando la expresión conjunta de todos los genes del panel a estudio.	151
5.4.2. Modelo de Cox considerando la expresión por separado de cada gen del panel a estudio.	153
5.4.3 Modelo de Cox separando a las pacientes en riesgo alto o muy alto en función del número de ganglios afectados.	154
6.-Relación de los factores pronósticos clásicos con la presencia de micrometástasis en sangre periférica.	156
6.1. Relación de los factores pronósticos categóricos con la presencia de micrometástasis en sangre periférica: tablas de contingencia.	156
6.2. Relación de los factores pronósticos cuantitativos con la presencia de micrometástasis en sangre periférica: regresión logística.	157
6.3. Relación del factor número de ganglios (cuantitativo) con el valor cuantitativo de cada transcrito en sangre periférica: estadístico de Pearson.	157
VI. Discusión.	159
1.-Bases para la detección de células tumorales mamarias aisladas diseminadas.	159
1.1. Micrometástasis y células malignas diseminadas aisladas.	159
1.2. Lugar de depósito de células tumorales aisladas.	161
1.3. Detección de células tumorales mamarias aisladas diseminadas.	164
1.3.1. Citoqueratinas.	164

1.3.2. Problemas relacionados con el hecho de detectar células tumorales mamarias diseminadas sólo mediante citoqueratinas: necesidad de utilizar más genes como diana.	167
1.3.3. HER-2, EGP2, PS2 y P1B.	171
2.- Conceptos relativos al gen de referencia y a la cuantificación de transcritos de mRNA.	178
2.1. Elección del gen de referencia.	178
2.2. Cuantificación relativa del número de copias de los transcritos a estudio. Utilidad de la sensibilidad de la RT-PCR.	180
3.-Comentarios acerca de otros trabajos realizados sobre la presencia de micrometástasis en cáncer de mama.	184
3.1. Trabajos existentes sobre el tema.	184
3.2. Recapitulación acerca de los resultados de los trabajos de otros autores.	198
4.-Resultados obtenidos en nuestra serie.	199
4.1. Resultados concernientes a los tratamientos administrados en nuestra serie.	199
4.2. Resultados obtenidos para la determinación de los transcritos a estudio.	201
4.2.1. Razones de no hallar expresión de PS2.	201
4.2.2. Incidencia de detección de transcritos atribuidos a células tumorales circulantes.	202
4.2.3. Importancia de la degradación del m-RNA.	204

4.3. Resultados de los factores pronósticos clásicos.	205
4.3.1. HER-2.	205
4.3.2. Otros factores.	208
4.4. Resultados relativos a la presencia de micrometástasis.	211
4.4.1. Independencia absoluta de la presencia de micrometástasis con respecto al resto de factores pronósticos.	211
4.4.2. Importancia de la independencia del factor pronóstico “micrometástasis” respecto al resto de factores.	214
4.4.3 Ausencia de relación entre los valores de los distintos transcritos. Necesidad de considerar conjuntamente la presencia de todos los transcritos. Importancia del PIB.	216
4.4.4. Impacto de la presencia de micrometástasis en sangre periférica tras el tratamiento quimioterápico.	220
VII. Limitaciones del estudio.	222
VIII. Líneas futuras de investigación.	223
IX. Conclusiones.	224
X. Bibliografía.	225

I. Introducción.

1.- Cáncer de mama

1.1. Importancia demográfica del cáncer de mama en España.

La población oficial de España a 1 de Enero del 2.000 fue de 40.499.791 personas, de las que el 51,05% eran mujeres. [1] En dicho año, se produjeron 360.391 decesos; desglosados por causas de mortalidad, las dominantes fueron las enfermedades del aparato circulatorio (34,88% del total), seguidas por cáncer y por las enfermedades del aparato respiratorio (26,38% y 11,37% respectivamente) [2]

Nuestro país carece todavía de un registro oficial global de tumores. Los datos estimados a partir de Comunidades Autónomas que sí cuentan con dichos registros muestran que el cáncer de pulmón es la primera causa tanto en número de casos como en muertes (de 84.736 casos y 57.800 muertes por cáncer en el año 2.000; las neoplasias pulmonares suponen el 19,85% (16.821 casos) y 27,64% (15.974 muertes) respectivamente), seguido por el cáncer de mama (17,62% (14.934 casos) y 11,04% (6.381 muertes)) y el de colon (12,39% de los casos y 10,30% de las muertes respectivamente). [3]. Dado que el cáncer de mama en el varón supone sólo el 1% de los tumores mamarios, el cáncer de mama es hoy por hoy la primera causa de mortalidad por cáncer en las mujeres españolas. [4]

1.2. Generalidades.

1.2.1. Riesgo.

El riesgo de padecer un cáncer de mama aumenta con la edad, siendo el riesgo estimado de padecerlo a lo largo de la vida para una mujer blanca de 13,1%; desde el

momento del nacimiento, la probabilidad de fallecer de un cáncer de mama es de 3,4%.

[5]

1.2.2. Tendencia temporal.

En los últimos años ha habido un auge en la práctica de mamografías de cribado con el fin de conseguir un diagnóstico precoz del cáncer de mama, a raíz de los datos de los trabajos de Otto *et al* [6], Duffy *et al* [7], Blanks *et al* [8] y Greenlee *et al* [9] en Holanda, Suecia, Reino Unido y Estados Unidos respectivamente. Dichos trabajos globalmente sugieren que si bien la mortalidad por cáncer de mama en Occidente presenta una tendencia a la disminución, el número total de diagnósticos ha aumentado, a favor de estadíos mucho más tempranos y curables a largo plazo al menos en el grupo de mujeres de 40 a 59 años.

1.2.3. Factores de riesgo para el cáncer de mama.

Los más contrastados son los siguientes:

1.2.3.1. Agregación familiar.

Globalmente, existe un riesgo 1,5-3 veces superior al de la población normal para aquellas pacientes cuyo familiar de primer grado (hermana o madre) hayan padecido un cáncer de mama. [10] La historia familiar es un factor de riesgo heterogéneo que depende del número de familiares afectados, del número de familiares no afectados, de la edad al diagnóstico en los familiares y del grado de parentesco. Incluso en la ausencia de una predisposición hereditaria conocida al cáncer de mama (ver siguiente apartado), las pacientes con historia familiar positiva tienen un cierto incremento del

riesgo, debido bien a factores genéticos aún no definidos, factores ambientales, o a una combinación de ambos.

1.2.3.2. Predisposición hereditaria.

La predisposición hereditaria ha de sospecharse sobre todo cuando una mujer padece cáncer de mama a edades tempranas (por debajo de 45 años) y tiene historia familiar positiva para cáncer de mama y/o ovario (fundamentalmente), o cuando hay un gran número de familiares afectados.

En el año 1994 se clonó el gen BRCA1, tras identificar en 1990 una región de susceptibilidad genética al cáncer de mama en la región 17q21. Las mutaciones de dicho gen (transmitido de forma autosómica dominante) se asocian a un riesgo de hasta 85% de desarrollo de cáncer de mama a lo largo de la vida, sobre todo a edades tempranas. Asimismo, también la posibilidad de padecer cáncer de ovario aumenta si esta mutación está presente.

En ese mismo año se localizó y clonó el BRCA2, en el cromosoma 13 (transmisión autosómica dominante). El riesgo estimado de padecer cáncer de mama es similar para las pacientes que presentan mutaciones en este gen, si bien la posibilidad de padecer cáncer de ovario es menor. **[11-13]**

Las proteínas derivadas de la transcripción de los genes BRCA1 y BRCA2 ejercen una función inhibitoria de las señales desencadenadas por las hormonas esteroideas en el epitelio mamario; hipotéticamente, una alteración en la función de dichas proteínas provocaría una falta de control sobre los caminos de señalización celular derivados de la activación estrogénica, predisponiendo a la carcinogénesis. **[14]**

Las pacientes con los síndromes de Li-Fraumeni, Cowden, Muir-Torre y con la enfermedad ataxia-telangiectasia, tienen también un aumento de la susceptibilidad al

cáncer de mama; este aumento está relacionado con un deterioro en la capacidad de reparación del DNA a nivel de todos los tejidos, no tratándose por tanto de síndromes específicos de cáncer de mama.

1.2.3.3. Factores hormonales.

Los estudios epidemiológicos a gran escala sugieren que a mayor tiempo de exposición a estrógenos, mayor riesgo de cáncer de mama. Una menarquia temprana, una menopausia tardía, la nuliparidad y una edad tardía al primer embarazo se relacionan con un aumento en la incidencia. [15,16] La intensidad de exposición juega un papel importante: en mujeres posmenopáusicas, cuyos estrógenos provienen fundamentalmente de la aromatización en tejidos periféricos de los andrógenos suprarrenales, la obesidad se asocia a un incremento del riesgo (la aromatización de andrógenos se produce sobre todo en el tejido graso). [17] También el uso de terapia hormonal sustitutiva aumenta el riesgo. [18] Estas dos últimas situaciones están vinculadas a un aumento de la cantidad de estrógenos circulantes. [19]

La incidencia de cáncer de mama se incrementa con la edad. Dicho incremento persiste tras la menopausia, pero a una velocidad 6 veces menor. Esto sugiere la importancia de la función ovárica (en cuanto a síntesis de estrógenos) en el riesgo de cáncer de mama. [20]

1.2.3.4. Estilo de vida y factores dietéticos.

Los estudios desprendidos del análisis de las poblaciones inmigrantes (en las que se observa un cambio de la incidencia del cáncer de mama hacia la incidencia del país al que emigran con el paso del tiempo) hicieron sospechar una relación con factores dietéticos. [21, 22] Si bien el consumo de grasa per capita se correlaciona con incidencia

y mortalidad por cáncer de mama, el mayor estudio al respecto, que combina los datos de 7 cohortes prospectivas sumando un total de 337.819 mujeres, fracasó a la hora de hallar una diferencia en la incidencia de cáncer de mama entre el grupo del quintil superior del consumo de grasa con respecto al grupo del quintil inferior. [23]

La práctica de ejercicio físico regular parece proteger del cáncer de mama en mujeres premenopáusicas debido a dos razones: a la pérdida de grasa periférica y al aumento de ciclos anovulatorios; ambos factores conducen a una menor exposición a estrógenos. [24]

Un gran metaanálisis que estudió la relación del consumo de alcohol con la incidencia de cáncer de mama, halló que el riesgo relativo para las pacientes que consumían 1, 2, o 3 unidades de bebida alcohólica al día era de 1,1, 1,2 y 1,4 respectivamente respecto a las mujeres abstemias. [25] Dicho riesgo parecía disminuir si se acompañaba de ingesta alta de ácido fólico. [26]

Falta evidencia suficiente para afirmar que el consumo de fibras o de vitaminas confiera protección, pero parece que una dieta con alto contenido en frutas y en vegetales puede disminuir el riesgo. [27]

1.2.3.5. Enfermedades benignas de la mama.

Las enfermedades benignas de la mama se dividen en no proliferativas y proliferativas (hiperplasia ductal, adenosis esclerosante, atipia ductal con hiperplasia y carcinoma lobulillar *in situ*). Las primeras no están asociadas a incremento de incidencia de cáncer de mama, mientras que las segundas sí. Si en una biopsia de enfermedad proliferativa no observamos atipias histológicas, el riesgo de cáncer está aumentado 1,5-2, mientras que si lo que observamos es una hiperplasia con atipia, el riesgo relativo es de 5. Para hacerse una idea de lo que estos datos representan, el riesgo

a 15 años de presentar cáncer de mama para una mujer con una biopsia de hiperplasia con atipia e historia familiar positiva es del 20%. [28]

1.2.3.6. Factores ambientales.

Se acepta que la exposición a radiaciones ionizantes incrementa el riesgo de cáncer de mama, con un período de latencia de hasta 40 años. Al respecto es muy ilustrativo el estudio de Gervais-Fagnou *et al*, [29] en el que en una cohorte de 427 mujeres que habían recibido irradiación supradiafragmática como tratamiento de enfermedad de Hodgkin en el pasado mostraban un riesgo relativo de 10,6 para cáncer de mama respecto al esperado para mujeres de su edad sin irradiación previa.

A pesar de lo dicho en los párrafos precedentes, hasta un 50 % de las mujeres no tienen en su historia clínica ningún factor de riesgo identificable más allá del aumento de la edad y el género femenino. [30] Puesto que el 99% de los casos de cáncer de mama tienen lugar en la mujer, el factor “género femenino” no se considera un factor de riesgo.

1.3. Breve recuerdo clínico.

Los nódulos y masas en la mama son detectables en el 90% de los pacientes con cáncer de mama, y constituyen el signo más frecuente en la historia clínica y en la exploración física. La masa típica del cáncer de mama suele ser solitaria, unilateral, sólida, dura, irregular, fija y no dolorosa.

Las descargas espontáneas por el pezón a través de un conducto mamario es el segundo signo más frecuente del cáncer de mama. Tal descarga se produce en aproximadamente el 3% de las mujeres con cáncer de mama, pero el 90% de los casos

de descarga por el pezón traducen patología benigna. En general, descargas lechosas, purulentas o pegajosas no suelen corresponder a patología tumoral, pero las descargas serosas, serosanguinolentas, hemorrágicas o acuosas han de ser investigadas.

Otras manifestaciones de presentación incluyen cambios cutáneos, linfadenopatías axilares o signos locales de enfermedad avanzada o diseminada.

En general, en la enfermedad avanzada, los síntomas se deberán al deterioro orgánico en el que las metástasis asienten, así como a las manifestaciones de cualquier cáncer avanzado (caquexia, astenia, deterioro del estado general progresivo), muchas de las cuales son difíciles de desligar de aquellas producidas por los tratamientos oncológicos administrados.

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, que crece a velocidades distintas en pacientes diferentes y con frecuencia es una enfermedad sistémica en el momento del diagnóstico inicial (debido a la presencia de micrometástasis diseminadas en otros tejidos, que ocurrirán con mayor o menor probabilidad en función de unos factores que se discutirán más adelante y que hoy por hoy son los pilares de la justificación del tratamiento adyuvante). Hay una serie de evidencias que apoyan esta aseveración: **[31]**

a) Tiempo de duplicación tumoral del cáncer de mama: un tumor de mama de 1 cm contiene aproximadamente 10^9 células y ha realizado 30 de los 40 ciclos replicatorios que tendrán lugar antes de que el paciente fallezca. El tiempo de duplicación de la lesión en el cáncer de mama varía de 25-200 días en las lesiones pequeñas y precoces, pero en la enfermedad avanzada el tiempo de duplicación puede ser superior a los 500 días. Por eso, un tumor de 1 cm puede llevar en la mama de 2 a 17 años de evolución antes de ser diagnosticado. En este tiempo el fenotipo de las células

tumorales no es estático, sino que va ganando agresividad en términos de potencial metastático, inhibición de apoptosis en respuesta a citotóxicos y potencial angiogénico.

b) El pronóstico está influido por marcadores bioquímicos: la presencia de ciertos marcadores moleculares en lesiones aparentemente localizadas y completamente reseccionadas se relaciona con rápidas recaídas a distancia por existencia de enfermedad que está oculta al momento del diagnóstico.

c) Las medidas de tratamiento local tienen un efecto muy limitado en la supervivencia: la supervivencia mediana de pacientes no tratadas es de 2,5 años. Las pacientes tratadas sólo con tratamientos locales (cirugía con o sin radioterapia local) tienen una expectativa de vida mejor que las pacientes que no han recibido ningún tipo de tratamiento, pero continúan muriendo a ritmos considerablemente mayores que controles sanas de la misma edad hasta 20 años después del tratamiento. Cualquiera que sea la causa de muerte, el 75-85% de las pacientes con historia de cáncer de mama presenta evidencia de tumor en la autopsia.

d) La exéresis del tumor primario no altera sustancialmente el riesgo de las metástasis: las metástasis a distancia están presentes en los 2/3 de las pacientes con cáncer de mama en el momento del diagnóstico; las diferentes modalidades de tratamiento local (mastectomía radical, mastectomía radical modificada, mastectomía simple; administración o no de radioterapia) apenas modifican la supervivencia. Las pacientes con metástasis en los ganglios linfáticos axilares tienen una alta tasa de recidiva con metástasis a distancia a pesar de haberse realizado resección completa del tumor.

e) Los ganglios regionales afectados son predictores de enfermedad sistémica, y no barreras para la diseminación tumoral: la exéresis de los ganglios linfáticos axilares en la cirugía no altera la tasa de recurrencias, el desarrollo de metástasis a distancia o las

tasas de supervivencia. Hasta el 50% de todas las pacientes con cuatro o más ganglios linfáticos axilares afectados tendrán evidencia de enfermedad metastásica clínica antes de que transcurran 18 meses.

Desde el análisis de estos datos crudos no podemos llegar al punto de ofrecerle a una paciente en concreto información útil sobre cuál va a ser el curso natural de su enfermedad; el amplio espectro clínico cuyos puntos extremos son el cáncer lobulillar *in situ* y el cáncer metastático con invasión visceral no define más que la heterogeneidad de la enfermedad que nos ocupa; no sólo será importante saber en qué punto se encuentra la paciente en cada momento, sino tener en cuenta una serie de factores pronósticos (factores cuya presencia o ausencia nos indica cuál va a ser el curso de la enfermedad con altas probabilidades) y predictivos (factores cuya presencia o ausencia nos indica a qué tratamientos va a responder o no la enfermedad de una paciente en concreto). Tales factores asociarán dicho espectro clínico a una supervivencia más o menos prolongada.

1.4. Subtipos histológicos del cáncer de mama.

1.4.1. La mama normal.

La mama en reposo está constituida por 6-10 sistemas principales de conductos, cada uno de los cuales está dividido en lobulillos, las unidades funcionales del parénquima mamario. Cada sistema ductal drena a través de una vía excretora independiente o seno lactífero. Las sucesivas ramificaciones de los conductos galactóforos en dirección distal terminan en los conductos terminales.

La areola, el pezón y las desembocaduras de los conductos galactóforos principales están revestidos de epitelio escamoso estratificado. El revestimiento de los conductos mamarios principales se convierte en un epitelio columnar

pseudoestratificado y después en un epitelio cuboidal de dos capas. Por debajo del epitelio de revestimiento, más prominentemente, puede verse una capa baja de células aplanadas: las células mioepiteliales. Dichas células contienen miofilamentos orientados paralelamente al eje largo del conducto. Siguiendo escrupulosamente el contorno de los conductos y conductillos existe una membrana basal. Los lobulillos están incluidos en un estroma laxo, delicado, mixomatoso, que contiene linfocitos dispersos (tejido conectivo intralobulillar), y cada uno de los lobulillos está incluido en un estroma interlobulillar más denso, colágeno, fibroso (figuras 1-3). [32]

1.4.2. Tumores malignos de mama.

En la mama se agrupan tejidos de diferentes estirpes que pueden dar lugar a diferentes tipos de tumores (sarcomas, basaliomas, linfomas,...); sin embargo sólo trataremos los tumores malignos de mama específicos de esta glándula. Existen otros tumores de tipo benigno que no son el objeto de esta revisión (fibroadenoma, tumor filodes y papiloma intraductal) [33]

1.4.2.1. Carcinoma no invasivo (*in situ*).

a) Carcinoma intraductal (o carcinoma ductal *in situ*): (Figura 4) El carcinoma intraductal antaño se consideraba una lesión rara, pero con el aumento del uso de la mamografía que detecta lesiones precoces y pequeñas, hoy en día supone aproximadamente del 20 al 30% de los carcinomas de mama. Está constituido por una población maligna de células que carecen de la capacidad de invadir a través de la membrana basal y que por tanto son incapaces de producir metástasis a distancia. Existen 5 subtipos histológicos: comedocarcinoma, sólido, cribiforme, papilar y micropapilar. (Figura 5)

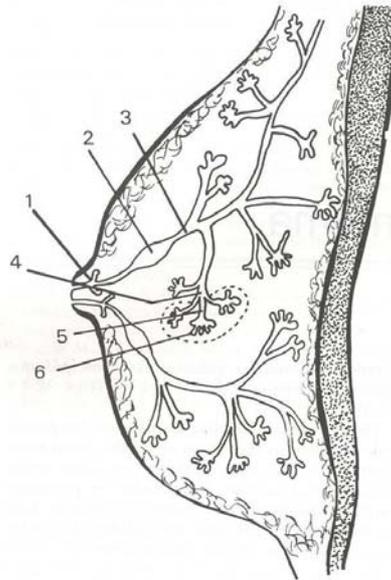


Figura 1: estructura de la mama: 1, conducto galactóforo; 2 y 3: galactóforo de primer orden; 4, galactóforo interlobular; 5, galactóforo intralobular; 6, acinos glandulares (tomada de Gonzalez Merlo, J: Ginecología; 7ª ed).

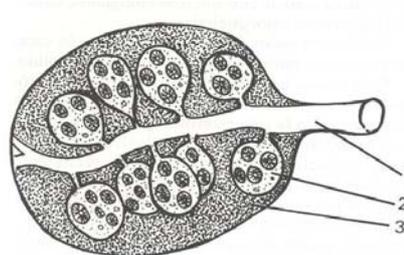


Figura 2: estructura del lóbulo: 1, conducto del lóbulo; 2, lobulillo con acinos glandulares; 3, tejido intersticial (tomada de Gonzalez Merlo, J: Ginecología; 7ª ed).

A excepción del comedocarcinoma, estas lesiones son habitualmente ocultas clínicamente y se detectan como hallazgo casual en biopsias de mama o por mamografía. El comedocarcinoma se caracteriza por células de alto grado de malignidad en proliferación rápida. Se piensa que fundamentalmente el

comedocarcinoma, y, con menos probabilidad los subtipos restantes, son precursores del cáncer infiltrante.

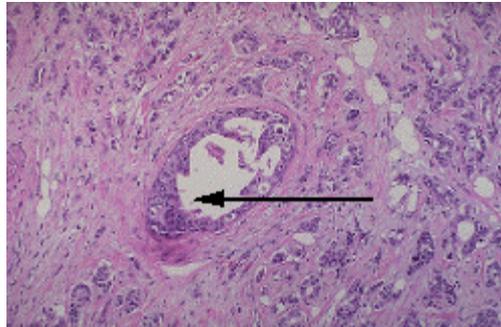


Figura 3: tejido mamario normal. La flecha negra señala un ducto cortado transversalmente (tomada de “The internet pathology laboratory for medical education”; www.pubmedcentral.nih.gov)

b) Carcinoma Lobulillar *in situ*: Se trata de una lesión histológicamente única que se manifiesta por una proliferación, en uno o más conductos terminales, acinos o ambos a la vez, de células laxamente cohesionadas, a veces algo mayores de lo normal, con raras mitosis y núcleos ovalados o redondos con nucléolos pequeños. (Figura 6)

c) Evolución de las lesiones in situ a carcinomas invasivos.

El carcinoma intraductal es un claro precursor del carcinoma invasivo; si bien los pasos iniciales de los caminos que llevan a la tumorigénesis mamaria todavía no están definidos, parece que prácticamente todos los cánceres de mama invasivos proceden de un carcinoma intraductal. La presencia de cambios cromosómicos compartidos tanto en el carcinoma intraductal como en el tejido maligno adyacente invasivo demuestra su relación clonal evolutiva. [35, 35]

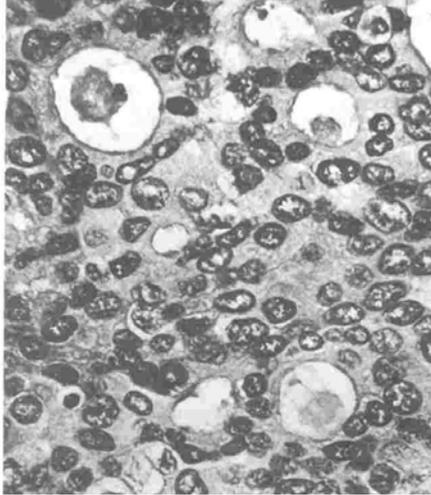


Figura 4: carcinoma intraductal con patrón cribiforme (tomada de Robbins S: Patología estructural y funcional, 5ª edición).

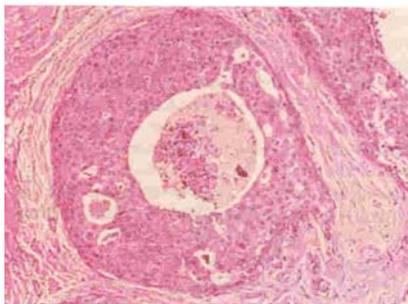


Figura 5: comedocarcinoma. Se observa la proliferación intraductal de células malignas con necrosis central (tomada de Robbins S: Patología estructural y funcional, 5ª edición).

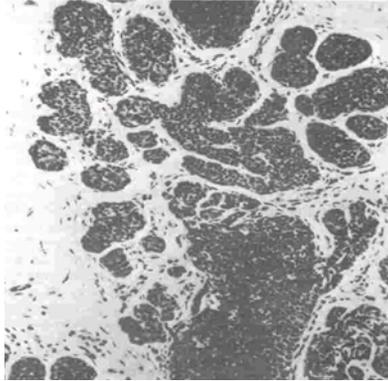


Figura 6: carcinoma lobulillar *in situ*. Se observa gran proliferación celular tumoral bien diferenciada en conductos terminales (tomada de Robbins S: Patología estructural y funcional, 5ª edición).

Existen múltiples diferencias entre el tejido normal o las lesiones benignas y el carcinoma intraductal; tienen lugar imbalances cromosómicos, con pérdida o ganancia de múltiples *loci*, a medida que las lesiones hiperplásicas progresan hacia la invasividad. La pérdida de heterocigosidad se aprecia en un 70% de los tumores intraductales de alto grado, comparado con un 35% de hiperplasias con atipia o un 0% de las muestras de tejido normal. [36] Se han identificado marcadores moleculares relacionados con la tumorigénesis mamaria: el receptor de estrógenos está expresado en un 70% de los carcinomas intraductales; el proto-oncogén *Her2/neu* en el 50%, pero no en las hiperplasias atípicas o en el tejido normal. [37] El gen supresor de tumores p-53 está mutado hasta en el 25% de los casos, pero muy raramente se encuentra mutado en tejido normal o en lesiones benignas. [38] La frecuencia con la que estos marcadores moleculares están expresados, en general refleja su traducción ulterior en carcinomas invasivos. Los cambios más dramáticos en los patrones de expresión génica ocurren durante la transición de tejido normal a carcinoma intraductal,

mientras que el perfil de expresión génica del carcinoma intraductal es muy similar al del carcinoma invasivo. [39] La historia natural de los carcinomas intraductales de grado bajo y medio sin tratar desemboca a los 10 años hasta en un 60% de los casos en un diagnóstico de cáncer invasivo en la mama afecta. No está clara la historia natural de los carcinomas intraductales de alto grado, porque en general se resecan quirúrgicamente y por tanto el seguimiento de dicha lesión se pierde. [40]

Sin embargo, el carcinoma lobulillar *in situ* tiene un comportamiento diferente. Su tasa de proliferación es baja; en general expresa siempre el receptor de estrógenos y prácticamente nunca expresa el HER2/neu o la proteína p53-mutada. [38] Es difícil establecer para el patólogo la línea divisoria entre el carcinoma lobulillar *in situ* y la hiperplasia lobulillar. El riesgo de carcinoma invasivo tras un carcinoma lobulillar *in situ* está aumentado de 7 a 10 veces, pero estos carcinomas invasivos son en general ductales, y se diagnostican tanto en la mama afecta como en la contralateral, y en cualquier lugar de la mama (a diferencia de los diagnosticados tras el carcinoma intraductal, que suelen diagnosticarse en el mismo lugar). [41] Las observaciones de que la mayoría de las pacientes con carcinoma lobulillar *in situ* no desarrollan carcinoma infiltrante, de que el riesgo de cáncer es bilateral y de que la mayoría de los cánceres desarrollados son ductales hace pensar que el carcinoma lobulillar *in situ* es una enfermedad difusa de la mama, un factor de riesgo del cáncer ductal infiltrante, más que una lesión precursora en sí misma.

1.4.2.2. Tumores invasivos de la mama.

La tabla 1 muestra las frecuencias relativas de los distintos subtipos histológicos de tumores de mama con componente invasivo. [42]

-Carcinoma ductal infiltrante: (Figuras 7 y 8) Es el tipo más frecuente de todos los cánceres mamarios. La mayoría exhibe un llamativo aumento de un estroma denso de tejido fibroso, que da al tumor una alta consistencia (“carcinoma escirro”). Histológicamente consiste en células malignas de revestimiento de los conductos dispuestas en cordones, nidos sólidos de células, túmulos, glándulas y masas anastomosadas, o mezclas de estos patrones. Las células invaden claramente el estroma de tejido conectivo. Suele observarse la invasión de espacios perivasculares y perineurales, así como de vasos sanguíneos y linfáticos. En función de dos parámetros (grado de atipia nuclear y diferenciación histológica definida por la formación de túbulos), se clasifican en bien diferenciados, moderadamente y pobremente diferenciados (Grado 1-2-3 respectivamente).

-Las figuras 9 a 12 muestran otros subtipos histológicos menos frecuentes (medular, coloide, enfermedad de Paget de la mama, lobulillar invasivo). Salvo el carcinoma lobulillar, es raro que el resto de los subtipos se presenten aisladamente.

Tabla 1. Incidencia de los diferentes subtipos histológicos de cáncer de mama

Incidencia de los tipos histológicos del cáncer de mama invasor	Porcentaje
Carcinoma ductal invasor	
Puro	52,6%
Combinado con otros tipos	22,0%
Medular	6,2%
Coloide	2,4%
Enfermedad de Pager	2,3%
Otros tipos puros	2,0%
Otros tipos combinados	1,6%
Carcinoma lobulillar infiltrante	4,9%
Carcinoma ductal y lobulillar combinado	6,0%

Figura 7.

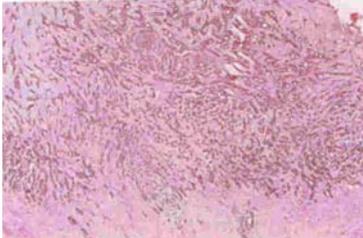


Figura 8.

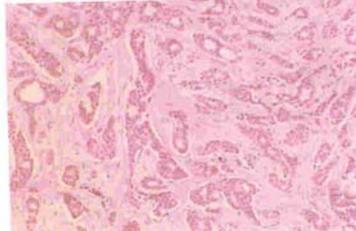


Figura 9.

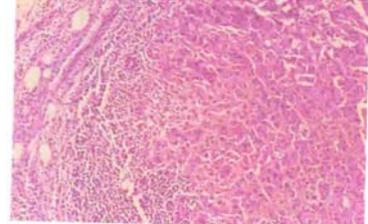


Figura 7: carcinoma intraductal. **Figura 8:** carcinoma ductal infiltrante a gran aumento en el que se observan las células tumorales en cordones y tómulos infiltrando el estroma. **Figura 9:** Carcinoma medular con infiltrado linfoide en el que se aprecia cómo los linfocitos infiltran las células epiteliales sincitiales (tomadas de Robbins S: Patología estructural y funcional, 5ª edición).

Figura 10.

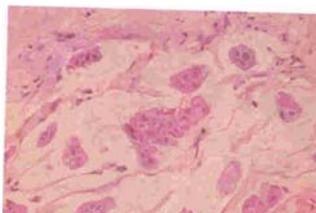


Figura 11.

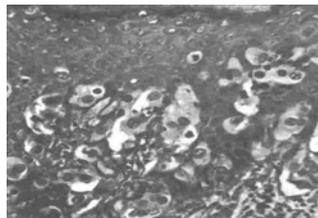


Figura 12.

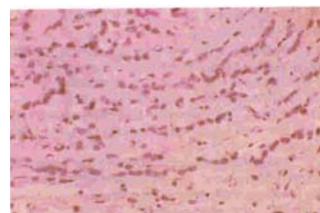


Figura 10: carcinoma coloide, en el que se aprecian los lagos de mucina que se tiñen tenuemente y en los que flotan pequeños islotes de células tumorales. **Figura 11:** enfermedad de Paget (forma de carcinoma ductal que crece por los conductos principales hacia la piel): se observa cómo las células tumorales infiltran la epidermis. **Figura 12:** carcinoma de tipo lobulillar infiltrante. Las células se distribuyen en filas en un denso estroma fibroso (tomada de Robbins S: Patología estructural y funcional, 5ª edición).

2. Biología del crecimiento tumoral.

La base de nuestro estudio es el análisis de la presencia de micrometástasis a distancia que no son evidentes clínicamente. Antes de describir los detalles técnicos, es conveniente revisar una serie de aspectos básicos de biología tumoral que nos permitirán comprender cómo tiene lugar el desarrollo de dichas micrometástasis.

La historia natural de los tumores malignos puede dividirse con fines académicos en cuatro fases: transformación, crecimiento, invasión local y metástasis a distancia. La transformación engloba los mecanismos genéticos por los que una célula benigna pasa a ser maligna; es objeto de revisión de temas de patología general y no entraremos en ello.

El crecimiento de una masa tumoral por los descendientes clonales de células transformadas es un procedimiento complejo influido por una serie de factores (básicamente 3: cinética del crecimiento de las células tumorales, angiogénesis tumoral y progresión/heterogeneidad tumoral); algunos como el tiempo de duplicación de las células tumorales son intrínsecos de las mismas, mientras que otros como la angiogénesis representan respuestas del portador suscitadas por las células tumorales o por sus productos de secreción.

2.1. Cinética del crecimiento de las células tumorales.

Con una aproximación simplista podría pensarse que desde una sola célula tumoral (10 micras de diámetro) a la mínima masa clínicamente detectable (1 gramo: 10^9 células) se llega con 30 ciclos de replicación, y que con 10 ciclos más se llega a un tumor de 1 kilogramo de peso y 10^{12} células, que es la máxima masa aproximadamente compatible con la vida. Esta aproximación presupone que no existe pérdida celular en el

compartimiento replicativo del tumor, y dicha asunción no se corresponde con la realidad. [43]

El ciclo celular de los tumores tiene las mismas cinco fases (G_0 , G_1 , S, G_2 y M) que el de las células normales. Medidas respecto al tiempo de duplicación indican que el tiempo del ciclo celular para células tumorales es igual o más largo que el de las células normales correspondientes. La proporción de células del tumor que se encuentran en replicación en un momento dado se denomina “fracción de crecimiento”. Se sabe que en fases tempranas y microscópicas del tumor, la inmensa mayoría de las células están en replicación activa. A medida que el tumor crece, un número cada vez mayor de células abandona el compartimiento replicativo debido a que se desprenden, carecen de nutrientes o a que permanecen quiescentes en fase G_0 . De hecho, la mayor parte de las células en el interior de los cánceres permanecen en la fase G_0 o G_1 . En el momento en el que el tumor es clínicamente detectable, la mayoría de las células no forman parte del compartimiento replicativo; en los tumores de crecimiento más rápido, la fracción de crecimiento es aproximadamente del 20%. De este modo, el crecimiento progresivo es determinado por el predominio de producción celular sobre la pérdida. La tasa de crecimiento tumoral depende de la fracción de crecimiento y del grado de desequilibrio entre la producción y la pérdida celular. Algunas leucemias y algunos tumores sólidos como el carcinoma microcítico de pulmón tienen una tasa de crecimiento relativamente elevada y por ello su curso clínico es rápido. Sin embargo, los tumores más frecuentes como el cáncer de mama, colon o pulmón no microcítico tienen bajas fracciones de crecimiento y en ellos la producción celular excede a la pérdida solo en un 10%, por lo que su crecimiento es más lento. [43] Lo más importante es que la fracción de crecimiento de las células tumorales ejerce un efecto profundo sobre su sensibilidad a la quimioterapia anticancerosa. Debido a que la mayoría de los agentes antitumorales

actúan sobre las células que están sintetizando activamente DNA, no es difícil imaginar que un tumor que contiene sólo una fracción replicativa del 5% crecerá lentamente, pero será relativamente refractario al tratamiento con fármacos que matan a la célula cuando se halla en división. Paradójicamente, tumores mucho más agresivos (como las leucemias y algunos linfomas), son más sencillos de curar por su alta fracción replicativa. Asimismo, cuanto más pequeño sea el tumor, más rápido es su crecimiento, por lo que en estadios en los que no hay evidencia clínica de enfermedad (durante la adyuvancia), es posible que con las dosis convencionales de quimioterápicos si bien consigamos una importante tasa de reducción celular entre ciclo y ciclo, también en ese intervalo de tiempo se restablezca la masa tumoral inicial, con lo que podría obtenerse un beneficio del aumento de la dosis total de fármacos para evitar este segundo efecto. Esta es la base del tratamiento quimioterápico a altas dosis para el cáncer de mama de alto riesgo (figura 13). [44, 45]

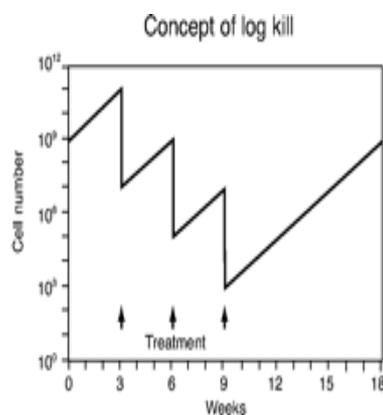


Figura 13: modelo teórico de respuesta a citotóxicos en el estado adyuvante. El eje de ordenadas muestra la carga tumoral en escala logarítmica; el eje de abscisas supone la aplicación periódica de tratamientos cada 3 semanas. Cada una de las aplicaciones produce una muerte celular en escala logarítmica en función de la fracción replicativa de dicho tumor microscópico. Sin embargo, dada la rápida velocidad de crecimiento, en las 3 semanas necesarias para la recuperación de la toxicidad, el tumor vuelve a su tamaño original. Esta es la base del aumento de la dosis de fármacos con intención curativa (tomada de De Vita, V: Principles and Practice of Oncology, 6ª edición)

2.2. Angiogénesis tumoral.

De máxima importancia como modificador del crecimiento tumoral es el aporte sanguíneo. Folkman *et al* [46] han demostrado que las células tumorales pueden crecer en cultivo en ausencia de vascularización tan solo hasta formar nódulos de 1 o 2 milímetros de diámetro. Sin embargo, si dichos nódulos se implantan después en tejido, se reanuda el crecimiento. Existen observaciones paralelas *in vivo* que apoyan el hecho de que el tumor es esencialmente dependiente de la vascularización: la necrosis es un hecho frecuente en los tumores humanos; los exámenes histológicos demuestran que las regiones necróticas son paralelas a los vasos sanguíneos y que suelen estar separadas de ellos por una zona de 1-2 milímetros de células viables. Además, sin la presencia de vasos intratumorales, el fenómeno de la metástasis es imposible. Son interesantes al respecto los estudios de Macchiarini *et al* [47] y Horak *et al* [48], que correlacionan la probabilidad de metástasis con la intensidad de la vascularización de los tumores primarios, de pulmón y mama respectivamente.

2.3. Progresión y heterogeneidad tumoral.

Con el transcurso del tiempo muchos tumores se vuelven más agresivos y adquieren un potencial maligno mayor. Este fenómeno se conoce como progresión tumoral. Dicha progresión tiene lugar de forma escalonada. Está relacionada con la aparición secuencial de subpoblaciones de células que difieren en varios atributos fenotípicos, como capacidad de invasión, tasa de crecimiento, capacidad de metastatizar, respuesta a hormonas y sensibilidad a fármacos antineoplásicos. Por tanto a pesar del hecho de que la mayoría de los tumores son de origen monoclonal, para el momento en que son clínicamente evidentes, las células que los componen son extremadamente heterogéneas. La causa última de dicha progresión son las mutaciones

acumuladas de forma independiente en las diferentes células con la replicación progresiva, generando así subclones de diferentes características. Las células transformadas son genéticamente inestables y tienen alterados sus mecanismos de reparación; así, de los errores acumulados en las sucesivas replications, aparecerán células con diferentes mutaciones que generarán unos u otros fenotipos; la supervivencia de los mismos está determinada por dichos fenotipos: por ejemplo, si se genera un subclón muy antigénico, será destruido por las defensas del huésped; por otra parte, un subclón que no precisase de factores de crecimiento para multiplicarse, es más probable que se perpetúe. [49]

2.4. Mecanismos de invasión y metástasis.

La invasión y metástasis son la causa principal de morbi-mortalidad relacionada con el cáncer. Para que las células tumorales se escindan de la masa primaria, penetren en los vasos sanguíneos y linfáticos y crezcan secundariamente en un lugar distante deben de seguir una serie de pasos que se resumen en la figura 14. Cada uno de dichos pasos está sometido a múltiples influencias, y por ello en cualquiera de los puntos la célula tumoral puede morir. Estudios en ratones revelan que si bien diariamente se desprenden millones de células, solo se producen unas pocas metástasis. No todas las células que se encuentren en un momento dado circulando por el torrente sanguíneo o linfático tienen potencial metastático y por ende relevancia clínica. La base de la ineficiencia del proceso es la propia heterogeneidad del tumor; solo unos pocos subclones de células poseen la capacidad adecuada para completar todos los pasos necesarios. [50]

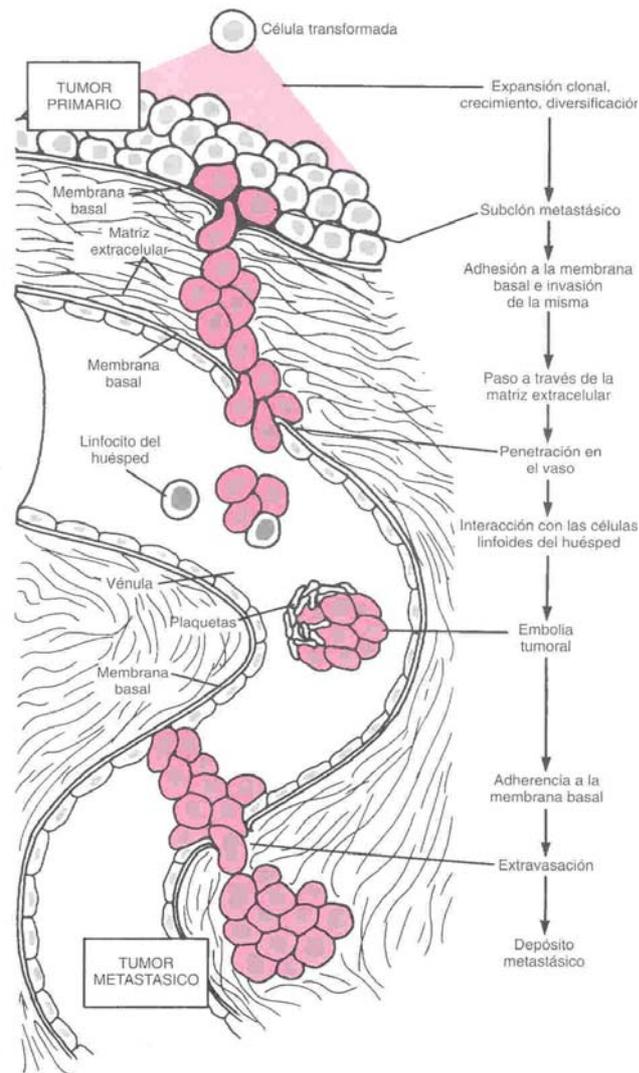


Figura 14: cascada de eventos del fenómeno metastático representado de forma esquemática (tomada de Robbins S: Patología estructural y funcional, 5ª edición).

La secuencia puede dividirse en dos pasos: invasión de la matriz extracelular y diseminación vascular y alojamiento de las células tumorales. Los tejidos normales están organizados en una serie de compartimientos separados entre sí por dos tipos de matriz extracelular: membranas basales y tejido conectivo intersticial. Aunque estén organizados de manera diferente, cada uno de los componentes de la matriz extracelular está compuesto por colágenos, glucoproteínas y proteoglicanos. Una célula maligna debe primero romper la membrana basal, atravesar el tejido conectivo intersticial,

posteriormente romper la membrana basal vascular y pasar a la circulación; dicho ciclo ha de repetirse cuando el émbolo de células tumorales se extravasa en un lugar distante. La invasión de la matriz extracelular requiere que las células se desprendan entre sí; seguidamente han de unirse a los componentes de la matriz y degradarlos, y, finalmente, es necesario un proceso de migración.

Las células normales están adheridas entre sí y a sus alrededores mediante diversas moléculas de adhesión; de especial importancia son las cadherinas, una familia de glucoproteínas transmembrana. [51] Las cadherinas epiteliales median la adherencia homotípica en un tejido epitelial, motivando así la constitución homogénea de un tejido; sin embargo, se sabe que en diversos tumores epiteliales como los adenocarcinomas de colon o mama, existe una regulación a la baja de la expresión de dichas cadherinas. Esto facilita el desprendimiento de las células. [52]

Posteriormente las células tumorales han de adherirse a los componentes de la matriz. Existen estudios que corroboran que la fijación de las células tumorales a la laminina y fibronectina de la matriz es importante para la invasión y metástasis. Las células epiteliales normales expresan receptores de alta afinidad para la laminina de la membrana basal, polarizados en una sola superficie celular. Sin embargo, las células tumorales tienen dichos receptores distribuidos por todo el perímetro de la célula. Además parece existir una correlación positiva entre la capacidad de invasión y la densidad de dichos receptores en los cánceres de mama. Asimismo, las células malignas expresan otro tipo de receptores, las integrinas, con capacidad para unirse a otras moléculas de la matriz, como la fibronectina, el colágeno o la vitronectina. [53]

Las células tumorales generan proteasas que degradan activamente los componentes de la matriz, practicando de esa manera los “canales” necesarios para la migración. Existen tres tipos fundamentales de proteasas: serin-proteasas, cisteín-

proteasas y metalo-proteinasas. Diversos trabajos apoyan el papel de la colagenasa IV (metaloproteinasa) en la invasión y metástasis, basado en la observación de que muchos carcinomas poseen altas concentraciones de colagenasa IV, en cuantías mucho más altas que las lesiones adyacentes no invasoras, y que la inhibición de dicha colagenasa en animales de experimentación conducía a una menor tasa de metastatización. [54-58]

La locomoción a través de las zonas degradadas parece que tiene lugar por la secreción de citocinas por parte de la propia célula tumoral. Se ha caracterizado una proteína de 55 kilodaltons que al unirse a receptores específicos de la célula tumoral induce la motilidad. Asimismo, los productos generados por la degradación de la matriz tienen actividad quimiotáctica sobre la célula tumoral. [59, 60]

Una vez en la circulación, las células tumorales son especialmente vulnerables a los mecanismos de defensa del huésped (en general son lisadas por las células NK). Dentro de la circulación las células tienden a agregarse en cúmulos, formados por células tumorales y elementos formes de la sangre (la adherencia a plaquetas parece aumentar la probabilidad de supervivencia de los émbolos y la adhesividad a tejidos distantes). La detención y extravasación de émbolos tumorales en lugares distantes implica la adherencia al endotelio, seguida de la salida a través de la membrana basal. En este proceso están implicadas moléculas de adhesión y enzimas proteolíticas. Es de especial interés la molécula CD44, que media la migración de linfocitos T. Estudios recientes revelan que los tumores expresan variantes de dicha molécula con capacidad para adherirse al endotelio y que dicha expresión capacita a las células tumorales para la diseminación extravascular. [59, 61, 62]

Como ya detallaremos, nuestro propósito es el analizar el impacto pronóstico de la presencia de células tumorales diseminadas en sangre periférica tras el tratamiento adyuvante, cuando no hay evidencia clínica de metástasis.

3. Factores de supervivencia y progresión de la célula tumoral mamaria

Es esencial revisar la importancia de los factores de crecimiento y las hormonas esteroideas relacionadas con la progresión y crecimiento del cáncer de mama pues constituyen los factores pronósticos más importantes del cáncer de mama localizado (además del sistema TNM).

3.1. Receptores esteroideos.

3.1.1. Conceptos básicos.

Los estrógenos y progestágenos son hormonas esteroideas implicadas en la fisiopatología de múltiples aspectos de la patología de la glándula mamaria. Ambos tipos de hormonas intervienen conjuntamente en el crecimiento, diferenciación y supervivencia del epitelio mamario. [63] Son de crucial importancia en el desarrollo de las neoplasias mamarias durante los años reproductivos (desde la menarquia a la menopausia); tras la menopausia, la actividad de las aromatasas periféricas transforma los andrógenos suprarrenales en estrógenos, suministrando estímulo hormonal tejido mamario. Se observa en tejido maligno no invasivo una concentración de receptores esteroideos unas 15 veces mayor a la del tejido normal. Su activación se ha relacionado fundamentalmente con un aumento de la replicación celular (no así en potencial metastatizante), y se cree que el aumento de la expresión de receptores esteroideos es un evento clave e inicial en la tumorigénesis mamaria. [64] El tejido mamario que sobreexpresa el receptor de estrógenos muestra una tasa de malignización 6,5 veces mayor que el tejido con una expresión normal. [65]

Los estrógenos y los progestágenos actúan a través de los receptores nucleares denominados ER y PR respectivamente. Ambos receptores se componen de 2 subunidades proteicas denominadas α y β ; el ER puede existir en forma homodimérica o heterodimérica, mientras que el PR solo existe en forma heterodimérica. [66] Los receptores esteroideos están asociados a otras proteínas, denominadas coactivadoras (puesto que intervienen en la afinidad con la que una vez activados por su ligando esteroideo dichos receptores presentan por unirse (y por ende a activar su transcripción) a una secuencia u otra de DNA), tales como CBP/p300, SRC-1, TIF2, AIB-1, N-CoR y SMRT. Dichas proteínas tienen la función de acetilación-desacetilación de histonas; este proceso es clave para permitir el acceso de los receptores esteroideos a las secuencias diana de DNA cuya transcripción va a ser activada. Múltiples factores intervienen en la determinación de cuáles van a ser los genes diana cuya transcripción va a ser activada por los receptores esteroideos: las ciclinas dependientes de kinasas (reguladores del ciclo celular) o la actividad de caminos de señalización dependientes de factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor*, EGF) o el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (*Insulin-like growth factor 1*, IGF-1), modulan la actividad de los receptores esteroideos, mediante la fosforilación de los mismos (la fosforilación en unos u otros aminoácidos del receptor esteroideo determina un cambio conformacional determinado que afectará a la especificidad de dicho receptor por activar una u otra secuencia de DNA). [67-69] Por otra parte, los receptores esteroideos adoptan una conformación tridimensional ligeramente diferente en función de qué ligando esteroideo se les haya unido, modificando también la afinidad. [70] Así pues, la complejidad de los factores que influyen en que la actividad hormonal desemboque en la transcripción de unos u otros genes, es enorme. Los desbalances entre dichos factores pueden dar lugar a la malignización de la célula.

Los esteroides influyen en la transcripción de genes reguladores del ciclo celular conocidos como protooncogenes nucleares, como el c-MYC y el EGFR tipo II (HER-2). [71, 72] Las protooncoproteínas derivadas de la traducción de dichos protooncogenes nucleares, así como otras proteínas reguladoras de ciclo celular como las ciclinas dependientes de kinasa, representan puntos de regulación convergentes de los caminos de señalización celular derivados de la activación por esteroides y por factores de crecimiento.

3.1.2. Relevancia clínica.

Desde el trabajo de Barbara Mason *et al* [73] en 1983 en el que se determinó la expresión de PR y ER de todos los cánceres de mama incidentes entre 1976 y 1980 de la ciudad de Auckland (1.136) se acepta la importancia clínica de la positividad de la expresión de ER y PR; en este estudio se constató que cuando ambos receptores eran positivos, existía una supervivencia significativamente mayor que cuando eran negativos; dicho efecto se probaba en ausencia de los tratamientos hormonales existentes hoy en día para bloquear la actividad replicativa inducida por esteroides femeninos. Estos resultados han sido consistentemente y repetidamente confrontados. Hoy por hoy se acepta como factor pronóstico molecular de importancia en enfermedad localizada; en enfermedad avanzada los datos son más controvertidos; si bien la actividad de estos receptores se ha relacionado con actividad replicativa, no está tan claro que posean actividad facilitadora de producción de metástasis. Así, según Hilsenbeck *et al* [74] y Costa *et al* [75], a los 5 años tras el diagnóstico del cáncer de mama la importancia pronóstica derivada de la expresión de ER y PR se pierde (en parte porque la replicación tiende a volverse hormonoindependiente con el avance de la enfermedad) Sin embargo, Chang *et al* [76] publicaron recientemente un análisis

retrospectivo con 346 pacientes en el que estudiaron la influencia de ciertos datos clínicopatológicos del tumor primario en el desarrollo de la enfermedad una vez que se desarrollan las metástasis; curiosamente encontraron asociación positiva entre la expresión del PR (y no del ER) en el tumor primario con una evolución más benigna en la enfermedad metastásica.

Sin embargo, lo que está muy claro hoy en día es el beneficio que se obtiene en todas aquellas pacientes con receptores positivos merced al bloqueo hormonal con los diferentes agentes disponibles. El meta-análisis decisivo fue el publicado en 1998 por el Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, en el que se analizan 36.689 pacientes incluidas en 55 ensayos clínicos. En estos ensayos se aleatorizaba el uso de tamoxifeno adyuvante (durante diferentes períodos de tiempo según que estudio; desde 1 año hasta 5 años) frente a la ausencia de tamoxifeno, en mujeres con cáncer de mama localizado con o sin ganglios positivos. Se encontró un beneficio global consistente determinado por una reducción de la *Odds Ratio* (OR) de recaída del 40% y una reducción de la OR de muerte por cáncer de mama del 23%. El beneficio se mantenía, en diferentes porcentajes, en los diferentes subgrupos analizados determinados por estado hormonal, tipo de quimioterapia recibida, aplicación o no de radioterapia, edad y afectación axilar. [77] En los años posteriores y hasta la actualidad ha habido un gran número de publicaciones que no es el objeto de este trabajo analizar, pero que atañen a estudios randomizados de diferente duración de terapias hormonales y a la comparación de distintos agentes entre sí, tanto en enfermedad localizada como avanzada. Podría considerarse estándar la administración de 5 años de tamoxifeno con o sin bloqueo hipofisario en función del riesgo en mujeres premenopáusicas con cáncer localizado, siendo posiblemente el anastrozol el fármaco más adecuado hoy por hoy en las postmenopáusicas. [78-80]

3.2. Receptores de factores de crecimiento.

Si bien existen investigaciones respecto a la importancia pronóstica de factores de crecimiento como el IGF o el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), el único con importancia probada hoy día es el HER-2.

