

Caracterización genética de dos subtipos de tumores mamarios (ER+PR+ vs ER+PR-) mediante la técnica de CGH-array

Memoria presentada por
Alma Carracedo Marsiñach

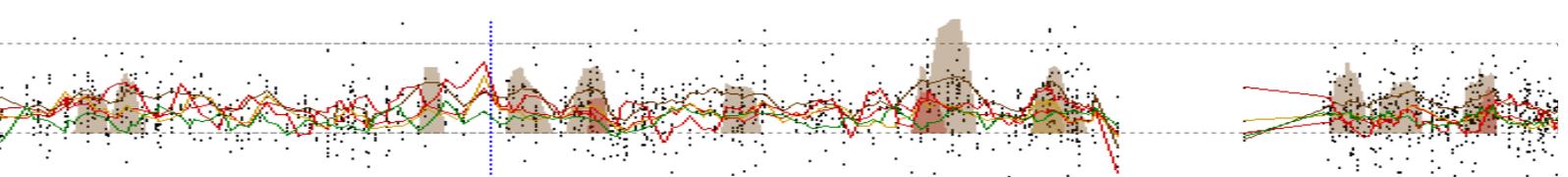
para optar al grado de
Doctora en Biología

Tesis realizada bajo la dirección del Dr. Francesc Solé Ristol (Laboratori de Citogenètica Molecular, Servei de Patologia, Hospital del Mar, Parc de Salut Mar, GRETNHE, IMIM) y la tutoría de la Dra. Maria Dolors Coll (Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona)

Dr. Francesc Solé Ristol

Alma Carracedo Marsiñach

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 2011



...Han pasado ya 6 añitos desde aquel día, en que por primera vez, y sin imaginarme lo que significaría aquel paso en mi vida, me ponía en contacto con el que ha sido y de alguna forma seguirá siendo mi jefe, es decir mi director de tesis, Francesc Solé...Kiko como solemos llamarle!, al que agradezco la oportunidad que me dio para llevar a cabo este proyecto.....creo que una parte de mi todavía no es realmente consciente de que ya esté por fin acabada! En realidad, me parece increíble!!!...sobretudo porque hace apenas unos meses...todavía me refería a ella como la historia interminable de mi vida!...y me provocaba algún que otro disgusto interno y momentos de desesperación.....estos días, cuando echo la vista atrás...bueno más bien la memoria...es emocionante!...son tantas las experiencias vividas!, las personas conocidas!...algunas...se quedaron por el camino...otras siguen acompañándome en algunos tramos....tantos buenos momentos!...de alegría, de viajes!, de ilusión, de entusiasmo, de compartir, de cariño, de comprensión, de aprendizaje científico, del alma y del corazón...de encuentros, de amistad!!! Y claro muchos otros...que te arrastraban hacia un camino algo distinto, momentos llenos de frustración, tristeza, enfado, incompreensión, disgusto, rabia...que a menudo hacían replantearse si querías seguir a delante con todo aquello, o si a pesar de todo tenías fuerzas para continuar!...menos mal que la ilusión, o lo que tantas veces habíamos oído los del ramo....la vocación y la ganas y tal vez más importante la vocecilla interna!...eran las que te daban un golpecito en la espalda y te animaban a seguir "palante"!...y es que en esos momentos algo durillos que en más de una ocasión te costaran alguna que otra llorera o alguna que otra noche de insomnio!...esa palmadita te mostraba la fuerza interna que te acompañaba día a día en ese proyecto de investigación...en esta tesis doctoral...a la que me gusta llamar...tesis de mi vida.....con ganas en estos momentos de dejarla atrás y a la vez con la gran emoción de sentir todo lo vivido durante este tiempo y ver que no podía haber sido de otra forma y dar las gracias por ello!...es mucho lo aprendido!..y muchos los recuerdos que me llevo en el corazón...y aunque me gustaría poder escribir un cachito de cada uno de ellos seguramente me supondrían unas cuantas hojas más de las ya presentes a continuación....y creo que con las que hay...que no son pocas!!!...hay más que suficiente!...

....tan sólo me queda agradecer a cada una de las personas que han pasado por mi vida estos añicos...y que han acabado formando parte de este trabajo!...y colaborado a que por fin lo haya terminado!....agradecer el apoyo, el cariño, las palabras de ánimo, la escucha comprensiva, las palmaditas en la espalda cuando el propio ánimo estaba algo desgastado, el venga! Que tú puedes!, o sencillamente el estar ahí y saber que podías contar con ellas...que no es poco!....así me gustaría dar un gran...Gracias!...a mis papás!, a mi hermana Miriam!, a Teresa, a quien consiero como una abuela...y a todas las personas que durante todo este tiempo de alguna forma u otra me tocaron el corazón y me ofrecieron y me siguen ofreciendo algo del suyo y en algunas ocasiones mucho más!....especialmente a Clara, Alba, Laura, Javier, Mar, Marta, Cristina, Maruja, Kristof, María José, Ramón, Gina, María, Miguel, Susana, Sergi, Benito, Laura, Adela, Ana, Guillermo, Verónica, Pablo, Conchita, Gabor....y en realidad a tantas otras! GRACIAS!

➤ Este trabajo ha sido financiado principalmente por los siguientes proyectos de investigación:

- PI05/0961 del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FEDER), Ministerio de Sanidad y Consumo.
- PS09/01296 del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FEDER), Ministerio de Sanidad y Consumo.
- PS09/01285 del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FEDER), Ministerio de Sanidad y Consumo.

También en parte por:

- RD01/0020/2004 y RD06/0020/0109 de la Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC), Instituto Carlos III (ISCIII), Ministerio de Ciencia e Innovación.

➤ Las muestras fueron obtenidas de la *Xarxa de Banc de Tumors de Catalunya (XBTC)*.

➤ Este trabajo ha recibido una ayuda del IMIM (*Institut Municipal d'Investigació Mèdic*) / *Institut de Recerca Hospital del Mar* para la finalización (impresión) de tesis doctorales, dotada de 400 euros.

	Páginas
ABREVIATURAS	13 - 14
1. INTRODUCCIÓN	15 - 84
1.1. Aspectos generales del cáncer de mama	16 - 29
1.1.1. <i>Epidemiología</i>	16 - 19
1.1.2. <i>Factores de riesgo genético</i>	19
1.1.3. <i>Crecimiento y diseminación tumoral</i>	19 - 23
1.1.4. <i>Marcadores tumorales</i>	23 - 29
1.2. Clasificación de las neoplasias malignas mamarias	30 - 38
1.2.1. <i>Clasificación clínica</i>	30 - 32
1.2.2. <i>Clasificación histológica</i>	33 - 36
1.2.2.1. <i>Tipo histológico</i>	
1.2.2.1.1. <i>Carcinoma ductal infiltrante</i>	
1.2.2.1. <i>Grado histológico</i>	
1.2.3. <i>Clasificación Molecular</i>	37 - 38
1.3. Principales factores pronósticos	39 - 53
1.3.1. <i>Afectación ganglionar</i>	39 - 40
1.3.2. <i>Tamaño tumoral</i>	40 - 41
1.3.3. <i>Oncogén HER2</i>	41
1.3.4. <i>Expresión de TP53</i>	41 - 42
1.3.5. <i>Edad en el momento del diagnóstico</i>	42
1.3.6. <i>Grado histológico</i>	42
1.3.7. <i>Tipo histológico</i>	42
1.3.8. <i>Receptores hormonales</i>	43 - 53
1.3.8.1. <i>Receptores hormonales en el desarrollo y estructura celular de la glándula mamaria</i>	
1.3.8.2. <i>Receptor de estrógenos (ER)</i>	
1.3.8.2.1. <i>Señalización esteroidea iniciada en el núcleo</i>	
1.3.8.2.2. <i>Señalización esteroidea iniciada en la membrana</i>	
1.3.8.3. <i>Receptor de progesterona (PR)</i>	
1.3.8.4. <i>Receptores hormonales (ER y PR) en el cáncer de mama</i>	
1.3.8.4.1. <i>Cánceres de mama hormonales (ER+/PR+ vs ER+/PR-)</i>	

1.3.8.5. Receptores hormonales como factor pronóstico	
1.4. Principales estrategias terapéuticas	53 - 71
1.4.1. Cirugía	54 - 59
1.4.1.1. Lumpectomía	
1.4.1.2. Mastectomía	
1.4.1.2.1. Mastectomía total	
1.4.1.2.2. Mastectomía radical modificada	
1.4.1.2.3. Mastectomía parcial	
1.4.1.2.4. Mastectomía radical	
1.4.1.2.5. Mastectomía subcutánea	
1.4.2. Radioterapia	59
1.4.3. Quimioterapia	59 - 61
1.4.4. Terapia dirigida (anticuerpos monoclonales)	61 - 64
1.4.4.1. Herceptin	
1.4.4.2. Tykerb	
1.4.4.3. Avastin	
1.4.5. Terapia hormonal	64 - 71
1.4.5.1. Ablación endocrina	
1.4.5.1.1. Ooperectomía profiláctica	
1.4.5.1.2. Deprivación estrogénica ovárica	
1.4.5.2. Moduladores selectivos del receptor de estrógenos	
1.4.5.2.1. Derivados del trifeniletileno	
1.4.5.2.2. Otros componentes no esteroideos	
1.4.5.3. Inhibidores de aromatasa	
1.4.5.4. Disminuidores selectivos del receptor de estrógenos	
1.4.5.5. ER y PR como factores predictivos de terapia hormonal	
1.5. Técnicas aplicadas al análisis genético	71 - 86
1.5.1. Citogenética convencional (CC)	72 - 75
1.5.1.1. Caracterización por CC de carcinomas mamarios	
1.5.2. Hibridación in situ fluorescente (FISH)	75 - 79
1.5.2.1. Arrays de tejidos	
1.5.2.2. Caracterización por FISH de carcinomas mamarios	
1.5.3. Arrays de hibridación genómica comparada (CGH-array)	79 - 85
1.5.3.1. Caracterización por CGH y CGH-array de carcinomas mamarios	

3.2.5.1. Desparafinación	
3.2.5.2. Pretratamiento	
3.2.5.3. Digestión	
3.2.5.4. Hibridación	
3.2.5.5. Lavados de post-hibridación	
3.2.5.6. Análisis y criterios de valoración	
3.2.6. Rehibridación de FISH en tejido parafinado -----	121
3.2.7. Arrays de tejidos (TMAs) -----	121 - 124
3.2.7.1. Elaboración de la plantilla del TMA	
3.2.7.2. Selección del tejido	
3.2.7.3. Construcción del TMA	
3.2.7.4. Corte del TMA	
3.2.8. FISH en tejido parafinado procedente del TMA -----	124 - 126
3.2.9. Tests estadísticos utilizados para el análisis de la FISH -----	126
3.2.10. Material de laboratorio -----	126 - 129
3.2.10.1. Soluciones de trabajo	
3.2.10.2. Reactivos	
3.2.10.3. Kits	
4. RESULTADOS -----	130 - 148
4.1. Perfil de alteración genómico -----	131
4.2. Perfil de alteración cromosómico -----	131 - 135
4.3. Regiones de alteración solapadas (regiones SORIs) -----	136 - 140
4.4. Comparación de SORIs entre tumores ER+/PR+ y ER+/PR- -----	141 - 145
4.5. Validación mediante FISH, en las muestras de los TMAs, de los genes MAP3K3, RPS6KB1 y ZNF217 obtenidos a partir de los SORIs de ganancia diferentes entre los dos grupos -----	145 - 148
5. DISCUSIÓN -----	149 - 158
5.1. Optimización de las técnicas utilizadas -----	150 - 148
5.1.1. Técnica de CGH-array -----	150
5.1.2. Técnica de construcción del array de tejidos -----	150 - 151
5.1.3. Técnica de FISH -----	151

5.2. Análisis de los resultados	151 - 159
5.2.1. Análisis del perfil de alteración genómico	152
5.2.2. Análisis del perfil de alteración cromosómico	152 - 153
5.2.3. Análisis de las regiones de alteración solapadas	153
5.2.4. Análisis de regiones ganadas y perdidas con significancia estadística entre los grupos ER+/PR+ y ER+/PR-	153 - 158
5.2.4.1. Análisis del SORI perdido 3p21.21-p12.3	
5.2.4.2. Análisis del SORI perdido 9pter-p13.3	
5.2.4.3. Análisis del SORI perdido 17pter-p12	
5.2.4.4. Análisis del SORI perdido 21pter-q21.1	
5.2.4.5. Análisis del SORI ganado 20q13	
5.2.4.6. Análisis del SORI ganado 17q23.2-q23.3	
6. CONCLUSIONES	169 - 161
7. RESUMEN Y CONCLUSIONES EN INGLÉS	162 - 165
7.1. <i>Abstract</i>	163
7.2. <i>Conclusions</i>	164 - 165
8. BIBLIOGRAFÍA	166 - 187

ABREVIATURAS

ADN	–	Ácido dexosiribonucleico
ARN	–	Ácido ribonucleico
BAC	–	Cromosoma bacteriano artificial
CDI	–	Carcinoma ductal infiltrante
CGH	–	Hibridación genómica comparada
CISH	–	Hibridación <i>in situ</i> cromogénica
CMF	–	Ciclofosfamida-metrotexato-fluorouracilo
CNV	–	<i>Copy number variation</i>
CTC	–	Célula tumoral circulante
DCIS	–	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
EGFR	–	Gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico, también conocido como <i>ERBB</i> , <i>HER1</i> , <i>ERBB1</i> . Codifica para la proteína EGFR.
ER	–	Receptor de estrógenos
FISH	–	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente
GC	–	Ganglio centinela
GST	–	Gen supresor de tumores
GH	–	Grado histológico
HER2	–	Gen del receptor epidérmico humano, también conocido como <i>ERBB2</i> , <i>HER2/neu</i> . Codifica para la proteína ERBB2.
IA	–	Inhibidor de aromatasa
IHQ	–	Inmunohistoquímica
MISS	–	Señalización esteroidea iniciada en la membrana
NISS	–	Señalización esteroidea iniciada en el núcleo
NMM	–	Neoplasia mamaria maligna
TDLU	–	Unidad lóbulo-ductal terminal
TE	–	Terapia endocrina
TH	–	Tipo histológico
TMA	–	Microarray de tejido
TNM	–	Tamaño tumoral, afectación ganglionar, metástasis
PR	–	Receptor de progesterona
SERD	–	Disminuidor selectivo del receptor de estrógenos

Abreviaturas

SERM	–	Modulador selectivo del receptor de estrógenos
SG	–	Supervivencia global
SLE	–	Supervivencia libre de enfermedad
SORI	–	<i>Smallest overlapping region of imbalance</i>
SP	–	Sangre periférica

1. INTRODUCCIÓN

“La parte más difícil consiste en decidirse!...después...todo es cuestión de empezar!”

1.1. Aspectos generales del cáncer de mama

El cáncer de mama es una de las neoplasias más frecuentes y la primera causa de muerte entre la población femenina en los países industrializados, encontrándose España en la misma situación (1). Asociado con el estilo de vida occidental, las tasas de incidencia más elevadas se encuentran en los países con economías muy desarrolladas, que se suman a otros factores de riesgo ya conocidos como una temprana menarquia y una tardía concepción (2).

La mayoría de los cánceres de mama se desarrollan en mujeres sin antecedentes familiares y se consideran por ello esporádicos. Sin embargo, un 15%-20% de los cánceres de mama se asocian a antecedentes familiares, aunque todavía se desconoce en qué medida esta agregación familiar es fruto del azar, de una susceptibilidad genética, de determinados factores ambientales o de alguna combinación de todos estos factores. En estos casos hablamos de cánceres de mama familiares. Por otro lado, alrededor de un 5-10% de los cánceres de mama se atribuyen a mutaciones en la línea germinal en genes de herencia autosómica dominante con penetrancia elevada, como son el *BRCA1* y *BRCA2*. Éstos son cánceres de mama hereditarios, cuya aparición generalmente tiene lugar a edades muy tempranas y/o está asociada a antecedentes familiares muy importantes (3).

La detección precoz y los últimos avances en el tratamiento del cáncer de mama han provocado una reducción en las tasas de mortalidad y un aumento de la supervivencia total, en la mayoría de los países más afectados por esta patología. No obstante la incidencia de cáncer de mama está incrementándose en casi todo el mundo debido al aumento de factores de riesgo tales como una dieta inadecuada, el consumo de alcohol, la obesidad, y una disminución de la actividad física (1).

La introducción y aplicación de técnicas de citogenética y biología molecular al estudio de neoplasias humanas entre ellas el cáncer de mama, ha permitido la mejora del pronóstico y predicción de respuesta a diferentes tipos de tratamiento por medio de la utilización de marcadores tumorales específicos, así como un mejor entendimiento de los mecanismos de formación, crecimiento, actuación y diseminación de este tipo de tumores (4).

1.1.1. Epidemiología

El cáncer de mama es un problema de salud pública de gran relevancia a escala mundial, tanto por su alta incidencia como por la mortalidad que ocasiona.

Constituye el cáncer más común de afectación femenina, comprendiendo hasta un 23% de todos los cánceres que afectan a esta población, y el segundo más común al ser considerados ambos sexos (**Fig. 1**). En el año 2002, la incidencia mundial de la enfermedad ascendió a 1,15 millones de nuevos casos, de los que más de la mitad pertenecían a países industrializados (1, 5). En parte, la elevada incidencia de cáncer de mama que se da en las zonas más desarrolladas del mundo es debido a la existencia de programas de cribaje que permiten detectar de forma muy temprana cánceres invasivos. Por el contrario, la incidencia es menor en el este de Europa, Sudamérica, África y oeste asiático, aún así en estas áreas geográficas sigue representando el cáncer femenino más común (6) (**Fig. 1**).

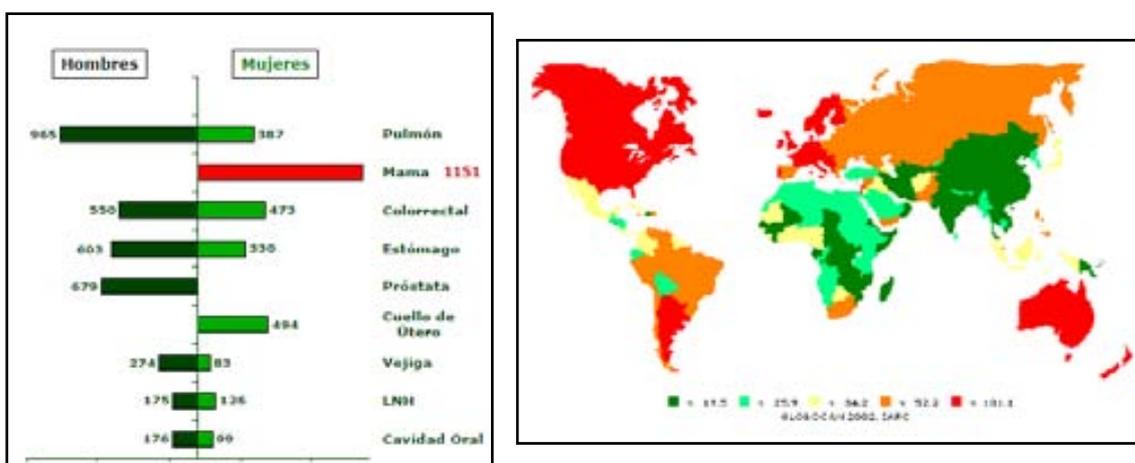


Fig. 1. Izquierda: incidencia anual estimada de los principales cánceres en el mundo. Año 2002. Número de casos en miles. Derecha: tasa de incidencia del cáncer de mama en el mundo. Año 2002. Número de casos por cada 100.000 habitantes.

España presenta una incidencia de 16.000 casos nuevos al año, lo que representa casi el 30% de todos los tumores del sexo femenino del país. La mayoría de los casos se diagnostican entre los 35 y los 80 años, con un máximo entre los 45 y los 65 años. Existe una distribución geográfica de incidencia notablemente variable según las provincias. Así en Cataluña la tasa de incidencia es de 83,9 casos/100.000 habitantes, mientras que la media nacional se sitúa en 50,9 casos/100.000 habitantes (**Fig. 2**).

Los avances logrados en el diagnóstico y tratamiento han conseguido aumentar la supervivencia relativa; hoy en día constituye el cáncer que más prevalece en el mundo y se estima que actualmente hay una prevalencia de más 4,4 millones de mujeres supervivientes diagnosticadas de cáncer de mama en los últimos 5 años. A pesar de esto, la mortalidad global no ha descendido como se esperaba, debido

preferentemente al incremento de su incidencia en la mayoría de países, especialmente en aquellos donde las tasas eran inicialmente bajas (7).

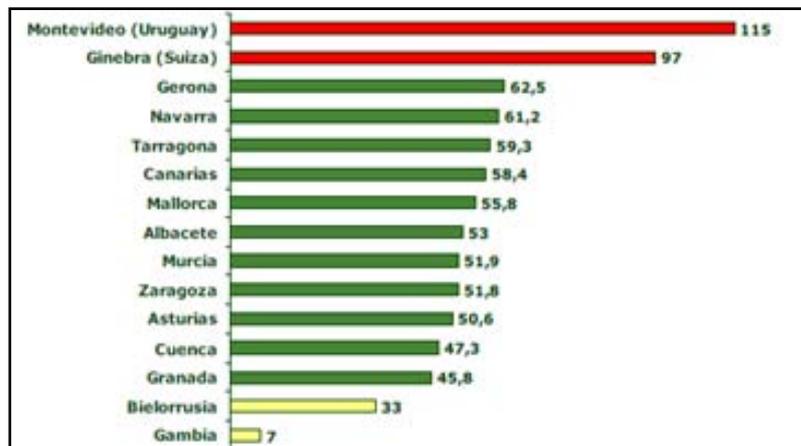


Fig. 2. Tasas de incidencia de cáncer de mama de registros españoles (casos por cada 100.000 habitantes), con el valor máximo y mínimo de Europa y el mundo (años 1993-1997).

La mortalidad en España es de las más bajas dentro del conjunto de todos los países desarrollados: la tasa ajustada obtenida en 2002 fue de 15,9 fallecimientos/100.00 habitantes/año. Fallecen unas 6.000 mujeres al año, lo que representa el 16,7% de todos los fallecimientos por cáncer del sexo femenino en nuestro país (**Fig. 3**).

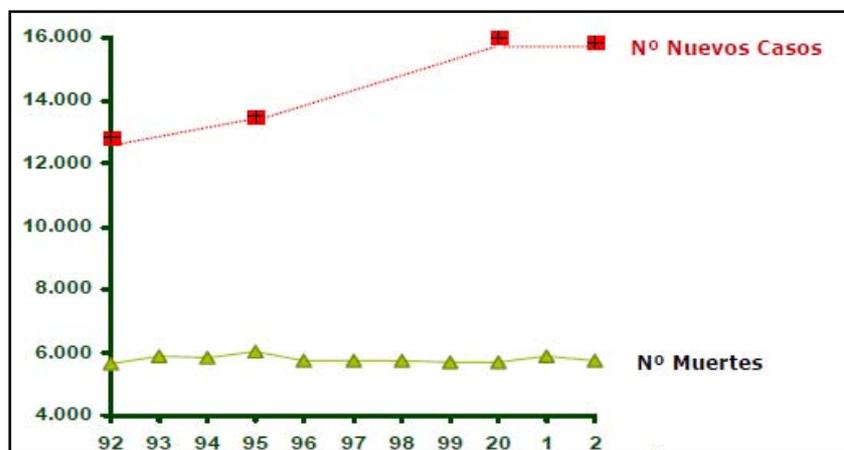


Fig. 3. Evolución del número estimado de nuevos casos y del número de muertes por cáncer de mama en España.

La media por fallecimiento por cáncer de mama es de 66 años. Gran Canaria es la provincia con mayor mortalidad y Navarra la comunidad autónoma donde el descenso de la mortalidad desde 1992 es más acusado, seguramente debido al hecho de que sea la primera comunidad que implantó un programa de diagnóstico precoz, en

1990. Se estima que en Cataluña una de cada 11 mujeres padecerá cáncer de mama durante su vida y una de cada 33 morirá a causa de él (8).

1.1.2. Factores de riesgo genético

Los factores genéticos contribuyen aproximadamente en un 5-10% de todos los cánceres de mama, pero representan el 25% de los casos diagnosticados antes de los 30 años (9).

Un 30-40% de los cánceres hereditarios de mama son debidos a alteraciones en el gen **BRCA1**, localizado en 17q21; mientras que un 10-30% se deben a alteraciones en el gen **BRCA2**, localizado en 13q12.3.

Los cánceres familiares de mama y de ovarios relacionados con estos dos genes muestran un patrón de herencia autosómica dominante provocado por mutaciones en **BRCA1** o en **BRCA2**. Ambos genes intervienen en el mantenimiento de la estabilidad genómica y actúan como genes supresores de tumores (GSTs) (10).

Estudios clínicos basados en miembros de riesgo de familias con cánceres de mama hereditarios estiman que el riesgo de desarrollar cáncer de mama hacia los 70 años es de un 78% en portadores de mutaciones de **BRCA1** y de un 80% en el caso de **BRCA2**. Los cánceres de mama que se desarrollan a partir de mutaciones en **BRCA1** o **BRCA2** se caracterizan por debutar a temprana edad (46 años de media) en comparación con los cánceres esporádicos (54 años de media) (11).

Histológicamente, el cáncer de mama asociado a **BRCA1** presenta una elevada frecuencia de carcinoma del tipo sólido tubular. Algunos estudios no han encontrado diferencias entre los cánceres relacionados con **BRCA1/2** y los esporádicos (12), mientras que otros han observado una relativa alta frecuencia de carcinoma medular en los relacionados con **BRCA1/2** (13, 14).

Además de **BRCA1/2**, alteraciones en otros genes pueden estar involucradas en algunos cánceres de mama hereditarios, pero no de forma tan relevante. Son de destacar los genes: **ATM**, **CHEK3**, **P53** y **PTEN** (15).

1.1.3. Crecimiento y diseminación tumoral

Se ha propuesto una gran variedad de modelos diferentes que intentan explicar la historia o el curso natural del cáncer de mama. Éstos incluyen los modelos descritos por **Speer et al.** (16), **Norton y Simon** (17), **Spratt et al.** (18), **Koscielny et al.** (19).

El **modelo Gompertz**, descrito inicialmente por **Norton y Simon** (20) ha constituido durante mucho tiempo la base descriptiva de los modelos de crecimiento

de los tumores sólidos, incluyendo los mamarios. Este modelo es una variante del modelo exponencial, al que le añade una disminución de la tasa de crecimiento con el paso del tiempo. Esta desaceleración provoca que el cáncer se aproxime finalmente a un tamaño límite, atribuible a muchos factores que incluirían la hipoxia o la falta de nutrientes. El origen de este modelo es una variedad de estudios realizados *in vivo* en los que la ecuación de *Gompertz* describe de forma más exacta las dinámicas de crecimiento tumoral (20, 21).

Speer et al. (16) observaron que la duración subclínica de crecimiento al que se refiere la ecuación original de crecimiento de *Gompertz* era demasiado corta (aproximadamente 4 semanas). También **Heuser et al.** (22), a partir de los datos clínicos de una serie mamográfica, obtuvieron el hecho de que nueve de 109 cánceres de mama sin tratar no presentaban crecimiento después de un año de ser detectados, y que por lo tanto la ecuación original de *Gompertz* no podía ser aplicada a esta fase latente. Además, desarrollaron un nuevo modelo, basado en el de *Gompertz*, con un crecimiento tumoral por fases que podía incluir una fase latente sin crecimiento alguno. **Retsky et al.** (23) revisaron la literatura existente y describieron una gran variedad de casos clínicos en los que el modelo tradicional exponencial no correlacionaba con los datos previamente analizados. Por todo ello, se concluyó que los modelos necesitarían incluir algún tipo de fase latente y fases de crecimiento acelerado que formarían parte del proceso completo del desarrollo tumoral.

Uno de los mayores impedimentos para el desarrollo de un buen modelo de crecimiento tumoral de cáncer de mama es la falta de datos representativos de todo el proceso de formación y desarrollo de este tipo de tumores. Este hecho dificulta el poder determinar si el crecimiento de un tumor primario de mama es una función continua o si por el contrario se lleva a cabo en ciertos momentos desde su debut inicial, interrumpidos por periodos de latencia (24).

Por lo que respecta a la diseminación tumoral, existen dos vías preferentes a través de las cuales las células tumorales pueden alejarse del tumor inicial y ser causantes de metástasis mamarias principalmente en hueso, pulmón, hígado y cerebro. La diseminación tumoral puede tener lugar a través del **sistema circulatorio** que irriga el tejido mamario circundante al tumor o en general de todo el parénquima mamario, y por otra parte a través del **sistema linfático**. No obstante, la falta de un flujo directo del sistema linfático al resto de órganos provoca que las células tumorales que se escapan vía linfática deban en último término entrar igualmente en el sistema vascular para poder ser distribuidas a su hipotético órgano diana (25).

Los lugares de mayor frecuencia de **diseminación regional linfática** son los ganglios axilares, los ganglios mamarios internos, los ganglios supraclaviculares y los ganglios infraclaviculares (26, 27) (**Fig. 4**).

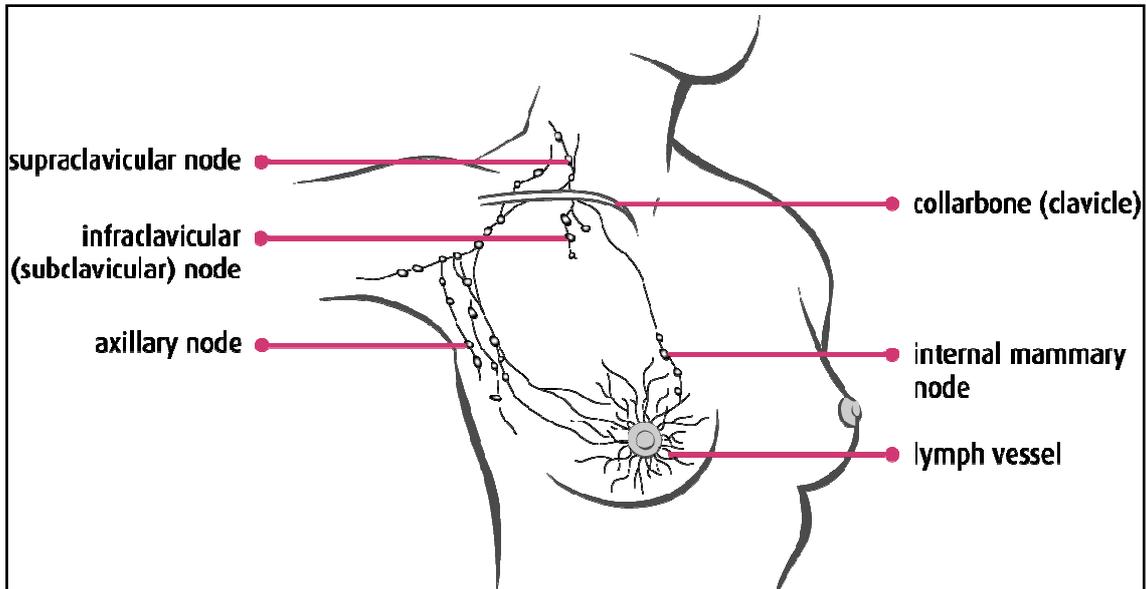


Fig. 4. Ganglios linfáticos adyacentes al área mamaria. *Supraclavicular node*: ganglios supraclaviculares. *Infraclavicular (subclavicular) node*: ganglios infraclaviculares. *Axillary node*: ganglios axilares. *Collarbone*: clavícula. *Internal mammary node*: ganglios internos mamarios. *Lymph vessel*: vasos linfáticos.

