

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA FÍSICA Y RADIOLOGÍA**



*ugr*

Universidad  
de **Granada**

**VALOR PREDICTIVO DE RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA  
NEOADYUVANTE EN DENSIDAD DE DOSIS, DE LOS  
CRITERIOS DE RESPUESTAS CITOLÓGICOS (CYCAR), EN  
PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA LOCALIZADO**

**TESIS DOCTORAL**

**IRENE ZARCOS PEDRINACI**

**GRANADA 2015**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autora: Irene Zarcos Pedrinaci  
ISBN: 978-84-9125-455-3  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/42053>

**DOCTORANDA:**

**Dña. Irene Zarcos Pedrinaci**

**TESIS DOCTORAL**

**VALOR PREDICTIVO DE RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA  
NEOADYUVANTE EN DENSIDAD DE DOSIS DE LOS  
CRITERIOS DE RESPUESTAS CITOLÓGICOS (CYCAR), EN  
PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA LOCALIZADO**

**Tesis doctoral presentada por D<sup>a</sup> Irene Zarcos Pedrinaci, para optar al  
grado de Doctora por la Universidad de Granada.**



**14 de Octubre de 2015**

**- D. José Luis García Puche, Jefe de Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario Clínico San Cecilio, de Granada.**

**- D<sup>a</sup> María José Serrano Fernández, Investigadora sénior asociada al Departamento de Medicina Legal y Toxicología. Asociada a la Unidad de Oncología Médica del H. Clínico San Cecilio de Granada.**

**CERTIFICAN:** Que el presente trabajo de investigación titulado ***“VALOR PREDICTIVO DE RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE EN DENSIDAD DE DOSIS, DE LOS CRITERIOS DE RESPUESTAS CITOLÓGICOS (CYCAR), EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA LOCALIZADO”***, ha sido realizado bajo mi dirección por D<sup>ña</sup>. Irene Zarcos Pedrinaci, para optar al título de Doctora por la Universidad de Granada.

**Y para que conste, firmo el presente certificado en Granada a 14 de Octubre de 2015.**

**Fdo.**

**Dr. D Jose Luis García Puche**

**Fdo.**

**Dra. D<sup>a</sup> María José Serrano**

Parte de este trabajo de tesis ha sido publicado en la revista

***VALOR PREDICTIVO DE RESPUESTA A LA  
QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE EN  
DENSIDAD DE DOSIS, DE LOS CRITERIOS DE  
RESPUESTAS CITOLÓGICOS (CYCAR), EN  
PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA  
LOCALIZADO***





# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
I. CÁNCER DE MAMA.....	3
1.-EPIDEMIOLOGÍA CÁNCER DE MAMA .....	3
2.-FACTORES DE RIESGO .....	5
3.-DIAGNÓSTICO Y ESTADIFICACIÓN.....	8
3.1.Diagnóstico. ....	8
3.1.1. Detección clínica: .....	8
Inspección y palpación:.....	8
3.1.2. Diagnóstico radiológico .....	8
Mamografía:.....	8
Ecografía mamaria:.....	9
RMN:.....	9
Galactografía: .....	10
3.1.3. Otros procedimientos para el estudio de extensión: .....	10
3.2. Diagnóstico anatomopatológico: .....	10
Biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC): .....	11
3.3 Clasificación histopatológica. ....	11
3.3.1. Carcinoma ductal in situ.....	11
3.3.2. Carcinoma lobulillar in situ .....	12
3.3.3 Carcinoma ductal infiltrante .....	12
3.3.4. Carcinoma lobulillar infiltrante .....	12
3.3.5. Carcinoma tubular.....	12
3.3.6. Carcinoma cribiforme .....	13
3.3.7. Carcinoma medular.....	13
3.3.8. Carcinomas mucinosos.....	13
3.3.9. Carcinomas metaplásico.....	13
3.3.10. Carcinoma papilar.....	13

3.3.11. Carcinoma adenoide quístico.....	13
3.3.12. Carcinoma inflamatorio .....	13
3.4. Estadificación:.....	14
3.4.1 Clasificación TNM y estadiaje según AJCC:.....	14
3.4.1.1. Clasificación del T .....	14
Clasificación clínica :.....	14
Clasificación patológica . .....	15
3.4.1.2. Clasificación del N .....	15
Clasificación anatómica: .....	15
Clasificación clínica:.....	15
Clasificación patológica del N : pN.....	17
Clasificación del ganglio centinela .....	17
3.4.1.3. Clasificación del M .....	18
3.4.1.4. Clasificación del TNM .....	18
4. FACTORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS: .....	19
4.1. Factores pronósticos:.....	19
Tamaño tumoral.....	19
Grado histológico .....	19
Tipo histológico .....	19
Invasión vascular y linfática .....	20
Receptores hormonales .....	20
Oncogenes Her2.....	20
Fracción de proliferación alta, Ki 67 .....	20
Multicentricidad .....	21
Edad.....	21
4.2. Otros factores pronósticos reconocidos sin una completa implantación:.....	21
Infiltración perineural, e infiltrado inflamatorio tumoral:.....	21
Marcadores de proliferación:.....	21
TP53: .....	22

Perfiles genómicos.....	22
Angiogénesis: .....	23
Micrometástasis en médula ósea:.....	24
Células circulantes de cáncer de mama. ....	24
4.3. Factores predictivos:.....	24
Estado hormonal:.....	24
Her2 .....	25
5. TRATAMIENTO NEOADYUVANTE EN CANCER DE MAMA.....	26
5.1 Beneficios e indicaciones del tratamiento neoadyuvante:.....	26
5.2.Poliqumioterapia en cáncer de mama. Esquemas basados en antraciclinas y taxanos. ....	27
Esquemas con antraciclinas: .....	28
Esquemas con taxanos.....	29
5.3.    Numero de ciclos, en neoadyuvancia:.....	30
Forma de administración:.....	30
Docetaxel: Secuencial vs concurrente. ....	30
Antraciclinas seguidas de taxanos o a la inversa.....	31
Quimioterapia administrada en densidad de dosis. ....	31
5.4.    Neoadyuvancia en cancer de mama HER 2. ....	32
Trastuzumab en cáncer de mama. ....	32
5.5.    Hormonoterapia en neoadyuvancia.....	35
5.6 Evaluación de respuesta patológica a la QTN por clasificación de respuestas patológica por Miller y Payne. Clasificación por residual cáncer Burden. Valor pronóstico de la RCP tras la quimioterapia neoadyuvante. ....	36
Clasificación de Miller y Payne (MYP) .....	36
Clasificación por Residual Cancer Burden (RCB):.....	37
II- GANGLIO CENTINELA EN CÁNCER DE MAMA .....	39
6. DISEMINACIÓN GANGLIONAR.....	39
Afectación axilar:.....	39
Cadena mamaria interna:.....	40
7. Ganglio centinela y biopsia selectiva del ganglio centinela.....	40

8. Biopsia selectiva del ganglio centinela en neoadyuvancia.....	41
II. CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES.....	43
9. Etapas de la carcinogénesis .....	43
9.1. Iniciación:.....	43
9.2. Promoción:.....	43
9.3. Progresión: .....	44
10. Invasión y metastatización (cascada metastásicas): .....	44
10.1. Angiogénesis. ....	45
10.2. Invasión y migración: .....	46
10.3. Intravasación y circulación:.....	47
10.4. Detención y extravasación.....	47
10.5. Colonización .....	47
10.6. Escape a las defensas.....	48
11. CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES.....	50
11.1. Definición de células tumorales circulantes .....	50
Primeros estudios en células tumorales circulantes .....	50
11.2. Importancia de las células tumorales circulantes en el proceso de metastatización. ....	51
11.3. Caracterización fenotípica y genotípica de las células tumorales circulantes en cáncer de mama. ....	52
11.4. Valor clínico de las CTCs: Valor pronóstico y predictivo de las CTCs en cáncer de mama.....	56
11.5. Técnicas de enriquecimiento, aislamiento y detección de las CTCs.....	57
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	59
HIPÓTESIS. ....	61
OBJETIVOS .....	63
Objetivos primarios: .....	63
Objetivos secundarios:.....	63
MATERIAL Y MÉTODOS .....	65
DISEÑO DEL ESTUDIO .....	67
1.-POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	67

2. RECOGIDA DE LOS DATOS Y VARIABLES DEL ESTUDIO .....	68
2.1. Descripción de variables independientes:.....	68
2.1.1. Variables clínicas e histopatológicas:.....	68
2.2. Descripción de variables dependientes:.....	72
3. CRONOGRAMA DE LA INTERVENCIÓN:.....	74
4. PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS: MUESTRAS BIOLÓGICAS EMPLEADAS Y PREPARACIÓN .....	76
4.1. Análisis realizados sobre las muestras de sangre .....	76
5 AISLAMIENTO, DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CTCs.....	78
5.1. Aislamiento y detección por selección positiva inmunomagnética: .....	78
5.1.1. Aislamiento .....	78
5.1.2. Detección por selección positiva inmunomagnética:.....	79
5.1.3. Detección de CTCs mediante tinción cromogénica:.....	81
5.1.4. Caracterización de CTCs por tinción inmunocitoquímica:.....	82
6. ANALISIS ESTADÍSTICO.....	83
7. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	84
RESULTADOS .....	85
I. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES: .....	87
1.1. Características clínicas. ....	87
1.2. Características del tratamiento. ....	89
1.3. Detección de CTCs.....	90
II. RELACIÓN ENTRE LOS SUBTIPOS HISTOPATOLÓGICOS Y LA RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE EN DENSIDAD DE DOSIS.....	92
III. RELACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DE CTCs BASALES CON LAS CARACTERÍSTICAS CLINICO-PATOLÓGICAS DE INTERÉS. ....	96
IV. VALOR PREDICTIVO DE RESPUESTA A LA QT NEOADYUVANTE EN DENSIDAD DE DOSIS DE LA CTC EN CÁNCER DE MAMA LOCALIZADO.....	98
OBJETIVO PRIMARIO.....	98
4.1. Relación presencia CTCs basales con la respuesta clínica:.....	98
4.2. Relación CTCs basales con la respuesta patológica Miller & Payne en el tumor, y analizando la respuesta en el tumor y en el ganglio. ....	99

4.3. Relación entre la respuesta patológica del tumor a la QTN y la respuesta citológica, por CTCs.....	99
V. RELACIÓN ENTRE AFECTACIÓN GANGLIONAR AXILAR Y LA PRESENCIA DE CTCs. ....	101
5.1. RELACIÓN CTC BASAL Y AFECTACIÓN GANGLIONAR AXILAR, MEDIANTE BSGC.....	101
5.2. RELACIÓN AFECTACIÓN AXILAR PATOLÓGICA Y PRESENCIA DE CTCs BASAL. ....	102
VI. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA DE LA POBLACIÓN.....	103
6.1 ANÁLISIS DE SLE Y SG SEGÚN EL SUBTIPO HISTOPATOLÓGICO DE CÁNCER DE MAMA. ....	103
6.2. VALOR PRONÓSTICO DE LA RC <sub>p</sub> EN LOS DIFERENTES SUBTIPOS DE CÁNCER DE MAMA TRATADOS CON QTN EN DENSIDAD DE DOSIS.....	105
6.3 ANÁLISIS DE SLE Y SG SEGÚN LA PRESENCIA DE CTCs BASALES.....	106
6.4 ANÁLISIS DE SLE Y SG SEGÚN LA RESPUESTA CITOLÓGICA. ....	108
DISCUSIÓN.....	111
CONCLUSIONES.....	127
BIBLIOGRAFÍA.....	131

## **ABREVIATURAS**

CKs: Citoqueratinas

CTCs: Células tumorales circulantes

CYCAR: Criterios de Valoración de Respuesta citológica. (Cytologic Criteria Assessment Response)

RP: Receptor de progesterona

TOP2A: gGen de la topoisomerasa II alfa humana

AC: Adriamicina o doxorubicina-ciclofosfamida

ACR: American College of Radiology

AD: Adriamicina o doxorubicina-docetaxel

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AJCC: Comité Americano de Cáncer

ASCO: American Society Clinical Oncology

BCIRG: Breast Cancer International Research Group

BRCA 1: Breast cancer 1.

BRCA 2: Breast cancer 2.

BSGC: Biopsia selectiva del ganglio centinela

cADN: Ácido desoxirribonucleico complementario

CAP: College of American Pathologists

CMF: Ciclofosfamida, metotrexato y fluorouracilo

CVAP: Ciclofosfamida, vincristina, adriamicina y prednisolona

DAPI: 4',6-diamino-2-phenylindole

DD: Densidad de dosis.

EBCTCG (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group)

EGFR: Epidermal growth factor receptor

ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay

EORTC: European Organization for Research and Treatment of Cancer

EMT: Transición epitelio-mesénquima

EpCAM: Molécula de adhesión de células epiteliales

FDA: Food and Drug Administration

FEC: 5-Fluorouracilo, epirubicina, ciclofosfamida

FAC: 5-fluorouracilo-adriamicina-ciclofosfamida.

FISH: Fluorescence in situ hybridation

G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos.

GEICAM: Grupo español de investigación de cáncer de mama

GEPARDUO: The second German Preoperative Adriamycin Docetaxel

GEPARQUATTRO: The fourth German Preoperative Adriamycin Docetaxel

GEPARTRIO: The third German Preoperative Adriamycin Docetaxel

HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

MAbs: Anticuerpos monoclonales

MACS: Sistema de enriquecimiento inmunomagnético por clasificación celular

MYP: M&P: Clasificación de Miller y Paine.

NSABBP: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project.

NYHA: New York Heart Association.

OR: Odds ratio

PAAF: Punción aspiración con aguja fina

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDGF: Plateled derived growth factor

PDGFR: Plateled derived growth factor receptor

RCp: Respuesta patológica completa

RCB: Residual Cáncer Burden

RE: Receptor de estrógeno

RH: Receptor hormonal

RP: Receptor de progesterona

RTKs: Receptores tirosin quinasa

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

S: Sensibilidad

SLE: Supervivencia libre de enfermedad

SLP: Supervivencia libre de progresión

SG: Supervivencia global

QTN: Quimioterapia neoadyuvante



## **INTRODUCCIÓN**



# CÁNCER DE MAMA

## 1.-EPIDEMIOLOGÍA CÁNCER DE MAMA

Según la OMS, cada año se diagnostican más de diez millones de casos nuevos de cáncer, que unido a su alto índice de mortalidad, se ha situado como la segunda causa global de muerte, responsable del 25% de todas las defunciones.

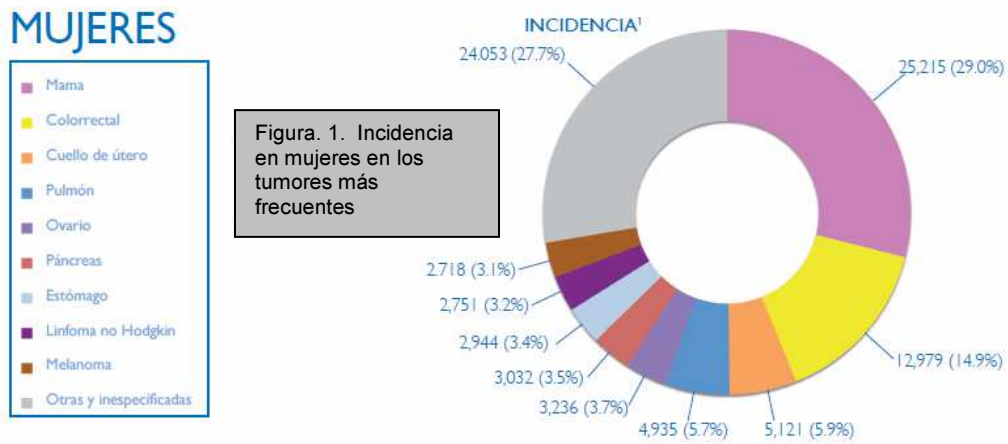
El cáncer de mama es la neoplasia maligna sólida más frecuente diagnosticada en las mujeres occidentales (Norteamérica y Europa), con aproximadamente 1.151.000 nuevos casos al año (22,7 % del total de la población femenina) (1) y es la neoplasia con mayor prevalencia mundial a 5 años, por ambos sexos (19,2%).

Aunque la mortalidad por cáncer de mama ha tenido una evolución llamativa, con un importante aumento desde los años 50 hasta la década de los 80 (2), en la mayor parte de los países desarrollados ha sufrido una disminución en las dos últimas décadas, debido al éxito de los nuevos tratamientos y a la implantación de los programas de cribado. Aún así, constituye el segundo tipo de cáncer con mayor tasa de mortalidad en todo el mundo, y aproximadamente un 25% de las mujeres diagnosticadas de cáncer de mama en estadio precoz desarrollará la enfermedad metastásica que sigue siendo incurable. Por todo esto constituye un importante problema de salud pública.

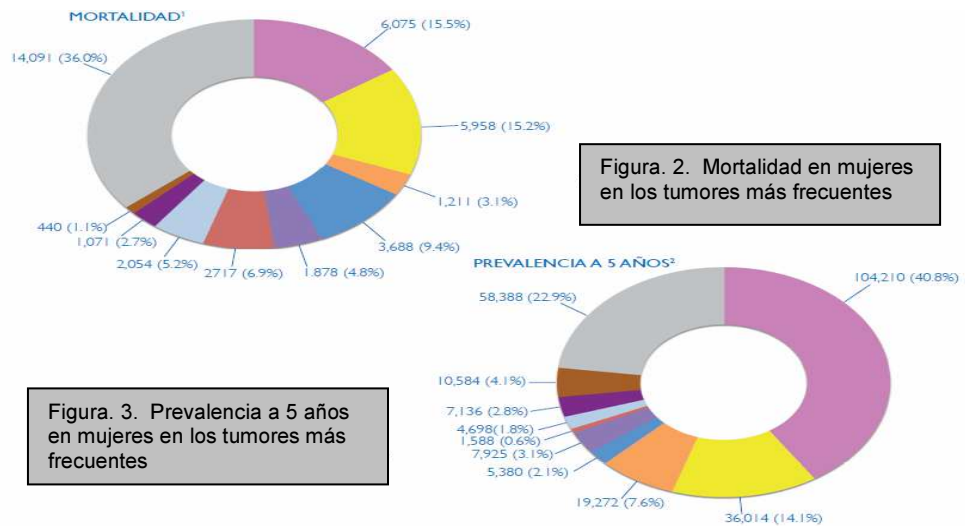
En febrero 2013 Malvezzi y col. publicaron las predicciones de la mortalidad por cáncer en Europa (3), estimando el número de muertes y las tasas de mortalidad (mundiales) estandarizadas por edad (ASRs), siendo éstas de 14.6 por 100,000 mujeres. Según este mismo artículo, las tendencias y las tasas previstas de mortalidad para cáncer de mama en la Unión Europea, y particularmente en España continuarán la tendencia favorable en la mortalidad por observada desde los años 90.

En el informe GLOBOCAN 2012 para España, la estimación de la incidencia global de cáncer de mama en el año 2012 fue de 27.182 casos, con un aumento gradual respecto al año 2006, que fue de 26.493. Así mismo, éste fue el tumor con mayor prevalencia a 5 años (17,9%), el quinto en incidencia (11,7%) y el cuarto en mortalidad (5,9 %) en ambos sexos (4,5). En las mujeres, la mayor incidencia,

mortalidad y prevalencia a 5 años es para el cáncer de mama (29%, 15,5% y 40,8%, respectivamente) (6). (Figuras 1, 2 y 3).



**Figura 1.**



**Figuras 2 y 3**

Las figuras 1, 2 y 3 han sido reproducidas con el permiso de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM).

## 2.-FACTORES DE RIESGO

El cáncer de mama parece ser debido a multitud de factores epidemiológicos conocidos, aunque desconocemos su interacción y el impacto en la prevención de ellos (7).

### 1. Edad:

Es el factor de riesgo individual más importante. La probabilidad de cáncer de mama aumenta con la edad. Su incidencia aumenta rápidamente hasta los 50 años, y posteriormente continua incrementándose más lentamente hasta los 80, donde se estabiliza.

### 2. Raza:

La incidencia es mayor en las mujeres de raza blanca, pero el pronóstico es peor en la de raza negra, con mayor proporción de tumores basal-like.

### 3. Antecedente personal de patología de mama:

El riesgo de un segundo cáncer primario en mujeres curadas de un cáncer de mama previo es mayor, siendo este riesgo un 0,5% en mujeres postmenopáusicas y un 2% en las premenopáusicas. En caso del carcinoma in situ, el riesgo a 10 años de padecer cáncer contralateral es del 5%.

### 4. Antecedentes Familiares:

La historia familiar de cáncer de mama duplica el riesgo en familiares de primer grado. También influye el número de casos en la familia, y la edad de presentación (RR: 2.9 en casos de menores de 30 años, RR: 1.5 si es mayor de 60 años).

## 5. Genética:

-El Síndrome De Cáncer De Mama Y Ovario Hereditario, es el causante del 5-10 % del total de casos de cáncer de mama y ovario respectivamente. Son debidos a mutaciones genéticas con alta penetrancia, de las que el 20-25% ocurren en BRCA1 y 2. Las principales mutaciones responsables de este síndrome son: En BRCA1, la localizada en el brazo largo del cromosoma 17 (17q21) y en BRCA2, la localizada en el cromosoma 13 (13q12) (8). Las mutaciones germinales en BRCA1 son responsables de un 42% de los casos de agregación familiar exclusiva de cáncer de mama y de un 80% de los casos de herencia de cáncer de mama-ovario (9). Las mutaciones en BRCA2 son las causantes de otro 10-30% de los casos de agregación familiar de cáncer de mama exclusivamente.

Otros genes de alta penetrancia que aumentan el riesgo de cáncer de mama son:

-p53, (cromosoma 17p13.1), Síndrome de Li-Fraumeni. El 17% de los cánceres de mama presentan esta mutación.

-PTEN, (cromosoma 10q22-23), Síndrome de Cowden, autosómico dominante con hamartomas, tumores benignos y alto riesgo de cáncer de mama.

-ATM, (cromosoma 11q22-23), Síndrome de ataxia-teleangiectasia. El riesgo en portadores heterocigóticos de la mutación es del 2 %.

## 6. Factores hormonales y reproductivos:

La menarquia precoz, la menopausia tardía y la nuliparidad o la edad tardía al primer embarazo son los principales factores reproductivos.

-La menarquia temprana se ha asociado con un aumento del riesgo de cáncer de mama. La reducción del riesgo con la menopausia precoz es debida probablemente al cese de la división celular en la mama con la finalización del los ciclos menstruales y el descenso de los niveles hormonales.

-La nuliparidad se asocia a un mayor riesgo (RR: 1,2-1,7). Siendo la paridad un factor protector, más pronunciado cuando existe menos tiempo transcurrido entre el nacimiento de un hijo y otro. Las primíparas con edad avanzada tienen mayor riesgo, siendo este riesgo en las mayores de 35 años superior al de las nulíparas.

-La lactancia materna ha sido considerada durante muchos años como un factor protector, sobre todo la de más larga duración, aunque en la actualidad existen datos contradictorios.

-Los Anticonceptivos orales suponen un moderado incremento de riesgo, atenuándose al abandonarlos, hasta desaparecer pasados los 10 años. (RR: 1,4)

-La terapia hormonal sustitutiva (estrógenos) aumenta el riesgo. Este efecto parece desaparecer cuando se abandona el tratamiento, siendo mayor al combinar estrógenos y progesterona. Los estudios de intervención lo confirman.

#### 7. Otros factores de riesgo ligados al estilo de vida:

-La obesidad es un factor de riesgo en postmenopáusicas.

-El ejercicio físico es un factor protector. En los resultados de un metaanálisis de 50 estudios se ha asociado con una disminución del 20% del riesgo de cáncer de mama dependiendo de la intensidad y de la duración de la actividad, (10)

-La dieta con alto consumo en grasas puede aumentar el riesgo, sobre todo con las grasas poli-insaturadas, mientras que los ácidos grasos omega-3 y el aceite de oliva tendrían un papel protector. El alcohol aumenta la frecuencia: La evidencia sugiere un efecto carcinogénico directo por el acetoaldeído, y por el efecto hormonal. El consumo de fruta, verdura y fibra tendrían un papel protector. La soja y los fitoestrógenos podrían ser factor protector, sin embargo algunos estudios experimentales muestran un efecto proliferativo sobre los tumores hormonosensibles. Actualmente existen datos contradictorios.(11).

## **3.-DIAGNÓSTICO Y ESTADIFICACIÓN.**

### **3.1.Diagnóstico.**

#### **3.1.1. Detección clínica:**

Inspección y palpación:

- Cambios cutáneos: Edema, eritema, piel de naranja y/o inflamación.
- Cambios morfología mamaria y su convexidad normal.
- Cambios pezón: Retracción, aplanamiento o inversión, desviación de su orientación normal, eritema o pérdida de elasticidad o persistencia de lesión eczematososa (pueden indicar Enfermedad de Paget).
- Lesiones malignas: nódulos únicos, irregulares o estrellados, consistencia dura, fijos a piel o tejidos adyacentes, generalmente no dolorosos.

#### **3.1.2. Diagnóstico radiológico**

Mamografía:

Es el método más importante en el diagnóstico precoz del cáncer de mama. Visualiza el 90% de los cánceres de mama. La mamografía de cribado ha demostrado reducir la mortalidad por cáncer de mama en diferentes estudios, entre un 15 a 20%, en mujeres de 40 a 74 años. (12).

El American College of Radiology (ACR), propone una categorización diagnóstica (Breast Imaging and Reporting and Data Base System -BI-RADS-), donde se resumen los hallazgos mamográficos y realiza una recomendación de manejo. Dichas categorías van de la 0 a la 6. A las pacientes con imágenes BI-RADS 4 y 5 se les debe realizar biopsia debido a su alto valor predictivo positivo. Las lesiones de categoría BI-RADS 3 (lesiones probablemente benignas con una probabilidad de malignidad menor de un 2 %), se recomienda un seguimiento con intervalo más corto.

Los signos mamográficos de malignidad incluyen: presencia de microcalcificaciones agrupadas anárquicamente o irregulares, bordes



irregulares o espiculados, asimetría del tejido glandular con densidades heterogéneas, y alteración arquitectural.

### **Indicaciones de mamografía:**

-Mujeres sintomáticas, incluso embarazadas, con sospecha clínica de cáncer de mama.

-Mujeres asintomáticas de Programas de Cribado para cáncer de mama, ha demostrado en algunos estudios la disminución de la mortalidad por cáncer de mama. Indicaciones:

- Anual o bianual entre 40-50 años de edad.
- Bianual entre 50-70 años.
- En >70 años no existe beneficio probado.
- Las mujeres con lesiones clasificadas como probablemente benignas.
- Mujeres con riesgo aumentado para cáncer.
- Anual en pacientes con AF de primer grado, y comienzo del screening adelantado unos 10 años.

### **Ecografía mamaria:**

No es adecuada la ecografía mamaria como técnica de screening. Empleo limitado a la identificación de lesiones quísticas, evaluación de mamas densas en mujeres jóvenes, visualización de nódulos axilares y para biopsia y marcaje previo tratamiento.

### **RMN:**

Es una técnica de imagen con mayor sensibilidad y menor especificidad que la mamografía. Indicada en tumores T0/N+, en mamas densas.

La RMN estaría indicada en programas de cribado: en aquellas mujeres con riesgo acumulativo de cáncer de mama mayor del 20%, como es el caso de mutaciones BRCA.

## **Galactografía:**

Detecta masas intraductales. Está indicada en procesos de secreción por uno o varios orificios.

### **3.1.3. Otros procedimientos para el estudio de extensión:**

-Analítica: hemograma, función hepática y renal.

-Marcadores tumorales: CEA, CA 15-3.

-Rx tórax.

-TAC tórax, en estadios III y IV, o cuando hay sintomatología respiratoria.

-Rastreo serie ósea (RCT con Gammagrafía ósea).

-Ecografía hepática, o TAC abdominal. Indicado en estadios III y IV o cuando hay alteración de la función hepática o sintomatología abdominal.

-PET o PET-TAC. Actualmente no hay establecida ninguna indicación para el diagnóstico del cáncer de mama.

## **3.2. Diagnóstico anatomopatológico:**

Para el diagnóstico anatomopatológico de lesiones sospechosas de cáncer de mama se realizan diferentes procedimientos: la punción aspiración con aguja fina (PAAF), la biopsia con aguja gruesa (BAG) con la obtención transcutánea de varios cilindros de tejido tumoral sobre los que se realizarán las diferentes técnicas de inmunohistoquímicas para evaluar el estado de los receptores de estradiol y progesterona o la valoración de proteínas tumor-supresoras. En algunas ocasiones es necesario realizar la biopsia escisional.

## **Biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC):**

Se define como ganglio centinela el primer ganglio que recibe el drenaje linfático de un tumor primario. Permite estadificar diversos tumores y proporciona un valor pronóstico al diagnóstico de cáncer de mama.

Para saber dónde se encuentra el ganglio centinela en el acto operatorio existen varios métodos como el marcaje con isótopos y los colorantes. El marcaje con isótopos radiactivos permite la identificación del ganglio centinela a las 2-3 horas de su inyección con una gammagrafía de control. Habitualmente se utilizan partículas marcadas con tecnecio 99 y gracias a la ayuda de una sonda radioguiada se localiza el ganglio en el mismo acto quirúrgico. Con una mínima incisión a nivel axilar es suficiente para extirpar esta adenopatía y someterla a estudio anatomopatológico intraoperatorio que nos dirá si hay afectación metastásica.

### **3.3 Clasificación histopatológica.**

La mayoría de los cánceres de mama son carcinomas de las células epiteliales procedentes de los ductos mamarios y de los lobulillos. Menos frecuentes son los carcinomas procedentes del estroma que rodea a las glándulas mamarias. En este grupo podemos incluir al Tumor Filodes Benigno, al Cistosarcoma Filodes y a los Angiosarcomas.

Podemos diferenciar dos tipos histológicos de cáncer según la existencia de invasión tumoral o no. La clasificación histopatológica más implantada actualmente es la establecida por la Organización Mundial de la Salud (13).

#### **3.3.1. Carcinoma ductal in situ**

Los carcinoma ductal in situ (DCIS) son tumores no invasivos, donde las células malignas están confinadas en la membrana basal del ducto sin atravesarla. Se consideran lesiones precursoras, y la presentación del cáncer de mama después del tratamiento del CDIS depende de las características de la lesión y también del tratamiento que se le administre. Algunos estudios

indican que la mayoría de las lesiones de CDIS no se convertirán en cáncer invasivo y que aquellas que lo hagan, se logran manejar incluso después de esta transición. De este modo, la detección y el tratamiento del CDIS impalpable da lugar a menudo a sobrediagnóstico y sobretratamiento.

### **3.3.2. Carcinoma lobulillar in situ**

En los carcinomas lobulillares in situ (LCIS), las células acinares se encuentran en la unidad terminal lobulillar, presentando una proliferación homogénea, caracterizadas por un núcleo redondeado y citoplasma escaso con membrana basal íntegra. Es más frecuente en mujeres de 40-50 años. Es una enfermedad característicamente multifocal (50 %) y se relaciona con la bilateralidad (14).