3.2.1. Receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 2 (HER-2)

Existen diversos mecanismos moleculares a nivel celular que pueden funcionar como oncogénicos. Sin entrar en detalle en ellos, diversos oncogenes codifican para receptores mutados de factores de crecimiento, con actividad tirosín-quinasa cuya activación por ligandos (conocidos para unos receptores y desconocidos para otros) desencadena la activación de las vías de señalización celular que llevan a la proliferación descontrolada. La mutación más común es la delección del dominio extracelular; en otras ocasiones se observan mutaciones puntuales que confieren la propiedad de estar activados de modo constitutivo. Con menos frecuencia se deleciona el extremo carboxi terminal de dichos receptores y así se elimina una secuencia reguladora negativa de la actividad del receptor.

Sin embargo para el oncogén de más relevancia identificado en el cáncer de mama en los últimos años, el mecanismo por el que tiene lugar la oncogénesis es por un aumento de la expresión del receptor no mutado; el subsiguiente incremento de la actividad tirosín-quinasa induce transformación celular. Hablamos del oncogén HER-2; se trata de una proteína de membrana que corresponde al receptor tipo 2 (de 4 descritos hasta la actualidad) del factor de crecimiento epidérmico. La amplificación del gen del HER-2 se encuentra en un 30 % de los cánceres de mama humanos y se correlaciona con más incidencia de metástasis en los ganglios regionales, grado histológico más

agresivo y presencia de estadios más avanzados al diagnóstico. Se relaciona con resistencia a diversos agentes quimioterápicos y hormonales. Los análisis multivariantes apoyan que su expresión ejerce una influencia (negativa) independiente del resto de los factores pronósticos en la supervivencia en pacientes con ganglios positivos respecto a la no expresión.

El gen *erbB-2* humano codifica una proteína de 1255 aminoácidos perteneciente a la familia de los receptores tirosín-quinasa (RTK). El producto del *erbB-2* es un miembro del subgrupo de los receptores del factor de crecimiento epidérmico (Epidermal Growth Factor Receptor [EGFR]) dentro de la superfamilia RTK, que incluye tanto al EGFR (codificado por el *erbB-1*), como a las proteínas codificadas por los genes *erbB-2*, *erbB-3* y *erbB-4*. Los cuatro genes codifican una proteína con actividad tirosín-kinasa con dominios de membrana sencillos y dos dominios celulares ricos en cisteínas. Los cuatro receptores se coexpresan en diferentes combinaciones y se pueden encontrar en una gran variedad de tejidos, **excepto el tejido hematopoyético.**

[81-90]

Se conocen 2 familias de proteínas que activan el HER-2-NEU: los agonistas EGF (EGF, TGF- α , Amfíregulina, Betacelulina y el factor de crecimiento de unión a heparina) y las neuregulinas (proteínas codificadas por un solo gen de 13 exones que por medio de splicing alternativo su transcripción da lugar a 12 neuregulinas distintas). **[91-95]** Una vez activado, y dado que los mismos activadores activan también a EGFR como *erbB3* y *erbB4*, dichos receptores forman heterodímeros con HER-2 y así comienza la cascada de señalización intracelular.

Hay 6 posibles formas de activación del HER-2-NEU (fig 15). La primera de ellas es fisiológica, mientras que las otras 5 comportan ganancia de función. La

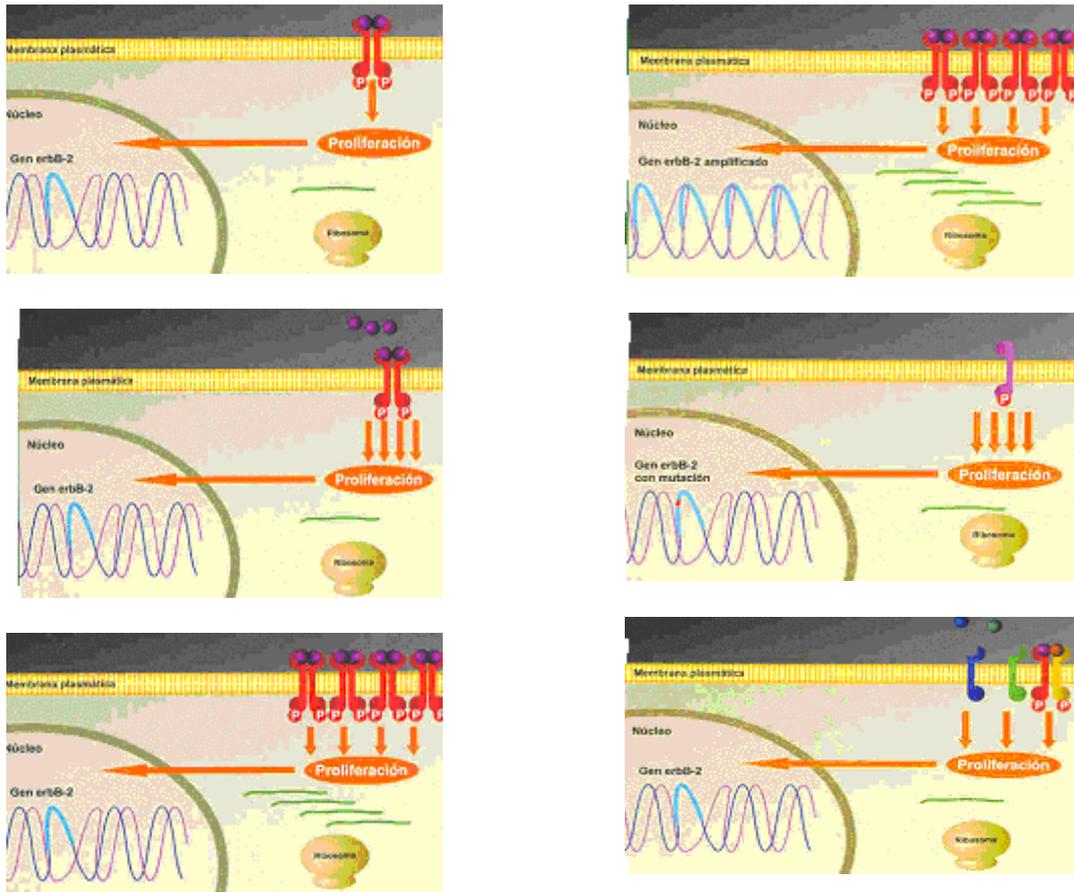


Figura 15: De arriba abajo y de izquierda a derecha. En la primera se aprecia el funcionamiento normal del receptor (transcripción del gen erbB-2, traducción del mRNA y síntesis del receptor. Unión del ligando y posterior efecto). En el segundo dibujo se observa la activación por exceso de ligando del receptor: el exceso de ligando lleva a una proliferación anómala. En la tercera representación, se muestra la activación por sobreexpresión del receptor erbB-2; el exceso de número de receptores amplifica, al activarse, la proliferación. En el cuarto supuesto, se observa un aumento del número de copias del gen erbB-2; este incremento provoca también un aumento del número de receptores. La quinta posibilidad de activación radica en una mutación del propio receptor (adquirida) que comporta que su actividad sea continua. El último caso, más complejo, es un ejemplo de transmodulación: otros receptores fosforilan y por tanto activan el receptor erbB-2 tras formar heterodímeros con él (tomada de García-Foncillas J: *Biología Molecular del Cáncer*, 1ª edición).

La unión de los ligandos a los receptores con actividad tirosín-quinasa produce, en general, la dimerización del receptor. [96] Seguidamente se inicia la actividad tirosín-quinasa del receptor, fosforilando sitios tirosina del propio receptor; de esta

manera se permite la unión estable a las moléculas efectoras que ponen en marcha los caminos de señalización celular; la unión de ligandos al HER-2 pone en marcha al menos 5 vías de señalización celular independientes la mayoría de las cuales pueden iniciar la activación de genes en el núcleo (Vías del PLC, fosfatidil inositol-3-quinasa, STAT-91, RAS-RAF-MAP y SRC) [97, 98]

Mientras que HER-2-NEU se expresa a concentraciones bajas en diversas células normales, en varios cánceres se sobreexpresa. En general este hecho está causado por amplificación genética o un incremento del número de genes *erbB-2* en el núcleo. Esta sobreexpresión desempeña un papel en la progresión del tumor, produciendo títulos elevados de crecimiento celular y transformación oncogénica.

A nivel práctico, la significación del HER-2-NEU en el cáncer de mama es múltiple: el cáncer de mama evoluciona desde la lesión premaligna no invasiva (carcinoma *in situ*) hasta el carcinoma metastático, pasando por los estadios localizados. Es posible encontrar la sobreexpresión del *erbB-2* en todos los estadios del cáncer de mama, pero no se ha encontrado en lesiones benignas de la mama; esto sugiere que el gen no se amplifica antes de un verdadero estado maligno. [37] La sobreexpresión se mantiene en lesiones metastáticas, sugiriendo una función continuada del HER-2. [99] Hay un trabajo con gran implicación clínica en este aspecto, de Niehans *et al* [100]; en él analizaron en autopsia con inmunohistoquímica la expresión de esta oncoproteína; el trabajo está realizado con 30 pacientes. De ellos, 18 sobreexpresaban el HER-2 en las metástasis, 15 (80%) de los cuales lo sobreexpresaban en todas. Y, todos los pacientes con sobreexpresión en tumor primario, mostraban sobreexpresión en las metástasis. De hecho, algún trabajo sugiere que la prevalencia de sobreexpresión del HER-2 en lesiones metastáticas a distancia es mucho mayor del 30% presente en las lesiones localizadas en la mama, sugiriendo una selección positiva de las clonas celulares que

sobreexpresan este factor (por ejemplo, el trabajo de Braun *et al* [101] encuentra en médula ósea una prevalencia del 60% de sobreexpresión del HER-2-NEU en las micrometástasis del cáncer de mama en médula ósea) Esto abrió la posibilidad al uso del Herceptin[®], anticuerpo monoclonal humanizado desarrollado contra este factor de membrana. Este anticuerpo monoclonal supone un cambio conceptual en el tratamiento de los tumores sólidos, constituyendo la primera terapia dirigida específicamente contra las células tumorales y sin efecto sobre las células normales con verdadera eficacia clínica. Es frecuente en la práctica clínica observar regresión de todas las lesiones metastásicas al tratar a las pacientes con Herceptin[®], apoyando que la hipótesis de la presencia del HER-2 en todas las metástasis no es sólo un hallazgo de laboratorio, sino que tiene traducción real.

No sólo es importante por ser en si mismo una diana terapéutica; diversos trabajos sugieren que la amplificación del HER-2 está relacionada con la resistencia a tratamientos quimio/hormonales en el cáncer de mama avanzado. El tamoxifeno ha sido hasta hace bien poco el tratamiento de elección de primera línea en cáncer de mama metastático en pacientes no jóvenes, sin metástasis viscerales progresivas o con peligro para la vida. (Los trabajos de Nabholz *et al* [102], Mouridsen *et al* [103] y Paridaens *et al* [104] han mostrado ya la superioridad de los inhibidores de la aromatasa anastrozol, letrozol y exemestano respecto al tamoxifeno). Dos importantes trabajos sugieren que la efectividad del tamoxifeno es inferior en las pacientes que sobreexpresan HER-2. [105-106] Al parecer, los inhibidores de la aromatasa podrían superar esta adversidad (el tamoxifeno actúa directamente bloqueando el receptor de estrógenos; esto conlleva una serie de mecanismos de resistencia mediados por el HER-2; sin embargo, los inhibidores de la aromatasa producen una deprivación de estrógenos, no poniendo en marcha dichos mecanismos) [107]

En lo que respecta a la resistencia a quimioterápicos, la mediación de HER-2 en pacientes con cáncer de mama localizado es más controvertida. En los primeros estudios acerca del impacto pronóstico de la amplificación del HER-2 se sugiere que el pronóstico desfavorable para los pacientes con dicha característica se debe en parte a la resistencia a quimioterápicos, en particular al régimen Ciclofosfamida/Metotrexate/Fluorouracilo (CMF). Dichos estudios datan del año 92. [37, 108] Sin embargo, estudios posteriores no confirmaron diferencias en la respuesta a CMF entre los pacientes con amplificación del gen y los pacientes sin ella. Miles *et al* [109] aleatorizaron 280 pacientes tras el tratamiento locorregional a recibir o no CMF; las pacientes con receptores hormonales negativos que no recibían tratamiento tenían una mediana de supervivencia de 2 años frente a los 11 de las tratadas. Las de receptores positivos mostraban una mediana de supervivencia de 7,5 años en el grupo control, y de 11 en el de tratamiento. Respecto a los subgrupos definidos por HER-2, las pacientes HER-2 negativas pasaban de 7,7 años de mediana a 12,7 con el tratamiento; en las HER-2 positivas el beneficio se mitigaba: de 4,4 se incrementó a 6,6 con CMF; es difícil saber si el menor incremento en el subgrupo HER-2 positivo se debe a un peor curso intrínseco a la enfermedad o a una resistencia al CMF; sin embargo, una limitación básica es que se compara CMF contra abstención, no contra un tipo de tratamiento diferente al que pueden ser más sensibles las pacientes HER-2. En el estudio de Menard *et al* [110], se aleatorizaron 380 pacientes con ganglios afectados a recibir o no CMF. Se observó beneficio en el grupo de tratamiento tanto en las pacientes HER-2 positivas como negativas. No hay que olvidar sin embargo que la alternativa control era no tratamiento, por lo que no es de extrañar la presencia de beneficio independientemente de la sobreexpresión. No obstante, más tarde el estudio del *Cancer and Leucemia Group B (CALGB)* número 8869 arrojó como resultados que las

pacientes con sobreexpresión del HER-2 se beneficiaban de la adición de antraciclinas respecto al uso del CMF; es más, se intuía una relación dosis-respuesta, de acuerdo con la mayor tasa de respuesta en el subgrupo de pacientes con el mayor nivel de antraciclinas de los tres niveles de dosis propuestos en el diseño. [111] Sin embargo, la metodología del análisis estadístico de dicho estudio fue criticada. [112] Más tarde, datos retrospectivos de los estudios 11 y 15 del Nacional Adjuvant Breast and Bowel Project Study Group (NSABP B 11 y 15) apuntaron resultados superponibles. [113, 114] En concreto, el NSABP 11 comparaba dos ramas; la rama control recibía un tratamiento con mostaza nitrogenada/Fluorouracilo, mientras que la rama experimental recibía además antraciclinas. Lo que es imposible de saber es si la adición de antraciclinas era capaz de superar una resistencia intrínseca a quimioterápicos en las pacientes HER-2 positivos, o si sencillamente se beneficiaban de modo inespecífico de la adición de un tercer quimioterápico. Existe un estudio muy importante *in vitro* de Järvinen *et al* [115], en el que se explica un posible mecanismo para la mayor sensibilidad a antraciclinas: las antraciclinas actúan inhibiendo la topoisomerasa II; el gen de la topoisomerasa II está próximo a la región que alberga el HER-2. Las líneas celulares que tienen amplificado el HER-2 en este estudio muestran en más de la mitad de los casos una amplificación del gen (y por tanto del producto proteico) de la topoisomerasa II; esta amplificación hace que estas células tengan unas tasas de topoisomerasa II 6 veces superior al normal. Curiosamente, las células con bajas concentraciones de topoisomerasa II muestran gran resistencia al tratamiento con antraciclinas; la citotoxicidad *in vitro* en las líneas celulares que sobreexpresan el gen de la topoisomerasa II es 2,5 veces mayor cuando se exponen a antraciclinas que en las células sin sobreexpresión. Más tarde, Konecny *et al* [116] tomaron 140 biopsias de tumor mamario no metastático e hicieron un análisis de exposición a diferentes

regímenes de quimioterapia. Si bien desde hace dos años se están incorporando los taxanos al tratamiento adyuvante del cáncer de mama operado, los regímenes fundamentales utilizados son el CMF y el CAF (Ciclofosfamida /Adriamicina /Fluorouracilo) o FEC (Fluorouracilo / Epirrubicina/Ciclofosfamida), éstos dos últimos con antraciclina. Los ensayos clínicos anteriormente mencionados sugerían que las pacientes con sobreexpresión del HER-2 debían ser tratadas con un régimen con antraciclina en lugar de CMF. En el estudio de Konecny, se exponen las células a concentraciones crecientes tanto de CMF como de FEC. Curiosamente, la mayor sensibilidad a quimioterapia la mostraban las células HER-2 positivas. Y, si bien la citotoxicidad era superior cuando se aplicaba FEC respecto a CMF, no había una diferencia mayor en el subgrupo HER-2. No obstante este estudio tiene una limitación : el 70% de las pacientes tenían positividad para los receptores hormonales; el beneficio de la quimioterapia tiene lugar principalmente en pacientes con negatividad para dichos receptores; así, dado que sólo 20 pacientes eran HER-2 positivas en este estudio, había muy poca potencia estadística para en un análisis en dicho subgrupo demostrar una diferencia mayor FEC-CMF que en el subgrupo HER-2 negativas, dado que globalmente es una cohorte con respuesta mitigada a los quimioterápicos al ser hormonopositivas. El hecho es que de momento no hay confirmación clínica veraz para estos hallazgos, si bien en general las pacientes HER-2 positivas suelen tratarse con antraciclina en la práctica clínica diaria.

Respecto al siguiente grupo de drogas principal en el tratamiento del cáncer de mama, los taxanos, de momento ni siquiera está establecido el mecanismo genérico de resistencia a ellos, ni si tiene relación o no con la sobreexpresión del HER-2. En general, los estudios de resistencia a estas drogas comprenden polimorfismos de las

tubulinas o los mecanismos de apoptosis en respuesta a los taxanos, pero no el gen HER-2.

El “Gold Standard” para la determinación de sobreexpresión del HER-2 en cáncer de mama es el FISH (“*fluorescence in situ hybridation*”). Dicha técnica detecta el directamente la amplificación del gen; su precio es de 1500 Euros y no se realiza de rutina en todos los centros. La detección de la proteína HER-2 por inmunohistoquímica (Herceptest[®]; se divide el resultado en 4 grupos de expresión: 0-1-2-3) por patólogos expertos presenta una correlación mayor al 90 por ciento con el FISH. En el estudio de Tedesco *et al* [117], las pacientes con una prueba FISH positiva respondían en un 50% de los casos al régimen de quimioterapia utilizado que incluía Herceptin[®]/Taxotere; las pacientes con Herceptest[®] 2/3 o 3/3 respondían en similar proporción. Todas las pacientes Herceptest[®] 3/3 eran FISH +, y la única paciente Herceptest[®]2/3 que respondió al tratamiento era también FISH +. Los autores concluyen que una positividad 2 ó 3 para el Herceptest[®] es equivalente a un FISH + y por tanto selecciona qué pacientes pueden beneficiarse de un tratamiento con Herceptin[®] y tienen evolución clínica análoga a las pacientes FISH +.

4. Líneas generales de tratamiento del cáncer de mama localizado.

4.1. Introducción. Estadíaje.

La situación clínica del cáncer de mama (localizado, localmente avanzado, metastático) puede clasificarse en estadios según el sistema internacional TNM (tamaño e invasión del tumor, tipo de afectación ganglionar, tipo de afectación metastásica). (Tablas 2 y 3). [118] Exceptuando la enfermedad metastásica, que en líneas generales es incurable en cáncer de mama, cada estadio tiene unas probabilidades de recaer (y volverse por tanto incurable) determinadas tras el tratamiento locorregional en el supuesto de no aplicar ningún tratamiento ulterior.

La clasificación por estadios es la base sobre la que se asienta el pronóstico en el cáncer de mama. Si se procede al tratamiento locorregional y no se aplica ninguna otra estrategia, entre un 10% de las pacientes en estadio I y un 80% de las pacientes en estadio IIIC, recaerán en forma de enfermedad metastásica en los 5 años siguientes a la cirugía. Estas pacientes, salvo excepciones, serán incurables. Un pequeño porcentaje de las pacientes que recaen lo hacen solo de forma locorregional. En esta situación, si se aplica un tratamiento radical con intención curativa, se puede lograr una supervivencia del 20% a 10 años. Cuando la recaída es diseminada, la mortalidad a los 5 años es cercana al 100%.

Basándose en estas posibilidades de recaída, se han desarrollado las diferentes modalidades de tratamiento adyuvante. La justificación de dicho tratamiento adyuvante reside en la hipótesis de destruir mediante el tratamiento citotóxico las micrometástasis que todavía existen a distancia después del tratamiento quirúrgico correcto antes de que se hagan clínicamente evidentes. El hecho es que si bien sabemos gracias al sistema de

estadificación TNM qué probabilidades de recaída tiene cada grupo concreto de pacientes, todavía nos hallamos lejos de la situación ideal.

Tabla 2. TNM

Tx	El tumor primario no es evaluable
Tis	Tumor primario no invasivo
T0	No hay evidencia de tumor primario
T1	Tumor primario < 2cm
T2	Tumor primario 2-5cm
T3	Tumor primario >5cm
T4	T4a: tumor invade pared costal. T4b: invade piel. T4c: invade piel y pared. T4d: linfangitis carcinomatosa cutanea o carcinoma inflamatorio
Nx	Ganglios no evaluables
N0	Ausencia de ganglios afectados
N1	Metástasis en 1-3 ganglios axilares
N2	Metástasis en 4-9 ganglios axilares o ≥ 1 en cadena mamaria interna en ausencia de axilares
N3	N3a: metástasis en > 9 ganglios axilares o ≥ 1 infraclavicular. N3b: metástasis en ≥ 1 ganglio mamario interno y afectación axilar. N3c: metástasis ganglionar supraclavicular ipsilateral
Mx	Metástasis no evaluables
M0	Ausencia de evidencia de metástasis
M1	Metástasis a distancia

Tabla 3. Agrupación por estadios.

Estadio 0	TisN0M0
Estadio 1	T1N0M0
Estadio IIA	T0N1M0 / T1N1M0 / T2N0M0
Estadio IIB	T2N1 / T3N0
Estadio IIIA	T0N2M0 / T1N2M0 / T2N2M0 / T3N1M0 / T3N2M0
Estadio IIIB	T4N0M0 / T4N1M0 / T4N2M0
Estadio IIIC	Cualquier T – N3M0
Estadio IV	Cualquier T – Cualquier N – M 1

Deberíamos poder predecir para una paciente en concreto si va a recaer o no en el supuesto de no administrar tratamiento alguno (porque tan importante como curar la enfermedad a una paciente de riesgo es evitarle efectos tóxicos a una paciente de bajo riesgo). De momento se trata a cada paciente en función de las probabilidades que tenga de recaída su subgrupo TNM al que pertenece (así, por ejemplo, de cada 100 pacientes que tratemos en estadio I, 90 de ellas no iban a recaer y por tanto el tratamiento ha sido innecesario, con las repercusiones en la salud de la paciente y en la economía sanitaria que ello conlleva)

Es por tanto necesaria la determinación de nuevos factores que afinen más que el TNM el pronóstico de una paciente en concreto. Además del estadio, otros factores bien establecidos en la actualidad y algunos en investigación nos ayudan a estimar el riesgo individual de recaída y a elegir por tanto el tratamiento.

4.2. Factores pronósticos.

-Índice de Nottingham:

En el año 1.982, investigadores del hospital de dicha localidad llevaron a cabo un estudio retrospectivo sobre 387 pacientes de cáncer de mama. Se tuvieron en cuenta 9 factores clínicos y patológicos (edad, estado menopáusico/premenopáusico, tamaño del tumor, afectación ganglionar (afectación de los niveles axilares anatómicos I, II o III), grado tumoral, reacción inflamatoria, presencia de histiocitos versus sólo tumor en los ganglios linfáticos y contenido en ER en el tumor primario) para crear un modelo multivariante pronóstico en el cáncer de mama localizado, que tuviera una mayor capacidad de estratificar individualmente a las pacientes en función de su riesgo de recaída. Tres de esos factores mostraron influencia independientemente de su relación con otros factores, con significación estadística, en el modelo multivariante de Cox: tamaño del tumor primario, grado histológico, y número de niveles linfáticos axilares afectados. La fórmula para el índice es:

$$I = (\text{Tamaño} \times 0,17) + (\text{Niveles ganglionares} \times 0,76) + (\text{Grado} \times 0,82)$$

El pronóstico es peor a mayor I (7% libres de enfermedad a 5 años si I es mayor de 4,4, y 77% si es menor de 2,8).

El tamaño del tumor es particularmente importante cuando no hay invasión ganglionar. A mayor número de ganglios afectados, el riesgo de recaída aumenta y disminuye la supervivencia. El grado tumoral tiene la limitación de la reproductibilidad inter-observador, a pesar de usarse el sistema estandarizado de Bloom-Richardson. [119] Dicho modelo fue posteriormente validado en otras series independientes. [120, 121]

-Edad:

A raíz de los estudios de Nixon *et al* [122] y Albain *et al* [123], se acepta que las mujeres de menos de 35 años tienen un pronóstico peor que las más mayores. A efectos prácticos para decidir el tratamiento, se dividen en premenopáusicas y peri/postmenopáusicas.

-Presencia/Ausencia de receptores hormonales: Ver apartado 1.6.1.

-Estatus del HER-2:

Ver apartado 1.6.2.3. Si bien en la enfermedad metastásica su estatus nos sirve para decidir un determinado tratamiento (Herceptin[®]), en el estado adyuvante su aplicación o no de momento sólo es aceptada dentro de ensayos clínicos; los resultados de la adición o no de dicho anticuerpo monoclonal a las pacientes HER-2 positivo se conocerán en los próximos años.

-Proteína P 53:

La P53 es una proteína oligomérica que se une al DNA cuya función es desencadenar respuestas celulares al daño del DNA. No están completamente descritos los mecanismos, pero en general se acepta que su actividad conduce a 3 tipos de respuesta: disminuye la velocidad de la transición de las fases de la replicación celular, activa sistemas proteicos encargados de la reparación del DNA, y, si el daño del DNA es crítico, activa la apoptosis. Cuando el gen de la P53 se halla mutado existe mayor inestabilidad genética debido a que la replicación celular no tiene freno, se dispone de menos tiempo para reparar el DNA en cada ciclo celular, y la respuesta apoptótica al daño genómico está inhibida. [124, 125]. La sobreexpresión de P53 en la célula

mamaria maligna se ha relacionado con peor pronóstico y peor respuesta a la quimioterapia y a la hormonoterapia. [126, 127] Sin embargo, los análisis inmunohistoquímicos todavía no pueden determinar si el aumento de la P53 detectado se debe a un incremento de su transcripción como respuesta a un estímulo proapoptótico o a que existe una P53 mutada y por tanto poco eficaz. Así, si bien es posible que en los próximos años las tasas de P53 en tumor primario decidan un tipo de tratamiento u otro, de momento no se ha incorporado su estatus al árbol de decisiones terapéuticas.

-Ciclina E:

De todos los factores pronósticos que se han evaluado recientemente, el de mayor impacto parece ser la sobreexpresión de la ciclina E en el tumor primario. Keyomarsi *et al* [128] en un estudio prospectivo sobre 395 pacientes determinaron, además de factores clínicos como estadio, afectación ganglionar y biológicos como el estatus de los receptores hormonales y del HER-2-NEU, la cantidad total de ciclina E en el tumor primario. La ciclina E en condiciones normales regula la transición de fase G1 a S en el ciclo celular; altas concentraciones de esta proteína aceleran esta secuencia y por tanto el número de mitosis celulares. En este estudio se realizó un análisis multivariante que arrojó dos conclusiones: se confirmó la importancia de los factores clásicos (la razón de tasas de incidencia de muerte por cáncer de mama localizado fue 1,7 veces mayor para el estadio IIIB que para el I; la de pacientes con receptores negativos 1,8 veces mayor que la de pacientes con receptores positivos y la de pacientes con ganglios afectados 1,8 veces que la de pacientes sin ganglios afectados) y se observó que la influencia de la sobreexpresión de la ciclina E es muy negativa: las pacientes con sobreexpresión de dicho marcador presentan una razón de tasas de incidencia de muerte de 13,3 veces mayor que la de las pacientes sin sobreexpresión. Este factor tiene su

importancia más radical en el estadio I: de 112 pacientes con estadio I, solo 14 fallecieron al momento del cierre del estudio; las 14 tenían concentraciones altas de ciclina E; ninguna de las demás tenía sobreexpresión de ciclina E y además se hallaban vivas y libres de enfermedad. Sólo existe este estudio al respecto y los datos deben ser tomados con cautela y valorados en cohortes independientes, pero probablemente este factor determine la elección de un tratamiento u otro en el futuro. Su determinación rutinaria no se lleva a cabo en la práctica clínica.

4.3. Esquemas de tratamiento.

Dada la heterogeneidad del cáncer de mama, es necesario un acuerdo internacional para definir y estandarizar los grupos pronósticos lo más exactamente posible basándose en las evidencias existentes para que todas las pacientes reciban el tratamiento más adecuado. Sería incorrecto usar un solo sistema, como por ejemplo el índice de Nottingham, que no tiene en cuenta el estado hormonal de la paciente o el HER-2. De hecho, el factor más relevante hoy día para recibir un tratamiento u otro es el tener o no los ganglios axilares afectos, independientemente de si está afectado un nivel o tres niveles. Es necesario tener en cuenta todos los factores aceptados y llegar a un consenso. Cada dos años, los más reconocidos expertos mundiales en cáncer de mama se reúnen en la localidad de Saint Gallen y llevan a cabo esta actividad. El último panel de expertos data del año 2003, y en él se decidió un esquema de estratificación de riesgos y tratamientos para cada grupo que se muestra a continuación. Para las pacientes con ganglios negativos el esquema recomendado es (Figura 16): **[129]**

Grupo riesgo	RRHH +	
	Premenop	Posmenop
Bajo (RRHH + y >35a y g1 y T1)	Tam x 5a	Anast x 5a *
Alto T1 , g2	GnRh-anal** + Tam x 5a ó	Anast x 5a * o CMF x 6 ó AC x 4 → Tam/Anast x 5a*
T2-3-4 , g3, HER2neu+++	FEC x 6	→ Anastx 5a*

* Anastrozol x 5a

** Goserelina 3.6 mg sc/28 días x 2-5 años

Grupo riesgo	RRHH -	
	Premenop	Posmenop
Bajo (RRHH + y >35a y g1 y T1)	No aplicable	No aplicable Obsv opcional si T<1cm
Alto T1 , g2	CMF x 6 ó AC x 4	
T2-3-4 , g3, HER2neu+++	FEC x 6	

Figura 16: esquemas de tratamiento basados en factores pronósticos para pacientes sin afectación tumoral axilar.

Como se puede apreciar, para decidir el tratamiento individual en pacientes sin ganglios afectos se tienen en cuenta varios factores: el más importante, la presencia o no de receptores; posteriormente, el ser pre o postmenopáusica; y después, en función del tamaño del tumor, grado histológico y edad de la paciente, se aplica un régimen sólo hormonal, quimioterápico sin antraciclinas, o quimioterápico con antraciclinas. La positividad del HER-2 por si misma hace considerar el administrar antraciclinas. Los

esquemas son: Ciclofosfamida/Metotrexate/Fluorouracilo (CMF), Adriamicina/Ciclofosfamida (AC), FEC (Fluorouracilo/Epirrubicina/Ciclofosfamida).

Sin embargo, a pesar de todos estos esfuerzos de estratificación, el factor más importante en cuanto a pronóstico sigue siendo el número de ganglios axilares afectos, y en este mismo panel de expertos se sugiere, tras el análisis de los fases III al respecto, la aplicación de un esquema con taxanos y antraciclinas siempre que haya ganglios afectos, independientemente del estatus de los receptores, edad, pre/postmenopáusicas, tamaño y grado del tumor primario, o estatus del HER-2. [129, 130] A mayor número de ganglios afectos, peor pronóstico en cuanto a recaída. Por encima de 4 ganglios afectos, el pronóstico se ensombrece. Se acepta que las pacientes con más de 4 ganglios afectos precisan un tratamiento más agresivo, pero no hay una alternativa definitiva actualmente, siendo la administración de un esquema con taxanos y antraciclinas el estándar tanto para las pacientes con 10 ganglios afectos como para las que sólo tienen 1.

4.4. Necesidad de una mayor exactitud en la estratificación del riesgo individual.

Los factores discutidos todavía están lejos de predecir con exactitud la presencia de enfermedad micrometastática en el momento del diagnóstico, hecho muy temprano en el carcinoma mamario y que determina, en última instancia, la recaída. Hasta un 30% de las pacientes con ganglios negativos recae a largo plazo; asimismo, un 30% de las pacientes con afectación ganglionar no recae nunca: esto quiere decir que si bien es el factor más potente para decidir sobre la aplicación de tratamiento o no a una determinada paciente, un número importante de pacientes sin afectación ganglionar están infratratadas; igualmente, hay un número de pacientes con afectación ganglionar

que podrían no ser sometidas a tratamiento citotóxico puesto que con el tratamiento locorregional con cirugía y radioterapia hubiera sido suficiente.

Los factores clínico-patológicos reseñados se basan en definitiva en datos probabilísticos desprendidos del análisis de grandes cohortes de población; ello no permite para una paciente en concreto predecir si se va a producir una recaída o no.

Como se ha discutido en apartados previos, la presencia de metástasis requiere que las células malignas sufran una serie de cambios en su expresión génica que les permita adquirir potencial invasor y motilidad; se conocen una serie de genes implicados pero no todos. La población celular de un tumor es heterogénea; así, si el análisis de una fracción del tumor no muestra presencia de expresión génica agresiva, este hecho no excluye que otras células del mismo tumor adquieran capacidad metastatizante o que de hecho existan ya pero a distancia e indetectables para los medios habituales de estadiaje (pruebas de imagen como TAC o RMN, o de actividad metabólica como Gammagrafía Osea o PET).

A pesar de estas limitaciones, un grupo de investigadores del *MD Anderson Cancer Centre* en el año 2003 presentó en la sesión plenaria del simposium anual de la ASCO un trabajo importante en el terreno de la predicción de eventos en el cáncer de mama: utilizando la tecnología de Micro-Arrays de cDNA, sometieron material tumoral fresco procedente de la lesión primaria a un estudio genético masivo. Con esta tecnología se puede analizar la expresión cuantitativa individual de unos 30000 genes diferentes, a pesar de que no se conozca la función de cada uno. Se estratifica cada gen individualmente por encima o por debajo de un punto de corte de referencia para aumento de expresión o represión de la misma, obteniendo finalmente el perfil de expresión génico de dicho tumor en concreto. Veintiséis mujeres participaron en dicho estudio. El evento que se testaba era la respuesta a un régimen de tratamiento (Taxol +

FAC). En su análisis encontraron 6 genes que mostraban una similar sobreexpresión en todas las mujeres que presentaron una respuesta completa al tratamiento aplicado. Así, concluyeron que las pacientes que presentaban de inicio dicho perfil genético, se podría predecir con exactitud que iban a responder a dicho tratamiento. [131] Sin embargo, aún no se ha comprobado en una cohorte de pacientes independiente. Podría pensarse que este procedimiento sería aplicable igualmente para testar si un determinado perfil genético en el tumor primario podría predecir a largo plazo la presencia de recaída. De todos modos, tal estudio no estaría exento de limitaciones: precisamente las células que se analizaran del tumor primario son exactamente las que no han metastatizado, y por tanto no necesariamente acertaríamos en las predicciones. Asimismo, el perfil génico de las células cambia con el tiempo en función del ambiente en el que esté: el estudio de Pusztai se ve cuestionado por un estudio posterior de Chang *et al* [132]: inicialmente analizan el perfil de expresión de tumores primarios con la misma técnica. Posteriormente someten a dichas pacientes a tratamiento con Taxotere. Finalmente vuelven a analizar el tumor después del tratamiento. Observan que los tumores que inicialmente son sensibles al Taxotere adquieren un perfil génico en el segundo análisis muy similar al de las pacientes que no respondieron desde el principio al Taxotere y que eran primariamente resistentes, lo que sugiere que el perfil génico puede administrar cierta información en un momento dado pero no necesariamente predecir un desenlace dada la naturaleza dinámica de los procesos tumorales.

Así, creemos que hoy por hoy un método realmente fiable sería la detección directa de las micrometástasis del cáncer de mama, en lugar de analizar factores que predigan su presencia. Éste sería el modo ideal de estratificar el riesgo de cada paciente en concreto en lugar de por grupos.

5.-Carcinoma de mama de alto riesgo o localmente avanzado.

5.1. Definición.

No existe una definición internacional para “carcinoma de mama de alto riesgo” por no haberse establecido un dintel de probabilidades de recaída por encima del cual el riesgo se considera “alto”. Sin embargo históricamente en todos los ensayos fase III internacionales en lo que respecta al cáncer de mama se estratifica a las pacientes en grupos: T3 ó T4 frente a T1 ó T2, y afectación axilar de 4 ó más ganglios frente a 3 ó menos. Cuatro ganglios como punto de corte de alto riesgo es una distinción relativamente reciente. Hasta finales de la década de los 80, todas las pacientes con ganglios positivos recibían el mismo tratamiento independientemente del número de ganglios por no existir alternativas terapéuticas diferentes para aquellas pacientes con más riesgo. El desarrollo de la quimioterapia a altas dosis con soporte de progenitores hematopoyéticos recolectados de sangre periférica (*High Dose Chemotherapy with Stem Cell Support*, HDCT) como modalidad terapéutica para el cáncer de mama avanzado llevó a que se testara en pacientes con cáncer de mama localizado. La aplicación de HDCT se llevó a cabo inicialmente en ensayos clínicos y posteriormente se extendió a la práctica diaria en los centros acreditados. En los 11 ensayos clínicos randomizados en los que la HDCT se aplicó como tratamiento adyuvante, se destinó fundamentalmente a pacientes con más de 10 ganglios afectados (en los últimos años de desarrollo de dicha estrategia se aplicaba también a las pacientes con más de 4 ganglios). El tamaño tumoral no se ha considerado como criterio definitorio de riesgo para estos ensayos, y nunca se ha desarrollado una modalidad terapéutica específica en función del tamaño tumoral salvo la aplicación de cirugía más o menos conservadora o radioterapia locorregional, aspectos cuyos estándares de aplicación no se han modificado en los últimos 20 años.

Así pues a efectos terapéuticos puede considerarse cáncer de mama de alto riesgo todo tumor mamario localizado que, independientemente de su tamaño, invade 4 ó más ganglios axilares. También se considera de alto riesgo la invasión de un ganglio en cadena mamaria interna, territorio infraclavicular o territorio supraclavicular. Cualquiera de estas afectaciones axilares estadifica automáticamente a la paciente en estadio III. Este tema está discutido ampliamente por uno de los mayores expertos mundiales en cáncer de mama, Gabriel Hortobagyi, en el editorial del *Journal of Clinical Oncology* del 15 de Junio de 2004. [133]

5.2. Estrategias para mejorar los resultados del tratamiento en el cáncer de mama localizado de alto riesgo.

Desde los años 80 se han desarrollado fundamentalmente 4 modalidades de tratamiento con el fin de mejorar los pobres resultados obtenidos en el cáncer de mama de alto riesgo con el tratamiento convencional. En la actualidad se están desarrollando a nivel internacional fundamentalmente dos: la aplicación de anticuerpos monoclonales y la administración de quimioterapia convencional con incremento de la densidad de dosis (disminución del intervalo entre ciclos para evitar recrecimiento de las micrometástasis). No se dispone de resultados maduros. Respecto a las otras dos, existen resultados que podrían considerarse definitivos.

-Aplicación de tratamiento neoadyuvante (antes de la cirugía): hipotéticamente las micrometástasis existentes aumentan su tasa de crecimiento inmediatamente después de la cirugía. La aplicación del tratamiento antes de la cirugía evitaría este efecto. Se buscaba con ello varios objetivos: evitar el retraso en el inicio del tratamiento sistémico; conseguir una reducción del tumor primario y hacerlo por tanto operable con procedimientos más conservadores; verificar en el propio tumor la respuesta a la

quimioterapia y por ende deducir el efecto producido sobre las micrometástasis para así obtener información pronóstica; evitar el crecimiento de las metástasis a distancia que se produce tras la extirpación del tumor primario (hecho observado en animales pero no constatado en humanos); y , en último término, disminuir el porcentaje de recaídas. Los resultados definitivos de los grandes estudios que se realizaron al respecto sugieren dos hechos importantes: primero, que se puede aplicar una cirugía más conservadora sin sacrificar el control local; segundo, que las pacientes que muestran una necrosis total del tumor primario tras la quimioterapia neoadyuvante sobreviven sin enfermedad a largo plazo en el 90% de los casos, constituyendo por tanto dicha respuesta completa patológica un marcador subrogado de curación. Sin embargo, el porcentaje de pacientes vivas y sin rastro de enfermedad a largo plazo es idéntico en las pacientes en las que se aplicó la quimioterapia antes o después de la cirugía. [134, 135]

-HDCT: La hipótesis de la que se parte es que la sensibilidad de las células tumorales a los fármacos utilizadas depende de la dosis de las mismas. Estos fármacos poseen toxicidad hematológica limitante. El aumento de la dosis precisa soporte hematopoyético; habitualmente se realiza con *Stem Cell* recolectadas de sangre periférica. Esta estrategia cura pacientes con linfomas, leucemias y tumores germinales (Revisado por Roy D. Baynes) [136] La alta sensibilidad del cáncer de mama a muchos citotóxicos motivó la investigación de esta estrategia en dicho tumor. Se acepta que la curación de un tumor pasa por la consecución de una respuesta completa.

De los trabajos de Schable *et al* [137] se desprenden tres reglas para la base científica de la quimioterapia a altas dosis: 1) para llegar a la curación es necesario erradicar todas las células tumorales; 2) existe una relación invariable directa entre la dosis de cualquier citotóxico y la fracción tumoral aniquilada (afirmación válida para los agentes alquilantes, prácticamente los únicos existentes en la fecha de dichos

trabajos); 3) existe una relación invariable entre la carga tumoral existente y la curabilidad alcanzable sólo con quimioterapia. Dado que en modelos preclínicos la resistencia a agentes alquilantes es revertida con el aumento de la dosis, estos agentes han formado la base de la HDCT. La toxicidad no hematológica de estos agentes habitualmente no se superpone, con lo que se pueden usar en combinación una vez que se asegure el soporte hematopoyético.

Se han desarrollado tres regímenes fundamentales de HDCT: STAMP I (Ciclofosfamida, Cisplatino, Carmustina), STAMP V (Ciclofosfamida, Carboplatino y Tiotepa) y la combinación de Ciclofosfamida y Tiotepa. El STAMP I mostraba toxicidad inaceptable no reversible (insuficiencia renal y muerte) debido al Cisplatino; la versión V podría considerarse la más aceptada y utilizada. Nunca se han comparado entre sí los tres esquemas.

Se comenzó a investigar el papel de la HDCT en pacientes con cáncer de mama diseminado en la década de los 80. Los ensayos fase I-II demostraron una tasa de respuestas del 70%, muy superior a la de los regímenes de rescate utilizados entonces (si bien los fase I no están diseñados para valorar tasas de respuesta). [138, 139] Posteriormente, estudios fase II sin quimioterapia de inducción previa al HDCT como el de Peters *et al* [140], mostraron que hasta un 20% de las pacientes podrían conseguir remisiones duraderas. Pero hubo un hecho que se pasó por alto: estos ensayos incluían pacientes muy pretratadas, con una larga evolución y posiblemente cánceres de mama diseminados no muy agresivos. Dicho de otra manera: las pacientes que tenían una enfermedad muy agresiva y fallecían en la primera o segunda línea de tratamiento, no eran incluidas en estos ensayos y por tanto no estaban representadas en el análisis. Así que no se podía inferir que los buenos resultados no fueran debidos al curso favorable inherente a la propia enfermedad de las pacientes incluidas en dichos ensayos, y sí a la

maniobra terapéutica probada. A pesar de ello, se pusieron en marcha los estudios de aplicación de la HDCT en primera línea de tratamiento en la recaída, con o sin quimioterapia de inducción previa. Hay 20 ensayos fase II en los que se estudia esta estrategia (revisados por Roy D.Baynes), de los que se desprende que un solo ciclo de HDCT consigue un 40-50% de respuestas completas. [136]

A la vista de los datos anteriores, se pusieron en marcha los ensayos fase III para enfermedad diseminada. El primero corresponde a Bezwoda *et al* [141]: en el brazo con tratamiento convencional sin HDCT todas las pacientes progresaron, mientras que en el brazo de HDCT, el 20% de las pacientes estaban vivas y libres de enfermedad a 5 años. Los resultados de Bezwoda nunca lograron ser reproducidos por otros investigadores; esto produjo que los datos de sus investigaciones fueran auditados por comisiones de investigadores independientes; finalmente se supo que Bezwoda había falseado sus resultados y dicho trabajo se considera no válido. El estudio de Peters *et al* [142] sometía a las pacientes con primera recaída a quimioterapia con Adriamicina, Fluorouracilo y Metotrexate; las que obtenían respuesta completa se randomizaban a HDCT u observación. A los 10 años, el 30% de las pacientes en el brazo de HDCT seguían vivas frente al 8% en el brazo control. Este estudio plantea problemas: el hecho de someter a trasplante sólo a las pacientes que alcanzan respuesta completa es de por sí un sesgo de selección importantísimo. De por sí son ya enfermas con muy buen pronóstico y con enfermedad quimiosensible, y el hecho de que el brazo alternativo sea observación no permite aseverar que no se hubieran obtenido los mismos resultados con esquemas menos agresivos. Asimismo, los criterios de entrada en el estudio eran en sí mismos factores de buen pronóstico para el cáncer de mama. Lotz *et al* [143] presentaron sus resultados en el *meeting* anual de la ASCO de 1999: se trataba de un trabajo con 61 pacientes en el que se administraba un tratamiento de inducción

heterogéneo y posteriormente se randomizaba a HDCT o dos-cuatro ciclos de quimioterapia convencional. Los resultados a 3 años eran favorables, pero se diluían con el tiempo debido al bajo número de pacientes. Dos trabajos adicionales, uno de ellos llevado a cabo por el *Nacional Cancer Institute* [144] de EEUU y otro por Madan *et al* [145], tampoco apoyan la estrategia. El primero de ellos tiene un diseño adecuado en la medida de que existe un brazo de tratamiento estándar que no es la observación, pero sigue seleccionando pacientes respondedoras. A pesar de ello (en contraste con el estudio fraudulento de Bezwoda), los resultados son los mismos en ambos brazos de tratamiento. El segundo de ellos no aplica tratamiento alguno al brazo control, y si bien los resultados son significativamente favorables a la HDCT, no se puede considerar concluyente.

Quizá con estos datos nunca debiera haberse iniciado estudios en carcinoma no metastático, pero el entusiasmo con esta técnica era tal que el reclutamiento para los estudios de fase II comenzó en el carcinoma localizado antes de que hubiera resultados definitivos en el carcinoma diseminado.

Los 5 estudios fase II (revisados por Roy D.Baynes) arrojaron resultados alentadores en el contexto clínico de la terapia adyuvante para carcinoma de mama de alto riesgo. [136] El seguimiento a 7 años arrojó una supervivencia mediana de 70%, muy superior a los controles históricos. Un estudio de García-Carbonero *et al* [146] sugirió que de nuevo en este contexto clínico había un importante sesgo de selección: analizando pacientes no sometidas a HDCT, se comparó la supervivencia a 7 años de pacientes que por sus características clínicas hubieran sido candidatas a ensayos clínicos con HDCT con la de pacientes que de haberseles planteado el ensayo hubieran cumplido criterios de exclusión. El resultado fue que el 35% de las que hubieran cumplido todos los criterios de inclusión estaban vivas a 7 años, frente a sólo un 15% a

4 años de las que hubieran sido excluidas. A pesar de ello, los ensayos fase III ya estaban en marcha. El primer trabajo importante, comunicado en la sesión plenaria de la ASCO de 1999, fue realizado por el grupo SWOG. Comparó la aplicación de un ciclo de STAMP I tras quimioterapia con CAF frente a la combinación de las drogas del régimen STAMP I a dosis intermedias sin soporte con precursores hematopoyéticos. Los resultados favorecen al brazo de STAMP I a dosis plenas (los datos fueron actualizados en el 2001, manteniéndose la misma tendencia) [147] También en esa misma sesión plenaria Bezwoda comunicó resultados favorables para el grupo experimental, pero sus datos han caído en descrédito. Un tercer estudio randomizado a cargo de Bergh *et al* [148] también consiguió ser presentado en la sesión plenaria de ese mismo año (lo que da una idea del interés que despertaba tal estrategia: solo 4 trabajos son presentados cada año en dicha sesión de los 8000-10000 recibidos; de ellos 3 correspondían al mismo tema en 1999). El esquema de tratamiento era algo diferente al del resto de los estudios, complicando su interpretación: el brazo “estándar” comprendía 6 niveles de dosis de Fluorouracilo+Epirrubicina+Ciclofosfamida, comenzando todas las pacientes en el nivel 3 y ascendiendo de nivel si había buena tolerancia, administrando un total de 9 ciclos (la hipótesis de los investigadores es que el metabolismo de estos fármacos tiene gran variabilidad inter-individuo, por lo que las dosis del régimen deben de ser “individualizadas”). El brazo experimental recibía 3 ciclos de quimioterapia “individualizada” y por último un ciclo de STAMP V. Los resultados, curiosamente, favorecen a la rama de 9 ciclos “individualizados”, tanto en su presentación en 1999 como en la actualización 1 año después publicado en The Lancet. [149]

Previamente a estos trabajos alentadores se habían comunicado 2 trabajos con resultados negativos que no merecen ser discutidos porque el análisis por intención de

tratar mostró que el 100% de las pacientes del grupo estándar recibían el tratamiento planeado, en comparación con el 85% del brazo experimental. [150, 151]

Existen 3 estudios adicionales que de momento sólo han sido presentados en el congreso de la ASCO y que todavía no han sido publicados en revistas médicas. Dos de ellos se presentaron en el 2001; el primero, a cargo de Gianni *et al* [152] compara la quimioterapia convencional frente a un régimen a altas dosis sin quimioterapia convencional previa. Este régimen consistía en una dosis de 7 gramos de Ciclofosfamida, seguida de una dosis de 8 gramos de Metotrexate, dos de 120 mg de Epirrubicina y finalmente un ciclo de Tiotepa/Melfalán con rescate. No puede considerarse un tratamiento estándar. Asimismo, el reclutamiento incluye pacientes con solo 3 ganglios afectados. El esquema subóptimo sin quimioterapia de inducción, y el pequeño número de pacientes insuficientes para detectar diferencias en un subgrupo con un riesgo inferior al del resto de los estudios (solo 3 ganglios afectados) probablemente hayan sido las razones de los resultados negativos. El segundo de ese mismo año es el más interesante, a cargo de Roche *et al* [153]: incluyen únicamente pacientes de más de 7 ganglios afectados y ambos brazos llevan 4 ciclos de FEC; uno de ellos seguido de observación y el otro de HDCT. Éste segundo brazo muestra una reducción del riesgo de recaída del 39%. Al año siguiente se presentó un nuevo estudio, en el que el brazo de HDCT, que no estaba precedido de quimioterapia de inducción, no muestra ventaja alguna sobre el brazo control. [154]

Por último, merecen atención los resultados de los 3 últimos ensayos finalizados. Ordenados de menor a mayor importancia podrían resumirse así: Tallman *et al* [155] publicaron en el *New England Journal of Medicine* los resultados de su ensayo con 540 patients con más de 10 ganglios afectados en el que el brazo control era CAF X 6 y el experimental CAF X 6 seguido de un ciclo de Ciclofosfamida y Tiotepa a altas dosis

(esquema subóptimo). A pesar de usar un esquema subóptimo, se aprecia que el tiempo a la recaída es mayor en las pacientes del brazo experimental, y que la supervivencia global no alcanza diferencias significativas porque en el brazo experimental se produjeron 10 muertes tóxicas. A.Zander *et al* [156] condujeron un estudio publicado en el *Journal of Clinical Oncology* en junio de 2004. Con sólo 307 pacientes se demuestra un riesgo relativo de recaída de 0.75 para el brazo experimental (4 ciclos de Epirubicina-Ciclofosfamida seguido de un ciclo de Mitoxantrona-Ciclofosfamida-Tiotepa a altas dosis) respecto al control (4 ciclos de Epirubicina-Ciclofosfamida seguidos de 3 de CMF). El problema es que el intervalo de confianza de dicho riesgo relativo es 0.54-1.06, debido al bajo número de pacientes; al incluir el valor nulo los resultados son cuestionados. El último estudio compara el tratamiento con FEC X 5 versus FEC X 5 seguido de STAMP V. Se trata del más importante por tres razones:

1) es el estudio con mayor número de pacientes (885) 2) estratifica a las pacientes en 2 grupos, de 4-9 ganglios y de 10 en adelante, siendo los resultados positivos para ambos pero sólo alcanza significación estadística el grupo de más riesgo (riesgo relativo de recaída para el brazo experimental de 0.71) 3) **el beneficio está limitado a aquellas pacientes sin expresión de HER-2 en el tumor primario. [157, 158]**

De todos estos ensayos pueden desprenderse las siguientes conclusiones:

- 1) el beneficio esperado para el brazo experimental era más alto del que se podía detectar con significación estadística para el número de pacientes incluídos.
- 2) para que el efecto sea visible la HDCT debe de estar precedida de quimioterapia de inducción convencional.

- 3) el beneficio existe siempre y cuando se use un esquema óptimo de quimioterapia y las muertes tóxicas sean menores del 2%
- 4) el beneficio no está limitado a las pacientes de más riesgo, pero la baja potencia estadística de los estudios hace que sólo sea apreciable en ellas
- 5) están aún sin determinar cuáles son los subgrupos que podrían beneficiarse más del procedimiento. Subgrupos como las pacientes que expresan HER-2 podrían no ser candidatas a esta estrategia por la resistencia intrínseca a la quimioterapia, por lo que tal vez sea preferible usar otro tipo de aproximaciones terapéuticas como el uso de anticuerpos monoclonales. El primero en definir un subgrupo con beneficio ha sido Rodenhuis, tras estudiar la expresión del HER-2 en el tumor primario. Observa que en las pacientes con sobreexpresión del HER-2 en el tumor primario el resultado a largo plazo es exactamente el mismo al aplicar la HDCT o la quimioterapia convencional. En ambos casos, los resultados son mucho peores que en el resto de las pacientes. El beneficio de la HDCT sobre la quimioterapia convencional está restringido al grupo de pacientes sin sobreexpresión del HER-2.

6.-Visión de conjunto. Planteamiento del problema.

El cáncer de mama localizado tiene diferentes tasas de recaída en función del estadio. No existen hoy por hoy factores pronósticos que predigan con exactitud el riesgo individual. A pesar de existir modalidades de tratamiento muy activas como la HDCT, la tasa de recaídas es inaceptablemente alta en el carcinoma de mama localizado de alto riesgo.

Es preciso identificar un factor pronóstico más certero que los que existen actualmente así como caracterizar aquellas pacientes que tienen pocas posibilidades de éxito incluso tras ser sometidas a HDCT y que por tanto merecen ser incluidas en ensayos con otras modalidades terapéuticas.