- **Ganglios axilares:** cadena de ganglios desde la axila hasta la clavícula que recibe la mayor parte del drenaje linfático mamario. El número de ganglios generalmente oscila entre 30 y 50. Los ganglios axilares están divididos en tres niveles dependiendo de lo cerca que estén del músculo pectoral (**Fig. 5**):
 - **Ganglios del nivel 1:** en la axila inferior, por el borde exterior del músculo pectoral menor; reciben la mayoría del flujo linfático del seno.
 - **Ganglios del nivel 2:** en la axila media, entre los bordes medios y laterales del músculo pectoral menor; reciben el flujo de los ganglios del nivel 1 y algo del flujo del seno y de la pared torácica.
 - **Ganglios del nivel 3:** en la axila superior, por debajo y cerca del centro de la clavícula, encima del área mamaria y a través del borde interno del músculo pectoral; reciben el flujo de los ganglios de los niveles 1 y 2, de la parte superior del seno y la pared torácica.

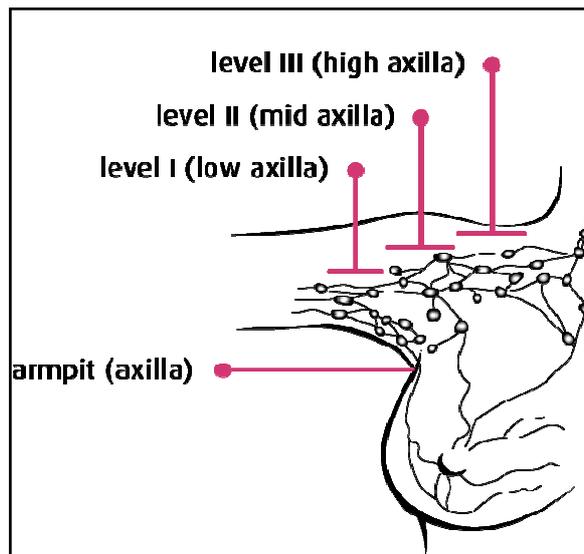


Fig. 5. Ganglios linfáticos axilares: *Level I (low axilla)*: ganglios axilares del nivel I. *Level II (mid axilla)*: ganglios axilares del nivel II. *Level III (high axilla)*: ganglios axilares del nivel III.

- **Ganglios mamarios internos:** en el pecho junto al esternón.
- **Ganglios supraclaviculares:** encima de la clavícula.
- **Ganglios infraclaviculares:** debajo de la clavícula; son poco frecuentes.

En el cáncer de mama, el estudio de la diseminación tumoral tradicionalmente se ha centrado en la metástasis ganglionar axilar, por ser la más frecuente. Los ganglios axilares del nivel 1 son los que generalmente quedan afectados en primer lugar. Con frecuencia durante la cirugía se extraen los ganglios axilares de los niveles 1 y 2. Estos ganglios se examinan bajo el microscopio para así poder encontrar posibles rastros de diseminación tumoral. Si se encuentran células tumorales, existirá una elevada probabilidad de que el cáncer se haya podido extender a otras partes del cuerpo.

Actualmente la biopsia del **ganglio centinela** (GC) es una técnica que se utiliza como primer método para la determinación de la afectación ganglionar axilar, y que se realiza de forma previa a la posible extracción quirúrgica del tumor y o de grupos ganglionares (28). Esta técnica permite mediante la utilización de un colorante biológico (azul isosulfán) la detección del GC, es decir, del primer ganglio que recibirá hipotéticamente el drenaje linfático de forma natural y por lo tanto recibiría las células que podrían diseminarse del tumor primario. Si este ganglio no presenta infiltración tumoral, significa que el resto de ganglios tampoco están afectados. El GC suele formar parte de los ganglios axilares, no obstante puede presentar una localización

diferente en cada mujer. Este procedimiento disminuye el número de ganglios linfáticos a extraer, reduciéndose así el riesgo de infección y linfedema (inflamación del brazo) (28).

Durante décadas se pensó que la dispersión tumoral en el cáncer de mama se producía en primer lugar hacia los ganglios linfáticos antes de llegar al torrente sanguíneo. Sin embargo, actualmente es un hecho demostrado que hasta un 30% de los pacientes que no muestran afectación ganglionar, desarrollarán metástasis en un periodo inferior a 5 años (29, 30). Por esta razón, en la actualidad se está realizando la puesta a punto de técnicas de detección de células tumorales circulantes (CTCs) en sangre periférica (SP), así como el estudio de su valor diagnóstico y pronóstico (31).

1.1.4. Marcadores tumorales

Un **marcador tumoral** (también llamado marcador biológico o biomarcador) es una molécula, sustancia o proceso que está alterado cuantitativamente o cualitativamente en una condición precancerosa o cancerosa detectable por una prueba. Esta alteración puede ser producida por el mismo tumor o por el tejido normal circundante como respuesta a la lesión tumoral. Inicialmente la idea de marcador se asoció a productos de secreción; es decir, a sustancias que sintetizadas y liberadas por la célula tumoral pasarían a un líquido biológico donde podrían ser cuantificadas. Asimismo, se incluían otras cuyo origen residiría en el huésped donde se asienta el tumor, reflejando preferentemente fenómenos de tipo inmunológico o desconocido (32).

En 1846, *Bence-Jones*, citado por **Solomon et al.** (33) describe la precipitación de una proteína en orina de enfermos con melanoma. Ésta resulta ser una inmunoglobulina monoclonal de cadena ligera, identificada como el primer marcador tumoral. Muchos años después de este descubrimiento, entre 1928 y 1963, se identificaron numerosas hormonas, enzimas, isoenzimas y otras proteínas que en condiciones de malignidad alteran sus concentraciones en fluidos corporales. Una de estas enzimas fue la fosfatasa ácida que sirve de marcador tumoral del cáncer de próstata desde 1930. Entre 1963 y 1965 se descubrieron los dos marcadores tumorales más utilizados en la actualidad, para hepatoma y cáncer colorectal: la **alfabetoproteína** y el **antígeno carcinoembrionario** respectivamente (34).

Desde entonces, y especialmente en los últimos años, tras la introducción y aplicación de las modernas técnicas inmunológicas, bioquímicas y de biología celular y molecular, que han permitido el descubrimiento de nuevos marcadores cancerígenos, el concepto de marcador se amplió notablemente, incluyendo todas las estructuras de

la célula transformada y los cambios que experimenta el tumor a lo largo de su evolución hasta la metástasis, ya sean enzimas, hormonas, neurotransmisores y sus metabolitos, proteínas, receptores celulares, ácidos nucleicos...No es extraño, pues, que ciertos términos y técnicas hasta ahora relegadas a laboratorios de investigación básica, comiencen a ser introducidos en la práctica hospitalaria (34, 35).

En 1996, *The American Society of Clinical Oncology (ASCO)* publicó por primera vez los protocolos a seguir sobre el uso de marcadores en cáncer de mama, basados en la evidencia clínica descrita hasta el momento. Desde entonces, el comité que se encarga de la actualización de los datos, formado a partir del comité de expertos reunidos inicialmente, actualiza cada cierto tiempo estos protocolos o prácticas a seguir (36). En el año 2007, mediante el uso de búsquedas computerizadas en la literatura del *MEDLINE* y en la *Cochrane Collaboration Library*, el comité revisó y analizó la información existente desde 1999, centrándose en las revisiones y meta-análisis de estudios publicados sobre marcadores tumorales. Las recomendaciones se basaron en la observación de diversos parámetros clínicos como la supervivencia total, la supervivencia libre de enfermedad, la calidad de vida, la toxicidad y la relación coste-eficacia del tratamiento, entre otros (37).

De las 13 categorías de marcadores tumorales mamarios considerados en el 2007 (**Tabla 1**), seis fueron incluidos por primera vez respecto a la revisión anterior en el año 2000 (**Tabla 2**).

TABLA 1. Marcadores tumorales mamarios que mantienen las recomendaciones establecidas previamente en ediciones anteriores a la celebrada en 2.007.

Marcador Tumoral		No recomendado	Recomendado
CA 15-3, CA 27-29 (37-41) (Circulante)	<ul style="list-style-type: none"> - Marcadores séricos que miden el MUC-1 circulante en sangre periférica - De un 75 a un 90% de pacientes con metástasis presentan niveles elevados 	<ul style="list-style-type: none"> - Exploración, diagnóstico, estadiaje, pronóstico o supervivencia - Seguimiento y tratamiento únicamente con su determinación 	<ul style="list-style-type: none"> - Seguimiento de pacientes con enfermedad metastásica durante el periodo de administración de terapia, junto con el uso del diagnóstico por imagen, historial y examen físico. En estos casos, niveles elevados indicarían una respuesta deficiente al tratamiento
CEA (Antígeno carcinoembrionario) (36, 37, 42-45) (Circulante)	<ul style="list-style-type: none"> - El CEA es una proteína integral de membrana de la familia de las inmunoglobulinas. - Detectada en suero por radioinmunoensayo 	<ul style="list-style-type: none"> - Exploración diagnóstico, estadiaje, pronóstico o supervivencia 	<ul style="list-style-type: none"> - Seguimiento de pacientes con enfermedad metastásica durante el periodo de administración de terapia, junto con el uso del diagnóstico por imagen, historial y examen físico - Si los niveles detectados de MUC-1 fueran elevados, el uso de CEA no sería necesario; en caso contrario, su detección podría aportar información clínica suplementaria de respuesta al tratamiento
ER (Receptor de estrógenos) y PR (Receptor de progesterona) (37, 46-49) (Tejido)	<ul style="list-style-type: none"> - Asociados con pronóstico favorable y altamente predictivos de respuesta a tratamiento endocrino tanto en terapia adyuvante como en metastásica 	<ul style="list-style-type: none"> - Exploración, estadiaje, pronóstico, supervivencia o seguimiento en mujeres con carcinoma ductal <i>in situ</i> candidatas a terapia hormonal 	<ul style="list-style-type: none"> - Diagnóstico y planificación del tratamiento en todos los cánceres primarios invasivos y en las lesiones metastásicas si se viera influenciada la terapia a escoger
Marcadores de proliferación por citometría de flujo de ADN (37, 50)	<ul style="list-style-type: none"> - Determinación de la fracción celular en fase S como uno de los principales marcadores de proliferación 	<ul style="list-style-type: none"> - Exploración, diagnóstico, estadiaje, pronóstico, supervivencia o seguimiento 	<ul style="list-style-type: none"> (Una elevada presencia de marcadores de proliferación correlaciona con un mal pronóstico en pacientes sin tratar, y puede que con un mayor beneficio de la administración de

(Tejido)		- Variabilidad de protocolos e interpretación de resultados	quimioterapia. Marcador no aceptado oficialmente)
Marcadores de proliferación por IHQ (37-50): Ki67, Ciclina D, Ciclina E, p27, p21, timidina quinasa, topoisomerasa II... (Tejido)	- Enzimas comunes que intervienen en el metabolismo del ADN, en la modificación del mismo y en puntos de control del ciclo celular	- Exploración, diagnóstico, estadiaje, pronóstico, supervivencia o seguimiento - Variabilidad de anticuerpos y protocolos utilizados y análisis de resultados	(Una elevada presencia de marcadores de proliferación correlaciona con un mal pronóstico en pacientes sin tratar, y puede que con un mayor beneficio de la administración de quimioterapia. Marcador no aceptado oficialmente)
<i>HER2</i> (37, 51-62) (Tejido)	- Miembro de la familia de receptores de factores de crecimiento epidérmicos (EGFR), que interviene en vías de señalización relacionadas con crecimiento y diferenciación celular - Amplificado y sobreexpresado en un 15-30% de nuevos casos - Asociado a un peor pronóstico y comportamiento tumoral más agresivo	- Exploración, diagnóstico, estadiaje, pronóstico, supervivencia o seguimiento - Rechazo o elección de terapia hormonal o terapia adyuvante basada en taxanos	- Planificación de tratamiento e identificación de pacientes potenciales de recibir beneficio en la práctica adyuvante o para la enfermedad metastásica de la administración de trastuzumab y/o de terapia adyuvante basada en antraciclinas
Dominio extracelular circulante de ERBB2 (37, 63, 64) (Circulante)	- Fracción sérica del dominio extracelular de ERBB2 asociada a un peor pronóstico	- Exploración, diagnóstico, estadiaje, pronóstico, supervivencia o seguimiento	(La utilización del dominio extracelular de ERBB2 como posible marcador alternativo a <i>HER2</i> es muy controvertida. La falta de estudios y resultados consistentes dificulta su utilización. Marcador no aceptado oficialmente)

<p>P53 (37, 65-70) (Tejido)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Proteína de reducida expresión en células sanas y de expresión aumentada en gran variedad de líneas celulares transformadas - Capacidad de unión al ADN y activación de genes que inhiben crecimiento y o invasión - GST con capacidad de detención del ciclo celular e inducción de apoptosis - Las alteraciones de P53 suelen ser mutaciones puntuales en regiones conservadas del gen o en dominios de la proteína importantes para su función o estructura. Las mutaciones sin sentido pueden ser detectadas debido a la pérdida de la actividad de la proteína y a su mayor vida media evitando el proceso de degradación 	<ul style="list-style-type: none"> - Exploración, diagnóstico, estadiaje, pronóstico, supervivencia o seguimiento 	<p>(Elevados niveles tisulares de P53 detectados por IHQ, y o mutaciones o deleciones en el gen detectadas por técnicas moleculares parecen estar asociadas a un mal pronóstico. Los resultados de estudios recientes son insuficientes para su uso como marcador en la práctica rutinaria y las metodologías de detección limitan su utilización. Además, no existen estudios prospectivos o retrospectivos que confirmen la aplicabilidad de dichos métodos. Marcador no aceptado oficialmente)</p>
<p>Catepsina D (37, 71, 72) (Tejido)</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Aspartil-proteasa lisosomal miembro de la familia de las peptidasas C2 - Interviene en el catabolismo celular en los compartimentos lisosomales y en el procesamiento antigénico y hormonal - Parece existir una asociación entre niveles elevados de la proteína con la respuesta al tratamiento y un incremento del riesgo de recaída 	<ul style="list-style-type: none"> - Exploración, diagnóstico, estadiaje, pronóstico, supervivencia o seguimiento 	<p>(La determinación de la catepsina D podría tener un valor predictivo, pero su importancia sería relativamente pequeña. Además los estudios centrados en la catepsina D detectada por IHQ son demasiado heterogéneos y sin ningún tipo de estandarización. Marcador no aceptado oficialmente)</p>

TABLA 2. Nuevos marcadores tumorales mamarios introducidos en la edición del año 2.007.

Marcador Tumoral	No recomendado	Recomendado
<p>Upa y PAI-1 (37, 73-76) (Tejido)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Serin-proteasa que interviene en la degradación de la matriz extracelular y posiblemente en la migración y proliferación celular tumoral - Ambas proteínas forman parte del sistema de activación del plasminógeno, relacionado con mecanismos de invasión, angiogénesis y metástasis 	<ul style="list-style-type: none"> - Exploración, diagnóstico, estadiaje, supervivencia o seguimiento 	<ul style="list-style-type: none"> - Detección por ELISA para la determinación del pronóstico en pacientes con un tumor primario sin afectación ganglionar - Planificación del tratamiento. Valores bajos de ambos marcadores se asocian a un menor riesgo de recaída en los que la administración de quimioterapia tan sólo aportaría un beneficio residual. Valores elevados determinan pacientes con un elevado riesgo de recaída y con un importante beneficio de la administración de quimioterapia adyuvante basada en CMF (ciclofosfamida-metrotexato-fluorouracilo)
<p>Fragmentos de Ciclina E (37, 77-79) (Tejido)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Proteína que se expresa en la fase G1 tardía del ciclo celular. Su asociación con CDK2 estimula la actividad quinasa y promueve la transición celular de la fase S, asegurando la división celular y promoviendo la síntesis de ADN 	<ul style="list-style-type: none"> - Exploración, diagnóstico, estadiaje, pronóstico, supervivencia o seguimiento 	<p>(En el cáncer de mama la ciclina E es cortada en fragmentos de bajo peso molecular que resisten a la inhibición de su actividad por parte de otras proteínas. Además confieren resistencia al tamoxifen y aumentan la inestabilidad genómica. Consecuentemente, aunque podría ser considerada como un marcador de mal pronóstico por el momento es necesario un mayor número de estudios. Marcador no aceptado oficialmente)</p>
<p>Análisis proteómicos (37, 80-86) (Tejido)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Diferentes aproximaciones para analizar un gran número de proteínas o de fragmentos peptídicos simultáneamente. Incluyen el ELISA multiplex, los arrays de aptámero y el <i>phage display</i> y los mayormente utilizados 	<ul style="list-style-type: none"> - Exploración, diagnóstico, estadiaje, pronóstico, supervivencia o seguimiento 	<p>(En general los estudios realizados son capaces de identificar subtipos de cáncer de mama atendiendo al su patrón proteínico. No obstante, son necesarios buenos estudios prospectivos que permitan confirmar los resultados obtenidos. Por el momento ninguna de las técnicas ha sido suficientemente validada. Marcador no aceptado oficialmente)</p>

	basados en el análisis por espectrometría de masas		
Análisis multiparamétrico de expresión génica (37, 87-90) (Tejido)	<ul style="list-style-type: none"> - Análisis de los perfiles de expresión génica para una mejor clasificación molecular - El <i>Oncotype DX</i>, el test <i>MammaPrint</i>, el <i>Rotterdam Signature</i> y el <i>Breast cancer Gene Expresión Ratio</i> son cuatro de los ensayos que más se aproximan al cumplimiento de los controles de ensayos de calidad y o validación clínica. Los dos primeros están comercialmente disponibles 	<ul style="list-style-type: none"> - Exploración, diagnóstico, estadiaje, supervivencia o seguimiento - Predicción de respuesta tan sólo a tamoxifen y a algunos otros regímenes quimioterapéuticos 	(El <i>Oncotype DX</i> que mide la expresión de 21 genes podría ser utilizado en pacientes diagnosticados <i>de novo</i> con tumores de mama ER+ y con afectación ganglionar negativa para predecir el riesgo de recaída en los tratados con tamoxifen, así como para la identificación de pacientes que podrían evitar la quimioterapia por el poco beneficio que recibirían de ella, y de los que recibirían un mayor beneficio de la quimioterapia adyuvante basada en CMF junto a tamoxifen. Todavía queda por concluir la utilidad clínica del resto de ensayos y por el momento no existe recomendación del uso de ninguno de ellos. Marcador no aceptado oficialmente)
Micrometástasis en médula ósea (29, 91, 92) (MO)	- Detección de células epiteliales que raramente se encuentran en la médula ósea y por lo tanto cualquier número apreciable de este tipo celular sería una muestra de la expansión tumoral de un cáncer de mama ya diagnosticado	- Exploración, diagnóstico, estadiaje, pronóstico, supervivencia o seguimiento	(Predicen un elevado riesgo de recaída y una peor supervivencia en cánceres de mama de estadios poco avanzados. Pero, en la mayoría de los casos el paciente ya presenta características que llevarán al oncólogo a tratarlo con terapia adyuvante. Marcador no aceptado oficialmente)
Células circulantes tumorales (37, 93, 94) (CTCs)	- Células presentes en la sangre que poseen características genéticas de un tipo específico de tumor, cuyo origen es incierto y significado clínico todavía no ha sido establecido	- Exploración, diagnóstico, estadiaje, pronóstico, supervivencia, predicción o seguimiento	(La detección de CTCs podría predecir la presencia de micrometástasis o de un tumor primario agresivo. Por el momento los resultados obtenidos en pacientes con cáncer de poca evolución sugieren su potencial utilidad. Marcador no aceptado oficialmente)

1.2. Clasificación de las neoplasias malignas mamarias

Las neoplasias malignas mamarias (NMMs) pueden ser clasificadas atendiendo a un elevado número de variables. La determinación y análisis de todas ellas en el momento de la detección de un cáncer de mama, ayudarán a la comprensión y establecimiento del tipo de neoplasia ante el que se encuentran patólogos y clínicos, de cuál será su hipotético comportamiento, así como del tratamiento más adecuado a administrar a la paciente.

Las clasificaciones más importantes y en su mayoría aplicadas de forma rutinaria en los centros de diagnóstico son las siguientes:

- **Clasificación clínica**
- **Clasificación histológica**
 - **Tipo histológico**
 - **Grado histológico**
- **Clasificación molecular**

1.2.1. Clasificación clínica

Los tumores de mama se clasifican según clasificación TNM que sigue unas reglas generales aplicables a todos los tipos de neoplasias y otras específicas para cada una de ellas. Sus siglas, TNM, se refieren al **tamaño tumoral** (T), afectación o no de **ganglios linfáticos regionales** (N) y presencia o no de **metástasis a distancia** (M) (95).

La clasificación TNM fue desarrollada entre 1943 y 1952 por el doctor *Pierre Denoix* en el *Institute Gustave-Roussy*. Subsecuentemente, la **Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC)** estableció un Comité Especial de Clasificación clínica del estadiaje bajo la supervisión del Dr. *Denoix*. La primera clasificación TNM propuesta por la UICC fue aplicada al cáncer de mama y publicada en 1954. El Comité y su directo descendiente, el *UICC TNM Prognostic Factors Project*, continuó con el desarrollo de la clasificación TNM para que pudiera ser aplicada a todos los tipos de tumores malignos existentes (96). En el 2002 se publicó la sexta y última edición de la Clasificación de los Tumores Malignos, desde que en 1968 se publicara su primera edición (97).

A partir del sistema TNM se puede identificar el estadio clínico en el que se encuentra el cáncer detectado, es decir aporta información acerca del grado de extensión y gravedad del mismo, lo que facilitará en la mayoría de los casos un pronóstico y una planificación del tratamiento más precisos.

Los conceptos carcinoma *in situ* y carcinoma infiltrante también están incluidos en el sistema TNM, por ello es necesaria su correcta identificación (98):

- **Carcinoma *in situ***: las células tumorales no atraviesan la membrana basal que recubre el conducto mamario, sino que taponan su luz según sea el grado de afectación, por lo tanto, todavía no invaden el estroma mamario adyacente (**Fig. 6 (a)**).
- **Carcinoma infiltrante**: las células tumorales invaden el estroma mamario pudiendo provocar micrometástasis en otras zonas del tejido mamario o incluso posteriormente metastatizar a otras zonas del cuerpo (**Fig. 6 (b)**).

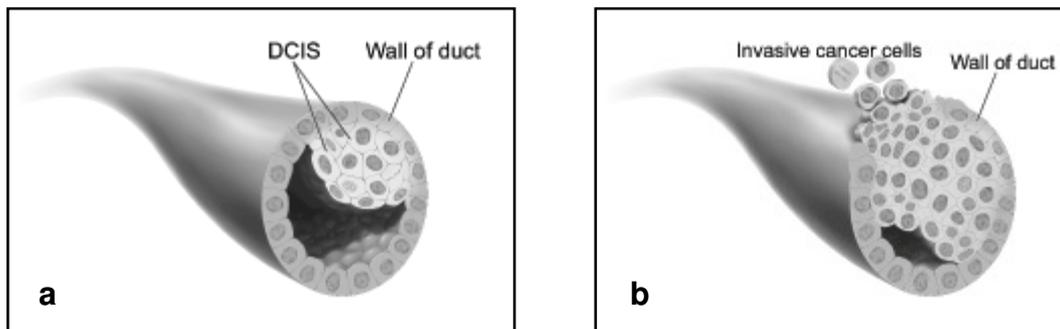


Fig. 6. (a) Carcinoma *in situ*. *Wall of duct*: pared del conducto. (b) Carcinoma infiltrante. *Invasive cancer cells*: células invasivas cancerígenas. Abreviaturas: DCIS: carcinoma ductal *in situ*.

Clasificación TNM (97, 98)

T – Tumor Primario

-**TX**. El tumor primario no puede ser valorado

-**T0**. No se demuestra tumor primario

-**Tis**. Carcinoma *in situ*

Tis (DCIS). Carcinoma Ductal *in situ*

Tis (LCIS). Carcinoma Lobular *in situ*

Tis (Paget). Enfermedad de *Paget* del pezón sin tumor

Nota: La enfermedad de *Paget* cuando está asociada a un tumor mamario en profundidad se clasifica según el tamaño del tumor.

-**T1**. ≤ 2 cm de tamaño tumoral

T1mic. ≤ 1 cm en su mayor dimensión

T1a. $>0,1$ cm y $\leq 0,5$ cm

T1b. $>0,5$ y ≤ 1 cm

T1c. >1 cm ≤ 2 cm

-**T2**. >2 cm ≤ 5 cm

-**T3**. >5 cm

-**T4**. Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a la pared torácica (costillas, músculos intercostales y el músculo serrato anterior, pero no los músculos pectorales).

T4a. Con fijación a la pared torácica

T4b. Con edema, infiltración de la piel de la mama o nódulos satélites confinados a la misma mama.

T4c. Ambas situaciones (4a y 4b)

T4d. Carcinoma inflamatorio

*T1-T4: tumores invasivos

N – Ganglios linfáticos regionales

NX. La afectación ganglionar no puede ser valorada

N0. No se observan o palpan adenopatías axilares

N1. Adenopatías en nódulos linfáticos axilares móviles ipsilaterales

N2. Adenopatías en nódulos linfáticos axilares fijos ipsilaterales (**N2a**) o en nódulos linfáticos internos mamarios ipsilaterales en ausencia clínica evidente de afectación axilar linfática (**N2b**)

N3. Adenopatías en nódulos linfáticos infraclaviculares ipsilaterales con o sin afectación axilar linfática (**N3a**); o en afectación clínicamente aparente de nódulos linfáticos mamarios internos ipsilaterales, en presencia de evidencia clínica de afectación axilar linfática (**N3b**); o en afectación de nódulos linfáticos supraclaviculares ipsilaterales con o sin afectación de nódulos axilares o internos mamarios (**N3c**)

M – Metástasis a distancia

MX. No se dispone de los requisitos mínimos para su evaluación

M0. Sin prueba de metástasis a distancia

M1. Con prueba de metástasis a distancia

A partir del sistema TNM se establece la clasificación clínica del cáncer de mama, es decir se define el estadio numérico o grado de dispersión de la neoplasia mamaria.

Estadios clínicos (96, 99)

Estadio	SR* a los 5 años	T	N	M
Estadio 0	100%	Tis	N0	M0
Estadio I	100%	T1	N0	M0
Estadio IIA	92%	T0	N1	M0
		T1	N1	M0
		T2	N0	M0
Estadio IIB	81%	T2	N1	M0
		T3	N0	M0
Estadio IIIA	67%	T0	N2	M0
		T1	N2	M0
		T2	N2	M0
		T3	N1, N2	M0
Estadio IIIB	54%	T4	N0, N1, N2	M0
Estadio IIIC		Tx	N3	M0
Estadio IV	20%	Tx	Nx	M1

*SR: supervivencia relativa

1.2.2. Clasificación histológica

Está basada en el estudio de las características tisulares específicas y diferenciales que presenta la neoplasia, en comparación con un tejido mamario normal (tipo histológico -TH-); además de su actividad y estructura celular (grado histológico -GH-). Esta clasificación solamente es aplicable a las neoplasias de carácter infiltrante.

1.2.2.1. Tipo histológico

La clasificación según el tipo histológico está basada en la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (WHO) (2).

Clasificación histológica de tumores mamarios

Tumores epiteliales

Carcinoma ductal infiltrante, sin otra especificación

- Carcinoma tipo mixto
- Carcinoma pleomórfico
- Carcinoma con células gigantes osteoclasticas
- Carcinoma con características coriocarcinomas
- Carcinoma con características melanotónicas
- Carcinoma lobular invasivo
- Carcinoma tubular
- Carcinoma cribiforme invasivo
- Carcinoma medular
- Carcinoma mucinoso y otros tumores con abundante mucina
 - Carcinoma mucinoso
 - Cistiadenocarcinoma y carcinoma mucinoso de célula columnar
 - Carcinoma *signet ring cell*
- Carcinoma neuroendocrino
 - Carcinoma neuroendocrino sólido
 - Tumor carcinoide atípico
 - Carcinoma de célula pequeña
 - Carcinoma neuroendocrino de célula grande
- Carcinoma papilar invasivo
- Carcinoma micropapilar invasivo
- Carcinoma apocrino
- Carcinomas metaplásicos
 - Carcinomas epiteliales metaplásicos puros
 - Carcinoma de célula escamosa
 - Adenocarcinoma con metaplasia de células fusiformes
 - Carcinoma adenoescamoso
 - Carcinoma mucoepidermoide

- Carcinoma metaplásico mixto epitelial/mesenquimal
- Carcinoma rico en lípidos
- Carcinoma secretor
- Carcinoma oncocítico
- Carcinoma cístico adenoide
- Carcinoma de célula acínica
- Carcinoma de célula clara rica en glicógeno
- Carcinoma sebáceo
- Carcinoma inflamatorio
- Neoplasia lobular
 - Carcinoma lobular *in situ*
- Lesiones proliferativas intraductales
 - Hiperplasia ductal usual
 - Atipia epitelial estrecha
 - Carcinoma ductal *in situ*
- Carcinoma microinvasivo
- Neoplasia papilar intraductal
 - Papiloma central
 - Papiloma periférico
 - Papiloma atípico
 - Carcinoma papilar intraductal
- Carcinoma papilar intracístico
- Proliferaciones epiteliales benignas
 - Adenosis y variantes
 - Adenosis esclerosante
 - Adenosis apocrina
 - Adenosis *blunt duct*
 - Adenosis microglandular
 - Adenosis adenomioepitelial
 - Lesión esclerosante compleja / cicatriz radial
- Adenomas
 - Adenoma tubular
 - Adenoma lactante
 - Adenoma apocrino
 - Adenoma pleomórfico
 - Adenoma ductal

<p>Lesiones mioepiteliales Mioepiteliosis Adenosis adenomioepitelial Adenomioepitelioma Mioepitelioma maligno</p> <p>Tumores mesenquimales Haemangioma Angiomatosis Haemoangiopericitoma Hiperplasia estromal pseudoangiomatosa Miofibroblastoma Fibromatosis (agresiva) Tumor miofibroblástico inflamatorio Lipoma Angiolipoma Tumor de célula granular Neurofibroma Sarcoma Angiosarcoma Liposarcoma Rabdomiosarcoma Osteosarcoma Leiomioma Leiomiosarcoma</p> <p>Tumores fibroepiteliales Fibroadenoma</p>	<p>Tumor filoide Benigno <i>Borderline</i> Maligno Sarcoma estromal periductal, bajo grado Hamartoma mamario</p> <p>Tumores del pezón Adenoma del pezón Adenoma siringomatoso Enfermedad de <i>Paget</i> del pezón</p> <p>Linfoma maligno Linfoma difuso de célula-B grande Linfoma de <i>Burkitt</i> Linfoma extranodal de célula-B de la zona marginal del tipo MALT Linfoma folicular</p> <p>Tumores metastásicos</p> <p>Tumores mamarios masculinos Ginecomastia Carcinoma Invasivo <i>In situ</i></p>
--	--

1.2.2.1.1. **Carcinoma ductal infiltrante**

En los carcinomas invasivos, como ya se ha descrito previamente, la proliferación celular ya no se limita a los ductos mamarios porque la estructura de la membrana queda alterada, y permite que las células tumorales inicien la dispersión hacia el resto del tejido mamario adyacente.

Los carcinomas invasivos mamarios más frecuentes son el carcinoma ductal invasivo, también llamado a menudo **carcinoma ductal infiltrante (CDI)** y el **carcinoma lobular infiltrante (CLI)** (2).