### **3.3.3 Carcinoma ductal infiltrante**

Tumor invasivos más frecuente, entre el 70 -80%. Con más del 50 % de la masa tumoral debe tener un patrón de crecimiento no específico. Sus células malignas infiltran el estroma en forma de cordones celulares. Hasta en un 80 % de los casos puede encontrarse componente de carcinoma in situ, habitualmente de alto grado. Dentro de este tipo tumoral se reconocen algunos subtipos particulares, como el carcinoma tipo mixto.

### **3.3.4. Carcinoma lobulillar infiltrante**

Representa entre el 5 % y el 15 % de los carcinomas invasivos. Presenta un crecimiento circunferencial. Existen variantes tipo alveolar, tipo sólido, y otras con rasgos pleomórficos, células en anillo de sello, histiocitoides o apocrinos. Entre los subtipos mixtos, el más importante es el carcinoma túbulo-lobulillar.

En su presentación es frecuente la multicentricidad y bilateralidad.

### **3.3.5. Carcinoma tubular**

Su diagnóstico ha aumentado con los cribados mamográficos (10- 20% frente a un 2%). Es un tipo especial caracterizado por un patrón de crecimiento en estructuras tubulares bien diferenciadas. Suele asociar buen pronóstico.

### **3.3.6. Carcinoma cribiforme**

Presenta una frecuencia baja (0,8-3,5 %). Todos expresan receptores hormonales, y suelen ser de bajo grado de diferenciación histológica.

### **3.3.7. Carcinoma medular**

Representa entre el 1 y el 10% de los tumores invasivos. Considerado como de buen pronóstico, a pesar de ser un tumor de alto grado citológico.

Este tipo, triple negativo, conlleva un mejor pronóstico que los tumores triple negativos de fenotipo basal.

### **3.3.8. Carcinomas mucinosos**

Carcinoma mucinoso o coloide, supone el 1-2 % de los casos y se da en mujeres de mayor edad.

### **3.3.9. Carcinomas metaplásico.**

Tiene mayor agresividad. Un 80% son triples negativos (HR para recaídas: 3,89 y 3,99 y para mortalidad 5.39 y 5,29, y también hay presencia de otros carcinomas ductales o los carcinomas triple negativos.

### **3.3.10. Carcinoma papilar**

Son un 1% de los casos. Mayor riesgo de afectación linfática y axilar.

### **3.3.11. Carcinoma adenoide quístico**

Tumor idéntico al de las glándulas salivares. Presenta buen pronóstico.

### **3.3.12. Carcinoma inflamatorio**

Subtipos especiales de tumor dentro de los tumores invasivos, pero con un comportamiento clínico diferente, más agresivos, caracterizados por frecuente afectación precoz de ganglios linfáticos, edema y eritema dérmico, junto con piel de naranja.

En cuanto a la Enfermedad de Paget: Son cambios en el pezón como lesión eczematosa persistente, en estos casos suele haber carcinoma intraductal difuso debajo de la areola con un posible componente invasivo. (15)

### **3.4. Estadificación:**

#### **3.4.1 Clasificación TNM y estadiaje según AJCC:**

La séptima edición del sistema TNM, que se utiliza en la actualidad, aúna la estadificación de la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) y la del Comité Americano de Cáncer (AJCC). La octava edición se estima que se publicará en el 2016.

El sistema TNM está basado en la extensión del tumor (T), el grado de diseminación a los ganglios linfáticos (N), y la presencia de metástasis (M).

Existe una clasificación clínica (cTNM), obtenida por la exploración clínica o radiológica, y una clasificación patológica (pTNM) que resulta de los datos de anatomía patológica.

TNM. 7 ° Edición. 2009 (15).

- T1(m): cáncer multicéntrico
- T1mic: microinvasión
- pN1mi: micrometástasis

##### **3.4.1.1. Clasificación del T**

###### **Clasificación clínica :**

-Tx Imposibilidad de determinar el tamaño del tumor primario.

-T0 Tumor primario no evidente

-Tis:

-Tis (CDIS)Carcinoma ductal in situ o carcinoma intraductal

-Tis (CLIS) Carcinoma lobulillar in situ

-Tis (Paget) Enfermedad de Paget sin tumor asociado. Si hay tumor asociado debe clasificarse acorde al tamaño del tumor

-T1 Tumor de 2 cm o menos en su diámetro mayor

-T1mic: Microinvasión 0.1 cm o menos en su diámetro mayor

-T1a: Más de 0. 1 cm pero no más de 0.5 cm en su diámetro mayor

-T1b: > 0.5 a =< 1 cm

-T1c: > 1 a =< 2 cm

-T2: Tumor > 2 cm a =< 5 cm en su diámetro mayor

-**T3**: Tumor > 5 cm en su diámetro mayor

-**T4**: Tumor de cualquier medida con extensión a pared torácica o piel. La pared torácica incluye costillas, músculos intercostales y serrato anterior. No incluye músculo pectoral

-T4a: Extensión a pared torácica

-T4b: Edema (incluye piel de naranja) o ulceración de la piel de la mama, o nódulos dérmicos satélites confinados a la misma mama

-T4c: Ambos

-T4d: Carcinoma inflamatorio

### **Clasificación patológica .**

Las categorías pT, se corresponden con las categorías cT:

#### **3.4.1.2. Clasificación del N**

##### **Clasificación anatómica:**

###### **1- Axilares:**

-**Nivel I (base)**: ganglios hasta el borde externo del músculo pectoral menor.

Incluye los ganglios intramamarios

-**Nivel II (intermedios)**: ganglios entre los bordes interno y externo del músculo pectoral menor. Incluye los ganglios interpectores: Rotter

-**Nivel III (vértice)**: ganglios por dentro del borde interno del pectoral menor

###### **2- Infraclavicular o subclavicular**

**3- Mamarios internos**: ganglios en los espacios intercostales a lo largo del borde del esternón

###### **4- Supraclavicular homolateral**

-Los ganglios cervicales y mamarios internos contralaterales son considerados metástasis a distancia (M1)

##### **Clasificación clínica:**

-**Nx**: Ganglios regionales no determinados (ej. removidos previamente).

-**N0**: Ausencia de ganglios metastásicos.

-**N1**: Metástasis en ganglios axilares homolaterales móviles.

**-N2:**

-N2a: Metástasis en ganglios axilares homolaterales (fijos entre sí o a otras estructuras).

-N2b: Metástasis en ganglios mamarios internos clínicamente evidentes sin metástasis axilares clínicamente evidentes.

**-N3:**

-N3a: Metástasis en ganglios subclaviculares.

-N3b: Metástasis en ganglios de la cadena mamaria interna y axila, ambos homolaterales y clínicamente evidentes.

-N3c : Metástasis en ganglios supraclaviculares homolaterales.

*-CLINICAMENTE EVIDENTES: ganglios detectados por examen clínico o por imágenes (TAC y ecografía ) excluida la linfografía radioisotópica*



## **Clasificación patológica del N: pN**

### **Clasificación del ganglio centinela**

Si no hay vaciamiento axilar asociado por tratarse de un ganglio centinela negativo deben emplearse las siguientes siglas:

**-pNX (sn):** Ganglio centinela no determinado.

**-pN0 (sn):** Ganglio centinela sin metástasis.

**-pN1 (sn):** Ganglio centinela con metástasis.

**-pNx.** Los ganglios regionales no pueden evaluarse.

**-pN0:** Ganglios axilares sin metástasis

-pN0 (i-): Sin evidencia histológica de metástasis, inmunohistoquímica negativa.

-pN0 (i+): Sin evidencia histológica de metástasis, inmunohistoquímica positiva > 0,2 mm.

-pN0 (mol-): Sin evidencia histológica de metástasis, hallazgos moleculares negativos.

-pN0 (mol+): Sin evidencia histológica de metástasis, hallazgos moleculares positivos.

**-pN1**

-pN1m: Micrometástasis (ninguna mayor 0.2 cm)

-pN1a: Metástasis en 1-3 ganglios axilares incluyendo al menos uno mayor de 2 mm.

-pN1b: Metástasis en ganglios mamarios internos (microscópicas, no clínicamente evidentes) detectadas por ganglio centinela.

-pN1c: Metástasis en 1-3 ganglios axilares e idem pN1b.

**-pN2:**

-pN2a: Metástasis en 4-9 ganglios axilares, incluyendo al menos, uno mayor de 2mm.

-pN2b: Metástasis en ganglios cadena mamaria interna en ausencia de metástasis axilares.

**-pN3:**

-pN3a: Metástasis en 10 ó mas ganglios axilares o en ganglios subclaviculares.

-pN3b: Metástasis clínicamente aparente en la cadena mamaria en presencia de 1 o más ganglios axilares positivo, o más de 3 ganglios axilares y ganglios en la mamaria interna con enfermedad microscópica detectada por ganglio centinela, sin ser clínicamente aparente.

-pN3c: Metástasis en ganglios supraclaviculares ipsilaterales.

**3.4.1.3. Clasificación del M**

**-Mx:** No puede determinarse metástasis a distancia.

**-M0:** Sin metástasis a distancia.

**-M1:** Metástasis a distancia.

**3.4.1.4. Clasificación del TNM**

Estadio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1 <sup>b</sup>	N0	M0
IB	T0	N1mi	M0
	T1 <sup>b</sup>	N1mi	M0
IIA	T0	N1 <sup>c</sup>	M0
	T1 <sup>b</sup>	N1 <sup>c</sup>	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
	T3	N2	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1 <sup>b</sup>	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

<sup>a</sup>Reproducido con permiso del AJCC: *Breast. En: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al., eds.:*

## **4. FACTORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS:**

### **4.1. Factores pronósticos:**

Los factores pronósticos son aquellos que influyen y marcan la evolución del tumor.

Existen factores de riesgo validados y con una implantación asentada, que permiten estimar el riesgo de recidiva y mortalidad. Hay que diferenciarlos de aquellos que están pendientes de aceptación.

La afectación ganglionar continúa siendo el factor pronóstico de mayor peso en la actualidad. El número de ganglios afectos también influye. En ausencia de tratamiento adyuvante se ha visto un mayor riesgo de recaída con un 30% a 10 años si no hay positividad y más del 70% cuando hay más de 10 ganglios afectados. La afectación ganglionar axilar está directamente relacionada con el tamaño tumoral, y ambos con la probabilidad de recidiva y supervivencia.

De todas las teorías sobre la historia natural del cáncer de mama temprano, parece que lo más probable es que no siga un único patrón de comportamiento, estando éste determinado por elementos intrínsecos al propio tumor y a la paciente.(16).

#### **Tamaño tumoral**

El diámetro del tumor constituye uno de los factores pronósticos más relevantes. Se ha relacionado con la afectación ganglionar metastásica y con la tasa de supervivencia.

#### **Grado histológico**

Presenta correlación con el pronóstico. El que peor pronóstico entraña es el grado 3 (17).

#### **Tipo histológico**

El carcinoma ductal in situ tiene peor pronóstico que el lobulillar in situ. Los tipos mucinosos, cribiformes y tubulares tienen mejor pronóstico que los

ductales. Los tumores medulares, a pesar de rasgos patológicos desfavorables, son atribuibles a segundos tumores de peor pronóstico.

### **Invasión vascular y linfática**

Es factor pronóstico adverso en las pacientes con ganglios negativos, pero se desconoce su importancia en las que tienen afectación ganglionar.

### **Receptores hormonales**

La presencia de receptores hormonales positivos, receptor de estrógeno (RE) y de progesterona (RP) se asocia a un mejor pronóstico.

### **Oncogenes Her2**

Amplificado entre el 15-30% de los casos. El oncogén Erb-2 neu codifica la síntesis de un receptor transmembrana que tiene actividad tirosinquinasa y estimula la proliferación celular de las células que lo expresan. Se ha asociado con un peor pronóstico, con una peor supervivencia libre de enfermedad y con una peor supervivencia específica a 10 años. Sin embargo las pacientes con Her2+ que reciben trastuzumab tienen mejor pronóstico que las mujeres Her2- (HR. 0,56; IC 95% 0,45-0,96), al menos en los dos primeros años de seguimiento, siendo un factor predictivo de respuesta.

### **Fracción de proliferación alta, Ki 67**

Ki67 es una proteína codificada por el gen MKI67, asociada con la actividad del ciclo celular y que muestra una buena correlación con la fracción de crecimiento. Ki67 es un marcador de la proliferación celular que ha demostrado poseer valor pronóstico y predictivo en cáncer de mama.

Su determinación mediante MIB-1 se asocia a un mayor riesgo de recaída (HR: 1,93; IC 95%. 1,35-1,87) y mortalidad (HT: 1,95 1,7- 2,24).

El índice de Ki67 hace referencia al porcentaje de células que se tiñen positivamente mediante técnicas de Inmunohistoquímica (IHQ). Es importante tener en cuenta que existen variaciones en la expresión de Ki67 a lo largo del ciclo celular. Un índice de Ki67  $< 14$  ó  $\geq 14$  es lo que va a definir que un tumor RE-positivo Her2-negativo y que se clasifique como Luminal A o Luminal B

respectivamente, con las implicaciones pronósticas y terapéuticas que ello conlleva (18)

### **Multicentricidad**

El pronóstico vendrá determinado por el diámetro del conjunto de los nódulos y no por el del máximo nódulo.

### **Edad**

La presentación por debajo de los 30 años, es un factor de mal pronóstico.

4.2. Otros factores pronósticos reconocidos sin una completa implantación:

### **Infiltración perineural, e infiltrado inflamatorio tumoral:**

La invasión perineural se asocia con frecuencia a la invasión de vasos linfáticos, pero no ha sido demostrado que se comporte como un factor pronóstico independiente (19) y lo mismo ha ocurrido con la inflamación intratumoral.

### **Marcadores de proliferación:**

Índice de proliferación celular: Si un tumor tiene un índice de proliferación alto, será más agresivo. Para ello se usa el índice mitótico, que ha demostrado una elevada correlación pronóstica. La determinación inmunohistoquímica de una alta expresión de MIB-1 o del % de Ki67, se correlacionan con mal pronóstico, mayor riesgo de recaída y de mortalidad, asociándose a tumores de alto grado histológico, afectación ganglionar o ausencia de receptores hormonales. Sin embargo, no ha sido validado en series amplias y prospectivas como factor pronóstico o predictivo de la respuesta a la quimioterapia.

## **TP53:**

La mutación del gen supresor TP53 se observa entre el 20%-30% de los carcinomas de mama, y se asocia a un pronóstico adverso, y en algunos estudios a resistencia al tratamiento quimioterápico.

## **Perfiles genómicos:**

Diversos investigadores han demostrado la heterogeneidad del cáncer de mama utilizando microarrays de cADN y clasificándolo en varios subtipos intrínsecos con distintos patrones de expresión y diferente pronóstico (20). Se han definido cuatro grupos principales:

### **-Subtipos luminales luminal A y luminal B:**

El subtipo luminal es el más frecuente. Mayor en mujeres posmenopáusicas y caucásicas. Corresponden a los tumores RE+ con un patrón de expresión propio del epitelio luminal de la mama, con expresión de citoqueratinas 8/18, RE y genes relacionados con la activación del RE como LIV1 y CCDN1. Menos del 20% tienen mutaciones de p53 y la mayoría son de bajo grado histológico. El subtipo luminal A tiene una mayor expresión de genes relacionados con RE y una menor expresión de genes de proliferación, al contrario que el subtipo luminal B.

El subtipo luminal se asocia a una mejor respuesta al tratamiento hormonal que a la quimioterapia. Sin embargo, el subtipo luminal B tiene un peor pronóstico que el luminal A. (21)

### **-Subtipo HER-2:**

Estos tumores no expresan RE. Expresan otros genes de ampliación de Her-2, como el gen GRB7110. Entre el 40-80% presentan mutaciones en p53, y es más probable que sean de alto grado. Presentan afectación ganglionar con una frecuencia dos veces mayor que los tumores luminales A. Por otra parte, son más sensibles que el subtipo luminal a la quimioterapia neoadyuvante con antraciclinas y taxanos, y son también sensibles a fármacos que bloquean la vía de Her -2 como trastuzumab y lapatinib.

### **-Subtipo basal:**

El patrón de expresión de este subtipo se parece al epitelio basal que hay en muchas partes del organismo, y concretamente a las células mioepiteliales de los ductos mamarios. No expresan RE, RP o Her -2, pero sí expresan citoqueratinas basales como las 5, 6 y 17 y genes de proliferación. La mayoría de ellos tienen mutaciones en p53 y son de alto grado histológico. Por inmunohistoquímica se define como un tumor RE-, RP-, Her -2- y CK5/6+ o EGFR+. Clínicamente, la mayoría de las mujeres portadoras de la mutación BRCA1 tienen tumores que pertenecen a este subtipo, siendo más frecuente en mujeres premenopáusicas afroamericanas.(22)

Los resultados posteriores demostraron que la supervivencia global y libre de enfermedad se correlacionaba perfectamente con esta categorización, siendo el pronóstico mejor en los luminales, que en los Her2, y por último en los triples negativos.(23)

Existen varias firmas genéticas, realizadas con microarrays, que clasifican el cáncer de mama según perfiles de expresión génica, con una concordancia elevada entre ellas. Algunos de estos test genéticos disponibles actualmente que proporciona información pronóstica del tumor son Oncotype DX, Mamaprint, y PAM 50. El Oncotype DX, también proporciona información predictiva de respuesta a la QT. Es decir, probablemente el perfil genético de los carcinomas mamarios condicionará el futuro del pronóstico (24,25)

### **Angiogénesis:**

Se ha relacionado una mayor densidad vascular con un peor pronóstico en el cáncer de mama, pero hay resultados contradictorios, siendo una variable pendiente de ser validada. Sin embargo, varios estudios demuestran un peor pronóstico si se demuestra con técnicas de inmuno-histoquímica una alta expresión de diferentes polipéptidos que actúan como factores de crecimiento de células endoteliales de la familia del factor del endotelio vascular (VEGF).

## **Micrometástasis en médula ósea:**

Su presencia se ha relacionado como factor de riesgo independiente en pacientes tanto en tratamiento adyuvante, como en las de bajo riesgo N0.

## **Células circulantes de cáncer de mama.**

Las células tumorales circulantes (CTCs), son aquellas células tumorales que se han desprendido del tumor primario y circulan por el torrente sanguíneo. Estas células tienen potencial maligno, ya que han demostrado la capacidad de formación de metástasis. En enfermedad precoz y metastásica, la presencia y el nivel de CTCs en sangre periférica, parece ser un factor de peor pronóstico, relacionado con una peor supervivencia, como se explica en apartados posteriores. (Este punto se encuentra ampliado más adelante)

### **4.3. Factores predictivos:**

#### **Estado hormonal:**

Los RE y RP han sido reconocidos como factores predictivos al tratamiento endocrino, aunque en algunos estudios, el estado del RP es más controvertido (26).

Los RE se activan con la unión a la hormona 17  $\beta$ -estradiol. Existen dos tipos de receptores: los RE- $\alpha$  y los RE- $\beta$ , que están codificados respectivamente por el gen ESR1 y ESR2. Los más importantes en mama son los RE- $\alpha$  que tras unirse con su ligando (estrógenos), son transportados al núcleo, donde funcionan como un factor de transcripción y regulan la expresión de una serie de genes importantes en la biología del cáncer de mama.

La expresión de los RP está regulada por los RE y se expresa en la gran mayoría de los carcinomas RE+. En cambio los RP están inhibidos por HER2 y aproximadamente el 25% de tumores RP- muestran amplificación de HER2. El 70-80% de los cánceres de mama son positivos para los RE:



- RE+ / RP+ (~ 65%): corresponden normalmente a carcinomas bien o moderadamente diferenciados.
- RE+ / RP- (~ 15%): habitualmente carcinomas moderada o pobremente diferenciados.
- RE- / RP+ (~5%): encontrado con más frecuencia en mujeres jóvenes en estadios avanzados. Su base biológica no está bien explicada.
- RE- / RP- (~15%): normalmente en carcinomas pobremente diferenciados. Más frecuente en mujeres jóvenes, afroamericanas y latinas. Aproximadamente 1/3 muestran amplificación de HER2.

La prueba standard para la determinación de los receptores hormonales es el análisis por técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) realizadas en tejido fijado en formol al 10% e incluido en parafina; sin embargo la variación de los resultados interlaboratorios es sustancial. (27)

## **Her2**

El gen Her2 forma parte de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y se encuentra amplificado en el 18-20% de los carcinomas de mama. La sobreexpresión de HER2 se debe principalmente a la amplificación del gen HER2 en el brazo largo del cromosoma 17. Se encarga de la síntesis de una proteína con actividad tirosinquinasa que se sobreexpresa en este grupo de tumores, habiéndose relacionado con la regulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Se ha demostrado tanto su valor pronóstico como predictivo de respuesta desfavorable a los tratamientos endocrinos en general y algunos quimioterápicos en particular (salvo a antraciclinas).

Su amplificación génica demostrado por FISH y, en menor medida la sobreexpresión demostrada por IHQ, predicen la respuesta a los tratamientos anti-Her2 tanto en cáncer metastático, como en adyuvancia y neoadyuvancia (28).

Debido al impacto clínico de la determinación de los RE, RP y HER2 y a la discordancia descrita entre los laboratorios, la ASCO (American Society of Clinical Oncology) y el CAP (College of American Pathologists) elaboraron una guía con las recomendaciones para la realización y el informe de estas determinaciones (29, 30).

## **5. TRATAMIENTO NEOADYUVANTE EN CANCER DE MAMA**

### **5.1 Beneficios e indicaciones del tratamiento neoadyuvante:**

Desde principios de la década de los 80, ha aumentado el interés de administrar quimioterapia antes de la cirugía (conocida como quimioterapia preoperatoria o neoadyuvante) en base a los buenos resultados logrados en las pacientes con enfermedad localmente avanzada. Tras los resultados arrojados por una serie de ensayos aleatorizados y un metaanálisis con 4000 pacientes, se demostró que esta secuencia terapéutica obtenía los mismos resultados en cuanto a supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad (SLE) comparada con la administración de quimioterapia posterior a la cirugía (31,32,33).

El fundamento para la administración de la quimioterapia preoperatoria es que una introducción temprana del tratamiento sistémico dará lugar a una acción temprana sobre la enfermedad micrometastásica a la vez que disminuirá el tamaño tumoral permitiendo un mayor número de cirugías conservadoras de la mama. Otra ventaja potencial del uso de quimioterapia aplicada antes de la cirugía incluye la determinación de la sensibilidad del tumor al tratamiento sistémico. Además, la respuesta tumoral a la quimioterapia preoperatoria puede servir de herramienta pronóstica útil.

La argumentación contraria a la quimioterapia preoperatoria es el retraso potencial durante varias semanas o meses del tratamiento local apropiado para las pacientes con tumores resistentes a la quimioterapia preoperatoria.

Actualmente las indicaciones para la administración de QT neoadyuvante, en la práctica clínica habitual, son:

Tumores localmente avanzados, inoperables al diagnóstico: Afectación cutánea o de la pared torácica (T4), o con afectación de adenopatías axilares fijas (n2)

#### **Carcinomas inflamatorios de mama.**

Cáncer de mama precoz con criterios de cirugía conservadora pero mala relación tamaño del tumor/ mama: Cáncer de mama Estadio IIa T2 > 3 cm y IIB y Cáncer de mama Estadíos III, que reúnen criterios de administración de QT adyuvante (34).

### **5.2. Poliquimioterapia en cáncer de mama. Esquemas basados en antraciclinas y taxanos.**

Sobre cuál es el esquema de quimioterapia óptimo en cáncer de mama localizado, se ha visto que la combinación de varios agentes quimioterápicos administrados postoperatoriamente es superior a la administración de un solo agente (35,36,37).

Algunos de los datos más importantes sobre el beneficio de la poliquimioterapia vinieron del Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), que se reúne cada cinco años para revisar los datos de los ensayos globales sobre el cáncer. El análisis general del año 2000 (publicado en 2005) resumió los resultados de varios ensayos aleatorizados sobre quimioterapia en la adyuvancia, iniciados en 1995. Los análisis comprendían 28.764 mujeres participantes en 60 ensayos de quimioterapia de combinación (poliquimioterapia) versus no quimioterapia. En todas las mujeres la poliquimioterapia redujo el riesgo anual de recaída de la enfermedad y morbilidad por cáncer de mama, que se traduce en una mejoría absoluta en la supervivencia a 15 años. El grupo de mujeres menores de 50 años fueron las que más beneficios obtuvieron, reduciendo el riesgo anual de recaída y morbilidad por la enfermedad en un 37% y 30%, respectivamente. Esto se

trajo en una mejoría absoluta de manera significativa, del 10% en la supervivencia 15 años (CRI = 42% vs. 32%) (38).

En neoaduvancia, a lo largo de los años numerosos estudios han explorado diversos regímenes de quimioterapia, para optimizar los resultados de los previos, y sirviendo como apoyo para asentar las bases a esta estrategia (39,40).

### **Esquemas con antraciclinas:**

Los esquemas de tratamiento con antraciclinas han demostrado superioridad sobre los regímenes con ciclofosfamida, metotrexato y fluorouracilo (CMF) (41,34). En el metaanálisis del Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) se analizaron 11 ensayos que comenzaron entre 1976 y 1989 con 14.000 mujeres y en los cuales fueron asignadas al azar para recibir tratamiento con base en antraciclinas, doxorubicina (A) o epirubicina, versus CMF. Aproximadamente el 64% de las cuales tenían menos de 50 años. En comparación con CMF, los regímenes de antraciclinas estuvieron relacionados con una reducción proporcional del 11% en el riesgo anual de recidiva local, y una reducción en el riesgo anual de morbilidad del 16%, algo modesto, pero estadísticamente importante. En cada caso, la diferencia absoluta en los resultados entre los tipos de quimioterapia con base en las antraciclinas y los CMF fue de aproximadamente 3% a cinco años y 4% a 10 años.(36).

En neoaduvancia, un estudio fase III, del grupo de Kuerer et al, evidenció un aumento de las respuestas completas patológicas, al incluir un esquema con antraciclinas, AC por 4 ciclos. El estudio se realizó con 372 pacientes y tuvo un seguimiento de 58 meses (42).

## Esquemas con taxanos

Aunque el esquema con antraciclinas FAC (5-Fluorouracilo, doxorubicina, ciclofosfamida), ha sido considerado el estándar en adyuvancia durante muchos años (34,36) posteriormente se desarrollaron numerosos estudios que reconocieron una mayor eficacia al añadir taxanos a los esquemas de poliquimioterapia, tanto en adyuvancia como posteriormente en neoadyuvancia.

Así se demostró en el estudio fase III, del Breast Cancer International Research Group (BCIRG) 001/TAX 316, donde la combinación de docetaxel, doxorubicina, y ciclofosfamida (TAC) adyuvante fue superior al esquema con 5-Fluorouracilo, doxorubicina, ciclofosfamida (FAC), en cáncer de mama operable con ganglios positivos, reduciendo el riesgo de recurrencia en un 28%, y de muerte en un 30%. Similares beneficios se obtuvieron en el estudio fase II, multicéntrico aleatorizado, presentado por el Grupo Español De Investigación De Cáncer De Mama (GEICAM) en ASCO del año 2008, que comparaba TAC vs FAC en adyuvancia en pacientes con cáncer de mama, ganglios negativos de alto riesgo, concluyendo que TAC era superior a FAC reduciendo en un 33% el riesgo de recaída en 5 años, de forma significativa.(43).

En el escenario de la neoadyuvancia se demostró el beneficio de los taxanos, tanto docetaxel como paclitaxel semanal, en enfermedad locoregional en varios estudios. Uno de los más representativos fue el Estudio NSABP B27, que se trata de un ensayo fase III aleatorizado con 2411 pacientes con cáncer de mama localizado, T1-T3, N0-N1, randomizadas a tres brazos de tratamiento: 4 ciclos de AC (adriamicina, ciclofosfamida) cada tres semanas seguido de cirugía; 4 ciclos de AC seguido de 4 ciclos de docetaxel cada tres semanas y posteriormente cirugía; y 4 ciclos de AC seguido de cirugía y después 4 ciclos de docetaxel. El brazo que incluía docetaxel, obtuvo una mayor supervivencia libre de enfermedad (SLE) y la supervivencia global (SG) (objetivos primarios), y prácticamente duplicó la tasa de RCp en la mama y axila (objetivo secundario), frente a las obtenidas con el brazo sin taxano, esquema AC (21,8 % vs. 11,5 %;  $p < .001$ ) (40).

Un estudio publicado por el grupo de Aberdeen<sup>31</sup> explora el beneficio de un régimen secuencial. En este estudio se incluyó a 162 pacientes con cáncer de mama que obtuvieron respuesta clínica tras 4 ciclos de un esquema neoadyuvante con antraciclinas. Posteriormente se aleatorizaban a recibir otros 4 ciclos adicionales del mismo régimen o 4 ciclos de docetaxel. La tasa de respuestas clínicas y patológicas fue superior en el grupo de docetaxel (44). En otro estudio Fase III, se comprobó lo ya observado en enfermedad metastásica, y es que el esquema de paclitaxel semanal ofrece mejores resultados que la pauta trisemanal del mismo. Green y cols, de MD Anderson Cancer Center, en un estudio fase III, con 258 pacientes con cáncer de mama localizado, T1-T3, N0-N1, M0, comparaban ambas pautas seguidas de FAC (5-Fluorouracilo, doxorubicina, ciclofosfamida). Se obtuvieron diferencias significativas, con una mayor tasa de RCp, con la pauta semanal 28,2 %, frente a la trisemanal, 15,7 % de RCp ( $p=0.02$ ). (45)

### **5.3. Numero de ciclos, en neoadyuvancia:**

El número de ciclos de tratamiento neoadyuvante (4,6 u 8), aun no está definido, existiendo algunos estudios que tratan dicho tema. El estudio fase III randomizado del GeparTrio, que comparó el esquema de TAC en 6 ciclos vs 8 ciclos, llegó a la conclusión que los pacientes que recibieron 8 ciclos, obtenían mayores tasas de respuestas clínicas de forma estadísticamente significativas, pero a costa de mayor toxicidad, aunque no más tasas de respuestas completas patológicas que con 6 ciclos (46)

### **Forma de administración:**

#### **-Docetaxel: Secuencial vs concurrente.**

La forma de administrar la QT, de manera secuencial o concurrente, lo cuestiona un estudio aleatorizado del Grupo Internacional de Mama. Concluyen con resultados en el borde de la significación, que existe un aumento del periodo libre de enfermedad al incorporar Docetaxel al esquema de Antraciclinas en adyuvancia en mujeres con ganglios positivos, siendo de

forma significativa el aumento de dicho periodo al administrar Docetaxel de forma secuencial comparado con la administración concurrente (47).