En lugar de testar factores que indirectamente predigan el desarrollo futuro de metástasis, proponemos buscar directamente células tumorales ocultas a los medios diagnósticos convencionales que terminen por desarrollar metástasis clínicamente evidentes. El término “micrometástasis” (se revisará más a fondo en la sección “Material y Métodos”) se refiere a depósitos tumorales viables de entre 0.2 y 2 milímetros que son detectables con las técnicas diagnósticas histopatológicas convencionales. Estas micrometástasis tienen un comportamiento análogo a metástasis de mayor tamaño; detectarlas no es un logro en términos de predicción porque constituyen ya enfermedad activa. El verdadero reto es detectar células tumorales aisladas antes de que hayan formado metástasis/micrometástasis. Hoy día existe una técnica de muy alta sensibilidad, la reacción en cadena de la polimerasa (*polimerase chain reaction* (PCR)), que puede detectar una célula maligna entre 100.000-1.000.000 células normales. La detección de una célula tumoral aislada en sí mismo puede no ser más que un hecho espúreo porque, como se ha explicado, la mayoría de las células

tumorales que circulan por el torrente sanguíneo no serán capaces de formar metástasis clínicamente relevantes, o, aunque puedan implantarse en un órgano a distancia, pueden permanecer quiescentes hasta la muerte del paciente por otra causa. Hoy día no se puede predecir si una célula en concreto va a poder establecer una metástasis clínica, por dos razones: primero, no se conoce qué fenotipo en términos de expresión de unos genes u otros (en el supuesto de que solo haya uno “válido”) es el necesario para poder metastatizar eficientemente; segundo, el fenotipo de cada célula puede cambiar con el tiempo y en función de los estímulos que reciba. Así, el diseño del estudio es clave para asegurar que se contesta con certeza a la pregunta planteada: por ejemplo, la presencia de células tumorales en sangre periférica el día después de la cirugía puede no traducir más que el paso a sangre debido al trauma quirúrgico y no necesariamente debido a un proceso de metastatización. Sin embargo la detección de células tumorales meses después de la cirugía, y sin tumor evidente por pruebas de imagen, podría implicar la presencia de micrometástasis viables. Asimismo, buscar micrometástasis en pacientes sin ganglios afectos podría no ser tan eficiente como en pacientes que sabemos que van a recaer en un 50% de los casos como las sometidas a HDCT por tener más de 10.

Existen antecedentes anecdóticos de detección de células tumorales diseminadas y su relación con mal pronóstico en otros tumores como melanoma, sarcoma de Ewing, pancreas, colon y próstata. **[159-163]**

El modo de detectar células tumorales entre células normales ha sido hasta hace pocos años la visión directa al microscopio. Dicha técnica es poco sensible y poco específica (por ejemplo, es dificultoso en una sección de médula ósea distinguir una célula tumoral de un blasto precursor de un leucocito). Posteriormente la tinción por inmunohistoquímica de ciertos antígenos celulares supuestamente expresados en células tumorales malignas y no en células normales aumentó la sensibilidad hasta la detección

de una célula tumoral entre 1.000-10.000 células normales. Con estas técnicas hay una serie de trabajos realizados en cáncer de mama, que buscan células tumorales aisladas en médula ósea (existen algunos trabajos con escaso número de pacientes realizados con sangre periférica). Existe el problema de que no se puede aseverar que las células tumorales aisladas o micrometástasis en médula ósea no siempre se desarrollan, y pueden continuar durante el resto de la vida del paciente en estado “durmiente”. Sin embargo, la presencia de células circulantes varios meses después de la cirugía podría implicar que existen, en algún órgano, metástasis activas.

Por otra parte, durante los últimos 15 años, la detección de células tumorales de cáncer de mama se ha hecho mediante dos aproximaciones no del todo correctas. La primera de ellas asume que las células tumorales de origen epitelial expresan citoqueratinas, no así las células hemopoyéticas. Así, la detección de citoqueratinas por inmunohistoquímica en la superficie de una célula necesariamente implicaría que son tumorales. Sin embargo, se ha visto recientemente que las células tumorales epiteliales en su proceso de metastatización pierden el fenotipo epitelial y adquieren rasgos fenotípicos de células mesenquimales, lo que les permite, entre otras cosas, migrar. Esto implicaría que no detectaríamos una parte de las células tumorales diseminadas. La citoqueratina más utilizada ha sido la K-19. La otra aproximación, más antigua, consistía en detectar una combinación de glicoproteínas de membrana que se expresara en las células tumorales aisladas. Esta estrategia se abandonó, por no ser dicha combinación de glicoproteínas específica de las células tumorales. Todos estos trabajos serán revisados en la sección Discusión.

Así pues, en nuestro diseño hay tres aspectos fundamentales: primero, que la detección de células tumorales se hará con la técnica más sensible que existe, la PCR; segundo, como proteínas diana usaremos además de la citoqueratina K-19 otras que no

se han utilizado hasta ahora, con más tasa de expresión en células metastásicas que la citoqueratina K-19 (los aspectos técnicos y las razones de selección de las proteínas se revisan en material y métodos extensamente); tercero, que el estudio en sangre periférica podría permitir detectar células procedentes de más órganos que la médula ósea.

En lo que respecta a otros tumores ya ha comenzado la investigación activa de células diseminadas en sangre periférica con PCR con diferentes marcadores en función del tumor estudiado. Creemos que éste hecho respalda nuestra elección de la técnica.

[164-168]

Un punto de interés adicional es el siguiente: los trabajos existentes en la actualidad refieren la búsqueda de células tumorales diseminadas en un momento inmediatamente posterior a la cirugía. En nuestro trabajo el diseño es distinto: la población objeto de estudio son pacientes con carcinoma de mama de alto riesgo que se sometieron a HDCT tras 6 ciclos de quimioterapia convencional. Tras los 6 ciclos se recolectaron progenitores hematopoyéticos de sangre periférica mediante aféresis. Utilizamos las muestras de sangre congelada de dichas aféresis. Así las células tumorales aisladas son células que se puede asegurar que no están en sangre periférica debido al trauma quirúrgico por haber pasado demasiado tiempo; por otra parte, habrán resistido a 6 ciclos de quimioterapia. Este diseño optimiza el trabajo: se reduce al mínimo la posibilidad de detección de células con significado espúreo (células que van a ser aniquiladas por la adyuvancia o células que están en la sangre debido al trauma quirúrgico).

El estudio parte con dos limitaciones: de momento no está demostrado que las células tumorales aisladas sean factor pronóstico, con lo que su detección puede no implicar ningún interés clínico. La segunda, es que las células que detectemos habrán

resistido a 6 ciclos de quimioterapia convencional, pero recordemos que todas las pacientes se sometieron posteriormente a un ciclo de HDCT: podría darse el caso de que de no haber aplicado ningún tratamiento más, la correlación de las células tumorales residuales con la recaída fuera importante; no obstante el ciclo de HDCT podría aclarar del organismo las células viables restantes y artefactar así los resultados.

Nuestro fin último es determinar un factor pronóstico que permitiría decidir a qué pacientes podría aplicárseles la HDCT y a quiénes otras estrategias. Para definir un nuevo factor pronóstico es esencial que los pacientes implicados tengan un pronóstico homogéneo en función del resto de factores conocidos.

Es de vital importancia detectar si las células diseminadas expresan el HER-2: de ser así habría una alternativa terapéutica ya disponible para el grupo de pacientes con micrometástasis. Asimismo, las conclusiones de este estudio deberán servir como hipótesis para estudios en estadios más tempranos.

II. Hipótesis de trabajo

La presencia de células tumorales diseminadas detectadas por PCR en productos de aféresis obtenida tras la estimulación con Filgastrim (factor estimulante de colonias granulocítico o G-CSF, aplicado inmediatamente antes de la aféresis para inducir la replicación de los progenitores hematopoyéticos y su paso a sangre para recolección) **tras 6 ciclos de quimioterapia identifica un grupo de pacientes con alto riesgo de recaída y muerte.**

Las pacientes que tras 6 ciclos de quimioterapia presentan todavía células tumorales diseminadas podrían no beneficiarse de la HDCT respecto a las pacientes que no tienen células tumorales circulantes.

De acuerdo con otros trabajos, existe una selección positiva de células HER-2 positivas en las metástasis de cáncer de mama. Las células tumorales diseminadas podrían expresar esta proteína en un alto porcentaje de los casos y ser por tanto sensibles al anticuerpo monoclonal Herceptin®.

La citoqueratina K-19 no es una proteína adecuada para la detección de las células tumorales aisladas de cáncer de mama.

La detección de células tumorales circulantes debe hacerse utilizando un panel de genes expresados en células de cáncer de mama y no en tejido hemopoyético, en lugar de un solo gen.

III. Objetivos

Los objetivos finales de este estudio son los siguientes:

-Determinar la presencia de células tumorales circulantes en sangre periférica mediante la detección de expresión de genes expresados en cáncer de mama y no en tejido hemopoyético en pacientes con cáncer de mama de alto riesgo tras la quimioterapia adyuvante con intención curativa.

-Analizar la asociación de la presencia de células tumorales circulantes con el resto de los factores pronósticos conocidos utilizados habitualmente en el cáncer de mama.

-Averiguar si los aparentemente peores resultados de la quimioterapia a altas dosis en carcinoma de mama de alto riesgo en el subgrupo de pacientes HER-2 positivo descrito por Rodenhuis [158] se explica por la presencia de células tumorales mamarias HER-2 positivas en sangre periférica.

-Investigar la importancia pronóstica en términos de tiempo a la recaída y tiempo de supervivencia total de la presencia de células tumorales tras la adyuvancia del cáncer de mama de alto riesgo tratado con intención curativa.

IV. Material y métodos.

1.-Pacientes.

1.1. Selección de pacientes.

Entre los años 1990 y 2001 se llevaron a cabo 195 procedimientos de quimioterapia a altas dosis con soporte con progenitores hematopoyéticos (HDCT) en pacientes con cáncer de mama en los servicios de oncología de dos centros hospitalarios madrileños: el Hospital 12 de Octubre y la Clínica La Luz (153 y 52 terapias respectivamente).

Cincuenta y cinco pacientes del Hospital 12 de Octubre y 31 de la Clínica La Luz con enfermedad diseminada fueron sometidas a HDCT. Otras 7 y 5 respectivamente tenían enfermedad localizada pero se trataba de recaídas aisladas del tumor primario.

Nuestra intención era analizar pacientes vírgenes de tratamiento y homogéneas en cuanto a pronóstico. Es obvio que no se pueden incluir en el mismo análisis a pacientes con tumor localizado y pacientes con enfermedad diseminada. Asimismo, las pacientes con una recaída localizada, ya han sido tratadas tiempo atrás de su enfermedad, y dicha recaída localizada traduce una diseminación que no es evidente clínicamente aún en el resto de los órganos; la prueba es que más del 70% de las pacientes con una recaída localizada fallece de su enfermedad y solo el 7% está libre de ella a 10 años. [169] Al diseñar un grupo de pacientes para un análisis pronóstico, ha de buscarse que sean lo más homogéneos posible respecto al resto de los factores pronósticos que ya se conozcan y cuya variación pueda influir en el desenlace a estudio, actuando como factores de confusión. Mezclar pacientes vírgenes de tratamiento con pacientes ya metastásicas contradice este principio.

De las 97 pacientes restantes, disponíamos de alícuotas de sangre periférica obtenida durante la aféresis para recolección de precursores hematopoyéticos. Ochenta y cuatro de ellas eran pacientes con carcinoma de mama de alto riesgo vírgenes de tratamiento. Estas 84 pacientes recibieron quimioterapia convencional seguida de 1 ciclo de HDCT con STAMP V. Estas 84 pacientes fueron las analizadas en el estudio (73 del Hospital 12 de Octubre y 10 de la Clínica La Luz). La tabla 4 ofrece el resumen de las características demográficas y clínicas de estas 84 pacientes.

1.2. Procedimientos terapéuticos.

1.2.1. Cirugía.

Tras el diagnóstico por medio de biopsia, las pacientes que no presentaban un tumor T4 fueron sometidas a mastectomía radical tipo Patey o cuadrantectomía más vaciamiento axilar en función de la relación tamaño tumoral/mama. En caso de que hubiera tumor viable en los márgenes de cuadrantectomía, o que el borde más próximo se encontrara a menos de 5 milímetros de tumor viable, se indicaba la ampliación. Por otro lado, las pacientes con un tumor T4 recibían quimioterapia de inicio, para intentar la cirugía tras la reducción tumoral.

1.2.2. Estadíaaje.

Tras la cirugía, y en las 4 semanas previas al inicio del tratamiento, a todas las pacientes se les realizó un estudio de extensión consistente en TAC tóraco-abdominal y gammagrafía ósea. Sólo se indicó TAC craneal en caso de presencia de síntomas neurológicos. El hallazgo de depósitos secundarios lógicamente excluye a las pacientes de la terapia adyuvante.

Tabla 4. Características de las pacientes

Característica	Valor
Edad (mediana, límites del intervalo)	44,28 (24-69)
Sexo (femenino, masculino)	100% / 0%
Estado hormonal	
Edad fértil (núm, %)	71 (85,5%)
Menopausia (núm, %)	12 (14,5%)
Tamaño tumoral (pieza quirúrgica):	
Tx/T1/T2/T3/	3(3,6%)/7(8,5%)/31(37,3%)/24(28,9%)
T4/no consta (núm/ %)	15(18,8%)/3(3,6%)
Número de ganglios afectos (media/límites del intervalo)*	13,37 (2-38)
1-3 (núm/ %)	4 (4,7%)
4-9 (núm/ %)	18 (21,4%)
>10 (núm/ %)	62 (73,8%)
Metastásicas de inicio (núm/ %)	0 (0%)
Hist. previa de cáncer de mama (núm/ %)	0 (0%)
Subtipo histológico	
Ductal (núm/ %)	72 (85,7%)
Lobulillar (núm/ %)	7 (8,3%)
Otros (núm/ %)	5 (6%)
Grado histológico	
1 (núm/ %)	1 (1,1%)
2 (núm/ %)	32 (38,1%)
3 (núm/ %)	51 (60,8%)
Receptores Hormonales	
ER+/PR+ (núm/ %)	43 (51,19%)
ER+/PR- (núm/ %)	9 (10,71%)
ER-/PR+ (núm/ %)	1 (1,19%)
ER-/PR- (núm/ %)	31 (36,90%)
HER-2-NEU	
Positivo (núm / %)	36 (42,8%)
Negativo (núm / %)	48 (57,2%)

*Una serie de pacientes recibieron la quimioterapia antes de la cirugía por ser inoperables de inicio debido a su gran tamaño (neoadyuvancia). Cuando se realiza quimioterapia neoadyuvante, tanto el tamaño tumoral como el número de ganglios encontrados suele ser menor al que se encontraría de no haber hecho quimioterapia. De ahí que en nuestra serie haya 4 pacientes con menos de 5 ganglios; no obstante, se trataba de pacientes de alto riesgo de inicio, puesto que las 4 padecían un carcinoma inflamatorio (por definición no es quirúrgico de inicio) y eran por tanto susceptibles de tratamiento con quimioterapia a altas dosis, independientemente del número de ganglios afectos.

Antes del inicio de la quimioterapia se obtuvo hemograma, perfil hepático y renal. Dado que estaba previsto que todas las pacientes recibieran antraciclinas y que la cardiotoxicidad es un conocido efecto de las mismas, se practicó también un electrocardiograma y se determinó isotópicamente la fracción de eyección ventricular (FEVI).

1.2.3. Quimioterapia adyuvante.

Los esquemas utilizados fueron dos:

1) Esquema FEC: 600 miligramos/metro² (mg/m²) de 5-Fluorouracilo en bolo intravenoso + 75 mg/m² de 4-Epirubicina en inyección intravenosa en 30-60 minutos + 600 mg/m² de Ciclofosfamida en inyección intravenosa en 30-60 minutos, administrados el día 1 cada 21 días. Este esquema se repite hasta un total de 6 ciclos siempre que no se presente toxicidad inaceptable, la paciente desestime seguir con el tratamiento o tenga lugar una progresión tumoral.

2) Esquema AC-Taxol: 60 mg/m² de Adriamicina en inyección intravenosa en 30-60 minutos + 600 mg/m² de Ciclofosfamida en inyección intravenosa en 30-60 minutos el día 1 cada 21 días por cuatro ciclos. Veintiún días después del último ciclo de AC se administra Taxol 175 mg/m² en infusión intravenosa lenta (3 horas) el día 1 cada 21 días por cuatro ciclos. Igualmente en caso de toxicidad inaceptable, progresión tumoral o negación de la paciente se suspende el tratamiento.

1.2.4. Comedicación.

Como premedicación del esquema FEC se administraron 20 mg de dexametasona o 125 mg de hidrocortisona más 8 mg de ondansetrón, ambos en inyección intravenosa de 15 minutos. El ondansetrón se indicaba asimismo vía oral cada

8 horas durante 3 días a dosis de 4 mg por toma; 4-12 mg de dexametasona en toma única o repartidos en 2-3 tomas orales durante 3 días completaban la medicación antiemética profiláctica.

La premedicación y la profilaxis del esquema AC son superponibles a las del esquema FEC.

El Taxol precisa ser premedicado para evitar reacciones alérgicas debidas a su disolvente con antihistamínicos anti-H1 y -H2, así como con corticoides. La pauta antiemética necesaria es menos intensa. En nuestro centro habitualmente se usa la siguiente pauta previa al Taxol: 5 mg de dexclorfeniramina + 50 mg de ranitidina + 125 mg de hidrocortisona + 8 mg de ondansetrón. Posteriormente se mantienen 4 mg de ondansetrón cada 8 horas durante 2 días; dicha pauta fue la administrada. Para prevenir las mialgias, efecto secundario presente en el 30%-50% de los casos en que se administra Taxol y que en función de la tolerancia individual puede motivar la interrupción del tratamiento, se pautó ibuprofeno (o similar) a dosis de 400-600 mg cada 8 horas.

1.2.5. Seguimiento clínico.

En la primera visita se realizó la anamnesis básica y por aparatos así como exploración física completa; se informó a cada paciente de su pronóstico y de las alternativas de tratamiento así como de la toxicidad y expectativas de éxito de cada una, y se obtuvo el consentimiento informado.

Posteriormente, el primer día de cada ciclo se realizó hemograma, perfil hepático y renal; anamnesis y exploración física. La recogida de datos de toxicidad se hizo de acuerdo con los criterios de toxicidad para citotóxicos del *National Cancer Institute*, universalmente aceptados y seguidos por todos los oncólogos de occidente en su

práctica diaria. [170] Dicha evaluación se repitió a mitad de cada ciclo hasta el final del tratamiento planeado.

Tras el tercer ciclo de antraciclinas y al final del tratamiento se repitió la valoración isotópica de eyección ventricular.

1.2.6. Manejo de la toxicidad.

1.2.6.1. Toxicidad no hematológica.

Las toxicidades grado I-II se manejaron de forma sintomática. En los protocolos habituales de tratamiento no se recomienda efectuar retrasos de ciclo ni reducciones de la dosis por toxicidades grado I-II.

Las pautas de manejo para las toxicidades habituales son:

-emesis grado I-II: ondansetrón 4 mg más metoclopramida 10 mg cada 8 horas vía oral hasta la resolución.

-diarrea grado I-II: loperamida 2 comprimidos vía oral tras la primera deposición por encima del número habitual del paciente y posteriormente 1 tras cada deposición adicional hasta resolución.

-mucositis grado I-II: enjuagues con antisépticos orales y anestésicos orales (lidocaína viscosa al 2% o similar). Puede asociarse nistatina tópica oral en caso de apreciarse “muguet”.

-alopecia grado I-III: no requiere manejo específico.

-mialgias grado I-II: ibuprofeno 400-600 mg cada 8 horas.

-neuropatía sensitiva por Taxol grado I-II: habitualmente no se produce hasta el cuarto-sexto ciclo de Taxol; en caso de presentarse no hay acuerdo sobre unas medidas estándar pero suele administrarse gabapentina 300 mg cada 8 horas, amitriptilina 10 mg al día o topiramato 50 mg cada 12 horas.

En caso de presentarse toxicidad no hematológica grado III: de tratarse de emesis, diarrea o mucositis, es precisa la admisión hospitalaria hasta resolución ya que el paciente en general debe estar en dieta absoluta. Tanto para estos tres eventos como para el resto, debe esperarse hasta su resolución o disminución hasta grado II, y reiniciar el tratamiento quimioterápico a la misma dosis. De presentarse un nuevo evento grado III, debe de reducirse la dosis un 25 %. Habitualmente de precisarse una segunda reducción suele interrumpirse el tratamiento quimioterápico.

En caso de evento tóxico grado IV, debe de valorarse ingreso hospitalario, esperar hasta resolución o atenuación hasta grado II y reiniciar el tratamiento con una reducción del 25%. De presentarse un segundo evento grado IV, se interrumpe el tratamiento.

1.2.6.2. Toxicidad hematológica.

El manejo habitual es el siguiente.

-Neutropenia grado I-II: no requiere manejo específico ni retrasos o reducciones de dosis

-Neutropenia grado III: esperar hasta resolución a grado II y reanudar tratamiento.

-Neutropenia grado IV: de no haber neutropenia febril no precisa antibióticos, factores estimulantes de colonias ni ingreso hospitalario. Igualmente, de no ser febril tampoco motiva reducción de la dosis de quimioterapia pero sí la espera hasta la resolución a grado II.

-Plaquetopenia grado I-II: no requiere manejo específico

-Plaquetopenia grado III: esperar hasta resolución a grado II. Habitualmente no se reduce dosis salvo que se repita la toxicidad.

-Plaquetopenia grado IV: en caso de presentar una cifra de plaquetas por debajo de 10.000 (o de 20.000 en paciente febril), o de padecer hemorragia activa, se precisa transfusión de concentrados de plaquetas. Asimismo debe de esperarse hasta la resolución, y el tratamiento debe de reanudarse con una reducción del 25% de la dosis. Un segundo evento grado IV suele motivar la suspensión definitiva del tratamiento.

-Anemia grado I-II: no requiere manejo específico.

-Anemia grado III-IV: actualmente existen diversos tipos de eritropoyetinas recombinantes de cómoda administración subcutánea que previenen estos eventos. En los años en que fueron tratadas las pacientes de este estudio las eritropoyetinas recombinantes estaban en desarrollo. En general se transfundían concentrados de hematíes cuando la cifra era de menos de 8 g de hemoglobina, y en otras situaciones en función del criterio del clínico. Una anemia grado III repetida o una anemia grado IV en general implicaban la suspensión del tratamiento quimioterápico.

-Neutropenia febril: revisar las pautas de manejo de neutropenia febril podría ser objeto exclusivo de una tesis doctoral. Se puede encontrar información sobre las pautas de actuación seguidas en nuestro centro durante los años del estudio en la revisión a cargo de Chanock *et al* publicada en 1996. [171]

1.2.7. Evaluación final.

Tras la quimioterapia adyuvante se realizaba de nuevo la misma evaluación que antes del inicio del tratamiento. En los casos en que se hubiera desarrollado enfermedad metastática, o existiera alguna secuela orgánica importante producto del tratamiento, o se denegara el consentimiento, no se aplicaba el ciclo de STAMP V, pero conviene recordar que únicamente analizamos pacientes en las que se completó todo el procedimiento.

Se realizó una prueba adicional a todas las pacientes que se sometieron a HDCT: se obtuvo una biopsia de médula ósea procedente de cresta ilíaca que fue examinada al microscopio óptico para excluir del estudio aquellas que tuvieran metástasis evidentes en médula ósea.

1.2.8. Estimulación de médula ósea para recolección de precursores hematopoyéticos en sangre periférica. Aféresis.

En cuanto se produjo la recuperación de las cifras hematológicas tras el último ciclo de quimioterapia convencional (entre 14-21 días después de la infusión), se inició la administración subcutánea cada 12 horas de 300 µg de *Granulocyte-Colony Stimulating Factor* (Factor estimulante de colonias granulocíticas o G-CSF; *Filgastrim*®) durante 10 días. De esta manera se produce una estimulación masiva de la replicación de los precursores hematopoyéticos (de leucocitos, plaquetas y eritrocitos) y su paso a sangre periférica. [172] Durante los últimos 3-4 días de estimulación se procedió a la recogida de precursores hematopoyéticos CD-34 – positivos. (Los progenitores hematopoyéticos pluripotenciales o *Stem Cells* están representados en la fracción de sangre periférica o médula ósea que expresa el antígeno CD-34 en su superficie) [173, 174] La recogida o aféresis se realiza a través de un catéter venoso central colocado en la vena subclavia; la selección de la fracción CD-34 se basa en un procedimiento de citometría de flujo que al mismo tiempo permite su cuantificación. [175] La aféresis se realizó 1 vez al día hasta la recogida de $2.5 - 5.0 \times 10^6$ precursores/Kg, cifra considerada suficiente para que la recuperación hematológica se produzca en los 14 días siguientes a la infusión de quimioterapia a altas dosis. [176] Habitualmente esta cifra se alcanza en el segundo o tercer día de aféresis. Los precursores fueron almacenados en bolsas de 250 ml para cada paciente a -180 C° (en

nitrógeno líquido) hasta su utilización. Se congelaron asimismo entre 2 y 4 alícuotas de 2 ml a -80 C° de producto de aféresis de cada cada paciente para ulteriores estudios.

1.2.9. Quimioterapia a altas dosis.

La infusión del ciclo de quimioterapia a altas dosis (HDCT) se realizó 2-3 semanas después de la aféresis.

Todas las pacientes fueron ingresadas en habitaciones preparadas para trasplante hematopoyético (aislamiento y flujo laminar) para el procedimiento la tarde antes al primer día de HDCT, colocándose un catéter venoso central. Desde ese momento se inició la infusión de 3000 ml de suero glucosalino cada 24 horas y medicación antiemética (ondansetrón 8 miligramos cada 8 horas más dexametasona 12 mg/día; en caso de persistencia de náuseas o vómitos se administraba metoclopramida, haloperidol o clorpromacina hasta su cese; en caso necesario se instauraba nutrición intravenosa y dieta absoluta), durante los primeros 4-5 días y después según criterio médico. Se llevó a cabo balance hídrico estricto pesando a la paciente diariamente además de cuantificando sus ingestas y pérdidas de líquido. Todos los días del ingreso se obtuvo hemograma, perfil hepático y renal así como análisis sistemático de orina.

El régimen de HDCT que recibieron todas las pacientes fue el STAMP – V: Carboplatino 400 mg/m²/día + Tiotepa 125 mg/m²/día + Ciclofosfamida 1500 mg/m²/día por cuatro días (días 1-4; dosis totales: Carboplatino 1600 mg/m²; Tiotepa 500 mg/m²; Ciclofosfamida 6000 mg/m²).

El séptimo día tras la primera dosis de quimioterapia se reinfundieron los progenitores hematopoyéticos por el catéter venoso central. Al día siguiente se inició la cobertura profiláctica de infecciones oportunistas con ciprofloxacino (500 mg/12 horas + Aciclovir 250 mg/8 horas + enjuagues con nistatina 3 veces al día). Asimismo, se

instauró dieta de bajo contenido bacteriano (salvo que la emesis, mucositis o diarrea tóxica lo impidieran, iniciándose nutrición parenteral). El cuarto día tras infusión de progenitores se indicó la administración subcutánea de 300 µg de Filgastrim® subcutáneo cada 12 horas hasta recuperación de las cifras de leucocitos o según criterio médico. En caso de presentarse fiebre se suspendía la profilaxis y se iniciaba el tratamiento indicado según criterio médico para fiebre en paciente inmunodeprimido.

La toxicidad por quimioterapia se manejó según las pautas habituales descritas en apartados previos. Otras complicaciones o eventos no específicos fueron tratados según criterio médico.

En el momento de la normalización de los recuentos sanguíneos, parámetros de función hepática y renal, se procedía al alta del paciente siempre y cuando se hubieran solucionado todos los cuadros tóxicos.

1.2.10. Terapias ulteriores.

Todas las pacientes recibieron radioterapia complementaria sobre lecho mamario y cadenas ganglionares hasta 45 Gray tras la HDCT. Asimismo, aquéllas cuyos tumores tuvieran expresión de receptores de estrógenos o de progesterona, recibieron tamoxifeno a dosis de 20 mg/día en una sólo toma durante 5 años o hasta que se evidenciara recaída de su enfermedad, en cuyo caso se iniciaba una terapia distinta según criterio médico.

1.2.11. Revisiones.

Tres meses tras la HDCT se obtuvo anamnesis básica y por aparatos, exploración física, analítica completa, gammagrafía ósea, TAC tóraco-abdominal, mamografía contralateral y valoración isotópica de la fracción de eyección ventricular.

Estas dos últimas pruebas se repitieron 1 vez al año indefinidamente, mientras que las demás se repitieron cada 3 meses durante el primer año.

La anamnesis, exploración y la analítica se repitieron cada 4 meses durante los años segundo y tercero; la gammagrafía ósea y el TAC bianualmente.

Los años cuarto y quinto las revisiones (anamnesis, exploración, analítica, TAC y gammagrafía) se repitieron semestralmente, y tras el quinto año, anualmente.

En caso de detectarse una recaída a cualquier nivel el programa de revisiones se interrumpió, reiniciando tratamiento oncológico.

1.2.12. Recogida de datos.

Se revisaron los registros clínicos de todas las pacientes, recogiendo los datos siguientes: edad, historia ginecológica, antecedentes personales y familiares, fecha de diagnóstico, estudio de extensión y TNM al diagnóstico, procedimiento quirúrgico aplicado, tratamientos oncológicos (quimioterapia de convencional, radioterapia, hormonoterapia) administrados y fechas de los mismos, fecha de la HDCT, toxicidad de los tratamientos, estado clínico en las revisiones, fecha de recaída, intervalo libre de enfermedad; tipo de recaída y fecha de éxitus.

Por otra parte se revisaron los datos anatomopatológicos disponibles para cada registro: tamaño, grado e histología tumoral; número y localización de los ganglios afectados; datos inmunohistoquímicos (receptores hormonales, antígeno Ki-67, P53, HER-2). Hasta el año 1998 no se inició la determinación rutinaria en el servicio de Anatomía Patológica de los marcadores KI-67, P53 y HER-2 en los centros de estudio, por lo que si bien se obtuvieron los valores de los receptores hormonales de todas las pacientes, no fue así para el resto de los marcadores.

Los datos se almacenaron en la hoja de cálculo “Excel” (*Microsoft Corporation*, EEUU; Versión Windows XP) y se analizaron con el programa estadístico “SPSS” (*Statistical Package for Social Sciences*, SPSS Inc., Chicago, Illinois, EEUU; Versión 12.0.)

2.-Determinación de la expresión de K19, HER-2, EGP2, PS2 y P1B en sangre periférica. Desarrollo del proceso realizado.

El trabajo técnico de laboratorio fue realizado por la doctora en biología Soledad Gamarra y el doctor en medicina Joaquín Martínez Lopez, especialista en hematología.

Los detalles concernientes a las técnicas utilizadas, a las razones de su elección, y al panel de genes cuya expresión se rastreó en sangre periférica para la detección de células tumorales circulantes/micrometástasis se explican ampliamente en el apartado Discusión.

2.1. Detección de células tumorales circulantes.

La detección de células tumorales de cáncer de mama en la sangre se realiza buscando moléculas de mRNA que se expresen en células de cáncer de mama y no en células sanguíneas. No existe ningún gen que se exprese sólo en células de cáncer de mama y que se exprese en todas las células de cáncer de mama bajo cualquier condición ambiental. Dentro de un mismo paciente, existen diferentes poblaciones celulares del tumor que padezca. De los 30000 genes que se han tipificado en el genoma, cada célula expresa unos u otros en función de los estímulos recibidos del microambiente en que se encuentre, el tipo celular de que se trate y otra serie de factores todavía no bien comprendidos pero que fundamentalmente se basan en la metilación/desmetilación (y otros proceso de regulación del acceso de los factores de transcripción a la molécula de DNA) de los promotores de cada gen. Dicha expresión génica confiere un fenotipo celular concreto; este fenotipo está determinado por qué genes y en qué cantidad se están expresando en mRNA y por tanto traduciendo a proteínas. Así los fenotipos celulares de las distintas poblaciones de cáncer de mama de un paciente serán similares

pero no idénticos. Por ello, detectando con una técnica muy sensible la expresión de varios genes que se expresen preferentemente en células de cáncer de mama y no se expresen (o lo hagan en escasísima cuantía) en células sanguíneas, tendremos un indicador de la presencia de células tumorales. Los genes elegidos cuya expresión (tránscritos de mRNA) hemos tratado de localizar son: Citokeratina 19 (K19), HER-2, EGP2, PS2 y P1B. La técnica utilizada fue la PCR en tiempo real (RT-PCR) tras retrotranscripción a c-DNA (DNA de cadena simple complementario a mRNA)

2.2. PCR y RT-PCR: fundamentos.

El objetivo de la PCR (*“Polimerase Chain Reaction”*, reacción en cadena de la polimerasa) es obtener una gran cantidad de copias de un fragmento de DNA específico. Fue descrita por Kary B. Mullis en 1985. Su desarrollo le valió el galardón con el premio Nobel de 1993. La patente de esta técnica actualmente está en posesión de Hoffman-LaRoche. Básicamente su fundamento es el siguiente: el DNA es una larga molécula con dos cadenas de nucleótidos complementarias entre sí. Un nucleótido es una molécula compuesta por una base nitrogenada (adenina (A), timina (T), citosina (C), guanina (G) o uracilo (U)), una pentosa (desoxi-ribosa si es nucleótido de DNA o ribosa si se trata de un nucleótido de RNA) y un grupo fosfato. En el DNA encontramos nucleótidos de A, T, C y G, mientras que en el RNA de A, U, C y G. Las bases nitrogenadas están en la parte interna de la doble hélice de DNA (en el caso de RNA la molécula es de una sola cadena). Cada base nitrogenada está unida por enlace tipo “puente de hidrógeno” a una base de la cadena complementaria. Las uniones posibles son sólo 2: A se une siempre a T y C se une siempre a G, por medio de 2 y 3 puentes de hidrógeno respectivamente. Una secuencia cualquiera de DNA se designa por el orden en que se encuentran dispuestas sus bases nitrogenadas. Cada gen está formado por

secuencias de 5000-100000 pares de bases y es única respecto a la de los otros genes. Gracias a la especificidad de las secuencias podemos amplificar regiones concretas de DNA.

Calentando la molécula de DNA a 95 C°, se rompen los puentes de hidrógeno y las dos cadenas de DNA se separan. Así las bases nitrogenadas de cada cadena quedan expuestas. Posteriormente, bajando a 55-60 C°, conseguimos la temperatura de “*annealing*”. En este paso, los “*primers*” o cebadores se unen a sus secuencias complementarias específicas. Un cebador es un oligonucleótido de 15-35 bases nitrogenadas que la DNA-sintasa o polimerasa necesita para comenzar la síntesis de DNA. Los cebadores deben contener una secuencia de nucleótidos que sea complementaria a una secuencia que encontremos al principio (“*primer forward*”) y al final (“*primer reverse*”) del fragmento que queremos amplificar. Una secuencia muy corta no sirve, porque puede hallarse repetida en varias localizaciones de la molécula del DNA; en general secuencias de 15-20 bases no suelen hallarse repetidas. Así, a esta temperatura tenemos las dos cadenas de DNA separadas; en un punto específico de ella hay dos cebadores que van a posibilitar el inicio de síntesis de DNA. En el último paso se eleva la temperatura a 72 C°, que es la temperatura óptima de trabajo de la enzima TAQ polimerasa (“*termophilus aquaticus polimerase*”; se trata de una polimerasa de DNA que se encuentra en dicha bacteria, cuyo medio habitual son las aguas termales. Antes del descubrimiento de la TAQ, el procedimiento de amplificación era mucho más complicado. La temperatura de 95 C° necesaria para separar las dos hebras de DNA inactiva las polimerasas que se utilizaban entonces, siendo necesario añadir enzimas en cada ciclo de PCR, alargando mucho el procedimiento). En este último paso la polimerasa sintetiza DNA sólo en la región en la que se han unido los cebadores, que es la secuencia que queremos amplificar. Al conjunto de estos 3 pasos de le denomina

“ciclo”. Los ciclos se repiten sucesivamente. En cada ciclo se dobla el número de copias del fragmento específico. (Figura 17) Habitualmente se repiten un total de 30-45 ciclos. Cada uno de los 3 pasos tiene una duración de 30-60 segundos. Por regla general, el procedimiento es eficiente con los siguientes reactivos en cada muestra (para un volumen final de 25 µl):

- 3 µl de DNA “diana” a concentración 20-100 ng/µl.
- 0,5 µl de cebador “*forward*” a concentración de 300 ng/ µl.
- 0,5 µl de cebador “*reverse*” a concentración de 300 ng/ µl.
- 0,75 µl de TAQ polimerasa a concentración de 1 unidad/ microlitro (una “unidad” se define como la cantidad de enzima que incorpora 10 nmol de desoxirribonucleótidos a DNA en 30 minutos a 74 C°)
- 1 µl de cloruro de magnesio a concentración 50mM
- 2 µl de dimetilsulfóxido (DMSO: agente detergente que facilita el acceso de la polimerasa al DNA)
- 2,5 µl de deoxirribonucleótidos (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) a concentración 2,5 mM.
- 2,5 µl de *buffer* de TAQ polimerasa
- 14,25 µl de agua destilada

Hoy en día la PCR se suele llevar a cabo en unos aparatos denominados termocicladores, que automáticamente generan con rapidez los cambios térmicos necesarios para los distintos pasos, manteniéndolos durante el tiempo y número de ciclos programados por el usuario.

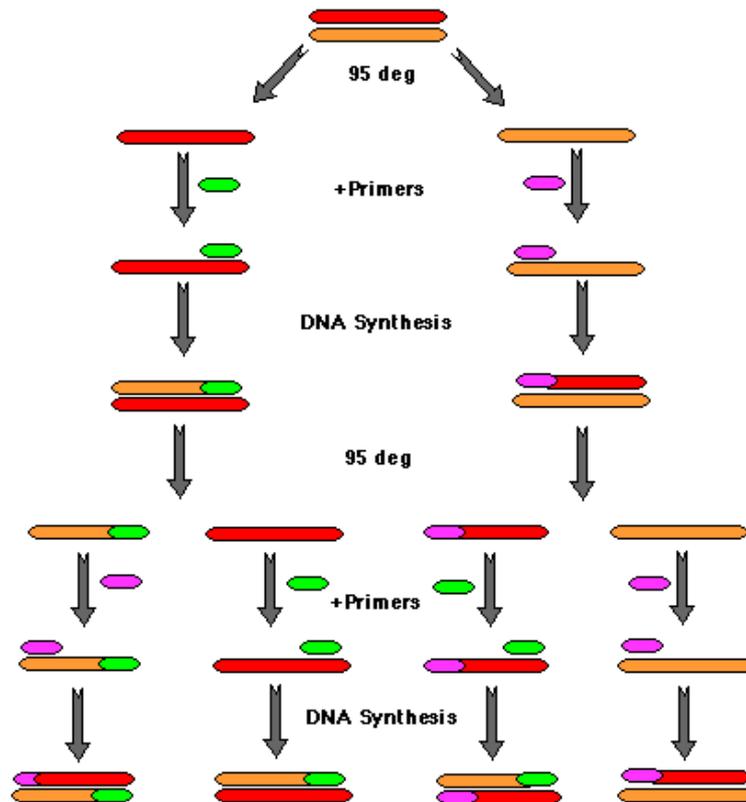


Figura 17: Esquematación de los pasos de la PCR estándar. Las barras roja y naranja representan un fragmento de DNA. A 95 C° las hebras se separan. Las barras verde y rosa representan un *primer forward* y *reverse*; se unen a sus secuencias específicas complementarias en las barras roja y naranja respectivamente. Por último la TAQ sintetiza un los fragmentos complementarios a partir de los cebadores (en el gráfico, se genera una barra naranja complementaria a la roja a partir de la barra verde más pequeña; y una roja complementaria a la naranja a partir de la rosa). Como se aprecia, al repetir los ciclos se dobla sucesivamente el número de copias del fragmento específico (tomada de Hoffman-LaRoche; <http://www.roche.com>).

De esta técnica básica se han desarrollado múltiples variantes. Discutiremos la *real time-PCR* (RT-PCR; “PCR en tiempo real”) con transcriptasa inversa, que es la utilizada en nuestro experimento.

Como se ha mencionado, buscamos m-RNA (no DNA) de los tres genes diana para saber si está teniendo lugar la expresión de los mismos y por tanto en la muestra analizada existen células tumorales diseminadas de cáncer de mama. No existe una

técnica que amplifique y por tanto permita detectar el RNA directamente; únicamente se puede amplificar y detectar DNA.

Para ello, es preciso sintetizar DNA a partir del m-RNA. Este DNA no es exactamente el DNA que encontraríamos si secuenciásemos el DNA nuclear: la secuencia de un gen contiene regiones que se traducen a RNA y regiones silentes que no se traducen, denominadas exones e intrones respectivamente. Los intrones y exones se alternan entre sí. En general las secuencias silentes o intrones son más largas que los exones. Su significado se desconoce. En el proceso de generación de RNA inicialmente se genera una copia de todo el gen, con exones e intrones. Sin embargo las secuencias de intrones son eliminadas, y el RNA final sólo contiene la secuencia de los distintos exones enlazados entre sí. Por ello, si sintetizamos el DNA complementario a un m-RNA obtendremos sólo la secuencia de exones del gen que lo codifica. Este DNA se denomina c-DNA (la letra “c” hace referencia a que es DNA complementario a RNA de cadena simple). El c-DNA se sintetiza a partir del m-RNA gracias a la enzima transcriptasa inversa. El c-DNA ya puede someterse posteriormente a procedimientos de PCR.

De cada muestra a estudio hay que obtener primero todo el m-RNA que existe en sus células. Posteriormente, sintetizando c-DNA obtenemos el perfil de expresión de los genes que están activos en las células de dicha muestra. Si existen expresión los genes K-19, HER-2, EGP-2, PS2 y P1B, quiere decir que en esa muestra hay células tumorales mamarias.

La RT-PCR permite la cuantificación de los productos de PCR durante el proceso de desarrollo de la misma, en contraste con la PCR clásica que requiere una serie de complejos y largos procedimientos técnicos posteriores. Se basa en la detección de señales de fluorescencia durante y/o después de cada ciclo de PCR. Esta

cuantificación es más exacta que con la PCR clásica. Además de la exactitud, permite un importante ahorro de tiempo.

Existen diversas modalidades aplicables para el desarrollo de la RT-PCR. La utilizada en este experimento fue la RT-PCR con “sondas Taqman”. (Figura 18) Las sondas Taqman son oligonucleótidos que mediante un enlace covalente están conjugados con 2 fluorocromos: un “*reporter*” o “dador” y un “*quencher*” o “aceptor”. Los utilizados habitualmente son el fluoróforo FAM (que emite fluorescencia a una longitud de onda de 520 nanómetros) como dador y el TAMRA (480 nanómetros) como acepto. Siempre que ambos fluorocromos se hallen en posición muy cercana el uno al otro, la fluorescencia emitida por FAM será absorbida por TAMRA. Sin embargo, a medida que se desarrolla la PCR, los fluoróforos se liberan de la sonda. La TAQ polimerasa posee actividad exonucleasa, que hidroliza los enlaces de los fluoróforos asociados a los cebadores a medida que hay síntesis de DNA en cada ciclo. De esta manera, la fluorescencia no es absorbida por TAMRA y es detectada, siempre que esté teniendo lugar la síntesis del transcrito buscado. En cada ciclo consecutivo, la fluorescencia aumenta debido a la acumulación exponencial de fluoróforos FAM libres. Este aumento de la fluorescencia permite la cuantificación del número de copias presentes en la muestra a estudio. La RT-PCR se realiza de forma automatizada en aparatos comerciales diseñados al efecto; al menos existen 7 aparatos comercializados disponibles. Las diferencias entre ellos básicamente radican en la velocidad de realización de la RT-PCR y el número de muestras que pueden ser analizadas en cada tanda. El escoger uno u otro depende de los requerimientos del usuario; por lo demás no se diferencian en el desarrollo del proceso o en los resultados obtenidos. El aparato Light Cycler (Roche, Mannheim, Alemania), fue el utilizado por nosotros.

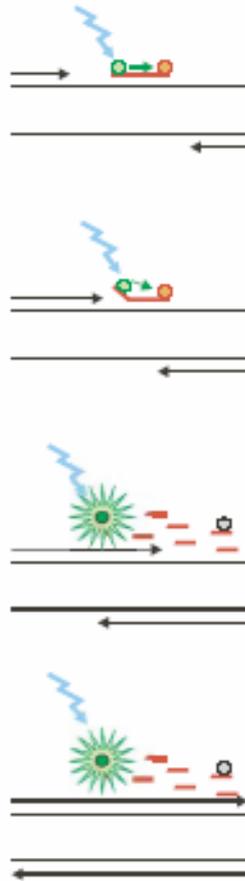


Figura 18: representación esquemática de la generación progresiva de fluorescencia durante la progresión cíclica de la RT-PCR. Se aprecia en el primer paso cómo al ser estimulado por la luz, el fluoróforo FAM (verde) emite fluorescencia pero ésta es absorbida por el fluoróforo TAMRA (rojo). Ambos están unidos al cebador. En el siguiente paso, al iniciarse la síntesis de DNA complementario por la TAQ, los fluoróforos son hidrolizados de la sonda. En la tercera imagen se observa cómo se separan a medida que la síntesis continúa, y tanto en ese paso como al final del ciclo, la fluorescencia emitida por FAM al recibir estimulación luminosa, no es absorbida por TAMRA, pudiendo ser detectada (tomada de VHJ van der Velden *et al*: Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. Leukemia 17(4): 1013-1034, 2003)

La cuantificación del número de copias (ver apartado 2.11. Cuantificación) se basa en el análisis de la fluorescencia emitida. Basado en la intensidad de la fluorescencia inespecífica (“*background signal*” o “ruido de fondo”), que es determinada durante los ciclos 3-15 automáticamente por el *software* del Light Cycler mediante el método de la segunda derivada de la pendiente de la fluorescencia detectada entre los ciclos mencionados, se calcula un “*Threshold*” o punto de corte (denominado Ct) para la fluorescencia específica. Cuando la fluorescencia detectada sobrepasa ese punto, quiere decir que se está amplificando el producto buscado. (Figura 19) Para cada muestra, además de los genes deseados, se realiza la amplificación de un *Housekeeping* o gen de referencia. Dicho gen de referencia ha de cumplir unas características ideales: debe de expresarse en todas las células y su expresión ser constante cuantitativamente de unas a otras; asimismo teóricamente no debe cambiar su valor de expresión en función de las distintas condiciones ambientales. Por último, debe tener una expresión intensa. Existen diversos genes de referencia (ver apartado 2.10. Gen de referencia para la cuantificación) cuyas características se aproximan a las ideales. El gen de la B-Glucuronidasa (GUS) fue el utilizado por nosotros. Mediante una razón entre el ciclo en el que se detecta el gen de referencia y el gen buscado, se puede estimar, en términos relativos, el número de copias del gen buscado. La fórmula para su cálculo se expone y explica en el apartado 2.11.

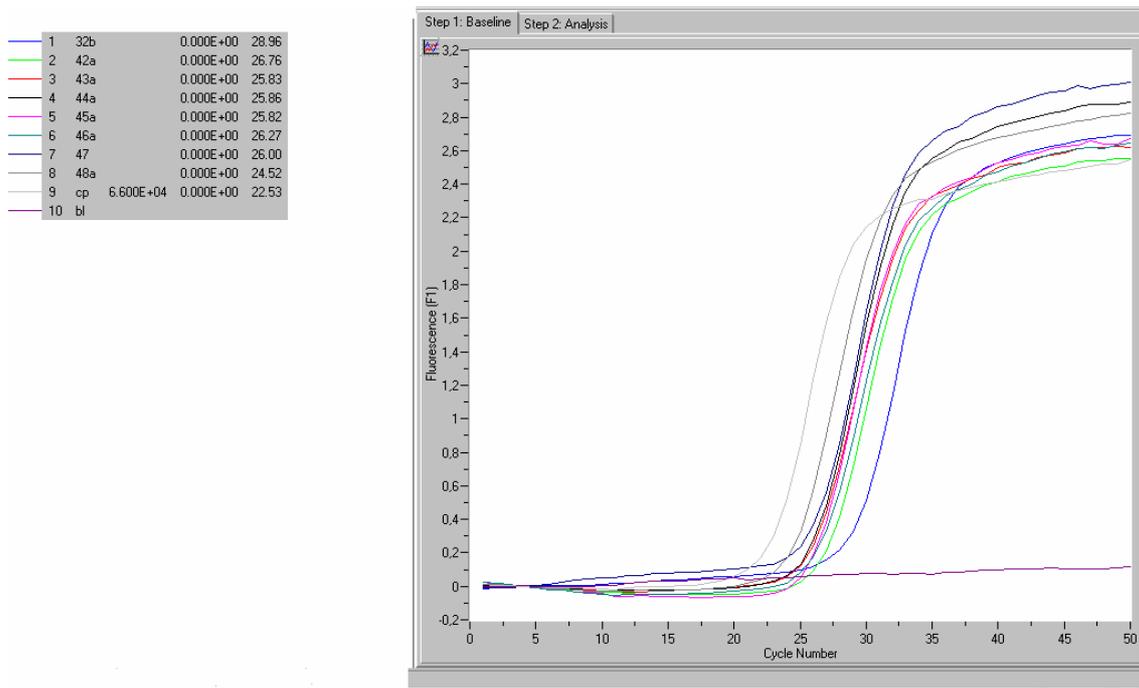


Figura 19: a modo de ejemplo se muestra la gráfica de detección de fluorescencia para el gen de referencia (B- Glucuronidasa o GUS) en 8 muestras, en un control positivo y en un control negativo. La cifra que aparece en la última columna es el ciclo en el que se produce el *Threshold* o detección de fluorescencia específica.

2.3. Reactivos.

- MagNA Pure LC mRNA HS KIT (Roche Applied Science, Penzberg, Alemania).
- GeneAmp Gold RNA PCR Reagent Kit (Applied Biosystems, Foster City, EEUU).
- Sondas Taqman de amplificación sintetizadas por Applied Biosystems (Foster City, EEUU)
- Light Cycler Capillares tubes (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania)
- LC Fast Start DNA Master Hybridation Probe (incluye polimerasa, buffer enzimático y dNTPs) (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania)

-Líneas celulares HC-1143 y MCF-7 (Banco de líneas celulares, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, Alemania)

2.4. Aparatos.

-Light Cycler Instrument (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania)

-MagNA Pure LC Instrument (Roche, Mannheim, Alemania)

-Termociclador PTC100 – Programmable Thermal Controller (MJ Research, New Haven, EEUU)

-Contador celular Coulter (AC-t Deff, Tokyo, Japón)

-Software Primer Express (Applied Biosystems, La Jolla, EEUU)

-Software de Roche Light Cycler versions 3.5 y 4.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania)

2.5. Extracción de m-RNA.

Para la obtención del m-RNA se procedió a descongelar las muestras a temperatura ambiente. Para aquellas pacientes que hubiera más de una alícuota de producto de aféresis disponible, se mezcló el producto de todas las alícuotas en una sola. Seguidamente cada muestra fue centrifugada a 13200 revoluciones/minuto durante 60 segundos; de esta manera se separa el producto en dos fases: suero y células. Se deshechó el suero y se reservó la fase celular.

La fase celular se sometió a un proceso de lavado previo a su procesamiento, consistente en suspensión en 2 mililitros de suero salino fisiológico, mezclado y posterior centrifugación a 13200 rpm durante 1 minuto, reservando la fase celular.

La extracción de m-RNA se llevó a cabo en el MagNA Pure LC Instrument (Roche, Mannheim, Alemania), utilizando el kit comercial MagNA Pure LC mRNA HS KIT diseñado al efecto (Roche Applied Science, Penzberg, Alemania).

El kit está diseñado para la purificación automática del m-RNA de hasta 32 muestras que contengan hasta 10^7 células mononucleadas de sangre periférica, usándolo en el aparato descrito. El m-RNA obtenido puede ser suspendido en volúmenes variables entre 50-100 μ l y tiene una calidad e integridad suficientes para ser posteriormente analizados en el Light Cycler.

El proceso de aislamiento del m-RNA está basado en la tecnología del “lecho magnético”, que es realizado automáticamente en el *MagNa Pure LC Instrument*. Tras someter las células a un proceso de lisado de sus membranas, se liberan todas las moléculas intracelulares. Las moléculas de m-RNA siempre son sintetizadas con una cola de poli-A en su extremo 3’; esta cola de adeninas sirve para el reconocimiento de la molécula de m-RNA para los procesos intracelulares. La cola de poli-A es reconocida selectivamente por medio de oligonucleótidos de T (timina), marcados con biotina. El complejo formado por el m-RNA y el oligonucleótido marcado es capturado por microesferas magnéticas revestidas de estreptoavidina. Los contaminantes posteriormente se eliminan mediante procesos repetidos de lavado, obteniendo finalmente sólo el m-RNA unido a las microesferas magnéticas, de las que son eluidas.

Los pasos básicos de trabajo, descritos por la casa comercial, son los siguientes:

-Contaje de 10^6 células mononucleadas obtenidas de cada paciente para constituir la muestra a estudio en el contador celular Coulter.

-Lisado de la muestra mediante el *Lysis Buffer*; esto libera los ácidos nucleicos e inactiva las enzimas DNA-asas y RNA-asas (este paso se lleva a cabo fuera del MagNa Pure LC Instrument).

Ya en el interior del aparato tienen lugar los 5 pasos siguientes:

-El lisado se divide en 4 alícuotas que son incubadas individualmente en el *Capture Buffer* primero y en un medio que contiene las microesferas después. La cola poli-A del m-RNA hibrida con la el oligonucleótido poli-T marcado con biotina en el primer paso. En el segundo paso, el complejo formado es fijado a la superficie de las microesferas gracias a la estreptoavidina. Por último se reúne de nuevo el material en la alícuota inicial.

-Incubación con una solución que contiene DNA-asa I; este proceso elimina el DNA que pueda haber en la muestra (si en el producto que vamos a someter a RT-PCR hay DNA genómico, existe la posibilidad de que hubiera amplificación de un fragmento de DNA, a pesar de que el m-RNA buscado no existiera en la muestra analizada, falseando los resultados)

-Lavado con el *Wash Buffer* I; elimina impurezas y potenciales inhibidores de las enzimas que posteriormente intervendrán en el proceso de la RT-PCR.

-Lavado con el *Wash Buffer* II; elimina otras sustancias no unidas a las microesferas, como proteínas y detritus celulares.

