



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Departament de Medicina
Programa de Doctorat en Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona

**MARCADORS BIOLÒGICS PREDICTIUS DE RESPOSTA
A LA QUIMIOTERÀPIA PRIMÀRIA (NEOADJUVANT)
AMB ANTRACICLINES I TAXANS**

Tesi doctoral

Ariadna Tibau Martorell

Directors

Dr. Agustí Barnadas Molins

Dr. Enrique Lerma Puertas

Dr. Daniel Escuin Borràs

Tutora

Dra. Montserrat Estorch Cabrera

Barcelona, 2016

El **Dr. Agustí Barnadas Molins** i el **Dr. Enrique Lerma Puertas** del Servei d'Oncologia Mèdica i Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau i la Universitat Autònoma de Barcelona, i el **Dr. Daniel Escuin Borràs** de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques Sant Pau (IIB Sant Pau), certifiquen que:

- **Ariadna Tibau Martorell** ha realitzat sota la seva direcció la present tesi doctoral: **“Marcadors biològics predictius de resposta a la quimioteràpia primària (neoadjuvant) amb antraciclins i taxans”** i que és apta per la defensa davant d'un tribunal per optar al títol de Doctor a la Universitat Autònoma de Barcelona.

- Que aquest treball ha estat realitzat al Servei d'Oncologia Mèdica, al Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona i a l'Institut d'Investigacions Biomèdiques Sant Pau (IIB Sant Pau).

Dr. Agustí Barnadas Molins / Dr. Enrique Lerma Puertas / Dr. Daniel Escuin Borràs

Directors

Als meus pares i a l'Elisenda

Al Jordi

Al Francesc, al Jordi, al Joan i a l'Àngels

AGRAÏMENTS

Aquesta tesi és fruit, en part, del treball compartit amb moltes persones al llarg de la meva tasca professional. A totes elles vull agrair la seva ajuda.

Al doctor Agustí Barnadas haver confiat en mi des del principi, i el seu recolzament i promoció per dur a terme aquest projecte. Al doctor Enrique Lerma la seva generositat, el seu temps i ajuda, sense la qual no s'hagués pogut realitzar aquesta tesi doctoral. Al doctor Daniel Escuin per la seva contribució al contingut.

A la doctora Montserrat Estorch, que amablement acceptà ser tutora d'aquesta tesi.

Vull agrair a la doctora Laura López la seva col.laboració decisiva per tirar endavant aquest projecte a la recta final i, molt especialment, a la Maitane Pérez i la Tania Vázquez, les moltes hores dedicades i la seva sempre completa disponibilitat.

Un agraiement molt especial i afectuós a la doctora Carmen Alonso i a la doctora Belén Ojeda, oncòlogues de la majoria de les pacients incloses en aquest estudi i agrair-los també el seu mestratge i amistat tots aquests anys.

Al doctor Ignasi Gich per la seva dedicació en l'anàlisi estadístic d'aquest projecte.

A la doctora Maria Jesús Quintana per la seva revisió crítica d'aquest document i suggerències per millorar-lo.

Al meu cosí Lluís, amb molt d'afecte, per les correccions lingüístiques.

Als companys del Servei d' Oncologia Mèdica amb qui comparteixo moments intensos de feina i també d'alegria.

A tots els pacients que he acompanyat durant tots aquests anys, perquè ha estat el contacte amb ells el que ha motivat la meva necessitat d'estudi i recerca.

Als meus pares, que m'ho donaren tot i gràcies als quals, sense ells saber-ho, sóc oncòloga.

I per últim, encara que en primer lloc, al Jordi. Pel teu suport, bons consells, tot el temps i moltes coses més.

TAULA D'ABREVIACIONS

ACT	Adriamicina, Ciclofosfamida i Docetaxel
ACTH	Adriamicina, Ciclofosfamida, Docetaxel i Trastuzumab
ADN	Àcid DesoxiriboNucleic
ARNm	Àcid RiboNucleic missatger
BRCA1	De l'anglès, <i>BReast CAncer 1</i>
BRCA2	De l'anglès, <i>BReast CAncer 2</i>
CEP	De l'anglès, <i>Chromosome Enumeration Probe</i>
CEP17	De l'anglès, <i>Chromosome 17 Enumeration Probe</i>
CISH	De l'anglès, <i>Chromogenic In Situ Hybridization</i>
CMF	Ciclofosfamida, Metotrexat i Fluorouracil
EBCTCG	De l'anglès, <i>Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group</i>
EC-T	Epirubicina i Ciclofosfamida seguit de Docetaxel
FDA	De l'anglès, <i>Food and Drug Administration</i>
FISH	De l'anglès, <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
FEC	Fluorouracil, Epirubicina, Ciclofosfamida
FAC	Fluorouracil, Adriamicina, Ciclofosfamida
GDP	De l'anglès, <i>Guanosine DiPhosphate</i>
GTP	De l'anglès, <i>Guanosine TriPhosphate</i>
HER2	De l'anglès, <i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
HER2/neu	De l'anglès, <i>Human Epidermal growth factor Receptor 2/neural</i>
HR	De l'anglès, <i>Hazard Ratio</i>
IC 95%	Interval de Confiança al 95%
Ki67	Antigen identificat per l'anticòs monoclonal Ki67
MAPs	De l'anglès, <i>Microtubule Associated Proteins</i>
MAPT	De l'anglès, <i>Microtubule Associated Protein Tau</i>
MF	Metotrexat i Fluorouracil

mTOR	De l'anglès, <i>mammalian Target Of Rapamycin</i>
OSNA	De l'anglès, <i>One-Step Nucleic Acid Amplification</i>
OR	De l'anglès, <i>Odds Ratio</i>
PCR	De l'anglès, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PI3K	De l'anglès, <i>Phosphatidylinositol 3-Kinase</i>
pN	Nòduls limfàtics (estudi anatomo-patològic)
pT	Mida tumoral (estudi anatomo-patològic)
RECIST	De l'anglès, <i>Response Evaluation Criteria In Solid Tumors</i>
REMARK	De l'anglès, <i>Reporting Recommendations for Tumour Marker Prognostic Studies</i>
RCp	Resposta Completa Patològica
RE	Receptors d'Estrògens
RP	Receptors de Progesterona
RR	De l'anglès, <i>Relative Risk</i>
RS	De l'anglès, <i>Recurrence Score</i>
RT-PCR	De l'anglès, <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SG	Supervivència Global
SLE	Supervivència Lliure d'Esdeveniments
SLM	Supervivència Lliure de Malaltia
SLR	Supervivència Lliure de Recaiguda
T-DM1	Ado-trastuzumab emtansina
TNM	Estadificació Tumoral/Nòduls/Metàstasis
TOP2A	Topoisomerasa II alfa

ÍNDEX

1.- INTRODUCCIÓ	1
1.1.- Epidemiologia	3
1.2.- Etiologia	3
1.3.- Factors pronòstics	4
1.3.1.- Factors clàssics	5
1.3.1.1.- Estat ganglionar	5
1.3.1.2.- Mida tumoral	6
1.3.1.3.- Grau histològic	6
1.3.1.4.- Invasió limfovascular	7
1.3.1.5.- Subtipus histològic	7
1.3.1.6.- Capacitat de proliferació tumoral: marcador Ki67	8
1.3.2.- Característiques de les pacients	9
1.3.2.1.- Edat i estat menopàusic	9
1.3.2.2.- Raça	10
1.4.- Factors predictius	10
1.4.1.- Receptors d'estrògens i de progesterona	11
1.4.2.- Oncogen <i>HER2</i>	13
1.5.- Signatures d'expressió gènica	14
1.5.1.- Subtipus intrínsecs de càncer de mama	15
1.5.2.- Firmes genètiques	17
1.5.2.1.- Oncotype DX	17
1.5.2.2.- Mammaprint	19
1.5.2.3.- Firmes genètiques per predir la resposta a la quimioteràpia neoadjuvant	21
1.6.- Quimioteràpia neoadjuvant	21
1.6.1.- Concepte de quimioteràpia neoadjuvant i objectius principals	21
1.6.2.- Quimioteràpia neoadjuvant i resposta completa patològica	22
1.7.- Marcadors predictius de resposta a les antraciclinaes	25
1.7.1.- Les antraciclinaes com a agents antitumorals	25
1.7.2.- <i>HER2</i> com a predictor de resposta a les antraciclinaes	26
1.7.3.- <i>TOP2A</i> com a predictor de resposta a les antraciclinaes	29
1.7.4.- Duplicació del <i>CEP17</i> com a predictor de resposta a les antraciclinaes	34

1.8.- Marcadors predictius de resposta als taxans	36
1.8.1.- Organització del citoesquelet cel•lular	36
1.8.1.1.- Composició dels microtúbuls	36
1.8.1.2.- Component dinàmic dels microtúbuls	38
1.8.1.3.- Proteïnes associades als microtúbuls	40
1.8.1.4.- Isotips de les tubulines	40
1.8.2.- Els taxans com a agents antitumorals	43
1.8.3.- Proteïna Tau com a mecanisme de resistència als taxans	43
1.8.3.1.- Valor predictiu de la proteïna Tau	44
1.8.3.2.- Valor pronòstic de la proteïna Tau	46
1.8.4.- Isotips de les tubulines com a mecanisme de resistència als taxans	47
1.8.4.1.- β III tubulina	48
1.8.4.2.- β I, II i IV tubulina	49
2. HIPÒTESI	51
3. OBJECTIUS	55
4. MATERIAL I MÈTODES	59
4.1.- Principis ètics	61
4.2.- Disseny de l'estudi	61
4.3.- Mostres tumorals i realització dels <i>Tissue Microarrays</i>	63
4.4.- Estudi immunohistoquímic	63
4.5.- <i>Hibridació in situ</i>	66
4.6.- Anàlisi estadística	66
5. RESULTATS.....	69
5.1.- Característiques de les pacients	71
5.2.- Objectiu 1	73
5.2.1.- Associacions de les duplicacions del CEP17 i les variables clinicopatològiques	73
5.2.2.- Valor predictiu del CEP17, l' <i>HER2</i> i la <i>TOP2A</i>	75
5.2.3.- Valor pronòstic del CEP17, l' <i>HER2</i> i la <i>TOP2A</i>	76
5.3.- Objectiu 2:	79
5.3.1.-Associacions de la proteïna Tau i les variables clinicopatològiques	79
5.3.2.-Valor predictiu de la proteïna Tau i els isotips de la β -tubulina	80

5.3.3.- Valor pronòstic de la proteïna Tau i els isotips de la β -tubulina	81
6. DISCUSSIÓ.....	83
6.1.- Objectiu 1:	85
6.1.1.- Valor predictiu de les duplicacions del CEP17, l'amplificació del gen <i>HER2</i> i les alteracions del gen de la <i>TOP2A</i>	85
6.1.2.- Valor pronòstic de les duplicacions del CEP17, l'amplificació del gen <i>HER2</i> i les alteracions de la <i>TOP2A</i>	88
6.2.- Objectiu 2:	90
6.2.1. Valor predictiu de la proteïna Tau i dels isotips de la β -tubulina	90
6.2.2. Valor pronòstic de la proteïna Tau i els isotips de la β -tubulina	92
7. CONCLUSIONS.....	95
8. BIBLIOGRAFIA	103

1.- INTRODUCCIÓ

1.1.- Epidemiologia

El càncer de mama és la neoplàsia més freqüent entre les dones i la primera causa de mort per càncer en dones als països occidentals, amb una incidència de 1,7 milions de casos i 521.900 morts a nivell mundial el 2012.¹

S'estima que es diagnostiquen anualment a Catalunya 4.675 casos nous de càncer de mama² incidència semblant a l'europea³ i nord-americana.¹

Els avenços terapèutics i la implantació de mesures de diagnòstic precoç han permès reduir significativament la taxa de mortalitat per càncer de mama a Europa³ i Amèrica del Nord.⁴ A Catalunya també s'observa una millora de la supervivència als 5 anys, objectivant-se entre els períodes 1985-1989 i 1995-1999, un increment significatiu d'un 66,7%⁵ a un 80.9%.²

1.2.- Etiologia

El desenvolupament del càncer de mama és un procés complex i multifactorial on intervenen factors hormonals i reproductius, el sexe, l'edat i factors genètics. La majoria dels tumors són esporàdics mentre que entre un 15 i un 20% dels casos es presenten en un context d'agregació familiar de càncer de mama. S'estima que entre un 5 i un 10% dels casos de càncer de mama poden atribuir-se a mutacions en gens d'alta penetració (els gens *BRCA1* i *BRCA2*) que es transmeten mitjançant un patró d'herència autosòmica dominant. Les dones portadores de mutacions en aquests gens tenen entre un 40 i un 80% de probabilitats de desenvolupar la malaltia.⁶ La identificació de diversos gens associats a

síndromes de predisposició hereditària al càncer ha permès una valoració individualitzada del risc de desenvolupar càncer de mama i recomanar estratègies de prevenció i cribratge a fi d'aconseguir una detecció precoç, i disminuir-ne la incidència i mortalitat.⁷

Entre els factors de risc epidemiològics destaquen aquells associats a una major exposició a les hormones reproductives femenines, inclosos la menàrquia primerenca, la menopausa tardana, l'edat avançada, l'ús de tractament hormonal substitutiu a la menopausa, i la nuliparitat.⁸ L'estil de vida també jugaria un paper clau. El consum d'alcohol s'associa a càncer de mama⁹ i l'obesitat seria també un factor de risc; en dones postmenopàusiques de càncer de mama receptors hormonals positius i en dones premenopàusiques de càncer de mama triple negatiu.^{10,11} Per contra, la pràctica habitual d'exercici físic exerciria un efecte protector.¹²

1.3.- Factors pronòstics

S'anomenen factors pronòstics les variables que reflecteixen la major o menor agressivitat d'una neoplàsia quan aquesta es troba en un estadi limitat i determinen la història natural de la malaltia de forma independent a l'administració d'un tractament adjuvant sistèmic. La recerca de factors pronòstics va dirigida a establir una sèrie de paràmetres que permetin predir l'evolució dels pacients. Els factors pronòstics clínics i patològics clàssics en càncer de mama són: l'afectació ganglionar, la mida tumoral, el grau de diferenciació histològic, el tipus histològic, la invasió limfovascular i la capacitat de proliferació cel·lular. Variables demogràfiques de la pacient, com són l'edat al moment del diagnòstic i l'estat de la funció ovàrica, o la raça, també podrien influir en l'evolució però no es poden pròpiament considerar variables pronòstiques.

1.3.1.- Factors clàssics

1.3.1.1.- Estat ganglionar

Clàssicament s'ha considerat que l'afectació dels ganglis limfàtics ressecats durant la cirurgia és el factor pronòstic més important en càncer de mama. A major nombre de ganglis amb presència de metàstasis tumoral major risc de recaiguda a distància i mort.¹³ En funció del nombre de ganglis infiltrats s'han definit quatre grups principals: ganglis negatius, de 1 a 3, de 4 a 9, i 10 o més ganglis amb cèl·lules malignes. L'afectació de 1-3 ganglis axil·lars disminueix la supervivència a 5 anys d'un 78% (sense infiltració ganglionar) a un 62%, mentre que en pacients amb 4 o més ganglis metastàtics la supervivència és del 32%.¹⁴

Tradicionalment l'anàlisi dels ganglis limfàtics s'havia avaluat mitjançant el buidatge axil·lar (o limfadenectomia axil·lar) dels nivells I i II axil·lar. Posteriorment, la introducció de la tècnica del gangli sentinella ha permès evitar la limfadenectomia axil·lar en aquells casos en què el gangli està lliure de malaltia o presenta cèl·lules tumorals aïllades (<2mm),¹⁵⁻¹⁷ micrometàstasi (0.2-2mm)¹⁸ o, en casos seleccionats, també amb macrometàstasi (>2mm),¹⁹ minimitzant així la morbiditat secundària al buidatge axil·lar, com són l'alteració de la sensibilitat de l'aixel·la i la cara interna del braç, o l'aparició de limfedema de l'extremitat superior.^{20,21} Actualment la metodologia OSNA (*One-Step Nucleic Acid Amplification*), tècnica que quantifica el nombre de còpies d'ARNm de la queratina CK19, permet l'anàlisi intraoperatòria del gangli sentinella d'una forma més precisa i sensible.²² Quan el gangli sentinella presenta cèl·lules tumorals amb una certa

quantia i hi ha un risc potencial que els ganglis secundaris també estiguin infiltrats per cèl·lules malignes és necessària la realització de la limfadenectomia.

1.3.1.2.- Mida tumoral

La mida del tumor ve definida per la mesura del component infiltrant del tumor. El pronòstic del càncer de mama està influït per la mida tumoral independentment de l'afectació ganglionar axil·lar, risc que es manté en els seguiments a llarg termini.²³ En pacients amb tumors sense metàstasis ganglionars, l'augment de la mida del tumor s'associa a un augment de la mortalitat específica per càncer de mama.²⁴ Paral·lelament, l'augment de la mida del tumor es correlaciona també amb una major risc d'afectació ganglionar axil·lar.²⁵

1.3.1.3.- Grau histològic

El grau histològic és una mesura de la diferenciació del tumor i és un factor pronòstic en càncer de mama,²⁶ especialment rellevant en tumors ganglis negatius.²⁷

Disposem de diferents classificacions. La més acceptada és la de Scarff-Bloom-Richardson i es basa en tres característiques: el nivell de diferenciació tumoral, el grau de pleomorfisme cel·lular i el nombre de mitosis presents, que permeten classificar-lo en 3 grups principals: tumors ben diferenciats (grau I), moderadament diferenciats (grau II) o pobrament diferenciats (grau III).²⁸ Malgrat que el valor pronòstic del grau histològic està ben establert, la seva pobre reproductibilitat i la variabilitat interobservador són dues de les seves principals limitacions.²⁹ Per aquest motiu, actualment s'empra la modificació

proposada per Elston i Ellis o modificació de Nottingham, que permet una millor concordança entre els patòlegs a l'hora de determinar el grau histològic i n'augmenta la capacitat pronòstica.³⁰ La classificació segons el sistema d'Elston i Ellis considera tres característiques del tumor: la formació de túbuls o glàndules, l'atípia nuclear i el nombre de mitosis. La suma de les puntuacions de cada un dels tres factors permet agrupar-lo en tres grups: grau I o ben diferenciat (score 3-5), grau II o moderadament diferenciat (score 6-7) i grau III o pobrament diferenciat (score 8-9). En estudis més recents basats en l'expressió gènica s'han desenvolupat índex multigènics que permetrien una millor correlació amb el grau histològic del tumor.^{31,32}

1.3.1.4.- Invasió limfovascular

La invasió limfovascular es defineix com la presència d'èmbols tumorals a l'espai endotelial pròxim al carcinoma invasiu,²⁵ i s'ha relacionat a perfils biològics de major agressivitat (alt grau histològic, manca d'expressió dels receptors hormonals, ganglis positius).²⁵ La invasió limfovascular és un factor pronòstic reconegut en pacients amb càncer de mama i ganglis negatius associant-se a un major risc de recidiva i mort per càncer de mama.³³⁻³⁶

1.3.1.5.- Subtipus histològic

El càncer ductal invasiu o infiltrant és el tipus histològic més freqüent de càncer de mama i es presenta en el 80% dels casos.^{37,38} Existeixen altres subtipus histològics associats a diferents pronòstics.³⁸

El carcinoma lobel·lar invasiu és el segon subtipus més freqüent (5-10%)^{38,39} i sol diferir del carcinoma ductal invasiu per presentar una major multifocalitat, multicentricitat i bilateralitat,⁴⁰ presentar-se en pacients de major edat, amb tumors receptors hormonals positius, baix grau nuclear, invasió limfovascular menys freqüentment i amb estadis més avançats al diagnòstic.^{39,41} El perfil de disseminació també sembla diferir del carcinoma ductal infiltrant observant-se més freqüentment metàstasis a leptomeninges, peritoneu, retroperitoneu, tracte gastrointestinal, òrgans reproductors i os, i un menor tropisme pel pulmó, fetge i parènquima cerebral.⁴⁰ Pel que fa al seu valor pronòstic quan es compara amb el carcinoma ductal invasiu, els resultats dels estudis són controvertits.⁴⁰⁻⁴² En un estudi amb 12.206 pacients provinents de 15 estudis del grup *International Breast Cancer Study Group* i amb una mitjana de seguiment de 13 anys, s'observà que, les pacients afectes d'un carcinoma lobel·lar invasiu presentaven, els primers anys, un millor pronòstic que aquelles amb carcinomes ductals invasius però, a partir dels 6 anys, un progressiu major risc de recaiguda i, a partir dels 10 anys, una pitjor supervivència.³⁹

Altres subtipus histològics menys freqüents com el papil·lar pur, el tubular i el mucinós identifiquen fenotips menys agressiu que el de les pacients afectes de carcinoma ductal invasiu.³⁸

1.3.1.6.- Capacitat de proliferació tumoral: marcador Ki67

El Ki67 és un anticòs monoclonal específic per un antígen nuclear i s'expressa durant el cicle cel·lular en la fase de proliferació (G₂, S, M i el final de la G₁).^{43,44} El seu resultat depèn del percentatge de cèl·lules que expressen l'anticòs, dividint els pacients en dos grups en funció de si l'índex de proliferació és alt o baix i permet establir una correlació

amb el pronòstic.

Diversos estudis avalen el paper del Ki67 com a marcador pronòstic en càncer de mama.⁴⁵⁻⁴⁷ No obstant, la validesa clínica d'aquest marcador de proliferació és controvertida donades les limitacions tècniques que en dificulten la seva reproductibilitat, una difícil estandardització i la falta d'homogeneïtat entre estudis per establir el punt de tall per determinar-ne el valor pronòstic.

L'estudi de Cheang i col·laboradors⁴⁸ plantejà que el marcador Ki67 permetria diferenciar els subtipus moleculars de càncer de mama luminal A dels luminals B, prenent com a punt de tall una expressió del 14%. Aquest punt de tall no ha estat posteriorment validat. Els experts de St. Gallen han consensuat com a punt de tall una expressió del marcador Ki67 del 20%.⁴⁹

També s'ha observat que la presència d'una major expressió de Ki67 es correlaciona amb l'absència dels receptors hormonals i la positivitat del marcador HER2.^{50,51}

1.3.2.- Característiques de les pacients

1.3.2.1.- Edat i estat menopàusic

L'edat és un factor de risc associat a càncer de mama⁸ i també un factor pronòstic.^{52,53} El càncer de mama en pacients menors de 35 anys s'associa a major risc de recaiguda i a característiques histològiques adverses (alt grau histològic, alta expressió de Ki67, invasió limfovascular i receptors hormonals negatius) en comparació amb les pacients

de major edat.^{54,55} En estudis recents basats en l'expressió gènica s'observa, en dones menors de 40 anys, una major freqüència dels subtipus moleculars triple negatiu i HER2 positiu i una menor freqüència de càncer de mama luminal A.⁵⁶

1.3.2.2.- Raça

Les dones afroamericanes presenten pitjor supervivència que les pacients de raça blanca.⁵⁷ Les causes d'aquestes diferències són probablement multifactorials: diferències en la biologia dels tumors,⁵⁸ estadis més avançats al diagnòstic,⁵⁷ i en el cas de la població afroamericana característiques socioeconòmiques desfavorables.⁵⁹

1.4.- Factors predictius

La informació pronòstica és complementada amb el coneixement dels factors predictius de resposta al tractament. Aquests són un conjunt de variables biològiques associades a la sensibilitat o resistència a un tractament sistèmic. Entre aquests factors hem de citar l'expressió dels receptors hormonals i l'existència d'amplificació de l'oncogen *HER2* (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*). L'expressió dels receptors hormonals s'associa a l'efecte terapèutic de l'hormonoteràpia, mentre que l'amplificació del gen *HER2* és factor predictiu de resposta als anticossos monoclonals trastuzumab,^{60,61} pertuzumab^{62,63} i trastuzumab-emtansina (T-DM1)⁶⁴ i també als inhibidors de la tirosina cinasa de l'*HER2* com es el cas del lapatinib⁶⁵ i el neratinib.⁶⁶

1.4.1.- Receptors d'estrògens i de progesterona

El receptor d'estrògens (RE) i el receptor de progesterona (RP) pertanyen a la família dels receptors esteroides. S'han descrit dues formes del RE: l'alfa (α) i la beta (β), codificades per gens diferents i independents. Ambdós tipus de receptors s'expressen en diferents teixits. Concretament, el RE α és el que s'expressa en les cèl·lules de càncer de mama i el que es determina a la pràctica clínica. Està codificat per un gen localitzat al cromosoma 14q22-q24, es sintetitza al citoplasma, i en absència de lligand es troba situat majoritàriament al citoplasma. La unió a l'estrogen activa una sèrie de mecanismes que impliquen la migració del receptor al nucli cel·lular, la dimerització del receptor i la unió d'aquest dímer a seqüències específiques d'ADN que indueixen la transcripció dels seus gens diana.^{67,68} Per altra banda, el RP actua de forma semblant al RE: la unió al lligand hormonal activa la traslocació al nucli i la posterior unió a seqüències específiques d'ADN, promovent el reclutament de proteïnes coactivadores i l'activació transcripcional.⁶⁹

El 60% dels carcinomes de mama en dones menors de 50 anys expressen els receptors horminals, en comparació al 80% en les dones postmenopàusiques.⁷⁰ La positivitat dels receptors horminals està inversament relacionada amb el grau histològic⁷¹ i l'índex de proliferació cel·lular Ki67⁷² i és un factor de bon pronòstic reconegut.^{73,74}

La determinació dels receptors horminals es realitza mitjançant tècniques d'immunohistoquímica. El RE és un marcador nuclear que detecta si les cèl·lules expressen la proteïna receptora dels estrògens. El mètode que mesura el grau d'expressió del receptor d'estrogen més emprat fou proposat pel grup d'Allred⁷⁵ i té en compte tant el percentatge de cèl·lules positives (valorat de l'1 al 5) com la intensitat de la tinció (valorada de l'1 al 3). La puntuació final es calcula sumant ambdós valors. Es considera positiu si s'expressa amb una

puntuació igual o major a 3. El RP també és un marcador nuclear que detecta si les cèl·lules expressen la proteïna receptora de la progesterona, es mesura mitjançant el mètode d'Allred⁷⁵ i es valora com a positiu emprant el mateix llindar que pel RE (positiu si la suma de les puntuacions d'intensitat i proporció és igual o superior a 3).

L'expressió dels receptors hormonals no és només factor pronòstic sinó que representa també un factor predictiu de resposta a l'hormonoteràpia.^{76,77} En absència del RE o del de progesterona, el tractament hormonal no té pràcticament impacte ni en la recurrència ni en la supervivència.⁷⁶ A més, el grau de resposta al tractament hormonal es correlaciona amb els nivells de positivitat del RE⁷⁶ i la presència del RP sembla augmentar el valor predictiu de resposta del RE a l'hormonoteràpia.⁷⁸

Desafortunadament, no totes les pacients presenten resposta (d'inici o posteriorment) al tractament hormonal. Això és degut a la presència o adquisició de resistències al tractament hormonal.⁷⁹ Diversos estudis demostren que la resistència al tractament hormonal estaria mediatitzada per la via de la *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K)–*Akt*–*mammalian target of rapamycin* (mTOR)^{80,81} entre d'altres.

Encara que el metanàlisi de l'EBCTCG (*Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group*) suggereix que el benefici a la quimioteràpia en pacients amb càncer de mama es dona independentment de l'estatus dels receptors hormonals,⁸² estudis més recents basats en l'expressió gènica^{83,84} suggereixen que en alguns subgrups de pacients l'expressió de receptors hormonals s'associaria a un menor benefici del tractament amb quimioteràpia.

1.4.2. Oncogen *HER2*

La família de receptors ErbB (HER) pertany al subgrup tipus I de la família de receptors transmembrana amb activitat tirosina cinasa. Està integrada per quatre membres: ErbB1/EGFR (HER1), ErbB2/Neu (HER2), ErbB3 (HER3) i ErbB4 (HER4), els quals, comparteixen un elevat grau d'homologia. La seva estructura consta de tres dominis:

1. El domini extracel·lular, situat a la zona N-terminal, la funció principal del qual és el reconeixement del lligand i la formació del dímer.
2. El domini transmembrana, lipofílic, el qual permet l'ancoratge del receptor a la membrana cel·lular.
3. El domini intracel·lular, que té activitat biològica. El canvi conformacional del domini extracel·lular causat per la formació del complex receptor-ligand, permet l'activació del domini intracel·lular i, per tant, de l'activitat cinasa del receptor.⁸⁵

ErbB2 és un receptor orfe, a causa de l'absència d'un lligand conegut que l'activi.⁸⁶ El domini extracel·lular té permanentment exposat el braç de dimerització cel·lular i no necessita d'un lligand que generi el canvi conformacional per activar-lo.^{86,87} Malgrat ser un receptor autònom passa a ser funcional quan forma heterodímers amb qualsevol dels receptors de la família HER units a lligand.⁸⁸ La seva activació desencadena activitats biològiques específiques: supervivència, proliferació i diferenciació cel·lulars, i inhibició de l'apoptosi.