### **-Antraciclinas seguidas de taxanos o a la inversa.**

La mayoría de estudios adyuvantes y neoadyuvantes han incorporado los taxanos tras las antraciclinas basándose en el orden cronológico de la aparición e incorporación de estas drogas a los esquemas de quimioterapia en el cáncer de mama. En un artículo recientemente publicado, revisan los estudios clínicos que han invertido el orden, tanto en la adyuvancia como en la neoadyuvancia. Describen los resultados de 7 estudios en el escenario adyuvante: cinco fases II randomizados, un estudio fase II retrospectivo y uno *on going*. Y en la neoadyuvancia analizan ocho, de ellos cinco estudios son randomizados, dos estudios retrospectivos y uno en desarrollo. Concluyen que no hay diferencias, ni en eficacia ni en toxicidad cuando se administró primero el taxano. El perfil de efectos secundarios en cada estudio dependía del tipo de agente usado, más que de la secuencia. (48)

Sería necesario el diseño de un estudio fase III, planificado para probar el beneficio de la secuencia inversa de taxanos y antraciclinas, que provea de más información en la neoadyuvancia y adyuvancia.

### **-Quimioterapia administrada en densidad de dosis.**

La QT a dosis densas consiste en la administración de fármacos en un intervalo de tiempo inferior al estándar. Esto se puede realizar de dos formas: disminuyendo la dosis del fármaco y el intervalo de administración entre cada ciclo, como los esquemas con paclitaxel semanal, o acortando el intervalo entre los ciclos administrando el fármaco a la misma dosis. p. ej. acortando de 3 a 2 semanas el intervalo con la ayuda de los mismos. En este último caso se utilizan factores de crecimiento hematopoyéticos.

Hasta la fecha se han realizado estudios con esquemas en dosis densas en varios tipos tumorales, siendo en los pacientes con cáncer de mama con

ganglios positivos que reciben QT adyuvante y en pacientes con linfoma difuso B de células grandes en los que se ha demostrado un impacto positivo en la supervivencia con este tipo de esquemas. Algunos de estos estudios significativos en cáncer de mama, se han realizado en adyuvancia con esquemas que incluían adriamicina, ciclofosfamida y paclitaxel, como el ensayo intergrupar U.S. CLB9741(49). Pero también disponemos de dos metaanálisis que tratan la materia, que incluyeron estudios tanto en la adyuvancia como en neoadyuvancia, con esquemas que incluían antraciclinas, taxanos en su mayoría (y algunos fluorouracilo como CMF, ECF), mostrando beneficio (50,51).

Hoy en día la aplicación de la quimioterapia con densidad de dosis, queda aceptada como una opción terapéutica en muchas de las guías clínicas reconocidas como la ESMO, NCCN. (52, 53)

#### **5.4. Neoadyuvancia en cancer de mama HER 2.**

##### **Trastuzumab en cáncer de mama.**

El receptor del factor de crecimiento epidérmico humano HER2, se descubrió en 1983, asociándose con la familia de los receptores tirosina quinasa de la familia erb. La sobreexpresión, se observa en el 20 a 30% de los carcinomas de mama invasivo. Este receptor pertenece a la familia HER, y tiene capacidad de unirse a otros receptores de la familia formando heterodímeros. Consta de un dominio extracelular, un segmento transmembrana lipofílico y un dominio intracelular de tirosina quinasa. Cuando se une a su ligando específico, se activada una señal de transducción y se pone en marcha la cascadas de señales intracelulares que promueven la proliferación celular, regulan el crecimiento y la supervivencia, así como la migración, y la diferenciación de la célula tumoral.

Se ha demostrado su valor pronóstico y predictivo de respuesta desfavorable a los tratamientos endocrinos en general y a algunos quimioterápicos en particular, salvo a antraciclinas. Su amplificación génica



demostrada por FISH y en menor medida la sobreexpresión demostrada por IHQ, predicen la respuesta a los tratamientos anti-Her2 tanto en cáncer metastático, como adyuvancia y neoadyuvancia. (28)

Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal tipo IgG1 humanizado, (a partir de células de mamífero) que se une al dominio extracelular de HER2 e inhibe la proliferación y la supervivencia de los tumores. (54). En 1995 se desarrolla el estudio pivotal fase 3 en pacientes metastásicas, que demuestra el aumento de SG en las pacientes con sobreexpresión de HER2 y que recibían trastuzumab.

En un ensayo clínico aleatorio, se mostró la actividad de trastuzumab junto a quimioterapia en pacientes cáncer de mama metastásico HER2 positivo, no tratadas previamente. Incluyeron 469 mujeres que recibieron QT (doxorubicina y ciclofosfamida) sola o en combinación con el anticuerpo. Los pacientes que recibieron trastuzumab tuvieron menor tasa de mortalidad al año (22% frente a 33% con  $p=0'008$ ) y una supervivencia mayor (25 vs 20'3 meses,  $p=0'046$ ) con un 20% de reducción del riesgo de muerte. (55)

En 1998, la FDA aprueba su uso en el tratamiento de cáncer de mama metastásico HER2 positivo. En 2006 se concede la indicación para la adyuvancia en pacientes con ganglios positivos, y 2 años después finalmente se aprueba su uso en mujeres sin afectación ganglionar.

Su uso en adyuvancia proviene de 5 grandes estudios que de forma global han demostrado que el uso de trastuzumab secuencial o concomitante a la quimioterapia, produce una reducción en el riesgo de recaída a 5 años y en un aumento en la supervivencia global. Los tres últimos incluían también pacientes con ganglios negativos pero con algún factor de mal pronóstico. En el metaanálisis que incluyen todos estos estudios fase III, se demostró una disminución del 40% de recaídas y un aumento en la supervivencia global del 30-40% en todos los subgrupos estudiados. La duración del tratamiento debe limitarse a un año y por la cardiotoxicidad demostrada en su uso concurrente con antraciclinas, se indica su uso junto a taxanos.

En neoadyuvancia, el uso de trastuzumab ha sido empleado en varios estudios, y los resultados más interesantes derivan de tres estudios aleatorizados:

El ensayo randomizado realizado en el MD Anderson Cancer Center, por Buzdar A et al, en cáncer de mama estadios II-IIIa con sobreexpresión de Her2 (3+) y/o positividad por FISH. La población de estudio fue aleatorizada a un esquema secuencial con 4 ciclos de paclitaxel seguidos de 4 ciclos de FEC asociado o no a trastuzumab. Posteriormente se intervenían y si no tenían ganglios clínicamente positivos al inicio se le realizaba BSGC y si se hallaba enfermedad microscópica residual se realizaba vaciamiento axilar. Se consiguió un aumento en las tasas de RCp en el brazo con trastuzumab, alcanzado la diferencia que se había fijado en el diseño inicial antes de la fecha prevista de finalización de estudio, por lo que se interrumpió el estudio de manera anticipada. Se alcanzó un 65,2 % de RCp en el brazo experimenta vs. 26,3 %, ( $p=0.016$ ). (56)

Otro de los grandes ensayos aleatorizados fue el europeo NOAH, que incluía a 227 pacientes con cáncer de mama estadios II-IIIB Her2 positivo. Se aleatorizaban a recibir un esquema secuencial con antraciclinas, paclitaxel y CMF, con o sin trastuzumab concomitante; El grupo que llevaba trastuzumab presentó un aumento de las RCp estadísticamente significativo, en comparación con el brazo control (38 % vs 20 %;  $p=0,003$ ). (57)

Por último, el mayor estudio de neoadyuvancia, con 1510 pacientes, fue la fase III GEPARQUATTRO, del grupo alemán. El esquema de quimioterapia consistía en 4 ciclos de EC (epirrubicina y ciclofosfamida) y posteriormente se randomizaban al brazo A con 4 ciclos de docetaxel o 4 ciclos de docetaxel más capecitabina (brazo B), o 4 ciclos de docetaxel seguido por 4 ciclos de capecitabina (brazo C). Se añadía trastuzumab en caso de ser Her2+, cada 3 semanas concomitante con la quimioterapia, antes de la cirugía, y hasta 1 año después. El estudio alcanzó su objetivo primario, alcanzando mayores tasas de RCp en las pacientes Her2+ tratadas con trastuzumab (45,5 % vs 19,5 %) de manera significativa respecto a las que no recibían el anticuerpo. (58)

## 5.5. Hormonoterapia en neoadyuvancia.

El esquema de quimioterapia y hormonoterapia concomitantes en la neoadyuvancia también se ha evaluado en una serie de estudios, en los que no se encuentra beneficio, no estando claro su papel a día de hoy.

En cuanto a la hormonoterapia sola en neoadyuvancia, se ha comprobado su beneficio en un grupo seleccionado de pacientes con cáncer de mama receptores hormonales positivos. En general, las respuestas clínicas son frecuentes aunque las patológicas son raras (<5%). Disponemos de menos estudios que hayan comprobado esta estrategia, en comparación con el número de ensayos de quimioterapia neoadyuvante. Algunos de los más representativos son:

Estudio de Ellis y cols, estudio fase III con 324 pacientes con cáncer de mama receptores hormonales positivos, no candidatas a cirugía de entrada. Se aleatorizaron a letrozol vs tamoxifeno durante 4 meses. Letrozol produjo mayor tasa de respuestas clínicas (respuestas completas y respuestas parciales) que tamoxifeno, 60 % frente al 41 % ( $p = 0.004$ ), siendo este el objetivo primario del estudio. También se obtuvo el objetivo secundario, que era la tasa de cirugías conservadoras, Esta fue de 48 %, con el letrozol frente a 36 % ( $p = 0.036$ ). No se analizó la RCp. (59)

Posteriormente se desarrolló el Estudio IMPACT, por Smith IE y cols, comparando anastrozol versus tamoxifeno versus combinación de ambos en neoadyuvancia. Era un estudio Fase III, aleatorizado, doble ciego, cuyo objetivo primario fue la tasa de respuestas clínicas a las 12 semanas de tratamiento y de cirugías conservadoras y cuyo objetivo secundario fueron los cambios en el porcentaje del marcador de proliferación celular, Ki67, a las dos semanas de tratamiento. Se incluyeron 330 mujeres postmenopáusicas con RE+. No hubo diferencias entre los tres brazos en la tasa de respuestas clínicas, anastrozol (37 %), tamoxifeno (36 %) y la combinación (39%), aunque sí se objetivó una mayor tasa de cirugías conservadoras con anastrozol. (60)

De manera que en pacientes postmenopáusicas con receptores hormonales positivos, que no sean candidatas a quimioterapia por su edad o

comorbilidad, un inhibidor de la aromatasa durante 4-6 meses, previos a la cirugía, es una opción válida.

## **5.6 Evaluación de respuesta patológica a la QTN por clasificación de respuestas patológica por Miller y Payne. Clasificación por residual cáncer Burden. Valor pronóstico de la RCP tras la quimioterapia neoadyuvante.**

La mayoría de las pacientes con carcinoma de mama que reciben quimioterapia neoadyuvante, presentan una disminución significativa de la enfermedad. Existen datos que apuntan a que el pronóstico de las pacientes que reciben quimioterapia neoadyuvante depende del tamaño de la enfermedad inicial y de la respuesta al tratamiento, siendo uno de los principales factores a largo plazo el grado de enfermedad residual después de la quimioterapia. Para evaluar la respuesta existen dos clasificaciones vigentes actualmente:

### **Clasificación de Miller y Payne (MYP)**

Comprende cinco categorías atendiendo a la reducción en la celularidad maligna en el tumor antes y después del tratamiento (61).

Grado 1. No hay una reducción en el número de células tumorales.  
Grado 2. Hay una mínima reducción en el número de células cancerosas (hasta un 30%).  
Grado 3. Se produce una reducción en el número de células tumorales de un 30-90%.  
Grado 4. La reducción en el número de células tumorales es de más del 90%.  
Grado 5. Hay una respuesta completa y por tanto no hay tumor residual.

Esta clasificación no contempla el tamaño tumoral ni el número y tamaño de las metástasis en ganglios.

## **Clasificación por Residual Cancer Burden (RCB):**

Está basada en la variable continua RCB (Residual Cancer Burden) que se calcula teniendo en cuenta el tamaño y celularidad del tumor primario así como el tamaño y número de metástasis en ganglios tras la terapia neoadyuvante:

- RCB de 0: aquellos tumores que desaparecen tras el tratamiento.
- RCB-I y RCB-II :la fracción de celularidad cancerosa invasiva (finv) de corte establecido entre las categorías es 1.36
- RCB-II y RCB-III: la puntuación es de 2.38

En esta clasificación no se tiene en cuenta el tamaño del tumor antes de iniciar la terapia. De manera que tumores de gran tamaño que se reducen significativamente pueden tener la misma puntuación que tumores más pequeños con una reducción menor (62). La ausencia de tumor residual en la mama o en los ganglios linfáticos después de la quimioterapia neoadyuvante, conocida como la respuesta completa patológica RCp, está asociada con un mejor pronóstico, dato que se ha comprobado en numerosos ensayos clínicos, y que conlleva menor riesgo de recurrencia y mayor supervivencia global.

Estas respuestas son más frecuentes en tumores de alto grado, de histología ductal, receptores hormonales negativos, y HER2 positivo, o tumores triple negativos.

Así, en el estudio del NSABP B-18 (63) se observó esta relación significativa entre la respuesta clínica y patológica a la quimioterapia neoadyuvante y el pronóstico. La SLE a los 5 años fue mayor en las pacientes que mostraron mayor RCC con un 76%, frente a un 64% que lograron una respuesta clínica parcial y un 60% con enfermedad estable ( $p = 0,001$ ). Tras 9 años de seguimiento la SG también fue superior en las pacientes que alcanzaron RCp, 85% vs. 73%, en aquellas con tumor residual en la pieza quirúrgica. En el análisis multivariante, en el que se incluían otros factores pronósticos conocidos, se comprobó que la RCp fue el único factor predictivo de SLE y SG.(64) La RCp y la negatividad de los ganglios axilares se han

considerado factores pronósticos establecidos, mientras que los datos sobre la relación de la respuesta clínica con el pronóstico son menos sólidos.

Ya que la respuesta a la quimioterapia preoperatoria se relaciona con la SLE y la SG, se ha propuesto como end point para numerosos ensayos clínicos, determinar el valor de nuevos regímenes quimioterápicos o nuevos fármacos y obtener una aprobación mas rápida que la obtenida a costa del desarrollo de estos fármacos en adyuvancia o en la enfermedad metastásica. (65) .

## II- GANGLIO CENTINELA EN CÁNCER DE MAMA

### 6. DISEMINACIÓN GANGLIONAR

La afectación ganglionar, continúa siendo el factor pronóstico de mayor peso en la actualidad, siendo importante para la toma de decisiones terapéuticas en las pacientes. El número de ganglios afectados también influye. En cáncer de mama en ausencia de tratamiento adyuvante se ha visto un mayor riesgo de recaída con un 30% a 10 años si no hay positividad y más del 70% cuando hay más de 10 ganglios afectados.

La diseminación también puede ocurrir a través de los vasos linfáticos mamarios, y algunos autores enfatizan la extensión vertical hacia el plexo linfático de la fascia pectoral y/o de la región subareolar. Los lugares de mayor frecuencia de diseminación regional linfática son los ganglios axilares, los de la cadena mamaria interna y los supraclaviculares:

#### **Afectación axilar:**

Aproximadamente un 50% de los pacientes con cáncer de mama clínicamente palpable tienen afectación axilar ganglionar, y ésta afectación está en relación directa con el tamaño del tumor primario (66). El programa SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results) del National Cancer Institute de EE.UU. examinó datos de supervivencia a cinco años de 24.740 pacientes diagnosticadas entre 1977 y 1982 y con al menos 8 ganglios axilares analizados, relacionando el tamaño tumoral y la afectación ganglionar. Cuanto mayor era el tumor, mayor era el riesgo de afectación ganglionar axilar. Incluso en los tumores pequeños el riesgo de afectación axilar era de un 20%. Los pacientes con cáncer microinvasivo eran el único subgrupo con un riesgo de afectación axilar menor al 5%. Existen diversos estudios que apoyan que la localización del tumor primario en la mama también influye en el riesgo de afectación ganglionar axilar, siendo mayor en los tumores localizados en los cuadrantes externos de la mama (67)

## **Cadena mamaria interna:**

La diseminación tumoral a los ganglios mamarios internos no se ha valorado tanto inicialmente en los estudios, como se hizo con los nódulos axilares, en parte debido a su localización intratorácica y a que no es tan común su afectación.

Handley estudió a 1000 pacientes que tenían realizada biopsia de la cadena mamaria interna y halló mayor afectación axilar que mamaria interna (54% versus 22%). Además encontró una mayor frecuencia de afectación de la mamaria interna cuando existía afectación axilar (35% vs 8% cuando no está afectada).

## **7. Ganglio centinela y biopsia selectiva del ganglio centinela.**

Desde el punto de vista de la Medicina Nuclear, es el ganglio o ganglios linfáticos regionales que reciben el drenaje linfático directamente desde el tumor primario y son detectables en la linfogammagrafía, especialmente si están conectados a un canal linfático. Desde el punto de vista quirúrgico, se considera ganglio centinela (GC) aquel o aquellos que presentan una actividad representativa y que están ubicados en el área preseleccionada gammagráficamente.

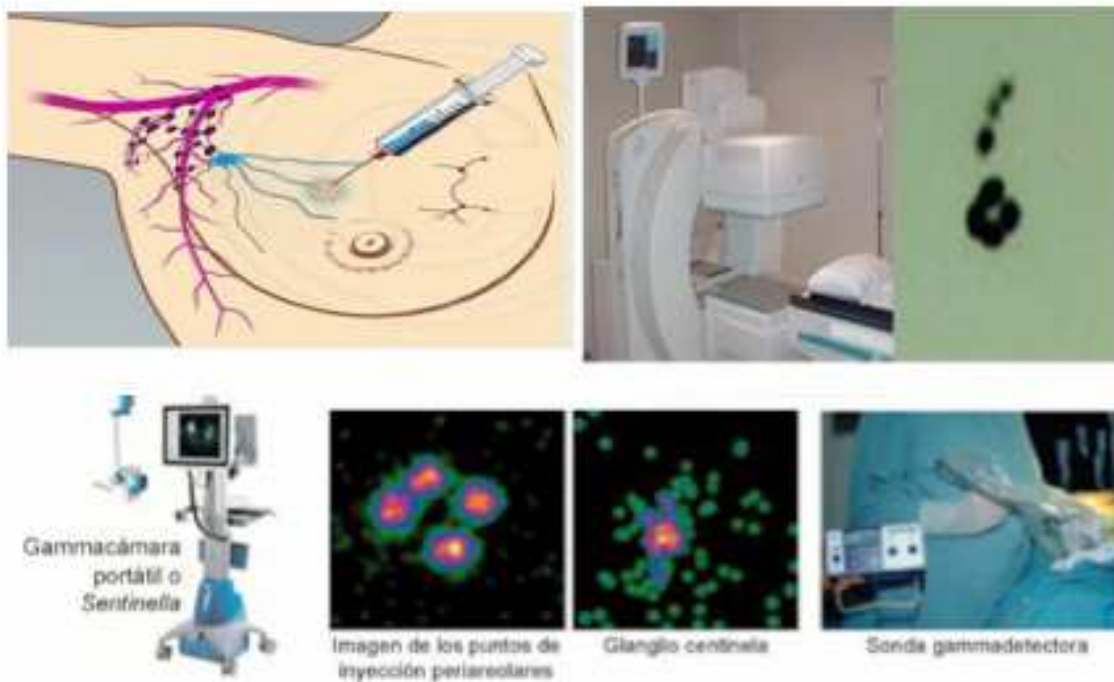
La biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC), es una técnica diagnóstica en la que se extirpan uno o dos ganglios, destinada a sustituir la linfadenectomía axilar tradicional. Este ganglio linfático, es por definición, el primer sitio donde disemina la célula tumoral metastásica, antes de progresar hacia ganglios linfáticos más alejados (Figura 4). Para su identificación se utilizan isótopos y colorantes que son selectivamente drenados por los vasos linfáticos mamarios y cuyo trayecto será visualizado a través de una gammagrafía. El análisis de este ganglio centinela determina así la necesidad o no de realizar una linfadenectomía axilar. (68, 69)

La técnica del GC debe ser intraoperatorio siempre que sea posible para aumentar la eficiencia de la técnica, excepto en el caso de la mamaria interna,



cuya biopsia intraoperatoria no es necesaria porque no entraña ningún gesto quirúrgico adicional. Son aceptables hasta 3 GC, aunque es recomendable limitar su número a 2. Se recomienda estudiar el ganglio en su totalidad a fin de evitar sesgos de localización. La única técnica que actualmente permite el estudio del GC en su totalidad es una técnica molecular (one step nucleic acid amplification [OSNA], SysmexTM) (70), por lo que se considera el procedimiento de elección para el estudio patológico del GC.

Es aceptable el estudio intraoperatorio histopatológico mediante cortes por congelación cuando el análisis molecular OSNA no sea posible. El estudio histológico intraoperatorio no permite el estudio del GC en su totalidad, por lo que debe completarse con el estudio diferido del GC restante. (71)



**Figura 4** Proceso de la Biopsia selectiva del ganglio centinela

## 8. Biopsia selectiva del ganglio centinela en neoadyuvancia.

En pacientes con tumores avanzados o afectación ganglionar, la quimioterapia neoadyuvante está indicada para evaluar la respuesta a la quimioterapia y aumentar la probabilidad de cirugías conservadoras. Tras la QTN, en pacientes con afectación ganglionar de inicio se encuentra enfermedad residual en la axila en torno a un 50–60%, por lo que determinar y

examinar el estado axilar tras la QTN es importante. Sin embargo el realizar una linfadenectomía axilar con la finalidad de determinar la enfermedad residual, conlleva una elevada morbilidad en muchas pacientes con poco beneficio asociado. Para evitar estas complicaciones asociadas a la linfadenectomía es preferible la realización de la BSGC, que por otro lado es considerada una técnica fiable para pacientes sin enfermedad clínica axilar al diagnóstico, (cN0). Tras la QTN un metanálisis encontró hasta un 12% de FN, en pacientes con. Sin embargo la utilidad de la técnica tras QTN en cN1, ha sido cuestionada, dado que los resultados disponibles en la literatura provienen de pequeñas series, con tasas de FN del 7% - 20%. Es posible que las tasas de identificación del ganglio centinela sean más bajas tras el tratamiento neoadyuvante debido a la fibrosis de ganglios linfáticos causados por la quimioterapia. Además, las tasas de falsos negativos pueden ser más elevadas debido a una reacción fibrosa del ganglio centinela.

El panel de expertos de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria recomienda en el consenso de 2013(71)

Consideraciones especiales:

1. En pacientes con axila clínica/ecográficamente negativa de inicio (cN0), puede realizarse la BSGC tanto previa al tratamiento sistémico primario como posterior al mismo (72, 73,74,75,76)( evidencia 1+).
2. En pacientes cN1/N2 de inicio con negativización clínica y ecográfica de la axila tras la neoadyuvancia (cyN0), puede realizarse la BSGC después del tratamiento sistémico primario y evitar la linfadenectomía axilar cuando el GC sea negativo. (Evidencia 1-) No obstante, series recientes aportan resultados controvertidos al respecto por la alta tasa de falsos negativos secundarios a la terapia sistémica primaria (69,77,78)

# **CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES.**

## **9. Etapas de la carcinogénesis**

### **9.1. Iniciación:**

Se define como el proceso inicial de alteración de una célula a nivel del genoma. Afecta a tres procesos: metabolismo, reparación del ADN y proliferación celular. Se lleva a cabo por la unión de un carcinógeno de forma irreversible al ADN, que produce una mutación de un oncogen o la inactivación de un gen supresor. Las dosis necesarias de carcinógenos completos para iniciar a la célula son muy bajas, pero no suficientes para que el proceso sea permanente.

Se caracteriza por ser un proceso irreversible y con memoria. La célula dañada no se distingue morfológicamente de la normal y necesita un ciclo completo más para que se fije el daño. El resultado de la mutación es la adquisición de una ventaja selectiva en el desarrollo de la célula y su descendencia, ventaja conseguida mediante fenómenos de resistencia a la apoptosis o menor sensibilidad a los factores inhibidores del crecimiento.

### **9.2. Promoción:**

Se caracteriza por la expansión selectiva y reversible de la población clonal de la célula previamente iniciada por un agente promotor. El agente promotor puede ser endógeno (que produce una promoción espontánea, o exógeno). A diferencia de la fase de iniciación, esta fase es reversible, y presenta dosis umbral y respuesta máxima. La continuidad de esta etapa, depende de la acción repetida de un agente promotor.

Bajo la perspectiva de la prevención, esta etapa es interesante, al ser una fase reversible, pudiendo interrumpir el proceso de carcinogénesis.

### **9.3. Progresión:**

En esta etapa, las células ya malignizadas de forma irreversible acumulan nuevas mutaciones que le confieren características más agresivas, como la invasión, la capacidad metastásica y la resistencia farmacológica. Se produce por un agente progresor, aunque también puede producirse por la incorporación al genoma de información genética exógena (p ej, de virus) o alteraciones cromosómicas espontáneas. Las características de una célula en progresión son la alteración en la estructura genómica reflejada por inestabilidad cariotípica (característica básica de esta etapa), que conlleva una alteración del aparato mitótico y un trastorno en los telómeros e hipometilación del ADN. Entre los genes afectados se encontraran los reguladores del ciclo celular como p53, transductores de señales externas como H-ras y los reparadores del ADN.

Se denomina carcinógeno completo al que es capaz de actuar por si mismo en las tres etapas de la carcinogénesis; algún carcinógeno completo, a dosis bajas, puede ser sólo iniciador (carcinógeno incompleto).

La carcinogénesis química es la más frecuentemente implicada en el desarrollo de tumores malignos; Estos agentes pueden actuar dañando el ADN directamente o facilitando el crecimiento celular e intervienen en la promoción tumoral, causando cambios epigenéticos.

## **10. Invasión y metastatización (cascada metastásicas):**

La metástasis se refiere a la capacidad de abandonar un tumor primario, viajara través de la circulación hasta un tejido distante y formar un segundo tumor. Se divide en sucesivas etapas en las que la célula tumoral adquiere cambios genéticos para poder colonizar de forma efectiva órganos distantes. Esta sucesión de etapas, es lo que se conoce como cascada metastásica. (16, 79)

## 10.1. Angiogénesis.

Los vasos tumorales van a originarse a partir de capilares y vénulas del tejido invadido, aunque el proceso de la angiogénesis acontece en procesos biológicos normales como la embriogénesis, procesos de cicatrización y algunas patologías benignas reumatoideas. Ante un estímulo angiogénico, el vaso progenitor incrementa su actividad de síntesis, aumentando así el número de células endoteliales. Posteriormente tras la disolución de la membrana basal, estas células van formando yemas vasculares que se ramifican y se ahuecan, formando nuevos capilares. Los neovasos serán tortuosos, con poca elasticidad, donde la sangre circula lentamente, son más permeables al paso de proteínas plasmáticas y a células.

La aparición de neovasos permitirá el transporte de las células tumorales a otros tejidos y el aporte de nutrientes al tumor. La hipótesis de que el crecimiento del tumor es dependiente de la angiogénesis, vino de la mano de Folkman en los años 70, y ha sido posteriormente corroborada por numerosos estudios experimentales que demuestran que la angiogénesis está mediada por diferentes polipéptidos entre los que destaca la familia del factor del endotelio vascular (VEGF), que se asocia con un incremento de la densidad vascular y un peor pronóstico (80). La relevancia de este descubrimiento ha sido muy importante y varias estrategias terapéuticas utilizadas en la actualidad están basadas en la inhibición de la angiogénesis tumoral.

En este proceso van a participar factores positivos y negativos:

### **Factores estimulantes de la angiogénesis:**

El factor estimulante más potente en la angiogénesis, es el VEGF (vascular endotelial growth factor), que se expresa también en la hipoxia y cuando se altera el p53. Puede ser secretado por células tumorales, macrófagos y miofibroblastos, bFGF (factor de crecimiento fibroblástico), angiogenina, angiotrofina y TNF (factor de necrosis tumoral)

### **Factores inhibidores: trombospondina y angiotensina.**

Para que se lleve a cabo la angiogénesis tumoral, son necesarias sobretodo las señales del factor derivado de células del estroma (SDF/CXCL-1, stromal cell-derived factor 1 y la del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). La primera es una citocina liberada por miofibroblastos del parénquima que mediante quimiotaxis recluta a células precursoras endoteliales, la cuales madurarán gracias a la presencia de VEGF, que a su vez es regulada por la disponibilidad de oxígeno y dependen de la actividad del factor de transcripción denominado factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1, hypoxia-inducible factor 1).

### **10.2. Invasión y migración:**

Las células tumorales para salir del tejido tumoral primario tendrán que interactuar con la matriz extracelular (MEC), que consta de un entramado de las membranas basales y el estroma intersticial. Para esta migración celular son necesarias varias proteínas de adhesión celular y enzimas líticas, como la E-cadherina, glucoproteína de membrana que cuando pierde su función facilita la pérdida de adhesión entre las células y favorece el desprendimiento celular con la invasión de tejidos circundantes.

El fenotipo celular mas asociado a la transición epitelio-mesénquima (TEM) es adquirido de manera transitoria por la célula tumoral, que cuando consigue asentarse en un órgano distinto al original y formar metástasis, revierte a un fenotipo similar al de origen (epitelial), pasando por una transición mesénquima- epitelio (TEM) inversa de la TEM (25).

Pero la adquisición de características malignas por parte de las células cancerosas no está únicamente proporcionado por su programa genético, sino que también es debida a la suma de mutaciones específicas en genes implicados en el control del ciclo celular y de señales que las células tumorales reciben de las células normales situadas en el estroma adyacente.

### **10.3. Intravasación y circulación:**

Durante esta fase la célula tumoral se introduce en los vasos sanguíneos y linfáticos. Primero se adhieren a células endoteliales mediante las proteínas de adhesión, a continuación las células neoplásicas secretan enzimas proteolíticas que facilitan la penetrancia a través de los vasos. Una vez que han llegado al lumen de un vaso sanguíneo o linfático, las células cancerosas individuales pueden viajar con la sangre o la linfa a otras zonas del cuerpo. Por otra parte, la sangre representa un ambiente activamente hostil para las células cancerosas. Las fuerzas hidrodinámicas en el torrente circulatorio que suelen ser mayores mientras menores son los vasos, pueden romper las células tumorales, que además tienen un diámetro de unos 20  $\mu\text{m}$ , mayor al de los eritrocitos y linfocitos, que son 7  $\mu\text{m}$  y de 3-8  $\mu\text{m}$  respectivamente y presentan capacidad de deformarse.

### **10.4. Detención y extravasación.**

Las células tumorales se quedan atascadas en los capilares de los órganos y abandonan la circulación. Este proceso consta de distintos pasos, en los que hay implicados diferentes factores:

- Adhesión al endotelio: receptores para selectinas.
- Retracción del endotelio: factores plaquetarios.
- Adhesión a la membrana basal: receptores de la laminina y trombospondina.
- Disolución de la membrana basal: por las proteinasas. Esto dura entre 8-24 horas, para atravesarla finalmente.
- Locomoción: factores de motilidad.