-Incubación en *Elution Buffer* a alta temperatura: libera el m-RNA del complejo microesfera magnética-oligonucleótido de timina marcado con biotina. El eluido final contiene sólo el m-RNA que existiera en la muestra procesada.

El volumen final es de 50 µl.

2.6. Retrotranscripción y síntesis de c-DNA.

Una vez obtenido el m-RNA para cada paciente, procedimos a la retrotranscripción y síntesis de DNA complementario de cadena simple o c-DNA. Este

paso se realizó con el GeneAmp Gold RNA PCR Reagent Kit (Applied Biosystems, Foster City, EEUU).

Este Kit aporta la enzima *MultiScribe Reverse Transcriptase*, una forma recombinante del virus de la leucemia murina. Es una DNA-polimerasa dependiente de RNA, que utiliza RNA (de cualquier tipo siempre que sea de cadena simple) como molde en la presencia de un cebador, para sintetizar una cadena de DNA (de cadena simple; c-DNA) complementaria al RNA molde. La retrotranscripción puede hacerse con el fin de obtener sólo el c-DNA de un RNA específico o bien para obtener el c-DNA complementario a todos los RNA que existen en la muestra. La primera aproximación requiere trabajar con cebadores específicos, mientras que la segunda utiliza oligonucleótidos hexaméricos cuya secuencia se ha generado al azar (de este modo las posibles secuencias son $4^6 = 4092$; con tantos hexámeros diferentes se consigue generar al menos una secuencia que sirva como cebador para cada RNA diferente) La enzima *MultiScribe* es compatible con ambos procedimientos. Nosotros utilizamos los hexámeros al azar, puesto que el objetivo era la detección de varios transcritos de m-RNA diferentes.

La enzima viene suministrada a una concentración de 50 unidades / μl , siendo una unidad la cantidad de enzima necesaria para incorporar 1 nmol de deoxi-timidín-trifosfato a 37 C° en 10 minutos usando un molde complementario de poli-adeninas. Es obtenida y purificada de cepas de *E.coli* que expresan el gen *pol* del virus de la leucemia murina en un plásmido.

Por otro lado, se incluye una solución con 10^6 copias / μl de RNA complementario del plásmido pAW 109; su objetivo es servir como control positivo de la reacción de retrotranscripción.

El desarrollo de la retrotranscripción se llevó a cabo según las recomendaciones del fabricante. Consta de 3 pasos (los dos últimos se llevan a cabo en el termociclador PTC 100), que describimos brevemente:

-Preparación de una solución “madre” que contenga los reactivos necesarios para la reacción de retrotranscripción excepto el m-RNA (obtenido en el paso anterior), con un volumen proporcional al número de muestras para las que queramos realizar retrotranscripción, teniendo en cuenta que el volumen final para cada reacción de retrotranscripción sea de 20 μ l. El volumen de RNA obtenido en la extracción que se añade a cada reacción de retrotranscripción es de 6 μ l; así, la solución “madre” debe incluir 14 μ l por muestra. Es decir, si queremos trabajar con 100 muestras, deberemos preparar una solución “madre” de 1400 μ l. Seguidamente en cada tubo mezclaremos 14 μ l de solución con los 6 μ l de RNA de cada paciente. Por cada 14 μ l de solución, los reactivos son los siguientes:

- 1 μ l de pAW109 RNA
- 1,7 μ l de agua destilada
- 4 μ l de *RT-PCR Buffer*
- 2 μ l de cloruro de magnesio 25 milimolar (mM)
- 2 μ l de nucleótidos trifosfato 10 mM
- 0,5 μ l de inhibidor de RNA-asa
- 0,3 μ l de *MultiScribe Reverse Transcriptase*
- 0,5 μ l de hexámeros al azar
- 2 μ l de *DTT-Buffer*

-Hibridación: incubando 10 minutos la mezcla final a 25 C° se logra la hibridación de los cebadores (hexámeros) a sus secuencias complementarias existentes en los m-RNA.

-Retrotranscripción: se produce incubando durante 12 minutos a 42 C°, temperatura óptima de trabajo de la *MultiScribe Reverse Transcriptase*.

2.7. *Primers* o cebadores y sondas Taqman.

Se utilizaron oligonucleótidos cebadores y sondas Taqman (*Taqman probes*) comerciales diseñados específicamente para la amplificación de los genes K-19 y PS2 por la empresa Applied Biosystems (por tanto su secuencia no está disponible al tratarse de un producto comercial). Para los genes HER-2, P1B y EGP2 así como para el gen de referencia B-Glucuronidasa, se utilizaron las secuencias reflejadas en la tabla 5 diseñadas por Bieche I *et al* [177], Bosma *et al* (P1B y EGP2) [178] y Beillard E *et al* [179], obteniéndose bajo encargo a Applied Biosystems.

Se aplicaron las reglas generales concernientes al diseño de los cebadores para que éstos lleven a cabo su función eficientemente:

- 1) el tamaño de la secuencia a amplificar (el número de bases comprendido entre el cebador forward y el cebador reverse) óptimo ha de tener entre 200-500 pares de bases.
- 2) el 30-80 % de los nucleótidos de la secuencia han de ser guaninas o citosinas.
- 3) deben de evitarse las secuencias con más de tres G o tres C repetidas (dado que al unirse a su base complementaria por tres puentes de hidrógeno, esos tripletes formarían una unión demasiado estable y se perdería eficiencia en la PCR al

entorpecerse el proceso de separación-uni3n de los cebadores).

- 4) la temperatura de “*melting*” (temperatura a la que se separan de su hebra complementaria) de los cebadores ha de ser idealmente 55-65C°.
- 5) es preciso que entre los 5 3ltimos nucle3tidos de los extremos 3’ de cada cebador no existan m3s de uno 3 dos grupos guanina-citosina para evitar la formaci3n de horquillas (pliegues que forma el DNA en su estructura secundaria)

Las secuencias y las caracter3sticas b3sicas de los cebadores utilizados se muestran en la tabla 5.

2.8. Amplificaci3n: Desarrollo de la RT-PCR.

La amplificaci3n y cuantificaci3n se llev3 a cabo mediante la tecnolog3a de RT-PCR con sondas Taqman en el aparato termociclador con detecci3n de fluorescencia Light Cycler Instrument, utilizando el kit enzim3tico LC Fast Start DNA Master Hybridation Probe (la polimerasa de este kit est3 modificada de tal manera que se mantiene inactiva hasta que es calentada a 94 C° durante 4 minutos). La cuantificaci3n se basa en la detecci3n de fluorescencia originada por el ac3mulo de mol3culas de DNA de doble cadena en los sucesivos ciclos.

Tabla 5. Características de los cebadores.

Gen	Primers	Secuencia	SONDA	Loc.*	Fragmento
K19	K19 fw K19 rv	Prod. Ref. Num:** Hs00761767s1 (Applied Biosystems)			
HER2	HER2 fw HER2 rv	5'AGCCGCGAGCACCCAAGT 3' 5'TTGGTGGGCAGGTAGGTGAGT T 3'	5'6FAMCCTGCCAGTC CCGAGACCCACCT- PHX: TAMRA	M11730	147 BP
EGP2	EGP2 fw EGP2 rv	5'CAGTTGGTGCACAAAATACTG TCA 3' 5'CATTCATTTCTGCCTCCATCA3'	5'6FAMTTGCTCAAAG CTGGCTGCCAAATGT- PH X:TAMRA	M32036	75 BP
PS2	PS2 fw PS2 rv	Prod. Ref. Num:** HS00170216m1 (Applied Biosystems)			
P1B	P1B fw P1b rv	5'AGTCCACCCTGTCCTTGGC 3' 5'CTGAGGAGTACGTGGGCCTG 3'	5'6-FAM- CTGCAAACCAGTGTG CCGTGCC-PH:TAMRA	L15203	62 BP
GUS	GUS fw GUS rv	5'GAAAATATGTGGTTGGAGAGC TCATT3' 5'CCGAGTGAAGATCCCCTTTT 3'	5'6FAMCCAGCACTCT CGTCGGTGACTGTTC A-PHX:TAMRA	M15182	100 BP

*Posición en el *Gene bank* *accesión number*; <http://pbil.univ-lyon1.fr/search/acnum.html>

**De los productos comerciales no se dispone de las secuencias, posición de acceso ni tamaño de fragmento por tratarse de datos confidenciales empresariales de Applied Biosystems (Foster City, EEUU)

Las reacciones de amplificación tienen lugar en capilares “Light Cycler Capillares tubes” de 10 µl. Para cada reacción, los reactivos son:

- 1 µl de cDNA obtenido de la retrotranscripción.
- 1 µl de cloruro de magnesio 0.004 mM.
- 1 µl de LC Fast Start DNA Master Hybridation Probe.
- 4 µl de agua destilada.

-1 μl de cebador *forward* y 1 μl de cebador *reverse* a concentración 0,3 μM

-1 μl de sonda Taqman a concentración 0,2 μM (para los genes K19, EGP2, PS2, P1B y GUS) o 0,25 μM (para el gen HER-2)

La reacción tuvo lugar en dos etapas:

- una primera etapa de calentamiento a 95 C° durante 10 minutos para activar la enzima Fast Start.

-una segunda etapa que comprende 50 ciclos de 2 pasos por ciclo: el primero de ellos de <1 segundo de duración en el que se llevan las muestras a 95 C° para conseguir la desnaturalización de la doble hebra (la duración del paso es de menos de 1 segundo porque sencillamente el aparato alcanza esta temperatura y de modo inmediato comienza a bajar a la temperatura de *annealing*). El segundo paso es de 30 segundos de duración, y en él tiene lugar tanto el *annealing* de los cebadores Taqman como la síntesis de DNA complementario. Las temperaturas de este segundo paso son distintas para cada cebador: 60 C° para el K19, P1B y B-Glucuronidasa; 65 C° para EGP2 y HER-2. Como se puede comprobar, el tiempo total de reacción es inferior a 50 minutos. Dado que se pueden introducir 32 capilares en cada proceso, ello genera una idea de la rapidez del aparato Light Cyclor.

2.9. Controles positivo y negativo.

Para testar la sensibilidad de la RT-PCR para cada gen específico y comprobar la idoneidad del desarrollo de la reacción, se adquirieron las líneas celulares HC-1143 y

MCF-7 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Alemania). Dicha línea celular expresan, entre otros genes, K-19, HER-2, EGP2, PS2 y P1B, así como GUS. Se utilizaron curvas de dilución estándar específicas para cada gen a estudio. (Figura 20) Posteriormente se midió la concentración de DNA bicatenario mediante fluorometría y se utilizó la fórmula siguiente para calcular el número de copias del transcrito:

$$6 \times 10^{23} \text{ (copias/mol)} * \text{Concentración (gramos/}\mu\text{l)}$$

$$\text{MW (gramos/mol)}$$

Se realizaron 8 diluciones seriadas de 10 en 10 del DNA originado por la amplificación de cada transcrito, considerando válidas aquellas curvas con una pendiente de 3,5. De esta manera sabemos el límite de detección de la técnica para cada transcrito. En cada tanda de 32 reacciones que admite el *Light Cycler* pueden incluirse 4 ó 5 diluciones obtenidas del producto mencionado para testar el número de copias respecto a las producidas por la línea celular utilizada como control positivo.

Como control negativo se usó sangre de donantes sanos al azar procedente del banco de sangre, procediendo a la amplificación mediante RT-PCR de los transcritos K-19, HER-2, EGP-2, PS2 y P1B en dicho producto.

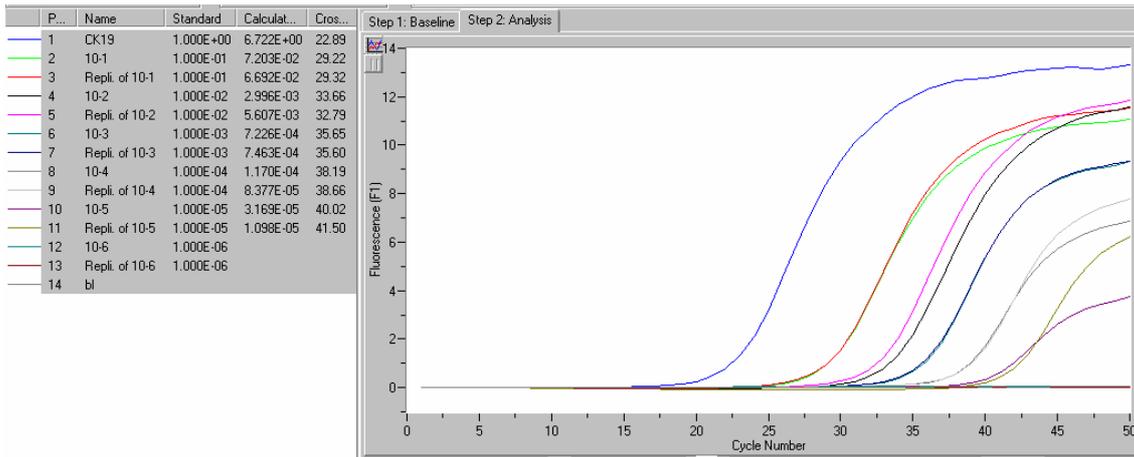


Figura 20: A modo de ejemplo se muestran los datos para las diluciones seriadas del transcrito de la K-19. En el recuadro de la izquierda aparecen las diluciones: sin diluir y en factores de 10 en 10 hasta la dilución 1/1000000 (cada dilución se testa por duplicado). Puede apreciarse como en la última de las diluciones no se detecta el transcrito a estudio.

2.10. Gen de referencia para la cuantificación.

La cuantificación del número de copias del transcrito analizado (K-19, HER-2, EGP-2, PS2 y P1B en nuestro caso) puede realizarse de varias maneras; nuestra elección fue expresarla de manera relativa respecto a un gen de referencia (Ver en Discusión: 2: Conceptos relativos al gen de referencia y a la cuantificación de transcritos de mRNA)

Pallisgaard *et al* [180] publicaron en la revista *Blood* en el año 2001 un estudio esponsorizado por el *Europe Against Cancer Program* (“Programa Europeo contra el Cáncer”) acerca de la idoneidad de diversos genes como genes de referencia. Los genes B-2 microglobulina, B-glucuronidasa y ABL fueron considerados como ideales. En la sección Discusión, en el apartado 2, se explican los conceptos relativos a la elección del gen de referencia.

Una aplicación importantísima del gen de referencia es testar la validez de las muestras: para la B-glucuronidasa, si en el ciclo 29 no se ha detectado fluorescencia específica, se asume que no hay suficiente RNA para detectar los transcritos a estudio y

la muestra se considera no válida (las razones de que una muestra no sea válida pueden ser múltiples, pero en general se debe a que durante el período de congelación (hasta 10 años para alguna de las muestras del presente estudio) el RNA se degrada). (Figura 21)

El gen de la B-glucuronidasa fue el utilizado, por ser de los tres genes válidos aquél para el que se tenía mayor experiencia de uso en nuestro laboratorio. Para su amplificación se usaron los cebadores y sondas Taqman descritos en la tabla 5.

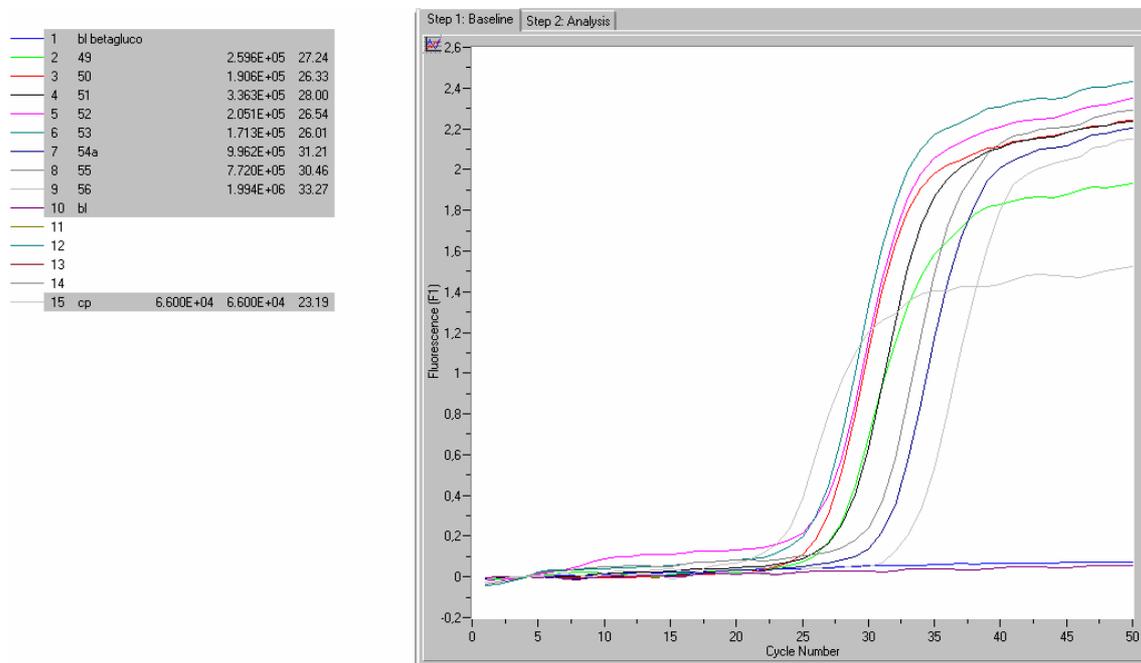


Figura 21: se ofrecen los resultados del Ct para GUS en 8 muestras, en un control positivo y en uno negativo. Como puede verse, en las muestras 54, 55 y 56, el Ct tiene lugar más tardíamente que en el ciclo 29; por tanto son muestras no válidas para el análisis por no tener mRNA suficiente.

2.11. Cuantificación relativa del número de copias de los transcritos a estudio.

El primer paso es calcular la eficiencia del proceso (una eficiencia de 2 implica que la cantidad de transcritos que estamos amplificando se dobla en cada ciclo; es la eficiencia óptima) Lo realiza el software del Light Cycler durante la fase exponencial del acúmulo de fluorescencia aplicando la fórmula:

$$E=10^{(-1/S)}$$

Siendo S la pendiente de la fase exponencial (*slope*). A modo de ejemplo la figura 22 muestra los datos para el cálculo de la eficiencia de uno de los transcritos.

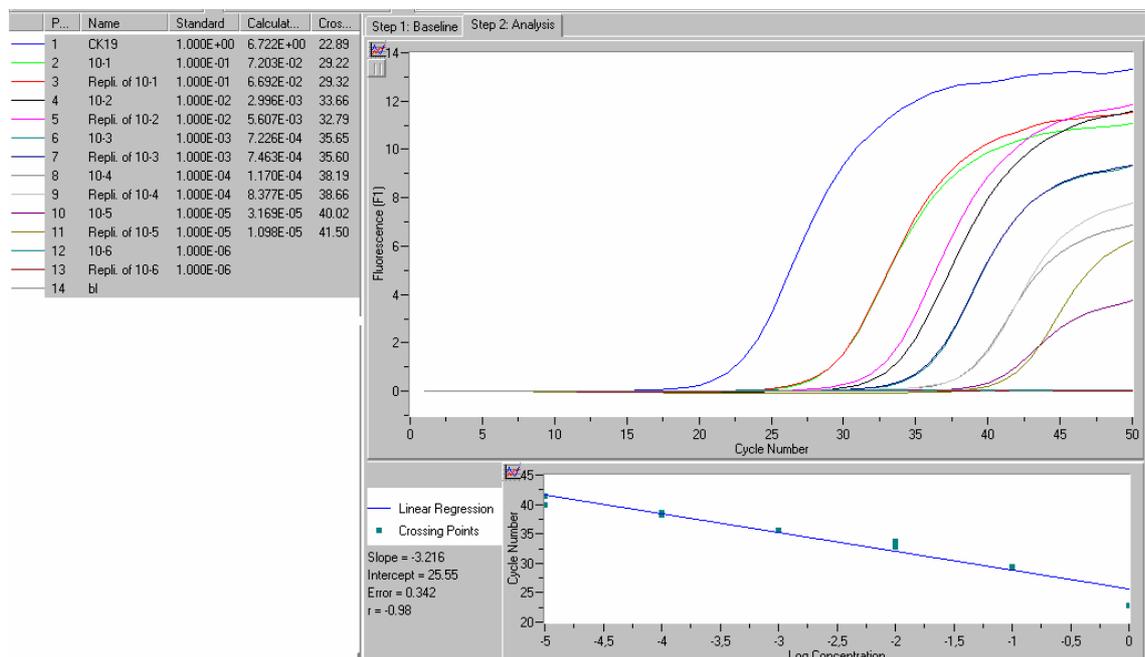


Figura 22: A modo de ejemplo se muestran los datos para el cálculo de la eficiencia de la PCR para K19.

La curva inferior muestra el Ct para cada dilución (las diluciones se muestran en el eje X en escala logarítmica). El valor de la pendiente es -3.216 como puede comprobarse en la imagen, por lo que, aplicando la fórmula mencionada, se obtiene una eficiencia de 2,03, muy próxima a la ideal.

El siguiente dato necesario es el Ct para cada transcrito a estudio y para GUS en cada muestra (realizado por el software del Light Cycler mediante el método de la segunda derivada; se basa en el hecho de que el máximo de la segunda derivada durante la fase exponencial de la curva de amplificación guarda una relación lineal con la concentración inicial de las moléculas de cDNA). Para obtener cada Ct debe analizarse cada transcrito en una sola reacción: así, para obtener los Ct de K19, HER-2, EGP2, PS2 y P1B y compararlos con el de GUS, han de hacerse 6 RT-PCR para cada muestra.

Por último, se calcula la razón o *ratio* de copias del gen a estudio respecto al número de copias de gen de referencia mediante la siguiente fórmula:

$$Ratio = (E_{target})^{(Ct_{ref} - Ct_{target})}$$

Siendo *Target* el transcrito a estudio, E la eficiencia y Ct, como se ha explicado, el punto de corte en el que la fluorescencia se detecta específicamente sobre el “ruido de fondo” para cada transcrito, tanto el de referencia como los de los genes a estudio.

3.-Consideraciones estadísticas.

Todos los test estadísticos comparativos fueron realizados a dos colas.

Los resultados se muestran con un máximo de tres decimales redondeados (ej: 0,0043 se mostraría como 0,004; 0,0045 se mostraría como 0005)

Los tiempos están calculados con decimales y no como “tiempos cumplidos”: por ejemplo, si una paciente fue operada el 3/8/1996 y su recaída se produjo el 31/8/97, no se tomará como valor de tiempo hasta la recaída 12 meses, sino 391 días, lo que equivale a 13,1 meses. Es un error muy frecuente en las publicaciones médicas el trabajo con tiempos cumplidos, que tiende a infraestimar los tiempos reales transcurridos. Los valores que aparezcan entre paréntesis inmediatamente después de los valores de los tiempos dados se referirán, salvo excepción que será convenientemente indicada, al intervalo de confianza al 95% de dicho tiempo para la población.

Se toma como tiempo de inicio para el seguimiento el primer instante en que cada paciente en concreto se queda libre de tumor; esto es, la fecha de la cirugía. Se define como momento de recaída la primera fecha en la que se objetiva enfermedad metastásica documentada por pruebas de imagen y/o anatomía patológica.

Para mostrar los resultados del seguimiento tanto de la cohorte globalmente como para comparar los seguimientos por subgrupos (análisis univariantes) en función de los desenlaces se utilizó el método de Kaplan-Meier. Todos los individuos “censurados” en nuestro estudio se produjeron por llegar al final del período de seguimiento sin presentar el desenlace. No tuvo lugar ninguna pérdida de seguimiento o *lost to follow up*. Tampoco tenemos noticia, a día de hoy, de que se haya producido ninguna muerte por una causa distinta al fenómeno en estudio. Treinta y seis (42,8%)

historias clínicas no presentaban datos de seguimiento por haberse enviado a nuestro hospital desde centros externos; los datos se completaron con entrevistas telefónicas con pacientes/familiares y médicos dichos centros, así como informes enviados por fax.

Respecto a la codificación de la variable “presencia de micrometástasis”: como se ha explicado, la detección de micrometástasis es un hecho probabilístico. A mayor número de genes que se expresen en cáncer de mama y no en sangre que utilicemos para buscarlas, más probabilidades tendremos de encontrarlas. De hecho, una célula diseminada puede no expresar todos los genes del panel puesto que la expresión génica tumoral varía muchísimo según las condiciones y además la población celular tumoral no es monoclonal, sino policlonal (un mismo paciente puede tener diferentes poblaciones celulares con diferentes expresiones génicas). Así, si separamos la información gen por gen estaríamos sesgando los resultados: por ejemplo, una paciente cuyas células diseminadas expresasen el P1B y no la K19, si hiciéramos un análisis en función de la expresión de K19, quedaría codificada como “sin micrometástasis” a pesar de tenerlas. Por ello, generaremos la variable ficticia categórica Micrometástasis (SI/NO), que dará una información global de la expresión de genes propios de cáncer de mama en sangre periférica. De hecho, se demostrará en los apartados subsiguientes cómo fragmentando la información gen por gen se pierde la potencia predictiva (y la significación estadística) de recaída y muerte para la presencia de transcritos de cáncer de mama en sangre periférica. También incluiremos un apartado de análisis multivariante en el que las variables definidoras de presencia de transcritos se introducirán con su valor crudo numérico, generando unos intervalos de confianza casi imposibles de interpretar. Por ello, hemos preferido trabajar con variables categóricas por su fácil interpretación práctica.

Es interesante recordar que este estudio está diseñado para detectar impacto pronóstico de un factor que hipotéticamente debe de ser muy potente (la presencia de micrometástasis invisibles al menos teóricamente debería de serlo). Los factores con gran impacto se pueden estudiar con cohortes relativamente pequeñas, como la nuestra. Sin embargo, para aseverar la importancia de factores con menos impacto se necesitan cohortes de gran tamaño (cientos-miles de pacientes). Esto es tanto más válido cuánto más interés tengamos en demostrar la independencia del factor a estudio del resto de los factores por los que haya que ajustar el análisis estadístico (por ejemplo: si queremos estudiar el valor de la presencia de receptores hormonales, debemos ajustar por la edad, porque una vez que tengamos el resultado no sabremos si se debe a la importancia propia de los fenotipos hormonales tumorales o a que unas determinadas edades se asocian con fenotipos hormonales más favorables como ocurre con el cáncer de mama en la mujer anciana, en general hormonodependiente y de evolución muy indolente). Quiere esto decir que para demostrar la importancia de los factores pronósticos poco potentes en análisis multivariantes, se precisan las cohortes de mayor tamaño.

En general, las cohortes que han demostrado la importancia de los receptores hormonales, grado tumoral, número de ganglios y otros factores, tienen un tamaño de unos 500-1000 pacientes. No es nuestra pretensión investigar de nuevo la importancia de dichos factores, sobradamente contrastados, pero sí queremos aportar pruebas de que nuestra cohorte es homogénea con el resto de las existentes y que no tiene lugar la presencia de factores pronósticos contradictorios con la literatura médica actual (por ejemplo, si en nuestra cohorte resultara que a mayor número de ganglios mejor pronóstico, obviamente los resultados carecerían de validez externa y no serían extrapolables a otras cohortes). Sin embargo, carecemos (por el tamaño de la cohorte) de la potencia estadística necesaria para demostrar la importancia de los factores

clásicos en análisis multivariantes, por lo que ofreceremos diversas pruebas univariantes en las que se demuestre que los factores clásicos se comportan al menos del modo coherente con los conocimientos existentes. Dichas pruebas incluyen:

-Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier estratificando las pacientes tanto para recaída como para supervivencia global por los factores pronósticos clásicos. Los factores que resulten significativos para supervivencia global por la prueba Log-Rank no serán comprobados para su influencia en recaída, puesto que se requiere más potencia para comprobar influencia en supervivencia. Se da por sentado que un factor que impacta en supervivencia lo hace en recaída, y de todos modos, es mucho más interesante para cualquier factor su impacto en supervivencia global que en recaída.

-Correlación de Pearson de los distintos factores pronósticos clásicos cuantitativos con la recaída y supervivencia (tanto en tiempos como en valores categóricos)

-Tablas de contingencia con porcentajes de recaídas y muertes estratificando a las pacientes por subgrupos definidos por los distintos factores clásicos categóricos.

-Comparación de medias de tiempos hasta la recaída y muerte en función de los distintos factores pronósticos. Esta prueba se evitará en la medida de lo posible: las variables de tiempo transcurrido en estudios biomédicos suelen ser muy asimétricas (no siguen la distribución normal); por ello el índice de tendencia central que mejor las resume es la mediana en lugar de la media. Sin embargo, el cálculo de diferencias entre medianas se realiza con pruebas no paramétricas, menos potentes que las paramétricas.

Estos tipos de prueba se han presentado por orden de importancia en cuanto a relevancia para interpretar factores pronósticos. Para cada factor se mostrará sólo la prueba más potente que haya dado un resultado positivo, no presentando los valores negativos, puesto que, como se ha dicho, nuestro objetivo no es hacer un estudio de los factores clásicos.

Otro de los objetivos nombrado en la sección 3 incluye la relación de los factores pronósticos clásicos con la presencia o ausencia de micrometástasis, para comprobar si dicha presencia se asocia a fenotipos tumorales particularmente agresivos en base a los factores pronósticos ya aceptados o es absolutamente independiente. Se utilizará para ello el estudio con el estadístico de Pearson o la prueba de Chi cuadrado en función de que se consideren las micrometástasis con su valor absoluto o codificadas como variable catagórica.

Es importante reseñar que respecto al HER-2 partimos con una limitación: unas 50 pacientes de este estudio fueron intervenidas quirúrgicamente en centros externos o antes del 1998, fecha en que se comenzó a realizar la prueba del HER-2 en los especímenes tumorales en nuestro hospital. Nos ha sido imposible recuperar todos los bloques de parafina del tumor primario; por ello contamos con 30 valores perdidos para el HER-2 en tumor. Las pruebas de análisis multivariante sistemáticamente excluyen aquéllos casos con valores perdidos. Si bien hemos realizado pruebas estadísticas incluyendo el HER-2, no las incluimos por no arrojar resultados suficientemente interesantes, debido a que obliga a trabajar con muy pocos pacientes y se pierde la mayoría de la información de nuestro estudio. Sin embargo ofreceremos pruebas de que el HER-2 se comporta del modo esperado en nuestra cohorte. No nos parece un punto crucial porque incluso en estudios internacionales a gran escala, se cuestiona la importancia del HER-2 en análisis multivariantes, ya que tiende a asociarse con otras

características de mal pronóstico, como la presencia de más ganglios axilares o la negatividad de los receptores hormonales.

El fin último de nuestro estudio es demostrar la importancia independiente del resto de los factores de la presencia de células tumorales circulantes, con implementación del tiempo en el modelo multivariante (supuesto dos subgrupos, A y B, y que en A ocurran un 30% de recaídas y en B un 25%; no es comparable si no se incluye el tiempo: la diferencia pronóstica será mayor si los de A ocurren en 3 meses y los de B en 5 años que si los de A ocurren en 6 años y los de B en 5). Para ello, la prueba elegida es el *Cox's proportional hazards model*. También este modelo se utilizará para comprobar si el peor resultado de ciertas pacientes sometidas a trasplante se explica por la presencia de células tumorales circulantes HER-2 positivas (ver secciones Hipótesis de trabajo y Objetivos). Para hallar los coeficientes correspondientes a cada variable, se permitirá al programa SPSS trabajar con todas las variables sin descartarlas del modelo final en función de su grado de significación. Existen varios métodos de introducción de variables al modelo: los modelos “hacia delante” que parten de un modelo con una sola variable e introducen las siguientes en función de unos criterios de significación estadística acotados por el usuario; los modelos “hacia atrás” que parten del modelo con el máximo número de variables y las retiran progresivamente en función de la significación estadística, y el modelo “introducir” que genera un modelo con todas las variables que el usuario desea comprobar. Los dos primeros tipos de modelos (en los que la significación estadística que funcione de delimitador puede acotarse tanto desde el estadístico de Wald como en función de la razón de verosimilitud) se utilizan para generar nomogramas que serán empleados con fines predictivos en series de casos. El modelo de introducción de todas las variables permite investigar el “peso” de cada factor, y es el que se emplea cuando se

desconoce todavía la significación teórica de cada variable. Una vez que se conoce por diferentes estudios el peso de cada variable puede ya procederse a utilizar un modelo para distintas series de pacientes o casos, y aquí sí tendría sentido optimizar el modelo al máximo para obtener el mayor poder predictivo con el menor número de predictores (lo que se conoce en estadística como “modelo parsimonioso”). Nuestro estudio pretende investigar la importancia y significación estadística de cada factor, por lo que los modelos se diseñarán con todos los predictores. Asimismo, para maximizar el uso de la información disponible, se categorizará el menor número de variables posibles (la división en categorías de una variable cuantitativa continua o discreta genera pérdida de información, aunque su análisis sea más cómodo de esta segunda forma; se encontrará información adicional a este respecto en el apartado de Discusión).

Creemos pertinente recordar ciertos aspectos fundamentales sobre la interpretación de la regresión de Cox. Se trata de un modelo que permite saber en qué medida una serie de predictores (cuantitativos o categóricos) influyen en un resultado como puede ser supervivencia global o recaída. No se trata sólo de saber el efecto sobre dicho resultado tras un tiempo concreto de seguimiento, sino de valorar cuál es el efecto de cada variable sobre la función de supervivencia a lo largo de todo el período de seguimiento, sea cual sea el punto temporal que se elija para la comparación (de otro modo estaríamos hablando sólo de un desenlace dicotómico (vivo/no vivo) y en ese caso sería suficiente un análisis de regresión logística). Sólo la regresión de Cox permite afirmar que un resultado (p.ej. tiempo de supervivencia) es más ventajoso para un factor determinado, (p.ej. mejor o peor supervivencia en función de presencia o ausencia de micrometástasis a igualdad de edad, número de ganglios, receptores hormonales y tamaño tumoral) puesto que ajusta por el resto de los factores que intervienen en dicho resultado.

La función de Cox sigue en general la ecuación:

$$\ln(\lambda_t) = B_1X_1 + B_2X_2 + \dots + B_nX_n$$

Donde λ_t es el riesgo de fallecer más allá de un instante cualquiera "t", X son los distintos predictores (p.ej., número de ganglios, presencia o ausencia de micrometástasis,...) y B son los coeficientes numéricos para cada predictor. De este modo, el riesgo de fallecer en el instante T sería:

$$\lambda_t = \lambda_0 e^{B_1X_1 + B_2X_2 + B_nX_n}$$

Se interpreta como λ_0 el riesgo basal cuando todos los factores pronósticos independientes valen cero.

Lo más interesante que nos ofrece la regresión de Cox es que para un predictor de carácter dicotómico, en el que tome el valor 0 para los no expuestos y el valor 1 para los expuestos, la razón de riesgos para presentar el desenlace a estudio vale e^B

(de tratarse de una exposición cuantitativa habría que elevar e al coeficiente B, pero multiplicando B por el incremento de unidades cuyo riesgo queremos estimar; por ejemplo si se tratara de $B = 1,5$ para el tamaño del tumor y quisiéramos investigar el riesgo de los tumores de 5 centímetros respecto a 2, habría que elevar e a 4,5) Esta razón de riesgos se interpreta como razón de densidades de incidencia, o número de eventos por persona y unidad de tiempo. Así, si $B = 1,5$, la razón de densidades de incidencia para presentar el evento en los expuestos al factor frente a los no expuestos vale 4,48; lo que es lo mismo, en una unidad de tiempo se producen 4,48 eventos en el grupo de expuestos por uno en el de no expuestos.

Por último, para comprobar si existe relación de los factores pronósticos clásicos con la presencia de micrometástasis en sangre periférica, se realizará de dos maneras diferentes en función si los predictores son categóricos o cuantitativos. Así, para testar

si existe relación entre presencia o ausencia de receptores hormonales y presencia o ausencia de micrometástasis, la prueba adecuada es una tabla de contingencia con el estadístico Chi-cuadrado. Por el contrario, para relacionar un predictor cuantitativo como es el tamaño tumoral en centímetros con la presencia o ausencia de micrometástasis, es preciso aplicar un modelo de regresión logística. En ella, los coeficientes B al elevarse a e no se interpretan como razón de densidades de incidencia sino como razones de riesgo, pues no se incluye el impacto temporal en la función logística.

V. Resultados

1. Tratamiento.

1.1. Tratamientos administrados.

Todas las pacientes recibieron quimioterapia previamente al trasplante autólogo, 15 de ellas (17,8%) en régimen neoadyuvante por considerarse su tumor inoperable de inicio. En estos 15 casos el régimen consistió en FEC X 3 pre-cirugía y FEC X 3 post-cirugía. A los 69 (82,14%) casos restantes se les administró quimioterapia adyuvante, siendo FEC X 6 en 55 (65,48%) casos y AC X 4 – T X 4 en 14 (16,67%).

La cirugía fue completa (márgenes negativos de 0.5-1 cm) en el 100% de los casos. Se procedió a mastectomía radical modificada en 59 (70,24%) casos y tumorectomía más vaciamiento axilar en el resto.

Todas (100%) las pacientes recibieron 45 Gy de radioterapia sobre lecho y cadenas ganglionares.

Cincuenta (59.52%) pacientes recibieron tamoxifeno adyuvante de acuerdo con su fenotipo hormonal. La duración mediana (en meses) de dicho tratamiento fue de 48 (límites del intervalo: 1-60) meses. En principio la indicación se pauta durante 60 meses; sin embargo en 31 casos se suspendió al producirse la recaída de la enfermedad y cambio de tratamiento. Sólo en 1 caso se suspendió por intolerancia, a los 4 meses de iniciarse.

Ochenta y cuatro pacientes (100%) recibieron 1 ciclo de STAMP-V

1.2. Toxicidad registrada.

Las tablas 6, 7 y 8 muestran un resumen de las toxicidades más relevantes observadas, para las pacientes que recibieron FEC, AC-Taxol y por último las toxicidades observadas en la administración de STAMP V.

Tabla 6. Resumen de toxicidad observada en los 420 FEC administrados.

Toxicidad	Incidencia (en porcentaje %) sobre el total de ciclos administrados
Emesis (Grado III/IV)	(13,09/3,57)
Diarrea (Grado III/IV)	(1,12/0)
Neutropenia * (afebril/febril)	(16,67/1,9)
Alopecia (Grado III)**	55,9
Toxicidad cardíaca ***	0
Mucositis (Grado III/IV)	(1,90/0,2)
Muertes Tóxicas	0

*Sólo se incluyen neutropenias GIII o GIV; el resto son irrelevantes.

**No existe Grado IV: alopecia total es GIII. Obviamente la alopecia no se repite ciclo tras ciclo, y por tanto la cifra mostrada se refiere al total de pacientes que sufrieron alopecia grado III.

***La toxicidad cardíaca del FEC x 6 (disminución de FEVI) es, según series, 1-5%. Sin embargo, para ser sometidas a trasplante, uno de los criterios es la presencia de FEVI dentro de límites normales. Por tanto, en nuestra serie sólo se incluyen pacientes que no presentaron toxicidad cardíaca con FEC; en el mismo período de tiempo se trataron otras pacientes que posteriormente no pudieron ser sometidas a trasplante por presentar disminución de la FEVI por debajo del 45%.

Tabla 7. Resumen de la toxicidad producida por AC-Taxol (112 ciclos).

Toxicidad	Incidencia (en porcentaje %) sobre el total de ciclos administrados
Emesis (Grado III/IV)	(6,25/0,89)
Diarrea (Grado III/IV)	(0,89/0)
Neutropenia * (afebril/febril)	(10,18/2,6%)
Alopecia (Grado III)**	85
Toxicidad cardíaca ***	0
Mialgias (Grado III)	5,37
Neuropatía sensitiva (Grado III/IV)	5,37
Motora (Grado III/IV)	0
Mucositis (Grado III-IV)	(2,6/0)
Muertes Tóxicas	0

*Sólo se incluyen neutropenias GIII o GIV; el resto son irrelevantes.

**De nuevo se refiere al porcentaje de pacientes, y no al número de ciclos, que presentaron alopecia total con este régimen (12 de 14 pacientes)

***Para la toxicidad cardíaca es aplicable el comentario de la tabla anterior.

Tabla 8. Resumen de la toxicidad producida por STAMP V (84 ciclos)

Toxicidad	Incidencia (en porcentaje %) sobre el total de ciclos administrados
Emesis (Grado III ó IV)*	51,19
Diarrea (Grado III ó IV)*	23,8
Infección de catéter central	9,52
Tromboembolismo pulmonar	3,57
Enterocolitis neutropénica	1,19
Neutropenia (afebril/febril)	(1,12/98,80)
Deterioro Creatinina (Grado III)*	2,38
Enfermedad venooclusiva hepática	2,38
Mucositis (Grado III ó IV)*	45,23
Muerte Tóxica**	1,19

*En casos como el trasplante autólogo la toxicidad gastrointestinal es más difícil de tipificar, dado que, por la gravedad del paciente en general tiende a instaurarse la nutrición parenteral con más antelación que en pacientes ambulatorios. Posiblemente un número de pacientes que recibieron nutrición parenteral (hecho que define que la toxicidad gastrointestinal sea GIV) no la hubieran recibido de no tratarse de pacientes en trasplante. Por ese motivo se presenta una sola cifra, que es la que corresponde al porcentaje de pacientes que recibió nutrición parenteral debido a toxicidad gastrointestinal. Los porcentajes suman más del 100%, dado que en muchos pacientes los motivos de instauración de nutrición parenteral eran más de uno (p.ej. emesis y diarrea).

**Una paciente que padeció enfermedad venooclusiva hepática desarrolló fracaso renal y fallo multiorgánico refractario a pesar de su ingreso en UCI, falleciendo al tercer día de cuidados intensivos.

En cuanto a la recuperación hematológica tras el ciclo de STAMP V, los días transcurridos desde la infusión de los progenitores hematopoyéticos son (mediana-límites del intervalo):

-recuperación hasta >500 neutrófilos /mm³: 10 (8-21)

-recuperación hasta >20000 plaquetas /mm³ con independencia de transfusión: 13 (9-26)

No se produjeron toxicidades dignas de mención durante la radioterapia ni durante la administración de hormonoterapia adyuvante, salvo 1 abandono de hormonoterapia motivado por intolerancia digestiva (1,19%).

2.-Seguimiento, recaídas y supevivencia.

2.1.-Seguimiento.

La cohorte fue seguida durante una mediana de tiempo de 68,3 meses (límites del intervalo: 6-103)

2.2. Recaídas.

La figura 23 muestra la curva de Kaplan-Meier para el evento “recaída”. Un total de 47 pacientes presentaron el evento (56%). Se aprecia en diagrama de caja de la figura 24 que la mediana del tiempo hasta la recaída en las pacientes que recaen es de 21 meses; las pacientes que al final del seguimiento se encontraban vivas y libres de enfermedad se representan en la figura 24 en el valor $X=0$ y fueron seguidas por un tiempo mediano de 82 meses. El tiempo a la recaída global (mediana de toda la serie) (observado en el punto en que la función de Kaplan-Meier vale 0,5) es de 66,0 meses.

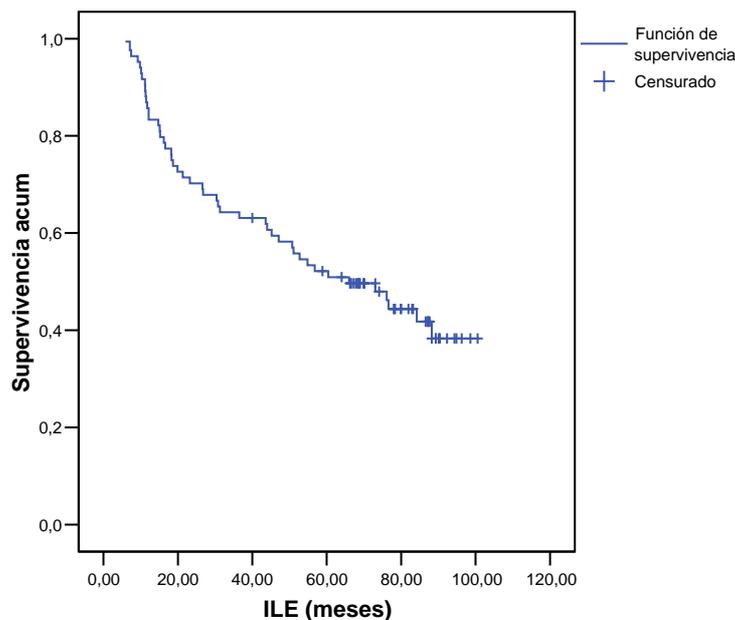


Figura 23: curva de Kaplan-Meier para tiempo hasta la recaída.

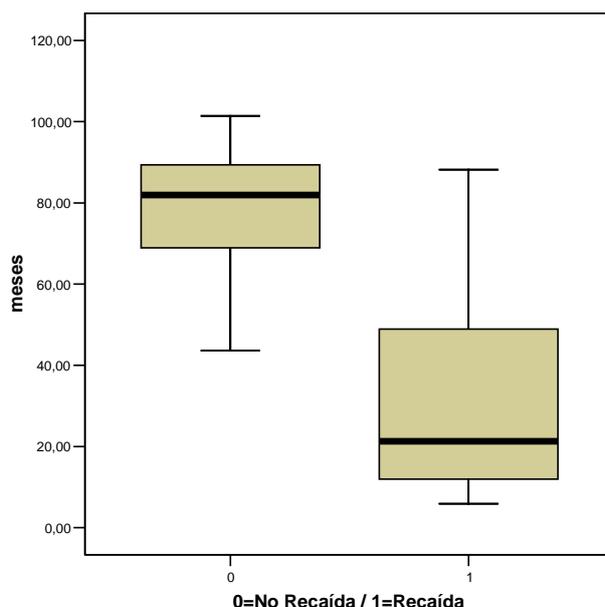


Figura 24: Diagrama de caja de tiempo de seguimiento hasta la recaída, en pacientes sin recaída (0) (por tanto equivalente a tiempo total de seguimiento) y con recaída (1)

2.3. Supervivencia.

La supervivencia mediana no se alcanzó a lo largo del seguimiento (en la figura 25 se aprecia cómo la función de supervivencia no llega a alcanzar el valor 0,5); la supervivencia media fue de 74,52 meses. Se produjeron un total de 35 fallecimientos (41,7%). La figura 26 muestra las medianas y los cuartiles 1 y 3 del tiempo de seguimiento en función de fallecimiento

Al final del período de seguimiento, el estado de las pacientes es el siguiente:

- 36 pacientes (42,8%) vivas sin enfermedad
- 13 pacientes (15,47%) vivas con recaída
- 35 pacientes (41,7%) muertas

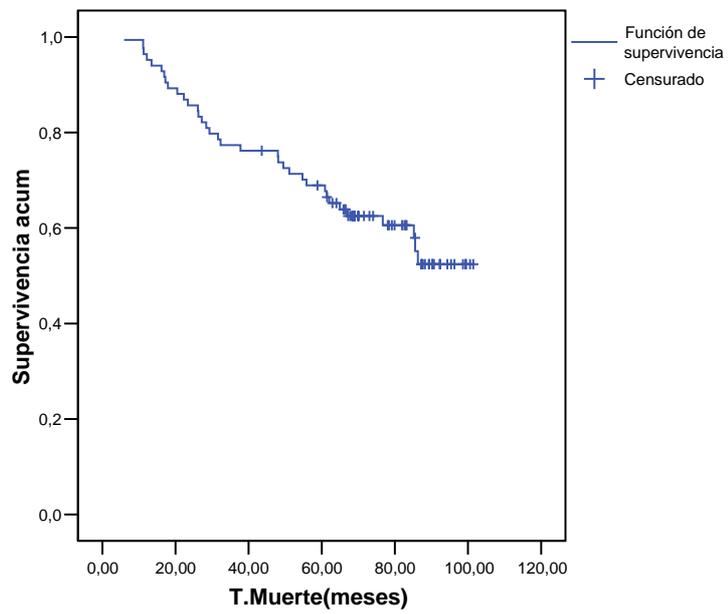


Figura 25: curva de Kaplan-Meier para supervivencia global.

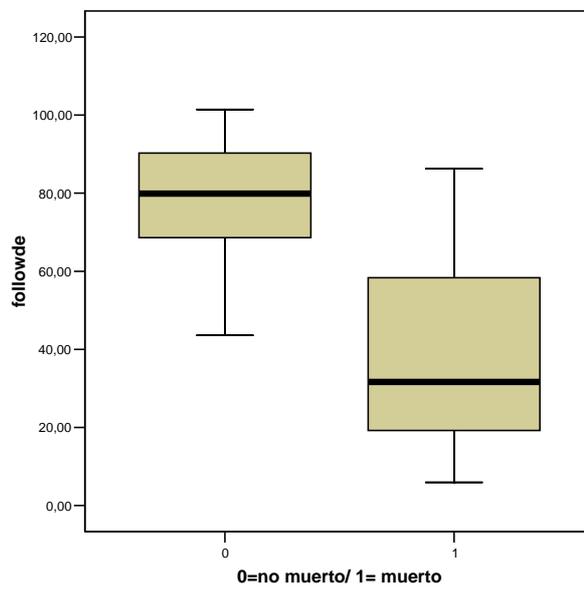


Figura 26: Diagrama de caja de tiempo de seguimiento en función de supervivencia.

3.-Determinaciones de los transcritos K19, HER-2, EGP2, PS2, P1B y GUS.

3.1. Eficiencia de la PCR.

La tabla 9 muestra la eficiencia de la PCR para cada transcrito. El gen PS2 no se consiguió amplificar en la línea celular control HC-1143. El Ct para dicho gen en varias pruebas realizadas, con la línea celular sin diluir, fue superior al ciclo 40, no pudiéndose descartar por tanto que se tratara de amplificación inespecífica.

Adquirimos una segunda línea celular (MCF-7) de cáncer de mama. Tampoco conseguimos tener certeza absoluta de que los transcritos de PS2 se amplificaban con el kit comercial adquirido. El Ct en esta ocasión se producía más allá del ciclo 35; teniendo en cuenta que para el resto de los genes se producía alrededor del ciclo 24 en la primera dilución (datos no mostrados; como se ha explicará en la sección de Discusión, apartado 2: Conceptos relativos a la cuantificación, la realización de la PCR en un control positivo sólo se realizó para comprobar que funcionaba correctamente. Para la cuantificación únicamente es necesaria la eficiencia de la PCR) Como se aprecia más adelante, tampoco obtuvimos resultados positivos para PS2 en ningún paciente. Se discuten en el apartado Discusión las diversas posibilidades subyacentes a este hecho.

Por todo lo explicado, no se puede ofrecer el valor de la eficiencia de la PCR para el PS2.

Tabla 9. Resultados de la eficiencia de la PCR para cada gen.

Gen	Eficiencia
K19	2,046
HER-2	1,743
EGP2	2,21
PS2	No procede
P1B	1,96

3.2. Valor del Ct. para GUS en cada muestra: muestras válidas.

Se ha explicado en el apartado 2.10 de la sección Material y Métodos que las muestras en las que el Ct. de Gus fuera superior al ciclo 29 no son válidas para el estudio. La tabla 10 muestra el valor de GUS para la muestra de cada paciente. Las muestras de 14 pacientes (16,67%) habían sufrido una degradación tal del RNA (objetivado por un Ct. para GUS >29) que sus muestras fueron desechadas para el análisis.

Tabla 10. Valor del Ct de Gus para cada paciente (PAC)

Pac.	Gus	Pac.	gus	Pac.	Gus	Pac.	GUS
1	27,800	22	27,250	43	25,860	64	26,550
2	28,720	23	24,810	44	25,830	65	28,190
3	22,830	24	>29	45	>29	66	>29
4	27,600	25	28,000	46	28,620	67	26,270
5	27,210	26	28,790	47	25,650	68	>29
6	28,960	27	28,690	48	26,460	69	26,010
7	25,490	28	27,490	49	25,150	70	26,590
8	28,580	29	27,420	50	26,210	71	26,010
9	28,640	30	>29	51	28,520	72	24,640
10	28,000	31	>29	52	26,800	73	26,700
11	26,530	32	>29	53	28,000	74	25,720
12	>29	33	>29	54	28,200	75	26,130
13	27,990	34	28,990	55	28,870	76	26,510
14	>29	35	>29	56	24,820	77	27,270
15	>29	36	27,790	57	28,080	78	>29
16	23,940	37	25,690	58	27,550	79	26,200
17	26,000	38	27,610	59	25,830	80	26,250
18	24,940	39	26,540	60	24,560	81	>29
19	25,820	40	28,000	61	27,860	82	26,600
20	28,270	41	26,330	62	24,510	83	24,650
21	27,250	42	27,240	63	26,790	84	24,550

3.3. Valores por paciente de cada transcrito a estudio respecto al gen de referencia.

Se ha explicado en el apartado 2.11 de la sección Material y Métodos que la cuantificación relativa precisa de los datos de la eficiencia de la PCR (mostrados en la tabla 7) y del valor del Ct GUS en cada muestra. A modo de ejemplo se ofrecen (figura 27) los datos del valor del Ct Gus para las muestras en que resultó positivo el gen EGP2

y los datos del Ct de Gus en esas mismas muestras. Es importante advertir que las numeraciones que genera el programa del Light Cycler no tienen nada que ver con la numeración de los pacientes; en cada tanda de PCR se analizan hasta 32 muestras simultáneamente que se numeran consecutivamente de cada vez empezando desde el 1; posteriormente ha de ser cotejada la identificación de cada muestra con el número de paciente real, que no es el número asignado por el programa.

La tabla 11 muestra los valores definitivos de cada transcrito en sangre periférica para cada paciente. Los valores en blanco corresponden a las pacientes cuya muestra fue desechada para el análisis por presentar un Ct para GUS mayor de 29.