El **CDI** hace referencia a un grupo heterogéneo de tumores que carecen de características suficientes para que puedan ser categorizados como un tipo histológico específico (ver clasificación histológica tumores mamarios WHO) (2). El CDI es el tipo histológico de cáncer de mama invasivo más común, comprendiendo entre un 40% y un 75% (100). Como su nombre indica, se origina en el epitelio del revestimiento de los conductos galactóforos (98).

Macroscópicamente, estos tumores no tienen características específicas. Existe una marcada variación respecto al tamaño tumoral y configuración (2).

Las células tumorales pueden encontrarse organizadas en cuerdas, islotes y trabéculas, mientras que algunos tumores presentan un claro patrón infiltrante sólido o

sincitial con una pequeña parte de estroma asociado (**Fig. 7**). El citoplasma a menudo es abundante y eosinófilo. Los núcleos pueden ser regulares, uniformes o muy pleomórficos con prominencias, y a menudo, múltiples nucleolos. La actividad mitótica puede ser intensa o virtualmente ausente. Hasta un 80% de los casos presenta carcinoma ductal *in situ* (DCIS) asociado (101, 102). De nuevo, el componente estromal es extremadamente variable. Puede haber una elevada proliferación fibroblástica celular, un escaso tejido conectivo o una marcada hialinización (2).

Aproximadamente un 70-80% presentan expresión del receptor de estrógenos (ER) (103) y entre un 15 y un 30% presentan expresión de ERBB2 (104).

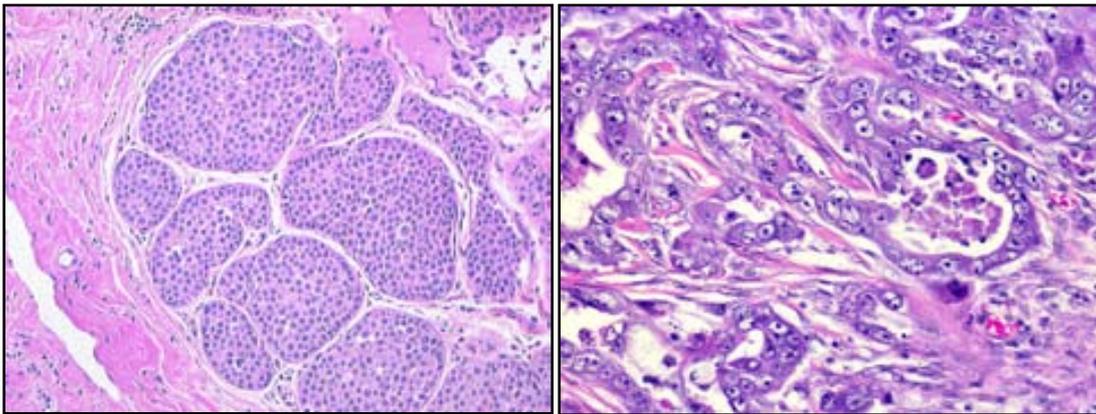


Fig. 7. Muestras de carcinoma ductal invasivo mamario. Visión microscópica.

1.2.2.2. Grado histológico

La clasificación histológica basada en el GH se realiza a partir del estudio y análisis de tres factores: **la formación tubular, el pleomorfismo nuclear y la actividad mitótica**. Para los tres factores anteriores se utiliza un sistema de puntuación numérico del uno al tres para asegurar que cada uno es evaluado individualmente (100).

- **Formación tubular:** expresión de la diferenciación glandular. Se analiza el % de estructuras del carcinoma formada por túbulos.
- **Pleomorfismo nuclear:** expresión de la uniformidad/irregularidad nuclear. Se observan el tamaño nuclear y la forma de las células epiteliales normales del tejido mamario adyacente. El incremento de la irregularidad nuclear de los márgenes tumorales y el número y tamaño de los nucleolos aportan información adicional para facilitar la puntuación.

- **Actividad mitótica:** evaluación del número de figuras mitóticas bien definidas. Si hubiera heterogeneidad mitótica en el tejido, se escogen las que presenten la mayor frecuencia mitótica.

El GH es un tipo de clasificación aplicada rutinariamente a todos los tumores mamarios invasivos, basada en el sistema **Scarff-Bloom-Richardson**. Muchos estudios han demostrado una asociación significativa entre el GH y la supervivencia en los carcinomas invasivos de mama (100). La asignación del GH mejoró su objetividad y eficiencia a raíz de las modificaciones realizadas por **Patley y Scarff** (105) y más recientemente por **Elston y Ellis** (106), todas ellas aplicadas al método inicialmente utilizado por **Bloom y Richardson** (107).

Grado histológico (100)

Formación tubular	Puntuación
> 75%	1
10-75%	2
Menos del 10%	3
Pleomorfismo celular	Puntuación
Menor, células uniformes	1
Moderado, variabilidad de formas y tamaño	2
Elevada variabilidad	3
Actividad mitótica	Puntuación
≤7	1
De 8 a 14	2
≥15	3

Los tres valores se suman obteniendo puntuaciones que oscilarán del tres al nueve, para las que el grado asignado será el siguiente:

- **Grado 1:** carcinoma bien diferenciado; de tres a cinco puntos.
- **Grado 2:** carcinoma moderadamente diferenciado; de seis a siete puntos.
- **Grado 3:** carcinoma pobremente diferenciado; de ocho a nueve puntos.

Esta clasificación ha sido criticada por algunos patólogos que afirman que no es apropiada para algunos tipos histológicos menos frecuentes como el tubular puro, el mucinoso, el medular, el lobular infiltrante y el cribiforme infiltrante, entre otros.

1.2.3. Clasificación molecular

Actualmente, los factores mayormente utilizados para clasificar a los pacientes con cáncer de mama, para la determinación del pronóstico y elección terapéutica adecuada son: la edad, la afectación ganglionar, el tamaño tumoral, las características histológicas, el estado hormonal y el estado del oncogén *HER2*. Sin embargo, la evaluación del riesgo individual de cada paciente a partir del análisis de los elementos anteriores es más limitada en el momento en que pacientes con similares características clínicas e histológicas presentan evoluciones y respuestas a tratamientos muy diferentes.

Durante los últimos años, diversas técnicas moleculares, en especial las orientadas a la obtención de perfiles de expresión génica, se han utilizado para ayudar a mejorar la clasificación, pronóstico y respuesta al tratamiento, así como la selección de la terapia más efectiva para el cáncer de mama. Estas nuevas técnicas parecen tener un claro potencial que ayudarían y complementarían en gran medida la información aportada por los factores predictivos y pronósticos tradicionales (108).

Hasta la fecha, los estudios de perfiles de expresión génica en cáncer de mama han identificado diversos subtipos generales de cáncer de mama: **luminal A**, **luminal B** (87, 108, 110, 111), **HER2** (108, 109, 112, 113), **basal-like** (85, 87, 108, 109, 114), **luminal C** (87, 108, 109) y los grupos *normal breast-like* (87, 108, 109). Estos subtipos difieren respecto a sus patrones de expresión génica, características clínicas, respuesta al tratamiento y evolución (**Tablas 3 y 4**).

TABLA 3. Clasificación molecular del cáncer de mama.

Característica / Tipo	LUMINAL A (Lum A) / B (Lum B)	HER2	BASAL-LIKE
Patrones de expresión	- Elevada expresión de receptores hormonales y proteínas asociadas (Lum A > Lum B)	- Elevada expresión de ERBB2 y otras proteínas presentes en el amplicón - Baja expresión de ER y proteínas asociadas	- Elevada expresión de proteínas epiteliales basales y citoquinas basales - Baja expresión de ER y proteínas asociadas - Baja expresión de ERBB2
Características clínicas	- +/- 70% de los cánceres de mama - ER +/- PR positivos - Tumores Lum B tienden a presentar mayor grado que los Lum A - Algunos sobreexpresan ERBB2 (Lum B)	- +/- 15% de los cánceres de mama - ER / PR negativos - Tienen a presentar un grado elevado y afectación ganglionar	- +/- 15% de los cánceres de mama - ER / PR / ERBB2 negativos (triples negativos - aunque no todos los triples negativos son <i>basal-like</i>) - EGFR y o CK5/6 positivos - Grado histológico 3 y elevado índice mitótico - Cánceres asociados a BRCA1 - Especialmente comunes en mujeres afroamericanas
Tratamiento, respuesta y evolución	- Respuesta a terapias endocrinas (diferencias entre Lum A y Lum B) - Respuestas variables a quimioterapia - Buen pronóstico	- Respuesta a Herceptin - Respuesta a quimioterapia basada en antraciclinas - Mal pronóstico	- No respuesta a terapia endocrina o Herceptin - Respuesta desconocida a platino e inhibidores PARP - Mal pronóstico (no homogéneo)

TABLA 4. Estado de los marcadores ER, PR y ERBB2 según el subtipo molecular de cáncer de mama.

Expresión marcador / Tipo	LUMINAL A	LUMINAL B	HER2	BASAL-LIKE
ER	+	+	-	-
PR	+	+ / -	-	-
ERBB2	-	+	+	-

1.3. Principales factores pronósticos

Un factor pronóstico es cualquier tipo de elemento cualitativo o cuantitativo representativo de las características que presenta el tumor y su entorno, que correlaciona con el supervivencia libre de enfermedad (SLE) o la supervivencia global (SG), sin la presencia de terapia adyuvante sistémica; por lo tanto, es todo factor capaz de ayudar a predecir la historia natural de la enfermedad. Es importante diferenciar un factor pronóstico, de un factor predictivo, que constituye cualquier medida asociada a la respuesta a un tratamiento específico (115). En teoría, la identificación, validación y aplicación de unos factores pronósticos adecuados ayudaría a asegurar que aquellos pacientes que reciban un tratamiento, puedan realmente beneficiarse de él (116). Dada la gran variabilidad clínica y la dificultad para poder predecir el comportamiento de los carcinomas de mama, se han descrito numerosos parámetros con la finalidad de permitir identificar aquellas características tumorales que tuvieran repercusión clínica (117).

Entre los más importantes y utilizados de forma rutinaria en la mayoría de centros de diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama destacan:

- **Afectación ganglionar**
- **Tamaño tumoral**
- **Estado de HER2**
- **Grado histológico**
- **Tipo histológico**
- **Estado de P53**
- **Edad en el momento del diagnóstico**
- **Marcadores de proliferación**
- **Receptores hormonales**

De entre todos ellos tal vez los de mayor relevancia son la afectación ganglionar, el tamaño tumoral y los receptores hormonales. El estado de *P53* se utiliza en el Hospital del Mar de forma rutinaria, pese a no ser todavía un marcador oficialmente aceptado. Además, son también de destacar otros marcadores pronósticos, algunos de ellos ya mencionados en las **Tablas 1 y 2**, cuyo uso todavía está limitado o se encuentran en fase de estudio.

1.3.1. Afectación ganglionar

Tal vez el indicador más importante para los pacientes con un tumor primario en la glándula mamaria es el estado de la afectación ganglionar, ya que los ganglios

linfáticos representan la principal vía de drenaje -que no la única- de la glándula mamaria. Existe una relación directa entre el número de ganglios axilares afectados y el riesgo de una futura recaída (118).

La mayoría de los protocolos clínicos clasifican los pacientes en 4 grupos nodales, a raíz de la información aportada por el *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP)*: ganglio negativo, de 1 a 3 ganglios positivos, de 4 a 9 ganglios positivos y de 10 o más ganglios positivos. Estos grupos presentan una supervivencia relativa a los cinco años de 82,8%, 73%, 45,7% y 28,4% respectivamente (119). Estos datos demuestran que el riesgo de recaída es significativamente importante en presencia de una afectación ganglionar positiva. Para los pacientes de bajo riesgo, especialmente aquellos que son ganglios negativos, es necesario un asesoramiento individualizado mediante el uso de otros factores pronósticos.

Tradicionalmente, la afectación ganglionar se ha obtenido mediante la disección axilar estándar en la que los ganglios linfáticos axilares de los niveles I y II eran extraídos. Actualmente, el uso de la biopsia del GC se ha extendido ampliamente. El estudio inicial de esta técnica fue aportado por **Giuliano et al.** por medio de la utilización de un tinte azul como marcador interno (120, 121).

Aunque la utilidad de esta técnica ya ha sido aprobada ampliamente, todavía existen muchos interrogantes que aclarar, incluyendo el método más adecuado para identificar el GC, así como el mejor método para analizar la afectación del ganglio en cuestión. El seccionamiento seriado de cada GC incrementa la sensibilidad así como el uso de la IHQ (inmunohistoquímica) para el análisis de los ganglios histológicamente negativos. Finalmente, todavía está por entender el significado pronóstico de las micrometástasis ocultas detectadas únicamente por medio de la IHQ (122-124).

1.3.2. Tamaño tumoral

El tamaño tumoral se correlaciona con la presencia y el número de ganglios linfáticos afectados y además constituye un factor pronóstico que correlaciona con el riesgo de recidiva o metástasis, ya que éste aumenta a medida que también lo hace el tamaño tumoral (115).

La influencia del tamaño del tumor primario en el pronóstico puede ser valorada en los casos con y sin afectación ganglionar. La relación probablemente refleja un aumento de la irrigación vascular y de la diseminación ganglionar a medida que tiene lugar el crecimiento progresivo del tumor (125).

El tamaño tumoral representa un factor de interés especial en los casos sin afectación ganglionar, en los que el tamaño aporta información relevante acerca del riesgo de recurrencia del paciente.

Un ejemplo de ello es el estudio que incluía a 13.464 mujeres afectadas de cáncer de mama sin afectación ganglionar. Las pacientes con tamaños tumorales <1 cm tenían un 99% de SG a los 5 años, en comparación con el 89% y 86% para los tumores de >1<3 cm y >3<5 cm (125). Además en el estudio posterior de **Rosen et al.** (126), esta asociación persistía con un seguimiento de mayor duración. Se analizó la relación entre el tamaño tumoral y el riesgo de recurrencia a los 20 años, encontrando una SLE de un 88%, 72% y 59% para los tumores de ≤1 cm, de >1,1<3 cm y de >3,1<5 cm respectivamente. Finalmente, el tiempo medio de aparición de enfermedad metastásica también se acortaba a medida que el tamaño se incrementaba (125, 127).

1.3.3. Oncogén HER2

El oncogén *HER2*, localizado en la región 17q21, se encuentra amplificado y/o expresado en aproximadamente un 30% de los tumores mamarios (53). Su sobreexpresión está asociada a un aumento de la agresividad tumoral y de la tasa de recurrencia. Como variable pronóstica independiente, su sobreexpresión está asociada a un mal pronóstico, pero este hecho está casi exclusivamente limitado a los pacientes con afectación ganglionar (128). En los pacientes sin afectación ganglionar, la influencia en el pronóstico es mucho más variable y no está claramente desligado de otros factores pronósticos (56). En este caso, la inconsistencia de *HER2* como factor pronóstico es evidente en el hecho de que menos de la mitad de los cánceres recurrentes presentan amplificación del mismo (129).

1.3.4. Expresión de P53

La expresión anómala de P53 está fuertemente asociada con otros marcadores de proliferación tumoral elevada, como son la sobreexpresión de ERBB2, aneuploidías, poca diferenciación tumoral...pero es independiente de otros factores como la edad, la afectación ganglionar y el tamaño tumoral (130, 131).

La expresión de la forma mutante de P53 tiene una influencia negativa tanto en la SG como en la SLE en pacientes con cáncer de mama (132).

La existencia de una estrecha relación entre la presencia de la forma mutante de P53 y la de otros marcadores de proliferación celular como Ki67, indica su importancia como factor pronóstico. No obstante, la falta de uniformidad en los métodos de análisis y ensayo es evidente, por lo que no está todavía reconocido como

tal (115). P53 se incluye como factor pronóstico en este apartado por ser utilizado en el Hospital del Mar.

1.3.5. Edad en el momento del diagnóstico

En general, el riesgo relativo de muerte por cáncer de mama se incrementa con la edad. A excepción de las mujeres menores de 40 años, cuya supervivencia es similar a las mujeres comprendidas entre los 50 y los 54 años, el curso de enfermedad más desfavorable lo poseen las mujeres de mayor edad (117).

Muchos estudios han analizado la influencia de la edad en el desarrollo del cáncer de mama, pero muchos de los resultados obtenidos son contradictorios (133, 134). No obstante, dos amplios análisis han demostrado que las pacientes menores de 35 años presentan un peor pronóstico, incluso después de ser aplicados otros factores pronósticos (135, 136).

1.3.6. Grado histológico

El GH es un importante indicador de agresividad y pronóstico (137). A partir del sistema *Scarff-Bloom-Richardson* (105, 107), mencionado previamente, se establecen los grados 1 (tumores bien diferenciados), 2 (tumores moderadamente diferenciados) y 3 (pobremente diferenciados).

Se ha observado, de forma independiente a otros factores, que la SG a los 5 años entre los grados 1 y 3 varía aproximadamente en un 45% (138).

1.3.7. Tipo histológico

Los carcinomas invasivos mamarios conllevan un claro potencial metastásico y una menor ratio de curación en comparación con los carcinomas *in situ*. No obstante las características específicas de cada tumor infiltrante determinan un mejor o peor pronóstico (115).

Algunos THs de carcinomas invasivos poseen un riesgo menor de diseminación y muerte, como son el carcinoma puro mucinoso, el puro tubular, el puro medular y el puro papilar (139-142). El carcinoma mucinoso, además, tiende a aparecer a una edad más tardía que el resto (143). El carcinoma medular presenta una menor malignidad en contraposición a su apariencia histológica claramente más agresiva, aunque puede ser más agresivo que los anteriores mencionados (142).

1.3.8. Receptores hormonales

Desde hace décadas se conoce la importancia de las hormonas esteroideas y de sus receptores en el correcto desarrollo y funcionamiento del tejido mamario, así como su implicación en la patogénesis y progresión del cáncer de mama. De ahí su relevancia no sólo como factor pronóstico de la enfermedad, sino también como factor predictivo (descrito más adelante) de respuesta a las terapias endocrinas (144).

A continuación se describe ampliamente el estado y funcionamiento de los receptores hormonales de estrógenos y de progesterona (ER y PR), tanto en el tejido mamario normal como en el patológico, así como su importancia e implicación en el cáncer de mama.

1.3.8.1. Receptores hormonales en el desarrollo y estructura celular de la glándula mamaria

La glándula mamaria no está completamente formada en el momento del nacimiento, sino que empieza a desarrollarse en la pubertad temprana; momento en que las estructuras primitivas ductales aumentan su tamaño y se ramifican (145). Una vez empiezan los ciclos menstruales ovulatorios, el sistema ductal se vuelve más complejo y las estructuras lobulares se forman al final de los ductos terminales formando las unidades lóbulo-ductales terminales (TDLUs). Estos ductos se diferenciarán para la síntesis y secreción de leche en la etapa avanzada de gestación y subsecuente lactancia (146).

Las hormonas esteroideas, como los **estrógenos** y la **progesterona**, intervienen de forma especialmente importante en este proceso de desarrollo y maduración mamaria. Mientras que los estrógenos, como el estradiol, estimulan -entre otras funciones- la **elongación ductal** y la **expresión del PR**, la progesterona induce el **desarrollo lóbulo-alveolar**. Estas hormonas ejercen sus funciones por medio de receptores específicos localizados en el tejido mamario (147).

El sistema ductal de la glándula mamaria está delimitado por una capa continua de células epiteliales luminales, que a su vez, se encuentra rodeada por una capa de células mioepiteliales (68). Estas células están en contacto directo con la membrana basal, mientras que las TDLUs están delimitadas por fibroblastos e inmersas en un estroma intralobular especial (148).

1.3.8.2. Receptor de estrógenos

El ER es un miembro de la súper familia de receptores nucleares, una familia de factores de transcripción regulados por ligando (149). El ER se puede expresar en dos isoformas diferentes, el **ER alpha** ($ER\alpha$) y el **ER beta** ($ER\beta$), que son codificados por genes diferentes (*ESR1* y *ESR2* respectivamente). El *ESR1* está localizado en la región 6q25.1, mientras que el *ESR2*, de menor tamaño, en la región 14q23.2. Además, por medio del *splicing* alternativo se obtienen diversas isoformas del ER en ambos casos. Por lo menos tres isoformas en el caso del $ER\alpha$ y cinco en el del $ER\beta$ (146). Aunque se conoce mucho menos sobre el $ER\beta$, es probable que presente funciones diferentes a las del $ER\alpha$, y que además éstas tengan efectos contrarios a los del $ER\alpha$ (150).

El $ER\alpha$ y el $ER\beta$ tienen similares, aunque no idénticas estructuras. Básicamente el ER está formado por un dominio de unión al ADN (DBD) flanqueado por dos dominios de activación transcripcional (AF-1 y AF-2). El receptor se une a su ligando por medio de su dominio de unión al ligando (LBD) (151).

En estudios en roedores se ha observado que tanto el $ER\alpha$ como el $ER\beta$ se expresan en la glándula mamaria normal (152) y que la expresión del $ER\alpha$ pero no del $ER\beta$ es crítica para el desarrollo ductal de la misma (153). En humanos, el ER también se expresa en la glándula mamaria normal (154).

El $ER\alpha$ se expresa en aproximadamente en un 7-10% de las células epiteliales luminales de la glándula mamaria madura; por el contrario el $ER\beta$ está presente en la mayoría de células epiteliales y mioepiteliales luminales, pudiendo ser detectado también en fibroblastos y otras células estromales (155).

Existen tres tipos de estrógenos que la mujer produce de forma natural (156, 157). En la mujer premenopáusica, el **17 β -estradiol** (E2), producido por el ovario, es el estrógeno presente en mayores cantidades y el más potente activador del ER por su gran afinidad al receptor. En la mujer premenopáusica, los niveles circulantes de estradiol fluctúan de 40 a 200-400 pb/mL durante el ciclo menstrual (156). Después de la menopausia, los niveles de estradiol caen considerablemente, a menos de 2 pg/mL por el cese de la actividad ovárica. El estradiol presenta la misma predisposición de unión para los dos tipos de ER. El segundo estrógeno endógeno es la **estrona**, un metabolito del estradiol menos potente que éste. La estrona se produce a partir de la androstenediona, el inmediato precursor de la estrona, en el tejido adiposo. En las mujeres postmenopáusicas, el ovario deja de producir estradiol, mientras que la glándula adrenal continúa produciendo androstenediona. Como resultado, el nivel de estrona se mantiene estable en la mujer, pero el nivel en plasma del estradiol cae

significativamente. La estrona se une preferencialmente al ER α . El tercer estrógeno endógeno es el **estriol** (E3), que resulta ser también un metabolito del estradiol. El estriol es el principal estrógeno producido por la placenta durante el embarazo, y se encuentra en cantidades más pequeñas que el estradiol y la estrona en las mujeres no embarazadas. El estriol se une al ER β (156, 157).

La mayor parte de los estudios existentes acerca de la biología del ER se han focalizado en su función como factor nuclear de transcripción; sin embargo el ER también puede unirse a otros factores de transcripción y proteínas y funcionar como coregulador de genes tradicionalmente no relacionados con los genes diana de los estrógenos. Además, evidencias recientes sugieren que los estrógenos se pueden unir al ER localizado en o cerca de la membrana plasmática y activar rápidamente otras vías de señalización (144). Recientemente se ha propuesto una nomenclatura específica para cada acción específica de los estrógenos por medio del ER, según si su localización y focalización de la acción inicial se encuentra en el núcleo o en la membrana plasmática (156):

- **Señalización esteroidea iniciada en el núcleo (NISS)**
- **Señalización esteroidea iniciada en la membrana (MISS)**

1.3.8.2.1. Señalización esteroidea iniciada en el núcleo

En ausencia de hormonas, el ER está mayoritariamente concentrado en el citosol. Cuando el estrógeno llega, traspasa la membrana celular, se une al ER (ER α o ER β) y tiene lugar la migración del receptor hacia el núcleo, así como su dimerización en forma de homodímeros (ER α - ER α) o heterodímeros (ER α - ER β) (158). Existen tres tipos de activación NISS que de forma general tiene lugar en el transcurso de horas:

- **Vía NISS clásica:** el dímero de ER se une a las secuencias de ADN de respuesta a estrógenos (ERE) en las regiones promotoras de los genes de activación estrogénica. Esta unión provoca el reclutamiento de proteínas coreguladoras (co-activadoras y co-represoras) hacia el promotor, que dirigen el incremento o disminución de los niveles de mRNA, la producción en menor y mayor cantidad de las proteínas para las que codifican y finalmente una respuesta fisiológica (158, 159) (**Fig. 8**).
- **Vía NISS no clásica:** el dímero de ER no necesita unirse a secuencias de ADN para modular la expresión génica, sino que lo hace a través de

factores de transcripción unidos a secuencias regulatorias alternativas de ADN, como son AP-1, SP-1 y los sitios USF, entre otros (144) (**Fig. 8**).

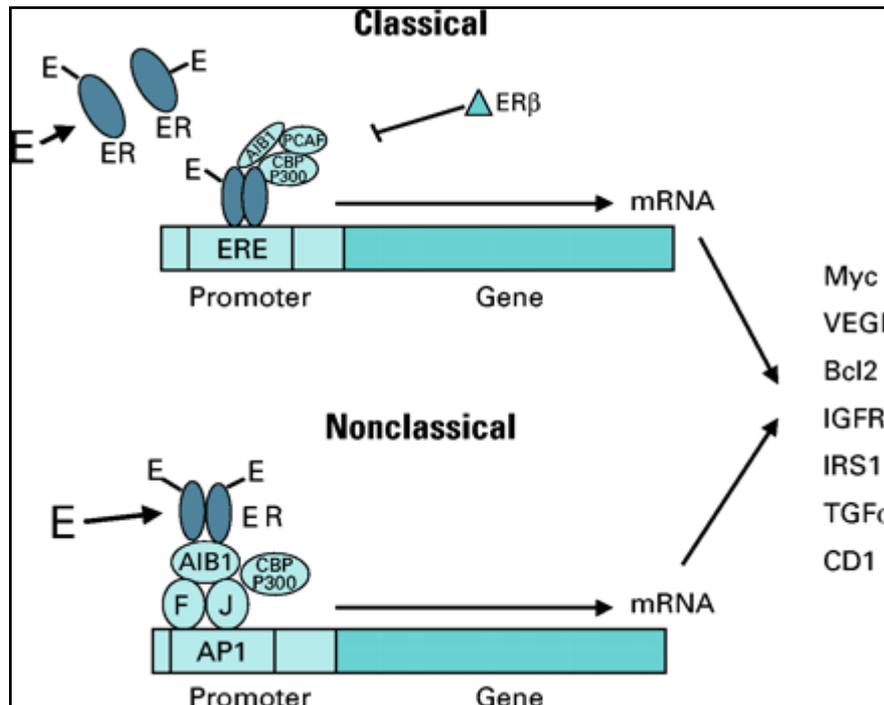


Fig. 8. Señalización nuclear iniciada por el estrógeno: vía NISS clásica (arriba) y vía NISS no clásica (abajo). Arriba: el estrógeno (E) se une al receptor de estrógenos (ER), induce su dimerización y activa su unión a los elementos de respuesta al estrógeno (ERE) en la región promotora de los genes diana. Proteínas coactivadoras son reclutadas al complejo y se activa la transcripción génica (vía clásica). El ERβ podrá antagonizar la actividad del ERα. Abajo: el ER unido a su ligando atrae complejos coactivadores a otros factores de transcripción como Fos (F) y Jun (J) para activar la transcripción génica a través de otras regiones promotoras como AP-1. Por el contrario, el reclutamiento de corepresores provoca la represión de la transcripción (160).

- **Vía NISS independiente de ligando:** además del estrógeno, otros estímulos pueden inducir la respuesta NISS de forma independiente al ligando. Factores de crecimiento como el factor de crecimiento de la insulina 1 (IGF-1), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), la heregulina - ligando de los receptores epidérmicos humanos como el ERBB2-, el factor de crecimiento transformante *alpha* (TGFα), neurotransmisores como la dopamina, moléculas de señalización como el monofosfato adenosín cíclico, e inhibidores de fosfatasa permeables de membrana, entre otros (144). Uno de los mecanismos más importantes para la activación ligando-independiente sería la fosforilación del ER o de sus coreguladores en sitios

específicos, inducida por factores de crecimiento y quinasas relacionadas con el estrés (161). El ER puede ser fosforilado en diversos sitios por múltiples quinasas como la quinasa reguladora extracelular 1 y 2 (ERK1, ERK2), las proteínas quinasas mitógeno-activadoras (MAPKs), la quinasa dependiente de ciclina 2 (CDK2), la proteína quinasa A y AKT. La activación de esta vía repercute en los genes regulados tanto por la vía NISS clásica como por la NISS no clásica (144).

1.3.8.2.2. Señalización esteroidea iniciada en la membrana

Además de la actuación del ER como factor de transcripción, evidencias crecientes muestran que el estrógeno puede provocar efectos celulares de rápida respuesta en cuestión de minutos, mucho antes de que tengan lugar cambios en la transcripción génica (162). El ER puede localizarse en o cerca de la cara interna de la membrana plasmática, donde puede interactuar y activar diversas vías de señalización (163-165). La acción del estrógeno vía ER α provoca respuestas celulares como el incremento de los niveles de calcio o de óxido nítrico así como la activación de múltiples cascadas de quinasas intracelulares como la de la proteína quinasa mitógeno-activadora (MAPK), de la fosfoinositol 3 quinasa (PI3K), del factor de crecimiento de la insulina (IGF), de la proteína quinasa A (PKA), de la proteína quinasa B (AKT) y de la proteína quinasa C (PKC) (158, 144).

1.3.8.3. Receptor de progesterona

Uno de los genes mayormente estudiados regulado por el ER es el *PR*, que media los efectos de la progesterona en el desarrollo de la glándula mamaria así como en el cáncer de mama (165). El *PR* se expresa a través de tres isoformas producto de un sólo gen localizado en la región 11q22-q23 y por medio del uso de diversas regiones promotoras contiguas y de inicio translacional. Las isoformas del *PR* consisten en una forma completa **PR-B** (116 kDa), una forma N-terminal truncada **PR-A** (94 kDa) y una isoforma **PR-C** (60 kDa). Al igual que el *ER*, el gen *PR* contiene una región DBD, una LBD y múltiples AFs. Las células positivas para la expresión del *PR* usualmente coexpresan las isoformas PR-A y PR-B; estos receptores tienen actividades transcripcionales diferentes dentro del mismo contexto promotor, pero pueden también reconocer diferentes promotores (166, 167). La expresión del PR-B es necesario para un correcto desarrollo de la glándula mamaria, mientras que la del PR-A es esencial para el desarrollo uterino y la función reproductora (168, 169). Además, estudios realizados en la glándula mamaria de roedores muestran que el PR es crítico

para el desarrollo lóbulo-alveolar de la glándula y que la *ratio* PR-A/PR-B es crítica para el correcto desarrollo de la glándula mamaria. El **PR-C** funciona como un inhibidor dominante del PR-B uterino durante la formación del miometrio (179).

En ausencia de progesterona, los PRs están unidos a diversas moléculas chaperonas como las *heat shock protein* (hsp); estas interacciones son un requisito para la formación de heterocomplejos estables PR-hsp90 que permitirán una correcta unión con el ligando (171). Cuando la progesterona se une a su receptor, éstos dimerizan y se produce la disociación de las hsp. Los receptores activados se unen directamente a regiones del ADN, concretamente a los elementos de respuesta de la progesterona (PREs) y a las secuencias PRE-like, todas ellas de las regiones promotoras de sus genes diana (172).