### **10.5. Colonización**

Una vez que se encuentra en otro tejido, las células tumorales podrán formar una nueva masa tumoral, pero sólo el 0,01% de las células circulantes lograrán formar colonias metastásicas. Será necesaria una neoangiogénesis para nutrir al nuevo tumor. Estas metástasis pueden encontrarse en estado

subclínico durante años, depende del equilibrio entre factores que estimulen la proliferación y la apoptosis. Sin los aportes necesarios pueden morir rápidamente o permanecer en aislamiento, Hay teorías sobre que incluso el propio tumor puede limitar el crecimiento al secretar un factor inhibidor de la angiogénesis. Esto hace que se genere la hipótesis de porque algunos tumores al resecaarlos desaparece el inhibidor de la angiogénesis, que contiene los diferentes focos tumorales sin crecer (en caso de su existencia), generando entonces una explosión en el crecimiento de éstos.

También disponemos de evidencia preclínica de la existencia de micrometástasis durmientes que persisten en un estado de no crecimiento por periodos extensos de tiempo (quiescencia).

## **10.6. Escape a las defensas**

Para la formación de las metástasis también será necesario la capacidad de evadir las defensas del huésped, algunos de los mecanismos estudiados son:

- Pérdida o disminución en la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I.(81)
- Pérdida o disminución en la expresión de moléculas coestimuladoras.
- Liberación de factores inmunosupresores, como el factor de crecimiento y transformación B (TGFB).
- Mutaciones de los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, lo cual produce alteraciones en la estructura del complejo MHC-péptido.
- Modulación antigénica: la unión de anticuerpos que no fijan complemento, a los antígenos tumorales, puede producir la endocitosis del complejo antígeno-anticuerpo perdiéndose su expresión en la superficie celular. Además estos anticuerpos pueden proteger al tumor de la acción de otros que sí fijan complemento.



- Enmascaramiento: las células tumorales pueden recubrirse con moléculas normales del hospedero contra la cual existe tolerancia.

Deficiencia en el procesamiento antigénico por parte de la célula tumoral.

- Resistencia de la célula tumoral a los mecanismos efectores tumorocidas.

- Inducción de apoptosis en los linfocitos T por expresión en la célula tumoral de moléculas como Fas ligando, que al unirse con la molécula Fas presente en los linfocitos T, induce señales en estos que lo llevan a la muerte celular programada.

# **11. CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES.**

## **11.1. Definición de células tumorales circulantes**

Por Células tumorales circulantes (CTCs), entendemos aquellas células tumorales que se han desprendido del tumor primario y circulan por el torrente sanguíneo. Estas células tienen potencial maligno, ya que han demostrado la capacidad de formación de metástasis.

Diferente es el concepto de Células tumorales diseminadas (DTCs), que hace referencia a aquellas células tumorales que tras diseminarse a sangre, quedan retenidas en lugares privilegiados, como la médula ósea o el hígado, para su supervivencia y suelen hacerlo en estado no proliferativo.

### **Primeros estudios en células tumorales circulantes**

En los últimos años el estudio de las células tumorales circulantes ha despertado un gran interés en el entendimiento de la enfermedad tumoral. Fue el patólogo australiano Thomas Ashworth quien identificó por primera vez en autopsias de pacientes con cáncer de próstata metastásico, células tumorales circulantes en sangre periférica, observando que eran idénticas a las del tumor primario, y este hecho podría explicar el origen de múltiples tumores que se originan en una misma persona” (82)

El siguiente trabajo de CTCs fue el de Engell. Este autor analizó la presencia de células tumorales en sangre periférica de 125 pacientes con cáncer gastrointestinal (83) y detectó que el 61% de los casos presentaban células tumorales en las muestras sanguíneas, y que esta presencia estaba asociada con el grado de diferenciación tumoral. Debido a que el 51% de los pacientes sobrevivieron de 5 a 9 años, tras la resección del tumor, presentaban células tumorales, Engell sugirió que “la diseminación de estas células hacia el torrente sanguíneo debía de haber ocurrido antes o durante la cirugía”.

Estos hallazgos permitieron que durante mucho tiempo se supusiera que la presencia de dichas células significaba una progresión de la enfermedad

neoplásica y que se podría relacionar directamente con la aparición de metástasis tumorales.

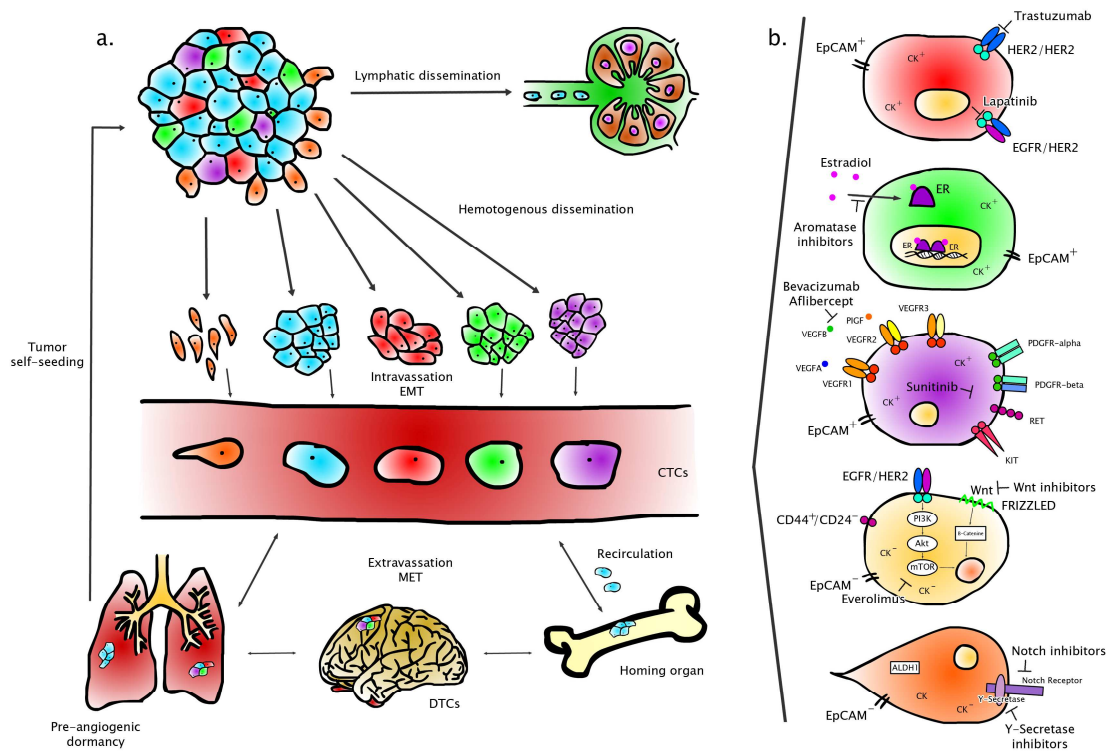
Actualmente, la séptima edición del manual de la American Joint Commission on Cancer Staging incluye una nueva categoría de cM0(i+), para designar a los pacientes con enfermedad microscópica en sangre o en la médula ósea, aunque estos pacientes seguirán siendo catalogados como no metastásicos (84).

## **11.2. Importancia de las células tumorales circulantes en el proceso de metastatización.**

La metástasis se define como todo tejido tumoral que surge en órganos sin relación anatómica directa con otro tumor maligno de igual naturaleza desarrollado con anterioridad. Para ello se requiere el vertido de células tumorales, y su traslado vía sanguínea o linfática hasta otros órganos, siendo la diseminación hematógena el mecanismo más frecuente para la formación de metástasis.

En los últimos años la investigación del cáncer se ha centrado principalmente en el tejido donde se origina la neoplasia o microambiente primario y el tejido donde se desarrolla la metástasis, conocido como microambiente metastático. Existe un nuevo microambiente, el sistema circulatorio, cuyo estudio permitirá explicar cómo las células migran desde el tumor primario y penetran en los vasos sanguíneos, como sobreviven en el torrente circulatorio eludiendo los mecanismos de vigilancia inmunológica, como se mantienen latentes en algunos órganos como la médula ósea durante años y finalmente como consiguen implantarse y proliferar en el órgano diana.

Por otro lado, las CTCs se originan tanto del tumor primario como de las metástasis y pueden adquirir características de invasión y motilidad para migrar al torrente sanguíneo. Sabemos que aproximadamente entre el 25% y el 30% de los pacientes con cáncer de mama y que no tienen ganglios afectos presentan recurrencia de la enfermedad tras la extirpación del tumor primario (85). Estos resultados determinaban la capacidad de las CTCs de diseminar, siendo este proceso indetectable por los métodos diagnósticos tradicionales empleados. (86)



**Figura 5.** Proceso de diseminación tumoral. Expert Rev. Mol. Diagn. © Future Science Group (2013)

Sin embargo, nuestro conocimiento sobre los mecanismos celulares y moleculares de la progresión del cáncer es aún extremadamente pobre, siendo desconocido cuántas y cuáles son las alteraciones genéticas que contribuyen a la diseminación tumoral. Se estima que solamente 1 de cada 10 CTCs presentes en sangre periférica pueden ingresar en tejidos distantes del tumor primario y que sólo un pequeño porcentaje de estas células va a desarrollar una enfermedad metastásica.

### 11.3. Caracterización fenotípica y genotípica de las células tumorales circulantes en cáncer de mama.

Gracias al desarrollo de nuevas técnicas, se ha puesto de manifiesto que las CTCs poseen alteraciones fenotípicas y genómicas características propias de células malignas, y que rara vez se encuentran en sangre periférica de personas sanas.

- **Caracterización fenotípica:**

-**Morfología** característica: tamaño mediano-grande y núcleo granulado con elevado ratio núcleo/citoplasma (aproximadamente  $\frac{3}{4}$ ). (87)

-**Marcadores epiteliales específicos:** La principal característica fenotípica de las CTCs de tumores de origen epitelial, es la expresión de citoqueratinas y molécula de adhesión de células epiteliales EpCAM (88,89). La expresión de estos marcadores puede variar, y no expresarse, tras la transición epitelio-mesénquima.

-**HER2:** es el biomarcador más estudiado en cáncer de mama. Por su evolución a lo largo de la enfermedad, el seguimiento de este marcador en las CTCs podrá ser una estrategia válida en la aplicación clínica. Hay discrepancia en el fenotipo/genotipo de las CTCs, metástasis y tumor primario con respecto al estado del HER2 (90,91,92). Se demostró que CTCs HER2-positivas aparecían en pacientes con tumores primarios HER2- negativos y viceversa, aunque la expresión de CTCs. HER2-positivas era más común en mujeres con enfermedad HER2-positiva (93,94). Se sugiere que las CTCs HER2-positivas podrían jugar un papel en la resistencia a la quimioterapia en pacientes con cáncer de mama HER2-negativo.

-**Receptores hormonales:** la pérdida de expresión de los RE y RP durante la enfermedad se considera como una mala respuesta a las terapias endocrinas en pacientes con cáncer de mama RH positivos. En varios estudios se ha observado que el fenotipo de las CTCs antes y después del tratamiento normalmente es idéntico; Sin embargo, el fenotipo más común de las CTCs es triple negativo mientras que en el 95% de los tumores primarios son RH positivos. Por lo tanto, la evaluación de la expresión de los RH en CTCs podrá predecir la respuesta al tratamiento en el 78% de los casos (95,96)

-**EGFR:** la disponibilidad de tratamientos como el lapatinib (inhibidor reversible del EGFR y HER2 aprobado para el tratamiento en cáncer de mama metastásico HER2 positivo) refuerza la necesidad de estandarizar la definición de EGFR positivo y del papel del EGFR y efectores en las CTCs. Algunos estudios plantean que esta heterogenicidad entre el fenotipo del tumor primario

y las CTCs, indica un potencial beneficio en tratamientos adicionales dirigidos contra dianas de las CTCs, no presentes en el tumor primario.

**-Topoisomerasa 2:** la alteración del gen TOP2A ha sido asociado con la sensibilidad a la quimioterapia basada en antraciclinas.

**-Marcadores de células madre:** Podrían estar involucradas en el desarrollo del tumor. Así, en el estudio realizado por Al-Hajj y col. se describe la existencia de una pequeña población de células tumorales con el fenotipo CD24-/CD44+ en pacientes con cáncer de mama metastático. Otros estudios han revelado la existencia de pequeñas subpoblaciones tumorales que expresan otros marcadores de células madre que pueden ser aisladas y crecidas in vitro, entre estos marcadores destacan 133 y  $\alpha$ -integrina, o el más reciente marcador ALDH1. La expresión de Aldehído Deshidrogenasa ha sido relacionada con un mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama, identificándose junto con el fenotipo CD24+/CD44- subpoblaciones con alta capacidad tumorigénica (91,92)

Otra capacidad que caracteriza a las CTCs, y que nos recuerda al comportamiento de las células madre, es la de evadir tratamientos sistémicos como la quimioterapia al encontrarse mayoritariamente en un estado no proliferativo (97). Según recientes estudios, estas células, que comprenderían entre un 1% y un 10% del total de la población celular, tendrían la capacidad de renovarse y diferenciarse, y podrían tener una importante capacidad tumorigénica y contribuir a la heterogeneidad celular. Por otra parte, una de las principales características de las células circulantes es la capacidad para escapar de la apoptosis gracias a su habilidad para permanecer en estado latente durante largo tiempo. Esta característica es una de las principales propiedades de las células madre, que permanecen en estado de latencia hasta que reciben las señales apropiadas del microambiente que las rodea para diferenciarse y proliferar.

**-La adquisición de un fenotipo mesequimal:** durante el proceso de transición epitelio-mesénquima en la CTCs se produce pérdida de la molécula de adhesión celular, pérdida de la polaridad ápico-basal celular, además de la pérdida de expresión de marcadores epiteliales (EpCAM), CKs y E-cadherina, y

aumento de los mesenquimales como la vimentina. Este hecho podría explicar la pérdida en la detección de CTCs cuando sólo se utilizan marcadores epiteliales. Aktas y cols. observan algunos marcadores de EMT, como Twist 1, Akt2 o PI3K $\alpha$ , en 62% de CTCs. (98)

- **Alteraciones genóticas en las CTCs.**

**-Aberraciones cromosómicas:** Las más frecuentes son las aneusomía en los cromosomas 1, 8, y 17. Una base importante de los trabajos llevados a cabo por el grupo de Schmidt-Kittler es el análisis de la posible correlación entre el fenotipo del tumor primario y la presencia de células tumorales circulantes que permitan determinar que cambios genéticos estructuran la base de la diseminación tumoral. La conclusión que se extrajo de estos trabajos fue que la frecuencia de anomalías cromosómicas presente en células diseminadas de pacientes M0 era menor que las presentes en el tumor primario. No ocurría lo mismo cuando comparaban las células procedentes de pacientes con metástasis (M1) con su tumor primario, ya que en este caso sí eran similares las anomalías genéticas presentes en ambos tipos de muestra. Esto podría demostrar la hipótesis de que los tumores diseminan en fases muy tempranas del desarrollo del cáncer y la capacidad de estas células para desarrollarse de forma independiente al desarrollo del tumor primario.

No obstante, la caracterización y entendimiento de las propiedades biológicas de las CTCs está aún en periodo de compresión y estudio. Si por lo que parece, estas células tienen poco potencial proliferativo, este hecho les permitiría escapar de los tratamientos quimioterápicos, los cuales actúan principalmente sobre células en estado proliferativo (97). Esta capacidad, de las células tumorales circulantes para evadir tratamientos sistémicos como la quimioterapia, puede ser debido a un comportamiento similar al de las células madre. Según recientes estudios, estas células, que comprenderían entre un 1% y un 10% del total de la población celular, tendrían la capacidad de renovarse y diferenciarse, y podrían tener una importante capacidad tumorigénica y contribuir a la heterogeneidad celular (98). Por otra parte, una de las principales características de las células circulantes es la capacidad para escapar de la apoptosis gracias a su habilidad para permanecer en estado

latente durante largo tiempo. Esta característica es una de las principales propiedades de las células madre, que permanecen en estado de latencia hasta que reciben las señales apropiadas del microambiente que las rodea para diferenciarse y proliferar.

#### **11.4. Valor clínico de las CTCs: Valor pronóstico y predictivo de las CTCs en cáncer de mama**

Durante años, la investigación de la enfermedad mínima residual y la micro metástasis se ha dirigido principalmente al desarrollo de técnicas que permitan detectar estas células diseminadas en órganos mesenquimáticos como la sangre periférica, médula ósea o también los ganglios linfáticos, intentando establecer su importancia clínica. Así, la detección de células tumorales diseminadas en médula ósea, es considerada como un factor pronóstico en el cáncer de mama, y monitorizar su presencia tras el tratamiento adyuvante, puede tener gran valor clínico.(84) No obstante el hecho de que la obtención de la muestra implique un proceso agresivo para el paciente supone un obstáculo para su implantación en clínica. Las células tumorales circulantes han sido descritas de un 10 a un 60% de pacientes con estadio I-III de cáncer de mama no metastásico.

La utilidad clínica de la detección de CTCs ha sido demostrada en el cáncer de mama metastásico, en cáncer colorrectal y de próstata metastásicos, así como en el cáncer pancreático, gástrico, de vejiga, y de pulmón entre otros.

En 2003, Gaforio y colaboradores realizaron un estudio en el que demostraban la capacidad pronóstico de la presencia de células tumorales en sangre periférica en pacientes con cáncer. En un estudio posterior, Cristofanilly relacionaba la presencia y número de células tumorales circulantes con la supervivencia global de pacientes de cáncer de mama metastásicos así como con la progresión libre de enfermedad. Los resultados de este trabajo concluían que la presencia de estas células identificaban pacientes que tenían un mayor riesgo de muerte y una progresión de la enfermedad más rápida.



El número de células tumorales circulantes en sangre periférica antes del tratamiento, ha sido considerado como un factor pronóstico independiente de supervivencia libre de progresión y supervivencia global en la enfermedad metastásica(85) La detección de ellas en cualquier momento durante la administración del tratamiento sistémico, se correlaciona con un aumento de la tasa de mortalidad en estos pacientes (95-96).

Si bien la presencia de estas células en pacientes con cáncer metastásico es considerada como factor pronóstico, debido a trabajos como los anteriormente mencionados, dicho valor está aún por determinar en pacientes con cáncer en estadios iniciales.

### **11.5. Técnicas de enriquecimiento, aislamiento y detección de las CTCs**

Son varios los métodos que se han desarrollado para el enriquecimiento y aislamiento de CTCs, basados fundamentalmente en las propiedades biológicas de las células, utilizando anticuerpos dirigidos contra marcadores específicos de estas células, y por otro lado basados en las propiedades físicas de las mismas, como la selección por el tamaño de las CTCs. Entre los primeros destaca la separación inmunomagnética, que puede ser positiva o negativa, dependiendo de si lo que retenemos son las células tumorales, en este caso sería selección positiva inmunomagnética o si lo que retenemos son las células hematopoyéticas dejando pasar por las columnas de separación las células tumorales, en este caso sería negativa. Entre los otros métodos de separación destacan la separación por gradiente de densidad y la separación por tamaño.

Una vez aisladas las CTCs, se procede a la detección mediante diferentes técnicas: inmunocitoquímica, técnicas de citometría de flujo, técnicas moleculares como la detección mediante transcriptasa inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), y otras que usan FISH(Hibridación in situ fluorescente), o nanopartículas. (99,100, 101, 102)

El sistema de CellSearch (Veridex, Raritan, NJ) es el más conocido y el único aprobado por la agencia gubernamental de control de alimentos y medicamentos de los EE.UU. (FDA) para la determinación de las CTCs. Se trata de un sistema que utiliza ferrofluidos de captura constituidos por nanopartículas magnéticas, revestidas de seroalbúmina bovina, conjugada con anticuerpos específicos frente al antígeno EpCAM para capturar a las CTCs. Una vez enriquecida la muestra detecta mediante microscopia de fluorescencia las posibles CTCs, presentes en sangre periférica (95). Se han desarrollado otras tecnologías recientemente para analizar grandes volúmenes de sangre por paciente, capturando mayor número de CTCs, como es el colector de células GILUPI (GILUPI Nanomedizin, Alemania). Su método está basado en la inmunocitoquímica con el uso de anticuerpos para la captura de CTCs, anti EpCAM, CKs y 4',6-diamino-2-fenilindole (DAPI). Este dispositivo permite el aislamiento de los CTCs de grandes volúmenes de sangre, in vivo, y que podría aumentar el conteo final de CTCs. (103)

Posibles inconvenientes de esta técnica, es que se ha descrito la pérdida de los marcadores de superficie, EpCAM y citoqueratinas, en subtipos de CTCs de potencial más agresivo, perdiendo su fenotipo epitelial a favor del mesenquimal.

Actualmente las guías internacionales de práctica clínica no incluyen la determinación rutinaria de células tumorales circulantes en sus análisis de biomarcadores, para definir el riesgo de las pacientes y las decisiones en cuanto al mejor tratamiento subsiguiente, aunque ya la elaborada por la Sociedad Americana de Oncología Clínica, contempla la opción de realizar la medición en las pacientes metastásicas (15).

No obstante, aún no hay datos suficientes y son necesarios más estudios que nos permitan esclarecer cuál es realmente la capacidad pronóstica y predictiva de respuesta al tratamiento de estas células en pacientes con tumores pequeños y si realmente pueden definir a subgrupos de pacientes con alto riesgo de recaída, no sólo centrándose en su presencia sino también realizando análisis genéticos que permitan determinar su agresividad y la posible respuesta a los tratamientos administrados.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## HIPÓTESIS.

El cáncer de mama es la neoplasia maligna sólida más frecuente diagnosticada en las mujeres, considerándose un importante problema de salud pública.

En cáncer de mama estadio localizado y localmente avanzado, es de gran interés la aplicación de quimioterapia previa a la cirugía (neoadyuvante), con el objeto de introducir de manera temprana el tratamiento sistémico sobre enfermedad micrometastásica, a la vez que disminuye el tamaño tumoral permitiendo un mayor número de cirugías conservadoras de la mama. Por otro lado, se busca alcanzar respuestas completas patológicas que se han relacionado con una mayor supervivencia. Estudios en este escenario aportan la ventaja de poder investigar in vivo la sensibilidad de diferentes esquemas terapéuticos y poder buscar marcadores biológicos de respuesta y pronósticos.

Nosotros analizamos la eficacia de un esquema de quimioterapia con fármacos estándar pero administrados los cuatro primeros ciclos cada dos semanas, doxorubicina-ciclofosfamida por cuatro ciclos, en densidad de dosis, seguido de cuatro ciclos de docetaxel cada 21 días, más trastuzumab (si existe sobreexpresión del her2-neu). Con objeto de conseguir un alto número de respuestas completas patológicas en pacientes con cáncer de mama.

Por otro lado, es sabido el valor pronóstico y predictivo de la clasificación molecular de cáncer de mama en cuatro subtipos intrínsecos de Chuck Perou, pero en la práctica clínica habitual no se tiene acceso a estas determinaciones genómicas. Es por ello que en nuestro estudio pretendemos establecer el valor predictivo de respuesta y valor pronóstico de la clasificación histopatológica subrogada de Sant Gallen, para la quimioterapia neoadyuvante (QTN) administrada en densidad de dosis.

A pesar de respuestas patológicas favorables con la QTN observamos recaídas posteriores en cáncer de mama localizado y localmente avanzado, haciéndonos pensar que existen otros factores determinantes en el patrón evolutivo de cada tumor, pendientes de descubrir y donde hay que centrar

futuras investigaciones. Conocemos que en estadios muy tempranos del desarrollo del tumor se produce la diseminación de células tumorales circulantes y estas células pueden ser responsables de las posteriores recaídas de la enfermedad, así como de la falta de respuesta a los tratamientos administrados en estos pacientes diagnosticados en estadios II y III. La desaparición de células tumorales circulantes en sangre durante el tratamiento, se asocia con una mejor respuesta a la quimioterapia y con un mejor pronóstico en cuanto a menores recaídas y mayor supervivencia. Basándonos en estas premisas, pensamos que la incorporación de técnicas de detección y caracterización fenotípica de las CTCs de pacientes con cáncer de mama en estadios II-III, puede resultar útil como factor pronóstico y predictivo de la respuesta al tratamiento neoadyuvante, aportando información adicional sobre la capacidad proliferativa, invasiva y metastásica de las células diseminadas.

# OBJETIVOS

## Objetivos primarios:

1. Determinar el valor predictivo de respuesta, a la quimioterapia neoadyuvante en dosis densas, de la presencia de CTCs al inicio y tras el tratamiento (criterio citológico de respuesta, CYCAR) en pacientes diagnosticadas de cáncer de mama localizado.
2. Analizar el valor predictivo de respuesta, de la clasificación subrogada de Saint Gallen en cuatro subtipos histopatológicos de cáncer de mama, tratados con quimioterapia neoadyuvante administrada las antraciclinas en densidad de dosis.

## Objetivos secundarios:

1. Estudiar la relación entre la presencia de CTCs basales y los cuatro subtipos histopatológicos de cáncer de mama de la clasificación subrogada de Sant Gallen, y con las variables clínico-patológicas de valor pronóstico y predictivo conocidos.
2. Detectar la relación entre la presencia de CTCs basales y afectación axilar patológica o mediante BSGC.
3. Determinar el valor pronóstico de la detección de las CTCs en pacientes con cáncer de mama en estadio precoz, relacionándolo con el intervalo libre de enfermedad y la supervivencia global.
4. Analizar el valor pronóstico de de la clasificación subrogada de Saint Gallen, en cuatro subtipos histopatológicos en nuestra población, y determinar en ellos el valor pronóstico de las respuestas completas patológicas alcanzadas tras la quimioterapia neoadyuvante administrada las antraciclinas en densidad de dosis.





## **MATERIAL Y MÉTODOS**



# DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio prospectivo observacional.

## 1.-POBLACIÓN DE ESTUDIO

Las pacientes se reclutaron en la Unidad Clínica de Oncología Integral del Hospital San Cecilio de Granada. Las muestras se procesaron en el Centro GENYO, como laboratorio central.

Las mujeres que se incluyeron en el grupo control eran voluntarias sanas sin vinculación consanguínea con las pacientes reclutadas en el estudio, a las cuales se les tomó una muestra única de sangre, previa firma del consentimiento informado específico, con la finalidad de minimizar la existencia de falsos positivos en la detección de CTCs.

El periodo de reclutamiento se inició en mayo 2011 y concluyó en febrero de 2015.

### **-Criterios de inclusión:**

- Pacientes Mayores de 18 años.
- Estadio II o III de cáncer de mama confirmados histológicamente en el Hospital Univ. San Cecilio: Todas las pacientes fueron discutidas en sesión conjunta multidisciplinar antes de su inclusión en programa de tratamiento neoadyuvante.
- -Firma del consentimiento informado específico del estudio.
- -La confirmación histológica fue realizada con una biopsia.
- Para que un tumor fuera considerado Her-2 positivo debía mostrar sobre-expresión de 3+ por inmunohistoquímica o bien resultar positivo por FISH (técnica que se solicitó sistemáticamente a todas las pacientes Her-2 2+ por inmunohistoquímica).

### **-Criterios de exclusión:**

- -Presencia de metástasis.
- -Historia previa de cáncer, excluyendo el carcinoma de cervix in situ, y el de piel no melanoma.
- -Deficiente función de médula ósea, definida como un recuento absoluto de neutrófilos inferior a 1,500/uL o de plaquetas inferior a 100,000/uL.
- -Anormal funcionamiento renal (definido como creatinina sérica superior a 2.5 mg/100 ml) o hepático.
- -Pacientes con historia de fallo congestivo cardiaco o fracción de eyección del ventrículo izquierdo inferior al 45 %. Se solicitó fracción de eyección del ventrículo izquierdo por MUGA a todas las pacientes).

## **2. RECOGIDA DE LOS DATOS Y VARIABLES DEL ESTUDIO**

### **2.1. Descripción de variables independientes:**

#### **2.1.1. Variables clínicas e histopatológicas:**

- Datos relativos al paciente: edad, sexo, antecedentes personales y familiares de cáncer de mama, ECOG.
- Fecha de diagnóstico
- Tipo histológico
- Grado de diferenciación
- Receptores hormonales y biomarcadores tumorales:

Para la determinación de los receptores hormonales, se analizó mediante técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) realizadas en tejido fijado en formol al 10% e incluido en parafina. Se utilizaron anticuerpos primarios de conejo y ratón de laboratorio Dako Denmark A/S, Dinamarca).

Nos basamos en las recomendaciones de la ASCO y del CAP para la valoración de los receptores de estrógenos y progesterona (29, 30)

Se informó el porcentaje de células tumorales positivas de cualquier intensidad. Tumores con el 1% o más de células tumorales invasivas, se consideran como positivos, pues algunos trabajos demuestran que se pueden beneficiar del tratamiento.

- Receptores estrógenos: para la inmunodetección de los RE se utilizó un anticuerpo primario anti-RE de conejo (clona SP1; Master Diagnóstica S.L.
- Receptores progesterona: para la inmunodetección de los RP se utilizó un anticuerpo primario anti-RP de ratón (clona Y85; Master Diagnóstica S.L.
- p53
- HER2, mediante técnicas de IHQ se detecta la sobreexpresión de la proteína: para la inmunodetección se utilizó el Herceptest™ DakoCytomation Autostainer (Kits) que incluye anticuerpo policlonal de conejo anti Her2 (Dako Denmark A/S, Dinamarca) en una solución comercial prediluida, con un tiempo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente. Interpretación de los resultados por IHQ:
  - Negativo (0): Ausencia de tinción de membrana o tinción en menos del 10% de las células.
  - Negativo (1+): Tinción de membrana débil e incompleta en más del 10% de las células.
  - Equívoco (2+): Tinción completa de membrana, débil o moderada, en más del 10% o tinción completa e intensa en 10-30% de las células.
  - Positivo (3+): Tinción de membrana completa e intensa en más del 30% de las células.