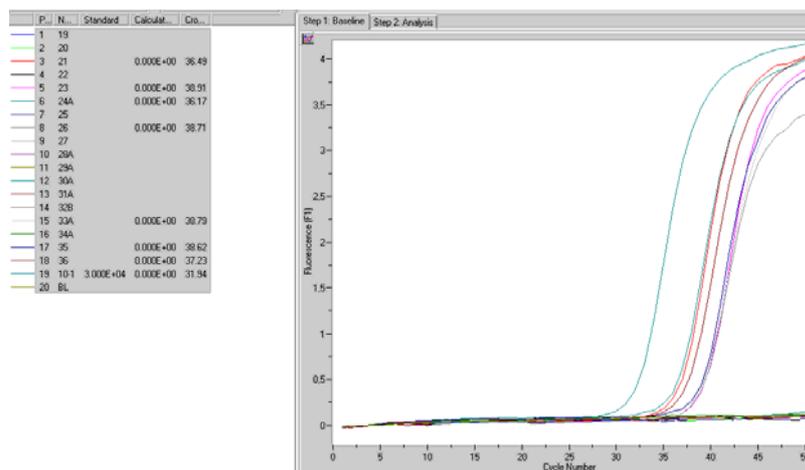
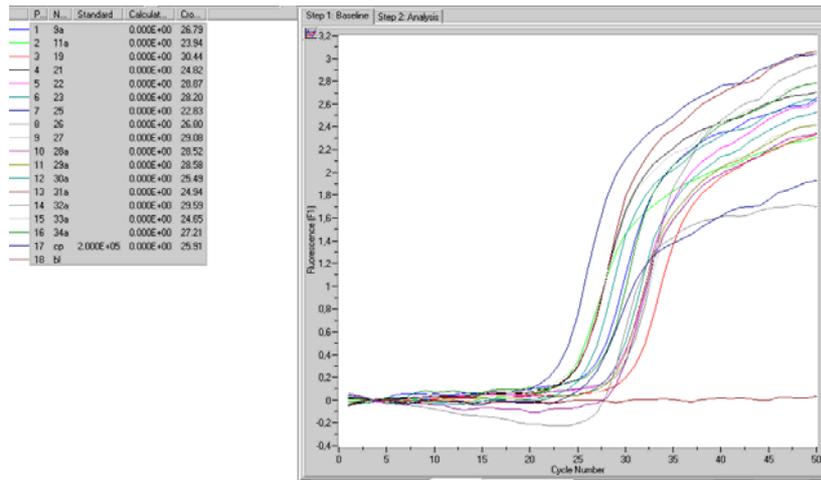


Figura 27: Ejemplo de los valores del Ct de GUS y de EGP 2 en muestras apareadas (valor de GUS y de EGP calculados en la misma muestra en reacciones distintas). Con dichos valores, el valor de la eficiencia (mostrado en la tabla 7) y la ecuación explicada en el apartado 2.11. de la sección Material y Métodos, se obtiene el valor cuantitativo para el gen a estudio en cada muestra. En la práctica no es necesario hacer estos cálculos pues el software del Light Cycler los ofrece automáticamente.

Tabla 11: Valores cuantitativos de cada transcrito por paciente*

Paciente	K19	HER2	EGP2	PS2	P1B	Paciente	K19	HER2	EGP2	PS2	P1B
1	,000000	,000000	,000800	,0000	,000000	43	,000000	,000000	,003200	,0000	,000000
2	,000000	,000000	,000000	,0000	,000000	44	,000000	,000000	,000000	,0000	,020000
3	,000000	,000000	,000000	,0000	,000000	45					
4	,000000	,000000	,000000	,0000	,000000	46	,000000	,000000	,000000	,0000	,000000
5	,000000	,000000	,000000	,0000	,000000	47	,000000	,000000	,000000	,0000	,000000
6	,000680	,000000	,000000	,0000	1,790000	48	,000000	,000000	,000000	,0000	,370000
7	,000000	,000000	,000000	,0000	,000000	49	,000000	,000000	,000400	,0000	,000000
8	,000000	,000000	,000000	,0000	,000000	50	,000000	,053000	,000300	,0000	,000000
9	,000000	,000000	,000000	,0000	,000000	51	,000000	,000000	,000000	,0000	,370000
10	,000000	,000000	,000000	,0000	,000000	52	,000000	,000000	,000500	,0000	,000000
11	,000000	,000000	,000000	,0000	,000000	53	,000000	,000000	,006000	,0000	,000000
12						54	,000000	,000000	,001000	,0000	,000000
13	,000000	,000000	,000000	,0000	,000000	55	,000000	,000000	,000000	,0000	,400000
14	,000000	,000000	,000000	,0000	,000000	56	,000000	,000000	,000600	,0000	,080000
15	,000000	,000000	,000000	,0000	,000000	57	,000000	,000000	,000000	,0000	,000000
16	,000000	,000000	,000000	,0000	,000000	58	,000000	,000000	,000500	,0000	,000000
17	,000000	,000000	,000000	,0000	,290000	59	,000000	,000000	,000000	,0000	,000000
18	,000000	,057000	,000000	,0000	,000000	60	,000000	,000000	,000100	,0000	,000000
19	,000000	,017000	,000000	,0000	,290000	61	,000000	,000000	,000000	,0000	,000000
20	,000000	,000000	,000000	,0000	,000000	62	,000000	,000000	,000000	,0000	,000000
21	,000000	,000000	,000000	,0000	,000000	63	,000000	,000000	,000000	,0000	,000000
22	,000580	,000000	,000600	,0000	,000000	64	,000000	,000000	,004000	,0000	,000000
23	,000000	,000000	,000000	,0000	,020000	65	,000000	,000000	,000000	,0000	,000000
24						66					
25	,000000	,000000	,000000	,0000	,000000	67	,000620	,000000	,000900	,0000	,000000
26	,000000	,000000	,000000	,0000	,330000	68					
27	,000000	,000000	,000000	,0000	,250000	69	,000000	,000000	,001200	,0000	,000000
28	,000000	,000000	,000150	,0000	,000000	70	,000000	,000000	,000000	,0000	,000000
29	,000000	,000000	,000500	,0000	,000000	71	,000000	,000000	,000000	,0000	,000000
30						72	,000000	,000000	,000600	,0000	,000000
31						73	,000000	,000000	,001800	,0000	,000000
32						74	,000000	,000000	,000000	,0000	,000000
33						75	,000000	,000000	,000000	,0000	,000000
34	,000000	,000000	,003400	,0000	,000000	76	,000000	,000000	,000300	,0000	,000000
35						77	,000000	,000000	,000000	,0000	,000000
36	,000000	,000000	,000000	,0000	,000000	78					
37	,000000	,000000	,000000	,0000	,000000	79	,000000	,000000	,000000	,0000	,000000
38	,000000	,000000	,000000	,0000	,130000	80	,000000	,012000	,000000	,0000	,000000
39	,000000	,087000	,000000	,0000	,000000	81					
40	,000000	,000000	,004000	,0000	,000000	82	,000000	,000000	,000000	,0000	,000000
41	,000000	,013000	,000000	,0000	,000000	83	,000000	,000000	,000100	,0000	,000000
42	,000000	,000000	,001500	,0000	,000000	84	,000000	,015000	,002000	,0000	,000000

*Se ofrecen los resultados en forma de listado para evitar complicaciones en su consulta debidas a las líneas de las tablas.

3.4. Micrometástasis. Intervalo de confianza para la población.

La tabla 12 ofrece finalmente los datos de qué pacientes sufrían la presencia de micrometástasis en sangre periférica de acuerdo con los criterios expuestos en “consideraciones estadísticas”

Tabla 12: Pacientes afectados de micrometástasis*.

Pac	Mic										
1	0	15	.	29	1	43	1	57	0	71	0
2	0	16	0	30	.	44	1	58	1	72	1
3	0	17	1	31	.	45	.	59	0	73	1
4	0	18	1	32	.	46	0	60	1	74	0
5	0	19	1	33	.	47	0	61	0	75	0
6	1	20	0	34	1	48	1	62	0	76	1
7	0	21	0	35	.	49	1	63	0	77	0
8	0	22	1	36	0	50	1	64	1	78	.
9	0	23	1	37	0	51	1	65	0	79	0
10	0	24	.	38	1	52	1	66	.	80	1
11	0	25	0	39	1	53	1	67	1	81	.
12	.	26	1	40	1	54	1	68	.	82	0
13	0	27	1	41	1	55	1	69	1	83	1
14	.	28	1	42	1	56	1	70	0	84	1

*Se ofrecen en forma de listado para facilitar su lectura. Pac = Paciente. Mic = micrometástasis (0=no/1=si).

Presentan micrometástasis el 45,7% de las pacientes con muestra analizable. El intervalo de confianza al 95% para la verdadera proporción de pacientes que presentarían micrometástasis en la población de pacientes con cáncer de mama de alto riesgo sometidas a HDCT es 34,0%-57,4%.

4.-Comprobación del impacto de los factores clásicos.

En este apartado ofrecemos los resultados obtenidos en nuestra cohorte para el impacto de las variables que hoy por hoy se acepta que tienen importancia pronóstica: estado de los receptores hormonales, edad, número de ganglios, grado tumoral, estado HER-2 en tumor, recepción o no de Taxol y tamaño tumoral. No se mostrará en este apartado ningún resultado del impacto del hallazgo de micrometástasis.

4.1. Pruebas de Kaplan-Meier.

Las figuras 28 a 30 incluyen los resultados del análisis de supervivencia de los factores que con la prueba Log Rank han resultado significativos.

En la figura 28 se puede comprobar como la presencia de más de 10 ganglios afecta empeora el pronóstico respecto a la invasión de menos de 10. Las medias de supervivencia son 70,7 (61,2-80,2) vs 87,3 (82,1-92,6) meses. No pueden compararse las medianas por ya que en el grupo de menos de 10 ganglios no se alcanzó la mediana (50% de fallecimientos) durante el tiempo de seguimiento. Valor Log Rank 4,41; $p=0,0357$.

Respecto a los receptores hormonales, también se alcanza importante significación estadística para su impacto en supervivencia como se observa en las figuras 29 y 30. De nuevo no pueden compararse medianas por no haber tenido lugar un 50% de eventos en el grupo de buen pronóstico para ER durante el tiempo de observación: la media de supervivencia para las pacientes con receptores positivos respecto a negativos es 82,29 (74,37-90,20) vs 60,74 (48,07-73,41) meses. Para PR (positivo/negativo; medias): 85,49 (77,47-93,51) vs 61,71 (50,54-72,88) meses. Los valores para la prueba de Log Rank son 5,70 ($p=0,017$) y 8,22 ($p=0,004$).

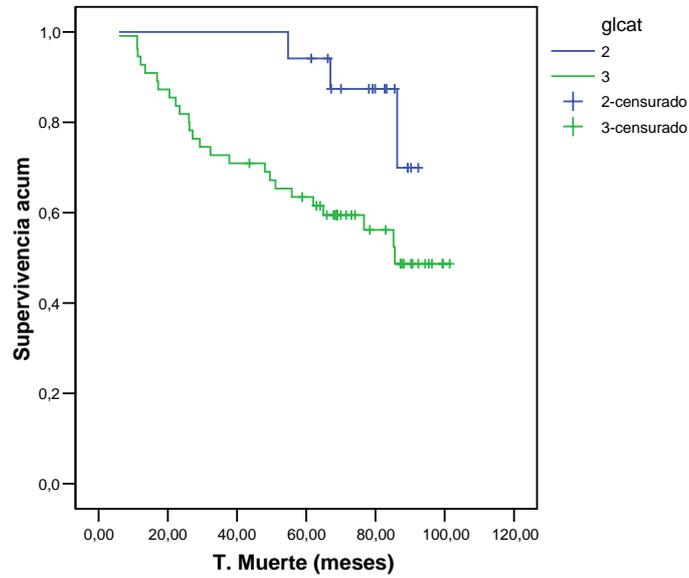


Figura 28: función de supervivencia de los subgrupos de pacientes con más o menos de 10 ganglios afectados. La variable “glat” toma el valor 3 para más de 10 ganglios y 2 para 10 ó menos.

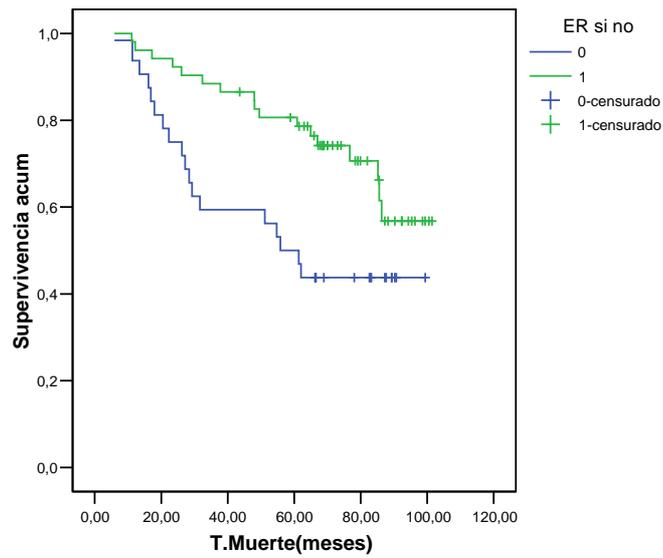


Figura 29: Función de supervivencia para sugrupos determinados por receptor de estrógenos.

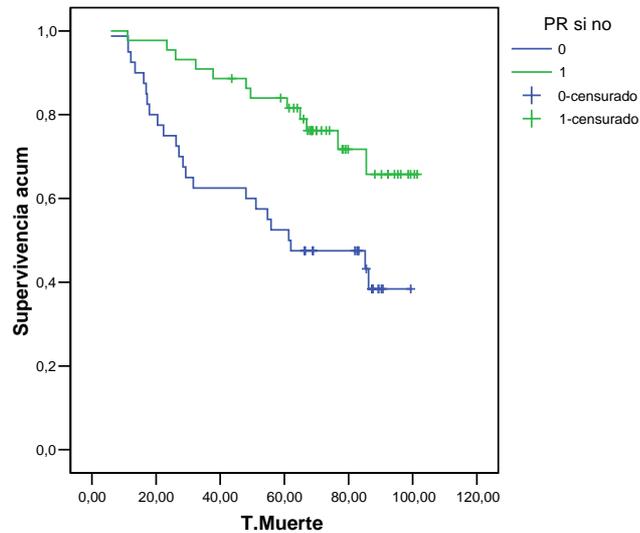


Figura 30: Función de supervivencia para subgrupos determinados por receptor de progesterona.

La expresión del HER-2 en tumor (positiva vs negativa) no alcanza significación estadística para impacto pronóstico en la recaída o en la muerte. Lo mismo ocurre para el grado tumoral (grado 3 vs grado 2 (no hay casos de grado 1 en nuestra serie)). No se muestran los datos.

4.2. Correlaciones de variables cuantitativas con el tiempo hasta la recaída o muerte.

De todas las variables consideradas (excepto las que atañen a la presencia de micrometástasis), las únicas cuantitativas y por tanto susceptibles de ser analizadas con el estadístico de Pearson, son el número de ganglios y el tamaño tumoral en centímetros. La prueba de Kaplan Meier, más importante que la de Pearson, ha resultado significativa para el número de ganglios, por lo que no tiene sentido mostrar el estadístico de Pearson. El tamaño tumoral en centímetros, como se verá, presenta impacto pronóstico estadísticamente significativo incluso en el modelo multivariante de

Cox final que incluye las variables relacionadas con la presencia de micrometástasis, por lo que carece de interés en este apartado.

4.3. Tablas de contingencia de variables categóricas y desenlace categórico recaída/no recaída o muerte/no muerte. Prueba de Chi cuadrado.

Además de las variables categóricas ER y PR, resta por comprobar el impacto del grado tumoral, el estado del HER-2 en tumor y la recepción o no de Taxol. Es importante mencionar que el grado en este estudio puede utilizarse como categórico dado que no hay ninguna paciente cuyo tumor fuera grado 1. Las tablas 13-15 son las tablas de contingencia exportadas del SPSS para el evento recaída. Los valores del estadístico Chi Cuadrado son 0,111 ($p=0,739$), 2,71 ($p=0,09$), 0,195 ($p=0,659$). Como se aprecia, solo la expresión de HER-2 considerada de forma categórica alcanza significación estadística “*borderline*”.

No se incluyen las tablas de contingencia que relacionan las variables comentadas con la variable categórica Muerte, puesto que tanto los valores de la Chi Cuadrado y por ende su significación estadística son todavía menores.

Tablas 13, 14 y 15: Tablas de contingencia importadas de SPSS para las variables Grado, Expresión del HER-2 y Recepción de Taxol y su relación con la variable categórica Recaída.

Tabla de contingencia

Recuento

	Grado		Total
	2	3	
NoRec 0	15	22	37
Rec 1	17	29	46
Total	32	51	83

Tabla de contingencia

Recuento

	HERCAT		Total
	,00	1,00	
No Rec 0	6	12	18
Rec 1	16	12	28
Total	22	24	46

Tabla de contingencia

Recuento

	Taxol S/N		Total
	0	1	
NoRec 0	32	5	37
Rec 1	39	8	47
Total	71	13	84

5.-Análisis del impacto pronóstico de la presencia de micrometástasis.

5.1. Pruebas de Kaplan Meier.

5.1.1. Análisis de supervivencia considerando la presencia de micrometástasis como variable categórica.

La figuras 31 y 32 muestran las curvas de supervivencia según el método de Kaplan Meier dividiendo la serie de pacientes en dos grupos: grupo “0” o sin presencia en sangre periférica de transcritos de los genes a estudio que definen la existencia de micrometástasis y grupo “1” en el que existe expresión de cualquiera de ellos. La primera figura representa el tiempo hasta la recaída; la segunda, el tiempo hasta el fallecimiento. Respecto a la recaída, la mediana de tiempo para el grupo “0” es de 76,56 (40,47-112,66) meses vs 31,3 (0,49-62,11) para el grupo “1”; $p=0,035$ para la prueba Log Rank. En lo que concierne a tiempo hasta el fallecimiento: no se alcanzó la mediana en el grupo “0”, media 78,77 (68,66-89,09) vs 66,66 (55,54-77,78); p (Log Rank) = 0,048.

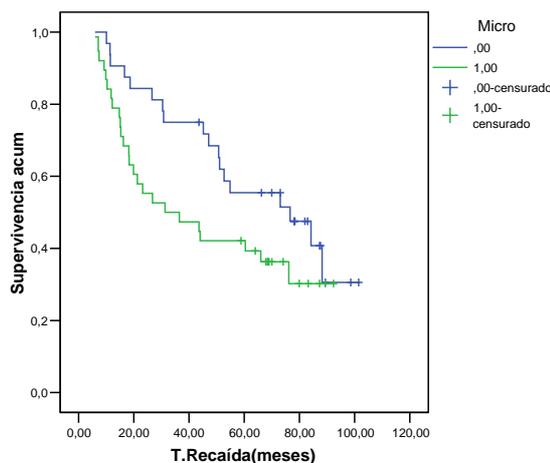


Figura 31: Curva de Kaplan Meier para tiempo hasta la recaída en función de la presencia de micrometástasis en sangre periférica.

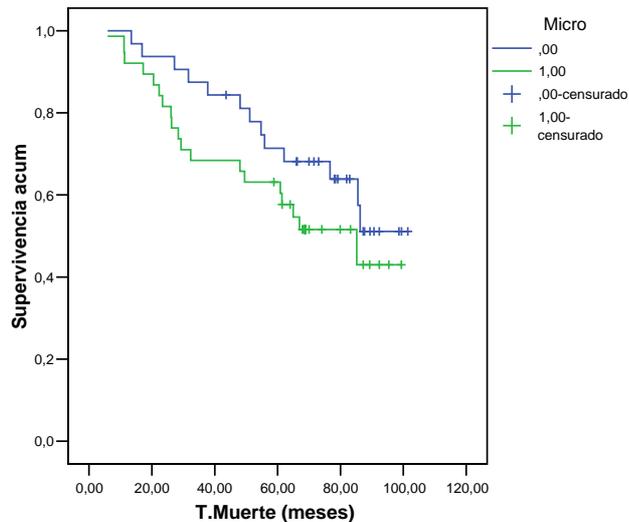


Figura 32: Curva de Kaplan Meier para tiempo hasta el fallecimiento en función de la presencia de micrometástasis en sangre periférica.

5.1.2. Análisis de supervivencia por cada uno de los genes cuya expresión define categóricamente presencia de micrometástasis

Las figuras 33-37 muestran las funciones de supervivencia de los distintos subgrupos considerando los genes del panel cada uno por separado. En cada figura el grupo “0” es aquel grupo de pacientes en los que no se encontró expresión del transcrito y el grupo “1” en el que sí. Por orden, son: relación de los genes K 19, HER-2, EGP2 y P1B con tiempo a la recaída y P1B con tiempo al fallecimiento. Los valores del test de Log Rank son: 1,12 ($p=0,2897$); 0,43 ($p=0,5144$); 0,58 ($p=0,4474$); 5,08 ($p=0,0242$) y 3,92 ($p=0,0479$). Alcanzan valor significativo ($p < 0,05$) las dos últimas.

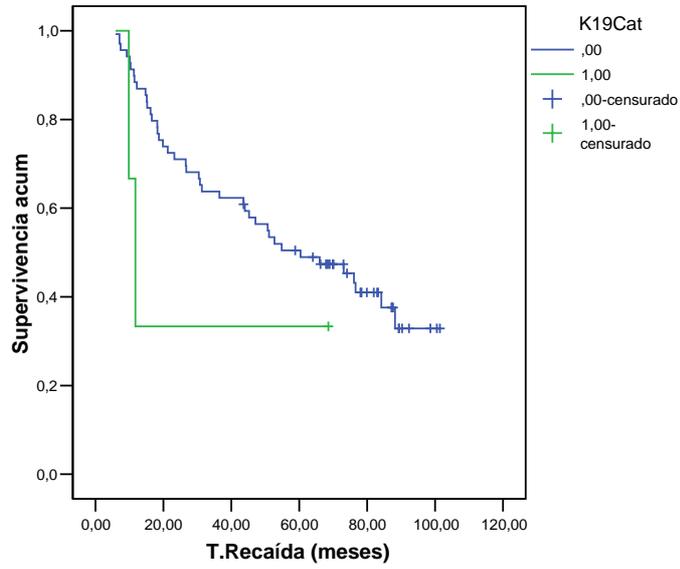


Figura 33: Curva de Kaplan Meier de tiempo a la recaída en función de la expresión de K19 en sangre periférica.

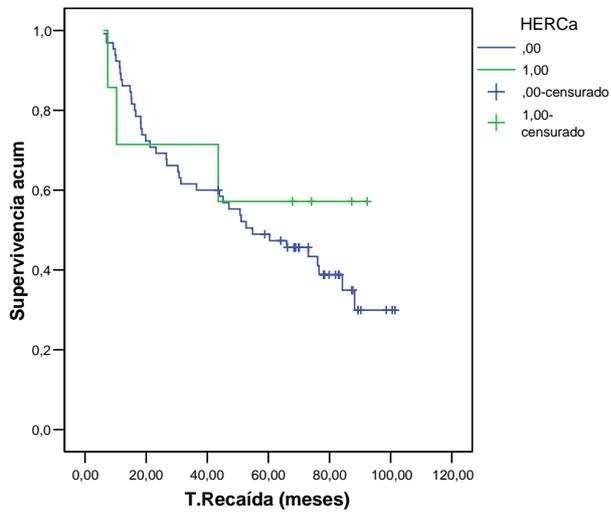


Figura 34: Curva de Kaplan Meier de tiempo a la recaída en función de la expresión de HER-2 en sangre periférica.

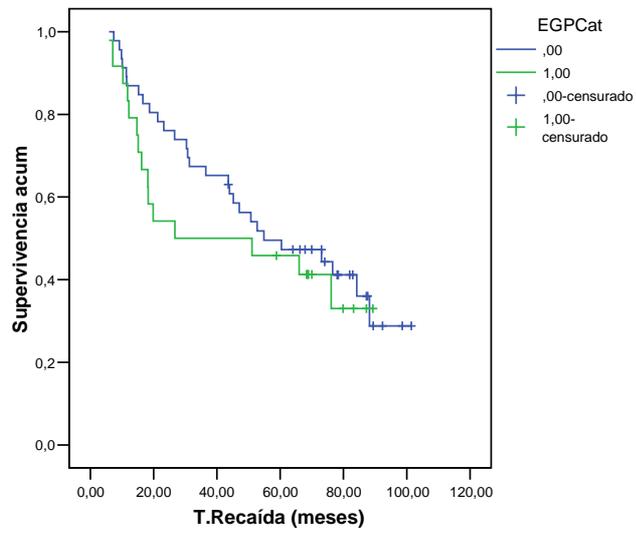


Figura 35: Curva de Kaplan Meier de tiempo a la recaída en función de la expresión de EGP2 en sangre periférica.

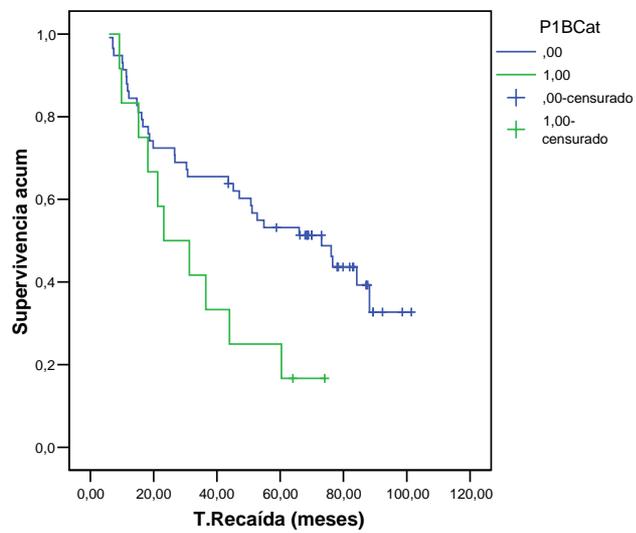


Figura 36: Curva de Kaplan Meier de tiempo a la recaída en función de la expresión de PIB en sangre periférica.

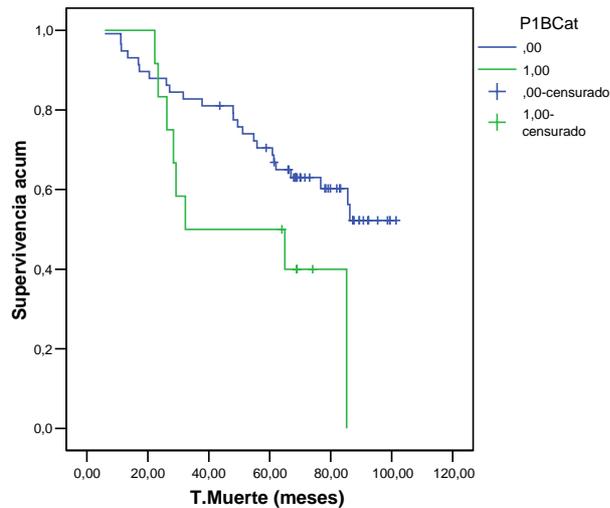


Figura 37: Curva de Kaplan Meier de tiempo a la muerte en función de la expresión de P1B en sangre periférica.

5.2. Correlación de los valores cuantitativos de la expresión de cada uno de los genes a estudio con tiempo hasta la recaída y la muerte. Correlación de los valores cuantitativos de la expresión de cada gen del panel con el resto.

La tabla 16 muestra la correlación (coeficiente de correlación de Pearson y significación estadística bilateral) del valor cuantitativo determinado por RT-PCR para los transcritos P1B, EGP2, HER-2 y K19 con el tiempo en meses tanto a la recaída como a la muerte. Se ha excluido el PS2 por tener valor = 0 en todas las determinaciones. Asimismo, pueden observarse los coeficientes de correlación de Pearson del valor de cada gen con el resto de los genes. Se obtiene $p < 0,05$ para las correlaciones del valor de P1B con los meses a recaída y a muerte, del valor de EGP2 con los meses a recaída y a muerte. Asimismo, existe una correlación con $p < 0,05$ para el valor de la expresión de P1B con K19. La figura 38 muestra a modo de ejemplo

visual el diagrama de dispersión de la correlación del valor de EGP2 con los meses transcurridos por paciente hasta la recaída.

Tabla 16: Tabla de correlaciones de Pearson importada de SPSS.

Correlaciones

		EGP2	HER2	K19	Meses a Recaída	Meses a Muerte
P1B	C. Pearson	-,115	-,046	,536	-,219	-,204
	p (bilat.)	,343	,701	,000	,045	,062
EGP2	C. Pearson		-,072	-,002	-,344	-,264
	p (bilat.)		,552	,987	,004	,027
HER2	C. Pearson			-,053	,012	,048
	p (bilat.)			,655	,918	,692
K19	C. Pearson				-,156	-,199
	p (bilat.)				,192	,093

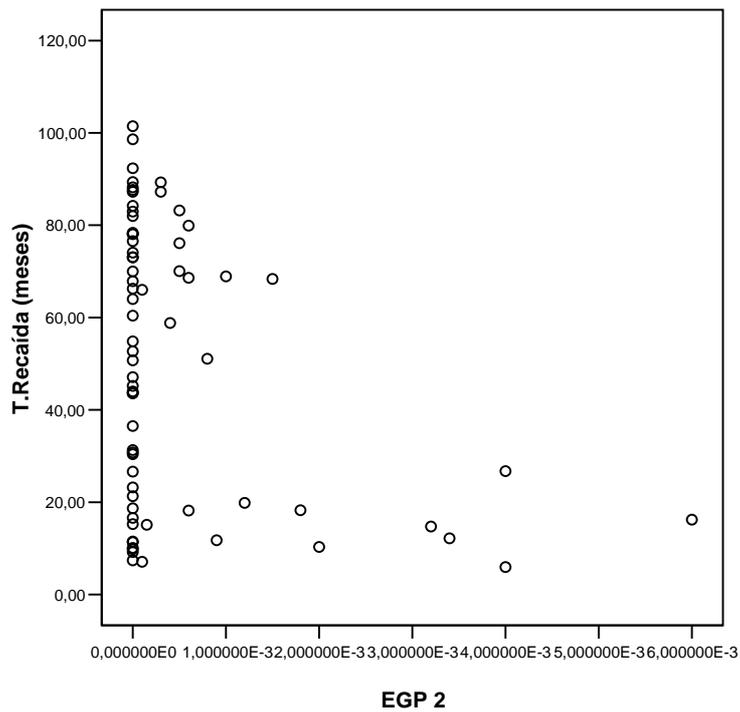


Figura 38: Diagrama de dispersión de los valores de EGP2 con el tiempo en meses a la recaída por paciente.

5.3. Impacto de la presencia de micrometástasis en recaída y muerte con independencia del tiempo al desenlace.

La tabla 17 muestra los valores absolutos de recaída o no recaída en cada subgrupo de pacientes definido por la presencia o ausencia de micrometástasis en sangre periférica (micrometástasis codificada como “sí” en caso de presencia de expresión en sangre periférica de cualquiera de los transcritos a estudio; codificada como “no” en caso contrario). La *Odds Ratio* de recaída para el grupo con micrometástasis es de 1,49 respecto al grupo sin micrometástasis.

La tabla 18 muestra los datos superponibles a la tabla 15 pero concernientes a fallecimiento o no fallecimiento en función de la presencia o ausencia de micrometástasis. La *Odds Ratio* de muerte es de 1,46 para el grupo con micrometástasis respecto al grupo sin micrometástasis.

Tabla 17: Tabla de contingencia para recaída/no recaída en función de presencia de micrometástasis

	Recaída	No recaída
MICRO “SI”	25	13
MICRO “NO”	18	14

Tabla 18: Tabla de contingencia para muerte/no muerte en función de presencia de micrometástasis

	Muerte	No Muerte
MICRO “SI”	19	19
MICRO “NO”	13	19

5.4. Impacto global de la presencia de micrometástasis en el tiempo a la recaída y a la muerte: análisis multivariante en conjunción con los factores clásicos. Modelo de regresión de Cox.

5.4.1. Modelo de Cox considerando la expresión conjunta de todos los genes del panel a estudio.

Seguidamente se presentan los datos de la influencia temporal en los eventos recaída y muerte de los distintos factores a estudio en un modelo multivariante.

El modelo incluyó las variables siguientes: edad en años, tamaño tumoral en centímetros, presencia/ausencia de ER, presencia/ausencia de PR, número de ganglios afectos, recepción o no de Taxol, grado tumoral y presencia/ausencia de micrometástasis en sangre periférica. La variable “grado” tiene teóricamente 3 categorías (1-2-3) y por ello es descompuesta por el programa SPSS en dos variables ficticias o polinomios ortogonales categóricos. De cualquier manera puesto que no se alcanza significación para dicha variable no se entrará en detalle en la descomposición en variables ficticias porque corresponde a un problema de metodología estadística.

La tabla 19 muestra los coeficientes B de la función temporal para recaída, su significación estadística y el valor de e^B o la razón de densidades de incidencia.

La tabla 20 utiliza las mismas variables predictoras, pero el desenlace a estudio es la muerte, por lo que los valores de e^B corresponden a las razones de densidades de incidencia de muerte atribuibles a cada factor.

Puede apreciarse como la incidencia de eventos es un 217% y 233% más rápida (para recaída y muerte respectivamente) para las pacientes con micrometástasis que para las pacientes sin ellas ($p < 0,05$)

Tabla 19: Modelo de Cox para tiempo a la recaída.

Variables en la ecuación

	<i>B</i>	<i>Sig.</i>	<i>Exp(B)</i>
<i>Edad (años)</i>	,036	,119	1,037
<i>Tam. T (cm)</i>	,147	,046	1,158
<i>Grado</i>		,842	
<i>Fict.1</i>	8,758	,895	6360,650
<i>Fict.2</i>	8,960	,893	7789,047
<i>ER</i>	-,435	,427	,647
<i>PR</i>	-,167	,732	,846
<i>Taxol si/no</i>	,900	,069	2,459
<i>Micromet. si/no</i>	,775	,030	2,171
<i>Num. Gl.</i>	,036	,157	1,037

Tabla 20: Modelo de Cox para tiempo a la muerte.

Variables en la ecuación

	<i>B</i>	<i>Sig.</i>	<i>Exp(B)</i>
<i>Edad (años)</i>	,020	,431	1,020
<i>Tam. T (cm)</i>	,104	,187	1,110
<i>Grado</i>		,736	
<i>Fict. 1</i>	8,335	,922	4168,242
<i>Fict. 2</i>	8,662	,919	5781,382
<i>ER</i>	-,720	,245	,487
<i>PR</i>	-,285	,626	,752
<i>Taxol si/no</i>	,550	,395	1,733
<i>Micromet. si/no</i>	,847	,043	2,333
<i>Num. Gl.</i>	,044	,119	1,045

5.4.2. Modelo de Cox considerando la expresión por separado de cada gen del panel a estudio.

En este apartado se presentan las tablas 21 y 22. En ellas se representan los coeficientes y sus exponenciales (razón de densidades de incidencia), para recaída y muerte respectivamente, para las mismas variables que en el apartado anterior. Sin embargo, la presencia categórica de micrometástasis se ha desglosado en los diferentes genes cuya expresión la definen.

Tabla 21: Modelo de Cox para tiempo a la recaída desglosando la variable “micrometástasis”.

Variables en la ecuación^b

	<i>B</i>	<i>Sig.</i>	<i>Exp(B)</i>
<i>Edad (años)</i>	,001	,979	1,001
<i>Grado</i>		,992	
<i>Fict. 1</i>	9,169	,914	9595,043
<i>Fict. 2</i>	9,193	,914	9823,635
<i>Tam. T (cm)</i>	,126	,101	1,134
<i>ER</i>	-,088	,876	,916
<i>PR</i>	-,409	,428	,664
<i>Num. Gl.</i>	,035	,182	1,035
<i>Taxol sí/no</i>	,748	,169	2,114
<i>K19(valor)</i>	-607,790	,746	,000
<i>HER2 (valor)</i>	1,003	,948	2,725
<i>EGP2 (valor)</i>	465,614	,003	1,64+202
<i>PS2 (valor)</i>		.	
<i>P1B (valor)</i>	2,055	,017	7,810

Tabla 22: Modelo de Cox para tiempo a la muerte desglosando la variable “micrometástasis”.

Variables en la ecuación

	<i>B</i>	<i>Sig.</i>	<i>Exp(B)</i>
<i>Edad</i>	,040	,115	1,041
<i>Grado</i>		,771	
<i>Fict. 1</i>	9,655	,890	15595,885
<i>Fict. 2</i>	9,910	,887	20131,929
<i>Tam T (cm)</i>	,140	,064	1,150
<i>ER</i>	-,675	,255	,509
<i>PR</i>	,162	,757	1,176
<i>Num. Gl.</i>	,031	,270	1,031
<i>Taxol si/no</i>	1,035	,053	2,816
<i>K19 (valor)</i>	,236	,762	1,267
<i>HER2 (valor)</i>	,197	,770	1,218
<i>EGP2 (valor)</i>	,446	,233	1,561
<i>PS2 (valor)</i>		.	
<i>P1B (valor)</i>	1,362	,003	3,904

5.4.2. Modelo de Cox separando a las pacientes en riesgo alto o muy alto en función del número de ganglios afectados.

Se realizó el análisis multivariante de Cox dividiendo a las pacientes en dos grupos. En el primer grupo se incluyeron a las pacientes con menos de 10 ganglios afectados; en el segundo grupo a las pacientes con 10 ó más. El número de pacientes (excluidas las pacientes sin muestra válida y por tanto no pudieron incluirse en el análisis multivariante) de cada grupo fue de 12 y 49 respectivamente. La tabla 23 muestra que la significación y el riesgo de muerte atribuible a la presencia de micrometástasis se conserva en las pacientes de más riesgo. No se alcanzó significación

estadística para ningún coeficiente en las pacientes de menos riesgo por lo que los datos no se incluyen (sólo 12 casos)

Tabla 23: Modelo de Cox en el subgrupo de pacientes de mayor riesgo, considerando influencia categórica de presencia de micrometástasis en el tiempo a la muerte.

Variables en la ecuación

	<i>B</i>	<i>Sig.</i>	<i>Exp(B)</i>
<i>Edad</i>	,030	,384	1,030
<i>Tam. T (cm)</i>	,088	,367	1,092
<i>Grado</i>		,518	
<i>Fict. 1</i>	8,310	,919	4064,685
<i>Fict. 2</i>	8,875	,914	7148,591
<i>ER</i>	-1,330	,120	,265
<i>PR</i>	,425	,608	1,530
<i>Taxol si/no</i>	,181	,823	1,199
<i>Micromet. si/no</i>	,884	,067	2,420
<i>Num. Gl</i>	,036	,369	1,037

6.-Relación de los factores pronósticos clásicos con la presencia de micrometástasis en sangre periférica.

6.1. Relación de los factores pronósticos categóricos con la presencia de micrometástasis en sangre periférica: tablas de contingencia.

Las tablas siguientes (24 a 27) muestran los recuentos de presencia/ausencia de micrometástasis en función de las distintas variables predictoras categóricas (grado, HER-2, ER y PR) Los valores de la prueba de Chi-cuadrado y sus significaciones estadísticas son:

-Grado: Chi = 1,011 (p=0,603)

-ER: Chi = 3,25 (p=0,071)

-PR: Chi = 0,847 (p=0,358)

-HER-2: Chi = 0,037 (p=0,847)

Tablas 24-27: tablas de contingencia entre los predictores categóricos y la presencia o ausencia de micrometástasis.

Tabla de contingencia

Recuento		Grado	
		2	3
Micro	No	11	20
Met	Si	15	22
Total		26	42

Tabla de contingencia

Recuento		ER	
		NO	SI
Micro	No	16	16
Met	Si	11	27
Total		27	43

Tabla de contingencia

Recuento		PR	
		No	Si
Micro.	No	17	15
Met.	Si	16	22
Total		33	37

Tabla de contingencia

Recuento		HER-2	
		No	Si
Micro.	No	7	8
Met.	Si	10	13
Total		17	21

6.2. Relación de los factores pronósticos cuantitativos con la presencia de micrometástasis en sangre periférica: regresión logística.

La tabla 28 muestra los coeficientes B, su significación y el valor del riesgo relativo por cada unidad de incremento en los mismos para la presencia de micrometástasis en sangre periférica, obtenidos por un modelo de regresión logística, considerando la presencia de micrometástasis como una variable categórica, y edad, tamaño tumoral y número de ganglios como variables cuantitativas. Por defecto este modelo incluye una constante.

Tabla 28: relación de factores pronósticos clásicos con la presencia de micrometástasis en sangre periférica.

Variables en la ecuación			
	<i>B</i>	<i>Sig.</i>	<i>Exp(B)</i>
<i>Edad (años)</i>	-,003	,910	,997
<i>Tam.T (cm)</i>	,017	,873	1,017
<i>Num.Gl.</i>	-,011	,746	,989
<i>Constante</i>	,380	,804	1,462

6.3. Relación del factor número de ganglios (cuantitativo) con el valor cuantitativo de cada transcrito en sangre periférica: estadístico de Pearson.

En la tabla 29 puede observarse como tampoco existe asociación entre el número de ganglios afectos y la presencia en sangre periférica de los transcritos analizados. Para investigar dicha asociación hemos aplicado la correlación de Pearson, que permite relacionar variables cuantitativas

Tabla 29: correlaciones entre el número de ganglios y los valores cuantitativos de cada transcrito en sangre periférica.

Correlaciones

		<i>K19</i>	<i>HER-2</i>	<i>EGP2</i>	<i>P1B</i>
<i>Número ganglios afectados</i>	<i>C.Pearson</i>	,008	-,077	,022	,109
	<i>p(bilat.)</i>	,947	,519	,859	,322
<i>K19</i>	<i>C.Pearson</i>		-,053	-,002	,536
	<i>p(bilat.)</i>		,655	,987	,000
<i>HER-2</i>	<i>C.Pearson</i>			-,072	-,046
	<i>p(bilat.)</i>			,552	,701
<i>EGP2</i>	<i>C.Pearson</i>				-,115
	<i>p(bilat.)</i>				,343

VI. Discusión.

1.- Discusión de la metodología aplicada para la detección de células tumorales diseminadas.

1.1. Micrometástasis y células malignas diseminadas aisladas.

Una micrometástasis es un agrupamiento de células malignas con organización arquitectural, distorsión microscópica del órgano de asiento, estroma intercelular y capacidad angiogénica. Las micrometástasis no son detectables por los métodos clínicos ni de imagen convencionales, pero sí por los métodos histopatológicos disponibles. Una micrometástasis abandonada a su libre evolución desarrolla enfermedad clínicamente evidente en un corto espacio de tiempo, pues una micrometástasis constituye tejido tumoral viable. En lo que respecta a cáncer de mama, su papel está definido al menos en lo referente a la afectación de los ganglios linfáticos locorreionales: el TNM en su sexta versión define metástasis ganglionar como un acúmulo de células malignas superior a 0,2 centímetros en un ganglio linfático. Una micrometástasis sería la afectación ganglionar de tamaño comprendido entre 0,2 milímetros y 0,2 centímetros, con reacción estromal e invasión vascular. [181, 182] El significado pronóstico de ambas entidades clínicas en cáncer de mama parece análogo, y hoy por hoy se tratan de igual modo. La diferencia es que para detectar las micrometástasis hay que hacer uso de técnicas anatomopatológicas más complejas que la habitual microscopía óptica sobre secciones teñidas con hematoxilina-eosina; es necesario analizar más secciones de cada ganglio linfático para que no pasen desapercibidas. Con técnicas específicas de inmunohistoquímica con anticuerpos dirigidos contra la superficie de las células tumorales aumentamos la sensibilidad de la técnica. Sin estas técnicas, hay un alto riesgo de clasificar como N0 a pacientes con afectación ganglionar micrometastásica y aplicarles por tanto un tratamiento subóptimo. [183]

No está definido sin embargo el papel de los depósitos celulares más pequeños encontrados en localizaciones distantes al tumor primario. Se trata de células aisladas o pelotones de pocas células que sólo se detectan por técnicas como la PCR. Estas células tumorales aisladas o pequeños pelotones no muestran en general actividad sugerente de tumor viable como replicación activa, reacción estromal o invasión vascular. [184] En series de autopsias se describen hallazgos de células tumorales aisladas en órganos como la médula ósea o el hígado muchos años después de un tratamiento de un tumor que posteriormente no recidivó ni causó la muerte del paciente, cuestionando el potencial maligno de dichas células tumorales aisladas. [185] Las células tumorales aisladas no son micrometástasis, pero algunos estudios retrospectivos que serán revisados en los apartados siguientes sugieren, por su impacto pronóstico, que pueden ser precursoras de las micrometástasis. Puede que se trate de una afirmación demasiado obvia, pero es importante señalar que si las células tumorales aisladas encontradas en otros órganos tuvieran por definición potencial metastático, el 100% de los pacientes con dicho hallazgo presentaría con el tiempo una recaída clínicamente evidente. La realidad es bien distinta, y las tasas de recaídas en pacientes con células tumorales aisladas a distancia oscila según series entre el 15%-50%. [186-200] Como se ha discutido previamente, el proceso de generación de metástasis es ineficiente y está limitado en múltiples puntos, como son la entrada o salida del espacio vascular, la capacidad de migrar por el estroma o la posibilidad de emitir estímulos angiogénicos una vez haya asentado en un órgano a distancia y constituir así una metástasis. Asimismo es importante que dichas células tumorales aisladas tengan capacidad replicativa (hoy por hoy se desconocen los estímulos que hacen entrar en mitosis o permanecer en estado quiescente a una célula tumoral aislada a distancia). Por todo ello, de no tener todas las ventajas fenotípicas mencionadas, una célula tumoral aislada a

distancia puede tener un significado espurio y no traducir más que la propia inestabilidad tumoral y la ineficiencia de su adhesión célula-célula con la consiguiente facilidad para que las células se “suelten” del tumor. Este hecho unido al caos vascular (los capilares vasculares tumorales son diferentes a los del tejido sano; las diferencias fundamentales son la desorganización, la variabilidad del espacio capilar-célula, el aumento de la fenestración, y el hecho de que la pared vascular en algunas zonas está constituida no por células endoteliales sino propiamente tumorales; esto lógicamente facilita el desprendimiento de las células tumorales al torrente sanguíneo) en el que se desarrolla un tumor hace que encontremos probablemente muchas más células tumorales aisladas a distancia de las que tienen en realidad potencial de generar una micrometástasis. [201] Así, dependiendo del diseño del estudio, se encontrará el significado pronóstico real para las células tumorales aisladas o no: lógicamente no es lo mismo hacer la búsqueda de células cuando existe un tumor macroscópico que está continuamente desprendiendo émbolos tumorales al torrente sanguíneo que después de un tratamiento locorregional y sistémico que elimina la práctica totalidad de la masa tumoral.

1.2. Lugar de depósito de células tumorales aisladas.

Como se ha explicado, el tratamiento adyuvante engloba la mayoría de los esfuerzos de la oncología actual, con el objeto de prevenir la recaída a distancia meses o años después de un tratamiento locorregional aparentemente curativo. La diseminación de células tumorales aisladas y/o la constitución de verdaderas micrometástasis es la causa de dicha recaída. Éstas pueden hallarse en diferentes localizaciones según el tumor a estudio. Para tumores epiteliales que muestran tendencia a metastatizar en los huesos, las células tumorales son frecuentemente detectadas en un aspirado de médula ósea. El espacio medular de la cresta ilíaca es un lugar anatómico con un intercambio

particularmente intenso de células entre la sangre y el intersticio mesenquimal medular. Las células tumorales aisladas se detectan en el tejido hematopoyético incluso en tumores que usualmente no metastatizan en el hueso (por ejemplo cáncer de colon), indicando que el tejido hematopoyético es un buen lugar para la detección de células tumorales. [202] La gran irrigación sanguínea de este compartimiento y la naturaleza tisular del mismo le confieren la posibilidad de actuar tanto como “filtro” de células como para ser un medio en el que las células tumorales indiferenciadas pueden asentarse o sobrevivir. [203-205] Obviamente el órgano diana preferente de metastatización sería en principio el órgano preferente para búsqueda y estudio de células tumorales aisladas; sin embargo, en cánceres como el de colon se plantea el problema ético y práctico de someter a los pacientes a biopsia hepática (órgano que en mayor frecuencia es el primer sitio de recaída en esta enfermedad) para estudiar algo cuya importancia no está aun demostrada. [206] Afortunadamente en el cáncer de mama no ocurre este problema: la médula ósea y el hueso son los órganos preferentes de asiento de metástasis; puesto que la médula ósea y la sangre periférica son lugares accesibles al estudio, el tejido hematopoyético constituye el órgano de elección.

El status de afectación ganglionar constituye hoy por hoy el mayor indicador de elección de tratamiento adyuvante en cáncer de mama. Los estudios de la presencia de células tumorales aisladas en médula ósea comienzan a sugerir que quizá no sea suficiente con estudiar los ganglios axilares: existe un trabajo interesantísimo de Gerber *et al* al respecto. [194] Analizan la presencia de células tumorales en la médula ósea en 484 pacientes con cáncer de mama sin afectación ganglionar y en 70 con afectación de un único ganglio. El 37% de las pacientes sin afectación ganglionar tienen evidencia de células tumorales en la médula ósea y conforman un subgrupo de peor pronóstico en términos de intervalo libre de enfermedad y supervivencia global que el 73% restante de

las pacientes sin ganglios afectos y sin afectación medular. También el 37,1% de las pacientes con un ganglio afecto, muestran células tumorales en la médula ósea, con igual significado pronóstico. Este trabajo sugiere que el cáncer de mama tiene diferentes vías de metastatización (linfática y hematogena) y que tal vez analizar sólo los ganglios linfáticos infraestadifique a ciertas pacientes que tienen afectación microscópica distante medular. Asimismo apoya que el tejido hematopoyético debe ser estudiado porque tiene importancia real en el pronóstico a largo plazo.

Sin embargo el estudio de las células tumorales aisladas en la médula ósea plantea 3 problemas respecto al estudio en sangre periférica:

- 1) Es preciso obtener una biopsia de cresta ilíaca, procedimiento mucho más traumático que una venopunción.

- 2) El estudio en médula ósea se basa en criterios morfológicos y por tanto subjetivos; no siempre es fácil identificar una célula tumoral y diferenciarla de otras formas citológicas inmaduras precursoras de células sanguíneas definitivas.

[207] La detección de células tumorales en la médula ósea se ha realizado en general con medios inmunológicos. Su ejecución es laboriosa y requiere un considerable grado de experiencia para diferenciar las células teñidas positivamente de los falsos positivos. Se ha trabajado mucho en estandarizar los anticuerpos monoclonales y los métodos utilizados, pero esto no ha llevado a una uniformidad de metodología o a reproductibilidad entre diferentes laboratorios. Como consecuencia, existe variación entre los hallazgos y las conclusiones en la literatura; ninguna técnica se ha adoptado universalmente. Existen muchos positivos entre los voluntarios sanos. [192]

- 3) Como ya se ha comentado, en la médula ósea existen depósitos celulares malignos que pueden permanecer quiescentes durante muchos años o incluso

hasta la muerte de la paciente por otras causas. Por tanto aunque se logran identificar, no necesariamente tendrían valor pronóstico. Sería necesario estudiar las características genéticas de dichos depósitos para deducir si en un futuro podrían “activarse”. [184]

El valor de las células tumorales en sangre periférica también podría ser cuestionable, y la literatura al respecto es muy escasa (será revisada en sucesivos párrafos). El principal problema hasta hace pocos años era la sensibilidad de las técnicas de estudio. La cuantía de células malignas en sangre periférica es del orden de una por 10^5 - 10^6 células mononucleadas no malignas. [191] La inmunohistoquímica, que ha sido el método tradicional de búsqueda de células tumorales aisladas, no alcanza tal sensibilidad. La PCR supera esta dificultad. Un claro ejemplo del aumento de la sensibilidad conseguido con la PCR respecto a la inmunohistoquímica lo encontramos en el trabajo de Schoenfeld *et al* [208]: en la sangre de 78 pacientes buscan la expresión de citoqueratina K-19 con ambas técnicas, tanto en muestras de sangre periférica como en la médula ósea. Aplicando inmunohistoquímica obtienen resultado positivo en el 5% y 22% en sangre periférica y en médula ósea. Cuando la detección se hace con PCR los porcentajes aumentan al 25% y 35% respectivamente. Con respecto a si las células circulantes en sangre periférica tienen valor pronóstico o no, parece posible que su presencia meses después del tratamiento locorregional traduzca la existencia de tumor activo oculto a distancia (ver apartado 1.6.)

1.3. Detección de células tumorales mamarias aisladas diseminadas.

1.3.1. Citoqueratinas.

Todas las células del cuerpo humano tienen el mismo genoma. Sin embargo, cada célula expresa sólo una parte de los genes del genoma. Ello explica las diferencias

morfofuncionales entre los distintos tipos de células. Al hablar de “expresión” nos estamos refiriendo al hecho de que para un determinado gen (DNA) se sintetice su mRNA complementario y se ponga en marcha la maquinaria de síntesis de la proteína codificada por ese gen. Estudiando los mRNA presentes en una célula, sabemos qué genes están expresados y qué genes reprimidos en ella.

El detectar en sangre periférica mRNA de genes que se transcriben en células de cáncer de mama que a su vez no se expresan en el tejido hematopoyético implicaría que en la sangre existen células tumorales diseminadas.

No existe un gen que se exprese en todas las células tumorales mamarias, en todo momento, y que no se exprese en tejido hematopoyético o en tejidos normales. Por ello un punto clave es elegir como genes candidatos para la búsqueda de células tumorales genes que se expresen en un alto porcentaje de las células tumorales mamarias metastásicas y no (o en escasísima cuantía) en el tejido hemático.

Las células de cáncer de mama son de origen epitelial; la sangre es de origen mesenquimal. Un gran porcentaje del citoplasma de las células (tanto normales como malignizadas) de los vertebrados está representado por componentes del citoesqueleto, incluyendo microfilamentos de actina, microtúbulos de tubulina y filamentos intermedios. Cada una de estas estructuras está compuesta por subunidades proteicas de menor tamaño procedentes de la transcripción de genes de una familia multigénica; las subunidades de las estructuras de los filamentos del citoesqueleto son diferentes de unas estirpes celulares a otras. Las mayores diferencias observadas corresponden a la composición de los filamentos intermedios. Aunque morfológicamente los filamentos intermedios de cada tipo celular parecen iguales, criterios inmunológicos y bioquímicos nos ayudan a diferenciar al menos 5 tipos de filamentos intermedios, cada uno con múltiples subtipos: en primer lugar, células que contienen proteínas “similares a la

queratina” o “citoqueratinas”, que son características de las células epiteliales; en segundo lugar, filamentos de vimentina, que se encuentran en células de origen mesenquimal, astrocitos, células de Sertoly, células del músculo liso vascular y en líneas celulares en cultivo; en tercer lugar, filamentos de desmina, típicos de las células miogénicas. En cuarto lugar, encontramos los neurofilamentos, correspondientes a las células neuronales, y, por último, los filamentos gliales, hallados en los astrocitos. [209, 210] A lo largo de la transformación celular y desarrollo tumoral, la estructura de estos filamentos intermedios está altamente conservada. [211-215]

Los carcinomas pueden ser identificados al microscopio mediante inmunohistoquímica en secciones congeladas de biopsia. La clasificación de los tumores mediante los subtipos específicos de filamentos intermedios se ha probado muy valiosa en el diagnóstico anatomopatológico clínico. Schlegel *et al* [216], Gabbiani *et al* [217] y Ramaekers *et al* [218] fueron los primeros en aprovechar las diferencias en los filamentos intermedios entre los tejidos tumorales y los tejidos circundantes; usando anticuerpos específicos contra dichos filamentos, marcados con peroxidasa y posterior adición de un fluorocromo, catalogaron los patrones de filamentos intermedios de distintos tipos de tumores y comprobaron la similitud respecto a la estirpe tisular de origen; con esta aportación se revolucionó el diagnóstico anatomopatológico, ganando en sensibilidad (posibilidad de detectar células malignas que no se aprecian con microscopía simple) y especificidad (posibilidad de filiar el origen de una metástasis tumoral de la que no se encuentra el tumor primario por métodos de imagen o tumor de origen desconocido)

En los casos examinados en la literatura médica, la presencia de tinción positiva para citoqueratinas se correlaciona con la ausencia de tinción para vimentina. [219-222] Asimismo, existe reacción positiva para vimentina en el componente estromal de los

tumores epiteliales. [223] Los carcinomas derivados de la glándula mamaria contienen queratinas 7, 8, 18 y 19. [223] La comparación entre la estructura de las citoqueratinas del tumor y del epitelio de origen también ha revelado un alto grado de similitud. [223, 224]

De este modo, la detección de citoqueratinas 7, 8, 18, o 19 en sangre periférica o en médula ósea en pacientes con un cáncer de mama sólo se podría explicar por la presencia de células tumorales diseminadas; ni siquiera la contaminación por células de la epidermis del tejido a analizar en el momento de la venopunción o biopsia de médula ósea justificaría este hallazgo, porque el patrón de citoqueratinas que expresa la epidermis es distinta al de las células tumorales mamarias.