El gen que codifica pel receptor HER2 (*ERBB2*, més conegut com *HER-2* o *HER-2/neu*) està localitzat al cromosoma 17q21.^{89,90} L'amplificació del gen *HER2* s'observa en un 20% de les pacients amb càncer de mama,⁹¹ i provoca un augment de l'expressió del

receptor HER2. Diversos estudis han demostrat una bona correlació entre l'amplificació del gen i la seva sobreexpressió proteica.^{92,93}

L'amplificació de l'*HER2* s'associa a múltiples activitats biològiques específiques (proliferació, desdiferenciació cel·lular, mecanismes d'apoptosi i reparació de l'ADN)⁹⁴ a processos moleculars -alteracions de la Topoisomerasa II alfa (*TOP2A*) i duplicació del centròmer del cromosoma 17 (*Chromosome 17 Enumeration Probe*, CEP17)-^{95,96} i a un fenotip clínic agressiu.⁹⁷⁻⁹⁹ El grup de Slamon fou el primer en demostrar l'impacte negatiu de l'amplificació del gen *HER2* en el pronòstic de les pacients amb càncer de mama.¹⁰⁰ L'amplificació del gen *HER2* és també un factor predictiu de resposta als fàrmacs diana anti-HER2: Trastuzumab,^{61,101} Lapatinib,⁶⁵ Pertuzumab,^{62,63} Ado-trastuzumab emtansina (T-DM1).⁶⁴ El benefici terapèutic del trastuzumab s'ha demostrat en diversos estudis en pacients amb càncer de mama precoç,^{61,102} localment avançat¹⁰³ i malaltia disseminada¹⁰¹ HER2 positiva.

No obstant, el paper del gen *HER2* com a factor predictiu de resposta als citostàtics i l'hormonoteràpia és controvertit: l'amplificació d'*HER2* s'ha associat a un menor índex de resposta a tractaments com el CMF (Ciclofosfamida, Metotrexat i Fluorouracil)¹⁰⁴ o el tamoxifè¹⁰⁵ i per contra, l'amplificació del gen *HER2* podria predir una major sensibilitat a la quimioteràpia amb taxans¹⁰⁶ i antraciclins.^{107,108} Aquest darrer punt serà discutit més àmpliament en un apartat posterior.

1.5.- Signatures d'expressió gènica

El càncer de mama és una malaltia heterogènia.¹⁰⁹ Els paràmetres clínics (edat, mida

tumoral, afectació ganglionar, grau histològic) i patològics (RE, RP o HER2) emprats a la pràctica clínica diària tenen un valor pronòstic i predictiu limitat. En aquest context, la tecnologia de *microarrays* és una de les eines amb més potencial per a la identificació de biomarcadors pronòstics i de resposta al tractament. Aquestes tècniques permeten interrogar de forma simultània l'expressió de milers de gens en una sola mostra de tumor, classificant-los en perfils d'expressió característics.^{110,111} Sota aquestes premisses, diversos estudis han tingut com a objectiu la creació de signatures d'expressió gènica que permetrien una millor aproximació pronòstica i predictiva.¹¹²

1.5.1- Subtipus intrínsecs de càncer de mama

Les firmes genètiques han permès la identificació de quatre subtipus intrínsecs principals de càncer de mama (*basal-like*, HER2-enriquit, luminal A i luminal B) i els tumors amb expressió normal (*normal-like*), amb diferències significatives pel que fa a la incidència, factors de risc, pronòstics i de resposta als tractaments.^{113,114} Posteriorment s'identificà un cinquè subtipus molecular anomenat *claudin-low*.^{115,116} L'estudi dels subtipus intrínsecs de càncer de mama requereix de mètodes d'alta tecnologia i és econòmicament molt costós. En aquest context, els estudis immunohistoquímics amb cinc marcadors (RE, RP, HER2, EGFR i citoqueratina 5/6) permeten una classificació aproximada a la de les firmes genètiques.^{58,117} No obstant, la concordança entre els subtipus intrínsecs de càncer de mama i els subtipus basats en els marcadors immunohistoquímics no és exacta.¹⁰⁹

A continuació s'exposen les principals característiques dels diferents subtipus intrínsecs de càncer de mama:

Subtipus luminals: S'anomenen així pel fet de presentar un patró d'expressió gènica semblant al component epitelial luminal de la mama. Els tumors *luminal-like* es divideixen en els subtipus moleculars luminal A i luminal B, que es diferencien principalment per un diferent nivell d'expressió dels gens de proliferació *MKI67*, *AURKA*, *TOP2A*, presentant els càncers luminal B pitjor pronòstic que els tumors luminal A.¹¹⁸ Concretament, els tumors luminal B solen presentar nivells alts de proliferació, mutacions de p53, i menor expressió del RE i dels gens reguladors del RE. Per contra, els tumors luminal A presenten alta expressió de gens reguladors del RE i baixa expressió de marcadors de proliferació. En conjunt els tumors luminals representen el subtipus més freqüent de càncer de mama (el subgrup luminal A el 30-40% dels càncers de mama i el luminal B el 20%).¹¹⁴ Estudis convencionals d'immunohistoquímica indiquen que el subtipus luminal de càncer de mama equivaldria a grans trets a aquells tumors amb expressió del RE (tumors RE positius).¹¹⁸

HER-2 enriquít. Es caracteritza per una elevada expressió d'*HER-2* i altres gens propers a l'*HER-2* al genoma, com per exemple *ERBB2*, *GRB7* i *FGFR4*. Solen ser tumors altament proliferatius i el 40% presenten mutacions de p53. Representen un 5-10% dels càncers de mama.^{109,119}

Subtipus basal. Es caracteritza per una baixa expressió dels gens luminals en relació al receptor hormonal i l'*HER2*, alta expressió dels clústers de proliferació i alta expressió del clúster basal. Aquest últim inclou els anomenats gens basals: citokeratines epitelials, com la CK5/6, 14, i 17, EGFR, c-Kit, vimentina, p-caherina, fascina, caveolines 1 i 2, y α crystalina. El subtipus basal comporta un pitjor pronòstic, amb un predomini de recaigudes a nivell visceral i cerebral, i menor tropisme ossi.¹¹⁴

Claudin-low. Es caracteritza per una baixa expressió de les proteïnes d'unió claudines 3, 4 i 7 i l'E-cadherina junt amb la presència de marcadors epitelials de transició epiteli-mesènquima i característiques de cèl·lules mares de càncer. Des d'un punt de vista clínic la majoria d'aquests tumors són carcinoma infiltrants receptors hormonals negatius i HER2 negatiu, amb un predomini de diferenciació metaplàsica i medul·lar. Representen el 7-14% dels tumors triple negatius, tenen pitjor pronòstic que el subtipus luminal A, i un pronòstic semblant als subgrups luminal B, HER-2 enriquit i al subtipus basal.¹¹⁶

Subtipus normal-like. El patró d'expressió gènica d'aquest subtipus molecular és molt semblant al de les cèl·lules basals epitelials i les cèl·lules adiposes de la mama, i presenta una baixa expressió dels gens característics de les cèl·lules epitelials luminals.

1.5.2.-Firmes genètiques

D'entre tots els perfils publicats, en destaquen dos (Oncotype DX i Mamamprint) per haver donat lloc a tests que actualment ja es troben en fase de validació prospectiva.

1.5.2.1.-Oncotype DX

L'anàlisi de 21 gens amb el Recurrence Score (RS, Oncotype DX®), es desenvolupà a partir de 250 gens candidats seleccionats de la literatura i analitzant 447 pacients, la majoria amb tumors ganglis negatius, hormonosensibles, emprant RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction*) a fi d'examinar un nombre limitat de gens en teixit parafinat. Dels 250 gens examinats, es seleccionaren 16 gens relacionats amb el càncer, i 5 de referència, per calcular el RS a partir d'una fórmula matemàtica.

Introducció

L'avantatge d'aquesta tècnica respecte altres firmes és que pot realitzar-se sobre teixit parafinat no requerint teixit fresc congelat.¹²⁰

Un anàlisi retrospectiu dels estudis NSABP B-20 i SWOG-8814 suggereix que no tots els pacients amb tumors receptors hormonals positius es beneficien de la quimioteràpia adjuvant. Ambdós estudis recolzen l'ús de l'Oncotype DX 21-gene RS per definir aquell subgrup de pacients que es beneficiarien de rebre tractament amb quimioteràpia. A l'estudi NSABP B-20,⁸³ que inclogué pacients amb càncer de mama ganglis negatius, aquelles que presentaven tumors amb un alt RS (≥ 31) obtenien un major benefici de la quimioteràpia amb CMF o MF (Metotrexat i Fluorouracil) en el risc de recaiguda a distància [relative risk (RR) = 0.26, IC 95% 0.13–0.53]. Les pacients amb tumors amb baix-RS (< 18) no es beneficiaven de l'addició de quimioteràpia (RR = 1.31, IC 95% 0.46–3.78). Pacients amb tumors de risc intermig (18–30) tampoc semblava que obtinguessin un benefici significatiu de la quimioteràpia (RR = 0.61, IC 95% CI 0.24–1.59). A l'estudi SWOG-8814,⁸⁴ que inclogué pacients amb càncer de mama i ganglis positius, s'objectivà que aquelles pacients amb tumors amb alt-RS (≥ 31) obtenien un benefici significatiu de la quimioteràpia en supervivència lliure de malaltia (SLM) [*Hazard Ratio* (HR) = 0.59, IC 95% 0.35–1.01]. No hi havia benefici a la quimioteràpia amb FAC en pacients amb tumors baix-RS (< 18) (HR = 1.02, IC 95% 0.54– 1.93). Les pacients amb tumors amb RS-intermig (18–30) aparentment tampoc semblava que es beneficiessin de la quimioteràpia (HR = 0.72, IC 95% 0.39–1.31).

Els estudis TAILORx i RxPONDER són estudis fase III de validació de la plataforma Oncotype DX que permetrà la identificació d'aquelles pacients amb tumors ressecats RE positius / HER2 negatius en les que la teràpia adjuvant endocrina sola és suficient gràcies a un inherent bon pronòstic amb només tractament hormonal, a la falta de benefici a la quimioteràpia, o a ambdós factors.^{121,122} L'estudi TAILORx està dissenyat per

pacients ganglis negatius, receptors hormonals positius i va finalitzar el seu reclutament el 2010. Recentment, se n'han publicat els primers resultats, on es confirma, en el subgrup de pacients amb tumors amb baix-RS (<10), baixes taxes de recaiguda [98.7% (IC 95%, 97.9 to 99.2)].¹²³ L'estudi RxPONDER, dissenyat per pacients amb tumors de 1 a 3 ganglis positius, finalitzà el reclutament l'octubre del 2015. Estem a l'espera dels resultats.

1.5.2.2.- Mammaprint

El perfil d'Amsterdam de 70 gens (test comercialitzat com a Mammaprint®) es realitzà a partir de teixit congelat de mostres del Netherlands Cancer Institute. Els autors varen incloure 98 tumors (78 tumors ganglis negatius, dels quals 34 desenvoluparen metàstasis durant un període de 5 anys de seguiment). Comparant l'expressió gènica dels tumors mitjançant *microarrays* d'ADN, definiren una signatura formada per 70 gens.

El valor pronòstic d'aquest perfil es va validar en 295 mostres independents de pacients amb càncer de mama T1-T2 amb o sense afectació ganglionar, que reberen o no tractament adjuvant. Amb un seguiment de 7 anys la signatura va estratificar les pacients en dos grups de risc. Les pacients classificades com de pitjor pronòstic segons la firma genètica (180) presentaren un major risc de recidiva a distància i mort que aquelles pacients classificades com de bon pronòstic (115) independentment de l'estat ganglionar. El segon estudi de validació es realitzà en una mostra de 302 dones de diferents institucions europees, menors de 60 anys, amb tumors T1 o T2 sense afectació ganglionar que no reberen tractament complementari. Amb un seguiment de més de 10 anys, la firma genètica va predir de forma més acurada el risc de recaiguda a distància i supervivència que els criteris clínics clàssics.^{124,125}

Introducció

El valor pronòstic d'aquesta firma genètica fou validat en una sèrie de pacients amb afectació ganglionar. Així Mook i col·laboradors publicaren els resultats de l'anàlisi de Mammaprint en una sèrie de 241 pacients amb tumors de mama T1 – T3, 1 a 3 ganglis afectats, operats i amb una mediana de seguiment de 8 anys. La supervivència lliure de metàstasi a distància i la supervivència específica per càncer de mama fou estadísticament superior en el grup classificat com de bon pronòstic per la firma genètica.¹²⁶

L'estudi MINDACT és l'estudi fase III de validació de la plataforma Mammaprint que permetrà la identificació d'aquelles pacients operades de càncer de mama sense afectació ganglionar o amb 1 a 3 ganglis afectes en les què la teràpia adjuvant endocrina sola és suficient gràcies a un inherent bon pronòstic amb només tractament hormonal, o a la falta de benefici a la quimioteràpia, o a ambdós factors. L'estudi de validació aleatoritzava les pacients en funció de si existia discrepància en el pronòstic determinat de forma clínica o bé per la plataforma genòmica amb l'objectiu de demostrar que la decisió de quimioteràpia adjuvant dirigida pel resultat genòmic era millor que pel criteri clínic. Les pacients de baix risc genòmic i clínic rebien sempre hormonoteràpia i aquelles d'alt risc clínic i genòmic rebien totes elles quimioteràpia. L'estudi MINDACT finalitzà el reclutament el juliol del 2011.¹²⁷ Els primers resultats han estat presentats a l'*AACR Annual Meeting 2016*¹²⁸ detectant en les pacients d'alt risc clínic/baix risc genòmic una supervivència lliure de metàstasi als 5 anys semblant, independentment que fossin aleatoritzades a la branca de quimioteràpia o no quimioteràpia.

1.5.2.3.- Firmes genètiques per predir la resposta a la quimioteràpia neoadjuvant

Finalment, esmentar que els tests moleculars específicament desenvolupats per predir la resposta completa patològica (RCp) a la quimioteràpia amb antraciclins i taxans no han demostrat superioritat sobre els paràmetres clinicopatològics clàssics i no disposem de resultats en supervivència.¹²⁹⁻¹³¹

1.6.- Quimioteràpia neoadjuvant

1.6.1.- Concepte de quimioteràpia neoadjuvant i objectius principals

La teràpia neoadjuvant, primària, preoperatòria o d'inducció en càncer de mama és aquell tractament sistèmic que s'administra prèviament al tractament quirúrgic o radioteràpic en casos de càncer de mama localment avançat no inflamatori (estadis III), càncer de mama inflamatori, i càncer de mama operable (tumors ≥ 2 cm).¹³²

Els principals objectius de la quimioteràpia neoadjuvant són:

1. Millorar les opcions quirúrgiques de les pacients (convertir tumors inoperables en operables¹³³ i convertir mastectomies en cirurgies conservadores).¹³⁴
2. Testar la sensibilitat del tumor al tractament sistèmic (informació pronòstica i predictiva).
3. Aconseguir una RCp, que s'ha proposat com a objectiu subrogat d'una millor SLM i d'una millor supervivència global (SG).¹³⁵⁻¹³⁸

1.6.2.- Quimioteràpia neoadjuvant i resposta completa patològica

La quimioteràpia primària és un procediment terapèutic habitual a la majoria d'unitats de patologia mamària. Inicialment la quimioteràpia neoadjuvant es va orientar en casos diagnosticats de càncer de mama localment avançat, perfil de pacients amb mal pronòstic, en què l'aplicació de tractaments locals havia demostrat una eficàcia molt limitada. La introducció de la quimioteràpia preoperatòria a la dècada dels setanta¹³³ va significar una millora substancial en els resultats d'aquestes pacients, en permetre un millor control local i un augment de les taxes d'operabilitat. En el seguiment posterior, s'observà que oferia un benefici en supervivència equivalent a la quimioteràpia adjuvant.¹³⁹

L'experiència de la quimioteràpia neoadjuvant en el càncer de mama localment avançat va evolucionar al llarg de la dècada dels vuitanta i noranta ampliant la seva indicació als tumors operables d'entrada. El grup de Milà encapçalat per Bonadonna introduí la quimioteràpia preoperatòria a l'estadi II del càncer de mama.¹³⁴ Així, en aquells tumors que en el moment del diagnòstic presenten una mida que no permet una teràpia preservadora de la glàndula mamària, l'administració d'un tractament previ a la cirurgia permet reduir la mida del tumor i oferir posteriorment una cirurgia de conservació de la glàndula, amb resultats en supervivència equivalents a la dels casos tractats amb el tractament adjuvant.

La majoria de les pacients tractades amb quimioteràpia preoperatòria experimenten una resposta clínica i patològica. La definició més àmpliament acceptada de RCp és l'absència de tumor invasiu a la mama i els ganglis axil·lars al moment de la cirurgia, independentment de la presència de component intraductal (ypT0/is ypN0).¹⁴⁰ La resposta clínica completa no sempre es correlaciona amb la RCp. Així, els resultats dels diferents

estudis mostren una taxa alta de respostes clíniques (49%-93%), i una taxa baixa de RCp (4%-30%).¹³² Els esquemes de quimioteràpia seqüencials amb antraciclins i taxans aconseguixen una taxa de RCp entre el 26% i el 34%, superiors a les prèviament assolides només amb antraciclins. Els tractaments prolongats de més de tres mesos que inclouen de 6 a 8 cicles de quimioteràpia assolixen taxes de RCp superiors als esquemes amb només 4 cicles (34-20% vs. 5-17%).¹⁴¹⁻¹⁴³

Els subtipus intrínsecs no luminals (HER2-enriquit i *basal-like*) presenten una major taxa de RCp després de quimioteràpia neoadjuvant quan es compara amb els tumors luminals A i B.^{144,145} En tumors HER2 positius la taxa de RCp pot arribar a ser del 40-66% quan es combina la quimioteràpia amb antraciclins i taxans i trastuzumab^{103,145} i del 46-61% amb quimioteràpia sense antraciclins i doble inhibició amb trastuzumab-lapatinib¹⁴⁶ o trastuzumab-pertuzumab.¹⁴⁷

Diversos estudis suggereixen que la RCp prediu un millor pronòstic en pacients amb càncer de mama i per tant seria un potencial marcador subrogat de supervivència.^{148,149} Els últims anys el nombre d'estudis de quimioteràpia primària ha augmentat.¹⁵⁰ Els estudis de quimioteràpia neoadjuvant capturen objectius intermedis, com la RCp, amb l'esperança que increments en aquests es tradueixin en millores significatives en els objectius definitius (SG). A diferència dels estudis adjuvants, els estudis neoadjuvants necessiten de menor mida mostral, són menys costosos, i l'objectiu principal (generalment la RCp) s'assoleix en mesos enlloc d'anys (a diferència de la SG). L'any 2013, la *United States Food and Drug Administration (FDA)* concedí l'aprovació accelerada al pertuzumab en estadis precoços o localment avançats de càncer de mama HER2 positiu¹⁵¹ en base als resultats dels estudis neoadjuvants,^{147,152} a l'espera dels resultats dels estudis confirmatoris en adjuvència.

D'aquesta manera s'obria la porta al registre de fàrmacs en base a estudis de quimioteràpia primària.

Malgrat l'entusiasme inicial dels investigadors, pacients i les agències reguladores, queden diverses preguntes per resoldre. Recentment, la publicació d'un anàlisi combinat d'estudis aleatoritzats per part de Patricia Cortazar i col·laboradors confirma el valor pronòstic de la RCp en pacients amb càncer de mama¹⁵³ però planteja dubtes respecte el seu possible valor predictiu. L'anàlisi va incloure informació de gairebé 12000 dones diagnosticades de càncer de mama que havien participat en grans estudis randomitzats de quimioteràpia neoadjuvant. L'estudi confirmà que les pacients que assolien una RCp presentaven una millor supervivència lliure d'esdeveniments (SLE) (HR 0·48, IC 95% 0·43–0·54) i una millor SG (HR 0·36, IC 95% 0·30–0·44).¹⁵³ Aquest efecte era més pronunciat en pacients amb subtipus de càncer de mama més agressius (tumors triple negatiu i HER2 positius), resultats concordants amb estudis previs.^{154,155} No obstant, l'augment en la freqüència de les RCp entre els dos grups de tractament no s'associava a un augment en la supervivència, i per tant, l'estudi no aconseguia validar la RCp com a objectiu subrogat de la SLE i SG (valor predictiu). S'han proposat diverses raons per explicar aquest resultat. Primer, podria ser que una milloria en la taxa de RCp traduís una milloria marginal de la resposta patològica en pacients ja *de per se* destinats a un bon pronòstic. En segon lloc, pràcticament tots els estudis analitzats van incloure pacients amb subgrups heterogenis de càncer de mama (tumors amb alta expressió de receptors hormonals difícilment assoliran una RCp després de la quimioteràpia tot i gaudir d'un bon pronòstic). En tercer lloc, només en tres estudis (GeparQuattro,¹⁵⁶ NOAH,¹⁰³ i TECHNO¹⁵⁷), les pacients rebien un tractament diana específic (trastuzumab) per un subtipus específic de càncer de mama (tumors HER2 positius) i només les pacients de

l'estudi NOAH rebien el trastuzumab post-operatòriament. De resultes, en la majoria d'estudis el benefici incremental en la taxa de RCp fou baix (diferències en la freqüència de RCp entre grups entre l'1 i l'11%) mentre que per l'estudi NOAH arribava a ser del 20% (35% en el grup de pacients tractades amb quimioteràpia i trastuzumab *vs.* 15% en les pacients tractades només amb quimioteràpia). En aquest darrer estudi, un major nombre de pacients assolien una millor SLE (benefici absolut del 13%), suggerint que es necessitarien grans augments en la taxa de RCp per impactar en la supervivència;¹⁰³ no obstant, haver rebut el trastuzumab durant un any podria haver impactat en la milloria en supervivència. Finalment, remarcar que algunes de les dones que assoliren una RCp van recaure, i moltes amb malaltia residual es mantingueren lliures de malaltia.^{153,158}

1.7.- Marcadors predictius de resposta a les antraciclins

1.7.1.- Les antraciclins com a agents antitumorals

Les antraciclins (doxorubicina/adriamicina i epirubicina) són uns dels fàrmacs amb major espectre d'activitat antineoplàsica.¹⁵⁹ El mecanisme d'acció més acceptat és la inhibició de la TOP2A, generant ruptures persistents de la cadena d'ADN.^{160,161} També s'han descrit altres mecanismes com són la formació de radicals lliures i els efectes directes sobre la membrana plasmàtica,^{159,162} que permetrien explicar, en part, els efectes secundaris derivats del tractament.

Les antraciclins són un dels pilars fonamentals de la quimioteràpia del càncer de mama. El metanàlisi d'Oxford⁸² demostrà que el tractament complementari amb antraciclins disminueix el risc relatiu de mort per càncer un 36% traduint-se en un 5% de benefici absolut als 10 anys en SG. Per tant, la majoria de les pacients no es beneficien del

tractament sistèmic però sí s'exposen als efectes secundaris aguts (principalment la toxicitat hematològica) i crònics (risc de segones neoplàsies hematològiques,¹⁶³ i toxicitat cardíaca).¹⁶⁴ Per aquest motiu resulta prioritària la identificació de marcadors predictius de resposta a les antraciclins que ens permeti identificar aquelles pacients que es beneficiarien del tractament.

Alguns estudis han observat que els tumors amb amplificació del gen *HER2* presenten una major sensibilitat a les antraciclins.¹⁶⁵ De forma paral·lela, l'amplificació del gen *HER2* s'ha relacionat amb l'amplificació del gen de la *TOP2A* i per aquest motiu s'ha postulat un hipotètic paper de la *TOP2A* com a marcador predictiu de sensibilitat a les antraciclins, si bé el resultat dels estudis són també discordants. Donada la localització dels gens *HER2* i *TOP2A* a la regió cromosòmica 17q12-q21, zona que presenta fenòmens d'instabilitat genètica i de disfunció en la reparació de l'ADN,^{166,167} estudis recents s'han centrat en la duplicació del CEP17 com a potencial factor predictiu de resposta a les antraciclins.

1.7.2.- HER2 com a predictor de resposta a les antraciclins

Com s'ha comentat anteriorment, el protooncogen *HER2*, es localitza a la regió cromosòmica 17q12-21 i codifica la síntesi d'un receptor transmembrana amb activitat tirosina cinasa.¹⁶⁸ L'amplificació del gen *HER2* s'observa en un 20% de les pacients amb càncer de mama⁹¹ fet que condiciona la sobreexpressió proteica del receptor *HER2*,^{92,93} i un fenotip clínic agressiu lligat a un alt potencial metastàtic i pitjor supervivència.¹⁰⁰ Afortunadament, durant la última dècada, la supervivència de les pacients amb càncer de mama *HER2* positiu ha millorat de forma substancial gràcies a l'aparició dels fàrmacs diana

anti-HER-2: Trastuzumab,^{61,101,102,169,170} Lapatinib,⁶⁵ Pertuzumab,^{62,63} i T-DM1.⁶⁴ No obstant, el paper del gen *HER2* com a factor predictiu de resposta a l'hormonoteràpia¹⁰⁵ i als citostàtics^{104,106,171,172} és controvertit.

El valor de la sobreexpressió i amplificació del gen *HER2* com a predictor de resposta a les antraciclins, ha estat analitzat com a mínim en quinze estudis clínics (Taula 1).^{107,108,165,173-188}

Taula 1. *HER2* amplificat i/o sobreexpressat com a predictor de resposta a les antraciclins.

Autor, Any	n ^a	n ^b	n ^c	Disseny	Estadi	Tractament	Mètodes	Resultat	P
Comparació entre diferents règims amb antraciclins									
Muss i al, 1994 ¹⁰⁸	114	397	1572	R	I-III	FAC30 vs. FAC40 vs. FAC60 ^d	IHC	Positiu ^f	<0.001
Del Mastro i al, 2005 ¹⁰⁷	103	731	1214	R	I-III	Dosis denses FEC vs. FEC estàndard ^d	IHC	Positiu ^f	<0.001
Tubbs i al, 2009 ¹⁸⁷	265	2123	3176	R	I-III	AC vs. A-C	IHC i FISH	Negatiu	NS
Tibau i al, 2014 ¹⁸⁶	24	137	140	R	II-III	FEC75/FAC60 vs. EC-T ^e	FISH	Negatiu	NS
Règim amb antraciclins vs. Règim sense antraciclins									
De Placido i al, 1995 ¹⁸⁵	NR	123	220	R	II-III	CMF-EV vs. CMF ^d	IHC	Positiu ^g	0.05
Paik i al, 1998 ¹⁷³	239	638	707	R	I-III	PAF vs. PF ^d	IHC	Positiu ^g	0.02
Paik i al, 2000 ¹⁷⁴	599	2034	2295	R	II-III	AC vs. CMF ^d	IHC	Negatiu	NS
Di Leo i al, 2001 ¹⁸³	56	481	777	R	II-III	EC100 vs. EC60 vs. CMF ^d	IHC, FISH	Negatiu	NS
Di Leo i al, 2002 ¹⁸²	73	354	430	R	II-III	EC100 vs. EC60 vs. CMF ^d	FISH	Negatiu	NS
Moliterni i al, 2003 ¹⁷⁸	95	506	552	R	II-III	CMF-A vs. CMF ^d	IHC	Negatiu	NS
Di Leo i al, 2004 ¹⁸⁸	35	176	326	R	IV	A vs. T	IHC i FISH	Negatiu	NS
Knoop i al, 2005 ¹⁷⁷	265	805	980	R	I-III	FEC vs. CMF ^d	IHC i FISH	Negatiu	NS
Colozza i al, 2005 ¹⁸¹	22	266	348	R	I-II	E vs. CMF ^d	IHC	Negatiu	NS
Pritchard i al, 2006 ¹⁶⁵	163	628	710	R	II-III	FEC vs. CMF ^d	IHC, FISH i PCR	Positiu ^g	0.02
Bartlett i al, 2010 ¹⁸⁴	367	1762	2391	R	I-III	ECMF vs. CMF ^d	IHC i FISH	Negatiu	NS

^a Nombre de pacients amb valor HER2 conegut que són HER2 positives

^b Nombre de pacients amb valor HER2 conegut

^c Nombre total de pacients inclosos a l'estudi

^d Esquemes de quimioteràpia adjuvant

^e Esquemes de quimioteràpia neoadjuvant

^f Esquema amb dosis denses superior al subgrup de pacients HER2 positives

^g Esquema amb antraciclins superior al subgrup de pacients HER2 positives

Abreviatures: A, adriamicina; AC, adriamicina, ciclofosfamida; CMF, ciclofosfamida, metotrexat, fluorouracil; D, docetaxel; E, epirubicina; EC, epirubicina, ciclofosfamida; ECMF, epirubicina, ciclofosfamida, metotrexat, fluorouracil; EV, epirubicina, vincristina; FAC, fluorouracil, adriamicina, ciclofosfamida; FEC, fluorouracil, epirubicina, ciclofosfamida; FISH, *Fluorescence In Situ Hybridization*; *HER2*, *human epidermal growth factor receptor 2*; IHC, immunohistoquímica; NR, no reportat; NS, no significatiu; PF, mostassa de L-fenilalanina, fluorouracil; PAF, mostassa de L-fenilalanina, adriamicina i fluorouracil; PCR, *polymerase chain reaction*; R, Retrospectiu; T, docetaxel.