Un resultado equívoco (2+) se sometía posteriormente a un estudio mediante hibridación (FISH o CISH). Así mismo, en casos de duda sobre la idoneidad de la técnica de IHQ. Interpretación de resultados del análisis por FISH:

- Negativo (No amplificado): Ratio de señales del gen HER2 frente a señales del cromosoma 17 menor de 1,8 ó  $< 4$  copias del gen HER2 por núcleo
- Positivo (Amplificado): Ratio de señales del gen HER2 frente a señales del cromosoma 17 mayor de 2,2 ó  $> 6$  copias del gen HER2 por núcleo
- Equívoco: Ratio de señales del gen HER2 frente a señales del cromosoma 17 entre 1,8 y 2,2.
  - No interpretable: Si ocurre alguna de las siguientes circunstancias:
    - No hay presencia de señales de una u otra sonda en al menos 20 células

- Si las señales son débiles o inexistentes en más del 25% de las células
- Los controles no se consideran óptimos
- No es posible valorar como mínimo dos áreas diferentes de carcinoma infiltrante

Al inicio del estudio en 2011, para la interpretación de la técnica se siguieron los siguientes criterios detallados anteriormente (27), pero los dos últimos años esta interpretación se ha modificado basándonos en las recientes recomendaciones de las Guías de Práctica Clínica de la American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists. (104)

- Marcadores de proliferación:
  - Ki-67, Ciclina D: Para la inmunodetección del marcador Ki 67 se utilizó un anticuerpo primario anti Ki-67 de conejo (Clona SP6; Master Diagnóstica S.L.). Este marcador interviene en la definición de los subtipos intrínsecos del cáncer de mama y puede modificar las pautas de tratamiento. Un índice de Ki67  $< 14$  ó  $\geq 14$  es lo que va a definir que un tumor RE-positivo HER2-negativo y que se clasifique como Luminal A o Luminal B respectivamente. Las últimas recomendaciones comentadas del grupo de expertos de St Gallen de 2011(18), establecen el punto de corte de Ki67 en 14% en base al trabajo de Cheang y cols. (105).
- Clasificación fenotípica del tumor, según la clasificación subrogada de los subtipos moleculares, intrínsecos de Chuck Perou, realizada en Sant Gallen 2011. (18) Definimos 4 de subtipos histopatológicos, basado en los patrones de expresión de receptores hormonales y la sobreexpresión o amplificación del gen HER2neu: tumores luminales A (RE+/REP+, Ki 67  $< 14\%$ , Her2-); Luminales B (RE+/REP+ con Ki 67  $>14\%$ , o con HER2+); tumores HER2, y triples negativos (TN).
- Estadio al diagnóstico:
  - TNM clínico

- Estadio clínico
- Si M1, localización anatómica de las metástasis
- Estadio Postquirúrgico
  - TNM postquirúrgico tras tratamiento neoadyuvante.
  - Ganglio centinela previo a la quimioterapia.
  - N° ganglios examinados/n° ganglios afectados
- Métodos diagnósticos:
  - Ecografía o Mamografía: si/no
  - PAAF: si/no
  - Biopsia: si/no
  - Estudio de extensión: gammagrafía ósea, eco abdominal, Rx Tórax, TAC
- Variables relacionadas con la CTCs:
  - Número CTCs; expresión citoqueratinas.

#### **Datos del tratamiento**

- Cirugía del tumor: si/no, tipo de cirugía, fecha
- Ganglio centinela: si/no, fecha
- Linfadenectomía axilar: si/no, fecha
- Radioterapia: si/no, fecha de inicio y fin
- Quimioterapia neoadyuvante: si/no, fecha de inicio y fin, esquema de QT (CMF, AC-Taxanos, ...)
- Tratamiento biológico: si/no, fecha de inicio y fin, tipo de tratamiento biológico
- Tratamiento hormonal: si/no, fecha de inicio y fin, tipo de tratamiento (neoadyuvante, adyuvante, paliativa) y fármaco utilizado
- Toxicidad: Utilizando criterios de toxicidad de la Common Terminology Criteria Adverse Events V-4.0

- Datos de seguimiento
- Enfermedad residual (sin periodo libre de enfermedad): si/no y fecha
- Segundo tumor primario: si/no, fecha y localización anatómica y tipo histológico
- Fecha de último contacto o de defunción
- Estado vital: vivo (con enfermedad/sin enfermedad) y muerto

## **2.2. Descripción de variables dependientes:**

- Datos de respuesta tumoral patológica al tratamiento quimioterápico neoadyuvante, según escala de Miller & Payne graduada del 1 al 5. (61) Clasificamos la respuesta como patológica completa (RCp), grado 5, vs. no respuesta completa, que incluye los grados del 1 al 4.
  - Escala de Miller & Payne:
    - Grado 1: Mínimos cambios celulares, sin reducción significativa de la celularidad tumoral invasiva.
    - Grado 2: Disminución discreta de la celularidad tumoral invasiva inferior al 30% de la masa tumoral.
    - Grado 3: Disminución significativa de la celularidad tumoral invasiva entre el 30 y 90 % de la masa tumoral.
    - Grado 4: Marcada disminución de la masa tumoral mayor del 90% con persistencia exclusiva de focos microscópicos.
    - Grado 5: Ausencia de células tumorales invasivas. El carcinoma in situ residual se clasifica en el sistema de Miller & Payne, como respuesta completa, en ausencia de componente infiltrante.
  - Respuesta patológica completa de ganglio y tumor:
    - Ausencia de células tumorales en la pieza mamaria, y ausencia de enfermedad en la axila.
    - En caso de pacientes con BSGC positiva al inicio y que tras QTN, el examen ganglionar axilar es negativo.
  - Respuesta clínica al tratamiento neoadyuvante: Evaluada mediante exploración física y mamografía previa a la cirugía. Fue clasificada como respuesta clínica completa VS no respuesta clínica completa.



- Presencia de CTCs basales: detección de CTCs en sangre periférica en la determinación realizada antes del inicio de la QTN
- Valoración de Respuesta por criterios citológicos (CYCAR): favorable vs. no favorable.

Extraída mediante la evaluación prospectiva, seriada de tres determinaciones de CTCs en sangre, previo durante y al finalizar la QTN, antes de la cirugía. Distinguimos dos categorías:

- La respuesta favorable, engloba pacientes que en las tres extracciones de sangre nunca expresan CTCs, como las pacientes que tienen presencia de CTCs en la determinación basal pero acaban negativizándose.
- Respuestas no favorables, incluyen a pacientes que nunca negativizan la expresión de CTCs en sangre durante el tratamiento, o las que teniendo ausencia de CTCs en la determinación inicial acaban presentando CTCs en las extracciones posteriores.
- Presencia de CTCs tras la cirugía, analizamos de manera prospectiva la mediante determinaciones seriadas de CTCs en sangre periférica a los 2 y a los 6 meses.
- Supervivencia libre de enfermedad (SLE): Tiempo expresado en meses que media entre la cirugía y la recaída locorregional o a distancia.
- Supervivencia global (SG): calculada como la diferencia entre la fecha de diagnóstico y la fecha de muerte por cualquier causa o de pérdida de seguimiento

Analizamos la relación con la SG y SLE de los diferentes fenotipos de cáncer de mama, según la respuesta patológica alcanzada, y según de la presencia de CTCs basales, de CTCs tras la QTN (respuesta citológica) y CTCs en sangre a los 2 y/o a los 6 meses tras la intervención quirúrgica

### 3. CRONOGRAMA DE LA INTERVENCIÓN:

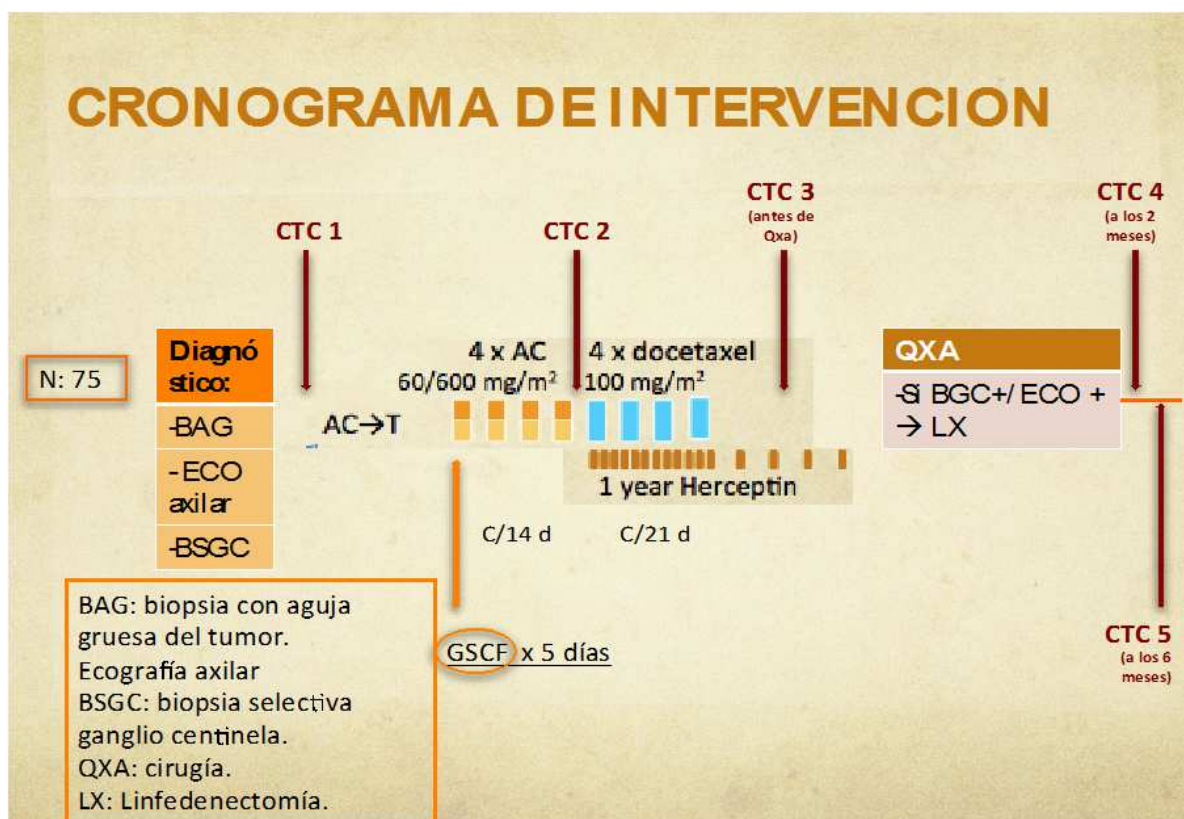
1. Estudio de extensión a todas las pacientes: historia clínica completa, examen físico, hemograma, bioquímica general, radiografía de tórax, ecografía abdominal y gammagrafía ósea. Se realizó mamografía de las dos mamas.
2. Realización de BSGC: A las pacientes con axila clínicamente negativa a la exploración y por ecografía al diagnóstico, se le realizó la BSGC previa al inicio de la QTN. Procedimiento BSGC explicado en introducción, basada en las recomendaciones del panel de expertos de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria , actualizado en 2013 (71):
3. Primera determinación en sangre de pacientes con cáncer de mama de células tumorales circulantes (CTCs) con la administración de quimioterapia preoperatoria: Doxorrubicina 60 mg/m<sup>2</sup>-Ciclofosfamida 600 mg/m<sup>2</sup>(AC) 4 ciclos, cada 15 días con soporte de pegfilgastrim.
4. Segunda determinación de CTCs antes de la administración del Docetaxel 100mg/m<sup>2</sup>(D) junto a trastuzumab (H), si existe sobre-expresión de Her-2, cada 21 días x 4 dosis. Trastuzumab 6 mg/Kg a partir de Taxotere, siguiendo en la irradiación y completando hasta un año.
5. Tercera determinación de CTCs previa a la cirugía.
6. Terapia local: entre la 2ª y 4ª semana después de completar el tratamiento neoadyuvante, cada paciente fue evaluada para el tipo de cirugía, entre las que incluyen: Lumpectomía, tumorectomía (ambas asociadas o no a radicalización si bordes afectados), cuadrantectomía, mastectomía simple, radical modificada o radical. A las pacientes que se consideraron candidatas apropiadas para cirugía conservadora se les ofreció dicha cirugía. Para las que no se consideraron candidatas apropiadas o que no deseaban cirugía conservadora se les realizó mastectomía radical modificada. A todas las pacientes con enfermedad clínica persistente en la axila al inicio o con BSGC positiva se les realizó linfadenectomía axilar.
7. Tratamiento con Radioterapia:
  - Todas las pacientes con cirugía conservadora de la mama recibieron

radioterapia con irradiación completa de la mama. de 40.05 Gy en 15 fracciones de 2,67 Gy con sobreimpresión de 10 Gy en 5 fracciones en casos de pacientes de edad inferior a 50 años o bordes microscópicamente afectados o bordes cercanos. La radioterapia no se ofreció a las pacientes con estadio clínico inicial que fueran tratadas con mastectomía y presentaran ganglios axilares negativos.

- Se procedió a irradiación de la mama y/o pared torácica +/- área SC y axila a la misma dosis en casos de tumor residual tras QT superior a 5 cm y/o muestreo axilar igual o superior a 3 ganglios linfáticos afectados.
- El tratamiento se efectuaba a partir de la 3ª a 6ª semana después de la Cirugía.

8. Cuarta determinación de CTCs: A los 2 meses de la intervención quirúrgica.

9. Quinta determinación de CTCs: A los 6 meses de la intervención quirúrgica.



**Figura 6.** Cronograma de la intervención.

## **4. PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS: MUESTRAS BIOLÓGICAS EMPLEADAS Y PREPARACIÓN**

### **4.1. Análisis realizados sobre las muestras de sangre**

Las muestras sanguíneas fueron recogidas en tubos heparinizados *CellSave®* (Veridex, Johnson & Johnson Company, LLC) y procesadas dentro de las 72 horas siguientes a su extracción. Para su transporte se adoptaron las medidas de bioseguridad, siguiendo el plan general de prevención de riesgos laborales de los Centros remitentes. Todas las muestras fueron identificadas con un código para preservar la confidencialidad de los sujetos donantes, según normativa vigente.

Las determinaciones analíticas que se realizaron sobre las dos muestras de sangre extraídas a las pacientes (una vez enriquecidas y fijadas sobre un porta las células tumorales circulantes presentes en ellas) fueron las siguientes:

- Muestra-1: expresión de citokeratinas, mediante tinción cromogénica enzimática, y receptor de estrógenos por tinción inmunofluorescente.
- Muestra-2: expresión del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), mediante doble tinción inmunocitoquímica.

#### **Controles positivos**

Para llevar a cabo este estudio científico, las técnicas de laboratorio empleadas fueron puestas a punto previamente sobre controles positivos. Estos se hacen de manera periódica y simultáneamente con las muestras de las pacientes.

Los controles positivos se diseñaron a partir de las muestras de sangre periférica donadas por voluntarios sanos que se mezclaron con un determinado número de células tumorales procedentes de tres líneas celulares de adenocarcinoma de mama obtenidas del American Type Culture Collection (ATCC): MDA MB-231, SKBR3 y MCF-7.

Los controles positivos permiten evaluar la sensibilidad de la metodología a la hora de aislar las células tumorales de la sangre periférica. Se pudo comprobar que la eficacia de la metodología rondaba entre el 50-58% de células recuperadas.

Se eligieron estas líneas porque presentan características diferentes.

- ✓ MCF-7: Esta línea celular se caracteriza por expresar receptores hormonales (RE+/RP+), EGFR y CD133. Presenta 3 copias del centrómero 17, dos copias del gen HER2 y dos copias del gen TOPO II $\alpha$ .
- ✓ MDA-MB-231: No expresan receptores hormonales ni el gen HER2 (son triple negativo: RE-/RP-/HER2-). Expresan el gen EGFR y CD133. En esta línea celular aparecen dos genotipos diferentes, un genotipo predominante (91.33%) que presenta trisomía para el centrómero 17 y un segundo genotipo, menos abundante en la población (8.67%) con tetrasomía para el centrómero 17. No aparece amplificación de ninguno de los genes (ratio medio respecto al CEP17 de 1.01 para ambos genes).
- ✓ SKBR-3: Esta línea celular no expresa receptores hormonales. Expresan el gen HER2 y EGFR. Presenta amplificación para el gen HER2 (número medio de copias  $25.87 \pm 7.39$ ) y amplificación para el gen TOPO II $\alpha$  ( $9.48 \pm 2.55$ ), respecto al CEP17. Son células con capacidad invasiva.

# 5 AISLAMIENTO, DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CTCs

## 5.1. Aislamiento y detección por selección positiva inmunomagnética:

### 5.1.1. Aislamiento

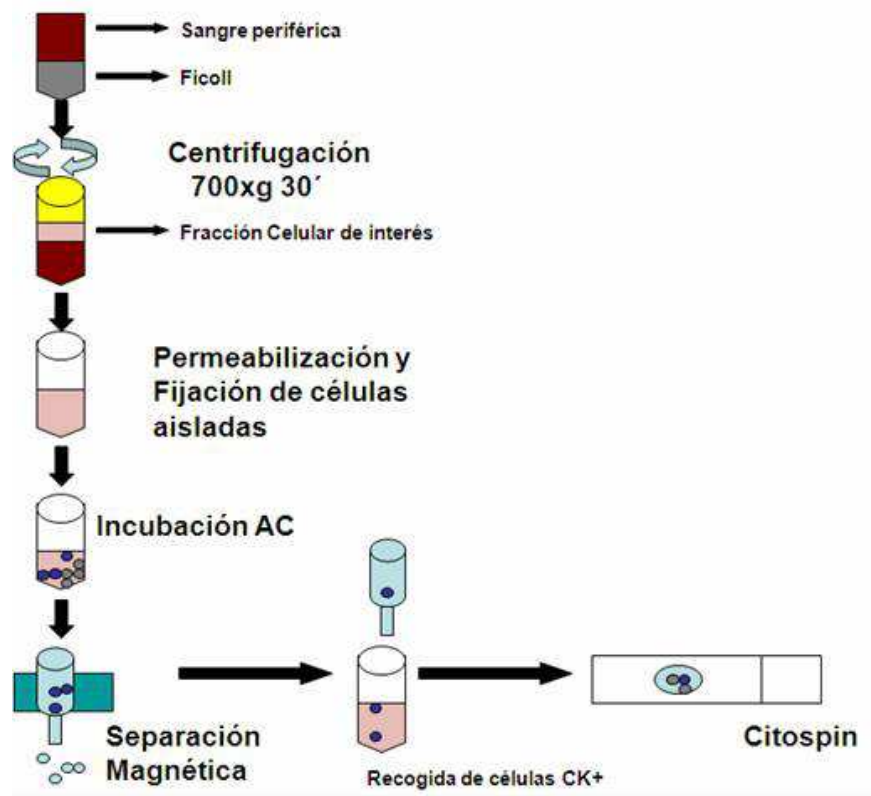
El almacenamiento de la muestra y su posterior análisis es realizado a temperatura ambiente (19-22° C). Se siguen los siguientes procesos:

- Preparación de la muestra.
- Marcaje magnético (incubación con el anticuerpo específico).
- -Selección inmunomagnética.

El método de aislamiento de células mononucleares, granulocitos y de células de origen epitelial presentes en sangre periférica se basa en la creación de un gradiente de densidad con ficoll (1119g/mL) que permite separar las células en función de sus diferentes densidades.

El gradiente se realiza vertiendo la muestra biológica (sangre periférica) sobre el ficoll; este proceso se hace muy lentamente para evitar que las dos fases se mezclen. La fuerza centrífuga a la que es sometida la muestra provoca que las células mononucleares, los granulocitos y otras células de semejante densidad queden retenidos en la interfase entre el plasma y la solución de ficoll de 1119 g/mL.

Una vez que las células mononucleares son separadas del resto de fracciones celulares de la sangre, mediante gradiente de ficoll, se procede a su marcaje y aislamiento por selección positiva inmunomagnética.



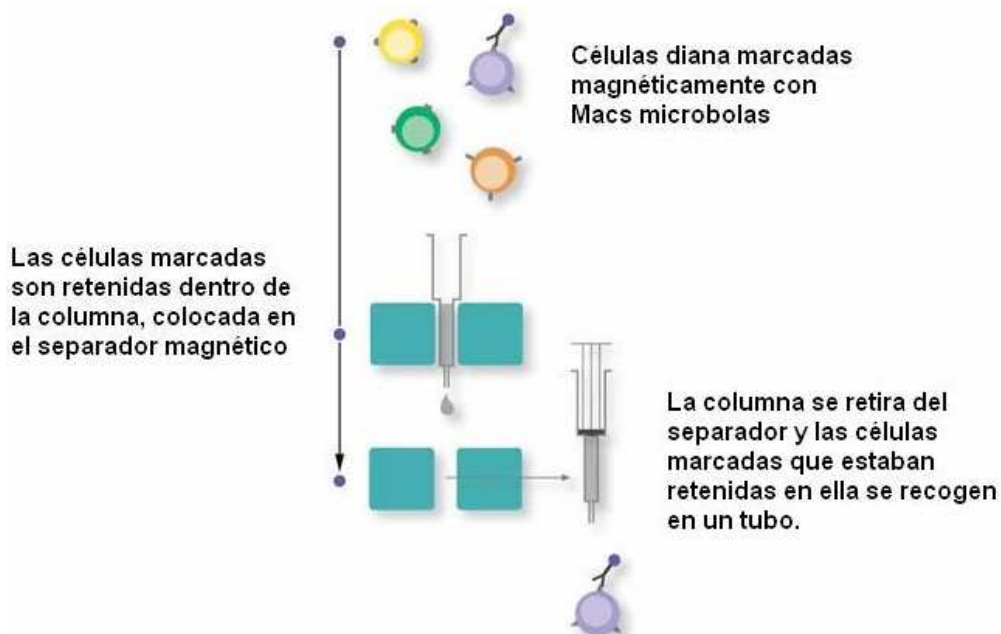
**Figura 7** Proceso de selección positiva inmunomagnética

### 5.1.2. Detección por selección positiva inmunomagnética:

El método de selección positiva inmunomagnética se basa en el aislamiento de las células diana dentro de una población heterogénea mediante la utilización del sistema MACS, que se basa en el uso de MACS<sup>®</sup> microesferas, MACS<sup>®</sup> Columnas y MACS<sup>®</sup> separadores (Miltenyi Biotec).

Las microesferas son partículas magnéticas de óxido de hierro de aproximadamente 50 nm de tamaño y biodegradables, las cuales no interfieren ni en la viabilidad, ni en la funcionalidad celular. Las microesferas están conjugadas con anticuerpos monoclonales, que reconocen específicamente las células epiteliales de interés, dirigidos contra la citokeratina CK-7, 8, 18 y 19.

Una vez marcadas, se aíslan mediante la utilización de las MACS columnas, colocadas sobre el separador magnético. Las columnas están diseñadas para soportar un alto campo magnético que permite que la fuerza magnética generada sea suficientemente fuerte para retener células marcadas con el anticuerpo conjugado con microesferas. La obtención de la población celular de interés se consigue mediante la liberación de la columna de su separador magnético siendo recogidas en tampón de elución. Este procedimiento retiene a las células de origen epitelial marcadas magnéticamente en la columna y deja pasar las células hematopoyéticas: selección inmunomagnética positiva.



**Figura 8.** Funcionamiento de columnas y el separador de MACS

Este sistema de separación celular basado en enriquecimiento inmunomagnético; permite seleccionar e identificar con mayor sensibilidad células tumorales diseminadas en sangre periférica, utiliza nanopartículas supermagnéticas unidas a anticuerpos específicos para marcadores de origen epitelial que no expresan las células hematopoyéticas maduras.

Los reactivos necesarios para el marcaje magnético y posterior selección vienen incluidos en el Kit de trabajo (Carcinoma Cell Enrichment and Detection Kit, Miltenyi Biotec).



### 5.1.3. Detección de CTCs mediante tinción cromogénica:

La detección de las células de origen epitelial circulantes presentes en sangre periférica está basada en un sistema de marcaje directo de la proteína mediante un anticuerpo anticitokeratina y empleando una tinción cromogénica enzimática. La presencia de marcadores de origen epitelial no debe detectarse en condiciones fisiológicas normales en sangre periférica.

Con esta metodología, el marcador específico utilizado es un anticuerpo pancitoqueratina. (CK3-11D5) que reconoce CTCs que expresan CK 7,8,18 and 19. La visualización de células tumorales, se realiza en un primer paso mediante una tinción cromogénica basada en una reacción enzimática provocada por la unión de la fosfatasa alcalina con su sustrato (Fast Red TR/Naphtol). Esta reacción produce un precipitado de color rojo permanente visible con microscopia convencional. La contra-tinción del núcleo se realiza con hematoxilina tipo Mayer's. La utilización de esta metodología permite detectar la citomorfología que presentan las CTCs, con un elevado ratio núcleo/citoplasma, mayor que el de los linfocitos. Criterios propuestos por Meng et al.(106)



**Figura 9.** CTCs teñida con tinción cromogénica y unida a linfocito.

- 1) Lavar en PBS y dejar secar al aire para visualizar en el microscopio de fluorescencia (Zeiss AXIOVER).

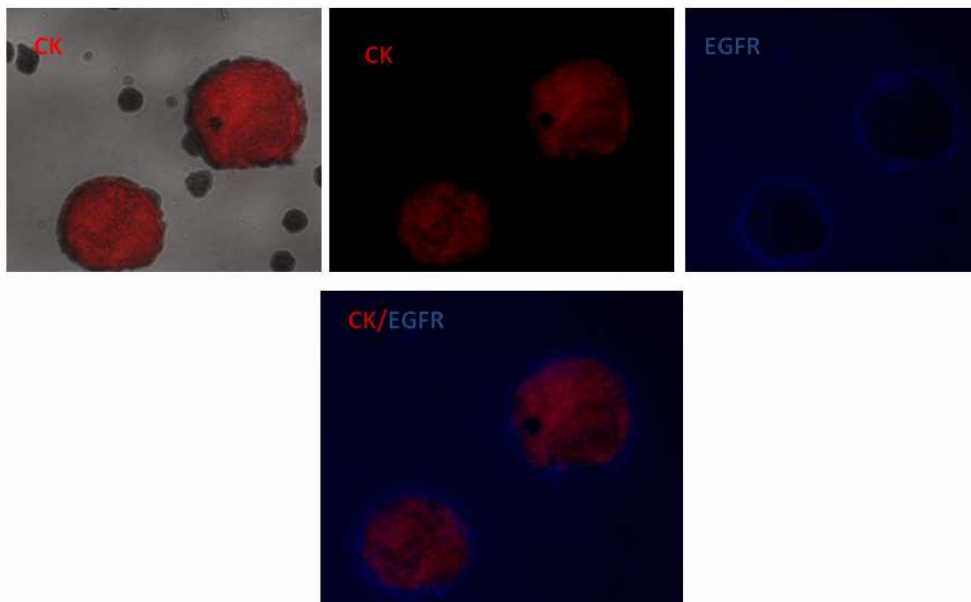
#### 5.1.4. Caracterización de CTCs por tinción inmunocitoquímica:

Se realiza una tinción inmunocitoquímica que nos permite la caracterización fenotípica de las células tumorales circulantes en sangre periférica. Utilizamos anticuerpos conjugados con fluorocromos, para el doble marcaje directo sobre el porta. El más empleado fue Alexa®, que presenta una fluorescencia azul.

El abanico de marcadores adicionales que se pueden utilizar es muy amplio e incluye tanto marcadores específicos de proteínas de superficie (por ejemplo: EGFR y CD133) como nucleares (por ejemplo: receptores hormonales, para estrógenos o progesterona) o intracitoplasmáticos (por ejemplo: citokeratinas).

Para evaluar los resultados se utiliza el microscopio de fluorescencia, Zeiss AXIO Imager.A1, with 20x, 40x, 63x and 100x oil immersion objective.

En nuestro caso, las CTCs con expresión de EGFR, mostraban un color azul en superficie.



**Figura 10:** 1<sup>a</sup>,2<sup>a</sup> CK+ en rojo. 3<sup>a</sup> EGFR+ en azul, 4<sup>a</sup>CK+ en rojo y EGFR+

## 6. ANALISIS ESTADÍSTICO

El método estadístico fue realizado utilizando el programa SPSS 14.0 (SPSS). De acuerdo con publicaciones anteriores se toma con valor umbral 1 célula tumoral circulante por cada 10 mililitros de sangre.

- **Análisis descriptivo:** Se ha realizado un análisis descriptivo de las principales variables estudiadas. Para las variables numéricas se calcularon las medidas de tendencia central, dispersión y posición. Para las cualitativas, frecuencias absolutas y relativas. Los datos se representarán en las correspondientes tablas y gráficos. Las variables categóricas fueron comparadas por la prueba exacta de Fisher, y las variables continuas se compararon mediante test de Student.
- **Análisis bivalente:** Para estudiar las variables que se relacionan con la respuesta patológica al tratamiento, la respuesta clínica, la presencia de CTCs basales y la respuesta citológica según la evolución de las CTCs, el intervalo libre de enfermedad y la supervivencia global. Se realizará el test de la T de student para muestras independientes en el caso de variables numéricas, y el test de la Chi-cuadrado de Pearson para las cualitativas. Previamente se comprobará la hipótesis de normalidad, con el fin de utilizar técnicas no paramétricas si fuese necesario.
- **Análisis multivalente:** Se realizó un modelo de regresión logística multivalente para cada una de las variables dependientes. Se calculó las OR y el intervalo de confianza al 95%. Así mismo, se calculará el test de Log-rang para comparar la supervivencia entre ambos grupos. Para todos los análisis se considerará significativo un valor  $p=0.05$ , con un intervalo de confianza del 95%. Y las curvas serán representadas mediante el método de Kaplan Meier.

## **7. CONSIDERACIONES ÉTICAS**

El estudio fue realizado siguiendo el código ético del Hospital Clínico San Cecilio de Granada, así como los principios y recomendaciones para la investigación biomédica con sujetos humanos, establecidos en la declaración de Helsinki (Asamblea General de la Asociación Médica Mundial, Helsinki, Finlandia 1964).

## **RESULTADOS**



# **I. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES:**

## **1.1. Características clínicas.**

En el presente estudio se incluyó un total de 75 mujeres con cáncer de mama localizado-locamente avanzado siendo válidas para el análisis 71. Se excluyeron 4 pacientes del análisis, 3 de ellas por progresión de la enfermedad durante la QTN sin completar el esquema de tratamiento previsto y 1 paciente por cambio de citotóxico en el esquema de quimioterapia establecido.

Las principales características clínico-patológicas de todas las pacientes incluidas en el estudio vienen reflejadas en la Tabla 1. La edad media de la población fue de 49 años (29-70), donde el 56 % de ellas eran premenopáusicas. El 75% de los tumores eran estadios T2-3 y el 57% tenían afectación ganglionar (50% cN1). El 70% de los tumores expresaban RE y el 58% RP en la IHQ, 21% de los tumores mostraban sobreexpresión del HER2 por IHQ o amplificación del gen por FISH. Según la clasificación fenotípica intrínseca encontramos que el 70% de los tumores eran luminales, (59% luminales A), un 8.5 % eran HER2 puros, y el 21% eran triple negativos.

**Tabla 1. Características clínico-patológicas**

		Número de pacientes (n total=71)	(%)
Estado menopausico	Pre	40	56,3
	Post	31	43,7
TNM clínico T	1	9	12,7
	2	37	52,1
	3	16	22,5
	4	9	12,7
TNM clínico N <sub>1</sub>	0	29	42,6
	1	34	50,0
	2	4	5,9
	3	1	1,5
Tipo histológico	Ductal	65	91,5
	Lobulillar	5	7,0
	Mucinoso	1	1,4
Clasificación fenotípica Perou	Tumor luminal A	8	11,3
	Tumor luminal B	42	59,2
	HER2	6	8,5
	Triple negativo	15	21,1
Grado de Diferenciación	Bien	15	25,4
	Intermedio	34	57,6
	Alto	10	16,9
Ki 67% <sub>2</sub>	< 14%	9	12,7
	≥ 14%	57	80,3
Receptores Estrogénicos	Negativo	21	29,6
	Positivo	50	70,4
Receptores Progesterona	Negativo	30	42,3
	Positivo	41	57,7
Her2	Negativo	56	78,9
	Positivo	15	21,1

Casos perdidos: TNM N<sub>1</sub>: 3 casos; ki67%<sub>2</sub>: 5 casos



## 1.2. Características del tratamiento.

El 97% de las pacientes completaron la QTN y en el 67,6% de ellas pudo ser administrada el total de los 4 ciclos de AC en densidad de dosis. El 18 % de las pacientes incluían en su tratamiento herceptin neoadyuvante junto a la administración de docetaxel, que posterior a la cirugía se continuó hasta completar un año.