El PR se expresa, de la misma forma que el ER α , en un 7-10% de las células epiteliales del lumen de la glándula mamaria madura. Parece ser que las células que expresan el PR también contienen el ER α . Sin embargo, las células que expresarían estos receptores esteroideos estarían separadas, aunque cercanas, de las que muestran proliferación celular (155). Se cree por lo tanto que el estradiol y o la progesterona controlarían la actividad proliferativa de las células luminales epiteliales de forma indirecta mediante un mecanismo en el que las células receptoras actuarían como sensores hormonales, que al captar la señal segregarían al medio factores de crecimiento paracrinós positivos o negativos y o juxtacrinós. Esto atenuaría la sensibilidad del epitelio mamario a las hormonas esteroideas de forma que la proliferación sólo tendría lugar cuando la concentración de factores de crecimiento positivos fuera suficientemente elevada. Este hecho se alcanzaría después de una exposición prolongada a niveles elevados de esteroides y posiblemente a otras hormonas, como ocurre en el embarazo, por lo que significaría un mecanismo efectivo para la prevención de actividad proliferativa no deseada (173, 144).

1.3.8.4. Receptores hormonales en el cáncer de mama

Como ya se ha indicado previamente, en condiciones normales, la expresión del ER α y del PR en la glándula mamaria está limitada a un número reducido de células epiteliales luminales sin capacidad proliferativa (155).

El incremento de la expresión del ER α así como la disminución del ER β podría ser uno de los cambios más tempranos que tendrían lugar en el proceso tumorigénico mamario (174). A medida que la expresión de este receptor aumenta, tiene lugar una mayor disregulación en el equilibrio proliferativo del tejido, lo que provoca un aumento

del número de células que expresan tanto el ER α como el antígeno asociado a proliferación, ki67 (175) (**Fig. 9**).

Estudios sobre la expresión del PR en lesiones premalignas y preinvasivas de cáncer de mama sugieren que su expresión también aumenta a medida que se incrementa la atipia del tejido mamario. Se ha sugerido que la *ratio* entre el PR-A y el PR-B se altera durante la tumorigénesis, predominando la expresión del PR-A (**Fig. 9**).

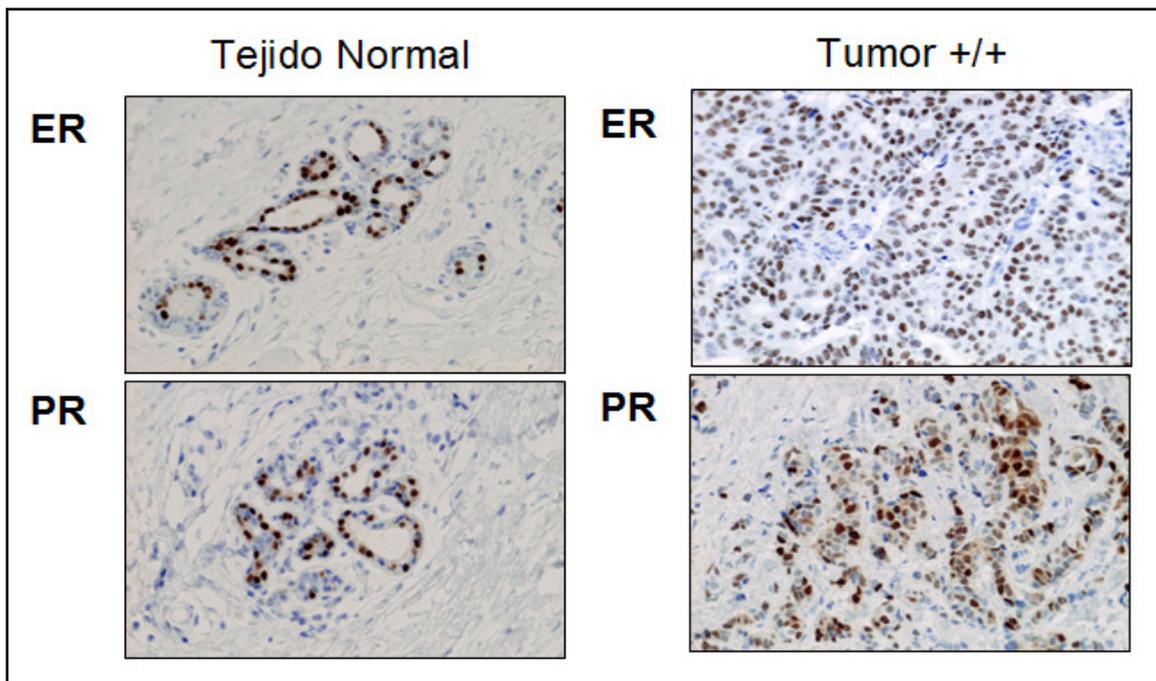


Fig. 9. Expresión de los ER y PR en el epitelio del lumen de la glándula mamaria. A la izquierda observamos un tejido sano en el que la expresión de ambos receptores está limitada a un número reducido de células. A la derecha observamos una región de un tumor mamario ER+/PR+ (positivo para ambos receptores) en el que la expresión de ambos receptores está repartida de forma homogénea por todo el tejido.

1.3.8.4.1. Cánceres de mama hormonales (ER+/PR+ vs ER+/PR-)

Aproximadamente un 75% de los cánceres de mama primarios expresan el ER y más de la mitad de ellos expresan también el PR; dentro del 25% restante se incluyen los tumores que no expresan ninguno de los dos receptores o tan sólo el PR (176). Todos los cánceres de mama que expresan al menos el ER son considerados cánceres de mama hormonales, puesto que su crecimiento depende en buena medida de la activación y actuación anómala de este receptor. Así pues encontramos dos subtipos de tumores mamarios dependiendo de su estado hormonal: los **ER+/PR+**, si expresan ambos receptores, y los **ER+/PR-**, si expresan sólo el ER. La expresión

negativa o positiva para cada receptor dependerá del % de células del tumor que lo expresan, y su detección se realiza por técnicas de IHQ.

Un gran avance en el tratamiento del cáncer de mama, fue la aparición de la primera terapia endocrina, el tamoxifen, cuya diana de actuación es el ER y por lo tanto contiene la capacidad de bloquear la proliferación celular derivada de la activación anómala de este receptor (177) -este punto es desarrollado más adelante en el apartado "1.4. Principales estrategias terapéuticas"- . Inicialmente a todos los cánceres de mama hormonales, es decir que como mínimo expresaran el ER, se les administraba tamoxifen. Con el tiempo se observó que la respuesta al tratamiento entre los dos subtipos de cáncer de mama mencionados era substancialmente distinta, siendo muy elevada en los ER+/PR+ (178, 179), mientras que muy pobre en los tumores ER+/PR- (180, 181). Todo ello llevó a la comunidad médica y científica a plantearse el por qué existía esta gran diferencia respecto a la efectividad del tratamiento, teniendo en cuenta que su diana de actuación era el ER y no el PR, y cuáles podían ser los mecanismos moleculares que provocaban la existencia de un tipo de tumor que no expresara el PR.

La activación del ER es necesaria para que tenga lugar la expresión del PR, por lo que tradicionalmente se pensó que los mecanismos de pérdida de su expresión, y por lo tanto de la existencia de los tumores ER+/PR-, podía ser debida a la presencia de un **ER defectuoso**, un **mal funcionamiento de la vía de señalización del ER** relacionada con la activación de la expresión del PR (182) o a una **disminución en los niveles de estrógeno circulante** -como ocurre en las mujeres postmenopáusicas- (183). Sin embargo, estos hechos no explicaban por qué algunos tumores ER+/PR- sí que respondían al tratamiento. Con el tiempo otros posibles mecanismos fueron descubiertos, como la **pérdida de heterocigocidad del locus génico del PR** (184, 185) así como la **hipermetilación del promotor del gen del PR** con su consecuente inactivación transcripcional (186). De nuevo, como ya había sucedido anteriormente, estos mecanismos tampoco podían explicar la resistencia de algunos tumores ER+/PR- a las terapias endocrinas, ya que éstas iban dirigidas de alguna forma u otra contra el ER y no tenía por qué influenciar en su respuesta la pérdida del gen del PR o la inactivación génica (**Fig. 10**).

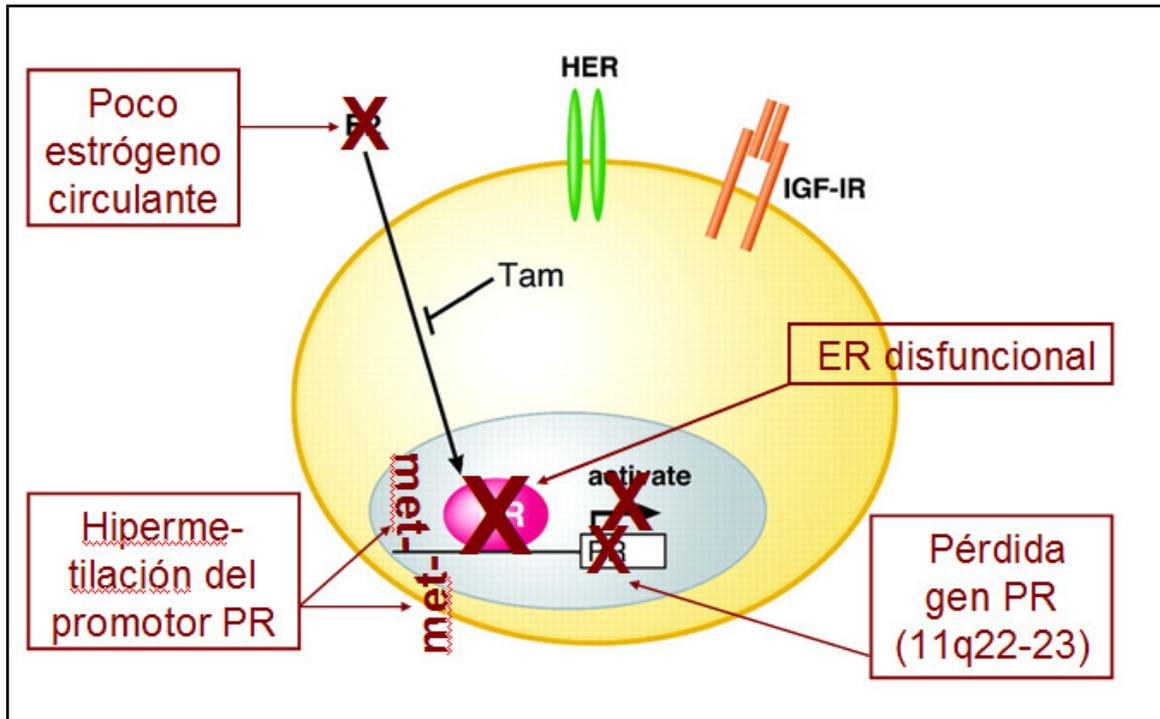


Fig. 10. Algunos de los mecanismos moleculares que podrían explicar la pérdida de expresión del PR en los tumores ER+/PR-: niveles bajos de estrógeno circulante, ER y vías de señalización del ER disfuncionales, hipermetilación del promotor del PR y pérdida de heterocigocidad del locus génico del PR. Abreviaturas: tam: tamoxifeno; met: metionina.

Recientemente algunos estudios sugieren un nuevo tipo de mecanismo para la pérdida de expresión del PR en el cáncer de mama (187). Éstos consisten en la relación a nivel molecular entre el ER y las vías de señalización de factores de crecimiento, así como de la relación entre los efectos de la vía NISS clásica y no clásica del ER. Básicamente se proponen dos alternativas diferentes, aunque probablemente complementarias. En primer lugar, parece ser que el **incremento** de la actividad de las **vías de señalización** relacionadas con factores de crecimiento como el **ERBB2**, el **IGF-IR** o el **EGFR**, provocarían una **disminución de la expresión del PR** a nivel de mRNA, y de forma independiente de los niveles de ER. La vía de la **PI3K/Akt** está especialmente involucrada en esta regulación negativa de los niveles de PR. En segundo lugar, evidencias experimentales sugieren que una **señalización hiperactiva de factores de crecimiento** puede **alterar la vías clásicas del ER**, de forma que se estimula la activación de la vía ligando independiente o de la vía MISS, lo que provocaría en ambos casos una **disminución del PR** (144).

En los últimos años, se ha intentado caracterizar clínica y patológicamente estos dos subtipos de tumores mamarios, así como identificar rasgos específicos para

el subgrupo ER+/PR-. Estudios recientes han observado una asociación de la **pérdida de expresión del PR con niveles bajos de ER**, una **mayor afectación ganglionar**, **aneuploidías**, **elevadas tasas de proliferación celular**, **un ligero mayor tamaño tumoral** y **una mayor fracción celular en fase S** (188). Además, gracias a los avances en las técnicas de citogenética molecular se han podido detectar, mediante el uso de la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y de la técnica de array de hibridación genómica comparada (CGH-array), alteraciones genéticas asociadas específicamente a los tumores ER+/PR-, como son ganancias en **11q13**, **12q14-q15**, **17q21-q25** y **20q13**, así como pérdidas en **11q13-15** (189). Por otra parte un estudio basado en el análisis de bases de datos de perfiles de expresión génica en tumores de mama ha descrito y enfatizado la presencia de una firma transcripcional específica basada en la vía de señalización **PI3K/Akt/mTOR** en estos tipos de tumores. A raíz de todos estos estudios, actualmente se piensa que los tumores ER+/PR+ y ER+/PR- representan en realidad entidades genéticas diferentes (191).

1.3.8.5. Receptores hormonales como factor pronóstico

La positividad del ER y PR en el cáncer de mama invasivo es un factor tanto pronóstico como predictivo (37) -éste último es tratado más adelante en el apartado "1.4.7.5. ER y PR como factores predictivos de terapia endocrina"- . Su efecto pronóstico es difícil de evaluar debido a que para ello debe ser realizado en ausencia de terapia adyuvante endocrina, y ésta es suministrada en la mayoría de los casos por el gran beneficio que representa para las pacientes (115).

En un estudio basado en pacientes con cáncer de mama en diversos estadios de desarrollo mostró que las mujeres que tenían tumores ER+ presentaban una SLE a los 5 años de un 74% y una SG de un 92%, mientras que en las mujeres con tumores ER- era de un 66% y 82%, respectivamente (192). No obstante, estudios con un mayor seguimiento, sugieren que el significado pronóstico de ambos receptores se va perdiendo con el tiempo. **Hilsenbeck et al.** (193) demostraron una mejora en el pronóstico para los tumores ER+ durante los tres primeros años de seguimiento pero no después de ellos. En general, parece ser que los pacientes con tumores ER+ presentan una mayor SLE después del tratamiento inicial, una mayor SG y mayor supervivencia después de recurrencia comparados con los pacientes con tumores ER- ; además esta ventaja sería independiente de la afectación ganglionar. Sin embargo, el valor del ER como factor pronóstico independiente disminuye por su asociación con otros indicadores ya establecidos de pronóstico también favorable. Los cánceres ER+

presentan en general un grado histológico menor, grado nuclear favorable, una fracción en fase S menor y un bajo índice de proliferación (194).

Respecto al PR, se ha observado una asociación de la pérdida de expresión del PR con niveles bajos de ER, una mayor afectación ganglionar, aneuploidías, elevadas tasas de proliferación celular, un ligero mayor tamaño tumoral y una mayor fracción celular en fase S (188). Su valor pronóstico está poco claro así como la etiología de los tumores ER+/PR-. Algunos estudios muestran que el estado del ER y del PR cambia a lo largo de la historia natural de la enfermedad o durante el tratamiento (195). Además, biopsias secuenciales de tumores mamarios muestran que los niveles del ER se reducen ligeramente con la administración de la terapia endocrina y pocas veces tiene lugar una pérdida total del receptor, sin embargo, los niveles de PR disminuyen mucho más drásticamente durante el mismo proceso, llegando a producirse la pérdida total del mismo en aproximadamente la mitad de los tumores, cuando tiene lugar el desarrollo de resistencia al tratamiento (196). Estos tumores entonces muestran un curso de enfermedad mucho más agresivo justo después de la pérdida del PR comparados con aquellos que mantienen su expresión. Por lo que la forma en que la ausencia inicial del PR o su pérdida posterior afecta al curso clínico de estos tumores, todavía está por aclarar (196, 197).

Es posible que la presencia del ER y PR prediga inicialmente una enfermedad de menor agresividad, de menor crecimiento tumoral y mayor tiempo de recurrencia, y que después de cierto tiempo de seguimiento ambos receptores pierdan su valor pronóstico inicial. Además, la pérdida posterior del PR podría suponer la adquisición de una mayor agresividad tumoral y un peor pronóstico y evolución de la enfermedad (144).

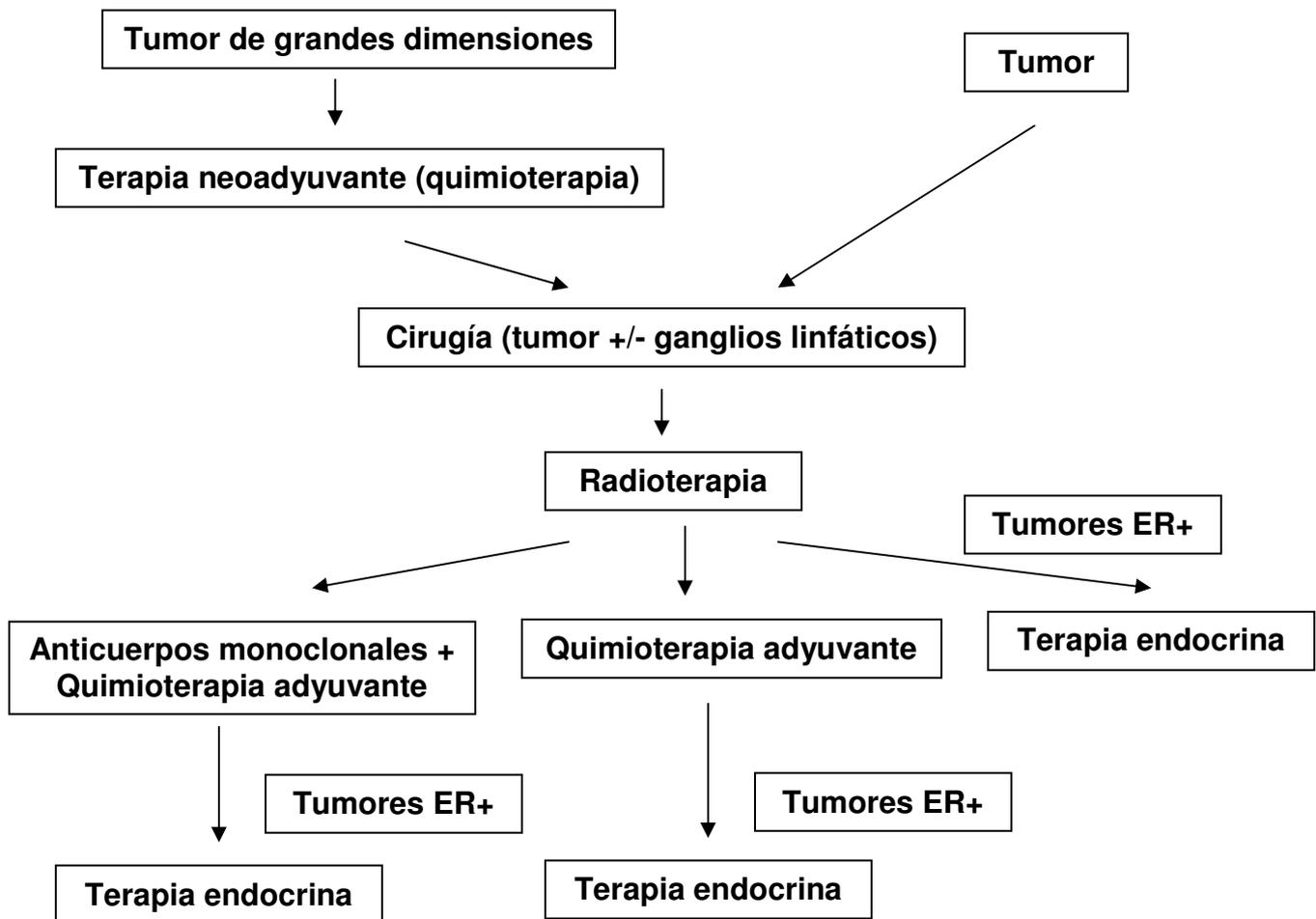
1.4. Principales estrategias terapéuticas

Los avances científicos y tecnológicos de los últimos años han proporcionado nuevos conocimientos sobre la aparición, desarrollo y crecimiento del cáncer, lo que se ha traducido en una mejora en los tratamientos de la enfermedad y una disminución de los efectos secundarios derivados de ellos. De tan sólo una o dos opciones que había en el pasado, actualmente existe una gran variedad de posibilidades de tratamiento dirigidas cada una de ellas hacia un tipo específico de cáncer de mama, y por lo tanto hacia un tratamiento personalizado más efectivo (198).

Las principales estrategias terapéuticas utilizadas en la actualidad son las siguientes:

- **Cirugía**
- **Radioterapia**
- **Quimioterapia**
- **Terapia dirigida (anticuerpos monoclonales)**
- **Terapia hormonal (terapia endocrina)**

El siguiente esquema representa de forma generalizada la secuencia de pasos a seguir respecto al tratamiento de un cáncer de mama infiltrante:



1.4.1. Cirugía

La cirugía es normalmente la primera línea de ataque contra un tumor mamario. La elección del tipo de cirugía depende de muchos factores, aunque básicamente vendrá determinado por el estadio en el que se encuentre el cáncer de mama. Actualmente existe la tendencia de practicar una cirugía tan conservadora como sea posible, aunque a veces no es posible y debe realizarse la extirpación total de la glándula mamaria; otras puede optarse por ambas opciones y recibir, en el caso

de la cirugía conservadora, radioterapia posterior (198). Existen diferentes tipos de cirugía -explicados a continuación- según la extensión de la zona extirpada.

1.4.1.1. Lumpectomía

La lumpectomía (**Fig. 11**) es la cirugía en la que sólo se extirpa el tumor mamario y parte del tejido adyacente. Es una forma de cirugía de conservación de la mama, lo que técnicamente se denomina como mastectomía parcial. Según la cantidad de tejido extirpado podemos encontrar diferentes tipos de lumpectomía; por ejemplo, hablaremos de cuadrantectomía, cuando se extrae aproximadamente un cuarto de la mama.

Después de la lumpectomía, todo el tejido extraído de la glándula mamaria es examinado cuidadosamente en busca de células cancerígenas presentes en los márgenes, es decir presentes en el tejido normal adyacente del tumor. En el caso de su existencia, se realizaría de nuevo una intervención quirúrgica, llamada re-escisión para extirpar el tejido cancerígeno remanente.

Como toda cirugía, la lumpectomía comporta ciertos riesgos como son la pérdida de sensación en parte de la mama y la pérdida de simetría entre ambas mamas, ya que la extirpación de tejido mamario provocará que la mama afectada aparente tener un menor tamaño. No obstante, éstos son pequeños inconvenientes al compararlos con una extirpación total de la mama o mastectomía (198).

Después de una lumpectomía se administran varios ciclos de radioterapia, lo que hace esta combinación de terapias tan efectiva como una mastectomía en tumores menores de 4 cm y márgenes libres de enfermedad. Generalmente se aplica radioterapia de 5 a 7 semanas, focalizada hacia la zona de extirpación del tumor para eliminar las posibles células cancerígenas que puedan quedar en el tejido adyacente después de la cirugía. La combinación de la lumpectomía y la radioterapia es comúnmente llamada terapia de conservación mamaria. Si fuera necesario además aplicar quimioterapia, ésta tendría lugar después de la radioterapia (198).

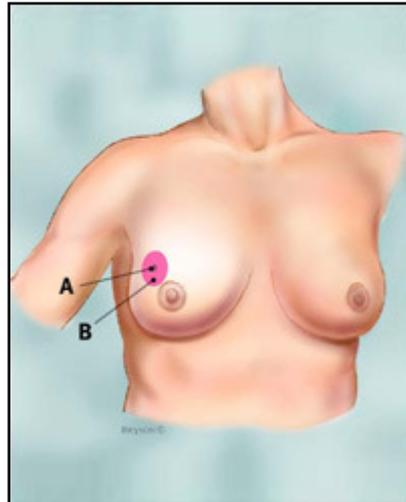


Fig. 11. Lumpectomía (zona de extirpación en color rosa). A: tumor; B: tejido adyacente.

1.4.1.2. Mastectomía

La mastectomía es la extirpación entera de la glándula mamaria. Las mastectomías comportan para muchas mujeres, a pesar del trauma físico y estético que puedan ocasionar, un estado de despreocupación futura por la enfermedad. No obstante, tienen algunas desventajas que deben ser consideradas, como un periodo mayor de recuperación post-intervención quirúrgica, la pérdida de función mamaria, la aplicación de cirugías posteriores si se estima conveniente la reconstrucción, así como posibles infecciones y formación de edemas. Hay cinco tipos de mastectomía (198):

- **Mastectomía simple o total**
- **Mastectomía radical modificada**
- **Mastectomía parcial**
- **Mastectomía radical**
- **Mastectomía subcutánea**

1.4.1.2.1. Mastectomía total

La mastectomía total (**Fig. 12**) se refiere a la mastectomía centrada únicamente en la glándula mamaria. La cirugía extirpa la mama entera sin tocar los ganglios linfáticos o músculos que la rodean. A veces algunos ganglios linfáticos se ven afectados debido a que están localizados en el área de extirpación de la mama. Este tipo de mastectomía es apropiada para mujeres con múltiples o grandes áreas de carcinoma ductal *in situ* (DCIS) y para las que necesitan una mastectomía profiláctica para prevenir la reproducción del cáncer de mama (198).

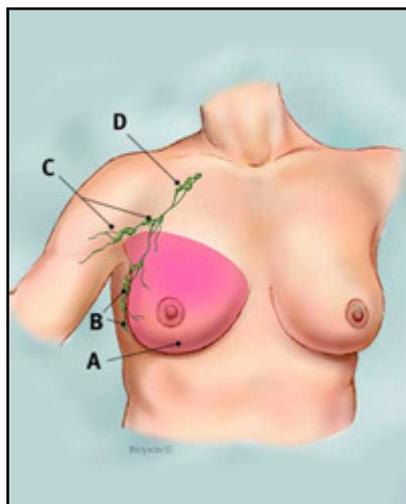


Fig. 12. Mastectomía total. Zona de extirpación en color rosa. A: Glándula mamaria; B, C y D: paquetes ganglionares.

1.4.1.2.2. Mastectomía radical modificada

La mastectomía radical modificada (**Fig. 13**) se refiere a la mastectomía que afecta a la glándula mamaria y a ganglios linfáticos. La cirugía extrae la mama entera y los ganglios linfáticos de los niveles I y II (B y C en la imagen, **Fig.13**). Los músculos no se ven afectados. La mayoría de mujeres con cánceres de mama invasivos que deciden pasar por una mastectomía, recibirán una mastectomía radical modificada para que parte de los ganglios linfáticos puedan ser examinados y poder determinar si células cancerígenas han podido dispersarse a través de la mama (198).

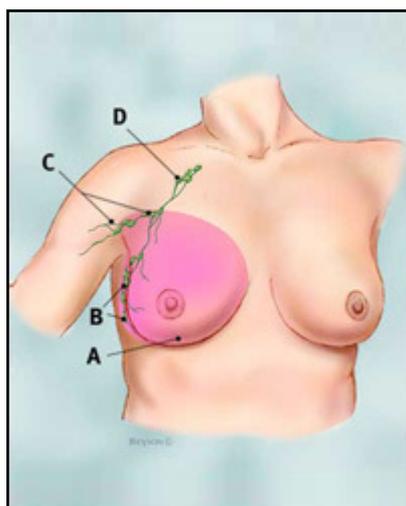


Fig. 13. Mastectomía radical modificada. Zona de extirpación en color rosa. A: glándula mamaria; B, C y D: paquetes ganglionares.

1.4.1.2.3. Mastectomía parcial

La mastectomía parcial se refiere a la mastectomía en la que se extirpa la parte cancerígena del tejido mamario y parte del tejido normal adyacente. Aunque la lumpectomía sería técnicamente una forma de mastectomía parcial, en este caso se extirpa mucho más tejido (198)

1.4.1.2.4. Mastectomía radical

La mastectomía radical (**Fig. 14**) se refiere a la mastectomía más extensa de entre los diferentes tipos existentes. La cirugía extirpa toda la glándula mamaria así como los niveles I, II y III (B, C y D en la imagen, **Fig. 14**). También son extraídos los músculos pectorales localizados bajo la mama. La mastectomía radical está recomendada tan sólo para aquellos casos en los que el cáncer de mama se ha expandido hacia los músculos pectorales inframamarios. Aunque en el pasado se realizaba de forma rutinaria, actualmente se realiza en muy pocas ocasiones, siendo igualmente efectiva la mastectomía radical modificada (198).

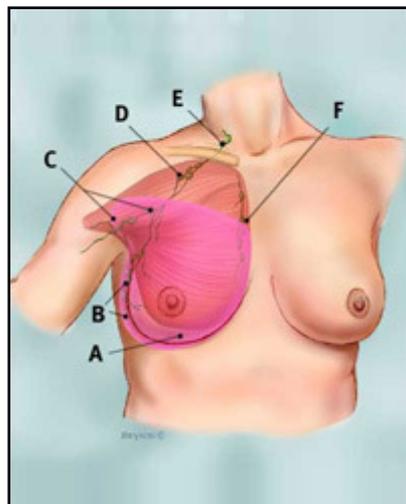


Fig. 14. Mastectomía radical. Zona de extirpación en color rosa. A: glándula mamaria y músculos pectorales; B, C, D y E: paquetes ganglionares;

1.4.1.2.5. Mastectomía subcutánea

La mastectomía subcutánea se refiere a la mastectomía en la que todo el tejido mamario es extirpado excepto el pezón. Se realiza de forma mucho menos frecuente que las mastectomías simples o totales porque se deja más tejido mamario que podría posteriormente desarrollar cáncer. Además algunos cirujanos han observado una peor

reconstrucción mamaria y posibles complicaciones posteriores en este tipo de casos (198).

1.4.2. Radioterapia

La radioterapia es un tipo de terapia altamente dirigida a destruir las células cancerígenas de la glándula mamaria que puedan haber quedado tras la operación quirúrgica. Es un método muy efectivo y puede reducir el riesgo de recaída en un 70%. (198).

La radioterapia utiliza una clase especial de energía de alta frecuencia invisible al ojo humano que puede dañar el ADN de las células, especialmente el de las células cancerígenas, debido a que presentan una elevada tasa de crecimiento y división celular, por lo que su material genético es más difícil de reparar si se producen lesiones (198, 199). Existen dos tipos de radioterapia:

- **Externa:** se utiliza una máquina que irradia la energía al área donde se encuentra el tumor.
- **Interna:** se utiliza una sustancia radioactiva sellada con agujas, semillas, alambres o catéteres que se colocan internamente dentro o cerca de la zona afectada.

En algunos casos además, se recomienda el uso de la hipertermia en combinación con la radioterapia. La hipertermia, también llamada terapia termal o termoterapia, utiliza una fuente de energía, como los ultrasonidos, que calienta las células cancerígenas. Parece ser que esta terapia sensibiliza más este tipo de células a la radioterapia.

Las investigaciones demuestran que las pacientes tratadas con radioterapia después de la lumpectomía presentan una mayor longevidad y mayor SLE en comparación con aquéllas que no recibieron radioterapia. Además se ha observado que estas pacientes presentan un 60% más de riesgo de recidiva (199). Los efectos secundarios de este tipo de terapia se limitan a la sección de piel que ha sido tratada. Puede aparecer irritación, escozor, picor, descamación, quemaduras de bajo grado, enrojecimiento... efectos que gradualmente desaparecen con el tiempo (198).