1.3.2. Problemas relacionados con el hecho de detectar células tumorales mamarias diseminadas sólo mediante citoqueratinas: necesidad de utilizar más genes como diana.

La inmensa mayoría de trabajos en los que se intenta detectar las células tumorales diseminadas de cáncer de mama fueron llevados a cabo únicamente utilizando las citoqueratinas como diana. [189, 192, 193, 196-198, 225-233]

Nosotros procedimos del mismo modo y asumimos que todas las pacientes que tuvieran células tumorales diseminadas de su cáncer de mama iban a poder ser detectadas buscando sólo la expresión de citoqueratinas. Sin embargo, sólo en el 4.7% de las pacientes detectamos expresión de mRNA de citoqueratinas en sangre periférica. Teniendo en cuenta que un 53% de las pacientes recayeron de su enfermedad posteriormente, resultaba claro que no estábamos detectando las micrometástasis.

Las células de cáncer de mama en su proceso de producción de metástasis sufren un proceso denominado “transición epitelio-mesénquima”: para abandonar el lecho

tumoral y pasar a sangre periférica, y para conseguir extravasarse de nuevo y migrar en tejidos distantes, precisan de una serie de ventajas fenotípicas que ya se han revisado. (Introducción, apartado 2.4) Para ello, han de perder su fenotipo epitelial y transformarse en células con rasgos mesenquimatosos. Uno de los eventos que tiene lugar es el cambio de las proteínas que constituyen su citoesqueleto (en general las células epiteliales tienen unos filamentos en su esqueleto que no permiten la motilidad; por el contrario los filamentos de vimentina presentes en las células de estirpe mesenquimal sí la permiten). Si bien esta observación se conoce desde hace años, la primera demostración clínica en cáncer de mama vino dada por Thomas *et al* [234] en 1999: sobre 54 bloques de parafina de tumor primario de cáncer de mama analizan la presencia de filamentos tanto de citoqueratinas como de vimentina. Posteriormente relacionan la expresión de los filamentos con el pronóstico. Observan el pronóstico es peor para las pacientes a medida que en el tumor va disminuyendo la cantidad de citoqueratinas y apareciendo la expresión aberrante de vimentina. Fuchs *et al* [235] asimismo comprobaron en 80 carcinomas y en seis líneas celulares de cáncer de mama habitualmente utilizadas en investigación que la desaparición de las citoqueratinas tenía lugar en el 75% de los casos; además, en el 21% de los casos los tumores expresaban vimentina.

Estos dos trabajos sólo sugieren que la transición epitelio-mesénquima puede producirse y ser relevante a nivel clínico (sólo llevan a cabo el análisis en el tumor primario y lo correlacionan con el pronóstico). Pero existen tres trabajos recientes y muy interesantes que parecen comprobar que dicha transición es necesaria para el proceso de generación de metástasis. El primero de ellos está realizado con líneas celulares. Zajchowski *et al* [236] aplican la tecnología de los Micro-Arrays de c-DNA en su estudio. A grandes rasgos consiste en lo siguiente: primero se extrae el m-RNA de

las células tumorales a estudio. Luego se sintetiza su DNA complementario (c-DNA). Posteriormente, se introduce el c-DNA en un recipiente llamado “Chip” que contiene 25000 pocillos, cada uno de ellos con oligonucleótidos o “primers” complementarios para una región determinada del genoma. En el siguiente paso se deja el Chip en las condiciones térmicas de hibridación; en este paso los c-DNA sintetizados se unen (“hibridación”) a las secuencias complementarias localizadas en los pocillos. Las secuencias de nucleótidos llevan unidos fluoróforos; en función de la cantidad de moléculas de c-DNA que haya complementarias al DNA que haya en cada pocillo, dicho pocillo se tiñe de rojo (sobreexpresión respecto a la referencia) o de verde (expresión por debajo de la referencia). Si comparamos el perfil de expresión en los 25000 pocillos para, por ejemplo, 100 muestras de cáncer de mama, y 100 muestras de tejido mamario normal, (este proceso lo lleva a cabo un programa informático), podemos saber qué regiones del genoma se encuentran amplificadas o silenciadas en el cáncer de mama respecto al tejido mamario normal. Puede realizarse el tipo de comparación que queramos; sólo es necesario obtener las muestras adecuadas (por ejemplo, parece poco viable saber cómo difiere la expresión génica de las metástasis respecto a los tumores primarios; requeriría biopsiar múltiples lugares anatómicamente inaccesibles o éticamente cuestionables a un número importante de pacientes) Es interesante recordar que no se conoce la función de todas las regiones del genoma; y de muchas regiones, se conoce el gen que codifica pero no su función concreta, de ahí la dificultad de la interpretación de los Micro-Arrays. Esta técnica requiere un soporte informático muy avanzado y cuesta alrededor de 2000 euros por muestra. Zajchowski *et al* [237] analizan y comparan la expresión génica de líneas celulares de cáncer de mama muy invasivas frente a la de líneas celulares que no son capaces de generar metástasis. Encuentran que la citoqueratina K-19 está sobreexpresada en las células incapaces de

generar metástasis, y que en las muy invasivas prácticamente no existe esta expresión; por el contrario tienen altos niveles de vimentina. Posteriormente, ya en un experimento clínico, Woelfle *et al* en su trabajo estudian el perfil de expresión de cánceres de mama con metástasis en médula ósea y lo comparan con el perfil de expresión de cánceres de mama sin metástasis. Encuentran que el perfil de expresión difiere considerablemente en 86 genes. Uno de ellos es la citoqueratina K-19; la expresión es 4 veces menor en los que presentan metástasis, sugiriendo que la desaparición de las queratinas tiene lugar en el proceso de génesis de metástasis. En el tercer trabajo, realizado por los mismos investigadores que el anterior y publicado al año siguiente, confirman la importancia de la eliminación de expresión de las citoqueratinas en el tumor para que se produzcan las metástasis, demostrando que la presencia de citoqueratinas en el tumor primario suprime la progresión del mismo. [238]

La prueba de que trabajar con citoqueratinas detecta sólo un pequeño porcentaje de las células tumorales circulantes viene dada por los resultados de otros trabajos en los que se buscan células tumorales en pacientes con metástasis activas: por definición estas pacientes tienen células circulantes en el 100% de los casos. Sin embargo, los trabajos de Slade *et al* [239], Fetsch *et al* [240] y Kahn *et al* [241], sólo encuentran células circulantes (utilizando las citoqueratinas) en un porcentaje del 13-40% de las pacientes que tienen un cáncer de mama con metástasis activas en el momento del análisis.

Sin embargo, como se ha mencionado, la mayoría de los trabajos han utilizado las citoqueratinas como gen diana para la detección de células tumorales de origen epitelial en el seno de un tejido mesenquimal como es la sangre. No nos parecía lógico deshechar esta aproximación sin compararla con otras alternativas, por lo que desde el

principio asumimos que la búsqueda de células tumorales debía hacerse además de usando otros genes como diana, las citoqueratinas.

La citoqueratina elegida fue la K-19 por dos razones: primero que el resto de los trabajos existentes la habían utilizado también (y la mayoría de ellos como único gen diana); el primer paso a la hora de diseñar un experimento es la coherencia científica con los conocimientos que hay sobre el tema en ese momento. Segundo, que los estudios que comparan la expresión de unas citoqueratinas con otras y el pronóstico del cáncer de mama, demuestran que aquéllas que expresan la K-19 son más agresivas que las que expresan otras citoqueratinas. [243, 244] En ambos trabajos Schaller demuestra que la tasa de metástasis y mortalidad para las pacientes cuyos tumores expresan citoqueratina K-18 es del 4,5%, en contraste con un 44,6% para aquéllas cuyos tumores expresan otras citoqueratinas. Por ello, es más probable detectar células tumorales circulantes buscando un gen asociado a células que metastatizan que buscando un gen asociado a tumores mamarios de buen pronóstico como la K-8 o la K-18 (aunque como se ha explicado, las células que más probablemente encontremos en la sangre periférica sean aquéllas que no expresan ningún tipo de citoqueratinas)

No obstante, y por todo lo explicado, nos vimos obligados a utilizar más genes como diana de detección

1.3.3. HER-2, EGP2, PS2 y P1B.

La vimentina no es un gen que sirva como diana para detectar células tumorales aisladas diseminadas de cáncer de mama: recordemos que para aseverar que en la muestra que analizamos hay una célula tumoral mamaria en virtud de la expresión de mRNA que encontramos, es preciso que el gen candidato se exprese en las células tumorales pero no en el resto del tejido de la muestra. Todas las células de la sangre

tienen filamentos de vimentina; por ello, encontraríamos vimentina en todas las muestras y no habría manera de distinguir si procede de células sanguíneas o tumorales.

En la revisión realizada sobre el HER-2 (Introducción, apartado 3.2.1) hemos mencionado que la expresión de dicho gen no tiene lugar en tejido hematopoyético. La detección de copias de m-RNA en las muestras de sangre tiene que traducir forzosamente la presencia de células mamarias. Por ello fue el segundo gen escogido para nuestro trabajo. No obstante, el HER-2 sólo se expresa en un 30-40% de los tumores mamarios, y, si bien existe una selección positiva en las metástasis (son las células HER-2 positivas las que con más probabilidades van a metastatizar; en general el porcentaje de positividad de HER-2 en las metástasis es alrededor del 50-65% como ya se ha comentado), está lejos de ser el gen ideal (el gen candidato perfecto sería aquél que se expresase en todas las células de cáncer de mama y en ninguna célula sanguínea, pero dicho gen no existe). Por otra parte, su análisis puede aportar datos importantes sobre la sensibilidad a la quimioterapia de las células circulantes: se ha revisado la importancia del HER-2 como factor de resistencia a fármacos. Asimismo, el trabajo de Rodenhuis sobre HDCT demuestra que las pacientes HER-2 positivas prácticamente no tienen beneficio derivado del aumento de dosis de los citotóxicos. Es por ello interesante valorar los diferentes desenlaces clínicos en virtud de que las células circulantes sean HER-2 positivas o no.

Sin embargo, tras realizar el análisis de expresión en sangre periférica de HER-2, los resultados fueron desalentadores. De las pacientes con muestras válidas, sólo el 9,7% expresaba HER-2 en cuantía detectable en sangre periférica. De nuevo parecía confirmarse que estábamos trabajando con un gen que no expresaba la presencia de micrometástasis, ya que el 9,7% estaba muy lejos del porcentaje total de recaídas superior al 50%. Tampoco el uso combinado de K19 y HER-2 mostraba ningún valor

predictivo (la razón de considerarlos combinadamente es que de esta manera se aumenta el poder de detección; no todas las células tumorales tienen porqué expresar los mismos genes, pero buscando la expresión de distintos genes que sólo se expresen en células tumorales aumentan las posibilidades de detección respecto a buscar uno sólo). Como se aprecia en las figuras 33 y 34 que reproducimos aquí de nuevo, la relación de la expresión de K19 o HER-2 en sangre periférica con los desenlaces a estudio parece espuria. También puede consultarse la tabla 20, en la que al “atomizar” la variable “micrometástasis” en los diferentes genes que hacen que las detectemos, se aprecia que en concreto la relación de la K19 o el HER-2 en sangre periférica con la función de supervivencia de Cox son completamente carentes de significación estadística ($p=0.746$ y 0.948 respectivamente)

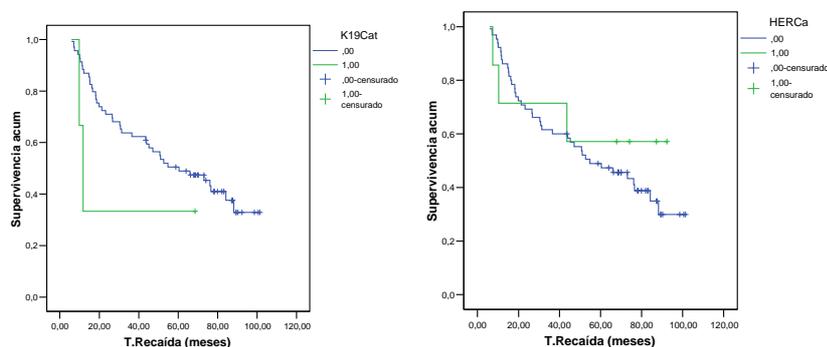


Figura 33 y 34: Curva de Kaplan Meier de tiempo a la recaída en función de la expresión de K19 y HER-2 en sangre periférica.

De esta manera, fue necesario buscar más genes en sangre periférica que detectasen la presencia de células tumorales en sangre periférica o micrometástasis ocultas que estuvieran ya soltando células tumorales a la sangre. El presupuesto disponible no permitió hacer un análisis por Micro-Arrays en el que se comparasen la expresión génica de diversas líneas celulares de cáncer de mama con tejido hematopoyético, pero sí utilizar genes expresados diferencialmente en cáncer de mama respecto a la sangre hallados por otros investigadores. Bosma *et al* [178] en el año 2002

publicaron un trabajo en que por análisis seriado de expresión génica detectaron tres genes que se expresan en células de cáncer de mama y no en tejido hemopoyético. El análisis seriado de expresión génica (“*Serial analysis of gene expression*”, *SAGE*) es una técnica de análisis masivo de expresión similar a los Micro-Arrays (si bien por razones que desconocemos no cuenta con la misma popularidad). De cualquier manera, en toda la literatura médica no hemos encontrado ningún trabajo que haya hecho lo mismo por la técnica de Micro-Arrays. La técnica y el experimento básicamente consisten en:

-SAGE: inicialmente hay que sintetizar todo el c-DNA complementario al m-RNA presente en las muestras a estudio (en este caso, se sintetizó el c-DNA complementario al m-RNA de 36 muestras de médula ósea, de 3 muestras de sangre periférica, y de 12 muestras de cáncer de mama. Posteriormente, se aíslan fragmentos de 11 pares de bases distribuidos a lo largo del genoma (entre 10000 y 30000). Por último, se comprueban las coincidencias de las secuencias de los c-DNA con los oligonucleótidos de 11 pares de bases. El número de coincidencias que ocurran es proporcional al número de transcritos que existen en la célula complementarios a la secuencia que contiene el fragmento de 11 pares de bases concreto. Únicamente hay que localizar en qué lugar del genoma está dicho fragmento de 11 pares de bases (estos últimos pasos los lleva a cabo un programa informático). Puede apreciarse que el fundamento es muy similar al de los Micro-Arrays, sólo que su análisis no puede ser “visual”, al no existir pocillos con diferentes colores en función de la cantidad de fluoróforo.

-El experimento de Bosma *et al* consistió en definir los genes que presentaban expresión diferencial en cáncer de mama respecto a sangre en un primer paso. Establecen el punto de corte de número de coincidencias (o “*matches*”) en 6 como significativo (quiere decir que los c-DNA que presentaran más de 6 *matches*

corresponden a m-RNA con abundante expresión. De los miles de fragmentos de 11 pares de bases seleccionados, 3027 fueron específicos de cáncer de mama respecto a sangre o a médula ósea (esto es obvio que no se corresponde a 3027 genes; puede haber varios fragmentos de 11 pares de bases que correspondan a un solo gen; por tanto es probable que el perfil de expresión de las células de cáncer de mama sólo difiera en 100 ó 200 genes respecto al tejido hemopoyético). De los 3027 fragmentos, 20 tuvieron más de 6 *matches*. Estos 20 fragmentos correspondían a 15 genes conocidos. Así que esos 15 genes fueron seleccionados como dianas para detección de células tumorales circulantes en sangre en función de su expresión génica diferencial.

La segunda parte del experimento consistió en detectar las células tumorales circulantes en 102 pacientes con cáncer de mama activo metastático usando estos genes. Finalmente encuentran que los genes más rentables para buscar células circulantes tumorales de cáncer de mama son el P1B, PS2 y el EGP2 (también usan la K19 por coherencia con los trabajos existentes hasta el momento). Los dos primeros son proteínas secretoras de membrana probablemente relacionados con funciones inmunológicas y el tercero es una glicoproteína de membrana expresada con mucha frecuencia en adenocarcinomas.

Como hemos mencionado, es el único trabajo que hemos encontrado que aplica un análisis masivo de expresión génica para diferenciar en qué genes se diferencia el perfil de expresión de las células tumorales de las sanguíneas, sin embargo no está exento de aspectos cuestionables. El problema fundamental es el *Gold Standard* que utilizan para afirmar que han encontrado células tumorales circulantes. Los resultados obtenidos con el panel de genes por PCR son cotejados después con un análisis por inmunohistoquímica de la fracción mononucleada de la sangre. Las muestras de sangre que tienen células tumorales detectadas por IHQ se califican como positivas, y las

demás como negativas. De esta manera, puede haber un número importante de falsos negativos. Así, en función de las cantidades de cada transcrito detectadas por RT-PCR, generan un modelo de regresión logística cuadrática (con coeficientes de segundo orden), en el que se da un punto de corte de cantidades de transcrito a partir del cual sus valores identifican que existen células identificadas por IHQ. En un segundo trabajo el mismo grupo utiliza esta ecuación (ya no la IHQ) en una nueva cohorte de 89 pacientes con cáncer de mama activo. Hacen un análisis de supervivencia en el que se dividen en dos grupos a las pacientes: aquéllas cuya ecuación arroja un valor de “1” (equivale a decir que tendrían células circulantes visibles por IHQ) y aquéllas cuya ecuación resulta “0”. Las del grupo “1” tuvieron una supervivencia significativamente menor. [244]

Es obvio que de estos dos trabajos lo que se puede desprender es que con la complicada ecuación (que no reproducimos aquí por dos razones: la primera porque estos investigadores usaron un gen de referencia distinto a GUS y por tanto los valores relativos para cada transcrito obtenidos por nosotros no serían aplicables a su ecuación, y la segunda porque es una ecuación con 16 términos de los cuales 12 son de segundo orden o superior y carece de interpretación práctica) que manejan, identifican un grupo de pacientes que tienen una carga tumoral tal que puede ser identificada incluso con IHQ. No es de extrañar por tanto que las pacientes con valor positivo vivan menos tiempo. De hecho, todas las pacientes con tumor activo deberían de tener, al menos a nivel teórico y en mayor o menor cuantía, células tumorales en el torrente sanguíneo. Sin embargo, lo verdaderamente útil para nosotros (sobre todo ante la ausencia de otros trabajos que hayan realizado un análisis diferencial) fue la identificación de 3 genes más cuya expresión es elevada y muy constante en células de cáncer de mama y escasa o nula en tejido sanguíneo. Por ello, procedimos a su detección por RT-PCR. Como se aprecia en el apartado de Resultados y en la discusión sucesiva, fue gracias a la

detección de la expresión de estos genes que pudimos obtener datos positivos. Es claro que la ecuación utilizada por Bosma *et al* carece de interpretación práctica en este estudio: en primer lugar, nuestras pacientes no tenían enfermedad activa; en segundo lugar, los objetivos de nuestro trabajo son distintos: no buscamos unas “cifras” de valores de transcritos que combinadas en un modelo matemático se correspondan con un *Gold Standard*, porque, entre otras cosas, no existe. Lo “único” (y en nuestra opinión de gran relevancia práctica) que tenemos para cotejar si las pacientes que presentan expresión de dichos transcritos en sangre presentan células tumorales circulantes o micrometástasis ocultas en algún lugar del organismo micrometástasis que están ya soltando células al torrente sanguíneo, es el perfil de recaída y muerte de las pacientes en el tiempo de observación.

En resumen, el planteamiento finalmente elegido por nosotros para detectar las células tumorales aisladas en sangre periférica fue la RT-PCR de los genes K-19, HER-2, EGP-2, P1B y PS2. De esta manera, al menos a priori, se minimiza el número de falsos negativos. Se ha comentado en Resultados que el 45,7% de las pacientes presentaron expresión de alguno de los transcritos, y que en dicho grupo de pacientes, el 66% de ellas recayeron en algún momento del seguimiento.

2.- Conceptos relativos al gen de referencia y a la cuantificación de transcritos de m-RNA.

2.1. Elección del gen de referencia.

La cuantificación del número de copias del transcrito analizado (K-19, HER-2, EGP-2, PS2 y P1B en nuestro caso) se expresa de manera relativa respecto a un gen de referencia (ver apartado siguiente).

Los cálculos de cuantificación de copias obtenidas con RT-PCR se desarrollaron inicialmente para medir la enfermedad mínima residual en enfermedades hematológicas malignas como por ejemplo las leucemias agudas o la leucemia mieloide crónica. Así, el primer criterio que se incluyó para la elección de un gen de referencia fue que dicho gen no debía de hallarse en un cromosoma alterado en dicha enfermedad (con mucha frecuencia en las enfermedades hematológicas malignas se presenta una translocación o una pérdida/ganancia cromosómica específica y característica; si el gen de referencia se halla en dicho cromosoma se corre el riesgo de que los resultados de cuantificación no sean válidos).

Por otra parte, la expresión del gen de referencia debe de ser similar entre distintos tipos celulares y además permanecer estable en diferentes condiciones: si el gen está relacionado (por ejemplo) con el ciclo celular, su valor será muy variable. A modo de ejemplo, en nuestro experimento, las pacientes habían recibido G-CSF dos veces al día durante al menos 7 días antes de la recolección de sangre periférica. Por ello, las células sanguíneas presentes en sangre periférica mostrarían una fracción de replicación superior a la habitual. Si el gen de referencia estuviera relacionado con la

replicación, la cuantificación de los transcritos buscados respecto a este gen de referencia arrojaría resultados anormalmente bajos.

Además, su estabilidad y su tasa de expresión deben de ser al menos iguales a las de los transcritos analizados.

Existe un problema frecuente que no debe de ser pasado por alto a la hora de diseñar el cebador para el gen de referencia: no es raro que la muestra de RNA contenga contaminación por DNA genómico. Hay que asegurarse de que el cebador es específico de c-DNA, para evitar artefactos en la supuesta tasa de expresión del gen de referencia y atribuir a expresión de dicho gen lo que en realidad es presencia de DNA genómico.

Los genes candidatos a gen de referencia están ampliamente estudiados para las hemopatías malignas; en ellas, las condiciones del medio extracelular la presencia de estímulos extracelulares que pueden alterar el perfil y la tasa de expresión génica de las células normales son muy extremas en relación a la sangre de pacientes sin tumores hematológicos. Además, la expresión de los transcritos a estudio para enfermedad mínima residual suele ser muy elevada. Por ello, los genes que son válidos en esta situación, lo son en general para cualquier otro tipo de estudio en sangre periférica. Por ejemplo, en nuestro experimento, lo único alterado respecto a la sangre de pacientes sanos es la administración de G-CSF; por lo demás la expresión de los transcritos a estudio debería de ser muy baja o nula, con lo que es sencillo que el gen de referencia cumpla también la característica de estar expresado en mayor cantidad que los genes a estudio. Se ha comentado en la sección Material y Métodos la publicación de Pallisgaard *et al* [180] respecto a la idoneidad de diversos genes candidatos a gen de referencia, cumpliendo los 3 mencionados las características ideales comentadas en este apartado. Como se ha explicado en la sección de Material y Métodos, el utilizado por nosotros de los tres candidatos fue la GUS. La utilidad del gen de referencia es doble:

por un lado identifica qué muestras no son válidas para el análisis y por otro, es un dato indispensable para la fórmula de cuantificación.

2.2. Cuantificación relativa del número de copias de los transcritos a estudio. Utilidad de la sensibilidad de la RT-PCR.

La transcripción reversa seguida de PCR es la técnica de elección para analizar la expresión de mRNA. La PCR en tiempo real es muy sensible y permite la cuantificación de transcritos raros y detectar cambios pequeños en la expresión de los mismos. El método de cuantificación depende del gen a estudio, de la cantidad esperada de mRNA y del grado de exactitud requerido. Existen dos modos de fundamentales de cuantificación en RT-PCR: cuantificación relativa (número de copias presentes del transcrito a estudio por copia del gen de referencia en cada muestra) o cuantificación absoluta. Michael W. Ptaffl hace una excelente revisión al respecto publicada en el año 2001 en la revista *Nucleic Acids Research*. [245] La cuantificación “absoluta” no es realmente absoluta; se basa en una curva de calibración externa respecto a un control positivo del gen a estudio. Los genes elegidos como referencia en la cuantificación relativa presentan una expresión más estable y existe más consenso al respecto que con los controles positivos. A modo de ejemplo, en nuestro estudio, existirían diversas formas de realizar la cuantificación “absoluta” sin existir acuerdo hoy por hoy de cuál es la adecuada: habría que obtener primero una muestra en la que sabemos que existe expresión del gen a estudio. De esa muestra habría que obtener diluciones seriadas de 10 en 10. Respecto a una de estas diluciones podría expresarse el número de copias en la muestra a estudio por número de copias del gen a estudio en la muestra control positivo. No existe consenso ni sobre qué tipo de muestra debe ser el control positivo (por ejemplo, podría usarse sangre de pacientes enfermos (en los que hipotéticamente existen células circulantes que pueden expresar el transcrito a estudio) o bien una línea

celular pura que supiéramos que expresa dicho gen: la concentración de mRNA del gen será mucho mayor en las diluciones realizadas con la línea celular pura que en las diluciones de sangre periférica de pacientes enfermos). Tampoco existe consenso sobre qué dilución (1/100, 1/1000,...) debe ser tomada como la de referencia. Por último, la expresión del gen a estudio no tiene porque ser constante: aun en el caso de que existiera consenso del tipo de muestra que debe ser tomada como referencia (por ejemplo, línea celular), no está claro que el nivel de expresión del gen a estudio sea la misma en las células de la muestra que estamos estudiando que en las células de la línea celular. Asimismo, utilizar este método implicaría validar un control distinto para cada producto a estudio (no conviene olvidar que en el genoma se han caracterizado más de 30000 genes). Así, la realización de la PCR en controles positivos y el cálculo de sensibilidad en nuestro experimento carece de interés salvo para comprobar que la PCR se desarrolla correctamente.

Por todo ello, la cuantificación relativa respecto a un gen considerado estable fue el procedimiento de elección en nuestro caso. La GUS se expresa en todas las células, y su nivel de expresión es similar entre unas muestras y otras. Por ello, el número de copias del transcrito a estudio respecto al mRNA de GUS presente en cada muestra es un dato mucho más fiable que si realizáramos cuantificación “absoluta”. La cuantificación relativa salva un problema que la cuantificación “absoluta” no puede resolver: como se ha mencionado, el mRNA presente en las muestras de sangre congeladas se degrada con el tiempo. Esta degradación sucede al azar (todas las moléculas de mRNA, sean del transcrito que sean, tienen la misma posibilidad de degradarse). Las muestras que no muestran fluorescencia específica para el gen de referencia en el ciclo 29 (en otras palabras, su Ct es en el ciclo 29) se deshechan porque no se puede asumir que exista suficiente mRNA para realizar estudios fiables. Sin

embargo, hay muestras en las que el Ct es 25 y otras en las que es 28,5. Eso quiere decir que (si la eficiencia (número de copias al final del ciclo/número de copias al principio del ciclo) de cada ciclo es 2) en la primera muestra existe $2^{3,5}=11,3$ veces más de mRNA que en la segunda. Durante la fase logarítmica de la PCR la amplificación es:

$$T_n = T_0 * E^n$$

Donde T es la cantidad de la secuencia en el ciclo n, T₀ es la cantidad en el ciclo 0; E es la eficiencia (máxima es 2, se dobla, y mínima es 1, no hay amplificación)

Si la cuantificación se realizara de modo absoluto, la muestra segunda engañosamente parecería que tiene menos cantidad de transcritos del gen a estudio (11,3 veces menos) que la primera, cuando en realidad el número de copias respecto al gen control podría ser mayor y por tanto existir más células tumorales circulantes por célula normal en la segunda. En realidad esa infracuantificación se debería simplemente a la diferente cantidad de mRNA total presente entre las distintas muestras. Realizar cuantificaciones absolutas podría sesgar los resultados: imaginemos que la posibilidad de recaída está relacionada directamente con la tasa de contaminación por células tumorales circulantes y que la paciente de la segunda muestra recae antes que la paciente de la primera muestra del ejemplo: la cuantificación relativa arrojaría un dato coherente con el resultado real, mientras que la “absoluta” daría un resultado completamente opuesto. Otros inconvenientes de la cuantificación “absoluta” son que la eficiencia de la amplificación ha de ser confirmada para el control y el gen diana y ha de ser idéntica; por otra parte, la generación de material control consume mucho tiempo y

ha de ser cuantificada minuciosamente. Por último, ha de realizarse una normalización del gen diana frente a un control estándar interno. En nuestro experimento el control positivo se utilizó únicamente para testar la sensibilidad máxima de la RT-PCR y la idoneidad del procedimiento, para no analizar las muestras a estudio sin la certeza absoluta de que este análisis es sensible (en otras palabras, de que no hay falsos negativos) y de que se realiza correctamente. Para todos los genes a estudio el resultado se muestra en cifras relativas (carece de unidades de medida) respecto al gen de referencia GUS en cada muestra. Las amplificaciones de cada gen a estudio y de GUS se realizan en reacciones separadas.

3.-Comentarios acerca de otros trabajos realizados sobre la presencia de micrometástasis en cáncer de mama.

Los trabajos realizados localizados en la literatura médica serán comentados por orden cronológico de publicación, reseñando sus aspectos más importantes y que puedan relacionarse con el nuestro, para al final extractar una serie de conclusiones.

3.1. Trabajos existentes sobre el tema.

-Pantel K *et al* [184] publican en 1993 el primer trabajo de entidad sobre aislamiento de células tumorales a distancia del tumor primario. La importancia radica no en el impacto pronóstico (si bien analizan 550 pacientes, corresponde a 3 tumores distintos (colon, estómago y mama) y en distintos estadios, desde T1NO hasta M1, por lo que el análisis pronóstico no es realizable), sino en que son los primeros en correlacionar con que a mayor estadio aumenta el porcentaje de células tumorales aisladas en la médula ósea (determinadas por inmunohistoquímica). Las células están identificadas con anticuerpos anti-queratinas, lo que puede subestimar el porcentaje real de células tumorales a distancia. Un aspecto interesante es que a las 71 pacientes que tienen cáncer de mama en este estudio les practican IHQ en la médula ósea para el HER-2, sugiriendo que existe selección positiva de células HER-2 positivas al encontrar que un 68% de las pacientes a las que le detectan micrometástasis medulares, dichas micrometástasis son HER-2 positivas.

-Vredenburgh JJ *et al* [186]: Estudian 64 pacientes con cáncer de mama metastático. Quince son sometidas a HDCT sin quimioterapia de inducción; el resto reciben quimioterapia con CMF previamente. A todas ellas les practican una biopsia de médula ósea, en la que buscan por IHQ contaminación por células tumorales. Detectan que la contaminación es significativamente mayor en las pacientes sin inducción, pero esto no se traduce en un mejor o peor pronóstico. Posibles razones son: 1) escaso

número de pacientes y desbalance extremo entre ambos grupos que impide sacar conclusiones con p significativa 2) ausencia real de impacto pronóstico de las células en médula ósea por poder tratarse de depósitos durmientes (o incluso irrelevantes: al tratarse de pacientes con enfermedad metastásica activa, puede haber depósitos activos en otros órganos en los que la presencia de células mamarias sea absolutamente anómala como el hígado o el cerebro, que sí impacten en el pronóstico) en contraposición al hecho de detectar células en sangre periférica meses después de la erradicación macroscópica del tumor 3) utilizan técnicas poco sensibles y 4) al tratarse de pacientes con enfermedad activa metastásica macroscópica es difícil demostrar que la afectación microscópica tenga importancia alguna, puesto que hay metástasis de mayor tamaño ya comprometiendo la vida de la paciente en el momento del estudio.

-Diel IJ *et al* [187]: lo atractivo de este estudio es que estudiaron a 727 pacientes, 367 con ganglios afectados y 360 con axila libre. Realizaron una biopsia de médula ósea en el momento de la cirugía y la búsqueda de células tumorales la realizan con un anticuerpo contra una mucina de membrana (que presenta falsos positivos con células sanguíneas, no es específico de cáncer de mama). Cotejaron la presencia de micrometástasis en médula con el tamaño tumoral, el estado ganglionar, los receptores hormonales, el grado y el estado hormonal de la mujer. La supervivencia es significativamente peor para las pacientes con tinción positiva para dicho anticuerpo en médula. Sin embargo, sólo son interpretables los resultados que ofrecen en las curvas de Kaplan-Meier y en otros análisis univariantes (por ejemplo ofrecen un valor de riesgo relativo para recaída a distancia de 2 en las pacientes con micrometástasis respecto a las pacientes sin ellas). No ofrecen el valor de los coeficientes del modelo de Cox, sólo la significación estadística menor de 0,05 para la variable micrometástasis (no para las demás), con lo que es imposible averiguar la diferencia de densidad de incidencia. El problema que

tienen las muestras demasiado grandes es que cualquier diferencia, por irrelevante que sea a nivel clínico, alcanza significación estadística. Hay un punto metodológico cuestionable, y es que las biopsias son tomadas justo después de la cirugía; es en el momento del trauma quirúrgico cuando más células tumorales se liberan al torrente sanguíneo. Por ello, las diferencias pueden estar sesgadas hacia el valor nulo. Una conclusión importante de este estudio es que parece que el impacto de las micrometástasis es independiente del estado de afectación ganglionar, sugiriendo que el cáncer de mama disemina no solo a través de los ganglios linfáticos sino por el torrente sanguíneo, siendo insuficiente un estadiaje que contemple sólo el sistema linfático. Años más tarde, este grupo publicó una actualización de su estudio con un seguimiento mediano de 6,5 años; observaron que el impacto pronóstico permanecía constante en el tiempo, mientras que el impacto atribuible al grado tumoral y a los receptores de progesterona parecía disminuir. [246]

-Vannucchi *et al* [225]: realizan un estudio corto con 33 pacientes con cáncer de mama localmente avanzado (IIIA) a las que someten a quimioterapia de intensificación. Contrastan la positividad para K19 por IHQ en biopsia de médula ósea (tomada antes de cualquier quimioterapia) con la positividad por PCR (no en tiempo real) en muestras de la sangre de aféresis. Encuentran correlación significativa, y un alto porcentaje de muestras tanto de médula ósea (57%) como de sangre de aféresis (48%) presentan K19 positivo. Sin embargo, si bien muchas de las pacientes negativas por IHQ tienen una PCR positiva, lo cual sugiere, que, si bien no necesariamente la presencia de células tumorales en médula ósea tiene porqué correlacionarse con la presencia en sangre, la IHQ es menos sensible que la PCR. El pequeño tamaño de la muestra obliga a tomar con cautela cualquier conclusión inferida de este estudio.

-Cooper B *et al* [189]: realizan un estudio sobre 57 pacientes en estadio IV con enfermedad activa que son sometidas a quimioterapia a altas dosis. Con una mezcla de anticuerpos dirigidos contra epitelio de glándula mamaria, buscan presencia de células que reaccionen positivamente a éstos tanto en médula ósea como en producto de aféresis. La supervivencia es la misma en las pacientes con reacción positiva o negativa. Las limitaciones del estudio son : 1)de nuevo se utiliza un método de detección con potencialmente falsos positivos (anticuerpos “anti-mama” pueden reaccionar contra células diferentes al cáncer de mama) y falsos negativos (por el mero hecho de utilizar IHQ y porque las células de cáncer de mama no necesariamente expresan ya antígenos propios de la glándula mamaria, sobre todo cuando circulan en sangre periférica) 2) escaso número de pacientes 3)el trabajar con pacientes con metástasis activas hace que la presencia de contaminación microscópica tal vez sea irrelevante, dado que existe ya tumor macroscópico tanto en las que tienen contaminación microscópica en el producto de aféresis como en las que no la tienen.

-Braun S *et al* [247]: sobre 20 pacientes con cáncer de mama con presencia de células K19-positivas en biopsia de médula ósea, realizan tinción por IHQ con 4 anticuerpos (anti –HER, -Lewis, -CO17 (antígeno de membrana de adenocarcinoma) y –Mucina1) para demostrar que la expresión de antígenos comunes de membrana puede ser variable. Efectivamente observan que no se presenta coexpresión de los 4 en ninguno de los casos. El estudio fue diseñado para testar la hipótesis de que las terapias dirigidas contra dianas específicas podría fracasar debido a ello: previamente a la publicación un estudio con un anticuerpo anti-CO17 para pacientes de cáncer de colon había resultado positivo disminuyendo el número de recaídas y muertes tras cirugía. Con el presente trabajo pretendían demostrar que debido a la heterogeneidad tumoral, ciertos antígenos comunes de membrana podían estar presentes sólo en algunas células y por tanto las

terapias dirigidas no ser efectivas invariablemente. Este estudio sólo tiene interés en nuestro caso porque apoya el hecho de que el perfil de expresión génica puede ser variable dentro de un mismo tumor y por tanto la detección de células tumorales ha de hacerse utilizando varios genes diana. [248]

-Mansi JL *et al* [190]: constituye uno de los estudios más importantes; fue publicado en The Lancet en 1999. Cuenta con un gran número de pacientes (350) y un seguimiento prolongado (12,5 años de mediana), además de tratarse de una cohorte relativamente uniforme en cuanto a pronóstico puesto que al menos no incluyó ningún paciente en estadio IV. Estos autores tomaron biopsia de médula ósea justo antes de la cirugía; las biopsias fueron teñidas con un anticuerpo policlonal anti-membrana epitelial. Analizando sin ajustar por otros factores pronósticos, encuentran un riesgo relativo para recaída y muerte de 1,5 para las pacientes con tinción positiva. Sin embargo, se pierde cualquier asociación pronóstica cuando la presencia de micrometástasis es incluida en un análisis multivariante y se ajusta por número de ganglios, receptores hormonales y grado tumoral. Quizá de nuevo las razones subyacente sean usar una técnica poco sensible y poco específica, lo que resta potencia a los resultados, y el hecho de buscar las células en un órgano en que como se ha explicado pueden permanecer latentes por mucho tiempo y por ello su hallazgo no necesariamente tenga significado. Al menos así lo hace sospechar el hecho de que a pesar del elevado número de pacientes pierdan la significación estadística en el análisis multivariante.

-Braun S *et al* [192]: probablemente el trabajo más importante. Publicado en el *New England Journal of Medicine*. Se trata de un estudio con 552 pacientes afectas de cáncer de mama estadios I, II o III a las que tomaron biopsias de médula y posteriormente realizaron IHQ con un anticuerpo anti-panqueratinas. La presencia de micrometástasis en médula ósea fue independiente del factor más relevante considerado (afectación

ganglionar o no). Asimismo, encontraron que la presencia de micrometástasis en médula resultó influyente (con significación estadística <0.05) tanto en la recaída a distancia como en el fallecimiento por cáncer de mama. Esta influencia se conservó al ajustar por receptores de estrógenos, grado tumoral, tamaño tumoral o afectación ganglionar (considerada como variable categórica). Sólo puede criticarse un aspecto de este estudio, y es que la definición de afectación ganglionar como variable categórica en un análisis multivariante no tiene sentido (obviamente una paciente sin ganglios afectados tiene menos riesgo que una con 1 ganglio afecto, pero no se puede analizar en el mismo grupo a las pacientes con 2 ó 3 ganglios afectados y a las pacientes con 7 u 8 ganglios afectados). Si tiene sentido en los análisis univariantes como por ejemplo la prueba de Kaplan Meier, en la que se agrupan en varias categorías puesto que no suelen compararse más de 2 ó 3 grupos. Sin embargo, en los análisis multivariantes la tendencia es aportar la información lo más cuantitativa posible, para establecer cuánto aumenta la razón de densidades de incidencia para el incremento en una unidad del factor de riesgo a estudio. No muestran los datos de si la presencia de micrometástasis era mayor en el grupo de pacientes con 8 ó 10 ganglios afectados que en las pacientes con pocos ganglios; de hecho, cuando se refieren a que la presencia de micrometástasis es independiente de la afectación ganglionar, también está considerada esta última variable como categórica. Al no aparecer estos datos no puede excluirse que la presencia de micrometástasis esté asociada a las afectaciones axilares más masivas y por tanto el efecto multivariante fuera no significativo si se dividiera la afectación ganglionar ganglio por ganglio.

-Lyda MH *et al* [193]: sobre 54 biopsias de médula ósea en pacientes con cáncer de mama (10% en estadio IV) realizaron tanto un examen histológico convencional como con IHQ con un anticuerpo anti-panqueratinas. El porcentaje de biopsias positivas para

tumor ascendió del 20% al 30%, siendo la supervivencia menor (estadísticamente significativa) en las pacientes con tinción positiva. Las conclusiones de este estudio son que el uso de marcadores IHQ aumentan la sensibilidad respecto a la microscopía convencional; sin embargo, tal vez de haber utilizado PCR el porcentaje de biopsias finalmente etiquetadas como positivas hubiera sido mayor. Es curioso que con el pequeño número de pacientes se obtenga un resultado significativo; sin embargo no se aportan datos de la influencia una vez estratificado el factor “micrometástasis” por el resto de los factores pronósticos en un análisis multivariante.

-Wong IHN *et al* [226]: aportan unos datos interesantes al ser los primeros que hacen RT-PCR en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama. De las 33 pacientes incluidas, 44% eran estadio III o IV. La RT-PCR se dirigió contra la K19. Detectaron positividad para la K-19 en un 72% de las pacientes con cáncer de mama, pero también en un 19% de controles sanos (aunque los niveles de K19 fueron mayores ($p < 0,05$) en las pacientes con cáncer). Los valores cuantitativos de K19 fueron mayores en las pacientes con estadios más avanzados. La supervivencia para las 10 pacientes con K19 en los límites más altos (punto de corte definido arbitrariamente) fue de 30 meses en contraste con las otras 23, cuya mediana de supervivencia fue de 54 meses ($p = 0,045$). No se realizó análisis multivariante. El número de pacientes que agrupan en el grupo de peor pronóstico es muy escaso, y este agrupamiento no puede descartarse que se produjera “probando” hasta ver un punto de corte arbitrario que produjera diferencias significativas. Sin embargo esto no quita importancia al estudio al ser el primero que demuestra relevancia para la presencia en sangre de transcritos propios de cáncer de mama. No conviene olvidar sin embargo la presencia de K19 en sangre de un 17% de los pacientes sanos; tampoco conseguimos explicar cómo obtienen un porcentaje tan alto de K19 en pacientes con cáncer salvo por el hecho de que la toma de muestras de

sangre se realizó en el momento de la cirugía. La presencia de K19 en controles negativos algunos autores la han explicado por lo que han denominado *Illegitimate expresión* o “expresión ilegítima”; se atribuye a expresión aberrante de K19 por células mesenquimales como las células endoteliales o los fibroblastos. [249, 250]

-Braun S *et al* [251]: de nuevo el grupo comandado por Klaus Pantel realiza un importante trabajo, publicado en el *Journal of Clinical Oncology* en enero de 2000. Cuentan con 59 aspirados medulares de pacientes con carcinoma de mama localmente avanzado (38% carcinoma inflamatorio y 62% con invasión de 4 ganglios). Tiñeron mediante IHQ dichos aspirados con el anticuerpo anti-panqueratinas A45-B/B3 utilizado en el trabajo mencionado más arriba publicado en NEJM. Los aspirados fueron tomados y teñidos antes y después de tratamiento quimioterápico con antraciclinas y taxanos. Del 49% inicial de pacientes que presentaban tinción positiva, tras la quimioterapia se redujeron a la mitad (29 pacientes pasaron a 14). Asimismo, 11 de 30 pacientes con la primera médula negativa, la positivizaron tras el tratamiento. Del total de pacientes, hubo un total de 28,8% de recaídas (esto sugiere que el tratamiento quimioterápico es efectivo; en una cohorte compuesta sólo por pacientes con carcinoma inflamatorio o más de cuatro ganglios afectados el porcentaje de recaídas sin quimioterapia es cercano al 80%). Sin embargo, las pacientes que presentaron en algún momento tinción positiva en médula tras la quimioterapia, recayeron en un 56%. Estos datos sugieren dos cosas: primero, que el factor pronóstico “afectación ganglionar” es “susceptible” de ser tratado y curado con quimioterapia, mientras que cuando hay afectación de tejido hemopoyético el porcentaje de recaídas es muy alto a pesar de los esfuerzos terapéuticos; segundo, que parece ser más importante encontrar células cancerosas tras el tratamiento que antes (prueba de ello es que el 50% de las pacientes con médula positiva al inicio se negativizaron). No obstante, no dan datos por

subgrupos: se echa en falta saber cuál es el porcentaje de recaídas en las pacientes que partieron con médula positiva y pasaron a negativa vs médula positiva que permaneció positiva vs médula negativa que pasó a positiva vs médula siempre negativa. Estos datos, si bien se trataría de muy pocos pacientes, podrían aseverar la hipótesis de que el aislamiento de células tumorales inmediatamente después de la cirugía y antes del tratamiento quimioterápico carecen de significado. Otro punto al que no encontramos explicación es que titulan su artículo “ausencia de efecto de la quimioterapia adyuvante para eliminar las células tumorales durmientes en la médula ósea de pacientes con cáncer de mama de alto riesgo”. Incluso textualmente refieren: “tras la quimioterapia, sólo el 48,3 % de las pacientes con tinción positiva al inicio la negativizaron tras el tratamiento”. No entendemos cómo pueden decir que la mitad de pacientes negativizadas sea etiquetada como “sólo”. En nuestra opinión, pueden titular el trabajo de esa manera porque tras el tratamiento, 26 pacientes (casi la mitad), presentaban positividad en médula ósea, pero una parte importante de ellas no la presentaban al principio; esto sugeriría que existe una vía de metastatización hematológica, independiente de la linfática, que es evidente cierto tiempo después de la cirugía y es muy difícil de erradicar. Por otra parte, apoya la hipótesis de ausencia de significado del aislamiento de micrometástasis en el período perioperatorio.

-Hu XC *et al* [252]: aportan un trabajo de escasa importancia. Analizan la presencia de K19, K20 y b-HCG en sangre periférica en 72 pacientes con cáncer de mama estadios I-IV y en 30 controles con enfermedades benignas de la mama. La detección de células tumorales con K19, K20 y BHCG fueron, en las enfermas y en las sanas respectivamente, 9,72%, 2,78%, 12,5% y 10%, 0%, 0%. El total de casos con algún marcador positivo en enfermas fue de 18% vs 10% en sanas. El porcentaje de detección de transcritos tendía a incrementarse con el estadio. Este trabajo no aporta datos de

influencia pronóstica. En relación a nuestros datos coinciden en el bajo porcentaje de detección de K19. El panel de genes elegido no parece encontrar todas las pacientes que presentan diseminación metastásica (entre otras cosas, porque el análisis a estas pacientes fue realizado en un momento en el que aún existía tumor, antes de la cirugía).

-Gerber *et al* [194]: su publicación ha sido ya comentada. Brevemente, realizaron IHQ con anticuerpos anti-panqueratinas en médula ósea de 484 pacientes con cáncer de mama libre de afectación ganglionar y en 70 pacientes con un ganglio afecto, encontrando similar porcentaje de médulas positivas (26% y 37%). La conclusión es que existen vías distintas de metastatización, pero en nuestra opinión, hay dos datos en contra :primero, que el porcentaje de médulas positivas en este estudio resultó estar asociado con la afectación ganglionar (no siendo por tanto independiente); el segundo, es que las biopsias medulares están tomadas en el período perioperatorio, pudiendo por tanto explicar la presencia de células en las médulas de las pacientes sin ganglios afectados (en este grupo sólo recayeron el 24% de pacientes, muy inferior a lo observado cuando se hace la inmunohistoquímica varios meses después de la cirugía y/o quimioterapia e igual al porcentaje de pacientes que recaen en este estudio en el grupo de 1 ganglio afecto). De nuevo sale a relucir la pregunta de si el practicar la detección de células tumorales cuando existe tumor o muy pocos días después de resecarlo subestima la importancia de las células cancerosas existentes a la sangre. De tener una importancia capital e independiente, el porcentaje de recaídas en las pacientes con tinción positiva sería mucho mayor; además, no necesariamente habría más médulas afectadas en el grupo N+. La liberación inespecífica durante el trauma quirúrgico de células tumorales explica que las pacientes N+ (que por definición tienen más carga tumoral y precisan una cirugía más agresiva) padezcan más diseminación hematógica

(si la muestra se toma antes de que el sistema inmune elimine las células sin capacidad de supervivencia a distancia)

-Braun S *et al* [195]: una vez más nos ofrecen un análisis muy interesante. Sobre 52 médulas de pacientes con cáncer de mama positivas para K19, realizaron la tinción para el HER-2. Las células positivas para K19 lo fueron también para el HER-2 en el 60% de los casos (apoyando el hecho de la selección clonal positiva para las células HER-2). Éstas recayeron en un porcentaje mayor que las K19 positivas/HER-2 negativas (21 eventos frente a 7). Este trabajo se discute en contraste con nuestros resultados más abajo.

-Gebauer *et al* [196]: entre 1989 y 1994 tomaron biopsia de médula ósea a 393 pacientes consecutivas con cáncer de mama durante la intervención quirúrgica; las médulas fueron teñidas con anticuerpos anti-membrana epitelial y anti-panqueratinas. Encontraron impacto positivo para la diseminación medular, pero sin embargo el impacto era menor que el atribuido a la afectación axilar o al tamaño tumoral. La toma de la muestra en el contexto quirúrgico, y la baja especificidad de los anticuerpos utilizados puede ser la causa.

-Kasimir-Bauer *et al* [197]: realizan un trabajo en el que analizan la presencia de K17 en un pequeño número de pacientes sometidas a quimioterapia a altas dosis. Trece de ellas recibieron la quimioterapia de intensificación con intención adyuvante; en ellas la tasa de detección de K19 en el producto de aféresis (3 de 13) fue baja y no predijo ningún tipo de evento (no obstante es un número de pacientes muy corto). Otras 30 recibieron las altas dosis con enfermedad metastásica; en ellas, la detección de K19 fue más alta (18 de 30); se apreció cierta tendencia a menor supervivencia. Lo más interesante de este estudio fue que no encontraron un aumento significativo del dominio extracelular del HER-2 (fragmento de proteína del HER-2 que se libera a la sangre y es

una estimación indirecta de la carga tumoral HER-2 positiva) en la sangre de las pacientes en las que se detectaron queratinas. No obstante, el estudio presenta importantes limitaciones de tamaño.

-Witzig *et al* [228]: realizaron un trabajo en el que desarrollaron una técnica de enriquecimiento inmunomagnético de las células presentes en sangre periférica previo al examen por microscopía con el fin de aumentar la sensibilidad de la detección por IHQ de células tumorales en sangre. Obtienen un 8% de casos positivos para un total de 29 pacientes con ganglios afectados.

-Stathopoulou A *et al* [229]: aportaron un importante estudio en el que apoyan la importancia de la detección de células tumorales por K19 en 148 pacientes de bajo riesgo. La detección fue realizada en sangre periférica. Es el primer estudio que detecta impacto en el análisis multivariante para la presencia de células tumorales detectadas con K19 (29% de las pacientes) en sangre periférica, si bien difiere de nuestro estudio en que se trata de una cohorte de bajo riesgo y sólo se produjeron 8 muertes (5,4%). La tasa de densidades de incidencia de muerte atribuible a la presencia de células K-19 positivas en sangre periférica fue de 8,58, aunque, repetimos, sólo se produjeron un 5,4 % de eventos en el tiempo de seguimiento, por lo que esta tasa de densidad de incidencia parece difícil de interpretar (una muerte en las pacientes sin K19 y 7 en las K19 positivas para un total de 148 enfermas)

-Xenidis N *et al* [231]: de nuevo se nos presenta un trabajo en el que se analiza la presencia de K19 en sangre periférica por RT-PCR en pacientes de bajo riesgo (161 en estadio I y II) Detectaron presencia de K19 en sangre periférica en el 27% de las pacientes (en el momento de la cirugía); dichas pacientes presentaron una mayor tasa de recaídas (razón de riesgos 3.91) siempre y cuando se tratara de pacientes con menos de 4 ganglios afectados (los estadios I y II eran estadios clínicos; posteriormente en el acto

quirúrgico se observa afectación axilar y cambio del estadio en pacientes con axila negativa clínicamente). Es más importante el hecho de que la presencia de células K19 positivas en sangre periférica en el subgrupo de pacientes de más alto riesgo (59 pacientes, 36% del total) tenía un efecto protector. Podría interpretarse que buscar células tumorales en un grupo de mal pronóstico (más de 4 ganglios) con un marcador de buen pronóstico (la K19 como se ha explicado sobradamente se asocia a mejor evolución) implica seleccionar, dentro del grupo de más de 4 ganglios, aquellas pacientes con menos riesgo. Como se aprecia en la tabla presentada en el apartado 5.4.3 de la sección de resultados, en nuestro caso la significación para las micrometástasis se conserva en el grupo de más alto riesgo, probablemente debido a que no hemos identificado las micrometástasis con la K19.

-Silva JM *et al* [253]: Trabajo muy importante por tratarse del primero en el que la búsqueda de células tumorales se realizó en sangre periférica con RT-PCR. A 45 pacientes con cáncer de mama se les determinó la presencia de K19 y mamaglobina en sangre periférica en el momento de la intervención. Estudiaron la asociación de la presencia de K19 con otros factores pronósticos conocidos. Obtuvieron relación entre los factores pronósticos adversos tamaño tumoral e índice proliferativo. A pesar de ser un número corto de pacientes, se obtiene una importante relación con los factores ligados a un mal curso clínico, lo que da idea de la potencia pronóstica de la presencia de células tumorales en sangre.