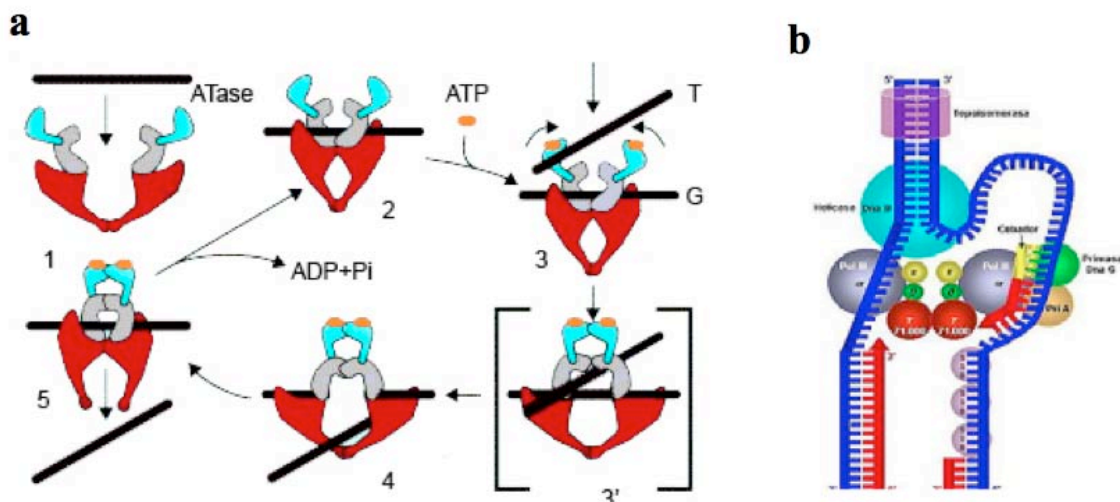
En deu d'ells ^{174,177,178,181-184,186-188} els resultats han estat negatius. Els treballs inicials que suggerien que els tumors HER-2 positius presenten una major sensibilitat a les antraciclins es basaven en anàlisis retrospectius de dos estudis on totes les pacients havien rebut esquemes de tractament amb antraciclins.^{107,108} Posteriorment, s'analitzà conjuntament el valor predictiu dels gens *HER2* i *TOP2A* en estudis de petita mida mostral que ja incloïen esquemes de quimioteràpia amb antraciclins i esquemes de quimioteràpia amb CMF.^{165,173,174,177,182,184,188-190} No obstant, només un dels estudis tenia suficient poder estadístic per detectar diferències estadísticament significatives entre els grups,^{184,191} sent l'estudi negatiu, resultats consistents amb els d'un recent metanàlisi.¹⁷² A aquest fet s'hi afegeix la naturalesa retrospectiva de tots els estudis, limitacions en la disponibilitat de les mostres, la variabilitat secundària a les diferents tècniques emprades en la determinació de l'estat de l'*HER2*^{165,183} i l'ús de diferents dosis i esquemes de quimioteràpia amb antraciclins (Taula 1).^{107,108}

Caldria qüestionar-se, doncs, si la sensibilitat a les antraciclins seria deguda a la sobreexpressió/amplificació del gen *HER2* o aquest actuaria de biomarcador subrogat d'un altre gen. Els estudis preclínic inicials no trobaren una relació consistent entre la sobreexpressió d'*HER2* i la sensibilitat a les antraciclins.^{192,193} Altres estudis demostraren que les antraciclins eren capaces d'interferir amb el tall i relligat de la TOP2A,¹⁶² produint lesions permanents a l'ADN.¹⁶¹ Aquests estudis suggerien que l'associació entre l'*HER2* i la sensibilitat a les antraciclins podria estar relacionada amb la TOP2A.

1.7.3.- TOP2A com a predictor de resposta a les antraciclines

La proteïna topoisomerasa-II alfa (TOP2A) pertany a la família de les topoisomerases, un grup d'enzims encarregats de modificar l'estructura terciària de l'ADN. La TOP2A juga un paper determinant durant la replicació i transcripció de l'ADN així com en la condensació i segregació cromosòmica.¹⁹⁴ La TOP2A actua produint ruptures transitòries a les cadenes d'ADN que permet la lliure rotació de les dues hèlices d'ADN i el pas dels complexos enzimàtics responsables de la replicació o de la transcripció de l'ADN (Figura 1).

Figura 1. Mecanisme d'acció de la topoisomerasa II alfa (TOP2A). (a) La TOP2A és un enzim homodimèric format per tres dominis funcionals: ATPasa (part superior), domini de tall (B) i regió C-terminal (A). La TOP2A talla una de les hèlices (G), permeten el pas de l'altra cadena d'ADN intacta (T). Els fàrmacs inhibidors de la TOP2A actuen a nivell dels passos 3 o 4, establint les ruptures de les cadenes d'ADN. (b) La TOP2A modifica l'estructura terciària de l'ADN, permetent el pas dels complexos replicatius i transcripcionals (adaptat de *Schoeffler AJ, et al. Q Rev Biophys 2008;41:41-101*).

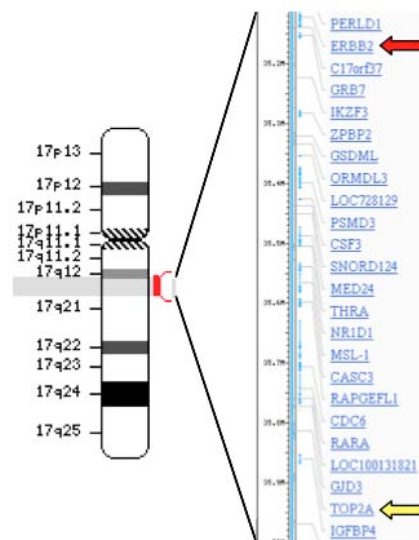


L'enzim TOP2A és la diana molecular dels inhibidors de la TOP2A (antraciclins, etopòsit)¹⁹⁵ encara que el mecanisme exacte de citotoxicitat no està plenament establert. Probablement aquests fàrmacs actuen augmentant el nombre d'unions covalents de l'enzim i l'ADN, estableixen els complexos ADN-TOP2A, provocant l'escissió mantinguda de la cadena d'ADN i la pèrdua de la seva funció, fenomen que en última instància condueix a la mort cel·lular per apoptosi. Estudis *in vitro* suggereixen que l'amplificació del gen de la *TOP2A* conduiria a la sobreexpressió de l'enzim TOP2A,¹⁹⁶⁻¹⁹⁸ però a diferència del gen *HER2*, estudis preclínic i clínic no han confirmat que l'amplificació de la *TOP2A* presenti una relació consistent amb la sobreexpressió d'aquesta proteïna,^{199,200} excepte en tumors altament proliferatius.²⁰¹ Probablement, esdeveniments no genètics com la taxa de proliferació cel·lular afecten la seva expressió.¹⁸⁹ Per tant, l'expressió de la proteïna TOP2A no sembla ser una predictor fiable de la resposta als inhibidors de la TOP2A, malgrat ser la diana molecular de les antraciclins. L'amplificació del gen de la *TOP2A* podria emprar-se com a marcador predictiu del tractament amb antraciclins.

El locus cromosòmic humà 17q12-q21 agrupa, a més del gen *HER2*, altres gens entre els que es troba el gen de la *TOP2A* (Figura 2). Jarvinen i el seu grup foren els primers en demostrar que l'amplicó del gen *HER2* en realitat inclou com a mínim dos amplicons i que l'amplificació de la *TOP2A* i l'*HER2* són fenòmens independents, encara que s'associen amb una certa freqüència (32-57% en tumors HER2 positius vs. 5-10% en tumors HER2 negatius).¹⁹⁸ Altres estudis han demostrat que quan el gen *HER2* i el gen de la *TOP2A* estan coamplificats, el nombre de còpies de l'*HER2* i de la *TOP2A* no són idèntics, recolzant també aquesta última hipòtesi.^{93,202} Donat que l'enzim de la TOP2A és la diana

molecular de les antraciclines, seria possible que fos aquest gen i no el de l'*HER2*, el nexa d'unió entre la malaltia *HER2* positiva i la sensibilitat a les antraciclines.²⁰¹

Figura 2. Detall del locus cromosòmic humà 17q12-q21. Aquest amplicó conté, a més del gen *HER2* (fletxa vermella), altres gens entre els quals destaca el gen de la *TOP2A* (fletxa groga) que codifica l'enzim T2A.



L'amplificació de la *TOP2A* és un fenomen poc freqüent en càncer de mama, amb una prevalença entre un 5 i un 10% segons els estudis més destacats.^{172,177,182} Diversos estudis han analitzat el paper de la *TOP2A* com a marcador predictiu de resposta a les antraciclines en càncer de mama amb resultats discordants.^{177,183,184,203-205} (Taula 2). De forma semblant a l'anàlisi del gen *HER2*, aquests estudis són de caràcter retrospectiu, la majoria de petita mida mostral,^{177,183,203,204} o les pacients havien rebut només esquemes de tractament amb antraciclines.^{186,204} Així, l'únic estudi amb suficient poder estadístic per

Introducció

detectar diferències estadísticament significatives entre els grups, que ja demostrava que l'amplificació del gen *HER2* no era el marcador predictiu de les antraciclins, també resultà negatiu per la *TOP2A*.^{184,191}

Taula 2. *TOP2A* amplificada i/o sobreexpressada com a predictor de resposta a les antraciclins.

Autor, Any	n ^a	n ^b	n ^c	Disseny	Estadi	Tractament	Mètodes	Resultat	P
Comparació entre diferents règims amb antraciclins									
Tanner i al, 2006 ²⁰⁴	48 ^d	391	525	R	III	Escalada dosi FEC vs. FEC – CTCb ^e	CISH	Positiu ^d	0.02
Tubbs i al, 2009 ¹⁸⁷	65	2123	3176	R	I-III	AC vs. A-C	FISH	Negatiu	NS
Press i al, 2011 ²⁰⁵	1057 ^d	2990	3222	R	II-III	ACT vs. ACTH + TCH	FISH	Positiu ^d	0.04
Tibau i al, 2014 ¹⁸⁶	7	137	140	R	II-III	FEC75/FAC60 vs. EC-T ^f	CISH	Negatiu	0.054
Règim amb antraciclins vs. Règim sense antraciclins									
Di Leo i al, 2001 ¹⁸³	161	481	777	R	II-III	EC100 i EC60 vs. CMF ^e	IHC	Negatiu	NS
Knoop i al, 2005 ¹⁷⁷	93	773	980	R	I-III	FEC vs. CMF ^e	FISH	Negatiu	0.06
O'Malley i al, 2009 ²⁰³	54	438	710	R	II-III	FEC vs. CMF ^e	FISH	Negatiu	NS
Bartlett i al, 2010 ¹⁸⁴	169	1762	2391	R	I-III	ECMF vs. CMF ^e	FISH	Negatiu	NS
Press i al, 2011 ²⁰⁵	1057 ^d	2990	3222	R	II-III	ACT vs. TCH	FISH	Negatiu	0.06
^a Nombre de pacients amb tumors amb <i>TOP2A</i> amplificada i/o sobreexpressada ^b Nombre de pacients amb status de la <i>TOP2A</i> conegut ^c Nombre total de pacients incloses a l'estudi ^d Status de la <i>TOP2A</i> analitzat només en el subgrup de pacients <i>HER2</i> positives ^e Esquemes de quimioteràpia adjuvant ^f Esquemes de quimioteràpia neoadjuvant Abreviatures: A, adriamicina; AC, adriamicina, ciclofosfamida; ACT, adriamicina, ciclofosfamida, docetaxel; ACTH, adriamicina, ciclofosfamida, docetaxel, i trastuzumab; C, ciclofosfamida; CISH, <i>Chromogenic in situ hybridization</i> ; CMF, ciclofosfamida, metotrexat, fluorouracil; CTCb, ciclofosfamida, tiotepa i carboplatí; D, docetaxel; EC, epirubicina, ciclofosfamida; ECMF, epirubicina, ciclofosfamida, metotrexat, fluorouracil; FAC, fluorouracil, adriamicina, ciclofosfamida; FEC, fluorouracil, epirubicina, ciclofosfamida; FISH, <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i> ; IHC, immunohistoquímica; NS, no significatiu; R, Retrospectiu; TCH, docetaxel, carboplatí, i trastuzumab.									

Per altra banda, alguns estudis mostraren una clara correlació entre els valor predictiu de l'*HER2* i de les alteracions de la *TOP2A* (amplificació/deleció)^{165,203} mentre d'altres suggerien que el valor predictiu recauria en les alteracions de la *TOP2A* però no en les amplifacions de l'*HER2*.^{177,205}

Recentment, els resultats de l'estudi BCIRG006^{60,205} que comparava en pacients amb tumors *HER2* amplifcats dos esquemes de quimioteràpia amb trastuzumab (ACTH,

adriamicina, ciclofosfamida, docetaxel, i trastuzumab i TCH, docetaxel, carboplatí, i trastuzumab) amb un esquema de quimioteràpia sense trastuzumab (ACT, adriamicina, ciclofosfamida, docetaxel) suggerí que en aquelles pacients amb coamplificació del gen *HER2* i de la *TOP2A*, no es demostrava superioritat d'un règim amb antraciclins a un règim amb trastuzumab (ACT vs. ACTH, *P* d'interacció 0.11 i ACT vs. TCH *P* d'interacció 0.063). Aquests resultats estan oberts a diferents interpretacions. Per una banda, podria ser que els tumors amb coamplificació d'ambdós gens, la *TOP2A* fos necessària per obtenir un benefici de les antraciclins. Per altra banda, es podria interpretar que l'amplificació de la *TOP2A* fos un marcador de resistència al trastuzumab donat que aquelles pacients amb tumors que presentaven una amplificació de l'*HER2* i la *TOP2A* no es beneficiaven significativament d'afegir el trastuzumab. Finalment, en tumors *HER2* positius, l'amplificació del gen de la *TOP2A* podria ser un marcador de quimiosensibilitat generalitzada, donat que l'esquema de tractament amb docetaxel, carboplatí i trastuzumab no demostrà menor efectivitat que la branca amb antraciclins. L'estudi conclou que en el subgrup de pacients *HER2* positius i amb *TOP2A* amplificada es podria ometre la quimioteràpia amb antraciclins. No obstant, no proporciona informació sobre el paper de les antraciclins en el subgrup de pacients amb tumors *HER2* negatives o amb duplicació del CEP17. Per altra banda, l'estudi també conclou que la coamplificació de la *TOP2A* en el subgrup de pacients *HER2* positius, i no l'amplificació de l'*HER2*, seria el marcador predictiu de resposta a les antraciclins.

Un altre aspecte pendent d'aclarir és el de les delecions de la *TOP2A*, amb una prevalença global entre el 2-11%.¹⁷² Estudis previs associen les delecions del gen de la *TOP2A* amb resistència als inhibidors de la *TOP2A*.^{196,206} Estudis més recents apunten en sentit contrari.¹⁷⁷

S'hauria de restringir l'ús de les antraciclinaes a les pacients amb tumors *HER2*-positius o *TOP2A* amplificada? Considerats conjuntament, aquests estudis no aconsegueixen confirmar o refutar el possible paper d'aquests biomarcadors com a factors predictius de sensibilitat a les antraciclinaes. A fi de resoldre aquestes qüestions, Angelo Di Leo i col·laboradors publicaren el 2011 un metanàlisi¹⁷² amb dades de pacients individuals provinents de 5 estudis randomitzats que comparaven règims amb antraciclinaes amb règims amb CMF.²⁰⁷⁻²¹⁰ Avaluaren de forma centralitzada l'estatus del gen *HER2* i la *TOP2A* mitjançant FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*): l'estatus del gen *HER2* en 3452 pacients i l'estatus de la *TOP2A* en 3102. Posteriorment calcularen els HR comparant la SLE i la SG en ambdós grups de pacients i dues cohorts d'*HER2* (tumors *HER2* ampificats vs. *HER2* no ampificats) i en tres cohorts de *TOP2A* (tumors amb *TOP2A* normal, ampificada, o amb deleció). El resultat de l'estudi fou negatiu, no recolzant l'ús exclusiu de les antraciclinaes només en pacients amb tumors *HER2* ampificats o *TOP2A* alterada, tancant d'aquesta manera un debat obert 15 anys abans.

1.7.4.- Duplicació del CEP17 com a predictor de resposta a les antraciclinaes

Donada la localització dels gens *HER2* i *TOP2A* al cromosoma 17, estudis recents s'han centrat en altres alteracions moleculars que es localitzarien a la regió 17q21, incloses alteracions en gens claus com *HER1-3*,¹⁸⁴ *p53*,²¹¹ i *BRCA1*,²¹² o variacions en el nombre de còpies de les regions subcromosòmiques, com a potencials factors predictius de resposta a les antraciclinaes. Concretament, estudis clínics recents^{184,186,213} suggereixen que la duplicació del cromosoma 17 mesurada amb sondes centromèriques (*Chromosome Enumeration Probe*, CEP) actuaria com a potencial biomarcador de sensibilitat a les antraciclinaes (Taula 3).

Taula 3. Duplicacions del CEP17 com a predictor de resposta a les antraciclines.

Autor, Any	n ^a	n ^b	n ^c	Disseny	Estadi	Tractament	Mètodes	Resultat	P
Comparació entre diferents règims amb antraciclines									
Tibau i al, 2014 ¹⁸⁶	13	137	140	R	II-III	FEC/FAC vs. EC-T ^d	CISH	Positiu	0.02
Règim amb antraciclines vs. Règim sense antraciclines									
Bartlett i al 2010 ¹⁸⁴	406	1931	2391	R	I-III	ECMF vs. CMF ^e	FISH	Positiu	0.03
Pritchard i al, 2012 ²¹³	253	639	716	R	II-III	FEC vs. CMF ^e	FISH	Negatiu	NS

^a Nombre de pacients amb tumors amb el CEP17 duplicat
^b Nombre de pacients amb valor del CEP17 conegut
^c Nombre total de pacients inclosos a l'estudi
^d Esquemes de quimioteràpia neoadjuvant
^e Esquemes de quimioteràpia adjuvant
Abreviatures: CEP17, *Chromosome 17 Enumeration Probe*; CISH, Chromogenic in situ hybridization; CMF, ciclofosfamida, metotrexat, fluorouracil; D, docetaxel; EC, epirubicina, ciclofosfamida; ECMF, epirubicina, ciclofosfamida, metotrexat, fluorouracil; FAC, fluorouracil, adriamicina, ciclofosfamida; FEC, fluorouracil, epirubicina, ciclofosfamida; FISH, *Fluorescence In Situ Hybridization*; NS, no significatiu; R, Retrospectiu.

No obstant, el mecanisme subjacent pel qual les duplicacions del CEP17 s'associarien a una major sensibilitat a les antraciclines no és ben conegut. Estudis d'Hibridació Genòmica Comparada proposen que la duplicació del CEP17 representaria una duplicació centromèrica o de regions subcromosals (inclòs el centròmer), més que no pas una duplicació completa del cromosoma.^{95,166,214,215} El cromosoma 17 acull múltiples gens que juguen un paper central en càncer de mama i en gens de reparació de l'ADN, inclosos els gens *BRCA1*, *TP53*, *HER2*, i la *TOP2A*.^{165,216-219} La regió cromosòmica 17q12-q21 presenta diversos fenòmens d'instabilitat genètica i de disfunció en la reparació de l'ADN.^{166,167} Malgrat el gen *HER2* és el gen més àmpliament estudiat d'aquesta regió, amplifícacions i delecions dels gens veïns, inclosos *GRB7*, *CDC6*, i *TOP2A*, són freqüents.²²⁰ Un augment en el nombre de còpies del CEP17 generaria, doncs, canvis genòmics claus, com per exemple amplifícació del gen *HER2*, amplifícació o delecio de la *TOP2A*, pèrdua de p53 i pèrdua de *BRCA1*. Aquestes anomalies cromosòmiques conduirien a mecanismes de tumorigènesi (proliferao cel·lular, angiogènesi i inhibicio de

l'apoptosi).^{166,221,222} A tall de conclusió, les duplicacions del CEP17 reflectirien la inestabilitat cromosòmica i disfunció en punts claus de la reparació de l'ADN, ambdós fenòmens lligats a sensibilitat a les antraciclins en estudis *in vitro*, podent explicar l'efecte clínic observat, no només en el cas de les duplicació del CEP17 sinó també en el cas de les anormalitats de la *TOP2A* (delecions i amplificacions).²²³

Recentment, en un anàlisi agrupat²²⁴ de 5 estudis clínics^{165,172,177,182,184,203} amb avaluació centralitzada de la duplicació del CEP17, apunta que aquesta, junt amb les aberracions del gen de la *TOP2A*, serien un marcador predictiu independent de sensibilitat a les antraciclins, demostrant resultats consistents a través dels 5 estudis inclosos.

1.8.- Marcadors predictius de resposta als taxans

1.8.1.- Organització del citoesquelet cel·lular

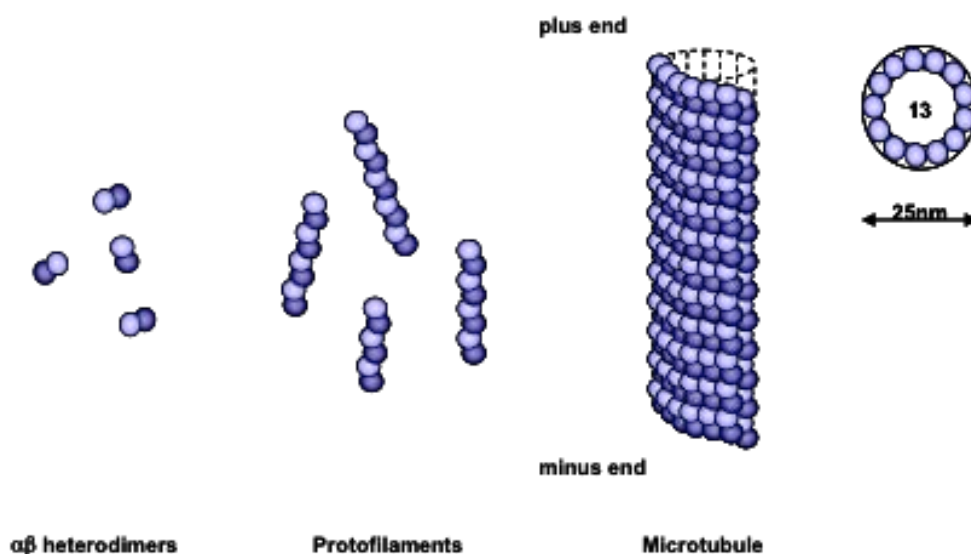
1.8.1.1.- Composició dels microtúbuls

El citoesquelet cel·lular és una estructura altament dinàmica i organitzada, formada per tres elements majoritaris: els microfilaments, els filaments intermedis i els microtúbuls. Els microtúbuls són components dinàmics del citoesquelet cel·lular i participen en el manteniment de la forma cel·lular, la motilitat i la divisió cel·lular, el transport intracitoplasmàtic i la regulació de diverses vies de senyalització.²²⁵

Els microtúbuls són estructures tubulars cilíndriques, buides i rígides de 25nm de diàmetre exterior i 12nm de diàmetre interior formades per subunitats de la proteïna globular tubulina. La tubulina és un heterodímer format per una subunitat α i una subunitat

β i és la unitat estructural del microtúbul. La tubulina és una de les proteïnes cel·lulars més abundants, present a tots els organismes eucariotes; representa el 2-5% de les proteïnes de l'epiteli cel·lular i el 10-20% de les proteïnes del teixit nerviós d'animals superiors. La majoria de cèl·lules eucariotes presenten diferents isoformes de tubulina, codificades per diferents gens. Els dímers d' $\alpha\beta$ -tubulina polimeritzen per unió cap amb cua mitjançant enllaços no covalents formant protofilaments lineals. Posteriorment els protofilaments interaccionen lateralment per contacte entre monòmers del mateix tipus formant cilindres helicoidals al voltant d'un eix central buit. El conjunt de tretze protofilaments forma el microtúbul (encara que *in vivo* s'han descrit microtúbuls constituïts entre 9 i 15 protofilaments) (Figura 3).²²⁶⁻²²⁹

Figura 3. Estructura del microtúbul. Els microtúbuls són estructures tubulars cilíndriques formades per subunitats de la proteïna globular tubulina. La tubulina és un heterodímer format per una subunitat α i una subunitat β que polimeritzen per unió cap amb cua formant protofilaments lineals. Posteriorment els protofilaments interaccionen lateralment per contacte entre monòmers del mateix tipus formant cilindres helicoidals al voltant d'un eix central buit. El conjunt de tretze protofilaments forma el microtúbul.



1.8.1.2.- Component dinàmic dels microtúbuls

Les funcions biològiques dels microtúbuls estan regulades principalment per la seva dinàmica de polimerització amb constants engalaments i despolimeritzacions, de manera que existeix un equilibri dinàmic entre els polímers de microtúbuls i la forma soluble dels heterodímers de tubulina.²³⁰ Una característica important dels microtúbuls és la seva polaritat. Degut a que els protofilaments es disposen de forma paral·lela (determinada per l'assemblatge i orientació dels heterodímers d' $\alpha\beta$ -tubulina en una mateixa direcció), el microtúbul és una estructura polar. Un extrem està compost per un monòmer d' α -tubulina (és l'anomenat extrem o pol negatiu) i, l'oposat, per un anell de β -tubulina (anomenat extrem o pol positiu). La velocitat d'elongació del microtúbul per addició de tubulina és més ràpid a l'extrem positiu que a l'extrem negatiu. Tan l'assemblatge com el desassemblatge es donen preferentment i de forma més ràpida i extensa al pol positiu dels microtúbuls però hi predomina la polimerització sobre la despolimerització. L'extrem positiu, per tant, és l'extrem de creixement del microtúbul. Per contra, al pol negatiu el microtúbul és també polimeritzat, però la incorporació de dímers de tubulina es dona a un ritme molt més lent.²³¹

La polimerització implica dos tipus de contacte entre les subunitats de la tubulina: les interaccions longitudinals o contacte cap-cua que generen un creixement longitudinal dels protofilaments, i les interaccions laterals responsables de la formació de la paret del microtúbul. Els contactes longitudinals són més intensos que els laterals. La cinètica de polimerització del microtúbul requereix també de dues molècules del nucleòtid GTP (*Guanosine Triphosphate*). Una primera molècula de GTP, no hidrolitzable, es troba unida a la subunitat α - en un extrem no intercanviable (*N-site* de l'anglès *non-exchangeable*), on

sembla que té un paper estructural, i una segona molècula de GTP, hidrolitzable, està unida a la subunitat β - a l'extrem intercanviable (*E-site* de l'anglès *exchangeable*) on pot unir-se o bé a GTP o a GDP (*Guanosine Diphosphate*). L'addició del dímer de tubulina als extrems d'un microtúbul comporta la unió, hidròlisi i intercanvi del nucleòtid GTP unit a la β -tubulina a la conformació inactiva GDP. Així l'extrem d'un microtúbul estarà format transitòriament per subunitats de tubulina-GTP i el centre del microtúbul estarà enriquit amb tubulina-GDP. A l'extrem oposat del microtúbul es dona aleshores l'escurçament d'aquest. Un dels paràmetres que determina l'estabilitat d'un microtúbul és la velocitat a la qual la tubulina-GTP s'addiciona a l'extrem positiu. L'estat de creixement (transició de despolimerització a polimerització) s'anomena "estat de rescat" i l'estat de decreixement (transició de polimerització a despolimerització) "estat de catàstrofe". L'energia alliberada en aquest procés permet la polimerització dels heterodímers d' $\alpha\beta$ -tubulina, la formació del microtúbul i la transició de l'estat de catàstrofe a l'estat de rescat.²³² Diversos estudis demostren que en una mateixa cèl·lula mentre uns microtúbuls estan despolimeritzant-se (catàstrofe) d'altres s'engalzen (rescat) i que un mateix microtúbul pot oscil·lar temporalment entre fases d'elongació i escurçament, definint un comportament complex i característic dels microtúbuls que rep el nom d'instabilitat dinàmica.^{233,234} Així la polimerització del microtúbul mostra un equilibri dinàmic amb el *pool* o magatzem intracel·lular de dímers de tubulina. Aquest equilibri es manté per la incorporació de dímers lliures a les estructures polimeritzades i un alliberament dels dímers al *pool* soluble de la tubulina.