1.4.3. Quimioterapia

La quimioterapia representa junto con la terapia hormonal el tratamiento más utilizado en cáncer de mama. Mientras que la terapia endocrina persigue la detención de la progresión del cáncer, la quimioterapia erradica las células cancerígenas. Éstas

tienden a crecer y dividirse muy rápidamente sin orden ni control por lo que son dianas potenciales de los agentes quimioterapéuticos. Las células normales crecen y se dividen de forma precisa y ordenada, no obstante, algunos tipos celulares lo hacen rápidamente por la constante renovación celular del tejido en el que se encuentran, como ocurre en los folículos pilosos, las uñas, la boca, el tracto digestivo y la médula ósea, por lo que éstos pueden quedar también afectados (41, 198). Existen diferentes tipos de familias quimioterapéuticas contra el cáncer de mama (entre paréntesis el nombre comercial) (198):

- **Alquilantes:** se intercalan en el ADN evitando que la célula cancerígena se divida. A esta familia pertenecen el bisulfán, cisplatino, ciclofosfamida (Cytosano), dacarbazina, tiotepa (Tiotepa), ifosfamida, mecloretamina y melfalán.
- **Antimetabolitos:** interfieren en la duplicación del ADN y del ARN celular. Se encuentran en este grupo el 5-fluorouracilo (Acrucil), folex (Metotrexato), gemcitabina (Gemzar) y capecitabina (Xeloda).
- **Antibióticos antitumorales (antraciclinas):** actúan sobre el ADN deteniendo la acción de ciertas enzimas que intervienen en la mitosis celular. Algunos de ellos son: la daunorubicina (Cerubidina), doxorubicina (Adriamicina), epirubicina (Ellence), mitoxantrone (Novantrone) y mutamicina (Mitomicina).
- **Inhibidores de la mitosis (taxanos):** son sustancias de origen natural que frenan la mitosis. Estos inhibidores incluyen el paclitaxel (Abraxano), docetaxel (Taxotere), vincristina (Oncovina) y vinorelbina (Navalbina).

La quimioterapia se administra generalmente por vía intravenosa; algunas veces pueden darse agentes quimioterapéuticos por vía oral o incluso intramuscular. Normalmente transcurren de una a cuatro semanas entre dos ciclos de quimioterapia, que vienen determinados por el grado de la enfermedad y la tolerancia a los efectos secundarios del tratamiento (198).

Generalmente la quimioterapia se administra después de la radioterapia, ésta es la denominada **quimioterapia adyuvante**. No obstante, en aquellos casos en los que existe un cáncer localmente avanzado, de más de 3 cm o que presente adenopatía axilar (afectación ganglionar positiva), se puede administrar quimioterapia

previa a la intervención quirúrgica, es la denominada **quimioterapia neoadyuvante**, lo que ayuda a la reducción del tamaño del tumor antes de su extirpación (198).

La quimioterapia se utiliza para tratar cánceres de mama invasivos poco avanzados y así destruir las células remanentes que puedan quedar después de la cirugía, reduciendo el riesgo de recaída, además de tratar cánceres en estado avanzado para destruir el mayor número de células cancerígenas.

En muchos casos, los agentes quimioterapéuticos son combinados, lo que significa que se administran dos o tres diferentes al mismo tiempo. Estas combinaciones son conocidas como regímenes terapéuticos (198).

1.4.4. Terapia dirigida (anticuerpos monoclonales)

Las terapias dirigidas son tratamientos que utilizan dianas específicas localizadas en las células cancerígenas, como cierto tipo de proteínas que permiten a estas células crecer de una forma anormalmente rápida. Generalmente son menos agresivas contra las células sanas que la quimioterapia. Algunas terapias dirigidas son moléculas que funcionan de forma similar a la de los anticuerpos que genera nuestro sistema inmune de forma natural, son las llamadas terapias inmunes dirigidas (198). Actualmente destacan el **Herceptin**, el **Tykerb** y el **Avastin**.

1.4.4.1. Herceptin

Su nombre químico es **trastuzumab**. Se utiliza para los llamados cánceres de mama **HER2 positivos** (HER2+) como terapia adyuvante tanto en la enfermedad metastásica como en los tumores poco avanzados, en los que bloquea la capacidad de las células malignas de recibir señales de división celular a través de su unión en la membrana celular. Este tratamiento se puede aplicar de forma efectiva tanto antes como después de la cirugía.

Los tumores HER2+ son aquellos que contienen células con un número anormal de copias del gen *HER2*, lo que se traduce generalmente en una sobreexpresión de la proteína para la que codifica. Ésta es un receptor de membrana que funciona como una antena receptora de señales en la superficie celular; señales que estimulan el crecimiento y división celular. En las células tumorales que contienen un número de receptores anormalmente alto, el crecimiento y división celular tiene lugar a demasiada velocidad. El Herceptin se adhiere específicamente a los receptores HER2 y bloquea así la transmisión de señales y activación de las vías de señalización; además actúa como señal mediante la cual el sistema inmune es capaz de reconocer y actuar sobre las células tumorales (200, 201) (**Fig. 15**).

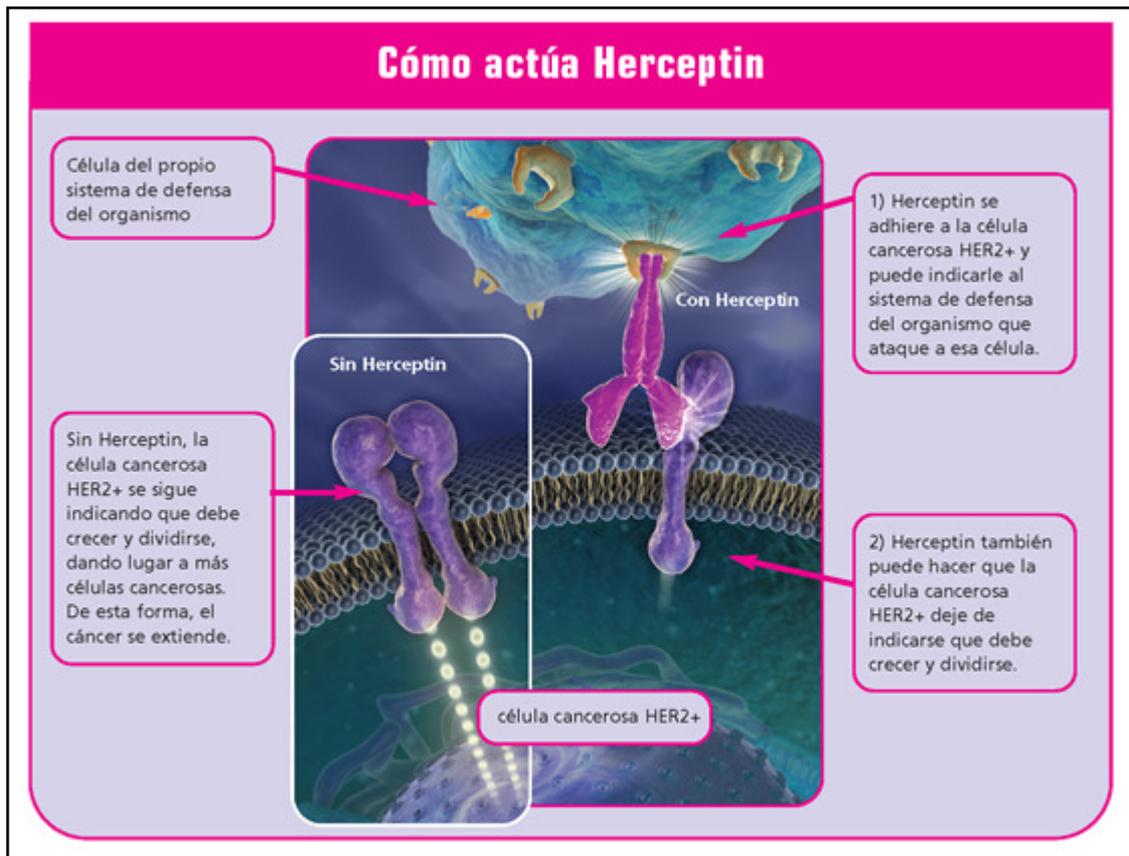


Fig. 15. Actuación del Herceptin en una célula tumoral. En condiciones normales, el receptor ERBB2 está localizado en la membrana plasmática en forma de monómeros. La llegada del ligando provoca su dimerización, activación y transmisión de la señal de división y crecimiento celular. El Herceptin se une a los monómeros ERBB2 e impide su dimerización y por lo tanto su posterior activación y transmisión de la señal.

Existen tres tipos de técnicas para identificar tumores mamarios HER2+ y que por lo tanto puedan beneficiarse del Herceptin:

- **IHQ:** es la técnica más utilizada. Utiliza una puntuación de 0 a 3+, según la cantidad de proteína que exista en el tumor. Si el valor obtenido es 0 ó 1, se considera un tumor HER2- (HER2 negativo). Si el valor del tumor es 3+, la paciente recibirá Herceptin. Si por el contrario es 2+, debe realizarse previamente la confirmación por la técnica de FISH para darlo como HER2+ y beneficiarse así del tratamiento (198).
- **FISH:** muestra el número de copias del gen *HER2* presente en las células tumorales. Cuantas más copias del gen, más receptores presentará la célula. Se establece una *ratio* entre el número de copias del gen y el número de copias del centrómero del cromosoma 17, donde está localizado

este receptor. Si esta ratio es ≥ 2 se considera amplificación del gen y por lo tanto HER2+ (202).

- **CISH** (hibridación *in situ* cromogénica): muestra el número de copias del gen *HER2* por medio de la tinción del ADN. Se utiliza el test *SpoT-Light HER2 CISH* que provoca el cambio de color del gen para facilitar su identificación (198).

El Herceptin sólo puede administrarse vía intravenosa. Puede presentar efectos secundarios de diversa gravedad; generalmente provoca síntomas parecidos a una gripe en aproximadamente un 40% de las pacientes como son fiebre, náuseas y dolores musculares. Los efectos secundarios suelen disminuir después del primer tratamiento, aunque todo dependerá del régimen de tratamiento que se esté administrando. Se han descrito algunos efectos secundarios severos como daños coronarios y coagulación sanguínea en un 5-30% de pacientes. Además también se han observado, aunque en muy pocos casos, complicaciones respiratorias relacionadas seguramente con reacciones alérgicas y con toxicidad pulmonar (202).

1.4.4.2. Tykerb

Su nombre químico es **lapatinib**. Se utiliza para los cánceres de mama HER2+ en los que bloquea las proteínas quinasas del interior celular que en estas condiciones facilitarían un crecimiento celular descontrolado. Actualmente el uso del Tykerb está aprobado en combinación con el Xeloda (capecitabina), para pacientes con cánceres de mama HER2+ en estado avanzado que han dejado de responder positivamente a las antraciclinas, los taxanos y el Herceptin; también está indicado en combinación con el Femara (letrozole) -un tipo de terapia endocrina-, en pacientes postmenopáusicas con cáncer de mama en estado avanzado HER2+ y ER+ (198).

El Tykerb puede generar algunos efectos secundarios, generalmente de poca gravedad y que pueden ser tratados de forma sencilla, como diarrea, vómitos y fatiga.

1.4.4.3. Avastin

Su nombre químico es **bevacizumab**. Se utiliza para el bloqueo del crecimiento y formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) de los que las células malignas dependerían para sobrevivir. Actualmente el uso del Avastin está aprobado en combinación con el Taxol para pacientes con cánceres de mama metastáticos HER2- que todavía no han recibido quimioterapia. Se administra de forma intravenosa y sus efectos secundarios pueden incluir sangrados nasales, aumento de la presión

sanguínea o aumento proteínico en la orina. En algunos casos se han descrito efectos más severos como coágulos sanguíneos, perforación intestinal, paradas cardíacas, disfunción renal y disminución de leucocitos (198).

1.4.5. Terapia hormonal

La terapia hormonal o terapia endocrina (TE), comprende un conjunto de estrategias terapéuticas utilizadas en los cánceres de mama hormonales, es decir que como mínimo expresan el ER, puesto que su diana de actuación se centra en este receptor. Por lo tanto, no serían efectivas en los tumores ER-. La terapia hormonal es una estrategia terapéutica completamente diferente aunque a menudo confundida con la terapia de reemplazo hormonal, que puede ser administrada a mujeres durante o al término de la menopausia para evitar o paliar algunos de sus efectos. La terapia de reemplazo hormonal no es un tratamiento contra el cáncer de mama y tampoco es utilizada en pacientes diagnosticadas de esta enfermedad.

La TE actúa en líneas generales de dos formas distintas: disminuyendo la cantidad de estrógenos en el cuerpo y o bloqueando la acción del estrógeno en las células tumorales mamarias. Existen diferentes tipos de TE:

- **Ablación endocrina**
- **Moduladores selectivos del ER (SERMs)**
- **Inhibidores de aromatasa (IAs)**
- **Disminuidores selectivos del ER (SERDs)**

1.4.5.1. Ablación endocrina

En las mujeres premenopáusicas, la mayor parte del estrógeno presente en el cuerpo es producido por los ovarios. En los tumores ER+, esta hormona es responsable en gran medida del crecimiento celular, por lo que la reducción de la cantidad de estrógeno en el cuerpo puede ayudar a la disminución de la proliferación celular descontrolada así como a la reducción del riesgo de recaída en este tipo de cáncer de mama (198).

En algunos casos, los ovarios (generalmente las trompas de Falopio) son extraídos quirúrgicamente, lo que se conoce con el nombre de extracción ovárica protectora o profiláctica o también **ooperectomía profiláctica**. Por otra parte, tratamientos químicos pueden utilizarse temporalmente para detener la producción estrogénica ovárica, proceso conocido como **deprivación estrogénica ovárica**. Estos dos tipos de tratamiento sólo pueden ser aplicados a mujeres premenopáusicas (198).

1.4.5.1.1. Ooperoctomía profiláctica

Desde su aplicación son muchos los estudios que demuestran que la ooperoctomía profiláctica, es decir la extirpación de los ovarios en las mujeres premenopáusicas, reduce el riesgo de cáncer de mama entre las mujeres con un alto riesgo de padecerlo y quienes todavía no han sido diagnosticadas de la enfermedad. El alto riesgo se refiere generalmente a las mujeres con resultados positivos para el test de los genes *BRCA1* y *BRCA2*, o a aquéllas que tienen una fuerte historia familiar de cáncer de mama, ovario o ambos (203). Según el *National Cancer Institute*, la profilaxis ovárica reduciría el número de nuevos casos de cáncer de mama entre las mujeres de alto riesgo en un 50%. Este beneficio sólo se alcanzaría si la extirpación ovárica se realizara antes de la menopausia (198).

Parece ser que las mujeres premenopáusicas a las que se les extirparon los ovarios y además se les administró tamoxifen durante 5 años después del tratamiento quirúrgico, presentaban un menor riesgo de recaída de cáncer de mama y mejor supervivencia comparadas con aquéllas que no recibieron el medicamento. Aunque este tratamiento se considera agresivo debido a que somete a las mujeres a un estado menopáusico permanente, se considera una buena opción terapéutica para aquéllas que no quieran tener niños biológicos o que presenten un alto riesgo de recaída. Además, pese a que la mayor parte del estrógeno presente en el cuerpo de una mujer proviene de los ovarios, existe una pequeña cantidad del mismo con un origen distinto, como el del tejido adiposo donde un esteroide producido en las glándulas adrenales se convierte en estrógeno. De ahí estriba la importancia de la administración de tamoxifen después de la profilaxis ovárica en el bloqueo del efecto de cualquier estrógeno del cuerpo (204).

1.4.5.1.2. Deprivación estrogénica ovárica

La deprivación estrogénica consiste en un proceso mediante el cual se detiene la fabricación de estrógenos en el ovario, a partir de la administración de tratamientos específicos. Actualmente se utilizan el Zoladex (nombre químico: goserelin) y el Lupron (nombre químico: leuprolide). Ambos medicamentos son agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), que activan en el cerebro las señales encargadas de provocar la detención de la fabricación de estrógenos en los ovarios. Se administran mediante inyecciones una vez al mes durante varios meses o cada pocos meses. Una vez se detiene el tratamiento, los ovarios vuelven a funcionar normalmente (198).

1.4.5.2. Moduladores selectivos del receptor de estrógenos

Los SERMs, son capaces de bloquear los efectos del estrógeno en el tejido mamario. Los SERMs se unen al ER en las células mamarias, no dejando lugar a su posible unión con el estrógeno, por lo que la célula no recibe las señales estrogénicas de crecimiento y multiplicación. Las células de otros tejidos del cuerpo, como las de los huesos y el útero, también tienen ERs, pero éstos presentan una estructura ligeramente diferente a la de los ER de los otros tejidos. Como su nombre indica, los SERMs son selectivos, es decir que un SERM que bloquea la acción del estrógeno en las células mamarias, funcionando como antagonista, puede activar su acción en otras células como el hueso, el hígado y el útero, donde funcionaría como agonista estrogénico (198).

Los SERMs pueden presentar algunos efectos secundarios de diversa gravedad, incluyendo coágulos sanguíneos y cáncer de endometrio. Los más comunes son fatiga, sofocos, sudores nocturnos, hemorragias vaginales y cambios de estado de ánimo. Respecto a los sofocos y sudores nocturnos, pese a su incomodidad y problemática, parece ser que las mujeres que los experimentan durante la ingestión de la terapia presentan menos riesgo de recaída de cáncer de mama, lo que indicaría que este tipo de efecto secundario es un marcador de buena respuesta al tratamiento. Además, los SERMs también pueden mejorar la densidad ósea, reduciendo el riesgo de sufrir una afección común en las mujeres postmenopáusicas como es la osteoporosis (198).

En los años 60 se descubrió el primer SERM, el trifeniletileno tamoxifen o como se conoce popularmente tamoxifen, y fueron demostrados sus efectos antiproliferativos en la glándula mamaria. Los SERMs pueden ser divididos en tres grandes categorías (177):

- **Derivados del trifeniletileno**
- **Otros componentes no esteroideos**
- **Componentes esteroideos antiestrogénicos** (actualmente considerados SERDs y por ello comentados en el apartado: “1.4.5.4. Disminuidores selectivos del receptor de estrógenos”)

1.4.5.2.1. Derivados del trifeniletileno

En este grupo destacan el **tamoxifen**, el **toremifeno** y el **droloxifeno**, siendo los dos primeros los de mayor importancia y uso hasta la fecha.

- ✓ **Tamoxifen:** conocido también como Nolvadex, fue desarrollado hace más de 30 años y aprobado por el *United States Food and Drug Administration* en 1977 para el tratamiento del cáncer de mama avanzado (205). Tiene afinidad por el ER al igual que el 17-*beta*-estradiol (206). El tamoxifen y sus metabolitos tienen una vida media de larga duración en el sérum y puede persistir en los tejidos durante varios meses incluso después de la detención del tratamiento (207). Al igual que otros SERMs se une al ER en las células tumorales mamarias y antagoniza los efectos del estrógeno en una gran variedad de genes reguladores del crecimiento (208). Su efecto predominante es citoestático, estimulando el bloqueo de la fase G1 del ciclo celular. Además, el tamoxifen también induce la apoptosis (205, 209).

En la mayoría de tejidos el tamoxifen funciona predominantemente como un estrógeno. Debido a esta actividad, en el hígado por ejemplo la concentración sérica de colesterol total y de lipoproteínas de colesterol de baja densidad disminuyen con el tratamiento (210). También en el tejido óseo preserva la densidad ósea en las mujeres postmenopáusicas (211, 212). El efecto de mayor gravedad del tamoxifen es consecuencia de su actividad estrogénica en el endometrio, que puede desencadenar hiperplasia endometrial y cánceres de endometrio de bajo grado (213, 214).

El tamoxifen es el tratamiento hormonal estándar para las mujeres premenopáusicas diagnosticadas de un cáncer de mama ER+, y para las mujeres postmenopáusicas que no recibirán inhibidores de aromataasa. Este tratamiento suele tener una duración de unos 5 años, pudiendo rebajarse a 2 ó 3 según el caso (198).

El tamoxifen se utiliza en: cáncer de mama ER+ de estadio temprano para reducir el riesgo de recaída después de la cirugía, cáncer de mama ER+ de estadio avanzado o metastático para reducir el riesgo de recaída después de la cirugía, y mujeres con alto riesgo de padecer cáncer de mama para reducir el riesgo de aparición de la enfermedad (198).

El tamoxifen puede: reducir el riesgo de recaída entre un 40 y un 50% en mujeres postmenopáusicas, así como entre un 30 y un 50% en las premenopáusicas, reducir el riesgo de aparición de un nuevo cáncer de mama en la otra glándula mamaria en un 50%, disminuir el tamaño tumoral en los cánceres de mama ER+ antes de la cirugía, reducir o detener el crecimiento de los cánceres de mama ER+ metastáticos en mujeres postmenopáusicas y premenopáusicas, y disminuir el riesgo de padecer cáncer de mama en las mujeres con un alto índice de riesgo de enfermedad pero que todavía no han

sido diagnosticadas (198).

Algunas personas no reciben un beneficio completo de la administración del tamoxifen. El cuerpo utiliza la enzima CYP2D6 para convertir el tamoxifen en su metabolito activo. Puede suceder que no haya suficiente enzima o ésta no funcione correctamente como para metabolizarlo en cantidades efectivas para el paciente o que la ingesta de otros medicamentos junto al tamoxifen provoquen la pérdida de la eficacia de la enzima (198, 215).

- ✓ **Toremifeno:** conocido también como Fareston, tiene una actividad muy similar a la del tamoxifen (115). Su uso fue aprobado para los cánceres de mama ER+ de mujeres postmenopáusicas con enfermedad metastásica. A diferencia del tamoxifen, el toremifeno no se ve afectado por el estado de la enzima CYP2D6, por lo que este medicamento puede representar una buena opción para aquellas personas con una enzima disfuncional o si se hiciera necesaria la ingesta de otro medicamento que afectara también a dicha enzima. Los efectos secundarios son parecidos a los que presenta el tamoxifen (198).

1.4.5.2.2. Otros componentes no esteroideos

En este grupo destacan el **EM-800** y **EM-652**, el **LY353381** (SERM1) y **LY357489** y el **raloxifeno**, siendo éste el más importante (177).

- ✓ **Raloxifeno:** conocido también como Evista, es un derivado del benzotifeno y representa el más estudiado de los SERMs de nueva generación. Se une al ER con la misma afinidad que el estradiol (216). Su actividad es similar a la del tamoxifen excepto por el hecho que tiene menor actividad estrogénica agonista en el endometrio (217). Además su eficacia tampoco se ve afectada por la enzima CYP26.

El raloxifeno se utiliza en: cáncer de mama ER+ en mujeres postmenopáusicas que todavía no han sido diagnosticadas de enfermedad pero que presentan un alto riesgo de padecerla, en mujeres postmenopáusicas diagnosticadas de osteoporosis y que todavía no han sido diagnosticadas de cáncer de mama, y para el tratamiento y la prevención de la osteoporosis en mujeres postmenopáusicas. Hasta la fecha no se utiliza en mujeres con cáncer de mama ya diagnosticado (198).

1.4.5.3. Inhibidores de aromatasa

Los IAs bloquean la actividad de la enzima aromatasa, que se encarga de la conversión de la androstenediona y testosterona en estrona y estradiol. La aromatasa se expresa en tejidos como el músculo y el tejido adiposo tanto en mujeres posmenopáusicas como en las premenopáusicas. Estos tejidos se convierten en la fuente predominante de estrógenos en las mujeres postmenopáusicas (218). Actualmente existen dos clases de IAs. Los inhibidores de tipo I y los inhibidores de tipo II. Los de tipo I se unen irreversiblemente a la aromatasa y tienen una estructura esteroideal, como la exemastona (**Aromasin**). Los de tipo II se unen a la aromatasa de forma reversible y son agentes de estructura no esferoidal, como el anastrozole (**Arimidex**) y el letrozole (**Femara**) (218). Los diferentes mecanismos de acción reducen resistencias cruzadas y permiten que la terapia sea prolongada utilizando diferentes inhibidores (219). En pacientes con un riesgo elevado de padecer cáncer de mama así como en aquéllas dónde la enfermedad se encuentra avanzada, los IAs han demostrado buenos resultados (220).

Los IAs parecen mostrar ciertas ventajas y unos efectos secundarios menores que los asociados a la terapia con tamoxifen, aunque también carecen de los efectos beneficiosos sobre el metabolismo lipídico y óseo. Además pueden causar problemas coronarios de mayor gravedad y mayor pérdida ósea u osteoporosis, al menos durante los primeros 5 años. El efecto secundario más común es el dolor de articulaciones. Los IAs se administran después del tratamiento inicial (cirugía y posiblemente radio y quimioterapia) (198).

Los IAs se utilizan en: cáncer de mama ER+ de estadios poco avanzados en mujeres postmenopáusicas como mejor elección de terapia endocrina; mujeres postmenopáusicas diagnosticadas de cáncer de mama metastático ER+ que han recibido 2 ó 3 años de tamoxifen; para continuar hasta los 5 años de terapia hormonal con IAs. Este cambio presenta más beneficio que 5 años de tamoxifen; mujeres postmenopáusicas que han recibido 5 años de tamoxifen, para continuar con 5 años más de terapia hormonal con IAs. Parece ser que reduce el riesgo de recaída en comparación con la detención del tratamiento después del tamoxifen; y mujeres diagnosticadas de cáncer de mama metastático ER+ que han recibido 2 ó 3 años de tamoxifen (198).

El estudio ATAC (*Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination*) realizado de forma multicéntrica con 9.366 pacientes, comparó los efectos del tamoxifen con el anastrozole, sólo o en combinación como terapia endocrina adyuvante en mujeres postmenopáusicas con cáncer de mama invasivo operable de bajo grado. El primer

análisis mostró que la SLE resultaba más larga y de forma general mejor tolerancia con anastrozole que con tamoxifen. Esta observación se mantuvo en análisis posteriores con una media de seguimiento de 47 meses para la eficacia del medicamento y 37 meses para su seguridad y tolerancia (180).

1.4.5.4. Disminuidores selectivos del receptor de estrógenos

Los SERDs bloquean los efectos del estrógeno en el tejido mamario de forma similar a los SERMs, como el tamoxifen. Los SERDs se colocan en el ER de forma que el estrógeno ya no puede unirse a él y por lo tanto la célula no recibiría las señales de crecimiento y multiplicación. Pero a diferencia del tamoxifen, los SERDs tienen la capacidad de inducir la reducción del número de ERs así como de alterar su forma provocando su disfunción (198).

Actualmente hay un SERD disponible para el tratamiento de cánceres de mama ER+, el **Faslodex** o fulvestrant. Este SERM es un derivado del estradiol cuyo mecanismo de acción antiestrogénico difiere significativamente de otros SERMs. El Faslodex bloquea la transactivación del ER a nivel de los dominios AF-1 y AF-2, además también impide la dimerización del receptor e induce su degradación. Es por lo tanto un potente inhibidor de la transcripción de los genes regulados por el ER (221).

Se utiliza en mujeres postmenopáusicas con cáncer de mama ER+ metastásico que han dejado de responder a la terapia endocrina. El Faslodex parece funcionar tan bien como el IA anastrozole a la hora de ralentizar o detener el crecimiento metastático en el tipo de cáncer mencionado después de que el tamoxifen haya dejado de funcionar. Los efectos secundarios más comunes del Faslodex son parecidos a los que presentan la mayoría de SERMs (198).

Los estudios realizados hasta la fecha muestran que aunque el Faslodex puede no ser el mejor SERM como tratamiento preventivo en mujeres normales debido a sus fuertes efectos antiestrogénicos, podría ser un importante agente antitumoral (177).

1.4.5.5. ER y PR como factores predictivos de terapia hormonal

El estado del ER en el tumor mamario es un predictor de respuesta a la TE. En el tratamiento adyuvante, un meta-análisis mostró que el tamoxifen reducía significativamente la recurrencia y muerte en pacientes con tumores ER+ (49). Resultados similares se han obtenido en dos estudios prospectivos que analizaron el efecto del tamoxifen en tumores ER-, así como en estudios retrospectivos de varios

ensayos clínicos (222). Además, muchos estudios han demostrado que la respuesta a este fármaco está directamente relacionada con los niveles de ER (178).

Aunque el valor predictor del ER respecto a la terapia endocrina está ampliamente aceptado, el del PR ha sido algo más controvertido (144). Por ejemplo, en un análisis global de todos los estudios de TE en cáncer de mama observó que el estado del PR no era capaz de predecir el hipotético beneficio de la TE (49). Sin embargo, la variabilidad en la metodología de los ensayos utilizados y la falta de controles de calidad en muchos laboratorios cuestionó estos resultados. Recientemente se ha publicado un estudio retrospectivo basado en dos grandes bases de datos de pacientes con cáncer de mama en estado poco avanzado de la enfermedad, tratados con TE y cuyos valores de ER y PR fueron analizados en dos laboratorios clínicos con controles estandarizados de calidad (179). En este estudio, se observó que pacientes con tumores ER+/PR+ se beneficiaban en mayor medida de la TE adyuvante que los pacientes con tumores ER+/PR-. Análisis multivariados mostraron que tanto el ER como el PR eran predictores independientes de SG, con una reducción del riesgo relativo de fallecimiento significativamente más elevada en los tumores ER+/PR- respecto a los ER+/PR+. Además, el PR todavía conservaba su valor incluso cuando el ER se consideró como una variable continua, indicando que la información predictiva del PR es independiente de los niveles cuantitativos del ER y que por lo tanto el PR aporta información predictiva junto con el ER (179). El valor predictivo del PR en el tratamiento adyuvante con tamoxifen también ha sido demostrado en dos pequeños estudios (223, 224).

De acuerdo con el valor predictivo del PR en el tratamiento adyuvante, varios estudios muestran que valores elevados de PR correlacionan independientemente con una mayor probabilidad de respuesta al tamoxifen, mayor tiempo de fallo al tratamiento y mayor supervivencia en pacientes con enfermedad metastásica (47). Como ocurre con el ER, la respuesta está directamente y positivamente relacionada con los niveles de PR (178). De forma similar, dos estudios recientes de neoadyuvancia mostraron una mejor respuesta (evolución clínica y *ratio* de proliferación) a la terapia endocrina en los tumores PR+ en comparación a los PR- (225, 226).

1.5. Técnicas aplicadas al análisis genético

El análisis citogenético de las células tumorales ha revelado la presencia de alteraciones cromosómicas clonales en más de 30.000 neoplasias humanas (227). Hoy en día sabemos que la presencia de determinadas alteraciones cromosómicas

aporta información importante con valor diagnóstico y pronóstico en neoplasias hematológicas y tumores sólidos (228, 229).

Desde su aparición, los métodos de análisis citogenéticos evolucionaron progresivamente y con el tiempo llegaron a formar parte de la rutina clínica, aportando valiosa información sobre la patología a tratar. A menudo, el conocimiento de la alteración cromosómica asociada a un determinado diagnóstico permite realizar un seguimiento de la evolución de la enfermedad, valorar la respuesta al tratamiento y detectar y cuantificar la enfermedad mínima residual (230). Buena parte del progreso alcanzado en este campo fue debido inicialmente al desarrollo y aplicación de la **citogenética convencional (CC)**.