-Gaforio JJ *et al* [254]: realizaron un estudio en el que tras enriquecimiento inmunomagnético analizaron la presencia de células positivas por IHQ para K19 en 25 pacientes con cáncer de mama no operado, 42 operado (muestra tomada en período perioperatorio) y 25 metastásicas. Encuentran positividad en 57% de los casos, lo que no es extraño al tratarse de pacientes con enfermedad activa en un 54% de los casos

(metastásicas + tumores aún no intervenidos). Encuentran una tendencia no significativa hacia peor supervivencia en las pacientes con hallazgos positivos, pero este dato no está ajustado diferenciando entre pacientes con metástasis o sin ellas, por lo que no puede descartarse que se deba a una asociación espuria con factores de impacto pronóstico conocido.

-Schneeweiss *A et al* [200]: aportaron el primer trabajo en el que se estudiaron únicamente pacientes de alto riesgo (91 pacientes, 73 con más de 10 ganglios afectados, 18 con 4-9) tratadas con quimioterapia a altas dosis. No encontraron ninguna asociación pronóstica, sin embargo, el estudio de micrometástasis fue realizado antes de cualquier procedimiento terapéutico, en médula ósea y con inmunohistoquímica usando anticuerpos de escasa especificidad (anti-membrana de células epiteliales)

-Weigelt *et al* [255]: se cita este trabajo a pesar de que estrictamente no corresponde a detección de micrometástasis. Este investigador pertenece al grupo de Astrid Bosma y Laura Van't Veer, que fueron quienes diseñaron el panel de genes para la detección más sensible y específica de células de cáncer de mama en sangre periférica. En este trabajo aplicaron el panel a la detección de micrometástasis en el ganglio centinela que en 70 pacientes cuyo ganglio centinela por procedimientos histopatológicos convencionales había resultado negativo, para testar si la sensibilidad y especificidad podía ser aumentada. Independientemente del resultado del trabajo (que fue positivo), lo interesante en relación al nuestro fue que ellos también finalmente excluyeron el gen PS2 del análisis por no detectar casos positivos.

3.2. Recapitulación acerca de los resultados de los trabajos de otros autores.

Como resumen de los trabajos presentados, puede decirse lo siguiente:

1.-El impacto de las células tumorales diseminadas en sangre periférica está poco estudiado, y en general se refiere a muestras obtenidas en el período perioperatorio.

2.-El impacto de las células tumorales aisladas en médula ósea está extensamente estudiado, y parece estar asociado, en los estudios bien diseñados, a un incremento en el riesgo de recaída posiblemente independiente del resto de los factores pronósticos.

3.-Este impacto pronóstico parece limitado a los subgrupos de pacientes con menor riesgo a priori en función del resto de los factores pronósticos.

4.-El impacto pronóstico de las micrometástasis cuando se estudia un solo gen como la K 19 parece ser viable (por el porcentaje de pacientes positivas) sólo en los grupos de menor riesgo.

5.-El análisis del impacto pronóstico de las micrometástasis en pacientes de alto riesgo exclusivamente no está realizado hasta la fecha. Posiblemente debido a la interacción con los factores que de por sí confieren mal pronóstico a las series, el estudio clásico con K19 (cuya presencia como indicador de micrometástasis parece limitarse a los grupos de bajo riesgo) puede que no sea eficiente. Tal vez la detección de micrometástasis en grupos de alto riesgo deba ser abordada con otros genes.

4.-Resultados obtenidos en nuestra serie.

4.1. Resultados concernientes a los tratamientos administrados en nuestra serie.

La supervivencia global de la cohorte (58,3% pacientes vivas tras un seguimiento de 74,5 meses) es la esperable en una cohorte de este tipo tratada con quimioterapia a altas dosis tras tratamiento de inducción. No puede ni debe ser comparada con los estudios randomizados discutidos en la introducción, dado que en nuestro caso las pacientes no fueron tratadas en el contexto de un ensayo fase III. Tampoco las toxicidades registradas difieren de las publicadas por otros grupos de trasplante en cáncer de mama, por lo que no merecen una discusión detallada.

Sí nos parece importante reseñar un dato obtenido en nuestra serie: el aparente peor pronóstico atribuible a la administración de Taxol en el análisis multivariante.

Actualmente los taxanos se utilizan junto a las antraciclinas dentro de esquemas adyuvantes para carcinoma de mama resecado con ganglios afectos, debido a los estudios que han mostrado su efecto beneficioso adicional sobre la administración de antraciclinas. Si bien existen múltiples estudios fase II y III, sólo merece la pena mencionar (pues la aplicación de taxanos en adyuvancia en pacientes con ganglios positivos hoy por hoy no es un hecho que deba ser justificado) los tres fase III con más de 1500 pacientes cada uno de Henderson *et al* [256], Citron *et al* [257] y Nabholz *et al* [258]. En el primero de ellos se observa un efecto constante a favor de la adición de Taxol en los tres subgrupos en función de la dosis de antraciclinas (se administraron 3 dosis distintas de antraciclinas). El incremento de dosis de antraciclinas no mostró ningún beneficio; la adición de Taxol sí. En el segundo de ellos, sobre un régimen de referencia de AC administrado cada 3 semanas se testaron 2 hipótesis en un estudio randomizado 2X2: si la adición de taxanos aportaban algo a sólo AC y si el acortamiento entre ciclos de 3 a 2 semanas arrojaba beneficios clínicos. Ambas

hipótesis resultaron comprobadas favorablemente. En el tercer estudio, se probó la eficacia del Taxotere; el régimen de referencia fue FAC y el experimental sustituyó el Fluorouracilo por Taxotere (TAC). En el primer “corte” previsto de análisis a 33 meses de seguimiento, ya fue evidente la mejora de los resultados para el brazo experimental. Este estudio de momento no ha sido publicado puesto que está previsto hacerlo cuando se haya completado el seguimiento total previsto de 60 meses. Globalmente, se estima que la adición de taxanos a las antraciclinas en adyuvancia puede reducir en términos absolutos un 10% de los eventos. Estos datos se empezaban a intuir a finales de los 90, y en concreto en nuestro país se comenzó a administrar Taxol fuera de ensayo a pacientes con un pésimo pronóstico a priori (por ejemplo pacientes con carcinoma inflamatorio). En las pacientes analizadas por nosotros, el esquema a altas dosis fue el mismo para todas, pero el esquema adyuvante permitido podía ser cualquiera que contuviera antraciclinas, a criterio de su oncólogo. No era la intención de nuestro estudio analizar la influencia del Taxol en adyuvancia; nuestro diseño experimental fue realizado para el estudio de las micrometástasis. Sin embargo, sabemos que 14 pacientes del grupo con rasgos de pésimo pronóstico (N3 clínico (ganglios supraclaviculares), carcinoma inflamatorio, T4 inoperable no inflamatorio) recibieron Taxol en un intento por parte de su oncólogo de mejorar su desenlace (y probablemente lo hubieran recibido más pacientes del grupo con rasgos similares de haber estado disponible antes; recordemos que analizamos pacientes que fueron tratadas a lo largo de la década de los 90, y el Taxol no comenzó a estar disponible hasta el 96-98 según hospitales). Por ello, no es de extrañar que, como muestra la tabla 19 aquí reproducida, la administración de Taxol esté asociada (casi con una p significativa) a un peor pronóstico. La razón de ello es el sesgo de selección cometido al aplicar el Taxol a las pacientes con peor pronóstico.

Esto resultó evidente en el análisis a pesar de tratarse de sólo 14 pacientes. No haber estratificado por recepción de Taxol habría sido un error estadístico considerable.

Tabla 19: Modelo de Cox para tiempo a la recaída.

Variables en la ecuación

	<i>B</i>	<i>Sig.</i>	<i>Exp(B)</i>
<i>Edad (años)</i>	,036	,119	1,037
<i>Tam. T (cm)</i>	,147	,046	1,158
<i>Grado</i>		,842	
<i>Fict.1</i>	8,758	,895	6360,650
<i>Fict.2</i>	8,960	,893	7789,047
<i>ER</i>	-,435	,427	,647
<i>PR</i>	-,167	,732	,846
<i>Taxol si/no</i>	,900	,069	2,459
<i>Micromet. si/no</i>	,775	,030	2,171
<i>Num. Gl.</i>	,036	,157	1,037

4.2. Resultados obtenidos para la determinación de los transcritos a estudio.

4.2.1. Razones de no hallar expresión de PS2.

En primer lugar nos parece interesante comentar de nuevo lo sucedido con el gen PS2. Los investigadores del grupo de Laura Van't Veer lo incluyen en el panel definido por SAGE, si bien era el que menos *matches* presentaba de todos los incluidos (lo que equivale a decir que era el de menos “cantidad” de expresión). En el trabajo en que definen el panel, dan los valores medios obtenidos por RT-PCR para cada transcrito. Los valores son cuantificados respecto a una línea celular y no respecto a un gen control, que es como hemos trabajado nosotros, pero a efectos de lo que comentamos no importa: respecto a la línea celular MCF7 la cantidad de EGP2 que encuentran en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama es 66 veces mayor y la cantidad de P1B es 330 veces mayor. Sin embargo, la cantidad de PS2 es 11 veces mayor. Esto quiere decir que la expresión en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama de PS2 es entre 700 y 4000 veces menor que la de P1B o EGP2, siendo por tanto muy

difícil de detectar. [244] Un año y medio después, en el estudio que el mismo grupo practicó sobre ganglios linfáticos, eliminaron el PS2 del panel. [255] Nosotros no conseguimos detectarlo en ninguna muestra. No es de extrañar: el Ct para EGP2 y para P1B en las pruebas realizadas con líneas celulares fue alrededor del ciclo 25; para el PS2 fue 10 ciclos más tarde, lo que implica una expresión 1000 veces menor en la misma línea celular. Dado que en sangre periférica por término medio en las pacientes con resultados positivos se encontraba un transcrito de un gen del panel por cada 10000 transcritos del gen de referencia, probablemente la presencia del PS2 fuera alrededor de un transcrito por cada 10^7 o 10^8 del gen de referencia. Tal sensibilidad no la alcanza la RT-PCR ni ninguna técnica que conozcamos.

4.2.2. Incidencia de detección de transcritos atribuidos a células tumorales.

Se han comentado en el apartado 3 los porcentajes de pacientes que arrojaron resultados positivos para la determinación de K19 en sangre o médula, con IHQ o con RT-PCR. En general, los resultados de incidencia de micrometástasis están alrededor del 20%-60%, en función de si se trata de grupos de pacientes de buen o mal pronóstico, adecuación del diseño y sensibilidad de la técnica.

Nosotros sólo encontramos un 4.7% de muestras positivas para K19, lo que nos hizo replantearnos por completo el estudio (ver apartado 1 de la sección Discusión). También hemos comentado en el apartado 1 de esta sección que la presencia de K19 se asocia a tumores en los que los demás factores pronósticos aceptados hoy día cumplen características de buen pronóstico (bajo grado, pequeño tamaño, poca o ninguna afectación ganglionar) y, que de hecho, la tendencia a metastatizar y la incidencia a largo plazo de metástasis es inferior en las pacientes cuyo tumor primario conserva la presencia de K19. No sólo son apoyan esta hipótesis los trabajos ya discutidos de

Thomas *et al* [234], Fuchs *et al* [235], Zajchowski *et al* [236] y Woelfle *et al* [237]. También los trabajos realizados para buscar metástasis en sangre periférica de Stathopoulou y Xenidis parecen compatibles: el primero porque trabaja con una muestra de tamaño importante de pacientes en estadio I o II y detecta K-19 en un porcentaje importante; el segundo porque la K19 detectada en sangre pierde toda importancia cuando se restringe su análisis a las pacientes de mal pronóstico en función del su número de ganglios afectos. [229, 231] Esto unido a los trabajos comentados que buscan células tumorales utilizando la K19 en pacientes con metástasis activas que por definición deberían de tener siempre células tumorales circulantes y que sin embargo en ningún caso se alcanza un 100% de positividad ni mucho menos, parecen confirmar la hipótesis de que a medida que nos hallamos en un estado más avanzado de la enfermedad disminuye la probabilidad de encontrar expresión de K19.

Al rehacer el estudio utilizando todos los genes del panel atribuibles a células tumorales, sí obtuvimos un porcentaje de positividad para presencia de células malignas congruente con el desenlace clínico y con otros trabajos (45,7%). Esto confirma, en nuestra opinión la importancia de utilizar, al menos en grupos de pacientes de mal pronóstico, un panel de genes en lugar de uno sólo. Ofrecemos de nuevo las tablas 20 y 22, en las que se aprecia que al “atomizar” la variable micrometástasis se pierde toda influencia pronóstica; esto sugiere que se pierde potencia estadística al utilizar un solo gen y que así nos hubiera ocurrido de haberlo hecho, salvo, posiblemente, para el P1B, cuya potencia se conserva (es el gen de mayor importancia del panel)

Tabla 20: Modelo de Cox para tiempo a la muerte.

VARIABLES EN LA ECUACIÓN

	<i>B</i>	<i>Sig.</i>	<i>Exp(B)</i>
<i>Edad (años)</i>	,020	,431	1,020
<i>Tam. T (cm)</i>	,104	,187	1,110
<i>Grado</i>		,736	
<i>Fict. 1</i>	8,335	,922	4168,242
<i>Fict. 2</i>	8,662	,919	5781,382
<i>ER</i>	-,720	,245	,487
<i>PR</i>	-,285	,626	,752
<i>Taxol si/no</i>	,550	,395	1,733
<i>Micromet. si/no</i>	,847	,043	2,333
<i>Num. Gl.</i>	,044	,119	1,045

Tabla 22: Modelo de Cox para tiempo a la muerte desglosando la variable “micrometástasis”.

VARIABLES EN LA ECUACIÓN

	<i>B</i>	<i>Sig.</i>	<i>Exp(B)</i>
<i>Edad</i>	,040	,115	1,041
<i>Grado</i>		,771	
<i>Fict. 1</i>	9,655	,890	15595,885
<i>Fict. 2</i>	9,910	,887	20131,929
<i>Tam T (cm)</i>	,140	,064	1,150
<i>ER</i>	-,675	,255	,509
<i>PR</i>	,162	,757	1,176
<i>Num. Gl.</i>	,031	,270	1,031
<i>Taxol si/no</i>	1,035	,053	2,816
<i>K19 (valor)</i>	,236	,762	1,267
<i>HER2 (valor)</i>	,197	,770	1,218
<i>EGP2 (valor)</i>	,446	,233	1,561
<i>PS2 (valor)</i>		.	
<i>P1B (valor)</i>	1,362	,003	3,904

4.2.3. Importancia de la degradación del m-RNA.

Creemos importante apuntar (hecho que se puede apreciar observando detenidamente la tabla 9) que un hecho que subestima la importancia de la detección de transcritos producidos por células tumorales en nuestro estudio es la degradación del m-

RNA que tiene lugar con el paso del tiempo. Si bien tomamos como 29 el Ct límite para GUS para aceptar las muestras como válidas, se aprecia que en las muestras cuyo Ct es 28 apenas se detectan transcritos. La mayoría de las muestras tienen un Ct para GUS entre 24 y 27; en las muestras con un Ct para GUS de 28 o mayor, hay una cantidad de m-RNA 10 veces menor que en las demás; por ello, y dada la baja presencia de transcritos anómalos respecto al gen de referencia, no es de extrañar que en estas muestras la RT-PCR no posea la sensibilidad suficiente. Esas muestras estarían categorizadas como “ausencia de micrometástasis”, cuando probablemente algunas de ellas sí las tendrían, quizá las pacientes que precisamente recayeron después, como ocurre en el resto de las pacientes del estudio. Por ello, estos falsos negativos pueden subestimar el efecto real. No conocemos ningún medio para solucionar este problema, dado que las muestras fueron conservadas en condiciones óptimas; la degradación del m-RNA con el tiempo es inevitable.

4.3. Resultado de los factores pronósticos clásicos.

4.3.1. HER-2.

Antes de proseguir, es necesario recordar que por el alto porcentaje (30%) de faltas en los datos de HER-2 en tumor primario en nuestro estudio, cualquier interpretación sobre estos datos ha de ser muy cautelosa cuando no ininterpretable. Durante el período en que las pacientes recibieron su tratamiento la prueba del HER-2 no se realizaba rutinariamente. Nos ha sido imposible conseguir todos los bloques de parafina para su análisis de los otros centros que nos enviaron pacientes para ser sometidas a quimioterapia a altas dosis. Por ello, no hemos incluido el estado del HER-2 en el análisis multivariante para evitar artefactos y pérdida de potencia.

De todos los trabajos realizados (comentados en el apartado 3) sobre la búsqueda de micrometástasis, sólo uno (Schneeweiss *et al*) está estratificado por el estatus de HER-2, y no obtiene resultados significativos para la presencia de micrometástasis.

[200]

Respecto a la importancia del HER-2 como predictor de mal pronóstico en pacientes sometidas a quimioterapia a altas dosis, la única serie que encuentra relación (de las pocas que lo han incluido entre las variables a estudio) es la de Rodenhuis. [158] Esta serie cuenta con 885 pacientes (por lo que cualquier efecto, por poco importante que sea alcanzará con muchas probabilidades significación estadística) y además el dato del estado del HER-2 estaba disponible en 811, datos más que suficientes para demostrar impacto. No conocemos ninguna serie en la que el impacto del HER-2 en el tumor primario haya sido determinado con sólo valores disponibles, como en nuestra serie. Sólo hemos obtenido cierta relación en un análisis de contingencia con la prueba Chi Cuadrado, en el que se aprecia que el porcentaje de recaídas es mayor en el grupo HER-2 positivo, con una significación estadística *borderline* ($p=0,09$) (Tabla 14).

Tabla 14: Tabla de contingencia de la relación de recaída con el estado HER-2

Tabla de contingencia

<i>Recuento</i>		<i>HERCAT</i>		<i>Total</i>
		<i>,00</i>	<i>1,00</i>	
<i>No Rec</i>	<i>0</i>	6	12	18
<i>Rec</i>	<i>1</i>	16	12	28
<i>Total</i>		22	24	46

Una de las hipótesis de las que partimos es que tal vez el subgrupo de mal pronóstico dentro de las pacientes sometidas a quimioterapia a altas dosis para las que la

quimioterapia de intensificación es prácticamente ineficaz según Rodenhuis (las HER-2 positivas) mediara su efecto por la presencia de células HER-2 positivas en sangre periférica. De hecho, existen dos trabajos que parecen apoyar esta hipótesis: el primero de ellos a cargo de Klaus Pantel *et al* [184] en el que observa positividad del HER-2 en más del 60% de los casos de 71 pacientes con micrometástasis en médula ósea (positividad en las micrometástasis, no en el tumor primario). El segundo, también realizado por un investigador de su grupo (Braun S): sobre 59 pacientes con médula ósea positiva para K19, la frecuencia de tinción positiva para HER-2 fue del 60%. En el tumor primario sólo tenían los datos de 24 pacientes, y la positividad de HER-2 en los tumores primarios fue del 29% (7 pacientes). No encontraron relación entre los factores pronósticos clásicos y la presencia de micrometástasis. Sin embargo las pacientes con micrometástasis HER-2 positivas parecían recaer a mayor velocidad. [195] Por ello pensamos que tal vez las recaídas fueran producidas por ese subgrupo concreto de micrometástasis: las HER-2 positivas. Así, en el diseño inicial decidimos detectar también transcritos de HER-2 en sangre periférica; fue una sorpresa para nosotros no obtener resultados positivos (sólo un 8,33% de los pacientes expresaban HER-2 en sangre)

La primera conclusión que extrajimos fue que no existía presencia de células tumorales en sangre periférica tanto tiempo después de la cirugía (hecho no demasiado incongruente con la literatura existente; de hecho es un punto que no está explorado en grupos de pacientes de alto riesgo). Sin embargo, los resultados obtenidos con el resto de los genes del panel y su impacto en la supervivencia muestran que sí existen células tumorales circulantes con capacidad de producir recaídas.

No podemos explicarnos cómo es posible esto sin practicar tinción de HER-2 en las médulas de las pacientes de nuestro estudio: será objeto de investigaciones futuras.

La hipótesis que nos gustaría comprobar es que las micrometástasis presentes en médula sí son HER-2 positivas y éstas envían células tumorales a la sangre, pero se reprime la expresión del HER-2 al adoptar el fenotipo mesenquimal necesario para circular por el torrente sanguíneo. Un primer paso sería demostrar que el porcentaje de células HER-2 positivas en la médula es alto, a diferencia de lo que hemos encontrado en la sangre. Un segundo paso requeriría trabajar con modelos animales para dilucidar el mecanismo.

También hemos observado que no existe relación en absoluto con la expresión del HER-2 (ni de hecho del resto de los factores) en el tumor primario y la presencia de células tumorales circulantes (Tabla 27), pero este hecho es coherente con las observaciones de otros investigadores, y con la propia nuestra de influencia independiente en los modelos multivariantes.

Tabla 27: ausencia total de relación entre HER-2 en el tumor primario y presencia de micrometástasis. Valor p de Chi Cuadrado = 0.837

Tabla de contingencia

<i>Recuento</i>		<i>HER-2</i>	
		<i>No</i>	<i>Si</i>
<i>Micro.</i>	<i>No</i>	7	8
<i>Met.</i>	<i>Si</i>	10	13
<i>Total</i>		17	21

4.3.2. Otros factores.

Las pruebas para comprobar el efecto de los factores clásicos han sido incluidas sólo para demostrar que nuestra serie no presenta datos aberrantes y por ello merece la pena comprobar la validez externa de nuestros hallazgos.

Sólo queremos hacer un apunte respecto al número de ganglios: en las grandes series de estudio de factores pronósticos, si bien es obvio decirlo, se ha determinado que, por cada ganglio afecto, el pronóstico empeora. En la mayoría de las series hoy por

hoy se divide el número de ganglios en categorías más o menos homogéneas en cuanto a pronóstico por razones prácticas, pues si no en cada nuevo estudio habría que desglosar los datos siempre en 10-15 subgrupos en función del número de ganglios afectados. Estos grupos son: ganglios negativos, 1-3 ganglios afectados, 4-9 y 10 ó más. Toda la literatura internacional acepta estas divisiones, pero es obvio que tener 9 ganglios afectados es peor que 4; asimismo, es mucho peor 2 ganglios que ninguno. También para ensayos terapéuticos se adoptan estas estratificaciones.

Recordamos aquí la figura 28, en la que se aprecia que nuestra serie no presenta datos inesperados de acuerdo con esta división aceptada internacionalmente

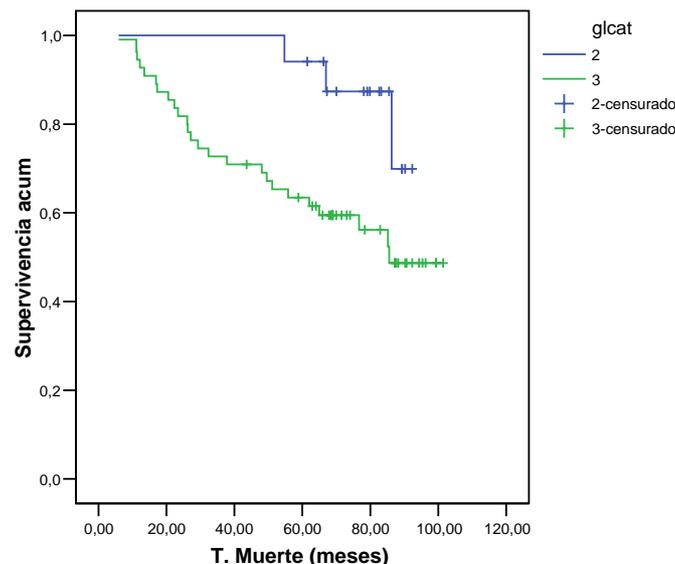


Figura 28: función de supervivencia de los subgrupos de pacientes con más o menos de 10 ganglios afectados. La variable “g1cat” toma el valor 3 para más de 10 ganglios y 2 para 10 ó menos.

Sin embargo, en los datos del análisis multivariante, la afectación ganglionar no alcanza significación estadística. La razón es la siguiente: el número de ganglios afectados variaba en nuestra serie de 2 a 38 (se ha explicado ya que en nuestra serie hay 4 pacientes con menos de 4 ganglios afectados pero estaban en localizaciones N3 (supraclavicular) o habían recibido quimioterapia neoadyuvante). Esto equivale a 36

categorías. Es virtualmente imposible obtener significación estadística con 36 categorías. Sin embargo, en un análisis multivariante lo más correcto es incluir la información lo más cuantitativa posible, y así lo hicimos. De hecho, nuestro objetivo no era investigar la importancia de la afectación ganglionar. Lo único que nos interesaba era descartar que la presencia de micrometástasis estuviera asociada a la presencia de ganglios. A pesar de todo esto, creemos muy importante reproducir aquí de nuevo la siguiente tabla: se puede apreciar que, con una p de 0,119 (borderline) cada ganglio afecto aumenta la razón de densidades de incidencia para muerte en 4,5 %, a pesar de contar con 36 categorías ganglionares.

Tabla 20: Modelo de Cox para tiempo a la muerte.

Variables en la ecuación

	<i>B</i>	<i>Sig.</i>	<i>Exp(B)</i>
<i>Edad (años)</i>	,020	,431	1,020
<i>Tam. T (cm)</i>	,104	,187	1,110
<i>Grado</i>		,736	
<i>Fict. 1</i>	8,335	,922	4168,242
<i>Fict. 2</i>	8,662	,919	5781,382
<i>ER</i>	-,720	,245	,487
<i>PR</i>	-,285	,626	,752
<i>Taxol si/no</i>	,550	,395	1,733
<i>Micromet. si/no</i>	,847	,043	2,333
<i>Num. Gl.</i>	,044	,119	1,045

4.4. Resultados relativos a la determinación de micrometástasis.

4.4.1 Independencia absoluta de la presencia de micrometástasis con respecto al resto de factores pronósticos.

Creemos muy interesante resaltar el hecho de detectar la presencia de transcritos atribuibles a células malignas mamarias y que por tanto parecen traducir la presencia de micrometástasis, no es un hecho que tenga lugar por debido a la asociación con otros factores de mal pronósticos. De ser así, la presencia de micrometástasis no sería más que una expresión en sangre periférica de dichos factores de mal pronóstico. No es un hecho infrecuente en las investigaciones biomédicas que tras encontrar un factor pronóstico aparentemente responsable de un mal curso de una enfermedad, se acabe demostrando posteriormente que dicho factor no es responsable por sí mismo, sino que constituye un eslabón del mecanismo patogénico desencadenado por otro factor. Sin embargo, se ha demostrado cómo la presencia de los transcritos a estudio en sangre no presenta ningún tipo de asociación positiva con el estado de los receptores hormonales, del HER-2, grado o tamaño tumoral, edad o número de ganglios (Tablas 21-26). Recordamos que la relación de dichos factores con la presencia de los transcritos se comprueba por medio de tablas de contingencia en los casos de factores categóricos (ER/PR/Grado/HER-2; tablas 24-27) y de regresión logística en el caso de factores cuantitativos (número de ganglios, edad, tamaño tumoral; tabla 28). Estos supuestos tienen validez al considerar la presencia de micrometástasis como variable categórica. Incluimos asimismo los valores del estadístico de Pearson de la relación entre el número de ganglios y los valores cuantitativos de cada uno de los genes que en conjunto definen la presencia de micrometástasis (tabla 29).

Tablas 24-27: tablas de contingencia entre los predictores categóricos y la presencia o ausencia de micrometástasis.

Tabla de contingencia

Recuento		Grado	
		2	3
Micro	No	11	20
Met	Si	15	22
Total		26	42

Tabla de contingencia

Recuento		ER	
		NO	SI
Micro	No	16	16
Met	Si	11	27
Total		27	43

Tabla de contingencia

Recuento		PR	
		No	Si
Micro.	No	17	15
Met.	Si	16	22
Total		33	37

Tabla de contingencia

Recuento		HER-2	
		No	Si
Micro.	No	7	8
Met.	Si	10	13
Total		17	21

Tabla 28: relación de factores pronósticos clásicos con la presencia de micrometástasis en sangre periférica.

Variables en la ecuación

	B	Sig.	Exp(B)
Edad (años)	-,003	,910	,997
Tam.T (cm)	,017	,873	1,017
Num.Gl.	-,011	,746	,989
Constante	,380	,804	1,462

Tabla 29: correlaciones entre el número de ganglios y los valores cuantitativos de cada transcrito en sangre periférica.

		Correlaciones			
		K19	HER-2	EGP2	P1B
Número ganglios afectados	C.Pearson	,008	-,077	,022	,109
	p(bilat.)	,947	,519	,859	,322
K19	C.Pearson		-,053	-,002	,536
	p(bilat.)		,655	,987	,000
HER-2	C.Pearson			-,072	-,046
	p(bilat.)			,552	,701
EGP2	C.Pearson				-,115
	p(bilat.)				,343

De cualquier manera el resultado que con mayor veracidad puede aseverar la independencia del impacto de la presencia de micrometástasis en el pronóstico es el resultado estadísticamente significativo obtenido en los análisis multivariantes.

Este resultado es congruente con los trabajos de Diel *et al* [187], Braun *et al* [192], y Stathopoulou *et al* [229]. Otras series de importante tamaño como las de Mansi *et al* [190], o Gebauer *et al* [196] pierden la significación en los análisis multivariantes. Como se ha explicado, puede deberse a la utilización de anticuerpos poco específicos para la detección de micrometástasis, no obteniendo todo el rendimiento al estudio que se pudiera haber conseguido a priori debido al elevado número de falsos positivos y falsos negativos. No conviene olvidar tampoco la importancia del momento de la detección de las células tumorales; repetimos de nuevo que las células liberadas al torrente sanguíneo durante la cirugía pueden no tener capacidad metastática y por tanto su detección y su consideración en el análisis, equivale (a efectos de análisis estadístico), a un falso positivo. Los falsos positivos y falsos negativos “diluyen” el efecto del factor a estudio, produciendo un sesgo hacia el valor nulo.

Una posible interpretación de la independencia respecto al factor más importante conocido hasta el momento (estado y cantidad de afectación de la axila) es que el cáncer de mama se disemina tanto por la sangre como por el sistema linfático, y que la diseminación a la sangre no ocurre una vez que las células tumorales han invadido los ganglios, sino que ocurre independientemente de ello. Por tanto, creemos necesario realizar un estudio de la presencia de células tumorales circulantes además de las células en los ganglios linfáticos durante el estadiaje inicial. No obstante, estos datos hay que validarlos en una serie de pacientes con ausencia de invasión axilar.

4.4.2. Importancia de la independencia del factor pronóstico “micrometástasis” respecto al resto de factores.

La importancia de esta hipótesis radica en que si bien los tratamientos quimioterápicos se ha probado que son efectivos en disminuir la tasa de recaídas atribuible a la afectación axilar (o a otros factores) cuando existe afectación demostrada en la sangre ésta parece muy difícil de erradicar. En los trabajos comentados que han arrojado resultado positivo queda patente que el riesgo de recaída producido por la presencia de células tumorales malignas presentes en médula [101, 187, 190, 192-196, 231] o en sangre [229] es entre un 200-800% mayor que en las pacientes con médula/sangre libres de micrometástasis. Asimismo el trabajo de Braun S *et al* [251] publicado en JCO es el único que ha investigado la presencia de células después del tratamiento; también confiere un pronóstico muy desfavorable. Por el trabajo de Vredenburg *et al* [186] puede interpretarse que la carga de micrometástasis disminuye con el tratamiento (recordemos que la presencia de micrometástasis resultó ser menor en las pacientes que habían recibido tratamiento de inducción) Esto implicaría que es más sencillo obtener resultados significativos estudiando a las pacientes después del

tratamiento, puesto que muchas de las pacientes que tengan médula positiva después de la cirugía la negativizarán después del tratamiento. En el análisis estadístico serían pacientes tipificadas como “micrometástasis sí” y sin embargo probablemente no recaerían después, sesgando los resultados. Este hecho puede salvarse con muestras grandes, como en el caso de Stathopoulou *et al* Braun *et al*. Otros autores sin embargo perdieron potencia estadística por este hecho. Sin embargo parece claro que el hecho de que Braun *et al* [251] en su trabajo en JCO hayan obtenido significación estadística con tan pocas pacientes (y probablemente nosotros también) se debe a que analizaron el impacto de la presencia de micrometástasis después del tratamiento. Esto es coherente con la hipótesis de que las células que todavía persisten tras el tratamiento son resistentes a los tratamientos aplicados. Parece claro a la vista de los resultados de Braun *et al* o a la de los nuestros que la tasa de recaídas en las pacientes que presentan células tumorales diseminadas tras el tratamiento es inaceptablemente alta (56,6% en el caso de Braun *et al* y 65,8% en nuestro caso)

No sabemos que hubiera pasado con nuestro porcentaje de recaídas de no haber sometido a las pacientes al ciclo de STAMP V. Los resultados comentados en la introducción sugieren cierta ventaja (aunque inconsistente según el estudio consultado) para las pacientes de muy alto riesgo que recibieron un ciclo de quimioterapia a altas dosis respecto a las que sólo recibieron quimioterapia convencional. Aceptando este hecho, puede ser que alguna de las pacientes en las que encontramos micrometástasis haya negativizado la presencia de transcritos con el ciclo de STAMP V y por tanto incluso la tasa de 65,6% de recaídas esté parcialmente sesgada hacia el valor nulo y la importancia de detectar micrometástasis sea todavía mayor. De cualquier manera no se puede descartar que el ciclo de STAMP V no tenga ningún efecto sobre las células

circulantes que ya han resistido 6 ciclos de tratamiento quimioterápico con antraciclinas y/o taxanos.

4.4.3. Ausencia de relación entre los valores de los distintos transcritos. Necesidad de considerar conjuntamente la presencia de todos los transcritos. Importancia del P1B.

No es de extrañar que el valor de las determinaciones no presente correlación entre unos y otros genes. Como se ha explicado, se utilizan varios genes para la búsqueda de micrometástasis para aumentar las posibilidades de detección, pero no porque la “detección agrupada” de varios transcritos defina la presencia de micrometástasis. Cualquiera de los transcritos escogidos si es detectado tiene una probabilidad importante de traducir la presencia de micrometástasis verdaderas (porque se expresan en células mamarias y no en sangre), si no, no sería comprensible que encontráramos tal relación con la recaída. Así, fragmentar la variable micrometástasis en los diferentes genes cuya expresión la definen, sería equivalente a separar una enfermedad cualquiera en los síntomas que la caracterizan (p.e. etiquetar “dolor de cabeza” como “tumor cerebral” no es correcto; sin embargo la suma de “dolor de cabeza”, “focalidad” y “hallazgos compatibles en la TAC” es muy probable que sea realmente “tumor cerebral”)

Apoyan estos datos las tablas 16, 21 y 22 aquí reproducidas de nuevo.

Tabla 16: Tabla de correlaciones de Pearson importada de SPSS.

		Correlaciones				
		EGP2	HER2	K19	Meses a Recaída	Meses a Muerte
P1B	C. Pearson	-,115	-,046	,536	-,219	-,204
	p (bilat.)	,343	,701	,000	,045	,062
EGP2	C. Pearson		-,072	-,002	-,344	-,264
	p (bilat.)		,552	,987	,004	,027
HER2	C. Pearson			-,053	,012	,048
	p (bilat.)			,655	,918	,692
K19	C. Pearson				-,156	-,199
	p (bilat.)				,192	,093

Tabla 21: Modelo de Cox para tiempo a la recaída desglosando la variable “micrometástasis”.

Variables en la ecuación^b

	<i>B</i>	<i>Sig.</i>	<i>Exp(B)</i>
<i>Edad (años)</i>	,001	,979	1,001
<i>Grado</i>		,992	
<i>Fict. 1</i>	9,169	,914	9595,043
<i>Fict. 2</i>	9,193	,914	9823,635
<i>Tam. T (cm)</i>	,126	,101	1,134
<i>ER</i>	-,088	,876	,916
<i>PR</i>	-,409	,428	,664
<i>Num. Gl.</i>	,035	,182	1,035
<i>Taxol si/no</i>	,748	,169	2,114
<i>K19(valor)</i>	-607,790	,746	,000
<i>HER2 (valor)</i>	1,003	,948	2,725
<i>EGP2 (valor)</i>	465,614	,003	1,64+202
<i>PS2 (valor)</i>		.	
<i>P1B (valor)</i>	2,055	,017	7,810

Tabla 22: Modelo de Cox para tiempo a la muerte desglosando la variable “micrometástasis”.

Variables en la ecuación

	<i>B</i>	<i>Sig.</i>	<i>Exp(B)</i>
<i>Edad</i>	,040	,115	1,041
<i>Grado</i>		,771	
<i>Fict. 1</i>	9,655	,890	15595,885
<i>Fict. 2</i>	9,910	,887	20131,929
<i>Tam T (cm)</i>	,140	,064	1,150
<i>ER</i>	-,675	,255	,509
<i>PR</i>	,162	,757	1,176
<i>Num. Gl.</i>	,031	,270	1,031
<i>Taxol si/no</i>	1,035	,053	2,816
<i>K19 (valor)</i>	,236	,762	1,267
<i>HER2 (valor)</i>	,197	,770	1,218
<i>EGP2 (valor)</i>	,446	,233	1,561
<i>PS2 (valor)</i>		.	
<i>P1B (valor)</i>	1,362	,003	3,904

Puede apreciarse cómo al fragmentar la variable micrometástasis se pierde prácticamente cualquier valor predictivo de recaída o supervivencia. Sólo parece observarse cierta correlación entre los valores de K19 y P1B en cuanto a las correlaciones entre los valores. La explicación la hayamos en el gráfico expuesto en la siguiente figura. Este gráfico muestra el diagrama de dispersión de los valores de K19 y P1b. Son sólo 4 valores, insuficientes en general para generar un valor significativo en el estadístico de Pearson. Sin embargo, ocurre que tres de los pacientes tienen valores con correlación “al azar”, de muy bajo valor absoluto todos ellos, y un paciente tiene valores absolutos muy grandes para las dos determinaciones, generando una tendencia artificial de agrupación que se puede apreciar visualmente.

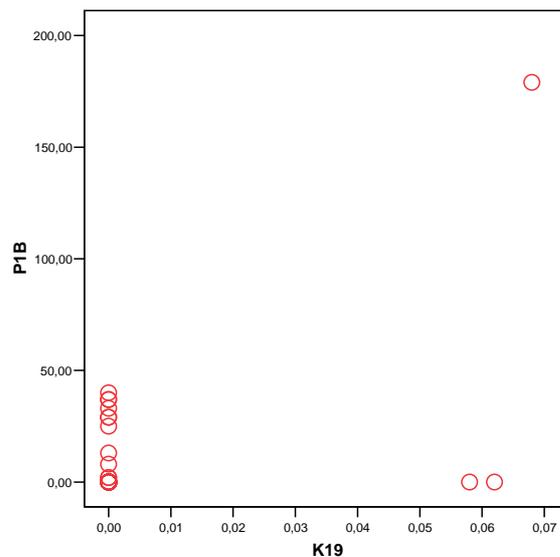


Figura 39: Diagrama de dispersión entre K19 y P1B. Puede apreciarse como sólo en 3 casos existen valores distintos de cero para ambas determinaciones. Sin embargo la agrupación de varios casos en K19=0 (casi todas las determinaciones de K19 resultaron nulas), y la presencia del valor extremo en P1B=200 genera una tendencia artificial. Los valores han sido multiplicados por 100 para evitar exceso de decimales en los ejes.

También el P1B conserva cierta relación univariante con la recaída y la supervivencia como se demuestra en las tablas 16, 21 y 22. Cuando no habíamos determinado todavía el valor del gen P1B, los resultados obtenidos para el impacto de la variable “micrometástasis”, si bien eran significativos, no eran tan importantes. Quiere esto decir que la búsqueda de transcritos de P1B detecta la presencia de micrometástasis que con otros genes son imposibles de detectar (el patrón de expresión de las micrometástasis puede cambiar de una a otra, pero no sería extraño que hubiera un gen cuya expresión sea más constante). Como se ha explicado, en los grupos de mal pronóstico parece que la detección de micrometástasis con la K19 subestima la incidencia real. Podría ser (si bien la función del gen P1B no está establecida) que el P1B tuviera algún tipo de función esencial relacionada con la supervivencia de las células tumorales en la sangre una vez desdiferenciadas a fenotipo mesenquimal, y por ello su presencia fuera muy constante y asimismo estuviera expresado en aquellas micrometástasis de mayor potencial maligno. Esta hipótesis requiere confirmación con modelos preclínicos.

El hecho de que el impacto sea constante incluso en las pacientes de más alto riesgo (más de 10 ganglios) parece apoyar esta hipótesis. En el estudio de Xenidis *et al* [231], la significación y el impacto se perdían en el grupo de más riesgo (4 o más ganglios), probablemente debido al buscar las micrometástasis con la K19, marcador de buen pronóstico.

Tabla 23: Modelo de Cox en el subgrupo de pacientes de mayor riesgo, considerando influencia categórica de presencia de micrometástasis en el tiempo a la muerte.

Variables en la ecuación

	<i>B</i>	<i>Sig.</i>	<i>Exp(B)</i>
<i>Edad</i>	,030	,384	1,030
<i>Tam. T (cm)</i>	,088	,367	1,092
<i>Grado</i>		,518	
<i>Fict. 1</i>	8,310	,919	4064,685
<i>Fict. 2</i>	8,875	,914	7148,591
<i>ER</i>	-1,330	,120	,265
<i>PR</i>	,425	,608	1,530
<i>Taxol si/no</i>	,181	,823	1,199
<i>Micromet. si/no</i>	,884	,067	2,420
<i>Num. GI</i>	,036	,369	1,037

4.4.4. Impacto de la presencia de micrometástasis en sangre periférica tras el tratamiento quimioterápico.

Sin duda, el punto más importante de nuestro trabajo es demostrar la importancia pronóstica independiente, clínicamente importante y estadísticamente significativa, de la presencia de células tumorales diseminadas en un grupo de pacientes de alto riesgo en función de los factores clásicos. Otros autores como Cooper *et al* [189] y Kasimir-Bauer *et al* [197] encontraron una tendencia pero estadísticamente no significativa. En el caso de Cooper puede deberse al hecho de tratar con pacientes con metástasis activas, y en el de Kasimir-Bauer con gran seguridad se debe al tamaño de la muestra. En el caso de Schneeweis *et al* [200] (que son los autores que han realizado un trabajo más parecido al nuestro), creemos que no encontraron resultados similares por haber utilizado técnicas de IHQ en lugar de PCR y por haber realizado las determinaciones antes de cualquier quimioterapia. El trabajo de Schneeweis cuenta con 90 pacientes; es un número muy escaso respecto al resto de los trabajos que realizando el estudio antes del

tratamiento sí encontraron efecto positivo. Asimismo, podría pensarse que en grupos de tan alto riesgo como el de Schneeweis o el nuestro la importancia de las micrometástasis podría “diluirse”, sin embargo en nuestro caso no ha ocurrido así. Quizá en un grupo de tan alto riesgo no sea adecuado usar como marcadores los genes que se expresan en el cáncer de mama de buen pronóstico (K19).

En nuestro caso la tasa de densidades de incidencia para recaída y muerte atribuibles a la presencia de micrometástasis ha sido mayor que para cualquier otro factor conocido (a pesar de partir ya de inicio de una serie de pésimo pronóstico, este factor parece incluso superar a los demás) Las pacientes con micrometástasis recaen y mueren a una velocidad 217% y 233% mayor respectivamente que las pacientes sin micrometástasis en este grupo (19 y 20). El hecho de que obtengamos estos datos en una serie de tan pequeño tamaño da una idea de la potencia de este factor y del acierto del diseño experimental (utilizar varios genes para detectar las micrometástasis y realizar la detección tras el tratamiento quimioterápico) Somos los primeros en obtener semejantes resultados.

Tablas 19 y 20: modelos de Cox para recaída y muerte respectivamente.

Variables en la ecuación

	B	Sig.	Exp(B)
Edad (años)	,036	,119	1,037
Tam. T (cm)	,147	,046	1,158
Grado		,842	
Fict. 1	8,758	,895	6360,650
Fict.2	8,960	,893	7789,047
ER	-,435	,427	,647
PR	-,167	,732	,846
Taxol si/no	,900	,069	2,459
Micromet. si/no	,775	,030	2,171
Num. Gl.	,036	,157	1,037

Variables en la ecuación

	B	Sig.	Exp(B)
Edad (años)	,020	,431	1,020
Tam. T (cm)	,104	,187	1,110
Grado		,736	
Fict. 1	8,335	,922	4168,242
Fict. 2	8,662	,919	5781,382
ER	-,720	,245	,487
PR	-,285	,626	,752
Taxol si/no	,550	,395	1,733
Micromet. si/no	,847	,043	2,333
Num. Gl.	,044	,119	1,045

VII. Limitaciones del estudio.

1.-La degradación del m-RNA que tiene lugar durante el período de conservación ha hecho imposible saber si las muestras cuyo Ct para Gus tuvo lugar tras el ciclo 28 resultaron negativas porque lo eran realmente o porque carecíamos de la sensibilidad suficiente. Esto hace que no podamos excluir un pequeño porcentaje de falsos negativos.

2.-En lo que respecta al HER-2, el alto número de valores perdidos limita las posibilidades de interpretación en función de dicho marcador pronóstico. No obstante, salvo el trabajo de Schneeweis *et al*, ninguno de los existentes estratifica sus resultados por dicho factor.

3.-Un número más amplio de pacientes permitiría haber dado las conclusiones con más confianza, a pesar de haber obtenido significación estadística

4.-Al ser los primeros en obtener los datos reflejados, creemos que los datos ofrecidos deben de tomarse con extrema cautela.

VIII. Lineas futuras de investigación.

-Convendría contrastar si el panel de genes utilizado es igualmente válido en una serie de pacientes de buen pronóstico, sin o con escasa afectación axilar.

-Asimismo, también en una serie de pronóstico mejor, es necesario investigar si el valor de la presencia de micrometástasis es el mismo que en nuestra serie.

-No hay datos en nuestra serie que permitan sugerir que las células tumorales circulantes deban su impacto pronóstico a la expresión del HER-2. Sin embargo, una serie de trabajos insisten en la selección positiva de clones HER-2 positivos en las metástasis en médula ósea. Es necesario, en las médulas óseas de las pacientes estudiadas, investigar la expresión del HER-2. De ser positiva en un porcentaje alto, abriría la vía a la investigación a dos campos: el primero, en demostrar que las células HER-2 positivas en médula ósea son las causantes de las células tumorales circulantes; el segundo, en investigar cómo y porqué dicha expresión se pierde al pasar a la sangre.

-La función del gen P1B no está estudiada en el cáncer de mama. Posiblemente estudiando qué papel tiene su expresión en las células tumorales mamarias circulantes pudiera encontrarse su valor como determinante de evasión inmunitaria o de facilitación del proceso de metástasis.

-Para realmente comprobar la significación pronóstica de las células tumorales circulantes, habría que realizar un estudio en el que una vez terminado el tratamiento en función de los factores pronósticos validados en la actualidad, se randomizara a las pacientes en dos brazos: en uno de ellos se estudiaría la presencia de células tumorales circulantes y en otro no se haría nada, aplicando tratamiento adicional o no en el brazo experimental en función de los hallazgos. De momento no se dispone de terapias específicas dirigidas contra las células tumorales circulantes.

IX. Conclusiones.

1.-La detección por RT-PCR en sangre periférica de transcritos de los genes K19, HER-2, EGP2 y P1B tras los 6 ciclos de quimioterapia adyuvante traduce la presencia de micrometástasis verdaderas en pacientes con carcinoma de mama localmente avanzado.

La presencia de dichas micrometástasis representa un factor de riesgo independiente y estadísticamente significativo más potente que los factores clásicos (afectación axilar, tamaño tumoral, receptores hormonales, grado tumoral) para recaída y muerte por cáncer de mama. **Se confirma, por tanto, la hipótesis principal del estudio.**

3.-No existen datos estadísticos que apoyen que la presencia de micrometástasis esté causada por o relacionada con el estado del resto de los factores pronósticos analizados.

4.-La ausencia de expresión del factor HER-2 en sangre periférica cuestiona que el impacto pronóstico de las micrometástasis (al menos mientras permanecen en el torrente sanguíneo) esté mediado por dicho factor.

5.-La detección de micrometástasis utilizando sólo marcadores epiteliales (K19 o HER-2) resultó ser ineficiente en nuestra serie, quizá debido a tratarse de una de muy mal pronóstico.

6.-El hecho de encontrar transcritos del gen P1B en sangre periférica parece traducir la presencia de las micrometástasis con más riesgo de recaída, pero nuestra serie carece del tamaño necesario para demostrar que dicho gen es suficiente sin los otros 3 genes del panel para realizar un estudio de micrometástasis en pacientes de alto riesgo.

7.-Un alto porcentaje de los casos en que persiste la detección de transcritos atribuidos a células tumorales mamarias tras el tratamiento quimioterápico es refractario al tratamiento con quimioterapia a altas dosis según el régimen STAMP V.

X. Bibliografía.

1. Instituto Nacional de Estadística: INE-BASE: Cifras de población al 1 de Enero de 2000: Población Total por Sexo. <http://www.ine.es>
2. Instituto Nacional de Estadística: INE-BASE: Salud: Defunciones según causa de muerte. <http://ine.es>
3. Globocan 2000. Database Version 1.0. <http://www-dep.iarc.fr/globocan/globocan.html>
4. Sasco AJ, Lowenfels AB, Pasker-DeJong P. Epidemiology of male breast cancer: a meta-analysis of Publisher case-control studies and discussion of selected aetiological factors. *Int J Cancer* 53 (4):538-549, 1993.
5. Ries LAG, Kosary CL, Hankey BF. SEER Cancer Statistics Review, 1973-1996. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 1999.
6. Otto SJ, Fracheboud J, Looman CW, Broeders MJ, Boer R, Hendriks JH, Verbeek AL, de Koning HJ; National Evaluation Team for Breast Cancer Screening. Initiation of population-based mammography screening in Dutch municipalities and effect on breast-cancer mortality: a systematic review. *Lancet* 361 (9367): 1411-1417, 2003.
7. Duffy SW, Tabar L, Vitak B, Day NE, Smith RA, Chen HH, Yen MF. The relative contributions of screen-detected in situ and invasive breast carcinomas in reducing mortality from the disease. *Eur J Cancer* 39(12):1755-1760, 2003.
8. Blanks RG, Moss SM, McGahan CE, Quinn MJ, Babb PJ. Effect of NHS breast screening programme on mortality from breast cancer in England and Wales, 1990-8: comparison of observed with predicted mortality. *BMJ* 321(7262):665-669, 2000.
9. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer Statistics, 2000. *CA Cancer J Clin* 50(1):7-33, 2000.

10. Ottman R, Pike MC, King MC, Henderson BE. Practical guide for estimating risk for familial breast cancer. *Lancet* 83(8349):556-558, 1983.
11. Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE. Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet* 343(8899):692-695, 1994.
12. Struewing JP, Hartge P, Wacholder S, Baker SM, Berlin M, McAdams M, Timmerman MM, Brody LC, Tucker MA. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 336(20):1401-1408, 1997.
13. Easton DF, Steele L, Fields P, Ormiston W, Averill D, Daly PA, McManus R, Neuhausen SL, Ford D, Wooster R, Cannon-Albright LA, Stratton MR, Goldgar DE. Cancer risks in two large breast cancer families linked to BRCA2 on chromosome 13q12-13. *Am J Hum Genet* 61(1):120-128, 1997.
14. Fan S, Wang J, Yuan R, Ma Y, Meng Q, Erdos MR, Pestell RG, Yuan F, Auburn KJ, Goldberg ID, Rosen EM. BRCA1 inhibition of estrogen receptor signaling in transfected cells. *Science* 284(5418):1354-1356, 1999.
15. Gail MH, Brinton LA, Byar DP, Corle DK, Green SB, Schairer C, Mulvihill JJ. Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *J Natl Cancer Inst* 81(24):1879-1886, 1989.
16. Rosner B, Colditz GA. Nurses' health study: log-incidence mathematical model of breast cancer incidence. *J Natl Cancer Inst* 88(6):359-364, 1996.
17. Huang Z, Hankinson SE, Colditz GA, Stampfer MJ, Hunter DJ, Manson JE, Hennekens CH, Rosner B, Speizer FE, Willett WC. Dual effects of weight and weight gain on breast cancer risk. *JAMA* 278(17):1407-1411, 1997.

18. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. *Lancet* 350(9084):1048-1059, 1997.
19. Hankinson SE, Willett WC, Manson JE, Colditz GA, Hunter DJ, Spiegelman D, Barbieri RL, Speizer FE. Plasma sex steroid hormone levels and risk of breast cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 90(17):1292-1299, 1998.
20. Winer E, Morrow M, Osborne CK, Harris JR. Risk Factors For Breast Cancer. En: *Cancer Principles & Practice of Oncology*. DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds) Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins, 2001, 1653-1654.
21. McMichael AJ, Giles GG. Cancer in migrants to Australia: extending the descriptive epidemiological data. *Cancer Res* 48(3):751-756, 1988.
22. Buell P. Changing incidence of breast cancer in Japanese-American women. *J Natl Cancer Inst* 51(5):1479-1483, 1973.
23. Hunter DJ, Spiegelman D, Adami HO, Beeson L, van den Brandt PA, Folsom AR, Fraser GE, Goldbohm RA, Graham S, Howe GR. Cohort studies of fat intake and the risk of breast cancer--a pooled analysis. *N Engl J Med* 334(6):356-361, 1996.
24. Thune I, Brenn T, Lund E, Gaard M. Physical activity and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 336(18):1269-1275, 1997.
25. Longnecker MP. Alcoholic beverage consumption in relation to risk of breast cancer: meta-analysis and review. *Cancer Causes Control* 5(1):73-82, 1994.
26. Zhang S, Hunter DJ, Hankinson SE, Giovannucci EL, Rosner BA, Colditz GA, Speizer FE, Willett WC. A prospective study of folate intake and the risk of breast cancer. *JAMA* 281(17):1632-1637, 1999.