Les funcions biològiques dels microtúbuls estan regulades principalment per la seva dinàmica de polimerització amb constants engalzaments i despolimeritzacions, de manera que existeix un equilibri dinàmic entre els polímers de microtúbuls i la forma soluble dels

heterodímers de tubulina, la integració de les proteïnes associades a microtúbuls (*Microtubule Associated Proteins*, MAP) i la integració dels isotips de β -tubulina (la principal proteïna dels microtúbuls).²³⁰ A continuació s'exposa amb major detall alguns dels mecanismes de regulació de la dinàmica de polimerització dels microtúbuls.

1.8.1.3.- Proteïnes associades als microtúbuls

Les MAP són proteïnes intracel·lulars que participen en el transport de vesícules a través de la xarxa de microtúbuls de la cèl·lula i en la segregació dels cromosomes durant la mitosi. També col·laboren en l'assemblatge de les subunitats de tubulina per a la formació de microtúbuls, i realitzen funcions d'estabilització i comunicació amb altres microtúbuls adjacents.²³⁵ Segons la seva funció es distingeixen tres tipus de MAP: proteïnes estructurals, com la proteïna Tau; proteïnes casquet, com les MAP-2 i MAP-4; i proteïnes motores, com la Kinesina i la Dineïna.^{236,237}

1.8.1.4.- Isotips de les tubulines

Existeixen múltiples isotips de la β -tubulina. Aquests isotips representen una família de proteïnes altament homòlogues i que difereixen únicament en un 4-16% de les seqüències d'aminoàcids.²³⁸ Concretament, la majoria de les divergències es concentren en els 10-15 aminoàcids de la última seqüència carboxi-terminal i les diferents seqüències carboxi-terminal són el que determinen les diferents classes d'isotips de la β -tubulina.^{238,239} Com a mínim, s'han descrit 8 isotips diferents de β -tubulina (classes I, II, III, IVa, IVb, V, VI i VII) (Taula 4).^{238,240}

Taula 4. Isoformes de la β -tubulina.

Classe	Gen Humà	Expressió	Regió C-terminal
I	HM40	Isotip predominant en la majoria de cèl·lules	ATAEEEEDFGEEAEEEA
II	H β 9	Cervell	ATADEQGEFEEEGEDEA
III	H β 4	Cervell, testicles; nivells elevats en alguns tumors en comparació al teixit normal	ATAEEEGEMYEDDEEESESQGPK
Iva	H β 5	Específica del cervell	ATAEEGFEFEEAEEVA
IVb	H β 2	Testicles	ATAEEGFEFEEAEEVA
V	ND	Expressió ubiqua	
VI	H β 1	Específica de determinades cèl·lules hematopoètiques	AKAVLEEDDEEVTEEAEMEPEDKGH

Inicialment es pensà que els diferents isotips de les tubulines tenien funcions específiques a nivell cel·lular. Posteriorment, diferents estudis demostraren que els diferents isotips tenien funcions redundants i que la substitució d'un isotip per un altre no alterava la funció cel·lular.²⁴¹ La majoria de cèl·lules eucariotes presenten diferents isoformes de tubulina, codificades per diferents gens.²⁴² Les classes I i II de la β -tubulina són els isotips més abundants. La β III-tubulina inicialment es pensà que es localitzava només a nivell neuronal i al teixit tissular. Posteriorment, l'expressió d'aquest isotip de la tubulina s'ha observat a la mitocondria i al citoplasma cel·lular d'altres teixits. Per altra banda, s'ha objectivat una àmplia distribució dels subtipus I, II, III i IV de β -tubulina en teixit normal i de càncer de mama essent aquests 4 subtipus els més àmpliament expressats a aquest nivell²⁴³.

1.8.2.- Els taxans com a agents antitumorals

Existeixen dos grans grups d'inhibidors dels microtúbuls: els que desestabilitzen els microtúbuls (p.e. alcaloides de la vinca, colquicina) i els que els estabilitzen (p.e. taxans i epotilones). En concret, els taxans (paclitaxel i docetaxel) s'uneixen directament als

microtúbuls en un punt d'unió de la β -tubulina específic i diferent del lloc d'unió del GTP i d'altres fàrmacs antitubulina com la vinblastina o la colquicina.²⁴⁴ Els taxans afavoreixen la polimerització del microtúbul estabilitzant la seva despolimerització, promouen les fases de nucleació i elongació i redueixen la concentració del *pool* de tubulina soluble necessari per la polimerització.²⁴⁵ De resultes, els microtúbuls formats en presència del taxans són molt estables però no funcionals; presenten una estabilitat inusual que provoca la inhibició del dinamisme intrínsec dels microtúbuls i, per tant, del seu funcionament. La desorganització de la dinàmica dels microtúbuls per part dels inhibidors dels microtúbuls, comporta una alteració en les funcions citoplasmàtiques del microtúbuls en les cèl·lules en interfase i la disrupció del cicle cel·lular (fase G2/M) durant la divisió cel·lular. Els efectes d'aquests fàrmacs tan en les cèl·lules en interfase com en les cèl·lules en divisió, comporta la mort cel·lular per mecanismes encara no clarificats.²⁴⁶⁻²⁴⁸

Els taxans (paclitaxel i docetaxel) són un dels fàrmacs amb major espectre d'activitat antineoplàstica. Aquest grup de fàrmacs són, junt a les antraciclins, un dels pilars fonamentals de la quimioteràpia en càncer de mama. Com s'ha apuntat anteriorment, el metanàlisi d'Oxford⁸² demostrà que el tractament complementari amb antraciclins ofería en pacients amb càncer de mama precoç un 5% de benefici absolut als 10 anys en SG. Aquest benefici augmentaria entre un 1 i un 3% addicional a l'afegir a un esquema de quimioteràpia amb antraciclins els taxans.²⁴⁹

Actualment, no disposem de factors predictius de resposta a la quimioteràpia amb taxans. Entre els potencials biomarcadors proposats destaquen la proteïna Tau i les isoformes de la tubulina. Estudis preclínics suggereixen que l'expressió de la proteïna Tau modularia la sensibilitat de les cèl·lules malignes als taxans.²⁵⁰⁻²⁵² Els treballs clínics inicials suggerien que els tumors amb nivells d'expressió reduïts de la proteïna Tau

presenten una major sensibilitat als taxans però són estudis de petita mida mostral, naturalesa retrospectiva, i on les pacients havien rebut només esquemes de tractament amb taxans.^{251,253-256} Posteriorment, la publicació de dos estudis amb major poder estadístic i ja amb branca control no confirmaren aquests resultats.²⁵⁷⁻²⁵⁹ Probablement les interaccions de la proteïna Tau amb el RE²⁵⁸ i complexos mecanismes de resistència (interacció amb els isotips de la tubulina,^{260,261} l'expressió de proteïnes de resistència a múltiples fàrmacs o de Bcl-2²⁶²) influïrien en aquests resultats.

1.8.3.- Proteïna Tau com a mecanisme de resistència als taxans

La proteïna Tau (50–64 kD) està codificada pel gen *MAPT* (*Microtubule Associated Protein Tau*) localitzat al cromosoma 17q21.²⁶³ Consta de 6 isoformes diferents i la seva activitat ve regulada per processos de fosforilació via serina tirosina cinasa.²⁶⁴ Aquesta proteïna s'expressa majoritàriament al sistema nerviós central, i en menor proporció, a altres teixits de l'organisme. Defectes en la proteïna poden causar patologies del sistema nerviós central (p.e. demències com la malaltia d'Alzheimer).^{265,266} La proteïna Tau pertany al grup de les MAP i juga un paper clau en l'assemblatge dels microtúbuls.^{267,268} La funció principal de la proteïna Tau és la d'unir-se a la superfície dels microtúbuls per estabilitzar-los i promoure el seu assemblatge a partir de les subunitats de tubulina. La seva sobreexpressió augmenta la polimerització i disminueix la flexibilitat cel·lular.²⁶⁹ A més, la Tau actua com un inhibidor competitiu, ja que competeix amb fàrmacs com el paclitaxel, ocupant els mateixos llocs d'unió als microtúbuls que aquesta substància, però amb major reversibilitat. En conseqüència, la presència de nivells reduïts de la proteïna Tau fa els

microtúbuls més accessibles i més vulnerables al fàrmac, circumstància que suggereix que la proteïna Tau protegeix parcialment els microtúbuls de la unió i efecte del paclitaxel.²⁷⁰

1.8.3.1.- Valor predictiu de la proteïna Tau

Com s'ha comentat prèviament, estudis *in vitro* suggereixen que nivells reduïts d'expressió de la proteïna Tau augmenten la sensibilitat de les cèl·lules malignes als taxans però no a l'epirrubicina.²⁵⁰⁻²⁵² En l'àmbit de la clínica el valor de l'expressió de la proteïna Tau com a predictor de resposta als taxans, ha estat analitzat com a mínim en 9 estudis (Taula 5).^{251,253-259,271} Els treballs inicials que suggerien que els tumors amb nivells baixos d'expressió de la Tau presenten una major sensibilitat als taxans són estudis de petita mida mostral, naturalesa retrospectiva i on totes les pacients havien rebut només esquemes de tractament amb taxans.^{251,253-256} Posteriorment, la publicació de tres estudis amb major poder estadístic i on ja s'inclouïa grup control sense taxans no confirmaren aquests resultats.²⁵⁷⁻²⁵⁹

A aquest fet s'hi afegeix la variabilitat secundària a les diferents tècniques emprades en la determinació de l'expressió de la proteïna Tau. Estudis anteriors, amb pacients tractades amb quimioteràpia neoadjuvant amb taxans, mostraren que una baixa expressió dels nivells d'ARNm de proteïna Tau (Tau negativa) s'associava a taxes més altes de RCp.^{251,253} No obstant, en estudis posteriors, aquests resultats no es replicaren i els nivells d'expressió d'ARNm no resultaren ser bons predictors de la resposta a paclitaxel ni en neoadjuvència²⁷¹ ni en adjuvència.²⁵⁷ Similarment, un estudi amb perfils d'expressió gènica realitzat en mostres de pacients amb càncer de mama tractades amb docetaxel tampoc identificà la proteïna Tau com a bon predictor de resposta als taxans.²⁷¹ Quan l'expressió de

la proteïna Tau s'avaluà mitjançant tècniques d'immunohistoquímica, els resultats resultaren també contradictoris.^{251,254-259} Nivells baixos d'expressió de la proteïna Tau s'associaren a una major taxa de RCp en pacients amb càncer de mama que havien rebut paclitaxel neoadjuvant,²⁵¹ o a millor supervivència en pacients amb tumors localment avançats o metastàtics tractades amb paclitaxel.²⁵⁴⁻²⁵⁶ Per contra, quan l'expressió de la proteïna Tau analitzada per immunohistoquímica s'avaluà en estudis amb major nombre de pacients, aquests no s'associaren a un benefici del tractament amb taxans.²⁵⁷⁻²⁵⁹

Donades les discrepàncies entre estudis, l'anàlisi retrospectiu de les 1942 pacients amb càncer de mama de l'estudi NSABP B-28 en funció de si els tumors eren RE positius o negatius ofereix una possible explicació.²⁵⁸ Una tendència no significativa d'una major sensibilitat al paclitaxel en el subgrup de pacients RE negatius suggeria que les interaccions de la proteïna Tau amb el RE i el tamoxifè podien influir els resultats. En càncer de mama l'expressió de la proteïna Tau es correlaciona estretament amb l'expressió del RE²⁵⁸ i l'expressió d'ARNm amb l'estatus del RE,²⁵³ de manera que els tumors RE negatius presenten menor expressió de Tau que els tumors RE positius. Paral·lelament, la Tau s'ha inclòs en diverses signatures genètiques conjuntament amb el RE.²⁷² A més, el gen de la Tau conté a nivell del promotor un element de resposta imperfecta als estrògens i és un gen inductor d'estrògens en neurones, cèl·lules de neuroblastoma i cèl·lules MCF-7 *in vitro*,²⁷³⁻²⁷⁵ suggerint que la Tau seria un coregulador del RE.²⁷⁵ En conjunt, aquestes observacions suggereixen, per una banda que l'expressió de la proteïna Tau seria un marcador d'activitat estrogènica en càncer de mama, i prediria un benefici de la teràpia antiestrogènica, i per altra banda, podria parcialment explicar perquè els càncers de mama RE negatius són més sensibles a la quimioteràpia amb paclitaxel. A aquest fet, s'afegeix que els mecanismes de resistència són complexes i difícils d'explicar en base a un únic biomarcador. És possible

Introducció

que el valor predictiu de la baixa expressió de la proteïna Tau estigués modulats per altres mecanismes moleculars, com la interacció amb els isotips de la tubulina,^{260,261} o l'expressió de proteïnes de resistència a múltiples fàrmacs o de Bcl-2.²⁶²

Taula 5. Estudis que analitzen el valor pronòstic i predictiu de la proteïna Tau.

Autor, any	n ^a	n ^b	n ^c	Tipus estudi	Tipus tumor	Estadi	Esquema tractament	Mètode d'avaluació	Valor pronòstic	Valor predictiu
Estudis amb una única branca de tractament amb taxans										
Rouzier i al, 2005 ²⁵¹	28	85	85	R	CM	I-III	P-FAC ^f	ARNm	NA	$P < 0.001$
	58	122	122					IHC		$P = 0.04$
Mimori i al, 2006 ²⁵⁶	14	20	20	R	CG	LA i M1	P ^g	IHC	NA	Si ⁱ
Rody i al, 2006 ²⁷¹	NR	50	50	R	CM	II-IV	TAC ^{f,g}	Microarrays	NA	No
Andre i al, 2007 ²⁵³	NR	209 ^d /82 ^e	267	R	CM	I-III	P-FAC ^f	ARNm	No	$P < 0.001$
Tanaka i al, 2009 ²⁵⁴	20	35	35	R	CM	M1	P ^g	IHC	NA	Si ⁱ
Shao i al, 2010 ²⁵⁵	28	54	54	R	CM	LA i M1	P-CDDP ^{f,g}	IHC	$P = 0.008$	$P = 0.02$
Règim sense taxans vs. Règim amb taxans										
Galmarini i al, 2008 ²⁵⁹	121	173	326	R	CM	LA i M1	A vs. T ^g	IHC	No	No
Pentheroudakis i al, 2009 ²⁵⁷	157	314	595	R	CM	I-III	E-CMF vs. E-P-CMF ^h	ARNm	No	No
	127	269						IHC		
Pusztai i al, 2009 ²⁵⁸	833	1.942	3060	R	CM	I-III	AC vs. AC-P ^h	IHC	Subgrup RE+	No
<p>^a Nombre de pacients amb tumors Tau positius</p> <p>^b Nombre de pacients amb estatus proteïna Tau conegut</p> <p>^c Nombre total de pacients inclosos a l'estudi</p> <p>^d Nombre de pacients amb estatus proteïna Tau conegut on s'avalua el valor pronòstic</p> <p>^e Nombre de pacients amb estatus proteïna Tau conegut on s'avalua el valor predictiu</p> <p>^f Esquemes de quimioteràpia neoadjuvant</p> <p>^g Esquemes de quimioteràpia metastàtica</p> <p>^h Esquemes de quimioteràpia adjuvant</p> <p>ⁱ Estudi descriptiu, no es realitzà anàlisi estadística univariable o multivariable</p> <p>Abreviatures: A, adriamicina; ARNm, àcid ribonucleic missatge; CDDP, cisplatí; CG, càncer gàstric; CM, càncer de mama; CMF, ciclofosfamida, metotrexat, fluorouracil; E, Epirubicina; FAC, fluorouracil, adriamicina, ciclofosfamida; IHC, immunohistoquímica; LA, localment avançat; M1, metastàtic; NA, no avaluat; NR, no reportat; P, Paclitaxel; R, Retrospectiu; RE+, receptor d'estrògens positiu; T, docetaxel; TAC, docetaxel, adriamicina, ciclofosfamida.</p>										

1.8.3.2.- Valor pronòstic de la proteïna Tau

Per altra banda, alts nivells d'expressió de proteïna Tau s'han associat de forma significativa amb un millor pronòstic tant en pacients amb càncer de mama precoç²⁵⁸ com en pacients amb càncer de mama avançat.²⁵⁵

L'estudi de Putszai²⁵⁸ demostrà que la coexpressió de la proteïna Tau i el RE eren factors de bon pronòstic, i s'associaven a una millor SLM i millor SG. Així, els tumors RE positius amb alta expressió de la proteïna Tau, respondrien al tractament hormonal, però serien poc sensibles a la quimioteràpia amb paclitaxel. En el subgrup de pacients RE negatius el valor pronòstic de la proteïna Tau no es confirmà, però s'observà una tendència no significativa a una millor resposta al paclitaxel.

1.8.4.- Isotips de les tubulines com a mecanisme de resistència als taxans

L'estudi de les alteracions de la β -tubulina com a mecanisme de resistència als agents antimitòtics esdevé més complex pel fet que existeixen múltiples isotips de la β -tubulina i probablement diversos mecanismes d'acció actuen a nivell d'una mateixa cèl.lula. S'han descrit dos mecanismes principals de resistència: la presència de mutacions del gen de la β -tubulina i l'expressió alterada dels isotips de la β -tubulina. Així, s'ha demostrat que mutacions de la β -tubulina de classe I conferirien resistència al paclitaxel.²⁷⁶ A més, estudis en línies cel.lulars de càncer d'ovari i pulmó resistents al paclitaxel descriuen nivells augmentats dels isotips I, II, III i IVa de la β -tubulina, quan es compara amb línies cel.lulars sensibles al mateix fàrmac.²⁶¹ S'ha hipotetitzat que la seva sobreexpressió alteraria la unió dels heterodímers de tubulina reduint la taxa de polimerització dels microtúbuls o generant dímers d' $\alpha\beta$ -tubulina amb propietats intrínseques dinàmiques alterades que els farien menys sensibles als agents antitubulina.²⁶⁰

A continuació es detalla els resultats dels principals estudis en càncer de mama que analitzen el paper dels diferents isotips de la β -tubulina en aquest context.

1.8.4.1.- β III-tubulina

El gen de la β III-tubulina es localitza al cromosoma 16, concretament al locus genòmic 16q24.3. Estudis preclínic mostren una correlació entre la sobreexpressió de la β III-tubulina i resistència al paclitaxel.^{260,261} Alguns estudis clínics suggereixen que la sobreexpressió de la β -tubulina classe III s'associaria a un pitjor pronòstic²⁷⁷⁻²⁸⁰ i/o a resistència al paclitaxel.^{277,278} La taula 6 mostra els estudis que avaluen el valor pronòstic de la β III-tubulina i la correlació entre la seva expressió i la resposta al tractament a un taxà.

Taula 6. Estudis que analitzen el valor pronòstic i predictiu de la proteïna β III-tubulina.

Autor, any	n ^a	n ^b	n ^c	Tipus estudi	Tipus tumor	Estadi	Esquema tractament	Mètode d'avaluació	Valor pronòstic	Valor predictiu
Règim amb fàrmacs antitubulina vs. Règim amb fàrmacs antitubulina										
Bernard-Marty i al, 2001 ²⁸¹	20	31	54	R	CM	LA i M1	T ^{d,e}	IHC	NA	No
Rosell et al, 2003 ²⁸²	19	53	612	R	CPCNP	III-IV	V CDDP i P CBDCA ^e	ARNm	No ^g	NA ^h
Paradiso i al, 2005 ²⁸³	29	70	72	R	CM	IV	EP ^e	IHC	No	Si ⁱ P = 0.004
Seve et al, 2005 ²⁸⁴	40	91	91	R	CPCNP	III-IV	P Platí vs. Gem Platí ^e	IHC	Si ^h P = 0.003	No
Ferrandina et al, 2006 ²⁷⁹	26	54	62	Ps	CO	III-IV	P Platí ^e	IHC	Si ^h P = 0.032	No
Seve et al, 2007 ²⁷⁷	22	40	40	R	TOD	IV	Règim basat en P	IHC	Si ^h P = 0.03	NA
Seve et al, 2007 ²⁸⁰	133	265	482	R	CPCNP	III-IV	V CDDP vs. Observació	IHC	Si ^h P = 0.07	No
Seve et al, 2008 ²⁷⁸	23	49	51	R	TOD	IV	Règim basat en P	IHC	Si ^h P = 0.014	NA
Saura i al, 2013 ²⁸⁵	96	247	295	Ps	CM	I-III	AC-I vs. AC-P ^d	IHC	NA	No
Règim sense taxans vs. Règim amb taxans										
Galmarini i al, 2008 ²⁵⁹	86	173	326	R	CM	LA i M1	A vs. T ^e	IHC	No	No
Aoki et al, 2009 ²⁸⁶	53	94	94	R	CO	I - IV	C Platí vs. P Platí	IHC	NA	Si ⁱ P = 0.02
Pentheroudakis et al, 2009 ²⁵⁷	157	314	595	R	CM	II-III	E-CMF vs. E-P-CMF ^f	ARNm	Si ^h P = 0.03	No
	114	274	595					IHC	No	No
^a Nombre de pacients amb tumors amb β III-tubulina sobreexpressada ^b Nombre de pacients amb estatus β III-tubulina conegut ^c Nombre total de pacients inclosos a l'estudi ^d Esquemes de quimioteràpia neoadjuvant ^e Esquemes de quimioteràpia metastàtic ^f Esquemes de quimioteràpia adjuvant ^g Estudi descriptiu, no es realitzà anàlisi estadístic univariable o multivariable ^h Sobreexpressió de β III-tubulina associada a pitjor pronòstic ⁱ Sobreexpressió de β III-tubulina associada a resistència a la quimioteràpia basada en taxans. ^j Sobreexpressió de β III-tubulina associada a benefici a la quimioteràpia basada en taxans. Abreviatures: ARNm, àcid ribonucleic missatge; AC, adrimacina, ciclofosfamida; CDDP, cisplatí; CBDCA, carboplatí; CM, càncer de mama; CMF, ciclofosfamida, metotrexat, fluorouracil; CO, càncer d'ovari; CPCNP, càncer de pulmó de cèl·lula no petita; E, Epirubicina; Gem, gemcitabina; IHC, immunohistoquímica; I, ixabepilona; LA, localment avançat; M1, metastàtic; NA, no avaluat; P, Paclitaxel; Ps, Prospectiu; R, Retrospectiu; T, docetaxel; TOD, tumors d'origen desconegut; V, vinorelbina.										

1.8.4.2.- β I-, II- i IV-tubulina

Actualment es disposa de poca informació clínica del paper de les β -tubulina classe I, II i IV en càncer de mama. La majoria dels estudis són exploratoris, petita mida mostral, amb heterogeneïtat de pacients, diverses dosis de tractament i en cas de la β II-tubulina amb l'únic estudi positiu totes les pacients havien rebut només tractament amb docetaxel.²⁸¹ Les taules 7 i 8 que segueixen a continuació sintetitzen els principals resultats dels estudis publicats sobre el paper pronòstic de la β -tubulina classe II i IV en càncer de mama. Referent a la β -tubulina classe I no es disposa d'estudis clínics.

Taula 7. Estudis que analitzen el valor pronòstic i predictiu de la proteïna β IV-tubulina.

Autor, any	n ^a	n ^b	n ^c	Tipus estudi	Tipus tumor	Estadi	Esquema tractament	Mètode d'avaluació	Valor pronòstic	Valor predictiu
Estudis amb una única branca de tractament amb taxans										
Bernard-Marty i al, 2001 ²⁸¹	31	38	54	R	CM	LA i M1	T ^{d,e}	IHC	NA	No
Paradiso i al, 2005 ²⁸³	35	70	72	R	CM	IV	EP ^e	IHC	No	No
Règim sense taxans vs. Règim amb taxans										
Galmarini i al, 2008 ²⁵⁹	138	173	326	R	CM	LA i M1	A vs. T ^e	IHC	No	No
^a Nombre de pacients amb tumors amb β IV-tubulina sobreexpressada ^b Nombre de pacients amb estatus β IV-tubulina conegut ^c Nombre total de pacients inclosos a l'estudi ^d Esquemes de quimioteràpia neoadjuvant ^e Esquemes de quimioteràpia metastàtic Abreviatures: CM, càncer de mama; E, Epirubicina; IHC, immunohistoquímica; LA, localment avançat; M1, metastàtic; NA, no avaluat; P, Paclitaxel; R, Retrospectiu; T, docetaxel.										

Taula 8. Estudis que analitzen el valor pronòstic i predictiu de la proteïna β II-tubulina.

Autor, any	n ^a	n ^b	n ^c	Tipus estudi	Tipus tumor	Estadi	Esquema tractament	Mètode d'avaluació	Valor pronòstic	Valor predictiu
Estudis amb una única branca de tractament amb taxans										
Bernard-Marty i al, 2001 ²⁸¹	18	32	54	R	CM	LA i M1	T ^{d,e}	IHC	NA	Si ^f P = 0.04
Règim sense taxans vs. Règim amb taxans										
Galmarini i al, 2008 ²⁵⁹	86	173	326	R	CM	LA i M1	A vs. T ^e	IHC	No	No
^a Nombre de pacients amb tumors amb β II-tubulina sobreexpressada ^b Nombre de pacients amb estatus β II-tubulina conegut ^c Nombre total de pacients inclosos a l'estudi ^d Esquemes de quimioteràpia neoadjuvant ^e Esquemes de quimioteràpia metastàtic ^f Sobreexpressió de β II tubulina associada a resistència a la quimioteràpia basada en taxans. No es realitzà anàlisi multivariat. Abreviatures: CM, càncer de mama; IHC, immunohistoquímica; LA, localment avançat; M1, metastàtic; NA, no avaluat; R, Retrospectiu; T, docetaxel.										

2. HIPÒTESI

El benefici del tractament amb antraciclins i taxans en càncer de mama és modest i els efectes secundaris a llarg termini no desdenyables. La identificació de factors predictius de resposta permetria millorar l'eficàcia de la quimioteràpia i minimizar les toxicitats secundàries. Actualment no disposem de biomarcadors específics per predir la resposta del tumor a la quimioteràpia amb antraciclins i taxans.

En el present estudi s'ha analitzat un conjunt de potencials marcadors predictius de resposta o resistència al tractament en una cohort de pacients amb càncer de mama estadis II i III tractades amb quimioteràpia neoadjuvant amb antraciclins i taxans, emprant la RCp com a marcador subrogat de quimiosensibilitat. Posteriorment s'ha avaluat el seu impacte en la supervivència.

Hipòtesis:

- 1.- La sensibilitat a les antraciclins seria deguda a les duplicacions del CEP17, potencial marcador d'instabilitat genòmica i de disfunció en la reparació de l'ADN, i també deguda a canvis genètics crucials de les regions pericentromèriques del cromosoma 17 (p.e. amplificació de l'HER2, amplificació del gen de la *TOP2A* o pèrdues del gen *BRCA1*).
- 2.- Les pacients amb tumors amb baixa expressió de proteïna Tau i dels isotips de la β -tubulina es beneficiarien d'esquemes de quimioteràpia amb taxans.

3.- OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquest treball de tesi doctoral és l'estudi de marcadors predictius de resposta a esquemes de quimioteràpia neoadjuvant amb antraciclina i taxans en una cohort de pacients amb càncer de mama estadis II i III emprant la RCp com a marcador subrogat de quimiosensibilitat i l'anàlisi de la implicació pronòstica d'aquests mateixos marcadors.

Els objectius específics d'aquest treball són els següents:

Objectiu 1.- En relació a les antraciclina:

- Explorar l'associació de les duplicacions del CEP17, l'amplificació del gen *HER2* i les alteracions del gen de la *TOP2A* i la RCp a la quimioteràpia neoadjuvant amb esquemes amb antraciclina.

- Determinar el valor pronòstic de les duplicacions del CEP17, l'amplificació del gen *HER2* i les alteracions de la *TOP2A* en el mateix grup de pacients.

Objectiu 2.- En relació als taxans:

- Analitzar l'associació de la proteïna Tau i els isotips de la β -tubulina amb la RCp a la quimioteràpia neoadjuvant amb antraciclina i taxans.

- Valorar la implicació pronòstica de la proteïna Tau i els isotips de la β -tubulina.

4.- MATERIAL I MÈTODES

4.1.- Principis ètics

Aquest treball es dugué a terme conforme als estàndards ètics establerts en la Declaració de Hèlsinki, i comptant amb l'aprovació del Comitè d'Ètica de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Sant Pau.