Se llevó a cabo la BSGC en el 77,5% de la población, previo al inicio de la QTN, en el resto no estaba indicado por tener afectación clínica desde el principio realizándose linfadenectomía en el momento de la cirugía. De las BSGC realizadas hubo afectación neoplásica en el 49%. Finalmente, se realizó linfadenectomía en el 81,7% de la población. La cirugía conservadora fue posible en el 73,2 % de la población.

**Tabla 2. Características del tratamiento**

		Número de pacientes (N=71)	(%)
completan QT	No	2	2,8
	Si	69	97,2
Densidad de dosis	No	23	32,4
	Si	48	67,6
Herceptin neoadyuvante	No	57	80,3
	Si	13	18,3
Tipo Cirugía	Tumorectomía	52	73,2
	Mastectomía	19	26,8
BSGC PREQT	Negativo	20	28,2
	Positivo	35	49,3
	No indicado	16	22,5
Linfadenectomía	Si	58	81,7
	No	13	18,3

### 1.3. Detección de CTCs.

De las 71 pacientes incluidas, se detectaron CTCs previo al inicio de la QTN en el 32,4%, tras la administración de los 4 ciclos de AC en densidad de dosis en el 33,8% y al finalizar la QT en el 28,2% de ellas. En las siguientes tablas se refleja el contaje absoluto de CTCs en los diferentes momentos durante el estudio.

**Tabla 3. Detección secuencial de CTCs durante la QTN**

	CTC preQT 71 n(%)	CTC mitadQT 71 n(%)	CTC postQT 71 n(%)
Ausencia	48 (67,6)	38 (53,5)	40 (56,3)
Presencia	23 (32,4)	24 (33,8)	20 (28,2)
Pérdidas	0	9 (12,7)	11 (15,5)

**Tabla 3.1 Contaje CTCs previo a la quimioterapia.**

Número de CTC N=71	Frecuencia	Porcentaje (%)
0	48	67,6
1	7	9,9
2	5	7,0
3	4	5,6
4	2	2,8
5	2	2,8
6	1	1,4
7	1	1,4
9	1	1,4
Total	71	100,0

**Tabla 3.2 Contaje CTCs mitad de tratamiento.**

		Frecuencia	Porcentaje (%)
Válidos	0	38	53,5
	1	3	4,2
	2	8	11,3
	3	3	4,2
	4	6	8,5
	5	1	1,4
	6	2	2,8
	16	1	1,4
	Total	62	87,3
Perdidos		9	12,7
Total		71	100,0

**Tabla 3.3 Contaje CTC tras QT**

		Frecuencia	Porcentaje (%)
Número de CTC	0	40	56,3
	1	6	8,5
	2	4	5,6
	3	2	2,8
	4	4	5,6
	5	3	4,2
	33	1	1,4
	Total	60	84,5
Perdidos		11	15,5
Total		71	100,0

## **II. RELACIÓN ENTRE LOS SUBTIPOS HISTOPATOLÓGICOS Y LA RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE EN DENSIDAD DE DOSIS.**

Incluimos un total de 75 mujeres con cáncer de mama localizado-locamente avanzado, siendo válidas para el análisis del objetivos 71. De ellas, 4 pacientes se excluyeron del análisis: 3 porque en el estudio de extensión se detectó enfermedad metastásica antes de empezar la QTN sin poderse analizar la RP al no operarse, y 1 paciente por cambio en el esquema de quimioterapia establecido.

Las siguientes tablas muestran la relación entre los distintos subtipos histopatológicos según la clasificación inmunohistoquímica subrogada de Saint Gallen 2011 y las respuestas clínicas y patológicas completas patológicas (RCp) al tratamiento con la QTN en densidad de dosis. Las respuestas patológicas se analizaron tanto en el tumor como en el tumor y en el ganglio axilar conjuntamente. El análisis estadístico utilizado para ver la relación entre los diferentes fenotipos con el grado de respuesta a la quimioterapia, fue el test de Chi-Cuadrado de Pearson. Además buscamos las posible asociación con la respuesta patológica completas a la QTN, de los tumores triple negativos (TN) vs el resto, los tumores Luminales vs el resto, y los tumores HER2 puros vs el resto.

En el análisis obtuvimos un 25,7% (19/74) de respuestas clínicas, pero no se encontró asociación estadísticamente significativa entre los distintos fenotipos de tumores y las respuesta clínica a la QTN. (Tabla 4).

**Tabla 4. Relación Clasificación fenotipos tumorales con Respuesta Clínica.**

Fenotipos N: 74 (100,0%)	Respuesta Clínica* N (%)		Valor p
	Completa 19 (25,7)	Parcial+Estabilizaciones+Progresiones 55 (74,3)	
Tumor luminal A	1 (11,1)	8 (88,9)	0,657
Tumor luminal B	11 (25,6)	32 (74,4)	
HER2	2 (33,3)	4 (66,7)	
Triple negativo	5 (31,3)	11 (68,8)	

En el análisis bivariante las variables que se relacionaron con la RCp de manera significativa fueron la clasificación subrogada de Saint-Gallen 2011 ( $p= 0,05$ ), siendo los fenotipos más respondedores los HER2-puros (50% de ellos con RCp) y los TN (con un 46,7% de RCp); la sobreexpresión de HER2 ( $p: 0,016$ ); el tener RE negativos ( $p= 0,013$ ); y los RP negativos ( $p= 0,001$ ). No se realizó análisis multivariante, al ser las variables clínicas que demostraron relación con la RCp, parte de las usadas para realizar la agrupación por subtipos de cáncer de mama. Agrupando los subtipos histopatológicos, observamos diferencias significativas en los tumores TN con mayor tasa de RCp (46,7%) en comparación con el resto de tumores luminales y HER2 (tasa de RCp del 19,6%). ( $p=0.046$ ) No hubo diferencias estadísticamente significativas al analizar los HER2 puros por separado por el pequeño número de pacientes incluidos. (Tabla 5).

**Tabla 5 Relación Clasificación fenotipos tumorales con Respuesta patológica Miller & Payne en el tumor.**

		Respuesta patológica Miller & Payne n (%) * N=71 (100%)		Valor p
		Grado 5 n (%) 18 (25,4)	Grados 1-4 n (%) 53(74,6)	
<b>Fenotipos</b>	<b>Luminal A</b>	1 (12,5)	7 (87,5)	0,05
	<b>Luminal B</b>	7 (16,7)	35 (83,3)	
	<b>HER2</b>	3 (50,0)	3 (50,0)	
	<b>Triple negativo</b>	7 (46,7)	8 (53,3)	
<b>Fenotipos</b>	<b>Luminal+HER2</b>	11 (19,6)	45 (80,4)	0,046
	<b>Triple negativo</b>	7 (46,7)	8 (53,3)	
<b>HER2</b>	<b>Negativo</b>	10 (17,9)	46 (82,1)	0,016
	<b>Positivo</b>	8 (53,3)	7 (46,7)	
<b>Receptores Estrogenos</b>	<b>Negativo</b>	10 (47,6)	11 (52,4)	0,013
	<b>Positivo</b>	8 (16,0)	42 (84,0)	
<b>Receptores Progesterona</b>	<b>Negativo</b>	14 (46,7)	16 (53,3)	0,001
	<b>Positivo</b>	4 (9,8)	37 (90,2)	
<b>Ki-67</b>	<b>&lt; 14%</b>	3 (33,3)	6 (66,7)	0,684
	<b>≥ 14%</b>	14 (24,6)	43 (75,4)	

En la tabla 6 se muestra el análisis de las respuestas patológicas determinadas en el tumor y en el ganglio. Nuestra población alcanzó un 21,1% (15/71) de RCp en el tumor y en el ganglio. No se encontró esta asociación al evaluar conjuntamente, aunque la población que más porcentaje obtuvo fueron los tumores TN 40,0% y los HER2 y Luminales B 16,7% y los luminales A 12.5%, p: 0 ,247. También observamos mayor porcentaje de RCp en los tumores TN vs el resto, 40% vs 16,1 %, aunque aquí no se alcanzó la significación estadística. p: 0 ,071. Tampoco se encontró asociación al comparar el subtipo subrogado Luminal vs el resto (p= 0,120), ni con los tumores HER2 vs el resto (tablas no mostradas)

**Tabla 6. Relación Clasificación fenotipos con Respuesta patológica Miller & Payne en el tumor y los ganglios axilares**

Fenotipos N: 71 (100,0%)	Respuesta Patológica Miller & Payne T+N N (%) *		Valor p
	Grado 5 (Completa)	Grado 1 a 4	
	15 (21,1)	56 (78,9)	
Tumor luminal A	1 (12,5)	7 (87,5)	0,247
Tumor luminal B	7 (16,7)	35 (83,3)	
HER2	1 (16,7)	5 (83,3)	
Triple negativo	6 (40,0)	9 (60,0)	
Luminal+HER2	9 (16,1)	47 (83,9)	0,071
Triple negativo	6 (40,0)	9 (60,0)	

### **III. RELACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DE CTCs BASALES CON LAS CARACTERÍSTICAS CLINICO-PATOLÓGICAS DE INTERÉS.**

En la tabla 7, se muestra la relación entre la presencia de CTCs en sangre previo al inicio de la QTN Basal, con las variables clínico-patológicas conocidas y con la clasificación por subtipos histopatológicos. No se halló ninguna relación significativa en este análisis.

Observamos que el estadio T1, era el que presentaba más tasa de detección de CTCs respecto al resto de estadios (55,6% presencia vs 44,4% de ausencias). Los tumores N0 eran los que mayor presencia de CTCs tenían, en un 34,5%. El único tumor mucinoso de la población tenía CTCs en el momento basal. En los tumores lobulillares el porcentaje de presencia de CTCs fue mayor que en los ductales. (40% vs 30,8%). Los tumores bien diferenciados presentaron CTCs en un 40%, en comparación con los moderado-mal diferenciados que tenían un 34,1% de presencia.

Al analizar el porcentaje de Ki67, observamos que los tumores con un valor de  $ki67 \geq 14\%$ , tenían mayor presencia de CTCs que aquellos con un  $Ki67 < 14\%$  (33,3 % vs 22,2%), aunque estas diferencias no fueron significativas. Los tumores que sobreexpresaban HER2, independientemente de los RH, tenían una tasa de detección de CTCs ligeramente mayor que los HER2 negativos (33,3% vs 32%). Los tumores que expresaban receptores hormonales tenían mayor presencia de CTCs, en comparación con los RH- (34 % vs 28,6%). Al analizar la relación de las CTCs con la variable clasificación según los subtipos histopatológicos de Chuck-Perou-like, comprobamos que los tumores HER2-puros eran los que más tasa de detección de CTCs presentaban, en un 66,5%, seguidos de los Luminales B con un 38,1%, de los TN con un 33,3% y por último, los Luminales A con una tasa de detección del 12,5%.



Tabla 7. Relación entre la presencia de CTCs basales con las características clínico-patológicas de la población y con la clasificación por subtipos histopatológicos.

\* Prueba de Levene para la igualdad de varianzas.

		CTC basal N = 71			p
		Ausencia N= 48	Presencia N= 23	Total N= 71 N (%)	
Edad al diagnóstico Media (± Desviación típica)		49,10 (±9,213)	48,39 (±10,68)		*0,78
TNM clínico T N (%)	1	4 (44,4)	5 (55,6)	9 (12,7)	0,387
	2	25 (67,6)	12 (32,4)	37 (52,1)	
	3	12 (75,0)	4 (25,0)	16 (22,5)	
	4	7 (77,8)	2 (22,2)	9 (12,7)	
TNM clínico <sub>1</sub> N	0	19 (65,5)	10 (34,5)	29 (42,6)	0,888
	1	23 (67,6)	11 (32,4)	34 (50,0)	
	2	3 (75,0)	1 (25,0)	4 (5,9)	
Tipo histológico	3	1 (100,0)	0 (0)	1 (1,5)	0,317
	Ductal	45 (69,2)	20 (30,8)	65 (91,5)	
	Lobulillar	3 (60,0)	2 (40,0)	5 (7,0)	
Grado de Diferenciación	Mucinoso	0 (0)	1 (100,0)	1 (1,4)	0,920
	Bien	9 (60,0)	6 (40,0)	15 (25,4)	
Ki 67 ) <sub>2</sub>	Intermedio- Alto	29 (65,9)	15 (34,1)	44 (75,6)	0,707
	< 14)	7 (77,8)	2 (22,2)	9 (12,7)	
Clasificación fenotípica C. Perou	≥ 14)	38 (66,7)	19 (33,3)	57 (80,3)	1
	luminal A	7 (87,5)	1 (12,5)	8 (11,3)	
	luminal B	26 (61,9)	16 (38,1)	42 (59,2)	
	HER2	2 (33,3)	4 (66,7)	6 (8,5)	
HER2	Triple negativo	13 (86,7)	2 (13,3)	15 (21,1)	1
	Negativo	38 (67,9)	18 (32,1)	56 (78,9)	
Receptores estrogénicos	Positivo	10 (66,7)	5 (33,3)	15 (21,1)	0,784
	Negativo	15 (71,4)	6 (28,6)	21 (29,6)	
	Positivo	33 (66,0)	17 (34,0)	50 (70,4)	

- Casos perdidos: <sub>1</sub> TNM N: 3casos. <sub>2</sub> ki67 5 casos

## IV. VALOR PREDICTIVO DE RESPUESTA A LA QT NEOADYUVANTE EN DENSIDAD DE DOSIS DE LA CTC EN CÁNCER DE MAMA LOCALIZADO.

### OBJETIVO PRIMARIO

#### 4.1. Relación presencia CTCs basales con la respuesta clínica:

Analizamos las respuestas clínicas y la presencia de CTCs basales en 71 pacientes. Observamos 19 respuestas clínicas completas, de las que un 58% no presentaban CTCs al inicio. En el análisis se apreció que no existía relación significativa entre ambas variables. (Tabla 8)

**Tabla 8. Relación presencia de CTCs basales y respuesta a la QTN.**

		CTCs basal N=71 n (%)		p
		Ausencia 48	Presencia 23	
Respuesta Clínica	Parcial+Estabilización+ Progresión n:51	36 (70,6)	15 (29,4)	0,472
	Completa n:19	11 (57,9)	8 (42,1)	
Respuesta Patológica en tumor Miller & Payne	Grado 5 (respuesta completa) n:18	12 (66,7)	6 (33,3)	1,000
	Grado 1-4 n:53	36 (67,9)	17 (32,1)	
Respuesta Patológica (N+T)	Completa n:15	11 (73,3)	4 (26,7)	0,759
	Resto respuestas n:56	37(66,1)	19 (33,9)	

#### **4.2. Relación CTCs basales con la respuesta patológica Miller & Payne en el tumor, y analizando la respuesta en el tumor y en el ganglio.**

En 71 pacientes se analizó la respuesta completa patológica tras la cirugía y se determinó la presencia de CTCs al inicio del tratamiento. Apreciamos 18 RCp, grado 5 de M&P, de las que 12 (66,7%), tenían ausencia de CTC basales. Esta relación no fue significativa.

Cuando analizamos las respuestas completas en el tumor y en el ganglio hallamos que sólo 15 de las pacientes la presentaban, de las cuales 11 RC (73%) tenían ausencia de CTCs en sangre en la determinación basal, encontrándose esta relación no significativa. (Tabla 8)

#### **4.3. Relación entre la respuesta patológica del tumor a la QTN y la respuesta citológica, por CTCs**

Sólo se pudieron extraer las tres determinaciones secuenciales de CTCs (previo a la QTN, tras 4 ciclos de AC, y posterior a la QTN) a 60 de las pacientes, de las 71 pacientes iniciales que completaron el tratamiento de QTN y fueron intervenidas. Se excluyeron 11, ya que rechazaron continuar con extracciones sanguíneas o se intervinieron en centros externos.

Así, 40 pacientes mostraban una evolución favorable citológica, debido a que desaparecían la CTCs o nunca se detectaban tras la QTN. Mediante el test de Chi cuadrado comprobamos si existía relación entre las respuestas completas patológicas a la QTN en el tumor y la respuesta favorable citológica tras recibir el tratamiento.

Observamos que en las pacientes con RCp, era más frecuente hallar una respuesta favorable citológica que en las que no alcanzaban RCp, (76,9% vs 3,8%). Esta relación no fue significativa. (Tabla 9). Esta misma distribución se reflejó al evaluar el grado de respuesta en el tumor y el ganglio. Sólo 10 de las pacientes alcanzaron RCp en el tumor y en el ganglio, siendo mayor el

porcentaje de respuestas citológicas favorables en ellas: RCp (80%), en comparación con la población sin RCp(64%).

**Tabla 9. Relación entre la respuesta patológica y la citológica a la QTN.**

		Respuesta citológica *		p
		n=60		
		Desfavorable 20 (33,3)	Favorable 40 (66,7)	
Respuesta Patológica tumor Miller&Payne	Grado 5 (respuesta completa) n: 13	3 (23,1)	10 (76,9)	0,513
	Grado 1-4 n: 47	17 (36,2)	30 (63,8)	
Respuesta Patológica (N+T)	Completa n: 10	2 (20,0)	8 (80,0)	0,471
	Resto respuestas n: 50	18 (36,0)	32 (64,0)	

\* Respuesta citológica: favorable: ausencia de CTCs tras QTN vs. Desfavorable: presencia de CTC tras la QTN.

También medimos la concordancia entre ambas metodologías de evaluación de respuesta a la QTN mediante el análisis Kappa, observando que existe una baja concordancia entre la evaluación de respuesta mediante la determinación evolutiva de CTCs y la manera estándar de evaluación patológica de M&P, con un valor de kappa de 0,4500.

## V. RELACIÓN ENTRE AFECTACIÓN GANGLIONAR AXILAR Y LA PRESENCIA DE CTCs.

### 5.1. RELACIÓN CTC BASAL Y AFECTACIÓN GANGLIONAR AXILAR, MEDIANTE BSGC

En 55 de 71 pacientes se realizó BSGC y se pudo analizar la presencia de CTCs basales. Resultaron 35 BSGC positivas para afectación neoplásica. Observamos que en aquellas pacientes con BSGC positiva la presencia de CTCs previas al inicio de la QT, era mayor que en las pacientes con BSGC negativa, 37,1% y 20 % respectivamente, aunque no se alcanzó la significación estadística. (Tabla 10).

**Tabla 10. Relación CTCs basal y afectación ganglionar axilar, mediante BSGC PREQTN.**

		CTC basal		Valor p
		Ausencia 38 (69,1)	Presencia 17 (30,9)	
BSGC PREQT N= 55	Negativo	16 (80,0%)	4 (20,0%)	0,308
	Positivo	22 (62,9%)	13 (37,1%)	

## 5.2. RELACIÓN AFECTACIÓN AXILAR PATOLÓGICA Y PRESENCIA DE CTCs BASAL.

En el análisis adicional realizado para relacionar la afectación ganglionar axilar tras la linfadenectomía con la presencia de CTCs al diagnóstico, observamos que de las 71 pacientes incluidas, se realizaron 58 linfadenectomías, ya fuera por tener BSGC positiva al inicio o bien por tener clínicamente afectación axilar al diagnóstico, y en estas pacientes hubo mayor presencia de CTCs al inicio de tratamiento, que las que no precisaron linfadenectomías. En este caso se observó que el 37,9 % de las pacientes tenían presencia CTCs vs 7,7% que no la presentaban, siendo esta diferencia significativa ( $p= 0,048$ ). (tabla11).

**Tabla 11. Relación CTCs basal y afectación axilar patológica.**

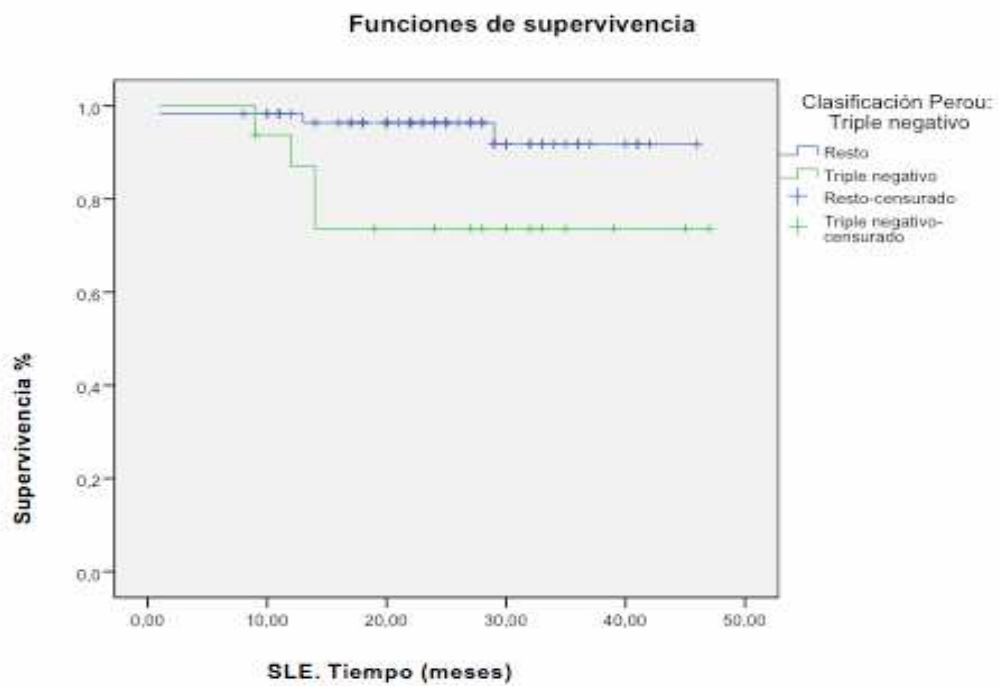
			CTC basal		Valor de p
			Ausencia 48 (67,6%)	Presencia 23 (32,4%)	
AFECTACIÓN AXILAR PATOLÓGICA N= 71 (100%)	Si	Recuento % de LINFADENECTOMIA	36 (62,1%)	22 (37,9%)	0,048
	No	Recuento % de LINFADENECTOMIA	12 (92,3%)	1 (7,7%)	

## **VI. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA DE LA POBLACIÓN.**

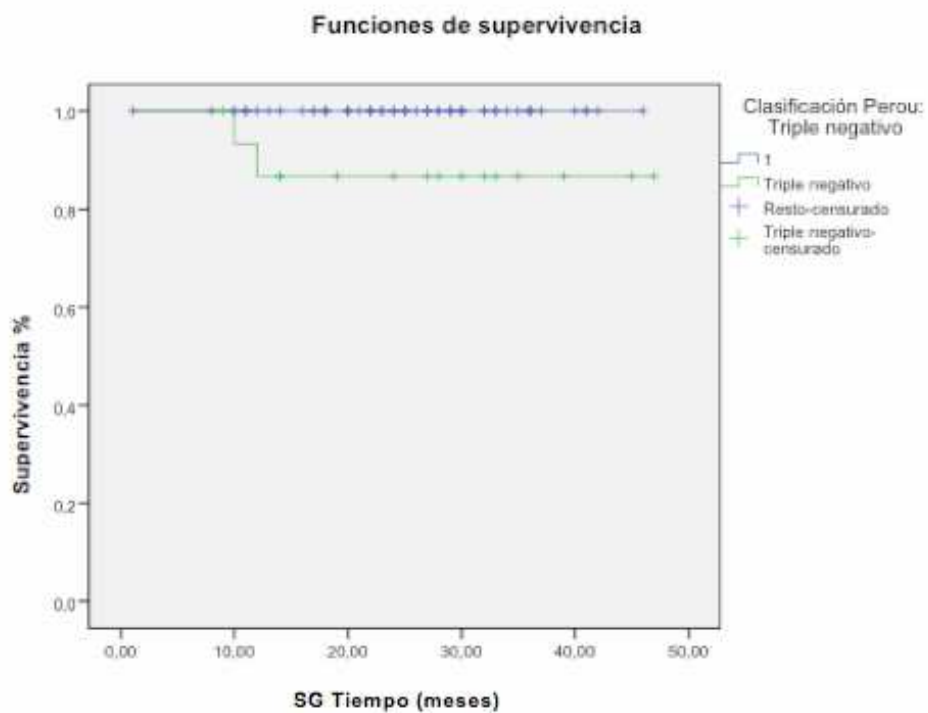
### **6.1 ANÁLISIS DE SLE Y SG SEGÚN EL SUBTIPO HISTOPATOLÓGICO DE CÁNCER DE MAMA.**

Incluimos al total de la población, 75 pacientes, para el análisis de supervivencia global (SG) y supervivencia libre de enfermedad como (SLE) según la clasificación por los cuatro fenotipos inmunohistoquímicos de cáncer de mama. Con una mediana de seguimiento de 45 meses, las dos muertes observadas y 4 de las 6 recidivas ocurrieron en el fenotipo TN. Al comparar la evolución para los diferentes fenotipos histológicos, observamos que los tumores TN tenían significativamente menor SLE en comparación con el resto ( $p= 0,022$ ). De manera que a 30 meses de seguimiento la SLE fue del 71,8% en TN vs el 93,3% en el resto de pacientes. Estas diferencias también fueron significativas para la SG, ( $p= 0,006$ ), con un 100% de pacientes vivos en el subtipo no TN vs un 85,7% en el TN, a 30 meses de mediana de seguimiento (Figuras 11 y 12). Durante el tiempo de observación de este estudio no se alcanzó la mediana de supervivencia global ni libre de enfermedad. No se calcularon las medias de supervivencia y sus correspondientes intervalos por no acontecer eventos suficientes (exitus en el caso de SG, o recaídas y éxitus en el caso de SLE), el subgrupo “no TN”.

**Figura 11.** Curvas de SLE. Kaplan Meier según los subtipos histopatológicos de cancer de mama.



**Figura 12.** Curvas de SG Kaplan Meier según los subtipos histopatológicos de cancer de mama.

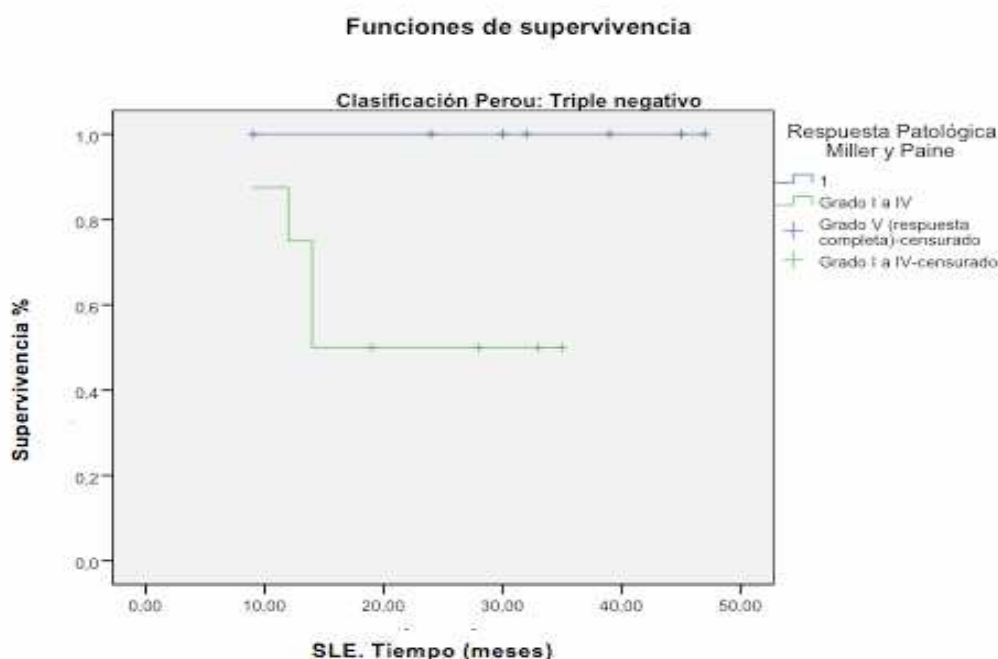




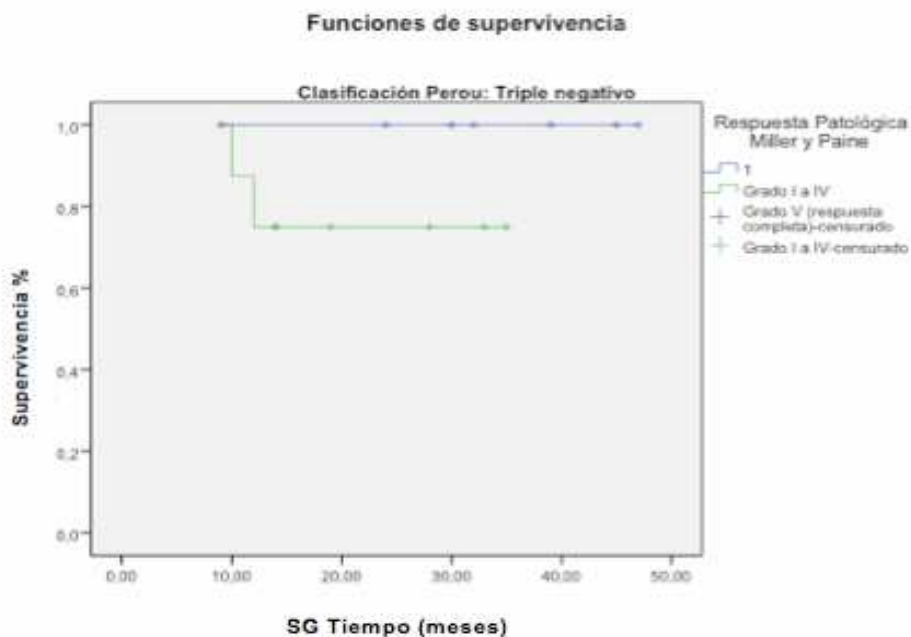
## 6.2. VALOR PRONÓSTICO DE LA RCp EN LOS DIFERENTES SUBTIPOS DE CÁNCER DE MAMA TRATADOS CON QTN EN DENSIDAD DE DOSIS.

Utilizamos el análisis estratificado de Cox para hallar las diferencias en SG y la SLE de los diferentes subtipos de cáncer de mama, según alcanzaran una RCp de M&P (grado 5) en comparación con el resto de respuestas patológicas (grado 1 al 4). Los tumores TN fueron los únicos que mostraron relación significativa entre RCp y SLE, con mayor SLE en aquellos con RCp ( $p= 0,048$ ) (grado 5). De modo que la SG y SLE a 30 meses fue del 100% en los pacientes TN que habían alcanzado una RCp tras la QTN (Figuras 13 y 14). En el resto de subtipos no hubo diferencias de SG o SLE entre los pacientes que habían alcanzado o no una RCp (datos no mostrados). Tampoco se alcanzó la mediana de SG o SLP en los pacientes de fenotipo no TN. No se pudo realizar un análisis multivariante, ajustando por otras de variables valor predictivo y pronóstico conocido, como la edad, el T, el N. por no haber eventos suficientes por cada variable de estudio.