27. Freudenheim JL, Marshall JR, Vena JE, Laughlin R, Brasure JR, Swanson MK, Nemoto T, Graham S. Premenopausal breast cancer risk and intake of vegetables, fruits, and related nutrients. *J Natl Cancer Inst* 88(6):340-348, 1996.
28. Dupont WD, Page DL. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med* 312(3):146-151, 1985.
29. Gervais-Fagnou DD, Girouard C, Laperriere N, Pintillie M, Goss PE. Breast cancer in women following supradiaphragmatic irradiation for Hodgkin's disease. *Oncology* 57(3):224-231, 1999.
30. Madigan MP, Ziegler RG, Benichou J, Byrne C, Hoover RN. Proportion of breast cancer cases in the United States explained by well-established risk factors. *J Natl Cancer Inst* 87(22):1681-1685, 1995.
31. Haskell CM, Casciato DA. Breast cancer natural history. En: *Manual of Clinical Oncology*. Casciato DA, Lowitz BB (eds). Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins, 2001, 221-222.
32. Stirling JW, Chandler JA. The fine structure of the normal, resting terminal ductal-lobular unit of the female breast. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 372(3):205-226, 1976.
33. Lester S. The female Breast. En: *Cotran, Kumar and Robbins' Pathologic basis of disease*. Schoen FJ (ed). Madrid, McGraw-Hill-Interamericana de España, 1995, 1215-1220.
34. Radford DM, Phillips NHJ, Fair KL, Ritter JH, Holt M, Donis-Keller H. Allelic loss and the progression of breast cancer. *Cancer Res* 55(22):5180-5183, 1995.
35. Stratton MR, Collins N, Lakhani SR, Sloane JP. Loss of heterozygosity in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Pathol* 175(2):195-201, 1995.

36. O'Connell P, Pekkel V, Fuqua SA, Osborne CK, Clark GM, Allred DC. Analysis of loss of heterozygosity in 399 premalignant breast lesions at 15 genetic loci. *J Natl Cancer Inst* 90(9):697-703, 1998.
37. Allred DC, Clark GM, Molina R, Tandon AK, Schnitt SJ, Gilchrist KW, Osborne CK, Tormey DC, McGuire WL. Overexpression of HER-2/neu and its relationship with other prognostic factors change during the progression of in situ to invasive breast cancer. *Hum Pathol* 23(9):974-979, 1992.
38. Rudas M, Neumayer R, Gnant MF, Mittelbock M, Jakesz R, Reiner A. p53 protein expression, cell proliferation and steroid hormone receptors in ductal and lobular in situ carcinomas of the breast. *Eur J Cancer* 33(1):39-44, 1997.
39. Porter DA, Krop IE, Nasser S, Sgroi D, Kaelin CM, Marks JR, Riggins G, Polyak K. A SAGE (serial analysis of gene expression) view of breast tumor progression. *Cancer Res* 61(15):5697-5701, 2001.
40. Burstein HJ, Polyak K, Wong JS, Lester SC, Kaelin CM. Ductal carcinoma in situ of the breast. *N Engl J Med* 350(14):1430-1441, 2004.
41. Salvadori B, Bartoli C, Zurrida S, Delledonne V, Squicciarini P, Rovini D, Barletta L. Risk of invasive cancer in women with lobular carcinoma in situ of the breast. *Eur J Cancer* 27(1):35-37, 1991.
42. Fisher ER, Gregorio RM, Fisher B, Redmond C, Vellios F, Sommers SC. The pathology of invasive breast cancer: a syllabus derived from the findings of the National Surgical Adjuvant Breast project. *Cancer* 36(1):1-85, 1975.
43. Tannock IF. Cell proliferation. In: *The basis science of Oncology*. Tannock IF, Hill RP (eds). New York, NY, McGraw-Hill 1992, 152.

44. Norton L, Day RS. Potential innovations in scheduling in cancer chemotherapy. En: Important advances in oncology. De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds). Philadelphia, PA, Lippincott-Raven Publishers, 1991, 57.
45. Norton L. A Gompertzian model of human breast cancer growth. *Cancer Res* 48(24):7067-7071, 1988.
46. Folkman J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 333(26):1756-1763, 1995.
47. Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletti CA. Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet* 340(8812):145-146, 1992.
48. Horak ER, Leek R, Klenk N, LeJeune S, Smith K, Stuart N, Greenall M, Stepniowska K, Harris AL. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* 340(8828):1120-1124, 1992.
49. Hill RP. Tumor progression: potential role of unstable genomic changes. *Cancer Metastasis Rev* 9(2):137-147, 1990.
50. Hart IR, Saini A. Biology of tumour metastasis. *Lancet* 339(8807):1453-1457, 1992
51. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251(5000):1451-1455, 1991.
52. Dorudi S, Sheffield JP, Poulson R, Northover JM, Hart IR. E-cadherin expression in colorectal cancer. An immunocytochemical and in situ hybridization study. *Am J Pathol* 142(4):981-986, 1993.
53. Kim YS, Liotta LA, Kohn EC. Cancer invasion and metastasis. *Hosp Pract (Off Ed)* 28(5):92-96, 1993.

54. Fridman R, Fuerst TR, Bird RE, Hoyhtya M, Oelkuct M, Kraus S, Komarek D, Liotta LA, Berman ML, Stetler-Stevenson WG. Domain structure of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. Characterization of proteolytic activity and identification of the tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binding regions. *J Biol Chem* 267(22):15398-15405, 1992.
55. Poulson R, Pignatelli M, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Wright PA, Jeffery RE, Longcroft JM, Rogers L, Stamp GW. Stromal expression of 72 kda type IV collagenase (MMP-2) and TIMP-2 mRNAs in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* 141(2):398-396, 1992.
56. Stracke ML, Liotta LA. Multi-step cascade of tumor cell metastasis. *In Vivo* 6(4):309-316, 1992 .
57. Alvarez OA, Carmichael DF, DeClerck YA. Inhibition of collagenolytic activity and metastasis of tumor cells by a recombinant human tissue inhibitor of metalloproteinases. *J Natl Cancer Inst* 82(7):589-595, 1990.
58. Aznavoorian S, Murphy AN, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer* 71(4):1368-1383, 1993.
59. Nabi IR, Watanabe H, Raz A. Autocrine motility factor and its receptor: role in cell locomotion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 11(1):5-20, 1992.
60. Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol* 9:541-573, 1993.
61. Albelda SM. Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab Invest* 68(1):4-17, 1993.
62. Kahn P. Adhesion protein studies provide new clue to metastasis. *Science* 258(5070):614, 1992.

63. Dickson RB, Stancel GM. Estrogen receptor-mediated processes in normal and cancer cells. *J Natl Cancer Inst Monogr* 27:135-145, 2000.
64. Peyrat JP, Bonnetterre J: Type I IGF receptor in human breast diseases. *Breast Cancer Res Treat* 22(1):59-67, 1992.
65. Shoker BS, Jarvis C, Sibson DR, Walker C, Sloane JP: Oestrogen receptor expression in the normal and precancerous breast. *J Pathol* 188(3):237-244, 1999.
66. Elledge RM, Fuqua SAW. Estrogen and progesterone receptors. En: *Diseases of the breast*. 2nd edition. Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK (eds). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000:471.
67. Dickson RB, Russo J. Biochemical control of breast development. En: *Diseases of the breast*. 2nd edition. Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, (eds). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000:471.
68. McDonnell DP, Clemm DL, Hermann T, Goldman ME, Pike JW. Analysis of estrogen receptor function in vitro reveals three distinct classes of antiestrogens. *Mol Endocrinol* 9(6):659-669, 1995.
69. Fujimoto N, Katzenellenbogen BS. Alteration in the agonist/antagonist balance of antiestrogens by activation of protein kinase A signaling pathways in breast cancer cells: antiestrogen selectivity and promoter dependence. *Mol Endocrinol* 8(3):296-304, 1994.
70. Spencer TE, Jenster G, Burcin MM, Allis CD, Zhou J, Mizzen CA, McKenna NJ, Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* 389(6647):194-198, 1997.
71. Schuchard M, Landers JP, Sandhu NP, Spelsberg TC. Steroid hormone regulation of nuclear proto-oncogenes. *Endocr Rev* 14(6):659-669, 1993.

72. Dickson RB, Lippman ME. Estrogenic regulation of growth and polypeptide growth factor secretion in human breast carcinoma. *Endocr Rev* 8(1):29-43, 1987.
73. Mason BH, Holdaway IM, Mullins PR, Yee LH, Kay RG. Progesterone and estrogen receptors as prognostic variables in breast cancer. *Cancer Res* 43(6):2985-2990, 1983.
74. Hilsenbeck SG, Ravdin PM, de Morr CA, Chamness CC, Osborne CK, Clark GM: Time-dependence of hazard ratios for prognostic factors in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 52(1):227-237, 1998.
75. Costa S-D, Lange S, Klinga K, Merkle E, Kaufmann M: Factors influencing the prognostic role of oestrogen and progesterone receptor levels in breast cancer-results of the analysis of 670 patients with 11 years follow-up. *Eur J Cancer* 38(10):1329-1334, 2002.
76. Chang J, Clark GM, Allred DC, Mohsin S, Chamness G, Elledge RM. Survival of patients with metastatic breast carcinoma: importance of prognostic markers of the primary tumor. *Cancer* 97(3):545-553, 2003.
77. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* 351(9114):930-942, 1998.
78. Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RC, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ. Meeting Highlights: Updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *J Clin Oncol* 21(17):3357-3365, 2003.
79. Boccardo F, Rubagotti A, Amoroso D, Mesiti M, Massobrio M, Benedetto C, Porpiglia M, Rinaldi M, Paladín G, Distante V, Franchi R, Failla G, Bordonaro R, Sismondi P. Anastrozole appears to be superior to tamoxifen in women already receiving adjuvant tamoxifen treatment. Presentado en el 26^o Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, San Antonio, Texas, Abstract nº 3; December 3-6, 2003.

80. Dowsett M. Analysis of time to recurrence in the ATAC (arimidex , tamoxifen, alone or in combination) trial according to estrogen receptor and progesterone receptor status. Presentado en el 26° Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, San Antonio, Texas, Abstract n° 4; December 3-6, 2003.
81. Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, Toyoshima K, Yamamoto T. The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science* 232(4758):1644-6, 1986.
82. Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA. The Her-2-neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 319(6050):226-230, 1986
83. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 230(4730):1132-1139, 1985.
84. King CR, Kraus MH, Aaronson SA. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* 229(4717):974-976, 1985.
85. Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene MI, Weinberg RA. The Her-2-neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* 312(5994):513-516, 1984.
86. Stern DF, Heffernan PA, Weinberg RA. p185, a product of the neu proto-oncogene, is a receptorlike protein associated with tyrosine kinase activity. *Mol Cell Biol* 6(5):1729-1740, 1986.
87. Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, Semba K, Nomura N, Miyajima N, Saito T, Toyoshima K. Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* 319(6050):230-234, 1986.

88. Kraus MH, Issing W, Miki T, Popescu NC, Aaronson SA. Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(23):9193-9197, 1989.
89. Plowman GD, Whitney GS, Neubauer MG, Green JM, McDonald VL, Todaro GJ, Shoyab M. Molecular cloning and expression of an additional epidermal growth factor receptor-related gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(13):4905-4909, 1990.
90. Plowman GD, Culouscou JM, Whitney GS, Green JM, Carlton GW, Foy L, Neubauer MG, Shoyab M. Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(5):1746-1750, 1993.
91. Plowman GD, Green JM, McDonald VL, Neubauer MG, Disteché CM, Todaro GJ, Shoyab M. The amphiregulin gene encodes a novel epidermal growth factor-related protein with tumor-inhibitory activity. *Mol Cell Biol* 10(5):1969-1981, 1990.
92. Shing Y, Christofori G, Hanahan D, Ono Y, Sasada R, Igarashi K, Folkman J. Betacellulin: a mitogen from pancreatic beta cell tumors. *Science*, 259(5101):1604-1607, 1993.
93. Higashiyama S, Abraham JA, Miller J, Fiddes JC, Klagsbrun M. A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science* 22;251(4996):936-939, 1991.
94. Akiyama T, Saito T, Ogawara H, Toyoshima K, Yamamoto T. Tumor promoter and epidermal growth factor stimulate phosphorylation of the c-erbB-2 gene product in MKN-7 human adenocarcinoma cells. *Mol Cell Biol* 8(3):1019-1026, 1988.

95. Holmes WE, Sliwkowski MX, Akita RW, Henzel WJ, Lee J, Park JW, Yansura D, Abadi N, Raab H, Lewis GD. Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2. *Science* 256(5060):1205-1210, 1992.
96. Cochet C, Kashles O, Chambaz EM, Borrello I, King CR, Schlessinger J. Demonstration of epidermal growth factor-induced receptor dimerization in living cells using a chemical covalent cross-linking agent. *J Biol Chem* 263(7):3290-3295, 1988.
97. Weiner DB, Kokai Y, Wada T, Cohen JA, Williams WV, Greene MI. Linkage of tyrosine kinase activity with transforming ability of the p185neu oncoprotein. *Oncogene* 4(10):1175-1183, 1989
98. Pawson T, Schlessinger J. sh2 and sh3 domains. *Curr Biol* 3(7):434-442, 1993.
99. Lacroix H, Iglehart JD, Skinner MA, Kraus MH. Overexpression of erbB-2 or EGF receptor proteins present in early stage mammary carcinoma is detected simultaneously in matched primary tumors and regional metastases. *Oncogene* 4(2):145-151, 1989.
100. Niehans GA, Singleton TP, Dykoski D, Kiang DT. Stability of HER-2/neu expression over time and at multiple metastatic sites. *J Natl Cancer Inst* 85(15):1230-1235, 1993.
101. Braun S, Schlimok G, Heumos I, Schaller G, Riethdorf L, Riethmuller G, Pantel K. ErbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients. *Cancer Res* 61(5):1890-1895, 2001.
102. Nabholz JM, Bonnetterre J, Buzdar A, Robertson JF, Thurlimann B. Anastrozole (Arimidex) versus tamoxifen as first-line therapy for advanced breast cancer in postmenopausal women: survival analysis and updated safety results. *Eur J Cancer* 39(12):1684-1689, 2003.
103. Mouridsen H, Gershanovich M, Sun Y, Perez-Carrion R, Boni C, Monnier A, Apffelstaedt J, Smith R, Sleeboom HP, Jaenicke F, Pluzanska A, Dank M, Becquart D,

- Bapsy PP, Salminen E, Snyder R, Chaudri-Ross H, Lang R, Wyld P, Bhatnagar A. Phase III study of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy of advanced breast cancer in postmenopausal women: analysis of survival and update of efficacy from the International Letrozole Breast Cancer Group. *J Clin Oncol* 21(11):2101-2109, 2003.
104. Paridaens R, Therasse P, Dirix L, Beex L, Piccart M, Cameron D, Cufer T, Roozendaal K, Nooij M, Mattiacci MR. First line hormonal treatment for metastatic breast cancer with exemestane or tamoxifen in postmenopausal patients. A randomized phase III trial of the EORTC Breast Group. *Proc Am Soc Clin Oncol* 23:6a, 2004.
105. Wright C, Nicholson S, Angus B, Sainsbury JR, Farndon J, Cairns J, Harris AL, Horne CH. Relationship between c-erbB-2 protein product expression and response to endocrine therapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer* 65(1):118-121, 1992.
106. Bianco AR, De Laurentis M, Carlomagno C. 20 year update of the naples GUN trial of adjuvant breast cancer therapy: Evidence of interaction between c-erbB-2 expression and tamoxifen efficacy. *Proc Am Soc Clin Oncol* 17:325b, 1998.
107. Wong ZW, Ellis MJ. First-line endocrine treatment of breast cancer: aromatase inhibitor or antioestrogen? *Br J Cancer* 90(1):20-25, 2004.
108. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, Save-Soderborgh J, Anbazhagan R, Styles J, Rudenstam CM, Golouh R, Reed R. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 10(7):1049-1056, 1992.
109. Miles DW, Harris WH, Gillett CE, Smith P, Barnes DM. Effect of c-erbB(2) and estrogen receptor status on survival of women with primary breast cancer treated with adjuvant cyclophosphamide/methotrexate/fluorouracil. *Int J Cancer* 20;84(4):354-359, 1999.

110. Menard S, Valagussa P, Pilotti S, Gianni L, Biganzoli E, Boracchi P, Tomasic G, Casalini P, Marubini E, Colnaghi MI, Cascinelli N, Bonadonna G. Response to cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in lymph node-positive breast cancer according to HER2 overexpression and other tumor biologic variables. *J Clin Oncol* 15;19(2):329-335, 2001.
111. Muss HB, Thor AD, Berry DA, Kute T, Liu ET, Koerner F, Cirrincione CT, Budman DR, Wood WC, Barcos M. c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med* 330(18):1260-1266. 1994.
112. Thor AD, Berry DA, Budman DR, Muss HB, Kute T, Henderson IC, Barcos M, Cirrincione C, Edgerton S, Allred C, Norton L, Liu ET. erbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 90(18):1346-1360, 1998.
113. Paik S, Bryant J, Park C, Fisher B, Tan-Chiu E, Hyams D, Fisher ER, Lippman ME, Wickerham DL, Wolmark N. erbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 90(18):1361-1370, 1998.
114. Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, Yothers G, Park C, Wickerham DL, Wolmark N. HER2 and choice of adjuvant chemotherapy for invasive breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-15. *J Natl Cancer Inst* 92(24):1991-1998, 2000.
115. Jarvinen TA, Tanner M, Rantanen V, Barlund M, Borg A, Grenman S, Isola J. Amplification and deletion of topoisomerase IIalpha associate with ErbB-2 amplification and affect sensitivity to topoisomerase II inhibitor doxorubicin in breast cancer. *Am J Pathol* 156(3):839-847, 2000.

116. Konecny G, Fritz M, Untch M, Lebeau A, Felber M, Lude S, Beryt M, Hepp H, Slamon D, Pegram M. HER-2/neu overexpression and in vitro chemosensitivity to CMF and FEC in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 69(1):53-63, 2001.
117. Tedesco KL, Thor AD, Johnson DH, Shyr Y, Blum KA, Goldstein LJ, Gradishar WJ, Nicholson BP, Merkel DE, Murrey D, Edgerton S, Sledge GW Jr. Docetaxel combined with trastuzumab is an active regimen in HER-2 3+ overexpressing and fluorescent in situ hybridization-positive metastatic breast cancer: a multi-institutional phase II trial. *J Clin Oncol* 22(6):1071-1077, 2004.
118. International Union Against Cancer. *Breast Tumours*, en Sobin LH, Wittekind Ch (eds): TNM classification of Malignant Tumours. New York, NY, Wiley-Liss, 2002, 135-146.
119. Haybittle JL, Blamey RW, Elston CW, Johnson J, Doyle PJ, Campbell FC, Nicholson RI, Griffiths K. A prognostic index in primary breast cancer. *Br J Cancer* 45(3):361-366, 1982.
120. Balslev I, Axelsson CK, Zedeler K, Rasmussen BB, Carstensen B, Mouridsen HT. The Nottingham Prognostic Index applied to 9,149 patients from the studies of the Danish Breast Cancer Cooperative Group (DBCG). *Breast Cancer Res Treat* 32(3):281-290, 1994.
121. Robertson JF, Dixon AR, Nicholson RI, Ellis IO, Elston CW, Blamey RW. Confirmation of a prognostic index for patients with metastatic breast cancer treated by endocrine therapy. *Breast Cancer Res Treat* 22(3):221-227, 1992.
122. Nixon AJ, Neuberg D, Hayes DF, Gelman R, Connolly JL, Schnitt S, Abner A, Recht A, Vicini F, Harris JR. Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *J Clin Oncol* 12(5):888-894, 1994.

123. Albain KS, Allred DC, Clark GM. Breast cancer outcome and predictors of outcome: are there age differentials? *J Natl Cancer Inst Monogr* (16):35-42, 1994.
124. Elledge RM, Lee WH. Life and death by p53. *Bioessays* 17(11):923-930, 1995.
125. Culotta E, Koshland DE Jr. p53 sweeps through cancer research. *Science* 262(5142):1958-1961, 1993.
126. Fan S, Smith ML, Rivet DJ 2nd, Duba D, Zhan Q, Kohn KW, Fornace AJ Jr, O'Connor PM. Disruption of p53 function sensitizes breast cancer MCF-7 cells to cisplatin and pentoxifylline. *Cancer Res* 55(8):1649-1654, 1995.
127. Domagala W, Striker G, Szadowska A, Dukowicz A, Harezga B, Osborn M. p53 protein and vimentin in invasive ductal NOS breast carcinoma--relationship with survival and sites of metastases. *Eur J Cancer* 30A(10):1527-1534, 1994.
128. Keyomarsi K, Tucker SL, Buchholz TA, Callister M, Ding Y, Hortobagyi GN, Bedrosian I, Knickerbocker C, Toyofuku W, Lowe M, Herliczek TW, Bacus SS. Cyclin E and survival in patients with breast cancer. *N Engl J Med* 347(20):1566-1575, 2002.
129. Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. International Breast Cancer Study Group, Oncology Institute of Southern Switzerland, Lugano. Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *J Clin Oncol* 21(17):3357-3365, 2003.
130. Saez RA, McGuire WL, Clark GM. Prognostic factors in breast cancer. *Semin Surg Oncol* 5(2):102-110, 1989.
131. Pusztai L, Ayers M, Simmans LM, Damokosh A, Hess K, Valero V, Clark E, Ross J, Hortobagyi GN, Stec J. Emerging science: prospective validation of gene expression profiling-based prediction of complete pathologic response to neoadjuvant paclitaxel/FAC chemotherapy in breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 22:1a, 2003.

132. Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A, Hilsenbeck SG, Gutierrez MC, Elledge R, Mohsin S, Osborne CK, Chamness GC, Allred DC, O'Connell P. Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer. *Lancet* 362(9381):362-369, 2003.
133. Hortobagyi G. What is the role of high-dose chemotherapy in the era of targeted therapies? *J Clin Oncol* 22(12):2263-2266, 2004.
134. Green M, Hortobagyi GN. Neoadjuvant chemotherapy for operable breast cancer. *Oncology (Huntingt)* 16(7):871-898, 2002.
135. Mamounas EP, Fisher B. Preoperative (neoadjuvant) chemotherapy in patients with breast cancer. *Semin Oncol* 28(4):389-399, 2001.
136. Baynes RD, Dansey RD, Klein JL, Hamm C, Campbell M, Abella E, Peters WP. High-dose chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation for breast cancer: past or future? *Semin Oncol* 28(4):377-388, 2001.
137. Schabel FM Jr, Trader MW, Laster WR Jr, Wheeler GP, Witt MH. Patterns of resistance and therapeutic synergism among alkylating agents. *Antibiot Chemother* 23(1):200-215, 1978.
138. Peters WP, Eder JP, Henner WD, Schryber S, Wilmore D, Finberg R, Schoenfeld D, Bast R, Gargone B, Antman K. High-dose combination alkylating agents with autologous bone marrow support: a Phase 1 trial. *J Clin Oncol* 4(5):646-654, 1986.
139. Eder JP, Antman K, Peters W, Henner WD, Elias A, Shea T, Schryber S, Andersen J, Come S, Schnipper L. High-dose combination alkylating agent chemotherapy with autologous bone marrow support for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 4(11):1592-1597, 1986.

140. Peters WP, Shpall EJ, Jones RB, Olsen GA, Bast RC, Gockerman JP, Moore JO. High-dose combination alkylating agents with bone marrow support as initial treatment for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 6(9):1368-1376, 1988.
141. Bezwoda WR, Seymour L, Dansey RD. High-dose chemotherapy with hematopoietic rescue as primary treatment for metastatic breast cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 13(10):2483-2489, 1995.
142. Peters WP, Jones RB, Vredenburgh J. A large prospective randomized trial of high dose combination alkylating agent with autologous cellular support as consolidation for patients with metastatic breast cancer achieving complete remission after intensive doxorubicin based induction chemotherapy. *Proc Am Soc Clin Oncol* 15:149a, 1996.
143. Lotz J, Cure H, Janvier M, Morvan F, Asselain B, Guillemot M, Laadem A, Maraninchi D, Gisselbrecht C, Roche H. High-Dose Chemotherapy (HD-CT) with hematopoietic stem cells transplantation (HSCT) for metastatic breast cancer (MBC): results of the french protocol PEGASE 04. *Proc Am Soc Clin Oncol* 18:43a, 1999.
144. Stadtmauer EA, O'Neill A, Goldstein LJ, Crilley P, Mangan KF, Ingle JN, Lazarus HM, Erban J, Sickles C, Glick H. Phase III randomized trial of High-Dose Chemotherapy (HDC) and stem cell support (SCT) shows no difference in overall survival or severe toxicity compared to maintenance chemotherapy with cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil (CMF) for women with metastatic breast cancer who are responding to conventional induction chemotherapy: The 'Philadelphia' Intergroup Study (PBT-1). *Proc Am Soc Clin Oncol* 18:1a, 1999.
145. Madan B, Broadwater G, Rubin P, Edwards J, Long G, Chao N, Rizzieri D, Marks L, Affronti M, Petros W, Peters W, Vredenburgh J. Improved survival with consolidation high-dose cyclophosphamide, cisplatin and carmustine (Hd-Cpb) compared with observation in women with metastatic breast cancer (Mbc) and only

bone metastases treated with induction adriamycin, 5-fluorouracil and methotrexate, Proc Am Soc Clin Oncol 19:48a, 2000.

146. Garcia-Carbonero R, Hidalgo M, Paz-Ares L, Calzas J, Gomez H, Guerra JA, Hitt R, Hornedo J, Colomer R, Cortes-Funes H. Patient selection in high-dose chemotherapy trials: relevance in high-risk breast cancer. J Clin Oncol 15(10):3178-3184, 1997.

147. Peters WP, Rosner G, Vredenburgh J, Shpall E, Crump M, Richardson P, Marks L, Cirrincione C, Wood W, Henderson I, Hurd D, Norton L. A prospective, randomized comparison of two doses of combination alkylating agents (AA) as consolidation after CAF in high-risk primary breast cancer involving ten or more axillary lymph nodes (LN): Preliminary results of CALGB 9082/SWOG 9114/NCIC MA-13. Proc Am Soc Clin Oncol 18:1a 1999.

148. The Scandinavian Breast Cancer Study Group 9401. Results from a randomized adjuvant breast cancer study with high dose chemotherapy supported by autologous bone marrow stem cells versus dose escalated and tailored FEC therapy. Proc Am Soc Clin Oncol 18:2a, 1999.

149. Bergh J, Wiklund T, Erikstein B, Lidbrink E, Lindman H, Malmstrom P, Kellokumpu-Lehtinen P, Bengtsson NO, Soderlund G, Anker G, Wist E, Ottosson S, Salminen E, Ljungman P, Holte H, Nilsson J, Blomqvist C, Wilking N. Tailored fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide compared with marrow-supported high-dose chemotherapy as adjuvant treatment for high-risk breast cancer: a randomised trial. Scandinavian Breast Group 9401 study. Lancet 356(9239):1384-1391, 2000.

150. Rodenhuis S, Richel DJ, van der Wall E, Schornagel JH, Baars JW, Koning CC, Peterse JL, Borger JH, Nooijen WJ, Bakx R, Dalesio O, Rutgers E. Randomised trial of high-dose chemotherapy and haemopoietic progenitor-cell support in operable breast

cancer with extensive axillary lymph-node involvement. *Lancet* 352(9127):515-521, 1998.

151. Hortobagyi GN, Buzdar, Champlin R, Gajewski J, Holmes FA, Booser D, Valero V, Theriault RL. Lack of efficacy of adjuvant high dose tandem combination chemotherapy for high risk primary breast cancer: a randomized trial. *Proc Am Soc Clin Oncol* 17:123a, 1998.

152. Gianni A, Bonadonna G. Five years results of the randomized clinical trial comparing standard versus high dose myeloablative chemotherapy in the adjuvant treatment of breast cancer with > 3 positive nodes. *Proc Am Soc Clin Oncol* 20:21a, 2001.

153. Roche HH, Pouillard P, Meyer N. Adjuvant high dose chemotherapy improves early outcome for high risk (N>7) breast cancer patients: The Pegase 01 trial. *Proc Am Soc Clin Oncol* 20:26a, 2001.

154. Crown JP, Lind M, Gould A. High dose chemotherapy with autograft support is not superior to CMF following Doxorubicin induction in patients with breast cancer and 4 or more involved axillary lymph nodes: The Anglo Celtic I study. *Proc Am Soc Clin Oncol* 21:42a, 2002.

155. Tallman MS, Gray R, Robert NJ, LeMaistre CF, Osborne CK, Vaughan WP, Gradishar WJ, Pisansky TM, Fetting J, Paietta E, Lazarus HM. Conventional adjuvant chemotherapy with or without high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation in high-risk breast cancer. *N Engl J Med* 349(1):17-26, 2003.

156. Zander AR, Kroger N, Schmoor C, Kruger W, Mobus V, Frickhofen N, Metzner B, Schultze W, Berdel WE, Koenigsmann M, Thiel E, Wandt H, Possinger K, Trumper L, Kreienberg R, Carstensen M, Schmidt EH, Janicke F, Schumacher M, Jonat W. High-dose chemotherapy with autologous hematopoietic stem-cell support compared

with standard-dose chemotherapy in breast cancer patients with 10 or more positive lymph nodes: first results of a randomized trial. *J Clin Oncol* 22(12):2273-2283, 2004.

157. Rodenhuis S, Bontenbal M, Beex LV, van der Wall E, Richel DJ, Nooij MA, Voest EE, Hupperets P, Westermann AM, Dalesio OB, de Vries EGE. Randomized phase III study of high-dose chemotherapy with cyclophosphamide, thiotepa and carboplatin in operable breast cancer with 4 or more axillary lymph nodes. *Proc Am Soc Clin Oncol* 19:74a 2000.

158. Rodenhuis S, Bontenbal M, Beex LV, Wagstaff J, Richel DJ, Nooij MA, Voest EE, Hupperets P, van Tinteren H, Peterse HL, TenVergert EM, de Vries EG. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for high-risk breast cancer. *N Engl J Med* 349(1):7-16, 2003.

159. Mellado B, Del Carmen Vela M, Colomer D, Gutierrez L, Castel T, Quinto L, Fontanillas M, Reguart N, Domingo-Domenech JM, Montagut C, Estape J, Gascon P. Tyrosinase mRNA in blood of patients with melanoma treated with adjuvant interferon. *J Clin Oncol* 20(19):4032-4039, 2002.

160. Schleiermacher G, Peter M, Oberlin O, Philip T, Rubie H, Mechinaud F, Sommelet-Olive D, Landman-Parker J, Bours D, Michon J, Delattre O. Increased risk of systemic relapses associated with bone marrow micrometastasis and circulating tumor cells in localized ewing tumor. *J Clin Oncol* 21(1):85-91, 2003.

161. Z'graggen K, Centeno BA, Fernandez-del Castillo C, Jimenez RE, Werner J, Warshaw AL. Biological implications of tumor cells in blood and bone marrow of pancreatic cancer patients. *Surgery* 129(5):537-546, 2001,

162. Hardingham JE, Hewett PJ, Sage RE, Finch JL, Nuttall JD, Kotasek D, Dobrovic A. Molecular detection of blood-borne epithelial cells in colorectal cancer patients and in patients with benign bowel disease. *Int J Cancer* 89(1):8-13, 2000.

163. Melchior SW, Corey E, Ellis WJ, Ross AA, Layton TJ, Oswin MM, Lange PH, Vessella RL. Early tumor cell dissemination in patients with clinically localized carcinoma of the prostate. *Clin Cancer Res* 3(2):249-256, 1997.
164. Ho SB, Hyslop A, Albrecht R, Jacobson A, Spencer M, Rothenberger DA, Niehans GA, D'Cunha J, Kratzke RA. Quantification of colorectal cancer micrometastases in lymph nodes by nested and real-time reverse transcriptase-PCR analysis for carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res* 10(17):5777-5784, 2004.
165. Natsugoe S, Nakashima S, Nakajo A, Matsumoto M, Okumura H, Tokuda K, Miyazono F, Kijima F, Aridome K, Ishigami S, Takao S, Aikou T. Bone marrow micrometastasis detected by RT-PCR in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 10(6):1879-1883, 2003.
166. Kubota K, Nakanishi H, Hiki N, Shimizu N, Tsuji E, Yamaguchi H, Mafune K, Tange T, Tatematsu M, Kaminishi M. Quantitative detection of micrometastases in the lymph nodes of gastric cancer patients with real-time RT-PCR: a comparative study with immunohistochemistry. *Int J Cancer* 105(1):136-43, 2003.
167. Martinez-Pineiro L, Rios E, Martinez-Gomariz M, Pastor T, de Cabo M, Picazo ML, Palacios J, Perona R. Molecular staging of prostatic cancer with RT-PCR assay for prostate-specific antigen in peripheral blood and lymph nodes: comparison with standard histological staging and immunohistochemical assessment of occult regional lymph node metastases. *Eur Urol* 43(4):342-350, 2003.
168. Noura S, Yamamoto H, Ohnishi T, Masuda N, Matsumoto T, Takayama O, Fukunaga H, Miyake Y, Ikenaga M, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M. Comparative detection of lymph node micrometastases of stage II colorectal cancer by reverse transcriptase polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 20(20):4232-4241, 2002.

169. Aberizk WJ, Silver B, Henderson IC, Cady B, Harris JR. The use of radiotherapy for treatment of isolated locoregional recurrence of breast carcinoma after mastectomy. *Cancer* 58(6):1214-1218, 1986.
170. Guidelines for the reporting of adverse drug reactions. Bethesda, Division of Cancer Treatment, National Cancer Institute. 1988.
171. Chanock SJ, Pizzo PA. Fever in the neutropenic host. *Infect Dis Clin North Am* 10(4):777-796, 1996.
172. Duhrsen U, Villeval JL, Boyd J, Kannourakis G, Morstyn G, Metcalf D. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Blood* 72(6):2074-2081, 1988.
173. Berenson RJ, Andrews RG, Bensinger WI, Kalamasz D, Knitter G, Buckner CD, Bernstein ID. Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons. *J Clin Invest* 81(3):951-955, 1988.
174. Berenson RJ, Bensinger WI, Hill RS, Andrews RG, Garcia-Lopez J, Kalamasz DF, Still BJ, Spitzer G, Buckner CD, Bernstein ID. Engraftment after infusion of CD34+ marrow cells in patients with breast cancer or neuroblastoma. *Blood* 77(8):1717-1722, 1991.
175. Siena S, Bregni M, Brando B, Belli N, Lansdorp PM, Bonadonna G, Gianni M. Flow cytometry to estimate circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation: comparative analysis of different CD34 monoclonal antibodies. *Haematologica* 76(4):330-333, 1991.
176. Bensinger W, Appelbaum F, Rowley S, Storb R, Sanders J, Lilleby K, Gooley T, Demirer T, Schiffman K, Weaver C. Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral-blood stem cells. *J Clin Oncol* 13(10):2547-2555, 1995.

177. Bieche I, Onody P, Laurendeau I, Olivi M, Vidaud D, Lidereau R, Vidaud M. Real-time reverse transcription-PCR assay for future management of ERBB2-based clinical applications. *Clin Chem* 45(8):1148-1156, 1999.
178. Bosma AJ, Weigelt B, Lambrechts AC, Verhagen OJ, Pruntel R, Hart AA, Rodenhuis S, van 't Veer LJ. Detection of circulating breast tumor cells by differential expression of marker genes. *Clin Cancer Res* 8(6):1871-1877, 2002.
179. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, Bi W, Dee R, van der Schoot E, Delabesse E, Macintyre E, Gottardi E, Saglio G, Watzinger F, Lion T, van Dongen JJ, Hokland P, Gabert J. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia* 17(12):2474-2486, 2003.
180. Pallisgaard N, Hokland P, Bi W, van der Velden VHJ, van Donden JJM, Dee R. Selection of referente genes for the European standardization and quality control program of real-time quantitative RT-PCR análisis of fusion gene transcripts for minimal residual disease follow up in leucemia patients. *Blood* 98(11):4467-4475, 2001.
181. Burkhardt R, Frisch B, Kettner G. The clinical study of micro-metastatic cancer by bone biopsy. *Bull Cancer* 67(3):291-305, 1980.
182. Frisch B, Bartl R, Mahl G, Burkhardt R. Scope and value of bone marrow biopsies in metastatic cancer. *Invasion Metastasis* 4(suppl 1):12-30, 1994.
183. Gusterson BA. The new TNM classification and micrometastases. *Breast* 12(6):387-390, 2003.
184. Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, Funke I, Izbicki JR, Riethmuller G. Differential expression of proliferation-associated molecules

in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 85(17):1419-1424, 1993.

185. Barz H, Barz D. The prevalence of single and synchronous multiple tumours in autopsy series and its dependence on age. *Arch Geschwulstforsch* 47(5):428-436, 1977.

186. Vredenburgh JJ, Peters WP, Rosner G, DeSombre K, Johnston WW, Kamel A, Wu K, Bast RC Jr. Detection of tumor cells in the bone marrow of stage IV breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy: the role of induction chemotherapy. *Bone Marrow Transplant* 16(6):815-821, 1995.

187. Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Holle R, von Minckwitz G, Solomayer EF, Kaul S, Bastert G. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst* 88(22):1652-1658, 1996.

188. Funke I, Schraut W. Meta-analyses of studies on bone marrow micrometastases: an independent prognostic impact remains to be substantiated. *J Clin Oncol* 16(2):557-566, 1998.

189. Cooper BW, Moss TJ, Ross AA, Ybanez J, Lazarus HM. Occult tumor contamination of hematopoietic stem-cell products does not affect clinical outcome of autologous transplantation in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 16(11):3509-3517, 1998.

190. Mansi JL, Gogas H, Bliss JM, Gazet JC, Berger U, Coombes RC. Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study. *Lancet* 354(9174):197-202, 1999.

191. Pantel K, Cote RJ, Fodstad O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst* 91(13):1113-1124, 1999.

192. Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kantenich CR, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmuller G, Schlimok G. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* 342(8):525-33, 2000.
193. Lyda MH, Tetef M, Carter NH, Ikle D, Weiss LM, Arber DA. Keratin immunohistochemistry detects clinically significant metastases in bone marrow biopsy specimens in women with lobular breast carcinoma. *Am J Surg Pathol* 24(12):1593-1599, 2000.
194. Gerber B, Krause A, Muller H, Richter D, Reimer T, Makovitzky J, Herrnring C, Jeschke U, Kundt G, Friese K. Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors. *J Clin Oncol* 19(4):960-971, 2001.
195. Braun S, Schlimok G, Heumos I, Schaller G, Riethdorf L, Riethmuller G, Pantel K. ErbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients. *Cancer Res* 61(5):1890-1895, 2001.
196. Gebauer G, Fehm T, Merkle E, Beck EP, Lang N, Jager W. Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up. *J Clin Oncol* 19(16):3669-74, 2001.
197. Kasimir-Bauer S, Oberhoff C, Schindler AE, Seeber S. A summary of two clinical studies on tumor cell dissemination in primary and metastatic breast cancer: methods, prognostic significance and implication for alternative treatment protocols (Review). *Int J Oncol* 20(5):1027-34, 2002.
198. Bischoff J, Rosenberg R, Dahm M, Janni W, Gutschow K. Minimal residual disease in bone marrow and peripheral blood of patients with metastatic breast cancer. *Recent Results Cancer Res* 162(1):135-140, 2003.

199. Lugo TG, Braun S, Cote RJ, Pantel K, Rusch V. Detection and measurement of occult disease for the prognosis of solid tumors. *J Clin Oncol* 21(13):2609-15, 2003.
200. Schneeweiss A, Diel I, Hensel M, Kaul S, Sinn HP, Unnebrink K, Rudlowski C, Lauschner I, Schuetz F, Egerer G, Haas R, Ho AD, Bastert G. Micrometastatic bone marrow cells at diagnosis have no impact on survival of primary breast cancer patients with extensive axillary lymph node involvement treated with stem cell-supported high-dose chemotherapy. *Ann Oncol* 15(11):1627-1632, 2004.
201. Fidler I, Kerbel R, Ellis E: Biology of cancer: angiogenesis. En: *Cancer Principles and Practice of oncology*. De Vita V, Hellman S, Rosenberg S (eds): Philadelphia, PA, USA, Lippincot Williams & Wilkins, 2001, 137-149.
202. Lindemann F, Schlimok G, Dirschedl P, Witte J, Riethmuller G. Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet* 340(8821):685-689, 1992.
203. Pantel K, Cote RJ, Fodstad O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst* 91(13):1113-1124, 1999.
204. Soeth E, Vogel I, Roder C, Juhl H, Marxsen J, Kruger U, Henne-Bruns D, Kremer B, Kalthoff H. Comparative analysis of bone marrow and venous blood isolates from gastrointestinal cancer patients for the detection of disseminated tumor cells using reverse transcription PCR. *Cancer Res* 57(15):3106-3110, 1997.
205. Melchior SW, Corey E, Ellis WJ, Ross AA, Layton TJ, Oswin MM, Lange PH, Vessella RL. Early tumor cell dissemination in patients with clinically localized carcinoma of the prostate. *Clin Cancer Res* 3(2):249-256, 1997.
206. Schimanski CC, Linnemann U, Berger MR. Sensitive detection of K-ras mutations augments diagnosis of colorectal cancer metastases in the liver. *Cancer Res* 59(20):5169-5175, 1999.

207. Naume B, Wiedswang G, Borgen E, Kvalheim G, Karesen R, Qvist H, Janbu J, Harbitz T, Nesland JM. The prognostic value of isolated tumor cells in bone marrow in breast cancer patients: evaluation of morphological categories and the number of clinically significant cells. *Clin Cancer Res* 10(9):3091-3097, 2004.
208. Schoenfeld A, Kruger KH, Gomm J, Sinnott HD, Gazet JC, Sacks N, Bender HG, Luqmani Y, Coombes RC. The detection of micrometastases in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer using immunohistochemistry and reverse transcriptase polymerase chain reaction for keratin 19. *Eur J Cancer* 33(6):854-861, 1997.
209. Steinert PM, Cantieri JS, Teller DC, Lonsdale-Eccles JD, Dale BA. Characterization of a class of cationic proteins that specifically interact with intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci USA* 78(7):4097-4101, 1981.
210. Pruss RM, Mirsky R, Raff MC, Thorpe R, Dowding AJ, Anderton BH. All classes of intermediate filaments share a common antigenic determinant defined by a monoclonal antibody. *Cell* 27(3 Pt 2):419-428, 1981.
211. Franke WW, Schmid E, Osborn M, Weber K. Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 75(10):5034-5038, 1978.
212. Franke WW, Weber K, Osborn M, Schmid E, Freudenstein C. Antibody to prekeratin. decoration of tonofilament like arrays in various cells of epithelial character. *Exp Cell Res* 116(2):429-445, 1978.
213. Hynes RO, Destree AT. 10 nm filaments in normal and transformed cells. *Cell* 13(1):151-163, 1978.
214. Sun TT, Green H. Immunofluorescent staining of keratin fibers in cultured cells. *Cell* 14(3):469-476, 1978.

215. Bannasch P, Zerban H, Schmid E, Franke WW. Liver tumors distinguished by immunofluorescence microscopy with antibodies to proteins of intermediate-sized filaments. *Proc Natl Acad Sci USA* 77(8):4948-52, 1980.
216. Schlegel R, Banks-Schlegel S, McLeod JA, Pinkus GS. Immunoperoxidase localization of keratin in human neoplasms: a preliminary survey. *Am J Pathol* 101(1):41-50, 1980.
217. Gabbiani G, Kapanci Y, Barazzone P, Franke WW. Immunochemical identification of intermediate-sized filaments in human neoplastic cells. A diagnostic aid for the surgical pathologist. *Am J Pathol* 104(3):206-216, 1981.
218. Ramaekers FCS, Putts JJG, Kart A, Jap PH, Vooljs GP. Use of antibodies to intermediate filaments in the characterization of human tumors. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol* 46(1):331-339, 1981.
219. Altmannsberger M, Osborn M, Schauer A, Weber K. Antibodies to different intermediate filament proteins. Cell type-specific markers on paraffin-embedded human tissues. *Lab Invest* 45(5):427-434, 1981.
220. Altmannsberger M, Osborn M, Holscher A, Schauer A, Weber K. The distribution of keratin type intermediate filaments in human breast cancer. An immunohistological study. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 37(3):277-284, 1981
221. Franke WW, Schmid E, Schiller D, Pintor S, Jarasch ED, Moll R, Denk H, Jackson B. Differentiation-related patterns of expression of proteins of intermediate-size filaments in tissues and cultured cells. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 46(1):431-463, 1981.
222. Osborn M, Geisler N, Shaw G, Sharp G, Weber K. Intermediate filaments. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 46 (1):413-429, 1981.

223. Moll R, Krepler R, Franke WW. Complex cytokeratin polypeptide patterns observed in certain human carcinomas. *Differentiation* 23(3):256-269, 1983.
224. Moll R, Franke WW, Schiller D. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31(1):11-24, 1982.
225. Vannucchi AM, Bosi A, Glinz S, Pacini P, Linari S, Saccardi R, Alterini R, Rigacci L, Guidi S, Lombardini L, Longo G, Mariani MP, Rossi-Ferrini P. Evaluation of breast tumour cell contamination in the bone marrow and leukapheresis collections by RT-PCR for cytokeratin-19 mRNA. *Br J Haematol* 103(3):610-617, 1998.
226. Wong IH, Yeo W, Chan AT, Johnson PJ. Quantitative correlation of cytokeratin 19 mRNA level in peripheral blood with disease stage and metastasis in breast cancer patients: potential prognostic implications. *Int J Oncol* 18(3):633-638, 2001.
227. Aerts J, Wynendaele W, Paridaens R, Christiaens MR, van den Bogaert W, van Oosterom AT, Vandekerckhove F. A real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) to detect breast carcinoma cells in peripheral blood. *Ann Oncol* 12(1):39-46, 2001.
228. Witzig TE, Bossy B, Kimlinger T, Roche PC, Ingle JN, Grant C, Donohue J, Suman VJ, Harrington D, Torre-Bueno J, Bauer KD. Detection of circulating cytokeratin-positive cells in the blood of breast cancer patients using immunomagnetic enrichment and digital microscopy. *Clin Cancer Res* 8(5):1085-1091, 2002.
229. Stathopoulou A, Vlachonikolis I, Mavroudis D, Perraki M, Kouroussis Ch, Apostolaki S, Malamos N, Kakolyris S, Kotsakis A, Xenidis N, Reppa D, Georgoulas V. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *J Clin Oncol* 20(16):3404-3412, 2002.

230. Ismail MS, Wynendaele W, Aerts JL, Paridaens R, Van Mellaert L, Anne J, Gaafar R, Shakankiry N, Khaled HM, Christiaens MR, Omar S, Vandekerckhove P, Van Oosterom AT. Real-time quantitative RT-PCR and detection of tumour cell dissemination in breast cancer patients: plasmid versus cell line dilutions. *Ann Oncol* 14(8):1241-1245, 2003.
231. Xenidis N, Vlachonikolis I, Mavroudis D, Perraki M, Stathopoulou A, Malamos N, Kouroussis C, Kakolyris S, Apostolaki S, Vardakis N, Lianidou E, Georgoulas V. Peripheral blood circulating cytokeratin-19 mRNA-positive cells after the completion of adjuvant chemotherapy in patients with operable breast cancer. *Ann Oncol* 14(6):849-855, 2003.
232. Jung YS, Lee KJ, Kim HJ, Yim HE, Park JS, Soh EY, Kim MW, Park HB. Clinical significance of bone marrow micrometastasis detected by nested rt-PCR for keratin-19 in breast cancer patients. *Jpn J Clin Oncol* 33(4):167-172, 2003.
233. Nogi H, Takeyama H, Uchida K, Agata T, Horiguchi-Yamada J, Yamada H. Detection of MUC1 and keratin 19 mRNAs in the bone marrow by quantitative RT-PCR predicts the risk of distant metastasis in breast cancer patients. *Breast Cancer* 10(1):74-81, 2003.
234. Thomas PA, Kirschmann DA, Cerhan JR, Folberg R, Seftor EA, Sellers TA, Hendrix MJ. Association between keratin and vimentin expression, malignant phenotype, and survival in postmenopausal breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 5(10):2698-2703, 1999.
235. Fuchs IB, Lichtenegger W, Buehler H, Henrich W, Stein H, Kleine-Tebbe A, Schaller G. The prognostic significance of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Anticancer Res* 22(6A):3415-3419, 2002.

236. Zajchowski DA, Bartholdi MF, Gong Y, Webster L, Liu HL, Munishkin A, Beauheim C, Harvey S, Ethier SP, Johnson PH. Identification of gene expression profiles that predict the aggressive behavior of breast cancer cells. *Cancer Res* 61(13):5168-5178, 2001.
237. Woelfle U, Cloos J, Sauter G, Riethdorf L, Janicke F, van Diest P, Brakenhoff R, Pantel K. Molecular signature associated with bone marrow micrometastasis in human breast cancer. *Cancer Res* 63(18):5679-5684, 2003.
238. Woelfle U, Sauter G, Santjer S, Brakenhoff R, Pantel K. Down-regulated expression of cytokeratin 18 promotes progression of human breast cancer. *Clin Cancer Res* 10(8):2670-2674, 2004.
239. Slade MJ, Smith BM, Sinnott HD, Cross NC, Coombes RC. Quantitative polymerase chain reaction for the detection of micrometastases in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 17(3):870-879, 1999.
240. Fetsch PA, Cowan KH, Weng DE, Freifield A, Filie AC, Abati A. Detection of circulating tumor cells and micrometastases in stage II, III, and IV breast cancer patients utilizing cytology and immunocytochemistry. *Diagn Cytopathol* 22(5):323-328, 2000.
241. Kahn HJ, Yang LY, Blondal J, Lickley L, Holloway C, Hanna W, Narod S, McCready DR, Seth A, Marks A. RT-PCR amplification of CK19 mRNA in the blood of breast cancer patients: correlation with established prognostic parameters. *Breast Cancer Res Treat* 60(2):143-151, 2000.
242. Schaller G, Fuchs I, Pritze W, Ebert A, Herbst H, Pantel K, Weitzel H, Lengyel E. Elevated keratin 18 protein expression indicates a favorable prognosis in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 2(11):1879-1885, 1996.
243. Schaller G, Fuchs I, Ebert A, Gstettenbauer M, Herbst H, Lengyel E. The clinical importance of keratin 18 in breast cancer. *Zentralbl Gynakol* 121(3):126-130, 1999.

244. Weigelt B, Bosma AJ, Hart AA, Rodenhuis S, van 't Veer LJ. Marker genes for circulating tumour cells predict survival in metastasized breast cancer patients. *Br J Cancer* 88(7):1091-1094, 2003.
245. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9):2002-2007; 2001. 251.
246. Solomayer EF, Diel IJ, Salanti G, Hahn M, Gollan C, Schutz F, Bastert G. Time independence of the prognostic impact of tumor cell detection in the bone marrow of primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 7(12):4102-4108, 2001.
247. Riethmuller G, Schneider-Gadicke E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Hoffken K, Gruber R, Pichlmaier H, Hirche H, Pichlmayr R. Randomized trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma. German Cancer Aid 17-1A Study Group. *Lancet* 343(8907):1177-1183, 1994
248. Braun S, Hepp F, Sommer HL, Pantel K. Tumor-antigen heterogeneity of disseminated breast cancer cells: implications for immunotherapy of minimal residual disease. *Int J Cancer* 84(1):1-5, 1999.
249. Dingemans AM, Brakenhoff RH, Postmus PE, Giaccone G. Detection of cytokeratin-19 transcripts by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in lung cancer cell lines and blood of lung cancer patients. *Lab Invest* 77(3):213-220, 1997
250. Krismann M, Todt B, Schroder J, Gareis D, Muller KM, Seeber S, Schutte J. Low specificity of cytokeratin 19 reverse transcriptase-polymerase chain reaction analyses for detection of hematogenous lung cancer dissemination. *J Clin Oncol* 13(11):2769-2775, 1995.
251. Braun S, Kantenich C, Janni W, Hepp F, de Waal J, Willgeroth F, Sommer H, Pantel K. Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant

tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol* 18(1):80-86, 2000.

252. Hu XC, Chow LW. Detection of circulating breast cancer cells with multiple-marker RT-PCR assay. *Anticancer Res* 21(1):421-424, 2001.

253. Silva JM, Dominguez G, Silva J, Garcia JM, Sanchez A, Rodriguez O, Provencio M, Espana P, Bonilla F. Detection of epithelial messenger RNA in the plasma of breast cancer patients is associated with poor prognosis tumor characteristics. *Clin Cancer Res* 7(9):2821-2825, 2001.

254. Gaforio JJ, Serrano MJ, Sanchez-Rovira P, Sirvent A, Delgado-Rodriguez M, Campos M, de la Torre N, Algarra I, Duenas R, Lozano A. Detection of breast cancer cells in the peripheral blood is positively correlated with estrogen-receptor status and predicts for poor prognosis. *Int J Cancer* 107(6):984-990, 2003

255. Weigelt B, Verduijn P, Bosma AJ, Rutgers EJ, Peterse HL, van't Veer LJ. Detection of metastases in sentinel lymph nodes of breast cancer patients by multiple mRNA markers. *Br J Cancer* 90(8):1531-1537, 2004.

256. Henderson IC, Berry DA, Demetri GD, Cirincione CT, Goldstein LJ, Martino S, Ingle JN, Cooper MR, Hayes DF, Tkaczuk KH, Fleming G, Holland JF, Duggan DB, Carpenter JT, Frei E 3rd, Schilsky RL, Wood WC, Muss HB, Norton L. Improved outcomes from adding sequential Paclitaxel but not from escalating Doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer. *J Clin Oncol* 21(6):976-983, 2003.

257. Citron ML, Berry DA, Cirincione C, Hudis C, Winer EP, Gradishar WJ, Davidson NE, Martino S, Livingston R, Ingle JN, Perez EA, Carpenter J, Hurd D, Holland JF, Smith BL, Sartor CI, Leung EH, Abrams J, Schilsky RL, Muss HB, Norton L. Randomized trial of dose-dense versus conventionally scheduled and sequential versus

concurrent combination chemotherapy as postoperative adjuvant treatment of node-positive primary breast cancer: first report of Intergroup Trial C9741/Cancer and Leukemia Group B Trial 9741. *J Clin Oncol* 21(8):1431-1439, 2003.

258. Nabholz JM, Pienkowski T, Mackey J, Pawlicki M, Guastalla J, Vogel C, Weaver C, Walley B, Martin M, Chap L, Tomiak E, Juhos E, Guevin R, Howell A, Hainsworth J, Fornander T, Blitz S, Gazel S, Loret C, Riva A. Phase III trial comparing TAC (docetaxel, doxorubicin, cyclophosphamide) with FAC (5-fluorouracil, doxorubicin, cyclophosphamide) in the adjuvant treatment of node positive breast cancer (BC) patients: interim analysis of the BCIRG 001 study. *Proc Am Soc Clin Oncol* 21:12c, 2002.