4.2.- Disseny de l'estudi

En aquest treball s'estudiaren de forma retrospectiva 140 mostres de tumor de pacients amb càncer de mama estadis II o III que reberen quimioteràpia neoadjuvant amb antraciclins i taxans a l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau entre 1993 i 2010. En totes les pacients el diagnòstic s'havia confirmat mitjançant biòpsia i cap d'elles havia rebut prèviament tractament amb cirurgia, hormonoteràpia, quimioteràpia o radioteràpia. En aquest estudi només es varen incloure pacients amb tumors HER2 positius no tractades amb trastuzumab neoadjuvant. Es varen excloure aquelles dones amb carcinoma inflamatori o tumors bilaterals. Cinquanta-cinc pacients reberen esquemes de quimioteràpia neoadjuvant amb antraciclins: FEC75 [5-fluorouracil (500 mg/m^2), epirubicina (75 mg/m^2) i ciclofosfamida (500 mg/m^2)] cada tres setmanes per 4 o 6 cicles, $n = 40$, o FAC60 [5-fluorouracil (500 mg/m^2), doxorubicina (60 mg/m^2) i ciclofosfamida (500 mg/m^2)] cada tres setmanes per 4 o 6 cicles, $n = 15$, entre 1993 i 2002. Vuitanta-cinc pacients reberen un esquema de quimioteràpia neoadjuvant amb antraciclins i taxans: EC-T [epirubicina (90 mg/m^2) i ciclofosfamida (600 mg/m^2) cada tres setmanes per 4 cicles seguit pel docetaxel (100 mg/m^2) cada tres setmanes per 4 cicles], entre el 2003 i el 2010. Per l'estadificació del

càncer s'emprà la setena edició del TNM.²⁸⁷ Per la resposta clínica al tractament s'avaluà mitjançant palpació, mamografia, ecografia i en alguns casos també per ressonància magnètica seguint els criteris RECIST (*Response Evaluation Criteria In Solid Tumors*).²⁸⁸ Totes les dones efectuaren cirurgia de la mama i l'extensió de la malaltia s'avaluà en la peça quirúrgica. Les pacients tractades amb FEC75 o FAC60 que presentaren resposta parcial al tractament sistèmic efectuaren la cirurgia i dos cicles addicionals de quimioteràpia amb FEC75 o FAC60 després de la cirurgia. Les pacients tractades amb l'esquema EC-T efectuaren cirurgia de la mama després d'haver completat els 8 cicles de quimioteràpia. Es considerà la irradiació de la mama i de les àrees ganglionars si existia indicació. Les dones amb tumors receptors hormonals positius reberen tractament hormonal. El seguiment i control de les pacients es feu seguint les guies clíniques.^{146,289,290} Els resultats de seguiment estaven disponibles en tots els casos. La mitjana de seguiment de les pacients fou de 64 mesos i la mediana de 52 (interval 7.2 mesos-15 anys).

L'objectiu principal de l'estudi fou la RCp definida com l'absència de tumor invasiu a la mama i els ganglis axil·lars al moment de la cirurgia, independentment de la presència de component intraductal (ypT0/is ypN0).¹⁴⁰ Els objectius secundaris de l'estudi foren la SLM, definida com el temps des de l'inici del tractament fins a la data de la primera recaiguda (local, regional, contralateral o a distància), un segon tumor primari, o mort per qualsevol causa (independentment de quina es donés primer) i la SG que es definí com el temps de l'inici del tractament fins la mort per qualsevol causa. Les pacients perdudes en el seguiment es censuraren en l'últim contacte.

4.3.- Mostres tumorals i realització dels *Tissue Microarrays*

L'estudi histològic es va realitzar en 140 mostres incloses en parafina procedents de core-biòpsies obtingudes previ a l'inici del tractament neoadjuvant. Els blocs de parafina s'emmagatzemaren a temperatura ambient. Les laminetes d'aquests blocs es tenyiren amb hematoxilina-eosina. La identificació de les mostres es realitzà mitjançant un nombre d'identificació assignat a cada pacient.

Per cada cas es seleccionà el bloc de parafina que contenia àrees més representatives de tumor infiltrant i d'aquests blocs es seleccionà la zona amb més parènquima tumoral per fer la secció mitjançant un punx de 5 mm de diàmetre màxim. Cada un d'aquests *tissue arrays* es col·locà ordenadament en un nou bloc de parafina, de manera que cada *tissue array* es podia identificar segons la seva posició amb el cas al qual corresponia. Sobre aquest material es realitzaren seccions seriades de 5- μ m per l'anàlisi immunohistoquímica, la hibridació *in situ* amb fluorescència (*Fluorescence In Situ Hybridization*, FISH) i la hibridació cromogènica *in situ* (*Chromogenic in situ hybridization*, CISH).

4.4.- Estudi immunohistoquímic

A la taula que segueix a continuació es descriuen els anticossos utilitzats a l'estudi immunohistoquímic, així com els clons, dilucions emprades, desemascament antigènic i proveïdors:

Taula 9. Llistat d'anticossos emprats en els estudis immunohistoquímics.

Anticòs	Clon	Dilució	Casa comercial	Desemmascarament antigènic	Temps incubació
RE	EP1	Pre-diluïda	Dako	PT Link pH High	8 min
RP	PgR636	Pre-diluïda	Dako	PT Link pH High	8 min
Ki67	MIB-1	Pre-diluïda	Dako	PT Link pH Low	8 min
Herceptest^a	Policlonal	Pre-diluïda	Dako	PT Link pH High	30min
Tau	2B2.100	1:100	USBiological	PT Link pH Low	20 min
βI-tubulina	SAP.4G5	1/2000	SIGMA	PT Link pH Low	20 min
βII-tubulina	7B9	1/2000	SIGMA	PT Link pH Low	20 min
βIII-tubulina	SDL.3D10	1/300	SIGMA	PT Link pH High	1 hora
βIV-tubulina	ONS.1A6	1/350	SIGMA	PT Link pH High	1 hora

Abreviatures: RE, receptors d'estrògens, RP receptors de progesterona

^aKit Dako (Ref. SK001). És un farmacodiagnòstic i les mostres es van processar seguint les instruccions del fabricant.

La sobreexpressió d'HER2 s'analitzà emprant l'HercepTest *assay* (Dako). Els tumors es classificaren com a RE o RP positius quan com a mínim l'1% de les cèl·lules tumorals presentava tinció nuclear.²⁹¹ La sobreexpressió de la proteïna HER2 vingué definida per una intensa i uniforme tinció de membrana (qualificació 3+) en més del 30% de les cèl·lules amb tumor infiltrant.²⁹² Per a l'índex de proliferació cel·lular Ki67 s'avaluà la proporció de cèl·lules positives (tinció nuclear), expressades en percentatges. El punt de tall per considerar la seva positivitats fou $\geq 20\%$.^{49,293}

Els resultats de la tinció per la proteïna Tau i els isotips de la β tubulina (classes I, II, III i IV) s'obtingueren multiplicant el percentatge de cèl·lules tenyides (0-100) per la intensitat de tinció -absent (0), dèbil (1), moderada (2), o elevada (3)-, obtenint un rang de 0 a 300. El punt de tall per determinar la "baixa" o "alta" expressió en tots els casos es determinà basant-nos en el valor de la mediana observat a la població de pacients.²⁵⁹ Valors ≥ 10 foren considerats positius per la proteïna Tau, i ≥ 210 , ≥ 15 , ≥ 30 , ≥ 15 , per la β I-, β II-, β III- β IV-tubulines respectivament (Figures 4 i 5).

Les biòpsies van ser avaluades a cegues per dos patòlegs. Els casos amb resultats discordants foren revisats per arribar a un acord.

Figura 4. Expressió de la proteïna Tau en teixit de càncer de mama, detecció per immunohistoquímica (objectiu x 20). (A) Baixa expressió (Tau negativa) (B) Alta expressió (Tau positiva).

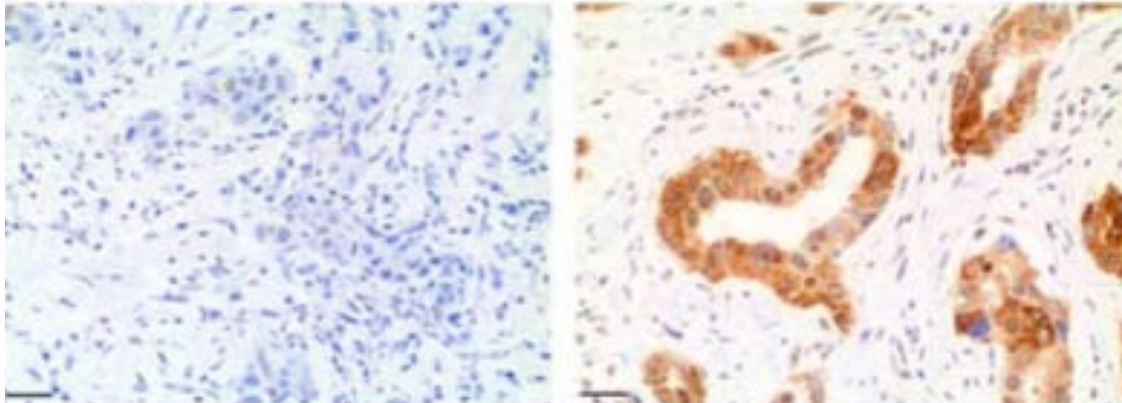
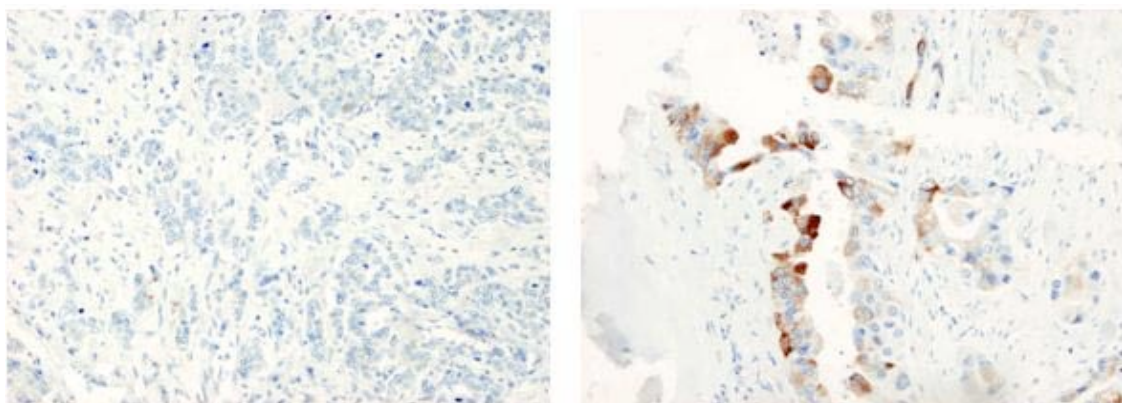


Figura 5. Expressió de la β III-tubulina en teixit de càncer de mama, detecció per immunohistoquímica (objectiu x 20). (A) Baixa expressió (β III-tubulina negativa) (B) Alta expressió (β III-tubulina positiva).



4.5.- *Hibridació in situ*

Mitjançant la tècnica del FISH es va estudiar l'estat del gen *HER2* en tots els tumors. L'estatus del gen de la *TOP2A* s'avaluà mitjançant CISH, i per FISH en aquells casos en què s'havia obtingut un resultat equívoc. Estudis previs han demostrat una bona correlació entre FISH i CISH pel que fa a l'anàlisi del gen de la *TOP2A*.²⁹⁴ Totes les sondes emprades eren de Dako: *HER2* FISH pharmDX i *TOP2A* FISH pharmDX. L'estudi del gen de la *TOP2A* mitjançant la tècnica del CISH requereix de sondes de color duals (*TOP2A* CISH Dako). Tots els tests es dugueren a terme seguint les recomanacions del fabricant. Les senyals fluorescents es van visualitzar en un microscopi de fluorescència Olympus BX51. Per a la interpretació dels resultats per FISH dels gens de la *TOP2A* i el *HER2* es van comptar com a mínim 60 nuclis per cada mostra. El gen de la *TOP2A* s'avaluà per CISH en 30 o més cèl·lules tumorals per mostra. L'amplificació de l'*HER2* es definí quan la *ratio HER2/CEP17* fou ≥ 2 ,²⁹⁵ l'amplificació de la *TOP2A* quan la *ratio TOP2A/ CEP17* era ≥ 2 ,⁹³ i la deleció de la *TOP2A* quan la relació *TOP2A/ CEP17* era < 0.8 ⁹³ seguint les recomanacions del fabricant. El terme duplicació del CEP17 es definí emprant com a punt de tall > 1.86 senyals de CEP per cèl·lula.^{166,184}

4.6.- Anàlisi estadística

Les variables quantitatives es compararen emprant la prova *t* de Student. L'associació entre variables categòriques es realitzà amb la prova de khi al quadrat i la *F* de Fisher. A l'anàlisi univariable la relació amb la RCp es valorà emprant la distribució de khi al quadrat. Quan s'avaluaren els marcadors predictius de resistència a les antraciclins, el model de regressió logística per la RCp s'ajustà per l'edat al diagnòstic (< 50 vs. ≥ 50 anys),

la mida del tumor (T2 vs. T3 vs. T4), l'afectació ganglionar (negativa vs. positiva), el grau histològic (1 o 2 vs. 3), la quimioteràpia neoadjuvant (FEC75/ FAC60 vs. EC-T), els RE (negatiu vs. positiu), els RP (negatiu vs. positiu), l'estat de l'*HER2* (normal vs. amplificat), l'estat de la *TOP2A* (no amplificat vs. amplificat), i l'estat del CEP17 (normal vs. duplicat), en la primera part d'aquest treball. Quan s'avaluaren els marcadors predictius de resistència als taxans, el model de regressió logística per la RCp s'ajustà per l'edat al diagnòstic (< 50 vs. ≥ 50 anys), la mida del tumor (T2 vs. T3 vs. T4), l'afectació ganglionar (negativa vs. positiva), el grau histològic (1 o 2 vs. 3), la quimioteràpia neoadjuvant (FEC75/ FAC60 vs. EC-T), els RE (negatiu vs. positiu), els RP (negatiu vs. positiu), l'estat de la proteïna Tau (negatiu vs. positiu), de la BI-tubulina (negatiu vs. positiu), de la BII-tubulina (negatiu vs. positiu), de la BIII-tubulina (negatiu vs. positiu), i de la BIV-tubulina (negatiu vs. positiu). Per analitzar la magnitud de l'associació entre les variables considerades com a probables predictores, s'expressaren els resultats amb *Odds Ratio* (OR) utilitzant un interval de confiança al 95 % (IC 95%).

La supervivència i el temps de recidiva s'expressaren mitjançant les seves mitjanes i es representaren amb les corbes de Kaplan-Meier. L'anàlisi univariable i multivariable es realitzaren utilitzant el model de regressió de Cox. La magnitud de l'associació s'expressà amb HR emprant un IC 95%. En el model final s'han inclòs aquelles variables que, escollides després de realitzar models multivariables parcials, aportaven predicció de forma significativa des del punt de vista biològic i/o estadístic. Així, a la primera part d'aquesta tesi, l'*HER2* (normal vs. amplificat), l'estat de la *TOP2A* (no amplificat vs. amplificat), i l'estat del CEP17 (normal vs. duplicat) com a variables individuals s'introduïren al model de Cox ajustant-se pels factors pronòstics tradicionals inclosos l'edat al diagnòstic (< 50 vs. ≥ 50 anys), la mida del tumor (T2 vs. T3 vs. T4), l'afectació ganglionar (negativa vs.

positiva), el grau histològic (1 o 2 vs. 3), la quimioteràpia neoadjuvant (FEC75/ FAC60 vs. EC-T), els RE (negatiu vs. positiu) i el Ki67 (baix vs. alt). El model de regressió de Cox s'emprà en una estudi exploratori analitzant la combinació de tumors que expressessin o bé la *TOP2A* amplificada i/o bé la duplicació del CEP17; al text s'han classificat i anomenat com a combinació de la *TOP2A* i duplicacions del CEP17. A la segona part d'aquest treball, la proteïna Tau (negativa vs. positiva), i la β I-, β II-, β III- i β IV-tubulines (negativa vs. positiva), s'introduïren al model de Cox com a variables individuals ajustant-se pels factors pronòstics tradicionals inclosos l'edat al diagnòstic (< 50 vs. \geq 50 anys), la mida del tumor (T2 vs. T3 vs. T4), l'afectació ganglionar (negativa vs. positiva), el grau histològic (1 o 2 vs. 3), la quimioteràpia neoadjuvant (FEC75/ FAC60 vs. EC-T), els RE (negatiu vs. positiu), l'*HER2* (normal vs. amplificat), i el Ki67 (baix vs. alt). Les proves estadístiques correspongueren a proves bilaterals, i un valor de *P* inferior de 0.05 va ser considerat estadísticament significatiu ($P < 0.05$).

El processament i anàlisi de les dades d'aquest estudi s'ha realitzat mitjançant el programa estadístic SPSS versió 19.0 (Statistical Package for Social Sciences, Chicago, IL) per Windows.

La selecció de pacients, realització de l'estudi i anàlisi de les dades es dugué a terme seguint les guies REMARK (*Reporting Recommendations for Tumour Marker Prognostic Studies*).²⁹⁶

5. RESULTATS

5.1.- Característiques de les pacients

Les característiques de les pacients i tumors es mostren a les Taules 10 i 11.

Taula 10. Característiques clínico-patològiques de les pacients ($n = 140$).

Variables clínico-patològiques	Nombre	%
Edat al diagnòstic		
Mitjana \pm Desviació típica		53.7 \pm 13.5
Mediana (rang)		51 (25.5-86.1)
≤ 50	67	48
> 50	73	52
Estadi		
II	50	36
III	90	64
Tumor primari		
T2	39	28
T3	42	30
T4	59	42
Ganglis limfàtics regionals		
N0	47	33.5
N1	63	45
N2	26	18.5
N3	4	3
Grau histològic		
1	11	8
2	63	45
3	66	47
Quimioteràpia neoadjuvant		
FEC / FAC	55	39
EC-T	85	61
Tipus de cirurgia		
Tumorectomia	52	37
Mastectomia	88	63
Resposta patològica		
Completa	13	9
Malaltia residual	127	91

Abreviacions: EC-T, epirrubicina, ciclofosfamida i docetaxel; FAC, fluorouracil, adriamicina i ciclofosfamida; FEC, fluorouracil, epirrubicina i ciclofosfamida; N: estat ganglionar; T, mida del tumor.

Resultats

Taula 11. Biomarcadors analitzats ($n = 140$)

Variabls immunohistoquímiques	Nombre	%
Receptors d'estrògens	87	62
Positiu	53	38
Negatiu		
Receptors de progesterona		
Positiu	68	48.5
Negatiu	72	51.5
Índex de proliferació Ki67		
Baix	57	42.5
Alt	77	57.5
Valors perduts	6	
<i>HER2</i>		
Positiu	24	17.5
Negatiu	113	82.5
Valors perduts	3	
<i>TOP2A</i>		
Amplificació	7	5
Deleció	6	4.5
Normal	124	90.5
Valors perduts	3	
Duplicació del CEP17		
Positiva	13	9.5
Negativa	124	90.5
Valors perduts	3	
Tau		
Positiva	62	49
Negativa	64	51
Valors perduts	14	
βI-tubulina		
Positiva	58	45
Negativa	71	55
Valors perduts	11	
βII-tubulina		
Positiva	59	49
Negativa	61	51
Valors perduts	20	
βIII-tubulina		
Positiva	60	48
Negativa	66	52
Valors perduts	14	
βIV-tubulina		
Positiva	56	43
Negativa	73	57
Valors perduts	11	

Abreviacions: βI-tubulina positiva ≥ 210 , negativa < 210 ; βII-tubulina positiva ≥ 15 , negativa < 15 ; βIII-tubulina positiva ≥ 30 , negativa < 30 ; βIV-tubulina positiva ≥ 15 , negativa < 15 ; CEP17, *Chromosome 17 Enumeration Probe*; *HER2*, *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*; Ki67 Alt ≥ 20 , Baix $< 20\%$; Tau positiva ≥ 10 , negativa < 10 ; *TOP2A*, Topoisomerasa II alfa.

Es van incloure 140 pacients, amb una edat mitjana de 53.7 ± 13.5 anys. La majoria

de les pacients presentaven tumors T3 o T4 (el 72%) i ganglis positius (el 66.5%); ambdós factors explicarien en part la baixa taxa de cirurgies conservadores observada (37%). Predominaren els tumors RE positius (62%) i HER2 negatius (82.5%). La quimioteràpia neoadjuvant amb un esquema seqüencial d'antraciclins i taxans s'administrà al 61% de les pacients.

S'assolí una RCp en 13 pacients de 140 (el 9%). Quatre dones de 55 (7%) assoliren una RCp després de 4 cicles de FEC75/FAC60 i 9 de 85 (11%) després dels 8 cicles d'EC-T. Quaranta-sis pacients (33%) presentaren una recurrència i 2 pacients (1.5%) es perderen en el seguiment. Es donaren 44 morts (31%), 41 de resultes del càncer de mama i 3 degudes a altres causes (dades no mostrades a les taules).

5.2.- Objectiu 1:

5.2.1.- Associacions de les duplicacions del CEP17 i les variables clinicopatològiques

La Taula 12 mostra les associacions del CEP17 amb les característiques de les pacients i les variables tumorals. L'estatus d'*HER2*, la *TOP2A* i les duplicacions del CEP17 s'avaluaren en 137 peces tumorals (97%). L'amplificació de l'*HER2* es detectà en 23 mostres (17%), la *TOP2A* estava amplificada en 7 casos (5% dels tumors), les delecions de la *TOP2A* en 6 mostres (4.5%) i la duplicació del CEP17 en 13 mostres (9.5%). La combinació de l'amplificació de la *TOP2A* i la duplicació del CEP17 es trobà en 20 casos (el 14.5% dels tumors).

Resultats

Taula 12. Anàlisi univariable de l'associació entre les característiques clínico-patològiques i l'estat del CEP17

Variables	Mostres analitzades per l'estat del CEP17 (n=137)			P ^a
	Total (%)	Duplicat(%)	Normal (%)	
Nombre	137	13 (9.5%)	124 (90.5%)	
Edat al diagnòstic				0.20
≤ 50	65 (47.5%)	4 (31%)	61 (49%)	
> 50	72 (52.5%)	9 (69%)	63 (51%)	
Estadi				0.83
II	49 (36%)	5 (38.5%)	44 (35.5%)	
III	88 (64%)	8 (61.5%)	80 (64.5%)	
Tumor primari				0.60
T2	38 (28%)	5 (38%)	33 (27%)	
T3	42 (31%)	4 (31%)	38 (30%)	
T4	57 (41%)	4 (31%)	53 (43%)	
Ganglis limfàtics regionals				0.53
N0	46 (33.5%)	4 (31%)	42 (34%)	
N1	62 (45.5%)	8 (61.5%)	54 (44%)	
N2	25 (18%)	1 (7.5%)	24 (19%)	
N3	4 (3%)	0 (0%)	4 (3%)	
Grau histològic				0.49
1	11 (8%)	0 (0%)	11 (9%)	
2	62 (45%)	7 (54%)	55 (44%)	
3	64 (47%)	6 (46%)	58 (47%)	
Receptors d'estrògens				0.61
Positiu	86 (63%)	9 (69%)	77 (62%)	
Negatiu	51 (37%)	4 (31%)	47 (38%)	
Receptors de progesterona				0.79
Positiu	68 (50%)	6 (46%)	62 (50%)	
Negatiu	69 (50%)	7 (54%)	62 (50%)	
Índex de proliferació Ki67				0.93
Alt	73 (55%)	7 (54%)	66 (53%)	
Baix	60 (45%)	6 (46%)	54 (43.5%)	
Valors perduts	4	0	4	
<i>HER2</i>				0.34
Amplificat	23 (17%)	4 (31%)	19 (16%)	
Normal	112 (83%)	9 (69%)	103 (84%)	
Valors perduts	2	0	2	
<i>TOP2A</i>				0.22
Amplificació	7 (5%)	0 (0%)	7 (5.5%)	
Deleció	6 (4%)	0 (0%)	6 (5%)	
No aberració	124 (91%)	13 (100%)	111 (89.5%)	
Teràpia neoadjuvant				0.98
FEC / FAC	53 (39%)	8 (61.5%)	76 (61%)	
EC-T	84 (61%)	5 (38.5%)	48 (39%)	
Tipus de cirurgia				0.92
Mastectomia	86 (63%)	8 (61.5%)	78 (63%)	
Tumorectomia	51 (37%)	5 (38.5%)	46 (37%)	
Resposta patològica				0.055
Completa	12 (9%)	3 (23%)	9 (7%)	
Malaltia residual	125 (91%)	10 (77%)	115 (93%)	

Abreviacions: CEP17, *Chromosome 17 Enumeration Probe*; EC-T, epirrubicina, ciclofosfamida i docetaxel; FAC, fluorouracil, adriamicina i ciclofosfamida; FEC, fluorouracil, epirrubicina i ciclofosfamida; *HER2*, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2; Ki67 Alt ≥ 20, Baix < 20%; N, estat ganglionar; T, mida del tumor; *TOP2A*, Topoisomerasa II alfa.

La duplicació del CEP17 no s'associà amb l'amplificació del gen *HER2* ($P = 0.16$), alt grau histològic ($P = 0.49$), negativitat del RE ($P = 0.61$), o alta expressió del Ki-67 ($P = 0.93$). Els tumors amb l'*HER2* amplificat presentaven coamplificació de la *TOP2A* en 3 casos (42.9%, $P = 0.06$), deleció de la *TOP2A* en 3 casos (50%, $P = 0.02$), i aneusomia del CEP17 en 2 casos (40% $P = 0.16$). L'amplificació de l'*HER2* s'associava significativament amb les alteracions de la *TOP2A* (amplificacions i delecions; $P = 0.003$) i amb les aneusomies del CEP17 ($P = 0.048$) (dades no mostrades a les taules).

5.2.2.- Valor predictiu del CEP17, l'*HER2* i la *TOP2A*

A l'anàlisi multivariable, les duplicacions del CEP17 s'associaren a una major taxa de RCp (OR 6.55, IC 95% 1.25-34.29, $P = .026$) i l'associació amb l'amplificació de la *TOP2A* fregà la significació estadística (OR 6.97, IC 95% 0.96- 50.12, $P = .054$; Taula 13).

Taula 13. Model de regressió logística per la Resposta Completa Patològica.

Variable	RCp	
	OR (IC 95%)	P^a
Receptors d'estrògens		
Positiu	1	
Negatiu	7.12 (1.69 - 30.03)	0.007
<i>HER2</i>		
Normal	1	
Amplificat	0.80 (0.18-3.59)	0.075
<i>TOP2A</i>		
No amplificat	1	
Amplificat	6.97 (0.96 – 50.12)	0.054
CEP17		
Normal	1	
Duplicat	6.55 (1.25-34.29)	0.026
<i>TOP2A</i> / CEP17 ^b		
Normal	1	
Alterat	6.71 (1.66 – 27.01)	0.007

^a Model de regressió logística ajustat pels factors pronòstics coneguts (edat, mida tumoral, estat ganglionar, estat dels receptors hormonals) i teràpia neoadjuvant.

^b Anàlisi combinant els tumors amb amplificació del gen de la *TOP2A* i la duplicació del CEP17.

Abreviacions: CEP17, *Chromosome 17 Enumeration Probe*; *HER2*, *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*; IC 95%, interval de confiança al 95%; OR, odds ratio; RCp, Resposta completa patològica; *TOP2A*, Topoisomerasa II alfa.

Resultats

Quan les amplificacions de la *TOP2A* i la duplicació del CEP17 es combinaren, observàrem una associació amb la RCp, sent les diferències significatives (OR 6.71, IC 95% 1.66-27.01, $P = 0.007$; Taula 13).

Les delecions de la *TOP2A* ($P = 0.42$), l'anàlisi combinat de les amplificacions i les delecions de la *TOP2A* ($P = 0.08$) i l'amplificació del gen *HER2* ($P = 0.07$) no mostraren una associació significativa amb la RCp.

Quan la RCp es valorà en funció del tractament rebut, les duplicacions del CEP17 foren els únics factors associats a resposta a FEC70/FAC65 (OR 14, IC 95% 1.42-137.32, $P = 0.025$) i la positivitat dels RE i l'anàlisi combinat de l'amplificació de la *TOP2A* amb les duplicacions del CEP17 s'associaren a millor resposta a l'esquema EC-T (OR 12.68, IC 95% 1.42-137.32, $P = 0.011$ i OR 6.31, IC 95% 1.98-81.18, $P = 0.007$, respectivament) (dades no mostrades a les taules).

5.2.3.- Valor pronòstic del CEP17, l'*HER2* i la *TOP2A*

L'anàlisi univariable mostrarà que les duplicacions del CEP17, l'amplificació d'*HER2* i l'amplificació de la *TOP2A* no s'associaven significativament ni amb la SLM ni amb la SG (Taula 14).