En los últimos años, el desarrollo de nuevas técnicas de análisis citogenético y biología molecular y el perfeccionamiento de las ya existentes, ha permitido un gran avance en el estudio y descubrimiento de un mayor número de anomalías genéticas ligadas a un cierto tipo de patología, así como su repercusión clínica. La CC ha dado paso a la **citogenética molecular** que incluye técnicas como la **FISH** (231) -sobre una muestra o sobre **arrays de tejido (TMAs)**-, el **multicolor-FISH (M-FISH)** y el **cariotipo espectral (Sky)** (232), la **CGH** (233) y los **arrays de CGH (CGH-array)**(234)...basadas todas ellas en el fundamento metodológico de la técnica de hibridación *in situ* (HIS) (235-237). A continuación se describen las técnicas de análisis genético relacionadas directamente con este estudio.

1.5.1. Citogenética convencional

La **CC** es la disciplina que permite el estudio y análisis del número y estructura de los cromosomas de células en metafase obtenidas tras el cultivo *in vitro* de las mismas. Desde la observación en los años 60 por **Nowell y Hungerford** de la aparición de un pequeño cromosoma, al que denominaron *Philadelphia* (Ph) en pacientes con leucemia mieloide crónica (238), y la posterior descripción en los años 70 por **Caspersson** de técnicas de bandeado cromosómico, el análisis citogenético convencional ha sido en los últimos 30 años, una de las áreas de la genética que se ha desarrollado con mayor rapidez (239).

En el caso de las neoplasias hematológicas, debido a la relativa facilidad de obtener metafases de calidad a partir de cultivos de médula ósea, el análisis citogenético convencional se ha incorporado en los laboratorios de genética como una técnica de rutina, que complementa al diagnóstico morfológico e inmunofenotípico. Además, el hecho de ser una técnica que permite analizar todo el genoma humano y su bajo coste económico despertó un gran interés, facilitando su uso y aplicación de

forma generalizada (240). Sin embargo, en el caso de los tumores sólidos, como los tumores de la glándula mamaria, la existencia de factores, fundamentalmente metodológicos, frenó la incorporación de esta tecnología a la rutina diagnóstica, de forma que pudiera complementar al diagnóstico anátomo-patológico (**Fig. 16**).

Entre los obstáculos técnicos para obtener metafases analizables a partir de muestras de tumor cabe destacar, entre otros: dificultad en la obtención de crecimiento *in vitro* de tumores primarios, de metafases con alteraciones y de metafases de buena calidad; necesidad de disgregación enzimática de la muestra; contaminación microbiana; presencia “contaminante” de células no patológicas y, por último, debido al tiempo de manifestación clínica de la mayor parte de los tumores, la ocurrencia de alteraciones cromosómicas muy complejas y variables que hacen difícil determinar el cambio cromosómico primario asociado con un tipo de tumor (241).

La técnica de CC sigue de forma general el siguiente procedimiento (242):

- Incubación de la muestra en medio de crecimiento con nutrientes, antibióticos y agentes inductores de la mitosis.
- Adición al medio de cultivo de una agente antibiótico (colchicina) que permite detener la división celular en metafase.
- Inducción de un choque hipotónico para romper las membranas celulares del cultivo.
- Fijación de los núcleos en suspensión para conservar la estructura cromosómica.
- Realización de la extensión celular sobre un portaobjetos y envejecimiento en placa calefactora.
- Tinción de las extensiones.

En el caso de los tumores sólidos es necesario realizar previamente una disgregación y digestión del tejido así como realizar un control del crecimiento celular para determinar el mejor momento de extracción del cultivo (242).

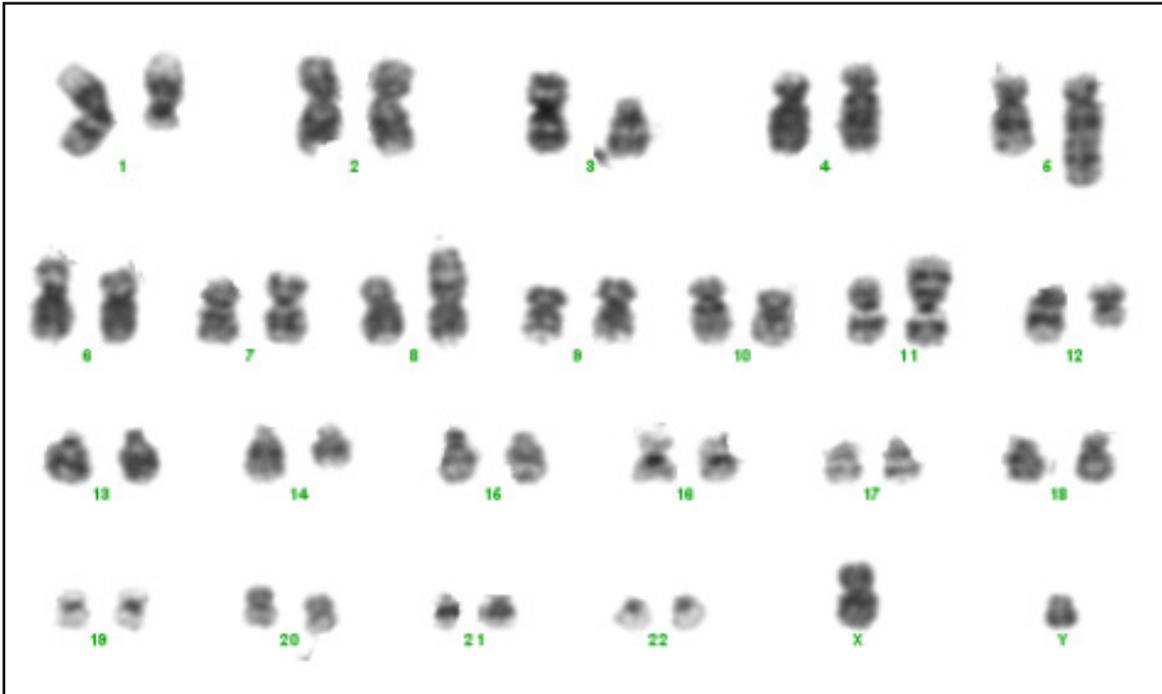


Fig. 16. Cariotipo de una muestra de tumor de mama cultivado en el laboratorio. En él se observan múltiples alteraciones cromosómicas, como son translocaciones, deleciones y adiciones.

1.5.1.1. Caracterización por citogenética convencional de carcinomas mamarios

En el año 2002, **Teixeira et al.** (243) publicaron una revisión acerca del perfil citogenético de los tumores mamarios basada en artículos originales publicados entre los años 1992-2001. Fueron descritas alteraciones clonales de un total de 322 muestras de 256 pacientes, y se observó que aunque las muestras mostraban alteraciones no aleatorias eran también muy heterogéneas (**Tabla 5**).

Se describieron 6.067 regiones cromosómicas ganadas, de entre las que destacaban: **1q11-q44** (31,3-35,2% de los casos), **7p22-q36** (18,4-21,5%), **8q11-q24** (10,2-11,3%), **20p13-q13** (10,5-10,9%), **12p13-q24** (10,2-10,9%), **16p11-p13** (9,8-10,2%), y **18p11-q23** (9,4-9,8%). Las ganancias más comunes correspondían a cromosomas enteros (**+7, +12, +18, +20**) o a brazos de cromosomas (**+1q, +8q, +16p**). Por otra parte, se observaron 12.168 regiones perdidas, de entre las que destacaban: **3p13-p14** (21,9-23,4%), **16q22-q24** (21,5-23,4%), **16q11-q21** (15,2-19,1%), **Xp22-q28** (13,3-17,2%), **8p21-p23** (13,3-15,6%), **13p11-q34** (13,3-15,5%), **3p21** (14,8%), **4p12-p16** (12,5-14,1%), **17p11-p13** (12,1-14,1%), **1q42-q44** (13,3-13,7%), **22p11-q13** (12,1-13,7%), **10p12-p15** (12,1-13,3%), **3p12** (12,5%), y **6q27, 10q26, 11p15, y 11q23** (12,1%)(243).

Además, los cariotipos casi triploides fueron observados únicamente en los carcinomas ductales, así como una gran parte de las translocaciones cromosómicas no equilibradas (243).

Tabla 5. Alteraciones cromosómicas recurrentes en cáncer de mama que han sido detectadas al menos una vez como único cambio. *Sole change*: único cambio. *Chromosomal change*: cambio cromosómico. *All cases*: todos los casos

Chromosomal change	All cases (%)	Sole change		Sole change/all cases
		Monoclonal	Polyclonal	
Structural				
del(3)(p12~13p14~21)	33 (13%)	10	19	88%
der(1;16)(q10;p10)	31 (12%)	9	11	65%
i(1)(q10)	24 (9%)	3	9	50%
del(1)(q11~12)	13 (5%)	1	9	77%
del(6)(q21~23)	10 (4%)	2	3	50%
del(1)(q42)	9 (4%)	2	4	67%
del(7)(q31~32)	6 (2%)	1	2	50%
del(1)(q25~31)	5 (2%)	0	2	40%
t(1;16)(q21;q13)	3 (1%)	0	3	100%
del(1)(q21)	3 (1%)	0	1	33%
der(1)t(1;8)(p12~13;q11)	2 (1%)	0	1	50%
der(1;3)(q10;q10)	2 (1%)	0	1	50%
der(1;15)(q10;q10)	2 (1%)	1	0	50%
del(2)(q11)	2 (1%)	0	1	50%
inv(7)(p22q11)	2 (1%)	0	1	50%
Numerical				
+7	44 (17%)	7	14	48%
-X	37 (15%)	2	3	14%
-18	27 (11%)	0	3	11%
+20	26 (10%)	0	4	15%
+18	25 (10%)	5	8	52%
+12	24 (10%)	1	2	13%
+3	24 (10%)	1	1	4%
+X	20 (8%)	3	3	30%
-19	18 (7%)	0	3	17%
+8	17 (7%)	1	1	12%
+1	7 (3%)	0	2	29%
+11	6 (2%)	1	1	33%
-Y	4 (2%)	1	1	50%

1.5.2. Hibridación in situ fluorescente

La técnica de **FISH** convencional permite detectar y localizar secuencias específicas de ADN o ARN sobre preparaciones cromosómicas, extensiones celulares, cortes de tejido y cortes ultrafinos utilizados para el estudio al microscopio electrónico (231).

Los dos componentes principales de la técnica de FISH son la sonda de ADN, previamente marcada directa o indirectamente con moléculas fluorescentes, y la secuencia diana en la muestra tumoral para la cual es específica. La base metodológica requiere inicialmente de una desnaturalización tanto del ADN de la muestra como del ADN de la sonda utilizada (que deberá ser complementaria al fragmento de ADN que se desee estudiar). Dicho proceso tiene lugar a partir de la

rotura de los puentes de hidrógeno que unen la doble hélice del ADN mediante la utilización de temperaturas elevadas (70º-80ºC). Posteriormente se procede a hibridar ambos ADN de modo que se produzca la unión entre ambos por complementariedad de bases. El resultado de la hibridación se interpretará microscópicamente y teniendo en cuenta el tipo de sonda utilizada (244).

Es importante destacar que no es una técnica de búsqueda de nuevas alteraciones cromosómicas, sino que detecta únicamente aquello que *a priori* se ha diseñado. El resto del genoma permanece oculto (244).

Podemos utilizar sondas de ADN de distintos tipos (**Fig. 17**): **centroméricas** (marcan únicamente las zonas centroméricas y permiten detectar alteraciones cromosómicas numéricas sobre metafase y núcleos interfásicos), de **pintado cromosómico** (constituidas por una librería de sondas que abarcan todo un cromosoma y permiten visualizar alteraciones citogenéticas numéricas y estructurales sobre metafases y confirmar de forma inequívoca cariotipos con translocaciones complejas o con cromosomas marcadores) y las de **secuencia única** o locus específico (marcan regiones cromosómicas muy concretas y permiten detectar alteraciones numéricas y estructurales sobre metafases y núcleos interfásicos) (244).

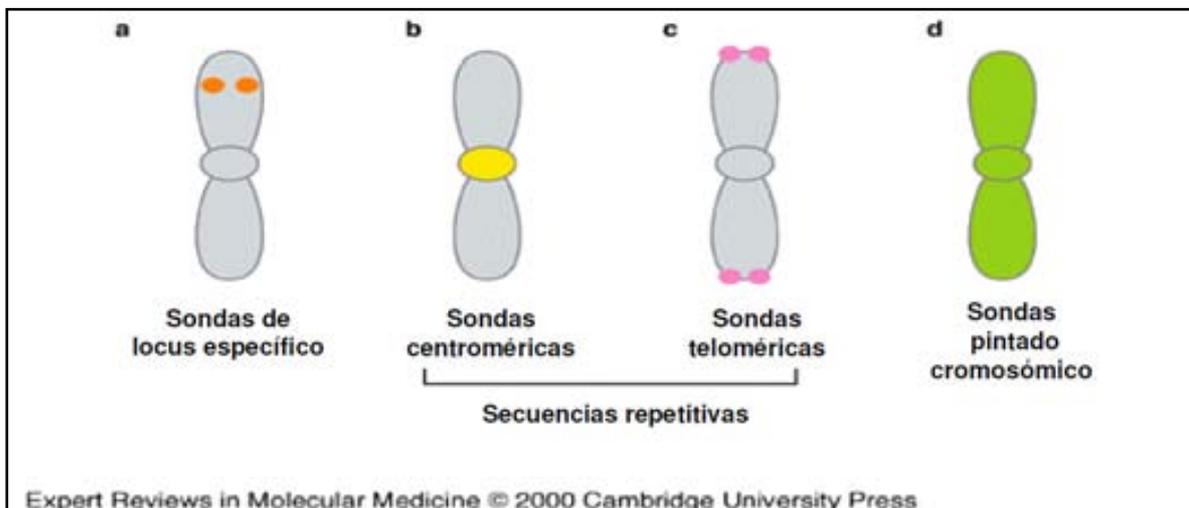


Fig. 17. Tipos de sondas de ADN.

La técnica de FISH ayuda a la CC en todas aquellas situaciones en las que no ha sido posible realizar un cariotipo: al disponer de metafases de poca calidad, o no haber obtenido metafases, o bien en los casos en los que las alteraciones cromosómicas asociadas a un diagnóstico son crípticas (no visibles en el cariotipo). Por ello, su utilización ha aumentado enormemente en los últimos años como complemento de las técnicas de CC (244).

1.5.2.1. Arrays de tejidos

Los **TMA**s fueron aplicados por primera vez por **Kononen et al.** en 1998 (245). Actualmente representan un gran avance para las técnicas basadas en el análisis histológico, incluyendo la IHQ y la FISH, ya que su utilización facilita el rápido estudio de cientos de muestras de pacientes diferentes tras un sólo experimento (246, 247). Desde su introducción en los laboratorios, esta tecnología se ha aplicado al estudio de la biología tumoral, la evaluación de biomarcadores moleculares y el control de calidad de laboratorios. Los TMA también sirven como una excelente herramienta de validación para otros tipos de análisis moleculares de alto rendimiento (248).

Uno de los pasos más importantes para la elaboración de un array de tejidos es la selección e identificación de las muestras tumorales que se quiere analizar e incluir en el TMA. Además se utiliza un corte del mismo tejido teñido con hematoxilina-eosina para determinar la mejor área de cada bloque de tejido parafinado del que extraer el cilindro muestra (249).

Antes de la construcción del TMA se diseña un esquema que indique en qué posición irá cada muestra y para la construcción física del TMA se utiliza un microarrayer de tejidos (manual o automatizado) que contiene las agujas necesarias para la formación del agujero dónde irá insertada la muestra y para la obtención del cilindro de cada muestra. El tamaño de los cilindros varía de 0,6 mm a 2 mm, siendo el de 0,6 el más utilizado, pudiendo incluir con este diámetro hasta 600 cilindros por TMA. El seccionamiento del TMA puede realizarse con un micrótopo tradicional pero este paso requiere un técnico especializado (250). El número de cortes que se pueden obtener dependen del grosor del corte y del grosor de los bloques de las muestras utilizadas. Actualmente se están desarrollando tecnologías que permitirían más de 2.000 cortes por TMA (251) (**Fig.18**).

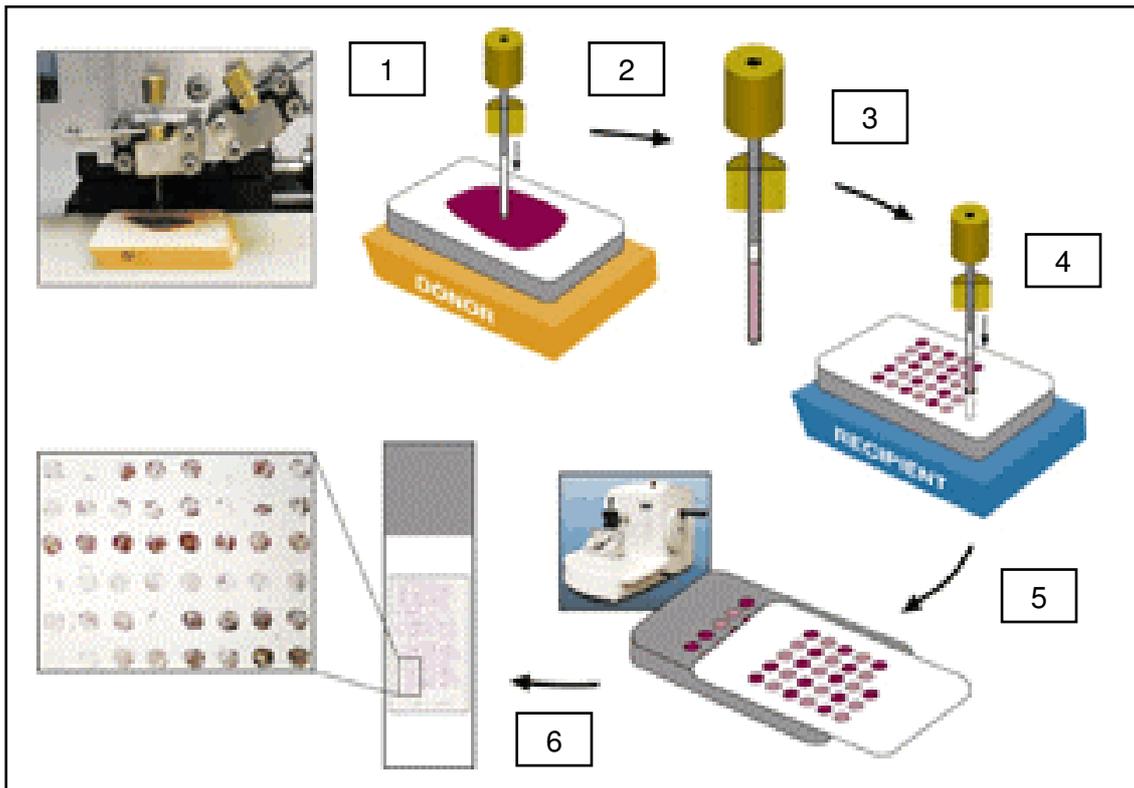


Fig. 18. Esquema general de la construcción de un array de tejidos (TMA). 1: Arrayer. 2: Obtención del cilindro del bloque de parafina de las muestras. 3: Aguja con cilindro de una muestra. 4: Inclusión de un cilindro de una muestra en el bloque de parafina con el resto de muestras. 5: Seccionamiento del TMA con micrótopo. 6: Portaobjetos con un TMA.

Los TMAs presentan importantes ventajas: permiten sacar más rendimiento de una muestra de tejido puesto que el número de cortes que se pueden obtener de un TMA es más elevado que el de un bloque parafinado, quedando además la mayor parte del tejido incluido en el bloque original de la muestra después de ser extraído el cilindro (252); permiten el análisis simultáneo de un mayor número de muestras en un sólo experimento (253, 254) y por lo tanto confiere al estudio uniformidad, ya que a las muestras se les aplica las mismas condiciones experimentales lo que evita variaciones durante el proceso que puedan afectar a los resultados (255); y finalmente permite disminuir los costes económicos y técnicos del estudio (249).

1.5.2.2. Caracterización por FISH de carcinomas mamarios

La aplicación de la técnica de FISH en los tumores mamarios ha permitido la comprobación y extrapolación de muchos de los resultados encontrados por las técnicas de CC y nuevas técnicas de citogenética molecular. Además, son varias las sondas de FISH utilizadas de forma rutinaria en muchos laboratorios de anatomía

patológica y citogenética, cuyo resultado puede aportar una valiosa información acerca del pronóstico y respuesta predictiva a cierto tipo de tratamientos.

Letessier et al. (189) analizaron el estado genético de varios genes, en 547 tumores invasivos mamarios organizados en un TMA por la técnica de FISH. Observaron amplificaciones de **8p12** en un 22,8%, de **8q24** en un 6,1%, de **11q13** en un 19,6%, de **12p13** en un 4,1%, de **17q12** en un 9,9%, y de **20q13** en un 9,9%.

Entre los genes que identifican las sondas comerciales más importantes aplicadas al diagnóstico del cáncer de mama podemos encontrar: **EGFR** (7p12), **MYC** (8q24), **CCND1** (11q13), **HER2** (17q11.2-q12), **TOP2A** (17q21-q22) y **ZNF217** (20q13), siendo la amplificación del gen **HER2** la de mayor relevancia, debido a que su positividad confiere un mal pronóstico a la enfermedad y a la vez una buena respuesta predictiva al tratamiento con trastuzumab (256).

1.5.3. Arrays de hibridación genómica comparada

La técnica de la **CGH-array** es una tecnología relativamente reciente cuyo origen se encuentra en la **CGH** (233), técnica que por primera vez permitía detectar cambios en el número de copias a una resolución de unas 3-10 Mb para las ganancias y de unas 10-20 Mb para las pérdidas a lo largo de todo el genoma (257,258) y que además no requería el cultivo de las células del tejido patológico. Como limitaciones, no permitía detectar translocaciones ni mosaicismos y requería una elevada infiltración tumoral (>50%)

Kallioniemi et al. (233) fue el primero que aplicó la CGH en la Universidad de California, San Francisco, como una nueva técnica de análisis cromosómico en 1992, seguido cercanamente por **du Manoir et al.** (259) Esta técnica está basada en la mezcla de un ADN tumoral, marcado con un fluorocromo verde (FITC), junto a un ADN normal, marcado con un fluorocromo rojo (TRITC) -ambos ADNs previamente digeridos-, que se hibrida a una extensión de metafases normales humanas. Para el marcaje de los ADNs se utilizaba la técnica de la *nick translation*. En la mezcla además se añadía el llamado ADN cot-1 que consistía en ADN de esperma de salmón o placenta, que se unía a las secuencias repetitivas que los cromosomas para evitar hibridaciones inespecíficas. Inicialmente el ADN referencia y las metafases eran obtenidas de voluntarios sanos y no del paciente, aunque con el tiempo ambos se pudieron obtener de casas comerciales. Entre los fragmentos de ADN marcados en ambos colores se establecía una hibridación competitiva hacia el locus de las metafases cromosómicas de la extensión. Después de la hibridación se realizaban

varios lavados para eliminar restos de la reacción y se aplicaba DAPI para resaltar y poder localizar las metafases (**Fig.19**).

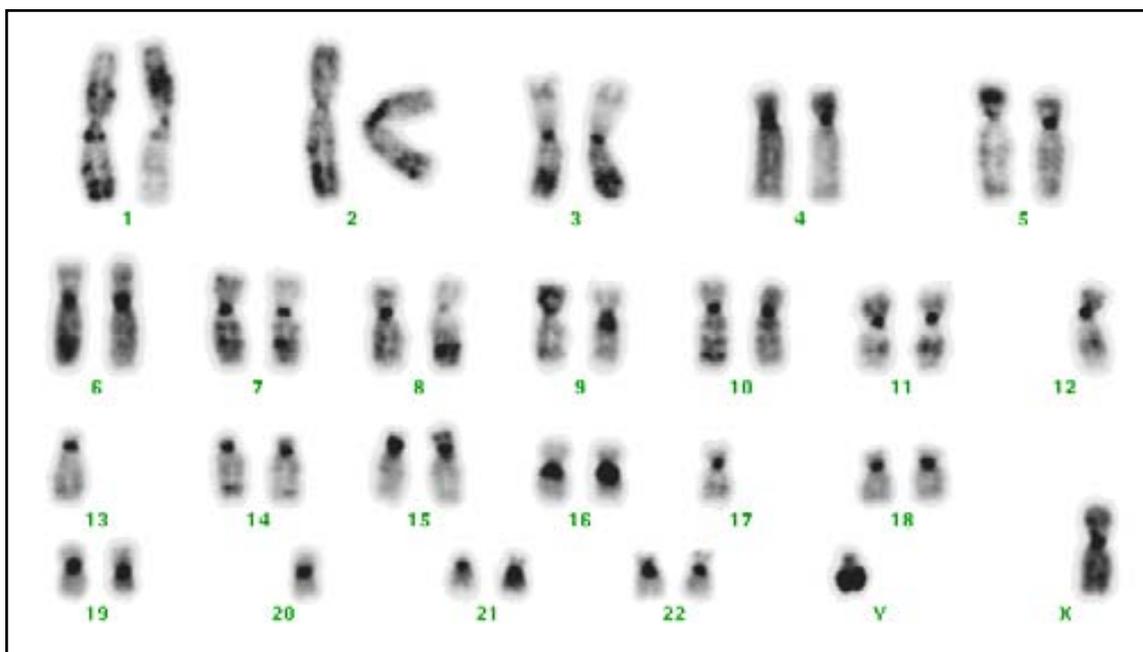
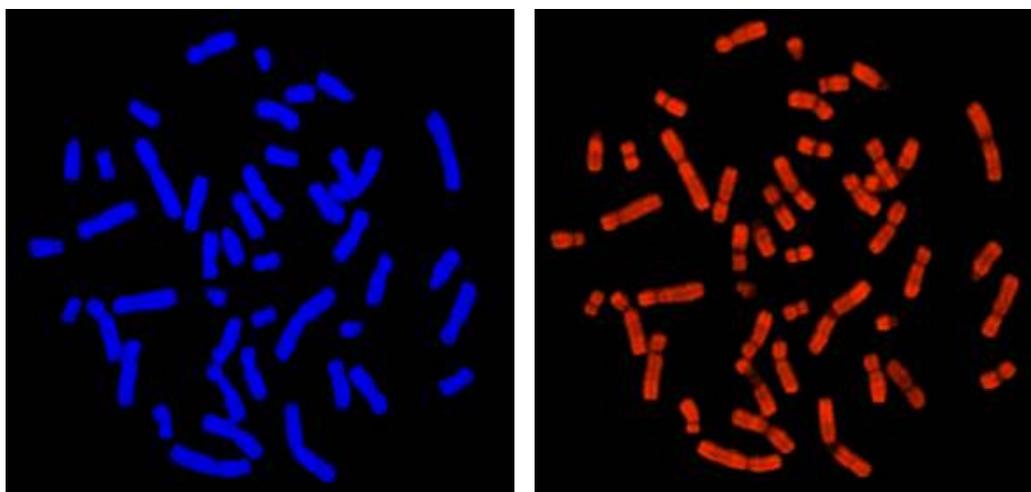


Fig. 19. Cariotipo de una muestra tumoral mamaria en el que podemos observar las bandas generadas después de la tinción con DAPI (bandas similares a las bandas G, pero con mucha menor claridad y resolución).

Finalmente se procedía a la captura de los dos fluorocromos utilizados y del DAPI, mediante un microscopio de fluorescencia, y se obtenía el cariotipo a partir de la imagen capturada en DAPI y las *ratios* de fluorescencia mediante un *software* de análisis para obtener los resultados finales. Cuando la *ratio* entre la fluorescencia verde y la roja era mayor que uno, entonces hablábamos de ganancia de material genético, y cuando era menor que uno, hablábamos de pérdida (260) (**Fig. 20**).



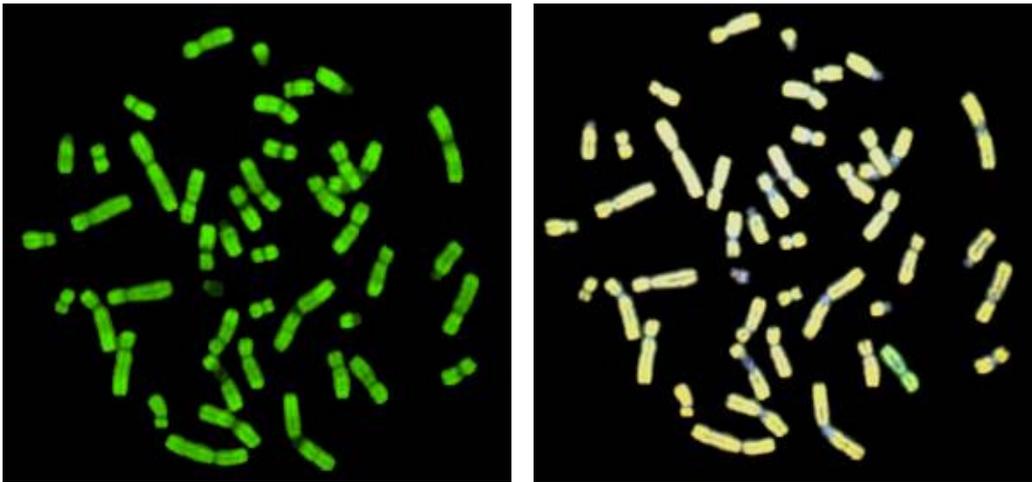


Fig. 20. CGH de una muestra tumoral mamaria. Metafases capturadas con un microscopio de fluorescencia. Arriba-izquierda: DAPI. Arriba-derecha: fluorescencia roja. Abajo-izquierda: fluorescencia verde. Abajo-derecha: superposición de las fluorescencias roja y verde.

Entre 1997 y 1998, **Solinas-Toldo et al.** (261) y **Pinkel et al.** (234) desarrollaron la primera técnica de CGH-array, donde la hibridación competitiva del ADN del paciente tenía lugar en un array formado por clones de ADN en lugar de metafases cromosómicas. Al igual que la CGH, es una técnica que no requiere cultivo del tejido a estudiar, y que permite detectar pérdidas y ganancias de material genético pero no las translocaciones ni los mosaicismos que sean inferiores al 30%.

Inicialmente las plataformas de CGH-array generalmente usaban clones de fragmentos grandes como los de **cromosomas artificiales bacterianos (BACs)** (262, 263). Los arrays aportaron una valiosa información, pero presentaban limitaciones importantes, como era el caso de su laboriosa fabricación, su limitada resolución (1-2 Mb) debido al tamaño (150-200 kb) y al número de clones (2.400-30.000) incluidos en el array y que representaban el genoma (264).

Más tarde fueron introducidos también los de fragmentos más pequeños como los **cósmidos** y los **fósmidos** (265), así como los constituidos por ácidos nucleicos menos complejos como los **cDNAs** (266), y **productos seleccionados de PCR** (267, 268). Finalmente en el año 2004, **Brennan et al.** (269) y **Carvalho et al.** (270) dan a conocer los primeros estudios de CGH-array en los que se utilizaban **oligonucleótidos**, caracterizados por fragmentos de ADN de secuencia única de 25 a 85mer que permitieron elevar de forma sorprendente la resolución de esta técnica y por lo tanto la capacidad de detección de alteraciones genómicas.

A partir de este momento diferentes plataformas de arrays y arrays de muy diversa y elevada resolución empiezan a estar disponibles en el mercado por distintas

casas comerciales como **Agilent Technologies**, **Affymetrix** y **NimbleGen**, que combinan diferentes métodos de marcaje, hibridación y análisis de resultados (264).