**Figura 13.** Curvas de SLE. Kaplan Meier según grado de respuesta patológica Miller y Payne en los subtipos histopatológicos de cancer de mama Triple Negativo



**Figura 14.** Curvas de SG Kaplan Meier según grado de respuesta patológica Miller y Payne en los subtipos histopatológicos de cancer de mama Triple Negativo



### 6.3 ANÁLISIS DE SLE Y SG SEGÚN LA PRESENCIA DE CTCs BASALES.

Analizamos la SLE y la SG según la presencia o ausencia de CTCs al diagnóstico, en 75 pacientes. Hubo 2 muertes en pacientes con ausencia de CTCs, y 6 progresiones de la enfermedad, 5 de ellas en pacientes sin CTCs basales, durante los 4 años de seguimiento. Mediante el método de Kaplan-Meier no hallamos diferencias significativas en SLE ( $p= 0,243$ ) ni en SG ( $p= 0,301$ ) entre ambas poblaciones (Figuras 15 y 16).

Figura 15. Curvas de SLE. Kaplan Meier según la presencia de CTCs basales.

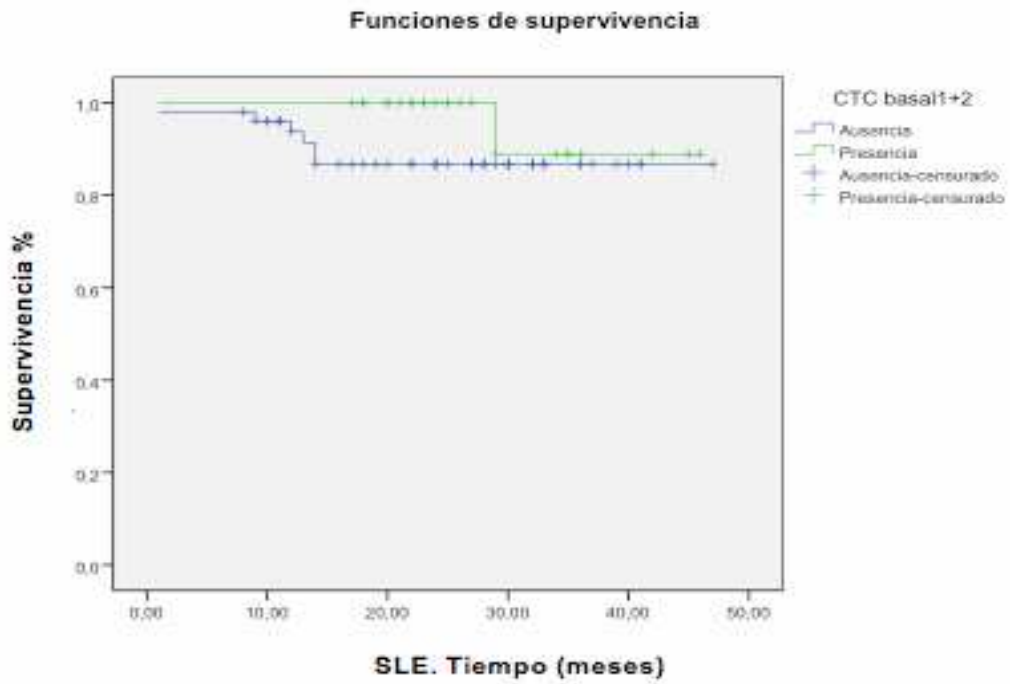
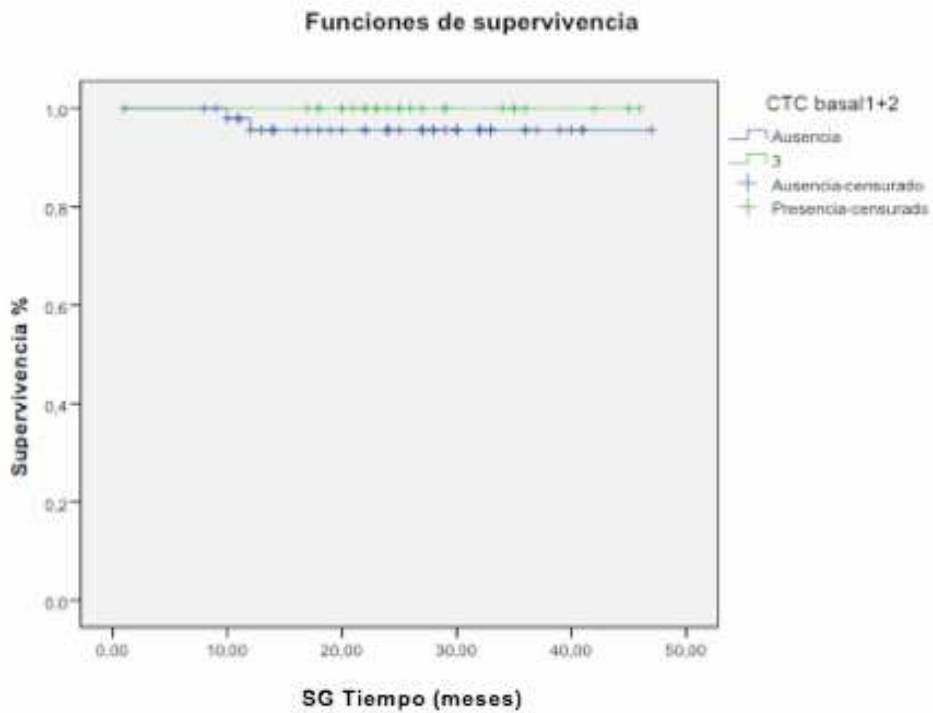


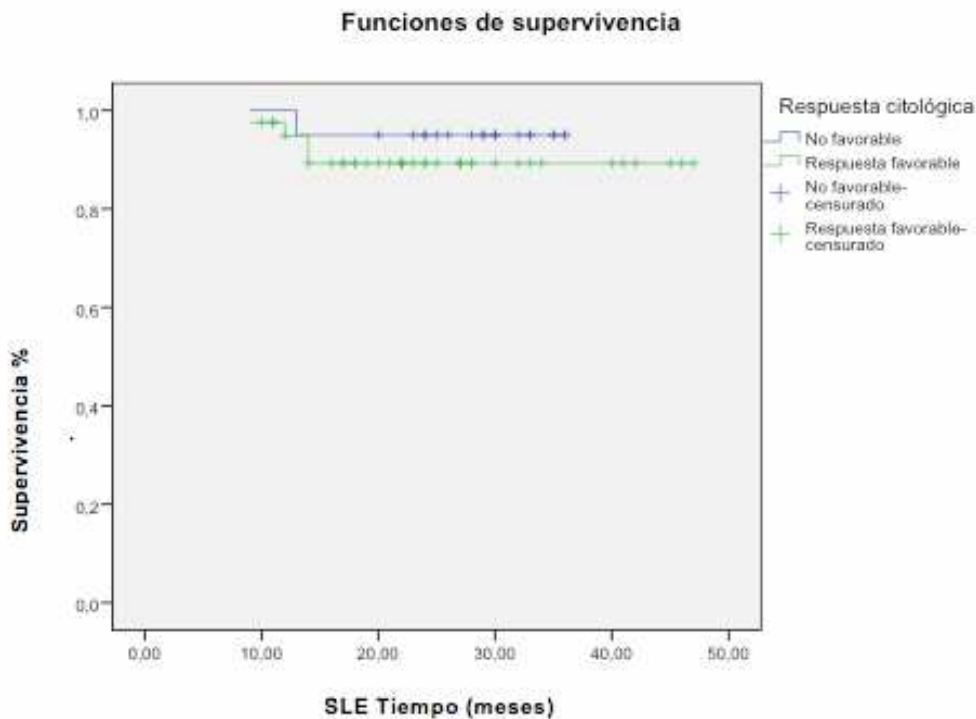
Figura 16. Curvas de SG. Kaplan Meier según la presencia de CTCs basales,



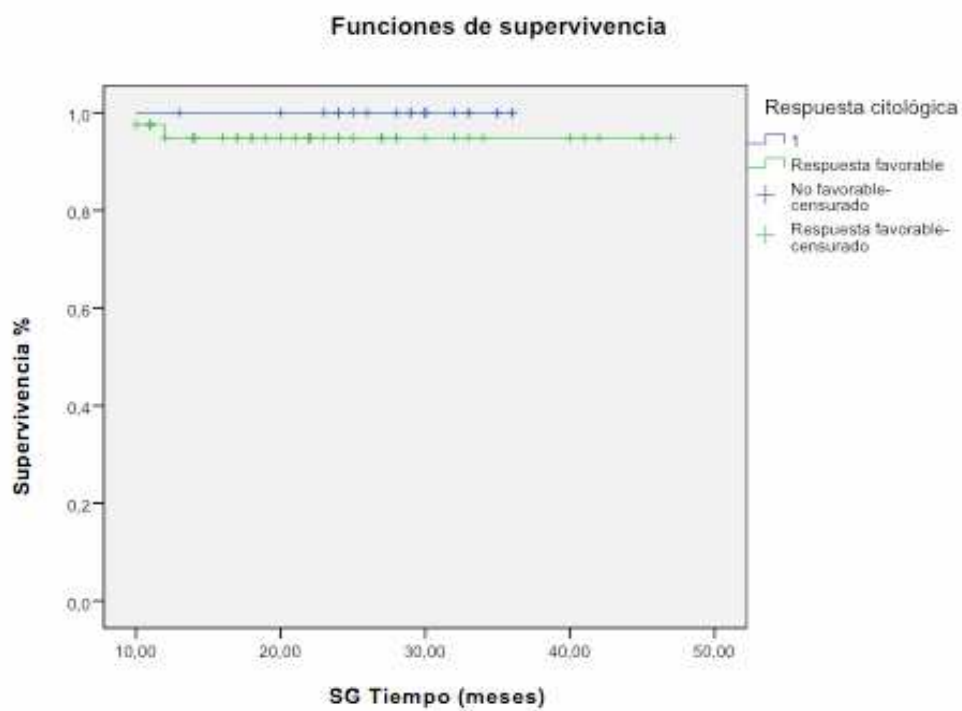
## 6.4 ANÁLISIS DE SLE Y SG SEGÚN LA RESPUESTA CITOLÓGICA.

En 61 pacientes analizamos la respuesta citológica, midiendo la presencia de CTCs en las 3 determinaciones seriadas, la última después de finalizada la QTN y previa a la cirugía. Las dos muertes y las cinco recaídas acontecieron en su mayoría en pacientes con una evolución citológica favorable, (ausencia de CTCs tras la QTN). No se apreciaron diferencias significativas en SLE ( $p= 0,468$ ) ni en SG ( $p= 0,307$ ) entre las pacientes que presentaban una respuesta citológica favorable en comparación con las que continuaban mostrando CTCs en la sangre tras haber completado el tratamiento citotóxico. (Figuras 17 y 18)

**Figura 17.** Curvas de SLE. Kaplan Meier según la respuesta citológica.



**Figura 18.** Curvas de SG Kaplan Meier según la respuesta citológica.





**DISCUSIÓN**





El éxito de la QT preoperatoria o neoadyuvante (QTN) en cáncer de mama localmente avanzado e inflamatorio ha permitido su implantación en estadios más tempranos. Sabemos que la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad son al menos igual que en los pacientes que la reciben la QT tras la cirugía, (32,107,108). Como se ha comentado en la introducción, la QTN aporta una serie de ventajas respecto a su aplicación postoperatoria: como una introducción temprana del tratamiento sistémico que actúe sobre la enfermedad micrometastásica a la vez que disminuirá el tamaño tumoral permitiendo un mayor número de cirugías conservadoras de la mama. Otra ventaja es la monitorización de la sensibilidad del tumor al tratamiento sistémico, (109,110). Además, la respuesta tumoral patológica a la quimioterapia preoperatoria puede servir de herramienta pronóstica útil, pues se ha demostrado que el alcanzar una respuesta patológica completa (RCp) se asocia con un menor riesgo de recaída y una mayor SG (111). De esta manera la RCp se ha instaurado como el objetivo principal en la mayoría de los ensayos clínicos de neoadyuvancia, y para nosotros constituye uno de los objetivos primarios de este estudio.

Existen diferentes esquemas de poliquimioterapia preoperatoria implantados en la práctica habitual, la mayoría incluyen antraciclinas y taxanos administrados de manera secuencial, después de que se demostrara que el añadir un taxanos al régimen de tratamiento con antraciclinas aumentaba la tasas de RCp (40). El número óptimo de ciclos está entre 6-8, administrados cada 21 días. Con la intención de optimizar la eficacia de la QTN, la aplicación de la quimioterapia cada 14 días o en densidad de dosis (DD), es una alternativa terapéutica aceptada en muchas de las guías clínicas reconocidas como la ESMO y NCCN (52). Otra justificación de este modo de administración bisemanal, reside en la hipótesis del modelo de crecimiento celular de tumores pequeños, con mayor proporción de células en replicación y por tanto mayor sensibilidad a las antraciclinas. De manera que un menor intervalo de tiempo interciclo limitaría la capacidad de recrecimiento celular, aumentando la muerte celular. Otras ventaja hipotética de esta QT en DD es una mayor inducción a la supresión ovárica que con el esquema convencional, que en pacientes

premenopáusicas con tumores hormono dependientes podría ejercer un efecto protector, al favorecer la amenorrea.

En base a lo anterior, llevamos a cabo este estudio prospectivo, observacional, con 71 pacientes, con cáncer de mama estadio II-III, reclutadas entre mayo 2011 y febrero de 2015. Tratadas con 4 ciclos de doxorubicina-ciclofosfamida (AC) cada 2 semanas, seguidos de 4 ciclos de docetaxel cada 3 semanas, junto a trastuzumab si HER2 sobreexpresado. Para evitar un mayor riesgo de neutropenia con esta pauta, administramos 5 días de factor estimulante de colonias granulocíticas, durante los cuatro primeros ciclos. Uno de los principales objetivos fue comprobar la presencia de CTCs en diferentes momentos durante la QTN y relacionarlo con la respuesta a la QTN en DD y con la supervivencia.

Otro de nuestros objetivos fue analizar el valor predictivo de respuesta y valor pronóstico de la clasificación subrogada de Saint Gallen en cuatro subtipos histopatológicos de cáncer de mama tratados con QTN en densidad de dosis.

De la población total, el 97% completó la QTN. Un 18 % de las pacientes recibieron herceptin neoadyuvante concomitante con el docetaxel.

Al analizar la tasa de RCp alcanzada tras la administración de la QTN en DD, hallamos una RCp en el tumor del 25,4%, y del 21,1% en el tumor y en el ganglio. Comparando con los estudios en neoadyuvancia con igual esquema pero administrado cada 3 semanas observamos tasas de RCp ligeramente superiores o muy parecidas, como el estudio GEPARTRIO, ensayo fase III, prospectivo, multicéntrico, con 2090 pacientes, se comparan 3 esquemas de QTN: 6 u 8 ciclos de docetaxel, doxorubicina y ciclofosfamida (TAC) frente a 2 ciclos de TAC seguidos de 4 ciclos de vinorelbina y capecitabina (NX). Las tasas de RCp fueron del 17 %, similares en los tres brazos. (112)

También encontramos tasas de respuestas ligeramente inferiores a nuestros resultados en el Estudio JBCRG03 (Japan Breast Cancer Research Group), que se trata de un estudio fase II, con 132 mujeres japonesas que recibieron 4 ciclos de docetaxel, seguidos de 4 ciclos de FEC cada 21 días, y la

RCp fue de un 23 %. Tasas muy similares a nosotros se consiguieron en el fase III NSABP30 B-27, con 2411 pacientes describieron un 26% de RCp en el tumor y 21,8 % en el tumor y en el ganglio para la rama que recibía 4 ciclos de AC seguido de 4 ciclos de docetaxel. (40)

En la revisión de los estudios publicados que utilizan el tratamiento neoadyuvante con antraciclinas y taxanos, en DD, encontramos resultados controvertidos, con tasas de respuestas inferiores a nosotros y variables como se muestra en el estudio AGO con 631 pacientes, compara epirubicina por 3 ciclos seguido de paclitaxel 3 ciclos cada 2 semanas con 4 ciclos de epirubicina y paclitaxel cada 3 semanas, demostrando un incremento significativo de RCp con el esquema en densidad de dosis, 18% vs 10%. También el número de cirugías conservadoras fue significativamente superior en la rama experimental.(113)

En otro estudio del GEPARDUO, fase III que compara la eficacia del esquema AT(Doxorrubicina, Docetaxel) 4 ciclos cada 14 días frente a AC 4 ciclos cada 21 días seguido de 4 ciclos de docetaxel por cuatro ciclos cada 21 días. Su incidencia de RCp en la mama y en la axila (objetivo principal del estudio), fue de un 14,3 % para los 8 ciclos vs 10,6 %, para los 4 ciclos en densidad de dosis. Vemos que obtienen resultados inferiores a nuestro estudio, considerando que el brazo con DD, sólo recibió 4 ciclos de tratamiento. (114)

De los metaanálisis que emplean esquemas quimioterápicos en DD, el realizado por Lemos Duarte y cols, incluye 4 estudios randomizados con antraciclinas, 3 en adyuvancia y 1 en neoadyuvancia. En concreto, el estudio en neoadyuvancia evalúa toxicidad y seguridad del esquema AC (doxorubicina; cyclophosphamide) cada 2 semanas vs. EC (epirubicin; ciclofosfamida) cada 3 semanas. Comprueban que la QT en DD con el apoyo profiláctico de pegfilgrastim es un esquema bien tolerado y con significativamente menor tasa de neutropenias grado 3-4, pero sin diferencias en la tasa de respuestas patológicas entre ambas ramas, 11% para la QT convencional vs 13% para la bisemanal. También se demostró un aumento de la SLE, independientemente del estado de los receptores hormonales. (51)

Aunque no deben ser comparados entre sí nuestros resultados con otros estudios, por incluir una población heterogénea, con esquemas de QTN variables en cuanto a número de ciclos, citotóxicos, y porque muchos de ellos no incluían trastuzumab neoadyuvante en pacientes con HER2 sobreexpresado. No obstante podemos concluir que nuestro esquema es eficaz con una elevada tasa de RCp y que se encuentra en el rango superior de lo publicado.

Sabemos que el cáncer de mama es una entidad heterogénea y diversos investigadores utilizando microarrays de ADN la han clasificado en varios subtipos moleculares con distintos patrones de expresión génica y diferente pronóstico. Los principales grupos moleculares son Luminal A (RE+/RP+, Her2-), Luminal B (RE+, RP+/-, Her2 +), Basal (RE-/RP-/Her2-, con perfil génico de célula basal / mioepitelial: CK 5/6+, CK 14+, p63+ y EGFR+), HER2 puro(RE-/RP-/Her2+), y todo negativo (RE-/RP- /Her2-, CK 5/6-, CK 14-, p63-) (115,116) Parece ser que estos subtipos moleculares conllevan un valor predictivo de respuesta a la quimioterapia, asociándose los subtipos triple negativo y los Her2+ puros, con una mayor probabilidad de conseguir RCp comparado con los subtipos luminales, que son más respondedores a la hormonoterapia. (117). Sin embargo esta relación predictiva y pronóstica no se ha determinado claramente para QTN en DD. Por otro lado, desafortunadamente en la práctica diaria no es fácil disponer de este genotipado, es por ello que para nuestro objetivo analizamos el valor predictivo de respuesta a la QTN en DD y el valor pronóstico de la clasificación en 4 subtipos intrínsecos de acuerdo con criterios clínico-patológicos establecidos por los panelistas de Sant Gallen 2011. (18). Siendo una de fortaleza de este trabajo que la clasificación por fenotipos analizados por IHQ fue planificada prospectivamente.

En nuestra serie había mayor porcentaje de tumores con expresión de RE, el 70%, y el 21% de los tumores sobreexpresaban Her2. Según la clasificación fenotípica encontramos una distribución con un 11,3% de tumores Luminal A, 59,2% Luminal B, (receptores hormonales + y Her2+ o ki67 >14%), el 8,5% eran Her2 puros con RH-, y el 21,1% triple negativos. Los resultados de nuestro análisis se encuentran en consonancia con los trabajos referidos

sobre la clasificación molecular, mostrando una relación significativa entre la clasificación por los 4 inmunofenotipos y la RCp en el tumor. Siendo los fenotipos más respondedores los Her2-puros y los TN, seguidos de los luminales B y A. Sí hallamos diferencias significativas cuando comparamos la tasa de RCp en el tumor entre los TN 46,7% y el resto 19,6% ( $p=0.046$ ).

Esta tendencia también se mantenía al analizar las RCp en el tumor y los ganglios, siendo los tumores TN los que mayor tasa de RCp alcanzaron respecto al resto de subtipos. Esta mayor tasa de respuestas a la QTN en los tumores que no expresan receptores hormonales o que sobreexpresan HER2, se ha demostrado en diferentes estudios, como en el ensayo prospectivo GEPARTRIO que arrojó unas tasas de RCp del 38,9 % en el fenotipo TN.(46) Y en el ensayo fase III GeparQuattro, con 1,509 pacientes, 445 HER2-positivos, donde las pacientes recibieron 4 ciclos de EC (epirrubicina y ciclofosfamida) y eran randomizadas a tres brazos de QT trisemanal, uno de ellos con 4 ciclos docetaxel , otro igual más capecitabina , ó esto mismo pero secuencial. Si sobreexpresaban Her2+ recibían trastuzumab neoadyuvante. Observaron que las tasas de RCp en las pacientes Her2+ eran significativamente mayores que las HER2-negativo (45,5 % vs 19,5 %). Desafortunadamente, el número de pacientes con fenotipo HER-2 puro incluido en nuestro estudio no nos ha permitido demostrar estadísticamente su papel predictivo para alcanzar una RCp. (58)

De manera que observamos que nuestros datos son concordantes con lo descrito en la literatura, donde los tumores TN y Her2, son los más quimiorespondedores, respecto al subtipo luminal, de menor riesgo y menor quimiosensibilidad. Demostramos así que la clasificación inmunohistoquímicas en subtipos intrínsecos tiene un valor predictivo de respuesta a la QT en DD.

Es sabido que a pesar de conseguir respuestas patológicas favorables con la QTN en cáncer de mama localizado y localmente avanzado, hay un grupo de pacientes que sufren recaídas. La identificación de marcadores relacionados con la obtención de una RCp, es objeto de estudio para distinguir pacientes respondedores de no respondedores, y también para investigar nuevas estrategias y dianas terapéuticas. Se ha demostrado que en estadios

muy tempranos del desarrollo tumoral se produce la diseminación de CTCs, pudiendo ser en parte responsables de las posteriores recaídas. Por ello, es el objetivo principal de este estudio determinar en nuestra población el valor predictivo de respuesta de la presencia o ausencia de CTCs, al inicio y su ausencia tras la quimioterapia neoadyuvante en DD, o también catalogado por nuestro grupo como respuesta citológica (CYCAR) favorable. Nosotros evaluamos de una forma prospectiva, la presencia de las CTCs en diferentes momentos durante la QTN, siendo esto una de las robusteces de nuestro trabajo.

De las 71 pacientes incluidas se identificaron presencia de CTCs, previo al inicio de la QTN en el 32,4%, tras la administración de los 4 ciclos de AC en densidad de dosis en el 33.8 %, y al finalizar el total de la QTN, en el 28,2%. En nuestro trabajo encontramos una tasa de detección de CTCs algo mayor de lo publicado en muchos estudios que analizan la presencia de CTCs durante la QTN, como en el REMAGUS-02 con tasas de CTCs del 17% en 86 muestras de quimioterapia postneoadyuvante y 27% en los 118 pacientes, cuando analizaban tanto muestras pre y posteriores al tratamiento. Igualmente en el estudio Gepar-Cuatro, con tasas de detección CTCs pre- y post-QTN del 22% y 11%, respectivamente (93,94). Una posible razón que podría justificar esta discrepancia es el tipo de marcadores y metodología utilizados en el aislamiento y detección de CTCs. De hecho, la mayoría de los estudios utilizan CellSearch System, el más conocido y aprobado por la agencia gubernamental de control de alimentos y medicamentos de los EE.UU. (FDA) para la determinación de las CTCs. En cambio, nosotros empleamos el método de Miltenyi Biotec, que se trata de un sistema de separación celular basado igualmente en la selección positiva inmunomagnética, pero que permite seleccionar e identificar con mayor sensibilidad células tumorales diseminadas en sangre periférica, al utilizar nanopartículas supermagnéticas unidas a anticuerpos específicos para marcadores de origen epitelial como son las CKs, que no expresan las células hematopoyéticas maduras. El principal problema con CellSearch System es que utilizan solo un anticuerpo, el marcador EpCAM, para detectar CTCs, pero ahora sabemos que esta molécula es uno de los primeros marcadores que CTCs puede perder durante el proceso de difusión,

particularmente en los estadios precoces del cáncer, dando lugar a falsos negativos y por otro lado lo pueden expresar células hematopoyéticas, generando falsos positivos (118). En nuestro trabajo usamos un anticuerpo pan-citoqueratina, que reconoce específicamente las células epiteliales de interés, dirigidos contra la citokeratina CK-7, 8, 18 y 19, para aislar y detectar CTCs, junto el uso de un anticuerpo EGFR. Esta mejor elección y combinación de marcadores específicos, podría explicar la superioridad de nuestros resultados. (89)

Al igual que otros estudios como el GepartQuatro y el REMAGUS 02, no encontramos relación de la presencia de CTCs al diagnóstico y las diferentes características basales de la población, ni con las variables clínico-patológicas de valor pronóstico y predictivo conocidos como el estadiaje T o N clínico, el grado de diferenciación histológica o el porcentaje de Ki67, (94). Esta ausencia de relación entre la detección de CTCs y las características tumorales de mal pronóstico, se ha explicado en parte por la adquisición de un fenotipo mesenquimal, en las CTCs de tumores agresivos, que conlleva la pérdida de expresión de proteínas como la molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM) y CKs, en el proceso de la transición epitelio-mesénquima, que harían a las CTCs indetectables a las técnicas actuales y que facilita el proceso de invasión y metastatización (119)

Sin embargo, sí encontramos relación significativa entre la presencia de las CTCs basales y la afectación patológica axilar, en aquellas pacientes que precisaron linfadenectomía ya fuera por tener BSGC positiva al inicio o afectación axilar clínica al diagnóstico. De hecho en la mayoría de pacientes con BSGC negativa no se detectaron CTCs basales en sangre. Estos datos hay que tomarlos con cautela, debido al bajo número de casos analizados y que esta relación referida con la BSGC prequimioterapia no fue estadísticamente significativa, pero si este dato se comprobara con mayor población y en futuros estudios, la detección de CTC como prueba complementaria adicional al estudio de extensión inicial en el diagnóstico del cáncer de mama podría ayudar a seleccionar la población que va a precisar linfadenectomía posterior, y omitir al menos la BSGC preNeoadyuvancia.

Objeto especial de estudio fue analizar la presencia de CTCs basales en los diferentes fenotipos de cáncer de mama. Observamos que los tumores HER2-puros eran los que presentaban mayor tasa de detección de CTCs, con un 66,5%, seguidos de los Luminales B, de los TN y por último los Luminales A, aunque no encontramos diferencias significativas entre los 4 subtipos establecidos y la presencia o ausencia de CTCs. Curiosamente cuando analizamos la población que sobreexpresaba el Her2, independientemente de si expresaban receptores hormonales o no, observamos que en la mayoría no se detectaban CTCs basales. De manera que podría ser que la expresión de receptores hormonales en tumores Her2 positivos (Luminales B Her2), confiriese a las células tumorales menor capacidad de desdiferenciación y migración por el torrente circulatorio.

Por otra parte, en nuestro estudio no se detectó correlación entre la presencia o ausencia de CTCs en cualquiera de las determinaciones seriadas, con la evaluación de la respuesta a la terapia neoadyuvante por criterios clínicos y patológicos. Siendo concordantes con la mayoría de otros estudios en este escenario prequirúrgico que tampoco demuestran el valor predictivo de respuesta patológica de la presencia de CTCs durante la QTN. (58,94,120) De igual modo, en el estudio de Boutrus y cols (121) no se halló relación con la respuesta clínica, evaluada mediante disminución en el volumen tumoral durante y tras la QTN. No obstante la controversia está presente, con los resultados presentados en un trabajo llevado a cabo por Pachmann y colaboradores, en pacientes tratadas con QTN empleando antraciclinas en intensidad de dosis, donde asocian la disminución en el conteo de CTCs durante los primeros ciclos de EC quimioterapia con la disminución del tamaño tumoral tras el tratamiento neoadyuvante. Esta relación se perdía en las pacientes que sobreexpresaban Her2 tratadas con trastuzumab(122)

Encontramos que la mayoría de las pacientes que consiguieron RCp ya fuera evaluando el tumor, o el tumor y los ganglios, presentaban una respuesta citológica favorable, con ausencia de CTCs tras la QTN. Esta relación no fue significativa, tal vez por el pequeño tamaño de la población analizada. Sería interesante volver a estudiar esta correlación en un futuro incluyendo mayor población para así demostrar la utilidad de la negativización de CTCs en



pacientes tratadas con QTN como herramienta predictiva de respuesta. No obstante, se podría justificar la falta de correlación porque son varios los estudios que describen el carácter quimioresistente de estas células, que puede deberse a un estado de quiescencia que les permitiría escapar de los tratamientos quimioterápicos que actúan principalmente sobre células en estado replicativo. Siendo una de las principales características de las CTCs escapar de la apoptosis y permanecer en estado latente durante largo tiempo. Por otro lado, recientes estudios hablan de que estas células, que comprenderían entre un 1% y un 10% del total de la población celular, tendrían la capacidad de renovarse y diferenciarse, y podrían tener una importante capacidad tumorigénica y contribuir a la heterogeneidad celular. Debido a todo lo anterior, se ha conferido un comportamiento de las CTCs similar al de las células madre (123).

Otra posible explicación a esta falta de correlación entre la respuesta al tratamiento por criterios patológicos y por los criterios de respuesta citológicos (CYCAR), sería por un lado la conocida heterogenicidad fenotípica y genotípica entre las CTCs de un mismo paciente, pudiendo sobreexpresar sólo alguna de ellas determinados marcadores como los RE, HER2 y EGFR. Por otro lado también se ha descrito discrepancia entre las CTCs con el tumor primario. Se demostró que CTCs Her2-positivas aparecían en pacientes con tumores primarios Her2-negativos y viceversa, aunque la expresión de CTCs Her2-positivas era más común en mujeres con enfermedad Her2-positiva. (124, 125) Este hallazgo, junto a la deficiente caracterización fenotípica y genotípica de las CTCs en los estudios referidos, llevaría a un tratamiento subóptimo sólo orientado al tumor primario. (88,90).

Por otro lado, el valor pronóstico de las CTCs ha sido ampliamente demostrado en cáncer de metastásicos. (95) Tanto la detección de ellas, como el número, en cualquier momento durante la administración del tratamiento sistémico se correlaciona con un aumento de la tasa de mortalidad en estos pacientes y ha sido considerado como un factor pronóstico independiente de SLP y SG en la enfermedad metastásica, pero su significado clínico en estadios tempranos permanece en controversia.