Taula 14. Anàlisi univariable de biomarcadors i relació amb la Supervivència Lliure de Malaltia i la Supervivència Global.

Variable	N	SLM		SG	
		HR ^a (IC 95%)	P ^a	HR ^a (IC 95%)	P ^a
CEP17					
Normal	124	1		1	
Duplicat	13	2.64 (0.64 - 10.9)	0.17	2.42 (0.58 - 10.02)	0.22
HER2					
Normal	113	1		1	
Amplificat	24	0.97 (0.45 - 2.08)	0.96	0.96 (0.44 - 2.06)	0.90
TOP2A					
No amplificat	130	1		1	
Amplificat	7	21.9 (0.92 - 5275)	0.26	21.73 (0.04 - 11545)	0.33
Ki67					
Baix	57	1		1	
Alt	77	1.89 (1.04 - 3.46)	0.03	1.91 (1.02 - 3.58)	0.04
TOP2A/CEP17 ^b					
Normal	117	1		1	
Alterat	20	4.35 (1.05 - 17.93)	0.04	3.71 (0.89 - 15.34)	0.07

^a Anàlisi univariable basat en 136 pacients, 44 recaigudes i 40 morts.

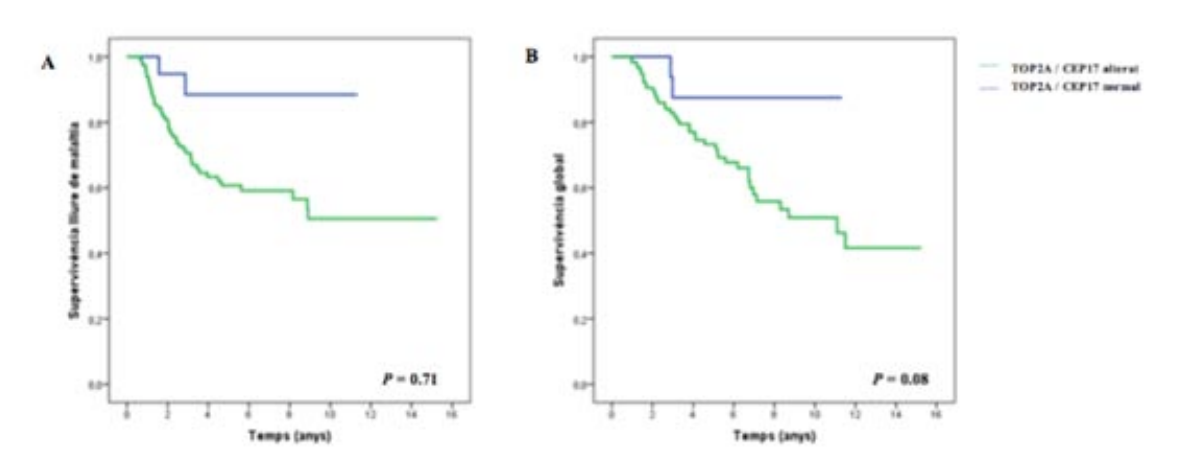
^b Subgrup que combina tumors amb amplificació de la *TOP2A* i duplicació del CEP17.

Abreviatures: HR, *hazard ratio*; HER2, *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*; IC 95%, interval de confiança al 95%; Ki67 Alt \geq 20; Baix < 20%, N, nombre de pacients; SLM, supervivència lliure de malaltia; SG, supervivència global.

No obstant, quan es combinava l'amplificació de la *TOP2A* i les duplicacions del CEP17, s'observà una associació significativa amb una millor SLM (HR 4.34, IC 95% 1.05-17.92, $P = 0.04$) i una tendència a la significació estadística per la SG (HR 3.70, IC 95% 0.89-15.34, $P = 0.07$) (Taula 14, Figura 6). Malauradament, a l'estudi multivariable i després d'ajustar-se pels factors pronòstics clàssics l'anàlisi combinat de l'amplificació de la *TOP2A* i les duplicacions del CEP17 perdia la significació estadística tant per la SLM com per la SG. La duplicació del CEP17, l'amplificació de la *TOP2A*, i l'amplificació d'*HER2* continuava sense mostrar una associació amb la SLM o la SG (Taula 15).

Resultats

Figura 6. Corbes Kaplan-Meier de l'associació de la combinació de l'amplificació de la *TOP2A* i les duplicacions del CEP17 amb (A) la Supervivència Lliure de Malaltia i (B) la Supervivència Global.



Taula 15. Anàlisi Multivariable de la Supervivència Lliure de Malaltia i la Supervivència Global per totes les variables pronòstiques.

Variable	SLM			SG		
	HR	IC 95%	P ^a	HR	IC 95%	P ^a
Edat (<50 vs. ≥50 anys)	1.03	0.5 - 2.15	0.91	1.09	0.5 - 2.41	0.81
Ganglis (negatiu vs. positiu)	2.95	1.23 - 7.07	0.01	3.12	1.21 - 8.03	0.01
Mida tumor (T2 vs. T3 vs. T4)	1.78	0.85 - 3.7	0.02	1.63	0.68 - 3.91	0.9
Grau histològic (I-II vs. III)	1.53	0.77 - 3.03	0.22	2.07	1.06 - 4.05	0.03
RE (negatiu vs. positiu)	0.45	0.24 - 0.81	0.01	0.51	0.24 - 1.07	0.07
Ki67 (baix vs. alt)	1.29	0.65-2.54	0.45	1.33	0.65-2.71	0.43
HER2 (negatiu vs. positiu)	1.23	0.51 - 2.97	0.63	1.06	0.43 - 2.62	0.89
RCp (positiu vs. negatiu)	4.41	0.54 - 30.65	0.08	4.49	0.58 - 34.72	0.15
Tractament (EC-T vs. FEC/FAC)	1.17	0.61 - 2.24	0.62	1.07	0.54 - 2.12	0.83
CEP17 (normal vs. duplicat)	2.46	0.54 - 11.06	0.24	2.29	0.51 - 10.35	0.27
<i>TOP2A</i> / CEP17 ^b (normal vs. alterat)	3.91	0.89 - 17.2	0.71	3.72	0.84 - 16.43	0.08

^a Anàlisi multivariable basat en 136 pacients, 44 recaigudes i 40 morts.

^b Subgrup que combina tumors amb amplificació de la *TOP2A* i tumors amb duplicacions del CEP17.

Abreviatures: EC-T, epirrubicina, ciclofosfamida i docetaxel; FAC, fluorouracil, adriamicina i ciclofosfamida; FEC, fluorouracil, epirrubicina i ciclofosfamida; HR, *hazard ratio*; *HER2*, *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*; IC 95%, interval de confiança del 95%; RE, receptors d'estrògens; SLM, supervivència lliure de malaltia; SG, supervivència global.

5.3.- Objectiu 2:

5.3.1.-Associacions de la proteïna Tau i les variables clinicopatològiques

L'expressió de la proteïna Tau es determinà en 126 mostres. Seixanta-dos dels tumors (49.2%) presentaren alta expressió de la proteïna Tau (tumors Tau positius). L'expressió de la proteïna Tau fou més freqüent en tumors RE positius (55, 70.5% $P < 0.001$) i RP positius (48, 77% $P < 0.001$) amb baix grau histològic (41, 63% $P < 0.001$) i estava inversament relacionada amb l'amplificació del gen *HER2* (57, 56%, $P = 0.004$) i l'índex de proliferació cel·lular Ki67 (37, 72.5% $P < 0.001$) (Taula 16).

Taula 16. Correlació entre l'expressió de Tau i les variables clínico-patològiques.

Variables	Tau		P
	Negativa	Positiva	
Nombre	64 (51%)	62 (49%)	
Edat al diagnòstic			0.27
≤ 50	33 (56%)	26 (44%)	
> 50	31 (46%)	36 (54%)	
Mida del Tumor			0.58
T2	17 (50%)	17 (50%)	
T3	18 (45%)	22 (55%)	
T4	29 (56%)	23 (44%)	
Ganglis limfàtics			0.21
Negatiu	18 (43%)	24 (57%)	
Positiu	46 (55%)	38 (45%)	
Grau histològic			0.001
Baix / Intermig	24 (37%)	41 (63%)	
Alt	40 (66%)	21 (34%)	
Receptors d'estrògens			<0.001
Positiu	23 (29.5%)	55 (70.5%)	
Negatiu	41 (85%)	7 (15%)	
Receptors de progesterona			<0.001
Positiu	14 (23%)	48 (77%)	
Negatiu	50 (78%)	14 (22%)	
<i>HER2</i>			0.004
Positiu	18 (78%)	5 (22%)	
Negatiu	44 (44%)	57 (56%)	
Ki67			<0.001
Baix	14 (27.5%)	37 (72.5%)	
Alt	48 (67.5%)	23 (32.5%)	

Abreviacions: T: Mida del tumor primari; N: Ganglis limfàtics regionals; *HER2* Human Epidermal Growth Factor Receptor 2; Ki67 Alt ≥ 20; Baix < 20%.

5.3.2.-Valor predictiu de la proteïna Tau i els isotips de la β -tubulina

Un 9% dels pacients (11 de 126 tumors) assoliren RCp. La baixa expressió de la proteïna Tau (tumors Tau negatius) fou significativament més freqüent entre aquells casos que presentaren RCp (10, 91% $P = 0.005$) comparat amb aquells casos que presentaven malaltia residual. A l'anàlisi multivariable, la baixa expressió de Tau es va mantenir com a factor predictiu independent de RCp (OR 1.10, IC 95% 1.35-9.09, $P = 0.025$). L'expressió de les β -tubulines no fou predictor de RCp. El seixanta-quatre per cent de les pacients amb RCp (7/11) reberen tractament amb taxans i eren Tau negatives, mentre que cap de les pacients que presentà RCp i rebé tractament amb taxans era Tau positiva. Els tumors Tau negatius presentaven una millor resposta a la quimioteràpia amb taxans i s'observà una associació significativa entre l'expressió de la proteïna Tau i l'efecte dels taxans ($P = 0.019$) (Taula 17).

Taula 17. Model de regressió logística per la Resposta Completa Patològica en funció de l'expressió de la proteïna Tau i la branca de tractament.

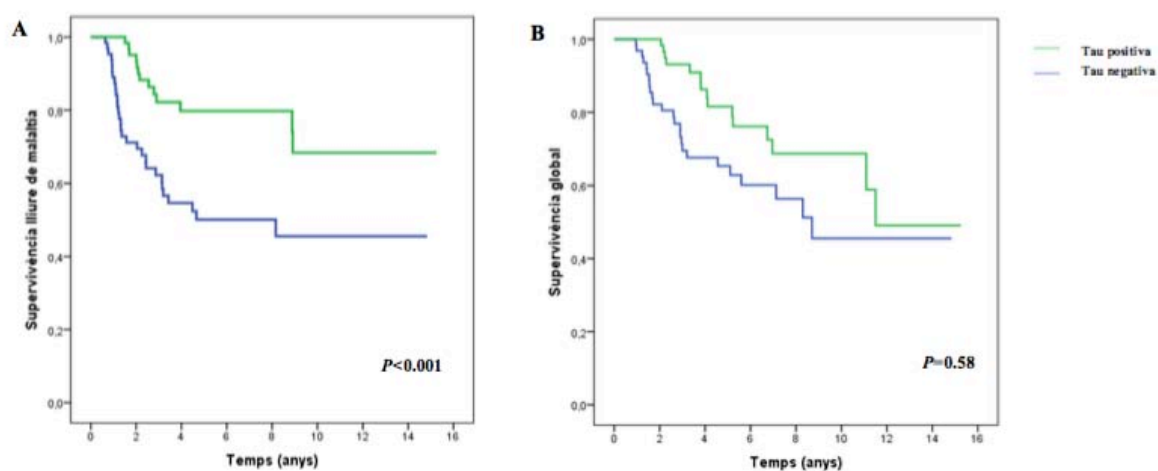
	Tractament	RCp		<i>P</i>
		Si	No	
Tau-negativa	FEC / FAC	3 (11.5%)	31 (81.5%)	0.019
	EC-T	7 (18.5%)	31 (81.5%)	
Tau-positiva	FEC / FAC	1 (9%)	25 (91%)	
	EC-T	0 (0%)	34 (100%)	

Abreviatures: EC-T: epirubicina, ciclofosfamida seguit de docetaxel; FAC: fluorouracil, adriamicina, ciclofosfamida; FEC: fluorouracil, epirubicina, ciclofosfamida; RCp, resposta completa patològica

5.3.3.- Valor pronòstic de la proteïna Tau i els isotips de la β -tubulina

Amb una mediana de seguiment de 52 mesos, les pacients amb alta expressió de la proteïna Tau presentaren a l'anàlisi univariable millor SLM (HR 0.35, IC 95% 0.18-0.67, $P = 0.002$) i SG (HR 0.51, IC 95% 0.27-0.97, $P = 0.043$) (Taula 18, Figura 7). A l'anàlisi multivariable l'expressió de Tau mantingué la significança estadística per la SLM (HR 0.29, IC 95% 0.15 – 0.59, $P < 0.001$), però no per la SG ($P = 0.58$) (Taula 19).

Figura 7. Corbes Kaplan-Meier de l'associació de la proteïna Tau amb (A) la Supervivència Lliure de Malaltia i (B) la Supervivència Global.



L'expressió dels isotips de les β -tubulines no s'associà a la SLM o la SG ni a l'anàlisi univariable (Taula 18) ni al multivariable (Taula 19).

Resultats

Taula 18 Anàlisi univariàble de biomarcadors i relació amb la Supervivència Lliure de Malaltia i la Supervivència Global.

Variable	N	SLM		SG	
		HR ^a (IC 95%)	P ^a	HR ^a (IC 95%)	P ^a
Tau					
Negatiu	64	1		1	
Positiu	62	0.35 (0.18 – 0.67)	0.002	0.51 (0.27 – 0.97)	0.043
βI-tubulina		1			
Negatiu	71			1	
Positiu	58	1.09 (0.60 - 2.00)	0.76	1.55 (0.81 – 2.94)	0.18
βII-tubulina					
Negatiu	61	1		1	
Positiu	59	0.98 (0.53 – 1.84)	0.97	1.10 (0.58 – 2.07)	0.76
βIII-tubulina					
Negatiu	66	1		1	0.40
Positiu	60	0.64 (0.34 – 1.18)	0.15	0.76 (0.40 – 1.44)	
βIV-tubulina					
Negatiu	73	1		1	
Positiu	56	0.86 (0.47 – 1.57)	0.63	0.84 (0.45 - 1.57)	0.59

^a Anàlisi univariàble basat en 136 pacients, 44 recaigudes i 40 morts.

Abreviatures: βI-tubulina positiva ≥210, negativa <210; βII-tubulina positiva ≥15, negativa <15; βIII-tubulina positiva ≥30, negativa <30; βIV-tubulina positiva ≥15, negativa <15; HR, *hazard ratio*; IC 95%, interval de confiança al 95%; SLM, supervivència lliure de malaltia; SG, supervivència global; Tau positiva ≥10, negativa <10.

Taula 19. Anàlisi Multivariàble de la Supervivència Lliure de Malaltia i la Supervivència Global per totes les variables pronòstiques.

Variables	SLM			SG		
	HR	IC 95%	P ^a	HR	IC 95%	P ^a
Edat (<50 vs. ≥50 anys)	2.31	0.99 - 5.41	0.052	2.06	0.86 - 4.89	0.10
Ganglis (negatiu vs. positiu)	2.62	1.08 - 6.36	0.03	3.12	1.20 – 8.09	0.01
Mida tumor (T2 vs. T3 vs. T4)	1.63	0.76 – 3.49	0.03	2.22	0.82 - 6.01	0.11
Grau histològic (I-II vs. III)	1.60	0.70-3.68	0.26	2.22	1.08 - 4.54	0.02
RE (negatiu vs. positiu)	0.48	0.20-1.18	0.11	0.32	0.12 - 0.81	0.19
Ki67 (baix vs. alt)	1.96	0.77-5.02	0.15	2.98	1.14 - 7.79	0.08
HER2 (negatiu vs. positiu)	4.01	0.43-35.94	0.22	3.04	0.33-27.48	0.51
RCp (positiu vs. negatiu)	-	-	-	0.09	0.01 - 0.76	0.09
Tractament (FEC/FAC vs. EC-T)	0.97	0.40-2.31	0.94	0.89	0.37-2.12	0.79
Tau (negatiu vs. positiu)	0.29	0.15-0.59	<0.001	0.74	0.26-2.12	0.58
βI-tubulina (negatiu vs. positiu)	1.03	0.47-2.23	0.93	1.29	0.58-0.54	0.52
βII-tubulina (negatiu vs. positiu)	0.61	0.28-1.30	0.20	0.79	0.37-0.48	0.54
βIII-tubulina (negatiu vs. positiu)	0.40	0.15-1.10	0.07	0.24	0.08-0.51	0.07
βIV-tubulina (negatiu vs. positiu)	0.60	0.27-1.31	0.20	0.47	0.21-0.52	0.06

^a Anàlisi multivariàble basat en 125 pacients, 43 recurrències i 40 morts.

Abreviatures: EC-T, epirrubicina, ciclofosfamida i docetaxel; FAC, fluorouracil, adriamicina i ciclofosfamida; FEC, fluorouracil, epirrubicina i ciclofosfamida; HR, *hazard ratio*; HER2, *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*; IC, interval de confiança; Ki67 Alt ≥ 20; Baix < 20%; RE, receptors d'estrògens; SLM, supervivència lliure de malaltia; SG, supervivència global.

6. DISCUSSIÓ

Actualment no disposem de biomarcadors específics per predir la resposta dels tumors de mama a la quimioteràpia amb antraciclins i taxans. La identificació de factors predictius de resposta permetria millorar l'eficàcia de la quimioteràpia i minimizar les toxicitats secundàries.

En la primera part d'aquesta tesi hem estudiat el paper de l'amplificació del gen *HER2*, l'amplificació del gen de la *TOP2A* i les duplicacions del CEP17 com a factors predictius de resposta a les antraciclins en una cohort de pacients amb càncer de mama estadis II i III tractades amb quimioteràpia neoadjuvant amb antraciclins i taxans, emprant la RCp com a marcador subrogat de quimiosensibilitat. També hem avaluat l'impacte d'aquests biomarcadors en la supervivència. A continuació es discuteixen els resultats obtinguts en aquest primer treball:

6.1.- Objectiu 1:

6.1.1.- Valor predictiu de les duplicacions del CEP17, l'amplificació del gen *HER2* i les alteracions del gen de la *TOP2A*

La principal troballa de la primera part d'aquesta tesi és que la duplicació del CEP17 s'associa amb la RCp en pacients amb càncer de mama tractades amb esquemes de quimioteràpia basades en antraciclins. Al nostre entendre, aquest és el primer estudi en analitzar l'associació entre la duplicació de CEP17 i la resposta a la quimioteràpia primària, emprant la RCp com a marcador subrogat de quimiosensibilitat. La raó per investigar l'associació de la duplicació del CEP17 i la resposta a la quimioteràpia es fonamenta en la hipòtesi que la duplicació del CEP17 seria un potencial marcador d'inestabilitat genòmica i

de disfunció en la reparació de l'ADN.^{215,297} El cromosoma 17 és el segon gen del genoma humà amb major densitat gènica, i inclou diversos gens claus en càncer de mama (*HER2*, *TOP2A*, *BRCA1* i *Tau*) i en la reparació de l'ADN (*p53*, *RAD51C* i *RAD52B*).^{297,298} A més a més, anàlisis de rearranjaments han demostrat que el cromosoma 17 acull una regió d'alta inestabilitat genòmica pròxima a 17q12 i caracteritzada per múltiples amplifícacions i delecions.^{221,222,299} Estudis més recents mitjançant Híbridació Genòmica Comparada suggereixen que la detecció de les polisomes del cromosoma 17 detectades per FISH o CISH en realitat són un fenomen rar en càncer de mama i que el que es detecta mitjançant aquestes tècniques serien guanys, duplicacions o amplifícacions a la regió del CEP17 més que no pas una duplicació de tot el cromosoma 17.^{214,215} Així, l'augment del nombre de còpies del CEP17 causaria canvis genètics crucials, com per l'exemple l'amplificació de l'*HER2*, l'amplificació o delecio de la *TOP2A*, pèrdues de *p53* o pèrdues en el gen *BRCA1*. Aquestes anomalies cromosòmiques s'han relacionat amb mecanismes de tumorigènesi en càncer de mama (proliferació cel·lular, fenòmens d'angiogènesi, i inhibició de l'apoptosi).^{221,222}

En aquest mateix treball també hem analitzat la prevalença de les duplicacions del CEP17, que han estat presents en el 9.3% dels tumors. Aquest valor és inferior als resultats reportats per altres autors. La reproductibilitat interlaboratori del test del CEP17 no està establerta, i la prevalença difereix en els diferents estudis, amb valors entre el 8% i el 68% depenent del material examinat, els mètodes de recompte cel·lular, i el llindar establert per definir la duplicació del CEP17.²⁹⁹

Per altra banda, estudis previs establiren una correlació entre la duplicació del CEP17 i un fenotip més agressiu.²⁹⁷ Nosaltres no hem pogut demostrar una associació entre

duplicació del CEP17 i alt grau histològic, metàstasis ganglionars, negativitat del receptor d'estrògens, ampliació del gen *HER2* o alta expressió de Ki67.

Una altra troballa d'interès al nostre estudi és que l'amplificació del gen de la *TOP2A* es podria correlacionar amb la RCp a la teràpia neoadjuvant amb esquemes basats en antraciclins tot i que cal tenir en compte que la diferència frega la significació estadística (OR 6.97, IC 95% 0.96-50.12, $P = 0.054$). Quan l'amplificació de la *TOP2A* es combina amb les duplicació del CEP17 les diferències són significatives (OR 6.71, IC 95% 1.66-27.01, $P = 0.007$). La petita mida mostral del nostre estudi podria explicar que l'amplificació del gen de la *TOP2A* (trobat en només el 5% dels tumors) no s'associés a la RCp. Aquestes observacions suggereixen que els tumors que presenten alteracions gèniques que poden incrementar el nombre de còpies de la *TOP2A* es beneficiarien més d'esquemes de quimioteràpia que incloguessin antraciclins. El mecanisme subjacent pel qual les duplicacions del CEP17 s'associarien a una major sensibilitat a les antraciclins no és ben conegut. La nostra hipòtesi planteja que la sensibilitat a les antraciclins no només seria deguda a l'augment del nombre de còpies del gen de la *TOP2A* en el context de l'amplificació del gen sinó també el resultat de guanys secundaris de les regions pericentromèriques del cromosoma 17 (duplicacions del CEP17). Per tant, les duplicacions del CEP17 generarien de forma indirecta un augment en el nombre de còpies del gen de la *TOP2A*.

A l'analitzar el paper de l'amplificació del gen *HER2*, no hem evidenciat que fos un marcador predictiu de resposta a la quimioteràpia amb antraciclins, dada consistent amb la literatura actual,^{172,191,199,224} suggerint que les pacients amb tumors HER2 negatius també es podrien beneficiar dels tractaments amb antraciclins. També hem observat que tumors amb la *TOP2A* sense alteracions podrien obtenir un benefici addicional del tractament amb

esquemes amb antraciclins. Altres mecanismes, com la resposta immune, les interaccions tumor-estroma, i les duplicacions del CEP17 podrien participar en la sensibilitat augmentada d'aquestes pacients als tractaments amb antraciclins.³⁰⁰⁻³⁰³

Per a resumir aquest apartat i en referència als resultats obtinguts, destacar doncs que l'ús d'antraciclins no s'hauria de limitar a les pacients amb amplificació del gen *HER2* o de la *TOP2A*.

6.1.2.- Valor pronòstic de les duplicacions del CEP17, l'amplificació del gen *HER2* i les alteracions de la *TOP2A*

No hem indentificat una relació estadísticament significativa entre la duplicació de CEP17 i la supervivència. Els nostres resultats són consistents amb estudis previs^{184,213} que analitzen el paper pronòstic i predictiu de la duplicació del CEP17 en pacients amb càncer de mama precoç tractades amb esquemes de quimioteràpia adjuvant que contenen antraciclins i no-antraciclins. Bartlett i col·laboradors¹⁸⁴ avaluaren el paper de les duplicacions del CEP17 en 1931 tumors provinents de 2391 pacients incloses a l'estudi *UK National Epirubicin Adjuvant Trial (NEAT/BR9601)*. Encara que aquest estudi no detectà diferències significatives a l'avaluar una potencial associació de les duplicacions del CEP17 amb el pronòstic (SLR HR 1.12, IC 95% 0.92-1.36, $P = 0.24$, SG HR 1.17, IC 95% 0.95-1.44, $P = 0.13$), demostrà que el benefici en supervivència a la branca de tractament que afegia l'epirubicina es limitava a aquelles pacients amb tumors amb duplicació del CEP17 (SLR HR 0.54, IC 95% 0.35-0.83, P d'interacció 0.005, SG, HR 0.60, IC 95% 0.50-1.45, P d'interacció 0.03). Resultats semblants foren obtinguts per Pritchard i col·laboradors²¹³ a l'estudi randomitzat *Mammary 5 (MA.5) adjuvant trial*, on no s'identificà una associació

significativa amb el risc de recaiguda (HR 1.15, IC 95% 0.86-1.54, $P = 0.34$) o el risc de mort (HR 1.39, IC 95% 0.90-2.15, $P = 0.14$) a l'anàlisi multivariable. No obstant, en aquelles pacients amb tumors amb duplicació del CEP17 i que reberen antraciclins, s'objectivà un benefici significatiu en SLM (HR 0.59, IC 95% 0.37-0.92, $P = .02$) i en SG (HR 0.61, IC 95% 0.37-1.01, $P = .05$) a l'anàlisi estadística univariable. Aquesta associació desapareixia després d'ajustar-se per altres variables.

Les limitacions del nostre estudi són: la petita mida mostral i el disseny retrospectiu, que podria haver esbiaixat la selecció de pacients. A més, l'absència de grup control sense quimioteràpia amb antraciclins no ens permet distingir si la taxa de RCp s'atribuiria a la alta sensibilitat a les antraciclins o a la quimioteràpia amb antraciclins, taxans, ciclofosfamida i/o 5-fluorouracil. Aquests resultats, doncs, són preliminars i requereixen la confirmació en estudis prospectius de major mida dissenyats per validar el paper predictiu d'aquests biomarcadors i comparar règims amb o sense antraciclins.

A tall de conclusió, aquestes troballes suggereixen que les duplicacions del CEP17 podrien ser un biomarcador de sensibilitat a la quimioteràpia primària amb antraciclins. Una millor comprensió de les anomalies a nivell del CEP17 ens ajudarien a seleccionar aquells pacients que es beneficiarien de règims basats amb antraciclins i identificar aquelles pacients la toxicitat de les quals es podria evitar.

Objectiu 2:

El paper de la proteïna Tau i les β -tubulines com a marcadors predictius de resistència als taxans i com a marcadors pronòstics ha estat analitzat en diferents estudis

amb resultats discordants. En la segona part de la present tesi doctoral s'ha avaluat el paper predictiu i pronòstic d'aquests marcadors en la mateixa cohort de pacients estudiada prèviament. A continuació s'exposa la discussió dels principals resultats:

6.2.1 Valor predictiu de la proteïna Tau i dels isotips de la β -tubulina

Les nostres dades mostren que les pacients amb tumors Tau negatius presenten una millor resposta a la quimioteràpia i a més, es beneficien d'esquemes de quimioteràpia amb taxans. Així, la proteïna Tau seria, no només un marcador de quimioresistència, sinó també un predictor de resistència a la quimioteràpia amb taxans. Fins on sabem, el present treball és el primer en avaluar l'associació de la proteïna Tau i la resposta a la quimioteràpia primària, emprant la RCp com a marcador de quimiosensibilitat en una cohort de pacients tractades amb quimioteràpia amb taxans i sense taxans. En aquest sentit, els estudis previs realitzats en el marc de la quimioteràpia neoadjuvant^{251,253} on les pacients havien rebut només esquemes de tractament amb taxans l'absència de grup control impossibilitava distingir si la major taxa de RCp s'atribuiria a la alta sensibilitat a la quimioteràpia o a una sensibilitat específica als taxans.