El proceso de la CGH-array se inicia mediante la extracción del ADN del tejido de las muestras que queremos analizar y de la obtención de la misma cantidad de un ADN control comercial. Un paso importante a realizar es la comprobación de la cantidad y calidad, así como del nivel de degradación del ADN extraído, puesto que un ADN de mala calidad puede dificultar una buena hibridación y por lo tanto el análisis de los resultados. Seguidamente se digieren y se purifican ambos ADNs. Se marcan con dos fluorocromos distintos, normalmente con Cy5 la muestra problema y con Cy3 la muestra control, se purifican de nuevo y se valora la calidad y la *ratio* de incorporación de fluorocromos, es decir, cómo de bien se han marcado los ADNs (265). Se realiza la mezcla entre un ADN muestra y un ADN control de forma que tengamos más o menos la misma cantidad de ADN marcado de cada uno de ellos. Se añaden los *buffers* de hibridación y el ADN cot-1. Finalmente se co-hibrida la mezcla con el array. Una vez finalizada la hibridación, es necesario disponer de un potente escáner para la lectura de las fluorescencias y su superposición, así como un *software* de análisis que permita convertir la información visual que aporta el escáner en datos numéricos analizables (265).

Desde su introducción en el mercado, los arrays de CGH han permitido el estudio y análisis exhaustivo de una gran diversidad de patologías, no sólo tumorales, sino también relacionadas con el retraso mental y la dismorfia y con la investigación prenatal (271). Actualmente su uso empieza a estar presente en algunos laboratorios de rutina clínica, aunque todavía está muy limitado debido al elevado coste que supone la adquisición de la plataforma y a la dificultad relativa de su análisis.

1.5.3.1. Caracterización por CGH y CGH-array de carcinomas mamarios

La CGH ha contribuido en gran medida al estudio de los tumores mamarios y por lo tanto a la detección de un mayor número de alteraciones cromosómicas, debido al hecho de no ser necesario el cultivo de los mismos para su posterior análisis, factor especialmente importante para este tipo de tumores. En su revisión, **Persson et al.** (272) describieron las alteraciones cromosómicas detectadas mediante CGH y CC de varios estudios existentes, observando que la primera técnica permitía la detección de un mayor número de aberraciones citogenéticas (**Tabla 6**). En otra revisión, **Struski et al.** (273) describieron las alteraciones cromosómicas encontradas en varios estudios de cáncer de mama realizados hasta el 2002 (**Tabla 7**).

Por lo que respecta a la CGH-array, desde su implementación hasta hoy día son muchos los trabajos en que esta técnica ha sido aplicada al estudio del cáncer de mama, lo que ha facilitado el tener un conocimiento mayor de las alteraciones genéticas ya descritas en la literatura. Además, debido a la elevada resolución de esta técnica se han podido observar alteraciones genéticas noveles y de mucho menor tamaño que las aportadas por la CC y la CGH, permitiendo un estudio más exhaustivo y específico de esta patología (274, 275).

Tabla 6. Alteraciones cromosómicas recurrentes de carcinomas mamarios obtenidas por CC y CGH.

Brazo cromosómico	Ganancias (CGH) n=278	Ganancias (citogenética) n=508	Brazo cromosómico	Pérdidas (CGH) n=261	Pérdidas (citogenética) n=508
1q	54%	16%	16q	23%	11%
8q	50%	8%	8p	22%	11%
11q	24%	4%	13q	18%	11%
17q	23%	2%	6q	15%	15%
20q	22%	5%	11q	15%	9%
16p	18%	6%	17p	14%	13%
5p	9%	4%	18q	13%	6%
3q	8%	5%	3p	11%	14%
7p	6%	7%	5q	11%	7%
7q	3%	9%	Xq	11%	10%
6p	2%	6%	4p	10%	7%
6q	2%	5%	1p	9%	20%
8p	2%	6%	Xp	8%	10%
			22q	6%	10%

Tabla 7. Revisión, realizada por *Struski et al.* (273), de alteraciones cromosómicas obtenidas por CGH, presentes en carcinomas ductales infiltrantes (CDI).

CDI (n)	Ganancias	Pérdidas	Referencia
7	1q,3p,6p,7q,8q,10q,12q,14q 15q,16,17,19,20q,21q,22q	4q,9p,11q,13q	(273)
1	1q,3p,6p,7q,8q,10q,12q,14q 15q,16,17,19,20q,21q,22q	4q,9p,11q,13q	(274)
38	1q,11q,17q	16q,11q,16q	(275)
29	1q,3q,5p,11q,17q,20q	1p,11q,13,17p,19p	(276)

5	1q,6q,8q,Xq	17p,22	(277)
46	8q,20q	16q	(278)
80	1q,8q,11q,16p,17q,19	1p,4p,4q,6q,11q,13q 16q,17p,18q,21q	(279)
39	1q,8q,11q,16p,19,20q,X	1p,4q,5q,6q,9p,11q 13q,16q,21q	(280)
78	8q,17q,1q	17p,16p	(281)

A continuación se detallan los resultados de algunos de los estudios más importantes de arrays relacionados con cáncer de mama hasta la fecha:

- **Nessling et al.** (276): array de BACs aplicado a 31 tumores primarios infiltrantes de mama (**Tabla 8**).
- **Shadeo and Lam** (277): array de BACs aplicado a 7 líneas celulares de cáncer de mama. Descripción de 75 regiones de ganancia y de 48 de pérdida. Amplificaciones mayormente observadas en **1p, 1q, 3p, 3q, 6p, 7q, 8q, 9p, 11q, 15q, 17q y 20q**.
- **Han et al.** (278): array de BACs aplicado a 28 neoplasias mamarias ER+ tratadas con tamoxifen. Regiones de ganancia mayormente observadas en **1q32.1, 17q23.3, 8q24.11, 17q12-q21.1 y 8p11.21** (en orden decreciente de prevalencia). Regiones de pérdida mayormente observadas en **6q14.1-q16.3, 11q21-q24.3 y 13q13.2-q14.3**.
- **Chin et al.** (190): array de BACs aplicado a 145 tumores primarios de mama. Amplificaciones mayormente observadas en los cromosomas **8, 11, 12, 17 y 20**. Asociación entre subtipos de expresión y su perfil genético.
- **Chin et al.** (279): array de oligos aplicado a 171 tumores primarios de mama. Regiones de ganancia mayormente observadas en **1q21.1-qtel, 5ptel-5p13.3, 8p12-q24.3, 17q12, 17q21-q25.1 y 20q11-qtel**. Regiones de pérdida mayormente observadas: **8ptel-p12, 11q14-qtel, 13q21-qtel y 17ptel-p11.2**.
- **Haverty et al.** (280): array de SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) aplicado a 51 tumores mamarios. Regiones amplificadas mayormente observadas en **8p12-p11.23, 8q24.13-24.22, 10p14-p13, 11q13.3-q13.4, 11q13.3-q13.5, 11q13.5-q14.1, 11q13.5-q14.2, 17q12-q21.2, 17q21.32-q22, 17q23.2-q23.3, 20q13.32-q13.33 y 20q13.33**. Regiones de pérdida mayormente observadas en **8p, 13q, 16q, 22q, 6q, 9p, 11q, Xp, 1p, 4p, 10q, 14q y 18p**.

- **Fang et al.** (281): array de SNPs aplicado a 21 tumores mamarios. Regiones de ganancia mayormente observadas en **1p, 1q, 3p, 5p, 6q, 7q, 10p, 11q, 21q** y **X**. Regiones de pérdida mayormente observadas en **1p, 1q, 2, 3q, 4, 6, 7q, 8q, 9, 10, 11q, 12q, 13q, 17p, 18, 19p, 20, 21q** y **22q**.

Tabla 8. Incidencia de ganancias (*gain*) y pérdidas (*loss*) en tumores mamarios (n=31) (276).

Gain	%	Gain	%	Loss	%
11q13	77	18q23	42	11q22-q23	58
17q21-q22	74	21q22	42	9p21	55
20q12	68	19q13	39	6q13	26
8q24	65	6p22	35	9p22-p23	26
12q13-q15	61	7p12	35	3p24-p25	23
20q13	61	9q34	35	13q21-q22	23
1p36	58	15q23	35	17p11-p12	23
17q12	58	17q23	35		
q26	55	18q21	32		
1q11-q23	48	22q13	29		
13q14	48	6q25	26		
1q25-q31	45	17p13	26		
6p21	45	20q11	26		
16p13	45	1q32	23		
2p23-p24	42	14q32	23		
15q25	42	15q26	23		

1.6. Análisis genético aplicado al estudio de tumores mamarios ER+ (PR+ /PR-)

Hasta hace relativamente poco tiempo la información existente acerca de los tumores dependientes de estrógenos, provenía básicamente de estudios clínico-patológicos -ver apartado “1.3.8.4.1. Cánceres de mama hormonales (ER+/PR+ vs ER+/PR-“-

La introducción de las nuevas técnicas de análisis genético junto con las ya existentes han permitido el estudio de estos dos tipos de tumores de forma más exhaustiva, y por lo tanto su mejor caracterización. A continuación se describen las características genéticas más importantes asociadas a los tumores ER+ (**Tabla 9**).

Tabla 9. Resultados de estudios genéticos previos relacionados directamente con los tumores ER+. Color verde: ganancias. Color rojo: pérdidas. Entre paréntesis el nombre de los genes analizados. Abreviaturas: a: amplificación; 2a: dos regiones de amplificación.

Estudio	Técnica	ALTERACIÓN ASOCIADA A:			
		ER+	Luminal A (ER+/PR+)	Luminal B (ER+/PR+ ó PR-)	ER+/PR-
Han et al. (278)	CGH-array	1q32.1 8p11.21 8q24.11 17q23.3 17q12-q21.2 6q14.1-q16.3 11q21-q24.3 13q13.2-q14.3			
Letessier et al. (189)	FISH			20q13 ^a (ZNF217)	
Chin et al. (190)	CGH-array		1q 8p11-p12 ^a 11q13-q14 ^a 12q13-q14 ^a 16p 17q11-q12 ^a 17q21-q24 ^a 20q13 ^a 16q	1q 8p11-p12 ^a 8q ^{2a} 11q13-q14 ^a 17q 20q 1p 8p 13q 16q 17p 22q	
Creighton et al. (191) (revisión)	CGH-array	22			11q13 12q14-q15 17q21-q25 11q13-q25

2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

“La posibilidad de que la meta no sea el objetivo. La posibilidad de que el camino en sí sea el objetivo de andar, la idea de transitar en un rumbo sin vivir cada paso como un examen, el placer de avanzar en una dirección”

(Jorge Bucay)

La hipótesis de este trabajo de investigación ha sido la siguiente: el hecho de que los tumores de mama ER+/PR+ y ER+/PR- presenten diferencias clínico-patológicas y de respuesta a la terapia hormonal implicaría que ambos podrían presentar diferencias en su perfil genético.

El objetivo principal esta tesis doctoral ha sido el estudio y caracterización genética de dos subtipos de tumores de mama (ER+/PR+ vs ER+/PR-) e identificar posibles diferencias existentes entre ambos grupos. Para alcanzarlo, nos hemos propuesto los siguientes objetivos específicos:

1. Seleccionar muestras congeladas de carcinoma ductal infiltrante ER+, extraer su ADN y analizar la calidad del mismo para la realización de la CGH-array.
2. Realizar una base de datos que contenga la información clínico-patológica de las muestras seleccionadas para realizar la CGH-array.
3. Aplicar la CGH-array a 48 muestras de tejido mamario congelado (25 ER+/PR+ y 23 ER+/PR-), analizar la información obtenida mediante los *softwares* de visualización y de análisis estadístico (*Feature Extraction v8.1*, *CGH Analytics v3.2.25* e *InSilicoArray* y realizar la técnica de FISH para comprobar algunas alteraciones genéticas observadas con el fin de:
 - Conocer el perfil genómico de cada grupo por separado y analizar estadísticamente los resultados mediante el test *U Mann-Whitney*.
 - Conocer el perfil cromosómico global y de cada grupo.
 - Conocer las regiones de alteración solapadas (SORIs) y las regiones SORIs recurrentes de cada grupo.
 - Realizar una base de datos, con la información obtenida del perfil cromosómico y las regiones SORI (incluidas las solapadas) para conocer las regiones alteradas de forma significativa entre ambos grupos analizando: el número de casos alterados, las regiones más alteradas y solapadas, las regiones más alteradas, solapadas y compartidas y el número de casos alterados con amplificaciones específicas incluidas en las regiones de alteración recurrentes.
 - Realizar la búsqueda informática en la base de datos *NCBI* de los genes localizados en las regiones alteradas de forma significativa entre ambos grupos que pudieran estar relacionados con cáncer de mama o con características propias de los tumores ER+/PR-.

4. Seleccionar 50 muestras ER+/PR+ y 50 ER+/PR-, elaborar una base de datos con las características clínico-patológicas y construir cuatro arrays de tejidos.
5. Validar en los arrays de tejidos mediante la técnica de FISH los genes de interés obtenidos por la CGH-array y analizar estadísticamente los resultados.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

***“El fracaso reside oculto en cada éxito, y el éxito en cada fracaso. En este mundo, es decir, en el nivel de las formas, todos “fracasamos” antes o después, y todas las realizaciones acaban convirtiéndose en nada. Todas las formas son impermanentes”
(Eckart Tolle)***

3.1. Material

Las muestras utilizadas fueron de pacientes diagnosticadas de CDI de mama, en la *Unitat de Patologia Mamària del Servei de Patologia* del Hospital del Mar entre los años 2000 y 2008. Todas ellas fueron obtenidas, congeladas y almacenadas, después de la obtención del permiso para su uso científico por el Comité Ético de Revisión del Hospital del Mar, de acuerdo con las instrucciones a seguir sobre muestras biológicas de la Declaración de Helsinki.

Para todos los tumores seleccionados, el subtipo histológico y el análisis de la expresión del ER y PR por IHQ fueron pertinentemente revisados por el Dr. Josep María Corominas (Servicio de Patología, Hospital del Mar. Barcelona). Además, el estadio patológico, diámetro tumoral, afectación ganglionar, grado histológico y la expresión de ERBB2 y P53 fueron obtenidos del informe patológico primario. Ninguno de los pacientes recibió quimioterapia neoadyuvante, para evitar alteraciones genéticas debido al tratamiento.

Mediante el uso del programa *SPSS 16.0* se construyó una base de datos con la información clínico-patológica de las muestras seleccionadas.

Las muestras seleccionadas se dividieron en dos grupos: **serie de screening** y **serie de validación (Tabla 10)**:

- **Serie de screening:** se utilizaron 48 CDIs de mama (25 ER+/PR+ y 23 ER+/PR-) para la aplicación de la técnica de CGH-array, seleccionados del archivo de tejido congelado del Banco de Tumores del Hospital del Mar. Las secciones de tejido se utilizaron para la extracción del ADN. La infiltración tumoral de las muestras variaba de un 20 a 100%. Además, en algunos de los 48 casos, también se utilizaron secciones de tejido de sus respectivos bloques incluidos en parafina para la confirmación por FISH, en caso de duda, de algunos de los resultados de la CGH-array. Los bloques escogidos fueron los mismos que los utilizados para los ensayos de IHQ y FISH en el diagnóstico clínico.
- **Serie de validación:** se utilizaron 100 CDIs de mama distintos de los anteriores (50 ER+/PR+ y 50 ER+/PR-) para extrapolar los resultados de interés que se pudieran obtener del estudio inicial de CGH-array, mediante la aplicación de la técnica de FISH. Las secciones de tejido se obtuvieron también del mismo bloque incluido en parafina utilizado para los ensayos de IHQ y FISH en el diagnóstico clínico.

Tabla 10. Características histopatológicas de las muestras (serie de *screening* y serie de validación). Abreviaturas: ER: receptor de estrógenos; PR: receptor de progesterona; n: número de muestras; LN: linfadenectomía; IHQ: inmunohistoquímica.

	Serie de <i>screening</i> (n=48)			Serie de validación (n=100)		
	ER+PR+ (n=25)	ER+PR- (n=23)	p-value	ER+PR+ (n=50)	ER+PR- (n=50)	p-value
EDAD (años)	67,83	67,37	0,942	69,6	68,23	0,577
LN			0,195			0,03
+	5	3		8	19	
-	9	4		7	13	
NR	11	16		35	18	
TAMAÑO (cm)			0,868			0,572
<2	19	17		30	30	
>2<5	6	6		19	17	
>5	0	0		1	3	
GRADO			0,862			0,716
I	5	4		18	16	
II	17	15		25	24	
III	3	4		7	10	
ESTADIO			0,523			0,084
I	14	12		25	23	
II	8	10		24	20	
III	3	1		1	7	
ERBB2 (IHQ)			1			0,001
+	1	0		0	10	
-	24	23		50	40	
P53 (IHQ)			0,668			0,461
+	4	2		9	12	
-	21	21		41	38	

3.2. Métodos

Para facilitar el seguimiento y entendimiento de las técnicas utilizadas, se presentan a continuación organizadas según el orden general de utilización:

- Extracción de ADN de tejido congelado
- Purificación de ADN de tejido congelado
- CGH-array
- Fabricación de sondas no comerciales
- FISH en tejido parafinado (sonda comercial y no comercial)
- Rehibridación de FISH en tejido parafinado

- TMAs
- FISH en tejido parafinado procedente del TMA
- Tests estadísticos utilizados para el análisis de la FISH

3.2.1. Extracción de ADN de tejido congelado

*Este protocolo se realiza a partir de unos 10 cortes de ente 10 y 14 μm , dependiendo del tamaño del tumor, que se encuentra a -80°C e incluido en el medio de conservación OCT. Los cortes se realizaron con un micrótomo (CM1850UV, *Leika*). Para la extracción del ADN se utilizó el kit *DNAeasy tissue QiAmp* que incluye los reactivos específicos utilizados en el protocolo que aquí se detalla.

Día 1:

- Añadir 1 mL de PBS 1x.
- Agitar con el vórtex hasta que el tejido quede desenganchado de las paredes del *ependorf*.
- Centrifugar 5 min a 3.000 rpm a temperatura ambiente.
- Eliminar sobrenadante con una pipeta *Pasteur*.
- Añadir 180 μL de *buffer* ATL.
- Añadir 20 μL de proteinasa K.
- Mezclar con vórtex.
- Sellar *ependorf* con *parafilm* para evitar evaporación.
- Incubar *ependorf* en estufa a 56°C toda la noche.

Día 2:

*Previamente preparar un baño seco a 70°C .

- Quitar *parafilm* y dar un pulso en el vórtex.
- Añadir 200 μL de *buffer* A1.
- Mezclar bien con el vórtex.
- Incubar en baño seco a 70°C 10 min.
- Añadir 210 μL de etanol 100% y mezclar con vórtex.
- Añadir la mezcla en una columna *QiAmp* medida previamente en tubo de 2 ml (proporcionado por el kit).
- Centrifugar a 8.000 rpm 1 min.
- Descartar sobrenadante. Poner la columna en tubo de 2 mL nuevo.
- Añadir 500 μL de *buffer* AW1.

- Centrifugar a 8.000 rpm 1 min.
- Descartar el tubo que contiene el filtrado y ponerlo en tubo de 2 mL nuevo.
- Añadir 500 μ L de *buffer* AW2.
- Centrifugar a máxima velocidad 3 min (aproximadamente 13.000 rpm).
- Descartar tubo. Poner columna en *ependorf* estéril.
- Añadir 50 μ L de agua destilada.
- Dejar 1 min a temperatura ambiente antes de centrifugar.
- Centrifugar a 8.000 rpm 1 min.
- Añadir 50 μ L de agua destilada.
- Centrifugar a 8.000 rpm 1 min.

*A partir de aquí se pueden guardar las muestras a -4°C ó -20°C hasta su posterior utilización, o previamente a su congelación, cuantificar y valorar la calidad y estado de degradación del ADN:

- **Cuantificación del ADN:** introducir 1 μ L de la muestra en un *nanodrop* (*Spectrophotometer ND-1000, Nanodrop*). Además de la cantidad del ADN, también es importante tener en cuenta las *ratios* de calidad del ADN que automáticamente obtenemos con la cuantificación. La *ratio* 260/280 nos da la relación ADN/proteínas, mientras que la *ratio* 260/230 nos da la relación ADN/reactivos. Unas buenas ratios consistirían en:
 - *Ratio* 260/280 > 1,8.
 - *Ratio* 260/230 > 1,6.
- **Gel de agarosa al 2%:** según la cantidad de muestras podemos preparar un gel grande o un gel pequeño:
 - Gel grande: 100 mL solución TBE 0,5x + 2 g de agarosa + 2 μ L de bromuro de etidio.
 - Gel pequeño: 50 mL solución TBE 0,5x + 1 g de agarosa + 1 μ L de bromuro de etidio.

Realizar la mezcla anterior en un erlenmeyer y calentar al microondas hasta que se disuelva la agarosa evitando que hierva. Verter la mezcla en la cubeta de electroforesis y colocar la pinza con las muescas para los pocillos. Dejar secar un mínimo de 20 min. Cargar una muestra (5 μ L de muestra + 2 μ L de azul de bromofenol 6x) en cada pocillo y dejar uno para el marcador de peso molecular (5 μ L); colocar el gel en una cubeta de electroforesis y correrlo a

120-140 V hasta que observemos la separación de las diferentes bandas de peso molecular (25-30 min). Finalmente, capturar y procesar la imagen del gel con ayuda del *GeneScan* (*Syngene*) y el software *GeneSnap* (*Syngene*) (**Fig. 21**).

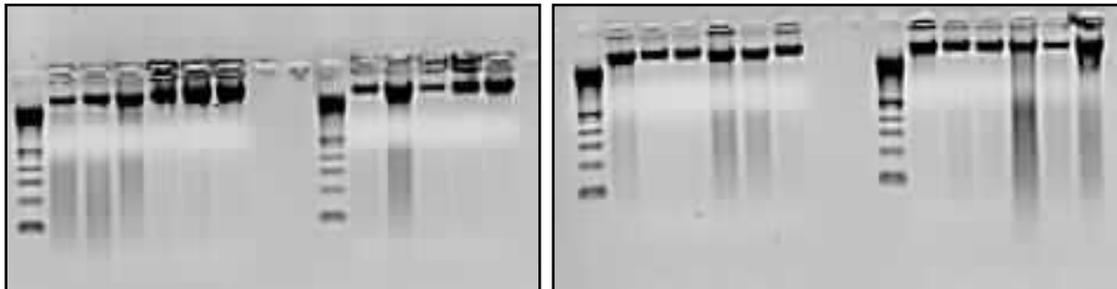


Fig. 21. Imágenes de dos geles de agarosa donde observamos en cada uno, dos grupos de seis muestras de genoma total directamente extraído del tumor. Al inicio de cada grupo observamos un marcador de peso molecular. La banda superior de cada muestra representa el genoma total que al no estar digerido, debería concentrarse en esa zona. Las muestras que presentan, además de la banda, un *smear* a lo largo del gel, corresponden a aquéllas que están, según la intensidad del *smear*, más o menos degradadas, lo que dificultaría la realización de la CGH-array. Si el *smear* fuera de gran intensidad y la banda superior de intensidad muy débil la muestra debería ser desechada y volver a ser extraída.

3.2.2. Purificación de ADN de tejido congelado

*Este protocolo utiliza una solución de fenol como agente purificante del ADN. El inconveniente de este proceso además de su elevada toxicidad, suele ser la pérdida de ADN. Se necesitan unos *ependorfs* especiales que tienen un cierre más seguro que los usualmente utilizados para evitar la evaporación de fenol.

Día 1:

- Diluir con agua destilada la solución ADN hasta un volumen de 300 μ L.
- Pasar la solución a *ependorfs* especiales.
- Añadir bajo campana 300 μ L de fenol:Cloroformo:Isoamil.
- Sellar con *parafilm*.
- Vórtex 1 min a máxima velocidad.
- Centrifugar a 13.000 rpm 3 min a temperatura ambiente.
- Añadir 1 μ L de glicógeno (20 mg/mL) y resuspender.
- Añadir un 10% de NaAc 3M dejándolo caer.
- Añadir dos volúmenes de etanol 100% frío e invertir.

- Sellar con *parafilm*.
- Dejar toda la noche a -20°C, o 1 hora a -80°C.

Día 2:

*Preparar un baño seco 70°C y colocar un *ependorf* con agua destilada.

- Centrifugar a 13.000 rpm 10 min.
- Eliminar *parafilm* y decantar.
- Lavar *pellets* con 100 µL de etanol 70% frío.
- Sellar con *parafilm*.
- Centrifugar a 10.000 rpm 10 min.
- Decantar el etanol.
- Secar en estufa a 37°C o a temperatura ambiente.
- Resuspender *pellet* con 50-100 µL de agua destilada a 70°C.

3.2.3. CGH-array

*La técnica de CGH-array se llevó a cabo en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) de Madrid, en el Laboratorio de Citogenética Molecular bajo la supervisión de Juan Cruz Cigudosa.

La plataforma utilizada para la realización de la CGH-array pertenece a la casa comercial *Agilent Technologies*, Palo Alta, CA, USA. Se utilizó el array **Human Genome CGH 44K** y **4x44K microarray**, versión B. En el formato 44K se hibrida una muestra en un array. La casa comercial al poco tiempo lanzó el nuevo formato 4x44K, dejando de fabricar el anterior, pudiendo hibridar en un array 4 muestras (**Fig. 22**). El nuevo formato seguía manteniendo las mismas características biológicas. En este caso se tuvieron que alterar algunos pasos del protocolo. Ambos formatos contienen 42.494 ó 4x42.494 secuencias codificantes y no codificantes y presentan una resolución espacial media de 43 Kb. Entre los dos formatos hay pequeñas diferencias referentes al protocolo a realizar e indicadas específicamente.

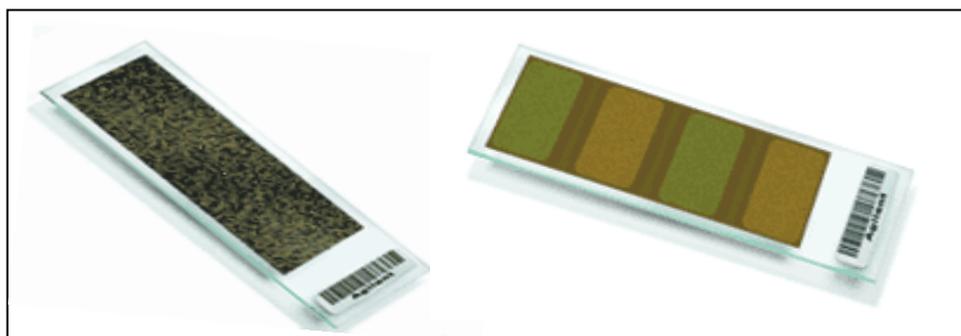


Fig. 22. Representación de los dos formatos de arrays de CGH utilizados en este estudio. Izquierda: formato 1x44K. Derecha: formato 4x44K.

3.2.3.1. Técnica de la CGH-array

*Realizamos la técnica en tandas de 20 muestras durante una semana.

*Para la realización de la técnica es necesario disponer específicamente de:

- Enzimas de digestión Alu 1 y RSA 1.
- ADN control comercial.
- Kit *Qiaprep Spin Miniprep* para la purificación del ADN.
- Kit *BioPrime CGH labeling System* para el marcaje del ADN.
- Microconos YM-30 para la limpieza del ADN marcado (*Millipore*).
- Fluorocromos Cy3 y Cy5.
- Acetonitrilo.
- Kit *Agilent Oligonucleotide aCGH Hybridization* para la hibridación de las muestras.
- Arrays de CGH (**Fig. 23**).
- Cámaras de hibridación para introducir los arrays durante la hibridación (*DNA Microarray Hybridization Chamber – SureHyb, Agilent Technologies*) (**Fig. 23**).
- *Gasket Slides* para proteger los arrays durante la hibridación (*Gasket Slides, Agilent Technologies*) (**Fig. 23**).
- Horno de hibridación (*DNA Microarray Hybridization Oven, Agilent Technologies*) (**Fig. 23**).
- Escáner para la lectura de las fluorescencias (*DNA Microarray Scanner, Agilent Technologies*) (**Fig. 23**).
- *Vacuum* para la evaporación de muestras (*Speed Vac, Savant*).

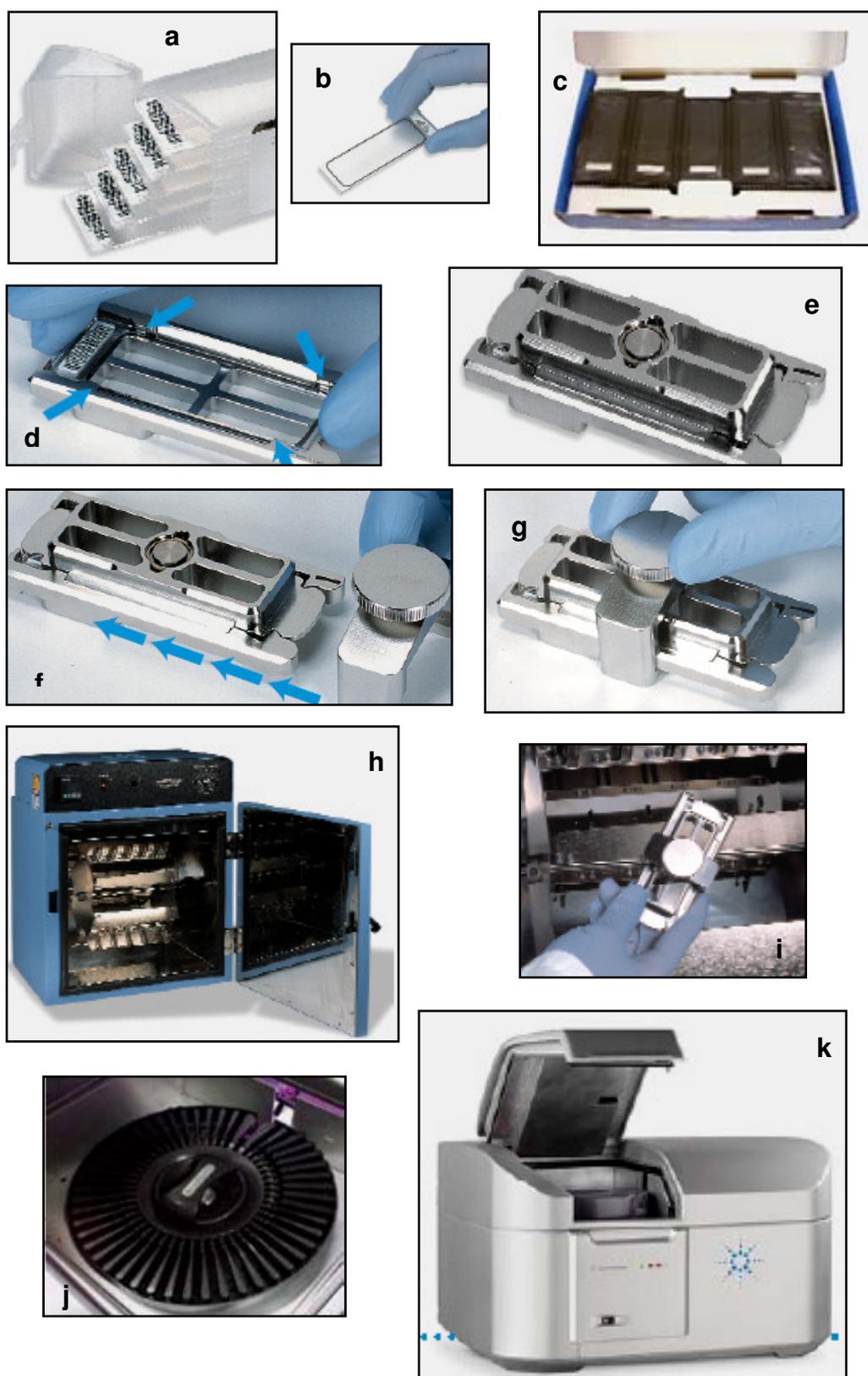


Fig. 23. Imágenes de parte del material utilizado específicamente en la CGH-array: a) arrays; b) y c) *gasket slides*; d) parte inferior de la cámara de hibridación; e) parte superior de la cámara de hibridación; f) y g) sellado de la cámara de hibridación; h) e i) horno de hibridación; j) y k) escáner de hibridación.