En nuestra población, no se demuestra relación significativa entre la presencia de CTCs basales y la respuesta citológica favorable o desfavorable tras la QTN, con la SG ni con la SLE. Aunque observamos que las dos únicas muertes y la mayoría de las recaídas acontecieron en pacientes con ausencia de CTC tanto al inicio como en la determinación al final de la QTN (evolución citológica favorable). Probablemente estos datos contradictorios puedan deberse al corto seguimiento y que aún no se han producido eventos suficientes como para hallar diferencias significativas. Se ha buscado esta relación pronóstica en el mismo escenario, durante la neoadyuvancia, sin hallar relación de las CTCs con la SG, pero sí con la SLE. (121) Por el contrario, Anthony Lucci y cols. publican los resultados de un estudio prospectivo, con 302 pacientes con cáncer de mama estadio del I-III, vírgenes de QT, en las que identifican una o más CTCs en el 24% de las muestras de sangre periféricas extraída previa a la intervención quirúrgica del tumor, concluyendo que la presencia de una o más células confiere un importante valor pronóstico en estas pacientes ya que predice una recaída temprana y una disminución en la SG, de manera significativa. Así mismo, conforme más número de CTCs detectaban, en cualquier momento, mayor era el incremento de la hazard ratio para la recaída de la enfermedad o muerte, mostrando este hallazgo mayor hazard ratio para recaída y muerte que la mayoría de las variables independientes pronósticas conocidas actualmente para el cáncer de mama localizado, como es la afectación ganglionar (123) Igualmente en neoadyuvancia se obtiene la misma relación pronóstica en algunos estudios como el fase II REMAGUS02, (94) y el de Bidard y cols. donde correlacionaron la presencia de CTCs con la SLR y SG, utilizando en ambos CellSearch system. Concluyen que la detección de CTCs y su monitorización durante el seguimiento y tratamiento de las pacientes, podrá tener un gran valor clínico con respecto a una predicción temprana de recidiva, incluso pudiendo superar los resultados obtenidos con los marcadores tumorales séricos clásicos. (92,93)

De nuevo la discrepancia en el fenotipo y genotipo demostrada entre tumor primario, CTCs y metástasis puede jugar un papel en el pronóstico de las pacientes. La heterogeneidad entre la expresión de Her2 entre el tumor

primario y la población de CTCs en pacientes con cáncer de mama, y el beneficio de aplicar tratamientos diana, se ha demostrado en un estudio randomizado que tumores Her2 negativo con CTC CK-19 positiva aleatorizadas a recibir trastuzumab Observando reducción en el riesgo de SLE en el brazo tratado con el anticuerpo.(126)

Por lo que nosotros concluimos que aún no hay datos suficientes y son necesarios más estudios que nos permitan esclarecer cuál es realmente la capacidad pronóstica y predictiva de respuesta al tratamiento de estas células en pacientes con tumores pequeños y si realmente pueden definir a pacientes con alto riesgo de recaída, no sólo centrándose en su presencia sino también en su caracterización fenotípica y genotípica, que permitan determinar su agresividad y la posible respuesta a los tratamientos

Por otro lado, analizamos la SG y SLE en nuestra población según los diferentes subtipos histopatológicos de cáncer de mama reconocidos, con una mediana de seguimiento de 45 meses, y observamos que los tumores TN tenían significativamente menor SLE y SG en comparación con el resto. Por lo tanto, nuestro estudio indica que a pesar de que los tumores TN son de los más quimiosensibles alcanzando mayores tasas de RCp, tienen menor supervivencia que el resto de subtipos menos agresivos. Probablemente la biología intrínseca del tumor confiere una mayor agresividad a los pacientes que no alcanzan RCp. En el resto de subtipos no encontramos esta asociación.

En los metaanálisis que valoran el impacto de la QT en densidad de dosis sobre la supervivencia en comparación con la pauta convencional, encuentran mayor SLE y tendencia a una mayor SG en la población con RH negativos con QT en DD. (Bonilla et al. Lemos Duarte et al.). Sabiendo además que el subtipo triple negativo presenta un peor pronóstico intrínseco, la administración de la QT en DD se podría plantear en estos pacientes con subtipos agresivos (Her2 puros y TN), aunque son necesarios más estudios bien diseñados centrados en esta población para probar su beneficio.

Por otro lado, existe cierta controversia sobre el valor pronóstico que confiere alcanzar RCp en el cáncer de mama tras la QTN. Aunque la mayoría de los estudios concluyen que las RCp se correlaciona con un mejor pronóstico y se ha catalogado como un marcador subrogado de la SG en subtipos TN y HER-2 puro (108) disponemos de algunos ensayos y metanálisis con diferentes esquemas que han fallado al intentar demostrar esta asociación. Estas discrepancias son debidas en parte a las limitaciones metodológicas de los ensayos como la heterogeneidad de la población, ausencia de una definición uniforme de RCp que aplican sólo al tumor y en otros también al ganglio, la utilización de diferentes scores (Residual Cancer Burden, o M&P), distintos regímenes de QTN y algunos de ellos sin añadir trastuzumab en pacientes con HER2 sobreexpresado. Por lo tanto, la búsqueda de biomarcadores de respuesta a los diferentes esquemas de QTN se ha convertido en los últimos años en objeto de muchos estudios en este escenario. (127).

En nuestra población, los TN que obtenían RCp grado 5 de M&P tras la QTN en DD mostraban mayor SLE y tendencia a una mayor SG que aquellos con otro tipo de respuesta. Estos datos no obstante deben ser interpretados con cautela pues es necesario mayor seguimiento de la población para determinar las diferencias en el resto de subtipos donde no hubo eventos suficientes. Este posible impacto beneficioso en el pronóstico de las pacientes con inmunofenotipo TN con RCp tras la QTN en densidad de dosis también demostrado con QTN trisemanales, muestra que dentro del mal pronóstico de estos aquellos con RCp tras la QTN viven más, siendo esta asociación entre RCp y mejor supervivencia tanto en los tumores TN y como en los Her2, (111).

Además, se han relacionado los tumores con ausencia de expresión de RE con un pobre grado de diferenciación, y con una elevada actividad proliferativa mediante la determinación de la fracción celular en la fase S. De

igual forma una alta fracción de células tumorales en la fase S del ciclo celular se ha relacionado con mayor respuesta al tratamiento(128). Según este modelo de crecimiento celular, en los tumores agresivos es necesario optimizar los esquemas de QTN, siendo la aplicación en densidad de dosis una opción interesante donde al haber mayor proporción de células en replicación, existe mayor sensibilidad a las antraciclinas que unido al menor intervalo de tiempo interciclo limitaría la capacidad de recrecimiento celular, aumentando la muerte celular.



**CONCLUSIONES**





## CONCLUSIONES

1. Concluimos que la sola presencia de CTC al inicio de la quimioterapia neoadyuvante en densidad de dosis y su desaparición en sangre durante el tratamiento, catalogado como criterio de respuesta citológica favorable, carece de valor predictivo de respuesta, siendo necesarios estudios adicionales en la caracterización fenotípica y genotípica de las mismas.
2. Demostramos que en nuestra población la clasificación histopatológica subrogada de Saint Gallen tiene valor predictivo de respuesta a la QTN en densidad de dosis, donde los tumores TN y HER2 fueron los más quimiorespondedores.
3. En nuestro trabajo encontramos una tasa de detección de CTC algo mayor de lo publicado en muchos estudios que analizan la presencia de CTC durante la QTN, por lo que la metodología de aislamiento basada en CKs frente a la basada a EpCAM es más sensible.
4. No detectamos relación entre la presencia de CTCs al diagnóstico con la clasificación histopatológica subrogada de Saint Gallen, ni con las variables clínico-patológicas de valor pronóstico y predictivo conocidos en cáncer de mama.
5. Hubo una relación significativa entre la presencia de las CTC basales y la afectación patológica axilar, en aquellas pacientes que precisaron linfadenectomía ya fuera por tener BSGC positiva al inicio o afectación axilar clínica al diagnóstico.
6. El tiempo de seguimiento no fue lo suficientemente amplio como para demostrar el valor pronóstico de la presencia de CTCs al diagnóstico y de la respuestas citológicas favorables a la QTN, en cuanto a una menor SLE y menor SG.

7. En este análisis preliminar, es necesario un mayor número de pacientes y mayor tiempo de seguimiento para demostrar el valor predictivo de respuesta y pronóstico de la presencia de CTCs en la población de cáncer de mama localizado tratado con QTN en densidad de dosis.
  
8. La clasificación subrogada de Saint Gallen tiene un valor pronóstico con impacto en la SLE de los pacientes con fenotipo TN, que alcanzaron respuestas completas tras la administración de la QTN en dosis densas.

## **BIBLIOGRAFÍA**



1. Ferlay J, Autier P, Boniol M. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe 2006. *Ann Oncol.* 2007 Mar; 18 (3): 581-92.
2. Botha JL, Bray F, Sankila R, Parkin DM. Breast cancer incidence and mortality trends in 16 European countries. *Eur J Cancer* 2003; 39 (12): 1718-29
3. Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, et al. European cancer mortality predictions for the year 2013. *Ann Oncol.* 2013 Mar;24(3):792-800
4. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013
5. Bray F, Ren JS, Masuyer E, et al. Estimates of global cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer.* 2013 Mar 1;132(5):1133-45.
6. Sánchez MJ, Payer T, De Angelis R, et al. Cancer incidence and mortality in Spain: estimates and projections for the period 1981–2012. *Ann Oncol.*2010; 21: 30-36.
7. Barraón E, Palomar L, Lorente D. Cáncer de mama. Diagnóstico, estudio de extensión y pronóstico en Oncología. 1ª ed. Madrid: Springer Healthcare; 2012. p 71.
8. Miki Y, Svendsen J, Shattuck-Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994; 266: 66-71.
9. Ford D, Easton DF, Stratton M, et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet.* 1998; 62(3): 676-89.
10. Lee I, Oguma, Y. Physical activity. *Cancer Epidemiology and Prevention.* 3<sup>rd</sup> ed. Nueva York, NY: Oxford University Press;2006:449-467
11. Colditz GA. Breast Cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention.* 3<sup>a</sup> ed. New York: Oxford University Press; 2006. P. 995-1013.
12. Nelson HD, Tyne K, Naik A, et al. Screening for breast cancer: an update for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 151 (10): 727-37, W237-42, 2009.
13. Tavassoli FA, Deville P. Pathology and genetics of tumours of the breast and Female genital Organs. International Agency for research on Cancer, Lyon, France.
14. Yeatman TJ, Cantor AB, Smith TJ, et al. Tumor biology of infiltrating lobular carcinoma. Implications for management. *Ann Surg* 222 (4): 549-59; discussion 559-61, 1995.
15. Breast. In: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al., eds.: *AJCC Cancer Staging Manual.* 7th ed. New York, NY: Springer, 2010, pp 347-76.
16. Ribelles N, Márquez A, Alba E. Cáncer de mama. Historia natural. En: Cortés H, Colomer R, Alba E. *Tratado de Oncología.* Segunda edición. Mallorca: Publicaciones Permanyer; 2009. P. 897-920.
17. Simpson JF, Gray R, Dressler LG, et al. Prognostic value of histologic grade and proliferative activity in axillary node-positive breast cancer: results from the Eastern

- Cooperative Oncology Group Companion Study, EST 4189. *J Clin Oncol* 18 (10): 2059-69, 2000.
18. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ & Panel members. Strategies for subtypes dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. 2011. *Ann Oncol.* 2011; 22(8):1736
  19. Lippman ME, Morow M, Osborne CK. Diseases of the breast, Third ed, vol 2, cap 34. 2004.
  20. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000; 406(6797): 747-52.
  21. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(16):5678-85.
  22. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA.* 2006;295(21):2492-502.
  23. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98(19): 10869-74.
  24. Christos Sotirous, et al. Gene expression improves breast cancer grading. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98:262-272.
  25. Martin M, et al. Molecular biology of breast cancer. *Clin Transl Oncol* 2006; 8 (1):7-14.
  26. Cuci X, Schiff R, Arpino G et al. Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. *J Clin Oncol.* 2005; 23:273-40
  27. Ruiz I. El informe anatomopatológico en el cáncer de mama. Cuadernos interdisciplinarios de cáncer de mama. Madrid: YOU&US S.A; 2014. P. 1-9.
  28. Pérez E. Combining adjuvant chemotherapy with biologicals. St. Gallen 2007. *Breast* 2007; 16 (Suppl 1): S10 Abstract S34.
  29. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010 Jun 1; 28(16):2784-95.
  30. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007. 25:118-145.
  31. Jones RL, Smith LE. Neoadjuvant treatment for early-stage breast cancer: opportunities to assess tumor response. *Lancet Oncol.* 2006 Oct;7(10):869-74.
  32. Mauri D, Paulidis N, Ioannidis JP. Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97: 188-94.

33. Bonadonna G, Zambetti M, Moliterni A, et al. Clinical relevance of different sequencing of doxorubicin and cyclophosphamide, methotrexate, and Fluorouracil in operable breast cancer. *J Clin Oncol* 22 (9): 1614-20, 2004
34. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Breast Cancer. V.1.2013. Accessed at [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/breast.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf)
35. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group: Polychemotherapy for early breast cancer: An overview of the randomised trials. *Lancet* 352 (9132): 930-42, 1998.
36. Di Leo A, Larsimont D, Beauduin M, et al: CMF or anthracycline-based adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer patients: 4 year results of a Belgian randomised clinical trial with predictive markers analysis. *Proc Am Soc Clin Oncol* 18:69a, 1999 (abstr 258).
37. Bines J, Earl H, Buzaid AC, et al. Anthracyclines and Taxanes in the Neoadjuvant Treatment of Breast Cancer. *Ann Oncol.* 2014;25(6):1079-1085
38. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 365 (9472): 1687-717, 2005.
39. Von Minckwitz G, Costa SD, Raab G, et al. Dose-dense doxorubicin, docetaxel, and granulocyte colony-stimulating factor support with or without tamoxifen as preoperative therapy in patients with operable carcinoma of the breast: a randomized, controlled, open phase IIb study. *J Clin Oncol.* 2001 Aug 1;19(15):3506-15.
40. Bear HD, Anderson S, Brown A, et al. The effect on tumor response of adding sequential preoperative docetaxel to preoperative doxorubicin and cyclophosphamide: preliminary results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol.* 2003 Nov 15; 21(22):4165-74.
41. Hutchins LF, Green SJ, Ravdin PM, et al. Randomized, controlled trial of cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil versus cyclophosphamide, doxorubicin, and fluorouracil with and without tamoxifen for high-risk, node-negative breast cancer: treatment results of Intergroup Protocol INT-0102. *J Clin Oncol.* 2005 Nov 20; 23(33): 8313-21.
42. Kuerer HM, Newman LA, Smith TL, et al. Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 1999; 17(2):460-469.
43. Martín M, Lluch A, Seguí MA, et al. Toxicity and health-related quality of life in breast cancer patients receiving adjuvant docetaxel, doxorubicin, cyclophosphamide (TAC) or 5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide (FAC): impact of adding primary prophylactic granulocyte-colony stimulating factor to the TAC regimen. *Ann Oncol.* 2006; 17:1205–1212.

44. Smith IC, Heys SD, Hutcheon AW, et al. Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: significantly enhanced response with docetaxel. *J Clin Oncol*. 2002; 20: 1456-66.
45. Green M, Buzdar A, Smith T, et al. Weekly paclitaxel improves pathologic complete remission in operable breast cancer When compared with paclitaxel once every 3 weeks. *J Clin Oncol*- 2005; 23: 5983; 23:5983-5992
46. Houbert J, von Minckwitz G, Denkert C, et al. Effect of neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy in different biological breast cancer phenotypes: overall results from the GeparTrio study. *Breast Cancer Res. Treat.* 2010; 124: 133-140.
47. Francis P, Crown J, Di Leo A, et al. Adjuvant chemotherapy with sequential or concurrent anthracycline and docetaxel: Breast International Group 02-98 randomized trial. *J Natl Cancer Inst.* 2008 Jan 16; 100(2): 121-33.
48. Bines J, Earl H, Buzaid AC, et al. Anthracyclines and Taxanes in the Neoadjuvant Treatment of Breast Cancer. *Ann Oncol*. 2014; 25(6):1079-1085.
49. Citron ML, Berry DA, Cirincione C, et al: 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* 21:1431-1439, 2003.
50. Bonilla L, Ben-Aharon I, Vidal L, et al. Dose-dense chemotherapy in nonmetastatic breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102:1845-1854.
51. Lemos I, da Silveira JP, Passos CS, et al. Dose-dense chemotherapy versus conventional chemotherapy for early breast cancer: a systematic review with meta-analysis. *Breast*. 2012; 21: 343-349.
52. Hudis C, Citron M, Berry D, et al, for the CALGB/ECOG/SWOG/NCCTG investigators. Five year follow-up of INT C9741: dose-dense (DD) chemotherapy (CRx) is safe and effective. Program and abstracts of the 28th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium; December 8-11, 2005; San Antonio, Texas. Abstract 41.
53. Mieog JS, van der Hage JA, van de Velde CJ. Neoadjuvant chemotherapy for operable breast cancer. *Br J Surg*. 2007 Oct; 94(10):1189-200.
54. Clifford A. Hudis, M.D Trastuzumab — Mechanism of Action and Use in Clinical Practice. *N Engl J Med* 2007; 357:39.
55. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001 Mar 15;344(11):783-92.
56. Buzdar AU, Ibrahim NK, Francis D, et al. Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3676-3685.



57. Gianni L, Semiglazov V, Manikhas GM, et al. Neoadjuvant trastuzumab in locally advanced breast cancer (NOAH): Antitumour and safety analysis. *J Clin Oncol* (Meeting Abstracts) June 2007 vol. 25 no. 18\_suppl 532.
58. Untch M, Rezai M, Loibl S, et al. Neoadjuvant treatment with trastuzumab in HER2-positive breast cancer: results from the GeparQuattro study. *J Clin Oncol*. 2010 Apr 20;28(12):2024-3.
59. Ellis MJ, Coop A, Singh B, Mauriac L, et al. Letrozole is more effective neoadjuvant therapy than Tamoxifen for ErbB-1 and ErbB-2 positive, estrogen receptor positive primary breast cancer: Evidence from a phase III randomized trial. *Journal of Clinical Oncology* 2001;19:3808.
60. Smith IE, Dowsett M, Ebbs SR, et al. Neoadjuvant treatment of postmenopausal breast cancer with anastrozole, tamoxifen, or both in combination: the Immediate Preoperative Anastrozole, Tamoxifen, or Combined with Tamoxifen (IMPACT) multicenter double-blind randomized trial. *J Clin Oncol*. 2005;23 (22):5108–5116.
61. Ogston KN, Miller ID, Payne S, et al. A new histological grading system to assess response of breast cancers to primary chemotherapy: Prognostic significance and survival. *Breast* 2003; 12:320-327
62. Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C et al. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2007; 25(28):4414-22.
63. Fisher ER, Wang J, Bryant J, et al. Pathobiology of preoperative chemotherapy: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel (NSABP) protocol B-18. *Cancer*. 2002; 95: 681-95.
64. Wolmark N, Wang J, Mamounas E, et al. Preoperative chemotherapy in patients with operable breast cancer: nine-year results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2001;30:96-102.
65. TM Prowell and R Pazdur. Pathological Complete Response and Accelerated Drug Approval in Early Breast Cancer. *N Eng J Med*. 2012 Jun 28;366(26):2438-41.
66. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer*. 1989 Jan 1;63(1):181-7.
67. Harris J, Lippman M, Morrow M, et al. *Diseases of the Breast*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996:892-6
68. Luini A, Galimberti V, Gatti G, et al. The sentinel node biopsy after previous breast surgery: preliminary results on 543 patients treated at the European Institute of Oncology. *Breast Cancer Res Treat*. 2005 ;89:159-63.
69. Boughey JC, Suman VJ, Mittendorf EA, et al. Sentinel lymph node surgery after neoadjuvant chemotherapy in patients with node-positive breast cancer: the ACOSOG Z1071 (Alliance) clinical trial. *JAMA*. 2013 Oct 9;310(14):1455-61.
70. Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, Kaneko T, Iwase T, Akiyama F, et al. One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph nodemetastasis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2007; 13:4807-16.

71. Bernet L, Piñero A, Vidal-Sicart S, Peg V, Giménez J, Algara M et al. Consenso sobre la biopsia selectiva del ganglio centinela en el cáncer de mama. Revisión 2013 de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria. *Rev Senol Patol Mamar.* 2014;27:43-53.
72. Lee S, Kim EY, Kang SH, et al. Sentinel node identification rate, but not accuracy, is significantly decreased after preoperative chemotherapy in axillary node-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;102:283
73. Van Deurzen CH, Vriens BE, Tjian-Heijnen VC, et al. Accuracy of sentinel node biopsy after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients: A systematic review. *Eur J Cancer.* 2009;45: 3124-30.
74. Kelly AM, Dwamena B, Cronin P, Carlos RC. Breast cancer sentinel node identification and classification after neoadjuvant chemotherapy; Systemic review and meta-analysis. *Acad. Radiol.* 2009;16:551-63.
75. Croshaw RL, Erb KM, Shapiro HM, Julian TB. The need for axillary dissection in patients with positive axillary sentinel lymph nodes. *Curr Oncol Rep.* 2011;13:5-10.
76. Fontein DB, van de Water W, Mieog JS, Liefers GJ, van de Velde CJ. Timing of the sentinel lymph node biopsy in breast cancer patients receiving neoadjuvant therapy. Recommendations for clinical guidance. *Eur J Surg Oncol.* 2013; 39: 417-24.
77. Kuehn T, Vogl FD, Helms G, Pueckler SV, Schirrmeister H, Strueber R, et al. German multi-institutional trial sentinel-node biopsy for axillary staging in breast cancer: Results from a large prospective German multi-institutional trial. *Eur J Surg Oncol.* 2004; 30:252-9.
78. Navarro J, Dueñas B, Luque C, Ramírez MJ, Martínez J, Ruíz A, et al. Intraoperative sentinel node biopsy by one-step nucleic acid amplification (OSNA) avoids axillary lymphadenectomy in women with breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Eur J Surg Oncol.* 2013 Aug;39(8):873-9.
79. Coghlin C, Murray GI. Current and emerging concepts in tumour metastases. *J Pathol.* 2010. 222(1): 1.15.
80. Fox SB, Generali D, Berruti A, Brizzi MP, Campo L, Bonardi S, et al. The prolyl hydroxylase enzymes are positively associated with hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor in human breast cancer and alter in response to primary systemic treatment with epirubicin and tamoxifen. *Breast Cancer Res.* 2011 Feb 3;13(1):R16.
81. Bodmer WF, Browning MJ, Krausa P, et al. Tumor escape from immune response by variation in HLA expression and other mechanisms. *Ann NY Acad Sci* 1993; 690: 42-9.
82. Saenz LF. Importancia de la detección de las células tumorales circulantes en el cáncer de mama. *Rev. Eubacteria*, Abril 2012. N°28 / ISSN-1697-0071.
83. Engel H.C, M.D. Cancer cell in the blood. A five to nine year follow-up study. *Annals of Surgery* 1959. Vol 149 No.4.

84. Janni W, Rack B, Lindemann K, et al. Detection of micrometastatic disease in bone marrow: is it ready for prime time? *Oncologist* 2005 Aug; 10 (7): 480-92.
85. Riethdorf S, Pantel K. Disseminated tumor cells in bone marrow and circulating tumor cells in blood of breast cancer patients: current state of detection and characterization. *Pathobiology*. 2008;75(2):140-8.
86. Hosh SB, Braun S, Pantel K. Characterization of disseminated tumor cells. *Semin Surg Oncol*. 2001 Jun;20(4):265-71.
87. Marrinucci D, Bethel K, Bruce RH et al. Case study of the morphologic variation of circulating tumor cells. *Hum Pathol* 2007;38:514–9.
88. Nadal R, Lorente JA, Rosell R, et al. Relevance of molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer the era of targeted therapies. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2013; 13(3): 295-307.
89. Nadal R, Fernandez A, Sanchez-Rovira P, et al. Biomarkers characterization of circulating tumour cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2012 May 3; 14(3):R71.
90. Munzone E, Nol. F, Goldhirsch A et al. Changes of HER2 status in circulating tumor cells compared with the primary tumor during treatment for advanced breast cancer. *Clin. Breast Cancer*. 2010 10(5), 392–397.
91. Niikura N, Liu J, Hayashi N et al. Loss of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expression in metastatic sites of HER2-overexpressing primary breast tumors. *J. Clin. Oncol.* 2012. 30(6), 593–599.
92. Bidard FC, Mathiot C, Delaloge S, et al. Single circulating tumor cell detection and overall survival in non-metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 2009; 21: 729–33.
93. Muller V, Riethdorf S, Loibl S, et al. Prospective monitoring of circulating tumor cells in breast cancer patients treated with primary systemic therapy—a translational project of the German Breast Group study GeparQuattro. *Proc Soc Am Clin Oncol* 2007; 25: 21085.
94. Pierga JY, Bidard FC, Mathiot C, et al. Circulating tumor cell detection predicts early metastatic relapse after neoadjuvant chemotherapy in large operable and locally advanced breast cancer in a phase II randomized trial. *Clin Cancer Res.* 2008 Nov 1;14(21):7004-10.
95. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 781–91.
96. Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, et al. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res.* 2006 Jul 15;12(14 Pt 1):4218-24.
97. Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development*. 2005 Jul; 132(14):3151-61.

98. Acloque H, Thiery JP, Nieto MA. The physiology and pathology of the EMT. Meeting on the Epithelial-Mesenchymal Transition. *EMBO Rep.* 2008; 9(4): 322-326.
99. Benoy IH, Elst H, Philips M, et al. Real-time RT-PCR detection of disseminated tumour cells in bone marrow has superior prognostic significance in comparison with circulating tumour cells in patients with breast cancer. *Br J Cancer* 2006; 94: 672–80.
100. Daskalaki A, Agelaki S, Perraki M, et al. Detection of cytokeratin-19 mRNA-positive cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with operable breast cancer. *Br J Cancer* 2009; 101: 589–97.
101. Gaforio JJ, Serrano MJ, Sanchez-Rovira P, et al. Detection of breast cancer cells in the peripheral blood is positively correlated with estrogen-receptor status and predicts for poor prognosis. *Int J Cancer* 2003; 107: 984–90.
102. Wiedswang G, Borgen E, Schirmer C, et al. Comparison of the clinical significance of occult tumor cells in blood and bone marrow in breast cancer. *Int J Cancer* 2006; 118: 2013–19.
103. Saucedo-Zeni, N. et al. A novel method for the in vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire. *Int. J. Oncol.* 41, 1241–1250 (2012).
104. Wolff AC, Hammond ME, Hicks D, et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *JCO* November 1, 2013 vol. 31 no. 31 3997-4013.
105. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009;101: 736–50
106. Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res.* 2004; 10:8152–8162.
107. Fisher B, Bryant J, Wolmark N, et al. Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *J Clin Oncol.* 1998; 16: 2672-85.
108. Van der Hage JA, Van de Velde CJ, Julien JP, et al. Preoperative chemotherapy in primary operable breast cancer: results from the European Organization for Research and Treatment of Cancer trial 10902. *J Clin Oncol.* 2001; 19: 4224-37.
109. Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD, et al. Preoperative chemotherapy: Updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. *J Clin Oncol* 2008, 26:778-785.
110. Insa A, Chirivella I, LLunch A. Neoadjuvant therapy for operable breast-cancer. *Med Clin (Barc).* 2006 Mar 4; 126(8):295-303.
111. Von Minckwitz G1, Untch M, Blohmer JU, et al. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in

- various intrinsic breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. 2012 May 20; 30(15): 1796-804.
112. Von Minckwitz G, Kümmel S, Vogel P, et al. Neoadjuvant vinorelbine-capecitabine versus docetaxel-doxorubicin-cyclophosphamide in early nonresponsive breast cancer: Phase III randomized GeparTrio trial. *J Natl Cancer Inst*. 2008 Apr 16; 100 (8): 542-51.
  113. Untch M, Konecny G, Ditsch N, et al. Dose-dense sequential epirubicin-paclitaxel as preoperative treatment of breast cancer: results of a randomised AGO study. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 2002; 1: 34a.
  114. Von Minckwitz, Raab G, Caputo A, et al. Doxorubicin With Cyclophosphamide Followed by Docetaxel Every 21 Days Compared With Doxorubicin and Docetaxel Every 14 Days As Preoperative Treatment in Operable Breast Cancer: The GEPARDUO Study of the German Breast Group Gunter *J Clin Oncol*.2005, 23: 2676-2685.
  115. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000; 406(6797): 747-52.
  116. Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res*. 2008; 14: 1368-1376.
  117. Desmedt C, Haibe-Kains B, Wirapati P, et al. Biological processes associated with breast cancer clinical outcome depend on the molecular subtypes. *Clin Cancer Res*. 2008; 14: 5158-5165.
  118. Mikolajczyk S, Millar L, Tsinberg P, et al. Detection of EpCAM-Negative and Cytokeratin-Negative Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood. *Journal of Oncology* Volume 2011, Article ID 252361.
  119. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell*. 2008 Jun; 14(6): 818-29.
  120. Serrano MJ, Sánchez P, Martínez-Zubiarre I, et al. Dynamics of circulating tumor cells in early breast cancer under neoadjuvant therapy. *Exp Ther Med*. 2012 Jul; 4(1): 43–48.
  121. Boutrus RR, Abi Raad RF, Kuter I, et al. Circulating tumor cells as predictors of response and failure in breast cancer patients treated with preoperative chemotherapy. *Int J Biol Markers*. 2013 Apr 23;28(1):17-23.
  122. Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, et al. Quantification of the response of circulating epithelial cells to neoadjuvant treatment for breast cancer: a new tool for therapy monitoring. *Breast Cancer Research* 2005, 7:R975-R979 (DOI 10.1186/bcr1328).
  123. Lucci A, Hall CS, Lodhi AK, et al. Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study. *Lancet Oncol*. 2012 Jul; 13(7): 688-95.
  124. Ignatiadis M, Rothé F, Chaboteaux C, et al. HER2-positive circulating tumor cells in breast cancer. *PLoS One*. 2011 Jan 10; 6(1).

125. Punnoose EA, Atwal SK, Spoerke JM, et al. Molecular biomarker analyses using circulating tumor cells. *PLoS One*. 2010 Sep 8; 5(9).
126. Georgoulas V, Bozionelou V, Agelaki S, et al. Trastuzumab decreases the incidence of clinical relapses in patients with early breast cancer presenting chemotherapy-resistant CK-19mRNA-positive circulating tumor cells: results of a randomized phase II study. *Ann Oncol*. 2012 Jul; 23(7):1744-50.
127. Wang J, Buchholz TA, Middleton LP, et al. Assessment of histologic features and expression of biomarkers in predicting pathologic response to anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in patients with breast carcinoma. *Cancer* 94:3107-3114, 2002.
128. Remvikos Y, Mosseri V, Zajdela A, et al. Prognostic value of the S-phase fraction of breast cancers treated by primary radiotherapy or neoadjuvant chemotherapy. *Ann N Y Acad Sci*; 698:193-203, 1993