Es ben conegut que els tumors HER2 positius, amb alt grau histològic i RE negatius presenten altes taxes de RCp quan es compara amb altres tipus de càncer de mama.^{304,305} En la nostra cohort de pacients, els tumors Tau negatius s'associen amb aquestes característiques tumorals i també amb la RCp. Aquesta associació podria explicar la relació entre baixa expressió de la proteïna Tau i una major taxa de RCp. No obstant, a l'anàlisi multivariable, després d'ajustar pels factors pronòstics clàssics (inclosos el grau histològic i l'estatus dels receptors hormonaals i de l'*HER2*) la manca d'expressió de la proteïna Tau es

manté associada a la RCp (OR 1.10, IC 95%, 1.35-9.09, $P = 0.025$) suggerint un potencial valor predictiu independent d'aquests factors. No obstant, la proteïna Tau és un biomarcador imperfecte. Aproximadament el 86% de tots els casos amb expressió de Tau reduïda presenten malaltia residual suggerint que altres mecanismes de resistència protegeixen les cèl·lules tumorals del docetaxel inclús si els microtúbuls són més vulnerables donada la baixa expressió de la proteïna Tau.

Els nostres resultats són consistents amb estudis inicials en línies cel·lulars de càncer de mama on nivells disminuïts de la proteïna Tau s'associaven a una major sensibilitat als taxans.^{251,252} La proteïna Tau actuaria com un inhibidor competitiu dels taxans, ocupant els mateixos llocs d'unió als microtúbuls que el quimioteràpic. Nivells reduïts de la proteïna farien els microtúbuls més vulnerables a l'efecte del citostàtic.²⁷⁰

Per altra banda, i com s'ha comentat prèviament, no s'ha demostrat una relació significativa entre l'expressió de les diferents isoformes de la β -tubulina i la resistència al docetaxel. Encara que el paper dels isotips de la β -tubulina com a marcadors de resistència als taxans és biològicament plausible^{260,261} l'evidència empírica d'aquest efecte en càncer de mama és escassa.^{281,283} Estudis en línies cel·lulars suggereixen que el mecanisme de resistència dels isotips de la β -tubulina és complex i multifactorial. S'ha hipotetitzat que la seva sobreexpressió augmentaria la incorporació dels dímers al *pool* soluble de la tubulina reduint la taxa de polimerització dels microtúbuls o bé generaria dímers d' $\alpha\beta$ -tubulina amb propietats intrínseques dinàmiques alterades que els farien menys sensibles als agents antitubulina.²⁶⁰ Es disposa de pocs estudis que analitzin el paper predictiu d'aquests biomarcadors en càncer de mama,^{257,259,281,283,285} sent la majoria d'ells de petita mida mostral, amb heterogeneïtat de pacients, manca de grup control, i no ajustament pels factors pronòstics tradicionals. Així, en el cas de la β III-tubulina, dels 5 estudis

publicats,^{257,259,281,283,285} només el de Paradiso, un estudi de petita mida mostral (70 pacients analitzades) i sense branca control (totes les pacients rebren esquemes amb docetaxel), suggeriria un possible efecte de resistència a l'anàlisi multivariable.²⁸³ En el cas de la β II-tubulina els dos estudis publicats revelen resultats discordants;^{259,281} el primer que avalua en un grup de 30 pacients amb càncer de mama localment avançat i metastàtic tractades totes elles en monoteràpia amb docetaxel suggereix en l'anàlisi univariable un possible efecte de resistència²⁸¹ mentre que el segon no demostra un efecte predictiu.²⁵⁹ Els tres articles que estudien el paper predictiu en càncer de mama de la β IV-tubulina foren tots ells negatius.^{259,281,283} En el nostre estudi, malgrat intentar contrarestar aquests possibles factors de confusió (major mida mostral, pacients amb càncer de mama estadis II-III, presència de grup control, i anàlisi estadístic multivariable) tampoc s'ha demostrat una relació significativa entre l'expressió de les diferents isoformes de la β -tubulina i la resistència al docetaxel.

6.2.2 Valor pronòstic de la proteïna Tau i els isotips de la β -tubulina

En termes de valor pronòstic, els resultats del nostre treball indiquen que l'expressió de la proteïna Tau és un factor independent de supervivència. Concretament, les pacients Tau positives presenten millor SLM que les pacients Tau negatives, resultats en consonància amb estudis anteriors.^{258,306} La raó clínica que explicaria l'associació entre proteïna Tau i pronòstic es fonamenta en la correlació entre l'expressió de la proteïna Tau i la sensibilitat hormonal en tumors RE positius.²⁵³ Diversos estudis *in vitro* suggereixen que el gen de la Tau seria un gen inductor de l'expressió del RE.²⁷³⁻²⁷⁵ A nivell clínic, el grup d'Andre²⁵³ demostrà que nivells elevats d'ARNm de Tau s'associaven de manera

significativa a menor risc de recaiguda en una cohort de 267 pacients tractades amb tamoxifè. Per contra, quan es determinaren els nivells d'ARNm de Tau en una altra cohort de 209 pacients no tractades amb tractament complementari l'associació fregava la significació estadística. En conjunt, aquestes observacions suggereixen que l'expressió de la proteïna Tau en càncer de mama seria, més que un marcador pronòstic *per se*, un marcador de sensibilitat endocrina, i prediria un benefici a la teràpia antiestrogènica.

Pel que fa al valor pronòstic dels isotips de la β -tubulina, no hem pogut demostrar una relació significativa entre l'expressió de les diferents isoformes de la β -tubulina i la supervivència en càncer de mama. Inclús previ a ajustar-se pels factors pronòstics clàssics, els isotips de la β -tubulina no mostraren una relació significativa ni amb la SLM ni amb la SG. No obstant, el nombre reduït de casos de la nostra sèrie podria haver limitat la nostra habilitat per identificar un efecte dels isotips de la β -tubulina en la supervivència. Una revisió de la literatura científica existent aporta poca llum sobre el paper de la β -tubulina en el pronòstic del càncer de mama. La majoria dels estudis són de caràcter exploratori, petita mida mostral, amb heterogeneïtat de pacients, diverses dosis de tractament i alguns d'ells sense branca control. Disposem només de 3 estudis que avaluen el paper pronòstic de la β III-tubulina en càncer de mama.^{257,259,283} Dos d'aquests estudis^{259,283} resultaren negatius. El tercer, publicat pel grup de Pentheroudaki,²⁵⁷ demostrà en una cohort de 595 pacients amb càncer de mama estadi II i III i tractades amb esquemes amb anatràciclins i taxans, una relació significativa entre els nivells d'ARNm de β III-tubulina i pitjor pronòstic en càncer de mama. Aquesta associació no es reproduïa quan s'analitzava la sobreexpressió de β III-tubulina mitjançant immunohistoquímica. Dos articles avaluen el paper pronòstic en càncer de mama de la β IV-tubulina^{259,283} i un el de la β II-tubulina,²⁵⁹ tots ells negatius. No es disposa d'estudis que analitzin la influència pronòstica de la β I-tubulina en càncer de mama.

Discussió

En global, doncs, aquests estudis donen poc suport a un possible paper dels isotips de la β -tubulina en el pronòstic de les pacients amb càncer de mama.

Les nostres troballes han de ser interpretades amb cautela donada la petita mida mostral i el disseny retrospectiu de l'estudi, i requereixen la confirmació en estudis prospectius de major mida dissenyats per validar el paper predictiu i pronòstic d'aquests biomarcadors.

En resum, els nostres resultats suggereixen que la sobreexpressió de la proteïna Tau podria ser un biomarcador de resistència a la quimioteràpia primària amb taxans i un marcador de bon pronòstic a llarg plaç.

7.- CONCLUSIONS

Pel que fa al paper dels biomarcadors analitzats en relació a la resposta i supervivència de pacients amb càncer de mama tractades amb esquemes de quimioteràpia neoadjuvant basades en antraciclins, les conclusions de la present tesi doctoral són:

- La duplicació del CEP17 s'associa a la resposta completa patològica en pacients tractades amb esquemes de quimioteràpia neoadjuvant amb antraciclins. L'amplificació del gen de la *TOP2A*, i del gen de l'*HER2* no sembla influenciar la resposta a la quimioteràpia neoadjuvant amb antraciclins.

- La duplicació del CEP17, les amplificacions del gen de la *TOP2A*, i les amplificacions de l'*HER2* no s'associen a pitjor pronòstic.

Pel que fa al paper dels biomarcadors analitzats en relació a la resposta i supervivència de pacients amb càncer de mama tractades amb esquemes de quimioteràpia neoadjuvant amb antraciclina i taxans, les conclusions de la present tesi doctoral són:

- La baixa expressió de la proteïna Tau s'associa a resposta a la quimioteràpia neoadjuvant i a benefici del tractament amb docetaxel. Els isotips de la β -tubulina no semblen ser útils com a biomarcadors de resistència a la quimioteràpia amb taxans.

- Les pacients amb alta expressió de la proteïna Tau presenten una millor supervivència lliure de malaltia independentment del tractament rebut. No hem identificat una associació entre l'expressió de la β I-, β II-, β III- i β IV-tubulina i el pronòstic en càncer de mama.

8.- BIBLIOGRAFIA

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al: Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 2015
2. Izquierdo A, Gispert R, Saladié F, et al: [Analysis of cancer incidence, survival and mortality according to the main tumoral localizations, 1985-2019: Breast cancer]. *Med Clin (Barc)* 131 Suppl 1:50-2, 2008
3. De Angelis R, Sant M, Coleman MP, et al: Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EUROCORE--5-a population-based study. *Lancet Oncol* 15:23-34, 2014
4. Berry DA, Cronin KA, Plevritis SK, et al: Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *N Engl J Med* 353:1784-92, 2005
5. Galceran J AA, Cardó X, Piñol JL, Gumà J, Saladié F et al.: El càncer a Tarragona, 1980-2001. Incidència, mortalitat, supervivència i prevalença. . Registre de Càncer de Tarragona. Fundació Lliga per a la Investigació i Prevenció del Càncer. Reus, 2008
6. Fackenthal JD, Olopade OI: Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. *Nat Rev Cancer* 7:937-48, 2007
7. Balmana J, Diez O, Rubio IT, et al: BRCA in breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol* 22 Suppl 6:vi31-4, 2011
8. Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, et al: Breast cancer. *Lancet* 365:1727-41, 2005
9. Singletary KW, Gapstur SM: Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms. *JAMA* 286:2143-51, 2001
10. Pierobon M, Frankenfeld CL: Obesity as a risk factor for triple-negative breast cancers: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 137:307-14, 2013
11. Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, et al: Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 95:1218-26, 2003
12. Friedenreich CM, Cust AE: Physical activity and breast cancer risk: impact of timing, type and dose of activity and population subgroup effects. *Br J Sports Med* 42:636-47, 2008
13. Fisher B, Bauer M, Wickerham DL, et al: Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer* 52:1551-7, 1983
14. Carter CL, Allen C, Henson DE: Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 63:181-7, 1989
15. Harlow SP, Krag DN, Julian TB, et al: Prerandomization Surgical Training for the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-32 trial: a randomized phase III clinical trial to compare sentinel node resection to conventional axillary dissection in clinically node-negative breast cancer. *Ann Surg* 241:48-54, 2005
16. Gill G: Sentinel-lymph-node-based management or routine axillary clearance? One-year outcomes of sentinel node biopsy versus axillary clearance (SNAC): a randomized controlled surgical trial. *Ann Surg Oncol* 16:266-75, 2009
17. Zavagno G, De Salvo GL, Scalco G, et al: A Randomized clinical trial on sentinel lymph node biopsy versus axillary lymph node dissection in breast cancer: results of the Sentinella/GIVOM trial. *Ann Surg* 247:207-13, 2008
18. Galimberti V, Cole BF, Zurrada S, et al: Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel-node micrometastases (IBCSG 23-01): a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 14:297-305, 2013
19. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, et al: Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. *JAMA* 305:569-75, 2011

Bibliografia

20. Ivens D, Hoe AL, Podd TJ, et al: Assessment of morbidity from complete axillary dissection. *Br J Cancer* 66:136-8, 1992
21. Land SR, Kopec JA, Julian TB, et al: Patient-reported outcomes in sentinel node-negative adjuvant breast cancer patients receiving sentinel-node biopsy or axillary dissection: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project phase III protocol B-32. *J Clin Oncol* 28:3929-36, 2010
22. Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, et al: One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 13:4807-16, 2007
23. Rosen PP, Groshen S, Kinne DW, et al: Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol* 11:2090-100, 1993
24. Chia SK, Speers CH, Bryce CJ, et al: Ten-year outcomes in a population-based cohort of node-negative, lymphatic, and vascular invasion-negative early breast cancers without adjuvant systemic therapies. *J Clin Oncol* 22:1630-7, 2004
25. Gajdos C, Tartter PI, Bleiweiss IJ: Lymphatic invasion, tumor size, and age are independent predictors of axillary lymph node metastases in women with T1 breast cancers. *Ann Surg* 230:692-6, 1999
26. Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AH, et al: Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol* 26:3153-8, 2008
27. Trudeau ME, Pritchard KI, Chapman JA, et al: Prognostic factors affecting the natural history of node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 89:35-45, 2005
28. Bloom HJ, Richardson WW: Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 11:359-77, 1957
29. Singletary SE, Allred C, Ashley P, et al: Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 20:3628-36, 2002
30. Elston CW, Ellis IO: Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19:403-10, 1991
31. Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, et al: Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst* 98:262-72, 2006
32. Liedtke C, Hatzis C, Symmans WF, et al: Genomic grade index is associated with response to chemotherapy in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 27:3185-91, 2009
33. Lee AK, DeLellis RA, Silverman ML, et al: Prognostic significance of peritumoral lymphatic and blood vessel invasion in node-negative carcinoma of the breast. *J Clin Oncol* 8:1457-65, 1990
34. Lauria R, Perrone F, Carlomagno C, et al: The prognostic value of lymphatic and blood vessel invasion in operable breast cancer. *Cancer* 76:1772-8, 1995
35. de Mascarel I, Bonichon F, Durand M, et al: Obvious peritumoral emboli: an elusive prognostic factor reappraised. Multivariate analysis of 1320 node-negative breast cancers. *Eur J Cancer* 34:58-65, 1998
36. Davis BW, Gelber R, Goldhirsch A, et al: Prognostic significance of peritumoral vessel invasion in clinical trials of adjuvant therapy for breast cancer with axillary lymph node metastasis. *Hum Pathol* 16:1212-8, 1985
37. Li CI, Anderson BO, Daling JR, et al: Trends in incidence rates of invasive lobular and ductal breast carcinoma. *JAMA* 289:1421-4, 2003
38. Li CI, Uribe DJ, Daling JR: Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer* 93:1046-52, 2005

39. Pestalozzi BC, Zahrieh D, Mallon E, et al: Distinct clinical and prognostic features of infiltrating lobular carcinoma of the breast: combined results of 15 International Breast Cancer Study Group clinical trials. *J Clin Oncol* 26:3006-14, 2008
40. Arpino G, Bardou VJ, Clark GM, et al: Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome. *Breast Cancer Res* 6:R149-56, 2004
41. Cristofanilli M, Gonzalez-Angulo A, Sneige N, et al: Invasive lobular carcinoma classic type: response to primary chemotherapy and survival outcomes. *J Clin Oncol* 23:41-8, 2005
42. Sastre-Garau X, Jouve M, Asselain B, et al: Infiltrating lobular carcinoma of the breast. Clinicopathologic analysis of 975 cases with reference to data on conservative therapy and metastatic patterns. *Cancer* 77:113-20, 1996
43. Beresford MJ, Wilson GD, Makris A: Measuring proliferation in breast cancer: practicalities and applications. *Breast Cancer Res* 8:216, 2006
44. Lopez F, Belloc F, Lacombe F, et al: Modalities of synthesis of Ki67 antigen during the stimulation of lymphocytes. *Cytometry* 12:42-9, 1991
45. Colozza M, Azambuja E, Cardoso F, et al: Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now? *Ann Oncol* 16:1723-39, 2005
46. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G, Jr., et al: Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer* 96:1504-13, 2007
47. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, et al: Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast* 17:323-34, 2008
48. 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* 101:736-50, 2009
49. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, et al: Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol* 24:2206-23, 2013
50. Viale G, Giobbie-Hurder A, Regan MM, et al: Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki-67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from Breast International Group Trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole. *J Clin Oncol* 26:5569-75, 2008
51. Hugh J, Hanson J, Cheang MC, et al: Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *J Clin Oncol* 27:1168-76, 2009
52. Brandt J, Garne JP, Tengrup I, et al: Age at diagnosis in relation to survival following breast cancer: a cohort study. *World J Surg Oncol* 13:33, 2015
53. Fowble BL, Schultz DJ, Overmoyer B, et al: The influence of young age on outcome in early stage breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 30:23-33, 1994
54. Nixon AJ, Neuberger D, Hayes DF, et al: Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *J Clin Oncol* 12:888-94, 1994
55. Colleoni M, Rotmensz N, Robertson C, et al: Very young women (<35 years) with operable breast cancer: features of disease at presentation. *Ann Oncol* 13:273-9, 2002
56. Liedtke C, Rody A, Gluz O, et al: The prognostic impact of age in different molecular subtypes of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2015
57. Eley JW, Hill HA, Chen VW, et al: Racial differences in survival from breast cancer. Results of the National Cancer Institute Black/White Cancer Survival Study. *JAMA* 272:947-54, 1994
58. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, et al: Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA* 295:2492-502, 2006

Bibliografia

59. Kohler BA, Sherman RL, Howlader N, et al: Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2011, Featuring Incidence of Breast Cancer Subtypes by Race/Ethnicity, Poverty, and State. *J Natl Cancer Inst* 107:djv048, 2015
60. Slamon D, Eiermann W, Robert N, et al: Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 365:1273-83, 2011
61. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al: Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353:1659-72, 2005
62. Baselga J, Cortes J, Kim SB, et al: Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 366:109-19, 2012
63. Swain SM, Baselga J, Kim SB, et al: Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 372:724-34, 2015
64. Verma S, Miles D, Gianni L, et al: Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 367:1783-91, 2012
65. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, et al: Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 355:2733-43, 2006
66. Chan A, Delaloge S, Holmes FA, et al: Neratinib after trastuzumab-based adjuvant therapy in patients with HER2-positive breast cancer (ExteNET): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 17:367-77, 2016
67. Couse JF, Korach KS: Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 20:358-417, 1999
68. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, et al: Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5925-30, 1996
69. Law ML, Kao FT, Wei Q, et al: The progesterone receptor gene maps to human chromosome band 11q13, the site of the mammary oncogene int-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:2877-81, 1987
70. Anderson WF, Chatterjee N, Ershler WB, et al: Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Breast Cancer Res Treat* 76:27-36, 2002
71. Mohammed RH, Lakatua DJ, Haus E, et al: Estrogen and progesterone receptors in human breast cancer. Correlation with histologic subtype and degree of differentiation. *Cancer* 58:1076-81, 1986
72. Wong H, Lau S, Cheung P, et al: Lobular breast cancers lack the inverse relationship between ER/PR status and cell growth rate characteristic of ductal cancers in two independent patient cohorts: implications for tumor biology and adjuvant therapy. *BMC Cancer* 14:826, 2014
73. McGuire WL, Clark GM: Prognostic factors and treatment decisions in axillary-node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 326:1756-61, 1992
74. Viale G, Regan MM, Maiorano E, et al: Prognostic and predictive value of centrally reviewed expression of estrogen and progesterone receptors in a randomized trial comparing letrozole and tamoxifen adjuvant therapy for postmenopausal early breast cancer: BIG 1-98. *J Clin Oncol* 25:3846-52, 2007
75. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, et al: Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 11:155-68, 1998
76. Davies C, Godwin J, Gray R, et al: Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 378:771-84, 2011
77. Allevi G, Strina C, Andreis D, et al: Increased pathological complete response rate after a long-term neoadjuvant letrozole treatment in postmenopausal oestrogen and/or progesterone receptor-positive breast cancer. *Br J Cancer* 108:1587-92, 2013

78. Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, et al: Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol* 21:1973-9, 2003
79. Ring A, Dowsett M: Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocr Relat Cancer* 11:643-58, 2004
80. Yamnik RL, Holz MK: mTOR/S6K1 and MAPK/RSK signaling pathways coordinately regulate estrogen receptor alpha serine 167 phosphorylation. *FEBS Lett* 584:124-8, 2010
81. Yamnik RL, Digilova A, Davis DC, et al: S6 kinase 1 regulates estrogen receptor alpha in control of breast cancer cell proliferation. *J Biol Chem* 284:6361-9, 2009
82. Peto R, Davies C, Godwin J, et al: Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet* 379:432-44, 2012
83. Paik S, Tang G, Shak S, et al: Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 24:3726-34, 2006
84. Albain KS, Barlow WE, Shak S, et al: Prognostic and predictive value of the 21-gene recurrence score assay in postmenopausal women with node-positive, oestrogen-receptor-positive breast cancer on chemotherapy: a retrospective analysis of a randomised trial. *Lancet Oncol* 11:55-65, 2010
85. Zhang X, Gureasko J, Shen K, et al: An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* 125:1137-49, 2006
86. Klapper LN, Glathe S, Vaisman N, et al: The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4995-5000, 1999
87. Garrett TP, McKern NM, Lou M, et al: Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell* 110:763-73, 2002
88. Tzahar E, Waterman H, Chen X, et al: A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 16:5276-87, 1996
89. Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, et al: The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* 312:513-6, 1984
90. Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, et al: Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* 319:230-4, 1986
91. Bartlett JM, Ellis IO, Dowsett M, et al: Human epidermal growth factor receptor 2 status correlates with lymph node involvement in patients with estrogen receptor (ER) negative, but with grade in those with ER-positive early-stage breast cancer suitable for cytotoxic chemotherapy. *J Clin Oncol* 25:4423-30, 2007
92. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al: Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244:707-12, 1989
93. Olsen KE, Knudsen H, Rasmussen BB, et al: Amplification of HER2 and TOP2A and deletion of TOP2A genes in breast cancer investigated by new FISH probes. *Acta Oncol* 43:35-42, 2004
94. Ross JS, Fletcher JA, Bloom KJ, et al: Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein. *Mol Cell Proteomics* 3:379-98, 2004
95. Jarvinen TA, Kononen J, Pelto-Huikko M, et al: Expression of topoisomerase IIalpha is associated with rapid cell proliferation, aneuploidy, and c-erbB2 overexpression in breast cancer. *Am J Pathol* 148:2073-82, 1996

Bibliografia

96. Bartlett JM, Campbell FM, Mallon EA: Determination of HER2 amplification by in situ hybridization: when should chromosome 17 also be determined? *Am J Clin Pathol* 130:920-6, 2008
97. Toikkanen S, Helin H, Isola J, et al: Prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression in breast cancer: a 30-year follow-up. *J Clin Oncol* 10:1044-8, 1992
98. Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, et al: HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *J Clin Oncol* 7:1120-8, 1989
99. Press MF, Bernstein L, Thomas PA, et al: HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J Clin Oncol* 15:2894-904, 1997
100. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al: Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235:177-82, 1987
101. 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* 344:783-92, 2001
102. Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al: Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353:1673-84, 2005
103. Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, et al: Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (the NOAH trial): a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *Lancet* 375:377-84, 2010
104. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, et al: Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 10:1049-56, 1992
105. Ellis MJ, Tao Y, Young O, et al: Estrogen-independent proliferation is present in estrogen-receptor HER2-positive primary breast cancer after neoadjuvant letrozole. *J Clin Oncol* 24:3019-25, 2006
106. Hayes DF, Thor AD, Dressler LG, et al: HER2 and response to paclitaxel in node-positive breast cancer. *N Engl J Med* 357:1496-506, 2007
107. Del Mastro L, Bruzzi P, Nicolo G, et al: HER2 expression and efficacy of dose-dense anthracycline-containing adjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Br J Cancer* 93:7-14, 2005
108. Muss HB, Thor AD, Berry DA, et al: c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med* 330:1260-6, 1994
109. Prat A, Perou CM: Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol* 5:5-23, 2011
110. Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, et al: Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 14:1675-80, 1996
111. Schena M, Shalon D, Davis RW, et al: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270:467-70, 1995
112. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, et al: A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 347:1999-2009, 2002
113. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al: Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406:747-52, 2000
114. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al: Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10869-74, 2001
115. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, et al: Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol* 8:R76, 2007

116. Prat A, Parker JS, Karginova O, et al: Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 12:R68, 2010
117. Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, et al: Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol* 23:7350-60, 2005
118. Sotiriou C, Pusztai L: Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med* 360:790-800, 2009
119. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, et al: Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 27:1160-7, 2009
120. Paik S, Shak S, Tang G, et al: A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 351:2817-26, 2004
121. Sparano JA, Paik S: Development of the 21-gene assay and its application in clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol* 26:721-8, 2008
122. Ramsey SD, Barlow WE, Gonzalez-Angulo AM, et al: Integrating comparative effectiveness design elements and endpoints into a phase III, randomized clinical trial (SWOG S1007) evaluating oncotypedX-guided management for women with breast cancer involving lymph nodes. *Contemp Clin Trials* 34:1-9, 2013
123. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, et al: Prospective Validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med* 373:2005-14, 2015
124. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al: Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415:530-6, 2002
125. Buyse M, Loi S, van't Veer L, et al: Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 98:1183-92, 2006
126. Mook S, Schmidt MK, Viale G, et al: The 70-gene prognosis-signature predicts disease outcome in breast cancer patients with 1-3 positive lymph nodes in an independent validation study. *Breast Cancer Res Treat* 116:295-302, 2009
127. Bogaerts J, Cardoso F, Buyse M, et al: Gene signature evaluation as a prognostic tool: challenges in the design of the MINDACT trial. *Nat Clin Pract Oncol* 3:540-51, 2006
128. Martine Piccart ER, Laura van' t Veer et al. : Primary analysis of the EORTC 10041/BIG 3-04 MINDACT study: a prospective, randomized study evaluating the clinical utility of the 70-gene signature (MammaPrint) combined with common clinical-pathological criteria for selection of patients for adjuvant chemotherapy in breast cancer with 0 to 3 positive nodes. *AACR Annual Meeting 2016*, 2016
129. Hess KR, Anderson K, Symmans WF, et al: Pharmacogenomic predictor of sensitivity to preoperative chemotherapy with paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide in breast cancer. *J Clin Oncol* 24:4236-44, 2006
130. Lee JK, Coutant C, Kim YC, et al: Prospective comparison of clinical and genomic multivariate predictors of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Clin Cancer Res* 16:711-8, 2010
131. Popovici V, Chen W, Gallas BG, et al: Effect of training-sample size and classification difficulty on the accuracy of genomic predictors. *Breast Cancer Res* 12:R5, 2010
132. Harris JR, Lippman ME, Morrow M, et al: Diseases of the breast. 1:1174, 2010
133. De Lena M, Zucali R, Viganotti G, et al: Combined chemotherapy-radiotherapy approach in locally advanced (T3b-T4) breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 1:53-9, 1978
134. Bonadonna G, Valagussa P, Brambilla C, et al: Primary chemotherapy in operable breast cancer: eight-year experience at the Milan Cancer Institute. *J Clin Oncol* 16:93-100, 1998
135. Bonadonna G, Valagussa P, Brambilla C, et al: Preoperative chemotherapy in operable breast cancer. *Lancet* 341:1485, 1993

Bibliografia

136. Cameron DA, Anderson ED, Levack P, et al: Primary systemic therapy for operable breast cancer--10-year survival data after chemotherapy and hormone therapy. *Br J Cancer* 76:1099-105, 1997
137. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, et al: Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 26:1275-81, 2008
138. Mieog JS, van der Hage JA, van de Velde CJ: Preoperative chemotherapy for women with operable breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev*:CD005002, 2007
139. Perloff M, Lesnick GJ, Korzun A, et al: Combination chemotherapy with mastectomy or radiotherapy for stage III breast carcinoma: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 6:261-9, 1988
140. Green MC, Buzdar AU, 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* 23:5983-92, 2005
141. Bear HD, Anderson S, Smith RE, et al: Sequential preoperative or postoperative docetaxel added to preoperative doxorubicin plus cyclophosphamide for operable breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol* 24:2019-27, 2006
142. Evans TR, Yellowlees A, Foster E, et al: Phase III randomized trial of doxorubicin and docetaxel versus doxorubicin and cyclophosphamide as primary medical therapy in women with breast cancer: an anglo-celtic cooperative oncology group study. *J Clin Oncol* 23:2988-95, 2005
143. Buzdar AU, Singletary SE, Theriault RL, et al: Prospective evaluation of paclitaxel versus combination chemotherapy with fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide as neoadjuvant therapy in patients with operable breast cancer. *J Clin Oncol* 17:3412-7, 1999
144. Perou CM, Parker JS, Prat A, et al: Clinical implementation of the intrinsic subtypes of breast cancer. *Lancet Oncol* 11:718-9; author reply 720-1, 2010
145. Usary J, Zhao W, Darr D, et al: Predicting drug responsiveness in human cancers using genetically engineered mice. *Clin Cancer Res* 19:4889-99, 2013
146. de Azambuja E, Holmes AP, Piccart-Gebhart M, et al: Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTT0): survival outcomes of a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial and their association with pathological complete response. *Lancet Oncol* 15:1137-46, 2014
147. Gianni L, Pienkowski T, Im YH, et al: Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 13:25-32, 2012
148. Kaufmann M, Hortobagyi GN, Goldhirsch A, et al: Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: an update. *J Clin Oncol* 24:1940-9, 2006
149. 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* 17:460-9, 1999
150. ClinicalTrials.gov. Neoadjuvant Trials and Breast Cancer; [cited 2015 September 30]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=Neoadjuvant+trials+AND+breast+cancer&Search=Search>.
151. FDA. Pertuzumab approval; [cited 2015 September 30]. Available from: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/applletter/2013/125409Orig1s051_corrected_ltr.pdf.
152. Schneeweiss A, Chia S, Hickish T, et al: Pertuzumab plus trastuzumab in combination with standard neoadjuvant anthracycline-containing and anthracycline-free chemotherapy

- regimens in patients with HER2-positive early breast cancer: a randomized phase II cardiac safety study (TRYPHAENA). *Ann Oncol* 24:2278-84, 2013
153. Cortazar P, Zhang L, Untch M, et al: Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet* 384:164-72, 2014
154. Esserman LJ, Berry DA, DeMichele A, et al: Pathologic complete response predicts recurrence-free survival more effectively by cancer subset: results from the I-SPY 1 TRIAL--CALGB 150007/150012, ACRIN 6657. *J Clin Oncol* 30:3242-9, 2012
155. von Minckwitz G, 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* 30:1796-804, 2012
156. 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* 28:2024-31, 2010
157. Untch M, Fasching PA, Konecny GE, et al: Pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy plus trastuzumab predicts favorable survival in human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer: results from the TECHNO trial of the AGO and GBG study groups. *J Clin Oncol* 29:3351-7, 2011
158. Carey LA, Winer EP: Defining success in neoadjuvant breast cancer trials. *Lancet* 384:115-6, 2014
159. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, et al: Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 56:185-229, 2004
160. Chaires JB, Satyanarayana S, Suh D, et al: Parsing the free energy of anthracycline antibiotic binding to DNA. *Biochemistry* 35:2047-53, 1996
161. Zunino F, Capranico G: DNA topoisomerase II as the primary target of anti-tumor anthracyclines. *Anticancer Drug Des* 5:307-17, 1990
162. Gewirtz DA: A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 57:727-41, 1999
163. Wolff AC, Blackford AL, Visvanathan K, et al: Risk of marrow neoplasms after adjuvant breast cancer therapy: the national comprehensive cancer network experience. *J Clin Oncol* 33:340-8, 2015
164. Gianni L, Herman EH, Lipshultz SE, et al: Anthracycline cardiotoxicity: from bench to bedside. *J Clin Oncol* 26:3777-84, 2008
165. Pritchard KI, Shepherd LE, O'Malley FP, et al: HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 354:2103-11, 2006
166. Watters AD, Going JJ, Cooke TG, et al: Chromosome 17 aneusomy is associated with poor prognostic factors in invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 77:109-14, 2003
167. Corzo C, Bellosillo B, Corominas JM, et al: Does polysomy of chromosome 17 have a role in ERBB2 and topoisomerase IIalpha expression? Gene, mRNA and protein expression: a comprehensive analysis. *Tumour Biol* 28:221-8, 2007
168. Popescu NC, King CR, Kraus MH: Localization of the human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosomes 17 to bands q12-21.32. *Genomics* 4:362-6, 1989
169. Perez EA, Romond EH, Suman VJ, et al: Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: planned joint analysis of overall survival from NSABP B-31 and NCCTG N9831. *J Clin Oncol* 32:3744-52, 2014
170. Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, et al: Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med* 354:809-20, 2006
171. Dhesy-Thind B, Pritchard KI, Messersmith H, et al: HER2/neu in systemic therapy for women with breast cancer: a systematic review. *Breast Cancer Res Treat* 109:209-29, 2008

Bibliografia

172. Di Leo A, Desmedt C, Bartlett JM, et al: HER2 and TOP2A as predictive markers for anthracycline-containing chemotherapy regimens as adjuvant treatment of breast cancer: a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 12:1134-42, 2011
173. Paik S, Bryant J, Park C, et al: erbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 90:1361-70, 1998
174. Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, et al: HER2 and choice of adjuvant chemotherapy for invasive breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-15. *J Natl Cancer Inst* 92:1991-8, 2000
175. Levine MN, Pritchard KI, Bramwell VH, et al: Randomized trial comparing cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in premenopausal women with node-positive breast cancer: update of National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Trial MA5. *J Clin Oncol* 23:5166-70, 2005
176. Colozza M, Bisagni G, Mosconi AM, et al: Epirubicin versus CMF as adjuvant therapy for stage I and II breast cancer: a prospective randomised study. *Eur J Cancer* 38:2279-88, 2002
177. Knoop AS, Knudsen H, Balslev E, et al: Retrospective analysis of topoisomerase IIa amplifications and deletions as predictive markers in primary breast cancer patients randomly assigned to cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil or cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil: Danish Breast Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol* 23:7483-90, 2005
178. Moliterni A, Menard S, Valagussa P, et al: HER2 overexpression and doxorubicin in adjuvant chemotherapy for resectable breast cancer. *J Clin Oncol* 21:458-62, 2003
179. Fisher B, Redmond C, Wickerham DL, et al: Doxorubicin-containing regimens for the treatment of stage II breast cancer: The National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *J Clin Oncol* 7:572-82, 1989
180. Fisher B, Brown AM, Dimitrov NV, et al: Two months of doxorubicin-cyclophosphamide with and without interval reinduction therapy compared with 6 months of cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in positive-node breast cancer patients with tamoxifen-nonresponsive tumors: results from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-15. *J Clin Oncol* 8:1483-96, 1990
181. Colozza M, Sidoni A, Mosconi AM, et al: HER2 overexpression as a predictive marker in a randomized trial comparing adjuvant cyclophosphamide/methotrexate/5-fluorouracil with epirubicin in patients with stage I/II breast cancer: long-term results. *Clin Breast Cancer* 6:253-9, 2005
182. Di Leo A, Gancberg D, Larsimont D, et al: HER-2 amplification and topoisomerase IIalpha gene aberrations as predictive markers in node-positive breast cancer patients randomly treated either with an anthracycline-based therapy or with cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 8:1107-16, 2002
183. Di Leo A, Larsimont D, Gancberg D, et al: HER-2 and topo-isomerase IIalpha as predictive markers in a population of node-positive breast cancer patients randomly treated with adjuvant CMF or epirubicin plus cyclophosphamide. *Ann Oncol* 12:1081-9, 2001
184. Bartlett JM, Munro AF, Dunn JA, et al: Predictive markers of anthracycline benefit: a prospectively planned analysis of the UK National Epirubicin Adjuvant Trial (NEAT/BR9601). *Lancet Oncol* 11:266-74, 2010
185. De Placido S, Perrone F, Carlomagno C, et al: CMF vs alternating CMF/EV in the adjuvant treatment of operable breast cancer. A single centre randomised clinical trial (Naples GUN-3 study). *Br J Cancer* 71:1283-7, 1995
186. Tibau A, Lopez-Vilaro L, Perez-Olabarria M, et al: Chromosome 17 centromere duplication and responsiveness to anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Neoplasia* 16:861-7, 2014

187. Tubbs R, Barlow WE, Budd GT, et al: Outcome of patients with early-stage breast cancer treated with doxorubicin-based adjuvant chemotherapy as a function of HER2 and TOP2A status. *J Clin Oncol* 27:3881-6, 2009
188. Di Leo A, Chan S, Paesmans M, et al: HER-2/neu as a predictive marker in a population of advanced breast cancer patients randomly treated either with single-agent doxorubicin or single-agent docetaxel. *Breast Cancer Res Treat* 86:197-206, 2004
189. Di Leo A, Moretti E: Anthracyclines: the first generation of cytotoxic targeted agents? A possible dream. *J Clin Oncol* 26:5011-3, 2008
190. Pritchard KI, Messersmith H, Elavathil L, et al: HER-2 and topoisomerase II as predictors of response to chemotherapy. *J Clin Oncol* 26:736-44, 2008
191. Bartlett JM, Munro A, Cameron DA, et al: Type 1 receptor tyrosine kinase profiles identify patients with enhanced benefit from anthracyclines in the BR9601 adjuvant breast cancer chemotherapy trial. *J Clin Oncol* 26:5027-35, 2008
192. Pegram MD, Finn RS, Arzoo K, et al: The effect of HER-2/neu overexpression on chemotherapeutic drug sensitivity in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene* 15:537-47, 1997
193. Orr MS, O'Connor PM, Kohn KW: Effects of c-erbB2 overexpression on the drug sensitivities of normal human mammary epithelial cells. *J Natl Cancer Inst* 92:987-94, 2000
194. Schoeffler AJ, Berger JM: DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology. *Q Rev Biophys* 41:41-101, 2008
195. Jarvinen TA, Liu ET: HER-2/neu and topoisomerase IIalpha in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 78:299-311, 2003
196. Withoff S, Keith WN, Knol AJ, et al: Selection of a subpopulation with fewer DNA topoisomerase II alpha gene copies in a doxorubicin-resistant cell line panel. *Br J Cancer* 74:502-7, 1996
197. Jarvinen TA, Tanner M, Rantanen V, et al: Amplification and deletion of topoisomerase IIalpha associate with ErbB-2 amplification and affect sensitivity to topoisomerase II inhibitor doxorubicin in breast cancer. *Am J Pathol* 156:839-47, 2000
198. Jarvinen TA, Tanner M, Barlund M, et al: Characterization of topoisomerase II alpha gene amplification and deletion in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 26:142-50, 1999
199. Cardoso F, Durbecq V, Larsimont D, et al: Correlation between complete response to anthracycline-based chemotherapy and topoisomerase II-alpha gene amplification and protein overexpression in locally advanced/metastatic breast cancer. *Int J Oncol* 24:201-9, 2004
200. Durbecq V, Desmed C, Paesmans M, et al: Correlation between topoisomerase-IIalpha gene amplification and protein expression in HER-2 amplified breast cancer. *Int J Oncol* 25:1473-9, 2004
201. Park K, Kim J, Lim S, et al: Topoisomerase II-alpha (topoII) and HER2 amplification in breast cancers and response to preoperative doxorubicin chemotherapy. *Eur J Cancer* 39:631-4, 2003
202. Hicks DG, Yoder BJ, Pettay J, et al: The incidence of topoisomerase II-alpha genomic alterations in adenocarcinoma of the breast and their relationship to human epidermal growth factor receptor-2 gene amplification: a fluorescence in situ hybridization study. *Hum Pathol* 36:348-56, 2005
203. O'Malley FP, Chia S, Tu D, et al: Topoisomerase II alpha and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 101:644-50, 2009
204. Tanner M, Isola J, Wiklund T, et al: Topoisomerase IIalpha gene amplification predicts favorable treatment response to tailored and dose-escalated anthracycline-based adjuvant chemotherapy in HER-2/neu-amplified breast cancer: Scandinavian Breast Group Trial 9401. *J Clin Oncol* 24:2428-36, 2006

Bibliografia

205. Press MF, Sauter G, Buyse M, et al: Alteration of topoisomerase II-alpha gene in human breast cancer: association with responsiveness to anthracycline-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 29:859-67, 2011
206. Bhat UG, Raychaudhuri P, Beck WT: Functional interaction between human topoisomerase IIalpha and retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7859-64, 1999
207. Levine MN, Bramwell VH, Pritchard KI, et al: Randomized trial of intensive cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil chemotherapy compared with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in premenopausal women with node-positive breast cancer. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 16:2651-8, 1998
208. Piccart MJ, Di Leo A, Beauduin M, et al: Phase III trial comparing two dose levels of epirubicin combined with cyclophosphamide with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in node-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 19:3103-10, 2001
209. Ejlertsen B, Mouridsen HT, Jensen MB, et al: Improved outcome from substituting methotrexate with epirubicin: results from a randomised comparison of CMF versus CEF in patients with primary breast cancer. *Eur J Cancer* 43:877-84, 2007
210. Poole CJ, Earl HM, Hiller L, et al: Epirubicin and cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil as adjuvant therapy for early breast cancer. *N Engl J Med* 355:1851-62, 2006
211. Bidard FC, Matthieu MC, Chollet P, et al: p53 status and efficacy of primary anthracyclines/alkylating agent-based regimen according to breast cancer molecular classes. *Ann Oncol* 19:1261-5, 2008
212. Fedier A, Steiner RA, Schwarz VA, et al: The effect of loss of Brca1 on the sensitivity to anticancer agents in p53-deficient cells. *Int J Oncol* 22:1169-73, 2003
213. Pritchard KI, Munro A, O'Malley FP, et al: Chromosome 17 centromere (CEP17) duplication as a predictor of anthracycline response: evidence from the NCIC Clinical Trials Group (NCIC CTG) MA.5 Trial. *Breast Cancer Res Treat* 131:541-51, 2012
214. Yeh IT, Martin MA, Robetorye RS, et al: Clinical validation of an array CGH test for HER2 status in breast cancer reveals that polysomy 17 is a rare event. *Mod Pathol* 22:1169-75, 2009
215. Marchio C, Lambros MB, Gugliotta P, et al: Does chromosome 17 centromere copy number predict polysomy in breast cancer? A fluorescence in situ hybridization and microarray-based CGH analysis. *J Pathol* 219:16-24, 2009
216. Fraser JA, Reeves JR, Stanton PD, et al: A role for BRCA1 in sporadic breast cancer. *Br J Cancer* 88:1263-70, 2003
217. Fraser M, Leung BM, Yan X, et al: p53 is a determinant of X-linked inhibitor of apoptosis protein/Akt-mediated chemoresistance in human ovarian cancer cells. *Cancer Res* 63:7081-8, 2003
218. Olivier M, Petitjean A, Marcel V, et al: Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. *Cancer Gene Ther* 16:1-12, 2009
219. Greenberg RA: Recognition of DNA double strand breaks by the BRCA1 tumor suppressor network. *Chromosoma* 117:305-17, 2008
220. Arriola E, Marchio C, Tan DS, et al: Genomic analysis of the HER2/TOP2A amplicon in breast cancer and breast cancer cell lines. *Lab Invest* 88:491-503, 2008
221. Chin SF, Wang Y, Thorne NP, et al: Using array-comparative genomic hybridization to define molecular portraits of primary breast cancers. *Oncogene* 26:1959-70, 2007
222. Fridlyand J, Snijders AM, Ylstra B, et al: Breast tumor copy number aberration phenotypes and genomic instability. *BMC Cancer* 6:96, 2006
223. Munro AF, Cameron DA, Bartlett JM: Targeting anthracyclines in early breast cancer: new candidate predictive biomarkers emerge. *Oncogene* 29:5231-40, 2010

224. Bartlett JM, McConkey CC, Munro AF, et al: Predicting Anthracycline Benefit: TOP2A and CEP17-Not Only but Also. *J Clin Oncol* 33:1680-7, 2015
225. Nogales E: Structural insight into microtubule function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 30:397-420, 2001
226. Tilney LG, Bryan J, Bush DJ, et al: Microtubules: evidence for 13 protofilaments. *J Cell Biol* 59:267-75, 1973
227. Burton PR, Himes RH: Electron microscope studies of pH effects on assembly of tubulin free of associated proteins. Delineation of substructure by tannic acid staining. *J Cell Biol* 77:120-33, 1978
228. Eichenlaub-Ritter U, Tucker JB: Microtubules with more than 13 protofilaments in the dividing nuclei of ciliates. *Nature* 307:60-2, 1984
229. Mogensen MM, Tucker JB, Stebbings H: Microtubule polarities indicate that nucleation and capture of microtubules occurs at cell surfaces in *Drosophila*. *J Cell Biol* 108:1445-52, 1989
230. Waterman-Storer CM, Salmon ED: Microtubule dynamics: treadmilling comes around again. *Curr Biol* 7:R369-72, 1997
231. Perez EA: Microtubule inhibitors: Differentiating tubulin-inhibiting agents based on mechanisms of action, clinical activity, and resistance. *Mol Cancer Ther* 8:2086-95, 2009
232. Akhmanova A, Steinmetz MO: Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:309-22, 2008
233. Kirschner MW, Mitchison T: Microtubule dynamics. *Nature* 324:621, 1986
234. Jordan MA, Wilson L: Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 4:253-65, 2004
235. Al-Bassam J, Ozer RS, Safer D, et al: MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments. *J Cell Biol* 157:1187-96, 2002
236. Fromes Y, Gounon P, Veitia R, et al: Influence of microtubule-associated proteins on the differential effects of paclitaxel and docetaxel. *J Protein Chem* 15:377-88, 1996
237. Itoh TJ, Hotani H: Microtubule-stabilizing activity of microtubule-associated proteins (MAPs) is due to increase in frequency of rescue in dynamic instability: shortening length decreases with binding of MAPs onto microtubules. *Cell Struct Funct* 19:279-90, 1994
238. Sullivan KF: Structure and utilization of tubulin isotypes. *Annu Rev Cell Biol* 4:687-716, 1988
239. Burns RG, SurrIDGE C: Analysis of beta-tubulin sequences reveals highly conserved, coordinated amino acid substitutions. Evidence that these 'hot spots' are directly involved in the conformational change required for dynamic instability. *FEBS Lett* 271:1-8, 1990
240. Sullivan KF, Cleveland DW: Identification of conserved isotype-defining variable region sequences for four vertebrate beta tubulin polypeptide classes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4327-31, 1986
241. Luduena RF: Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int Rev Cytol* 178:207-75, 1998
242. Mollinedo F, Gajate C: Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis* 8:413-50, 2003
243. Dozier JH, Hiser L, Davis JA, et al: Beta class II tubulin predominates in normal and tumor breast tissues. *Breast Cancer Res* 5:R157-69, 2003
244. Amos LA, Lowe J: How Taxol stabilises microtubule structure. *Chem Biol* 6:R65-9, 1999
245. Schiff PB, Horwitz SB: Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:1561-5, 1980
246. Wilson L, Jordan MA: Microtubule dynamics: taking aim at a moving target. *Chem Biol* 2:569-73, 1995

Bibliografia

247. Jordan MA, Toso RJ, Thrower D, et al: Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9552-6, 1993
248. Jordan MA, Wendell K, Gardiner S, et al: Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Res* 56:816-25, 1996
249. De Laurentiis M, Canello G, D'Agostino D, et al: Taxane-based combinations as adjuvant chemotherapy of early breast cancer: a meta-analysis of randomized trials. *J Clin Oncol* 26:44-53, 2008
250. Bhat KM, Setaluri V: Microtubule-associated proteins as targets in cancer chemotherapy. *Clin Cancer Res* 13:2849-54, 2007
251. Rouzier R, Rajan R, Wagner P, et al: Microtubule-associated protein tau: a marker of paclitaxel sensitivity in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:8315-20, 2005
252. Wagner P, Wang B, Clark E, et al: Microtubule Associated Protein (MAP)-Tau: a novel mediator of paclitaxel sensitivity in vitro and in vivo. *Cell Cycle* 4:1149-52, 2005
253. Andre F, Hatzis C, Anderson K, et al: Microtubule-associated protein-tau is a bifunctional predictor of endocrine sensitivity and chemotherapy resistance in estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 13:2061-7, 2007
254. Tanaka S, Nohara T, Iwamoto M, et al: Tau expression and efficacy of paclitaxel treatment in metastatic breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 64:341-6, 2009
255. Shao YY, Kuo KT, Hu FC, et al: Predictive and prognostic values of tau and ERCC1 in advanced breast cancer patients treated with paclitaxel and cisplatin. *Jpn J Clin Oncol* 40:286-93, 2010
256. Mimori K, Sadanaga N, Yoshikawa Y, et al: Reduced tau expression in gastric cancer can identify candidates for successful Paclitaxel treatment. *Br J Cancer* 94:1894-7, 2006
257. Pentheroudakis G, Kalogeris KT, Wirtz RM, et al: Gene expression of estrogen receptor, progesterone receptor and microtubule-associated protein Tau in high-risk early breast cancer: a quest for molecular predictors of treatment benefit in the context of a Hellenic Cooperative Oncology Group trial. *Breast Cancer Res Treat* 116:131-43, 2009
258. Puzstai L, Jeong JH, Gong Y, et al: Evaluation of microtubule-associated protein-Tau expression as a prognostic and predictive marker in the NSABP-B 28 randomized clinical trial. *J Clin Oncol* 27:4287-92, 2009
259. Galmarini CM, Treilleux I, Cardoso F, et al: Class III beta-tubulin isotype predicts response in advanced breast cancer patients randomly treated either with single-agent doxorubicin or docetaxel. *Clin Cancer Res* 14:4511-6, 2008
260. Burkhart CA, Kavallaris M, Band Horwitz S: The role of beta-tubulin isotypes in resistance to antimetabolic drugs. *Biochim Biophys Acta* 1471:O1-9, 2001
261. Kavallaris M, Kuo DY, Burkhart CA, et al: Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isotypes. *J Clin Invest* 100:1282-93, 1997
262. Ferlini C, Cicchillitti L, Raspaglio G, et al: Paclitaxel directly binds to Bcl-2 and functionally mimics activity of Nur77. *Cancer Res* 69:6906-14, 2009
263. Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, et al: A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:1858-62, 1975
264. Robert M, Mathuranath PS: Tau and tauopathies. *Neurol India* 55:11-6, 2007
265. Ramachandran G, Udgaonkar JB: Mechanistic studies unravel the complexity inherent in tau aggregation leading to Alzheimer's disease and the tauopathies. *Biochemistry* 52:4107-26, 2013
266. Kopke E, Tung YC, Shaikh S, et al: Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 268:24374-84, 1993

267. Rosenberg KJ, Ross JL, Feinstein HE, et al: Complementary dimerization of microtubule-associated tau protein: Implications for microtubule bundling and tau-mediated pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:7445-50, 2008
268. Choi MC, Raviv U, Miller HP, et al: Human microtubule-associated-protein tau regulates the number of protofilaments in microtubules: a synchrotron x-ray scattering study. *Biophys J* 97:519-27, 2009
269. Dye RB, Fink SP, Williams RC, Jr.: Taxol-induced flexibility of microtubules and its reversal by MAP-2 and Tau. *J Biol Chem* 268:6847-50, 1993
270. Kar S, Fan J, Smith MJ, et al: Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol. *EMBO J* 22:70-7, 2003
271. Rody A, Karn T, Gatje R, et al: Gene expression profiling of breast cancer patients treated with docetaxel, doxorubicin, and cyclophosphamide within the GEPARTRIO trial: HER-2, but not topoisomerase II alpha and microtubule-associated protein tau, is highly predictive of tumor response. *Breast* 16:86-93, 2007
272. West M, Blanchette C, Dressman H, et al: Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11462-7, 2001
273. Ferreira A, Caceres A: Estrogen-enhanced neurite growth: evidence for a selective induction of Tau and stable microtubules. *J Neurosci* 11:392-400, 1991
274. Lew GM: Changes in microtubular tau protein after estrogen in a cultured human neuroblastoma cell line. *Gen Pharmacol* 24:1383-6, 1993
275. Frasor J, Stossi F, Danes JM, et al: Selective estrogen receptor modulators: discrimination of agonistic versus antagonistic activities by gene expression profiling in breast cancer cells. *Cancer Res* 64:1522-33, 2004
276. Kavallaris M, Burkhart CA, Horwitz SB: Antisense oligonucleotides to class III beta-tubulin sensitize drug-resistant cells to Taxol. *Br J Cancer* 80:1020-5, 1999
277. Seve P, Reiman T, Lai R, et al: Class III beta-tubulin is a marker of paclitaxel resistance in carcinomas of unknown primary site. *Cancer Chemother Pharmacol* 60:27-34, 2007
278. Seve P, Reiman T, Isaac S, et al: Protein abundance of class III beta-tubulin but not Delta2-alpha-tubulin or tau is related to paclitaxel response in carcinomas of unknown primary site. *Anticancer Res* 28:1161-7, 2008
279. Ferrandina G, Zannoni GF, Martinelli E, et al: Class III beta-tubulin overexpression is a marker of poor clinical outcome in advanced ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 12:2774-9, 2006
280. Seve P, Lai R, Ding K, et al: Class III beta-tubulin expression and benefit from adjuvant cisplatin/vinorelbine chemotherapy in operable non-small cell lung cancer: analysis of NCIC JBR.10. *Clin Cancer Res* 13:994-9, 2007
281. Bernard-Marty C, Treilleux I, Dumontet C, et al: Microtubule-associated parameters as predictive markers of docetaxel activity in advanced breast cancer patients: results of a pilot study. *Clin Breast Cancer* 3:341-5, 2002
282. Rosell R, Scagliotti G, Danenberg KD, et al: Transcripts in pretreatment biopsies from a three-arm randomized trial in metastatic non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 22:3548-53, 2003
283. Paradiso A, Mangia A, Chiriatti A, et al: Biomarkers predictive for clinical efficacy of taxol-based chemotherapy in advanced breast cancer. *Ann Oncol* 16 Suppl 4:iv14-19, 2005
284. Seve P, Mackey J, Isaac S, et al: Class III beta-tubulin expression in tumor cells predicts response and outcome in patients with non-small cell lung cancer receiving paclitaxel. *Mol Cancer Ther* 4:2001-7, 2005
285. Saura C, Tseng LM, Chan S, et al: Neoadjuvant doxorubicin/cyclophosphamide followed by ixabepilone or paclitaxel in early stage breast cancer and evaluation of betaIII-tubulin expression as a predictive marker. *Oncologist* 18:787-94, 2013

Bibliografia

286. Aoki D, Oda Y, Hattori S, et al: Overexpression of class III beta-tubulin predicts good response to taxane-based chemotherapy in ovarian clear cell adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 15:1473-80, 2009
287. Sobin L GM, Wittekind C. : TNM Classification of Malignant Tumours. Seveth Edition. Wiley-Blackwell, 2010.
288. Jaffe CC: Measures of response: RECIST, WHO, and new alternatives. *J Clin Oncol* 24:3245-51, 2006
289. Khatcheressian JL, Wolff AC, Smith TJ, et al: American Society of Clinical Oncology 2006 update of the breast cancer follow-up and management guidelines in the adjuvant setting. *J Clin Oncol* 24:5091-7, 2006
290. Steger GG, Greil R, Lang A, et al: Epirubicin and docetaxel with or without capecitabine as neoadjuvant treatment for early breast cancer: final results of a randomized phase III study (ABCSG-24). *Ann Oncol* 25:366-71, 2014
291. 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* 28:2784-95, 2010
292. 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. *Arch Pathol Lab Med* 131:18-43, 2007
293. Prat A, Cheang MC, Martin M, et al: Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. *J Clin Oncol* 31:203-9, 2013
294. Hannemann J, Kristel P, van Tinteren H, et al: Molecular subtypes of breast cancer and amplification of topoisomerase II alpha: predictive role in dose intensive adjuvant chemotherapy. *Br J Cancer* 95:1334-41, 2006
295. Sauter G, Lee J, Bartlett JM, et al: Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol* 27:1323-33, 2009
296. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, et al: REporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies (REMARK). *Breast Cancer Res Treat* 100:229-35, 2006
297. Reinholz MM, Bruzek AK, Visscher DW, et al: Breast cancer and aneusomy 17: implications for carcinogenesis and therapeutic response. *Lancet Oncol* 10:267-77, 2009
298. Zody MC, Garber M, Adams DJ, et al: DNA sequence of human chromosome 17 and analysis of rearrangement in the human lineage. *Nature* 440:1045-9, 2006
299. Orsetti B, Nugoli M, Cervera N, et al: Genomic and expression profiling of chromosome 17 in breast cancer reveals complex patterns of alterations and novel candidate genes. *Cancer Res* 64:6453-60, 2004
300. Desmedt C, Di Leo A, de Azambuja E, et al: Multifactorial approach to predicting resistance to anthracyclines. *J Clin Oncol* 29:1578-86, 2011
301. Farmer P, Bonnefoi H, Anderle P, et al: A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nat Med* 15:68-74, 2009
302. Ejlertsen B, Jensen MB, Nielsen KV, et al: HER2, TOP2A, and TIMP-1 and responsiveness to adjuvant anthracycline-containing chemotherapy in high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol* 28:984-90, 2010
303. West NR, Milne K, Truong PT, et al: Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* 13:R126, 2011
304. Szentmartoni G, Tokes AM, Tokes T, et al: Morphological and pathological response in primary systemic therapy of patients with breast cancer and the prediction of disease free survival: a single center observational study. *Croat Med J* 57:131-9, 2016

305. Mougalian SS, Hernandez M, Lei X, et al: Ten-Year Outcomes of Patients With Breast Cancer With Cytologically Confirmed Axillary Lymph Node Metastases and Pathologic Complete Response After Primary Systemic Chemotherapy. *JAMA Oncol* 2:508-16, 2016
306. Baquero MT, Lostritto K, Gustavson MD, et al: Evaluation of prognostic and predictive value of microtubule associated protein tau in two independent cohorts. *Breast Cancer Res* 13:R85, 2011