Día 1:

*Preparar un termociclador a 37°C.

*Colocar el *buffer* EB incluido en el kit de purificación a 65°C.

*Realizar la digestión y purificación de todas las muestras (20 como máximo).

3.2.3.1.1. Digestión

- Calcular la cantidad necesaria de muestra para la obtención de 2 µg de ADN (si se trata del formato 1x44K) o 1-1,5 µg (si se trata del formato 4x44K). Completar con agua destilada hasta 42,5 µL si no se llegara a tal cantidad, o dejar evaporar las muestras si sobrepasamos los 42,5 µL con la ayuda de un *vacuum*.
- Calcular la cantidad total necesaria de ADN control que se necesitará para hibridar todas las muestras (2 µg x número de muestras). Repartir dicha cantidad en varios *eppendorfs* (3 ó 4) y llevarlos si fuera necesario también a 42,5 µL (cada *eppendorf* es considerado un *pool* de control).
- Añadir a cada muestra y a cada *pool* de control 5 µL de *buffer* T.
- Añadir a cada muestra y a cada *pool* 1,25 µL de enzima Alu 1 (10 u/µL).
- Añadir a cada muestra y a cada *pool* 1,25 µL de enzima RSA 1 (10 u/µL).
- Dejar la mezcla 2 h a 37°C en el termociclador.

3.2.3.1.2. Purificación del ADN digerido

*Utilizar el kit *Qiaprep Spin Miniprep*.

- Añadir 500 µL de *buffer* PB y pasar la mezcla por columna.
- Centrifugar a 9.000 rpm 1 min.
- Descartar centrifugado y secar con papel con el tubo boca abajo.
- Añadir 750 µL de *buffer* PE.
- Centrifugar a 9.000 rpm 1 min.
- Descartar centrifugado y secar con papel con el tubo boca abajo.
- Dejar evaporar unos minutos hasta que el filtro esté seco.
- Centrifugar a 9.000 rpm 1 min.
- Pasar columnas a *eppendorfs*.
- Añadir 50 µL de *buffer* EB.
- Dejar 1 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 9.000 rpm 1 min.
- Volver a añadir 50 µL de *buffer* EB.

- Centrifugar a 9.000 rpm 1 min.
- Cuantificar con un *nanodrop* utilizando 1 μ L de la muestra.
- Hacer un gel de agarosa al 1 % (50 mL + 0,5 g agarosa + 6 μ L SYBR). Correr 4 μ L de cada muestra y de cada pool de control mezclado cada una de ellas con 1 μ L de azul de bromofenol 6x y 1 μ L de agua destilada). Colocar el gel en una cubeta de electroforesis y correrlo a unos 120-140 V durante 25-30 min. Tapar el gel con papel de plata para evitar la pérdida de señal. Finalmente, capturar y procesar la imagen del gel con ayuda de un *GeneScan* (*Syngene*) y el software *GeneSnap* (*Syngene*) (**Fig. 24**).

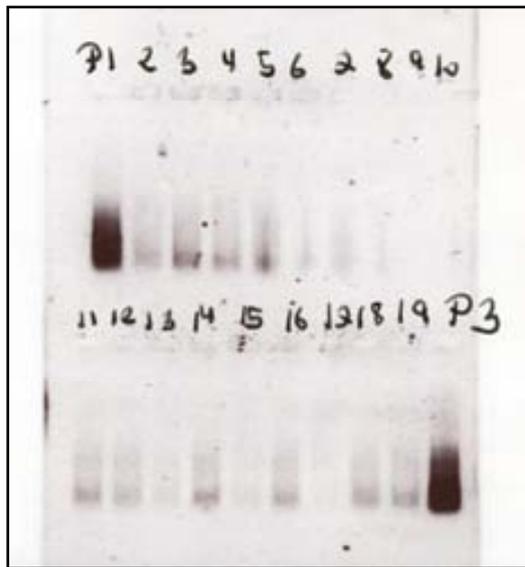


Fig. 24. Imagen de un gel de agarosa en el que observamos dos grupos de 9 muestras y un *pool* de control, en cada uno. Las muestras han sido previamente digeridas y por lo tanto debemos ver un *smear* localizado mayormente en la parte inferior del gel, ya que ahí se concentra el tamaño de bandas en que tienden a cortar las enzimas de digestión utilizadas. Si observáramos una banda superior de ADN, la digestión no se habría realizado correctamente y deberíamos volver a incubar la muestra con enzima. Los *smears* de los *pooles* de controles son mayores y de gran intensidad debido a la gran cantidad de ADN que pusimos en cada uno de ellos.

*En estos momentos tendremos de cada muestra y pool de control 95 μ L (100 μ L menos 1 μ L utilizado en el *nanodrop* y menos 4 μ L utilizados en el gel de agarosa).

*Preparar un control para cada muestra, sabiendo la concentración y cantidad de ADN que hay en cada una de ellas. Cuantificar la concentración de cada *pool* de control y repartir las soluciones de los *pooles* de forma que obtengamos un control con la misma cantidad de ADN que su muestra pareja. Llevar soluciones hasta 21 μ L con agua destilada si no alcanzáramos dicha cantidad.

Día 2:

*Es aconsejable no marcar a la vez más muestras de las que quepan en 10 arrays (en nuestro caso fueron siempre 10 muestras, utilizando 10 arrays en el formato 1x44K o 4 arrays en el formato 4x44K). El resto de muestras se guardan a -20°C hasta su posterior marcaje.

3.2.3.1.3. Marcaje

*Utilizar el *kit BioPrime CGH Labeling* y los fluorocromos Cy3 y Cy5.

*Llevar todas las muestras y controles hasta que alcancen los 21 µL con el uso del *vacuum*.

*Encender el baño seco a 95°C.

*Preparar una cubeta con hielo.

*Descongelar la solución RP, la dUTP mix y los fluorocromos Cy3 y Cy5.

- Añadir 2,5 µL de solución RP.
- Incubar 5 min a 95°C.
- Dejar 5 min en hielo.
- Añadir 10x dUPT mix.
- Añadir 3 µL de fluorocromo Cy3 (control) o Cy5 (muestra) dUPT.
- Añadir 1 µL de la enzima *Exo Klenow* (sacarla justo antes de su utilización).
- Homogeneizar las muestras manualmente y darles un pulso de unos 10s.
- Incubar 3 h, a 37°C en un termociclador tapado con papel de plata.
- Añadir 5 µL de *buffer stop*. Resuspender con pipeta.

3.2.3.1.4. Limpieza del ADN marcado

*Utilizar microconos YM-30.

- Añadir 400 µL de *buffer TE* a cada *ependorf*.
- Colocar un microcono en un tubo de 1,5 mL y pasar el contenido del *ependorf*.
- Centrifugar a 9.000 rpm 8 min, a temperatura ambiente.
- Invertir el filtro en un tubo de 1,5 mL nuevo.
- Centrifugar a 9.000 rpm 1 min, a temperatura ambiente.

*Cuantificar con el *nanodrop* la incorporación de fluorocromo para cada una de las muestras (Cy5) y su control correspondiente (Cy3), así como la concentración de ADN. Utilizar el *buffer TE* como control. Los valores aceptables de marcaje serán aquellos

que superen los 10 pmol/ μ L; es recomendable no seguir con el protocolo en el caso de valores menores de 6 pmol/ μ L. Puede que observemos marcaje de interferencia normal de fluorocromo Cy3 en las muestras y de Cy5 en los controles.

Calcular la cantidad de ADN marcado para cada muestra y su control para que en el momento de la hibridación tengamos aproximadamente la misma cantidad de ambos ADNs.

- Mezclar cada muestra con su correspondiente control de forma que con su unión obtengamos una dilución de color lilácea. Pasar la mezcla a nueva columna.
- Rellenar la columna con *buffer* TE.
- Centrifugar a 9.000 rpm 8 min, a temperatura ambiente.
- Invertir la columna en un tubo nuevo de 1,5 mL.
- Centrifugar a 9.000 rpm 1 min, a temperatura ambiente.
- Repetir centrifugación a 9.000 rpm 1 min, a temperatura ambiente (si se trata del formato 4x44K).
- Transferir cada muestra (muestras + control) a un tubo de 1,5 mL.
- Llevar volumen a 150 μ L de *nucleasa free water* (si se trata del formato 1x44K) o a 39,40 μ L (si se trata del formato 4x44K).

3.2.3.1.5. Hibridación

*Es aconsejable no hibridar más de 10 arrays conjuntamente.

*Utilizar el kit *Agilent Oligonucleotide aCGH Hybridization*.

*Añadir 1.250 μ L de *RNA free water* al *blocking agent* para diluirlo y dejarlo antes de usarlo 60 min a temperatura ambiente. Después puede conservarse a -20°C.

*Encender el baño seco a 95°C.

*Encender el termociclador a 37°C.

*Limpiar las cámaras de hibridación.

*Encender el horno de hibridación a 65°C.

*Trabajar en condiciones de baja intensidad de luz.

- Añadir 50 μ L de *Human Cot-1 DNA* (1 μ g/ μ L) (si se trata del formato 1x44K) o 5 μ L (si se trata del formato 4x44K).
- Añadir 50 μ L de *Agilent 10xBlocking Agent* (ya diluido) (si se trata del formato 1x44K) o 11 μ L (si se trata del formato 4x44K).
- Añadir 250 μ L de *Agilent 2xHybridization buffer* (si se trata del formato 1x44K) o 55 μ L (si se trata del formato 4x44K).

- Darle a la mezcla un pulso con la microcentrífuga.
- Incubar 3 min a 95°C.
- Incubar 30 min a 37°C (tapar el termociclador con papel de plata y sellar los *ependorfs* para evitar la evaporación de la muestra).
- Darle a la mezcla un *pulso*.
- Colocar un *gasket* (cara donde aparece la palabra *Agilent* hacia arriba) en la parte inferior de una cámara de hibridación.
- Añadir unos 490 µL de la mezcla en la parte superior de 1/3 del array (si se trata del formato 1x44K) o 110 µL (si se trata del formato 4x44K).
- Colocar el array en posición horizontal lo más rápido posible (cara de *Agilent* del array con la cara de *Agilent* del *gasket*), colocar la parte superior de la cámara de hibridación y sellar. Evitar que se formen burbujas y procurar que las ya formadas circulen y no queden fijadas por el interior de la cámara.
- Introducir la cámara en el horno de hibridación y dejar hibridar a 65°C unas 44 h (si se trata del formato 1x44K) o unas 24 h (si se trata del formato 4x44K).

*Preparar el *wash 1* y el *wash 2* para los lavados del día siguiente.

*Preparar cada lavado por duplicado.

- **Wash 1:** 500 µL de *lauryl* + 50 mL de SSPE 20X + 1.950 mL de agua destilada.

Filtrar y dejarlo hasta su utilización a temperatura ambiente en una botella cerrada. Esta cantidad es para unos 5 arrays.

- **Wash 2:** 250 µL de *lauryl* + 5 mL de SSPE 20X + 955 mL de agua destilada.

Filtrar en una botella e introducirlo junto a un vaso de precipitados de 1.000 mL en una estufa a 37°C. Esta cantidad es para unos 5 arrays.

Día 3:

*Para facilitar el desarrollo del protocolo para todas las muestras, aprovechamos este día para acabar de marcar e hibridar el resto de muestras que inicialmente dejamos apartadas.

*En el caso del formato 4x44K -24 h de hibridación- se realizan los lavados de post-hibridación de la primera tanda de muestras (10 muestras, lavar de 5 en 5).

3.2.3.1.6. Lavados de post-hibridación

*Trabajar en condiciones de baja intensidad de luz y bajo campana.

*Son necesarios los siguientes materiales: agitador magnético, *wash 1*, *wash 2*, acetonitrilo, cubeta grande para *wash 1*, cubeta pequeña para acetonitrilo, portaarrays, pinzas, *timer*, imán pequeño, imán grande, 2 tapas de cajas de petri con ranuras en los bordes, 2 vasos de precipitados de 1.000 mL y 2 vasos de precipitados de 2.000 mL a 37°C.

*Tener en cuenta que 2 L de *wash1* y 1 L de *wash2* son para lavar 5 arrays, por ello preparamos cada lavado por duplicado. En un día hacemos dos tandas de filtrados para lavar los 10 arrays que hemos hibridado.

- Colocar el vaso de precipitados grande encima del agitador magnético y verter en él aproximadamente la mitad del *wash 1*.
- Introducir uno de los imanes y una de las tapas de cajas de petri en el vaso de precipitados con el agitador encendido a poca velocidad. Evitar la formación de burbujas.
- Una vez el sistema está estable, introducir el resto del *wash 1* en la cubeta grande y el portaarrays.
- Quitar cada array de su correspondiente cámara (array + *gasket*) e introducirlos en la cubeta con el *wash 1* para separar el array de su *gasket* con ayuda de unas pinzas. Siempre manteniéndolo sumergido en la solución y dejando caer el *gasket* en la cubeta.
- Introducir el array en el portaarrays de la cubeta con *wash 1*.
- Repetir el proceso con cada array.
- Introducir el portaarrays con los arrays hibridados en el *wash 1* del vaso de precipitados e incubarlo durante 5 min.
- Antes de que finalicen los 5 min, ir a por el vaso de precipitados de 1.000 mL y a por el *wash 2 que tenemos a 37°C*.
- Después del tiempo establecido, con cuidado quitar el vaso de precipitados con *wash 1* y colocar el vaso de precipitados de 1.000 mL.
- Introducir un poco de *wash 2* en el vaso de precipitados 1.000 mL. Encender el agitador magnético. Colocar en su interior el segundo imán y la segunda tapa de caja de petri. Añadir el resto del *wash 2*.
- Introducir el portaarrays con los arrays hibridados. Incubar 1 min.
- Antes de que finalice el min, añadir a la cubeta pequeña acetonitrilo hasta casi cubrirla.
- Introducir el portaarrays en el acetonitrilo y dejarlo unos 12 s desplazando muy suavemente el portaarrays de lado a lado.

- Sacar lentamente el portarrays del acetonitrilo de forma que todos ellos salgan secos de esta solución.
- Dejar el portarrays sobre papel secante.
- Sacar cada uno de los arrays con mucho cuidado, secar sus bordes e introducirlos en su cajita original hasta su escaneado ese mismo día. Envolver la cajita en papel de plata.

*Se preparan los *washes* 1 y 2 para los lavados de post-hibridación del día siguiente (en el caso del formato 4x44K -24 h de hibridación-).

Día 4:

*En el caso del formato 4x44K -24 h de hibridación- se realizan los lavados de post-hibridación de la segunda tanda de muestras.

*En el caso del formato 1x44K -44 h de hibridación- se realizan los lavados de post-hibridación- de la primera tanda de muestras.

*Se preparan los *washes* 1 y 2 para los lavados de post-hibridación del día siguiente.

Día 5:

*En el caso del formato 1x44K -44 h de hibridación- se realizan los lavados de post-hibridación- de la segunda tanda de muestras.

3.2.3.2. Análisis de la CGH-array

*El análisis de los resultados de la CGH-array se inicia una vez se obtienen las lecturas de las fluorescencias de los arrays por medio del escaneado. Para el análisis y obtención de resultados se utilizan tres *softwares* diferentes, listados en orden de utilización:

- ***Feature Extraction v8.1 (Agilent Technologies)***
- ***CGH Analytics v3.2.25 (Agilent Technologies)***
- ***InSilicoArray CGH (Centro Príncipe Felipe de Valencia)***

*Los pasos a seguir son los siguientes:

3.2.3.2.1. Extracción de datos

*En primer lugar utilizamos el programa ***Feature Extraction*** que transforma las señales de fluorescencia del array obtenidas mediante el proceso de escaneado, en

datos numéricos que puedan ser analizados. También nos proporciona información acerca de la calidad de hibridación del array.

3.2.3.2.2. Visualización general de resultados

*Seguidamente utilizamos el programa **CGH Analytics**, en el que introducimos el archivo numérico en formato .txt generado por el *Feature Extraction*, y que nos permite obtener resultados visibles gráficamente y aproximados de nuestras muestras. Analiza los resultados por medio del estadístico *Z-Score*. También nos aporta información acerca de la calidad de las muestras por medio de la tabla *QC metrics*, donde debemos observar un *DLR Spread* <3. Mayores *DLR* nos indicarían hibridaciones muy dispersas que podrían hacer desechar el caso.

*Anotamos los resultados visuales que observamos con este programa.

3.2.3.2.3. Análisis y estadística

*Utilizamos el programa **InSilicoArray CGH** que nos permite obtener resultados numéricos a partir de los cuales decidiremos con exactitud los límites de las zonas de ganancia, pérdida o normalidad de las muestras. Tiene acceso gratuito en la red a través de la plataforma de análisis, GEPAS (<http://gepas.bioinfo.cipf.es/>) y analiza los resultados por medio del método estadístico *smoothing* (282).

*A partir del archivo numérico generado por el *Feature Extration*, creamos una plantilla para cada cromosoma, con todos los oligos presentes en el array, su posición en el genoma y gen al que pertenecen; además de un archivo con los resultados de cada una de las muestras para cada cromosoma. La plantilla y el archivo por cromosoma con todas las muestras deben ser introducidos en el *InSilicoArray CGH*.

*Este programa nos genera otro archivo numérico y otro visual para cada muestra y cromosoma a partir del cual ya podemos generar un archivo para cada cromosoma con los resultados de todas las muestras. Con éste es finalmente con el que trabajaremos, concretamente con uno de los datos que nos aporta, el valor **Copy Number Variation (CNV)** que presenta cada uno de los oligos/gen del array.

*Como norma general consideramos ganancia cuando el CNV está por encima de 0,08, pérdida cuando el CNV está por debajo de -0,05 y amplificación cuando el CNV está por encima de 0,5. Las aberraciones genómicas específicas polimórficas no fueron consideradas como alteraciones de número de copias.

3.2.3.2.4. Integración y obtención de resultados

*Los resultados definitivos (regiones ganadas y perdidas por muestra) se obtuvieron a partir de la información visual generada tanto por el *CGH Analytics* como por el *InSilicoArray CGH* y de la información numérica (CNVs) aportada por el *InSilicoArray CGH*.

Pese a establecer unos *cut-offs* generales de ganancia y pérdida atendiendo al valor de los CNVs, debido a la conocida heterogeneidad de alteraciones genéticas de las células tumorales mamarias en un mismo tumor y de la variable infiltración tumoral de nuestras muestras, decidimos establecer un punto de corte o *cut-off* de ganancia para cada una de las muestras. Para establecerlo, comprobamos una o más regiones/caso por FISH que aunque presentaban un CNV fuera del rango de ganancia, por medio de la información visual aportada tanto por el *CGH Analytics* como por el *InSilicoArray CGH*, considerábamos que podría tratarse en realidad de una ganancia real. Para su comprobación, escogimos un gen, que estuviera dentro de la región hipotética de ganancia, para el cual pudiéramos realizar un ensayo de FISH (ver apartado “3.2.5. *FISH en tejido parafinado (sonda comercial y no comercial)*”) por medio de la utilización de una sonda comercial que dispusiéramos o de una sonda no comercial fabricada en el mismo laboratorio.

Los ensayos de FISH fueron realizados sobre cortes de 3-4 μm de bloques de tejido parafinado de la muestra en cuestión. Si el resultado de la FISH era positivo para la ganancia, ajustábamos el punto de corte o *cut-off* para las ganancias en esa muestra, que pasaba a ser el que tuviera esa región. En el caso de las pérdidas no establecimos puntos de corte específicos para cada muestra, debido a la dificultad que presenta la técnica de FISH en parafina para la obtención de resultados de pérdida fiables en los tumores sólidos.

3.2.3.2.5. Obtención del perfil de alteración genómico y cromosómico

*A partir de los datos numéricos obtenidos por los programas previamente mencionados obtuvimos el perfil de alteración genómico. Calculamos el % de genoma alterado, ganado, perdido y el número de alteraciones, ganancias y pérdidas por muestra. Para ello calculamos en primer lugar el nº de pares de bases alteradas, ganadas o perdidas y sus correspondientes % para cada muestra, así como el número de alteraciones, ganancias y pérdidas, y seguidamente realizamos la media de los resultados obtenidos de las muestras para obtener los resultados de cada grupo.

*El perfil de alteración cromosómico se obtuvo a partir de los datos numéricos y visuales facilitados por los programas previamente mencionados que permitieron identificar las regiones de alteración así como su tamaño específico.

3.2.3.2.6. Obtención de los *smallest overlapping regions of imbalance*

*Una vez definidas las zonas de alteración (ganancias y pérdidas) para cada muestra y reunidas todas ellas por cromosomas, se obtuvieron los ***smallest overlapping region of imbalance*** o **regiones de alteración solapadas más pequeñas (SORIs)** de cada grupo de pacientes (recordemos: ER+/PR+ vs ER+/PR-). Para ello se buscaron las regiones que estuvieran alteradas, solapadas y compartidas por un mayor número de muestras para cada cromosoma, y que supuestamente serían las de mayor importancia patogénica o diferenciadoras para cada subtipo tumoral. Las regiones más alteradas y solapadas presentes en $\geq 30\%$ de los casos fueron definidos como los **SORIs recurrentes**.

3.2.3.2.7. Análisis estadístico de los resultados

*El test de ***U Mann-Whitney*** fue utilizado para el análisis de las variables continuas (% de genoma alterado, perdido y ganado; alteraciones, ganancias y pérdidas por muestras).

Para detectar las regiones alteradas con significancia estadística entre los dos grupos de pacientes, analizamos cuatro variables para cada cromosoma: a) el número de casos alterados de cada grupo, b) las regiones mayormente alteradas y solapadas entre los dos grupos, c) las regiones mayormente alteradas, solapadas y compartidas por los dos grupos y d) el número de casos alterados con amplificaciones específicas incluidas en las regiones de alteración recurrentes. El análisis fue realizado mediante la utilización del test de **Chi-cuadrado de Pearson** y el test **exacto de Fisher**.

Las regiones alteradas con significancia estadística entre los dos grupos de pacientes fueron exhaustivamente analizadas para obtener los genes de interés. La descripción de cada gen se obtuvo del *NCBI gene database* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

Todos los tests estadísticos se realizaron con el *SPSS 16.0 Software* (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Un p valor de ≤ 0.05 se consideró estadísticamente significativo y un p valor de ≤ 0.1 se consideró marginalmente significativo.

3.2.4. Fabricación de sondas no comerciales

*Para la realización de este protocolo es necesario disponer de una **librería de BACs** o en el caso de no disponer de ella, realizar una compra de los BACs que nos pudieran interesar. Nuestro laboratorio dispone de la librería de BACs del ***Children's***

Hospital Oakland Research Institute (<http://bacpac.chori.org>), CHORI, de 32k, que representa todo el genoma humano.

Antes de empezar con los diferentes pasos a realizar para la obtención de nuestra sonda, en primer lugar debemos seleccionar uno o varios BACs que contengan el gen a estudiar. Para ello buscamos nuestro gen de interés en la página web: <http://projects.tcag.ca/cgi-bin/variation/gbrowse/hg17/> que nos indicará a su vez los BACs disponibles que contienen el gen de interés y las zonas polimórficas (no escogeremos un BAC que incluya esas zonas para evitar problemas de co-hibridaciones no específicas).

Seguidamente buscamos la anotación del BAC seleccionado previamente, en el *CHORI BAC/PAC resource* (<http://bacpac.chori.org>) para cerciorarnos de que el BAC escogido existe en nuestra librería CHORI. Si así fuera, se localiza la posición del BAC en la librería física guardada en placas de 96 pocillos a -80°C y se inicia el cultivo del mismo.

3.2.4.1. Preparación del medio de cultivo de BACs (2xYT)

- Mezclar en un vaso de precipitados 16 g de triptona + 10 g de extracto de levadura + 5 g de NaCl + 1.000 mL de agua destilada. Colocar la mezcla en un agitador magnético hasta que se disuelva.
- Repartir el medio en ampollas de medio litro.
- Esterilizar en autoclave. Guardar el medio a temperatura ambiente hasta su utilización.
- Una vez autoclavado, añadir por botella (500 mL) 500 µL de cloramfenicol (200 mg/mL) alicuotadas y conservadas en el congelador y mezclar invirtiendo la misma varias veces. A partir de este momento el medio de cultivo debe guardarse en la nevera.

3.2.4.2. Cultivo de BACs (midipreps)

*Se utiliza el kit *Qiagen Plasmid Midi* que incluye los reactivos y columnas necesarias para la realización del proceso.

Día 1:

*Bajo campana.

- Picar el pocillo de la librería que contiene el BAC escogido.
- Colocarlo en 3 mL de medio de cultivo 2xYT en un falcon de 15 mL.

- Dejar unas 17 h a 37°C y 300 rpm en un agitador orbital (*Infors*) (las 17 h es el punto en que el crecimiento es óptimo, pero como nos interesa el ADN no importa si se produce en este paso una saturación del cultivo).

Día 2:

*Trabajar con el *bunsen* encendido para mantener la zona de trabajo en condiciones estériles.

- Inocular 500 µL del cultivo turbio en un erlenmeyer con 50 ml de 2xYT (dilución 1/10). Incubar unas 17 h (intentar no pasar de 20 h porque las bacterias entrarían en fase de latencia y es preferible encontrarlas en fase de crecimiento exponencial).
- Criopreservar cultivo: añadir 1.700 µL de cultivo día 1 + 300 µL de glicerol 87%. Mezclar bien con vórtex y guardar a -80°C (si necesitáramos de nuevo este mismo BAC, el protocolo comenzaría a partir del día 2 picando del cultivo criopreservado).

Día 3:

*Utilizar el kit *Qiagen Plasmid Midi*.

*Preparar centrífuga a 4°C. Colocar el *buffer* QF a 65°C hasta su utilización.

- Pasar los cultivos a flascones de 50 mL.
- Centrifugar a 4.000 rpm 15 min y a 4°C.
- Decantar y resuspender el *pellet* sin tocarlo directamente en 3 mL de *buffer* P1 -conservado en nevera ya que contiene la RNAsa-. Realizar paso con el *buffer* en hielo.
- Añadir 3 mL de *buffer* P2 -lisis alcalina-. Invertir 4-5 veces e incubar a temperatura ambiente 5 min.
- Añadir 3 mL de *buffer* P3 -ácido acético, neutralizador y estabilizador- frío. Invertir 4-5 veces e incubar en hielo 10 min.
- Centrifugar a 4.000 rpm 45 min y a 4°C.
- Recoger a otro flascón la solución de forma limpia hasta donde podamos, sin llevarnos restos de cultivo. Si no pudiéramos recoger fácilmente la solución volveríamos a centrifugarla.
- Centrifugar a 4.000 rpm 15 min y a 4°C.
- Rotular y colocar columna en un tubo de 15 mL.
- Equilibrarla con 3 mL de *buffer* QTB.

- Recoger solución centrifugada y empezar a pasarla por la columna.
- Lavar con 5 mL de *buffer* QC.
- Rotular nuevos tubos de elución de 15 mL.
- Colocar una columna en nuevos tubos y eluir el ADN con 2 mL de *buffer* QF precalentado a 65°C.
- Pasar 1 mL de eluido a *ependorfs* de 1,5 mL.
- Precipitar el ADN con 1 µL de isopropanol.
- Mezclar por inversión.
- Dejar toda la noche a -20°C o 1 h a -80°C.

Día 4:

- Centrifugar a 14.000 rpm 45 min y a 4°C.
- Decantar sobrenadante.
- Lavar con 100 µL de etanol 70% frío.
- Centrifugar a 10.000 rpm 10 min.
- Decantar sobrenadante. Dejar secar.
- Resuspender en 50 µL de agua destilada.
- Cuantificar el ADN y guardarlo a -20°C sellado con *parafilm* hasta su utilización.

3.2.4.3. Marcaje de BACs (*nick translation*)

*Se utiliza el kit de *nick translation* y los fluorocromos *Spectrum red* (marcador en rojo) o *green* (marcador en verde) según prefiramos.

Día 1:

*Se marca 1 µg de ADN de BAC. Es conveniente que para llegar a esa cantidad de ADN no superemos los 17,5 µL. Si se pasara tal cantidad se deja evaporar a 37°C algo de la solución en la que tenemos 1 µg de ADN. Si en cambio obtuviéramos 1 µg con menos de 17,5 µL rellenar con *nucleasa free water* hasta alcanzar dicha cantidad.

*Preparar baño seco a 70°C

*Sacar todos los reactivos excepto la enzima. Sacar la enzima en el momento de su utilización.

- Realizar **mix de la Nick:**

1 µg ADN ----- x µL
Nucleasa free water----- (17,5 µL -x µL)

Mix dNTPs*	-----	10 μ L
Mix dTTPs*	-----	5 μ L
Buffer de la <i>nick</i>	-----	5 μ L
Spectrum (<i>red</i> o <i>green</i>)*	-----	2,5 μ L
Enzima	-----	5 μ L

- Dar un *pulso* de centrifuga a la mezcla.
- Incubar entre 2,5-3 h a 15-18°C en un baño protegido de la luz con papel de plata.

***Solución dNTPs:** 10 μ L dATP + 10 μ L dCTP + 10 μ L dGTP (se puede preparar más cantidad siempre manteniendo las proporciones de cada alícuota de dNTP 0,3 mM).

***Solución dTTPs:** 10 μ L 0,3 mM dTTP + 20 μ L *nuclease free water* (se puede preparar más cantidad manteniendo las proporciones).

***Alícuotas Spectrum (*red* o *green*):**

- **Spectrum red:** añadir 100 μ L *nuclease free water* al *spectrum red* liofilizado. Añadir en un *ependorf* envuelto en papel de plata 10 μ L de la mezcla anterior + 40 μ L de agua destilada (esta será la solución *stock* a partir de la cual se cogen los 2,5 μ L para la mix de la *nick*).
- **Spectrum green:** añadir 50 μ L *nuclease free water* al *spectrum green* liofilizado. Añadir en un *ependorf* envuelto en papel de plata 10 μ L de la mezcla anterior + 40 μ L de agua destilada (esta será la solución *stock* a partir de la cual se cogen los 2,5 μ L para la mix de la *nick*).

***Pasado el tiempo pertinente continuar con el protocolo.**

- Detener la reacción de la *nick* colocando la mix 10 min en baño seco a 70°C.
- Correr 5 μ L del volumen de la reacción en un gel de agarosa al 2%. Observar las bandas de los fluorocromos bajo rayos UV: el fluorocromo verde es más pequeño y correrá en el gel antes que el rojo. Comprobar que se ve un *smear* y que se encuentra localizado mayoritariamente entre las bandas de 300 y 600 pb (**Fig. 25**).
- Teñir el gel con una solución de bromuro de etidio (100 mL de agua destilada + 25 μ L de bromuro de etidio) unos 20-30 min. Revelar y observar el *smear* del ADN (**Fig. 25**).

*Si hay una banda de ADN sin cortar o la mayor parte del mismo es de un tamaño mayor a 600 pb volver a incubar con 5 μ L de enzima. Si hay poca señal, incubar de nuevo el gel en bromuro de etidio.

*Posible punto de parada. Dejar muestras tapadas con papel de plata a -20°C .

- Añadir a la mix:
 - 10 μ L de *human Cot-DNA* (descongelar antes y darle *spin*).
 - 10 μ L de acetato sódico (NaAc) 3M.
 - 250 μ L etanol 100% frío.

- Dejar precipitando toda la noche a -20°C o 1 h a -80°C .

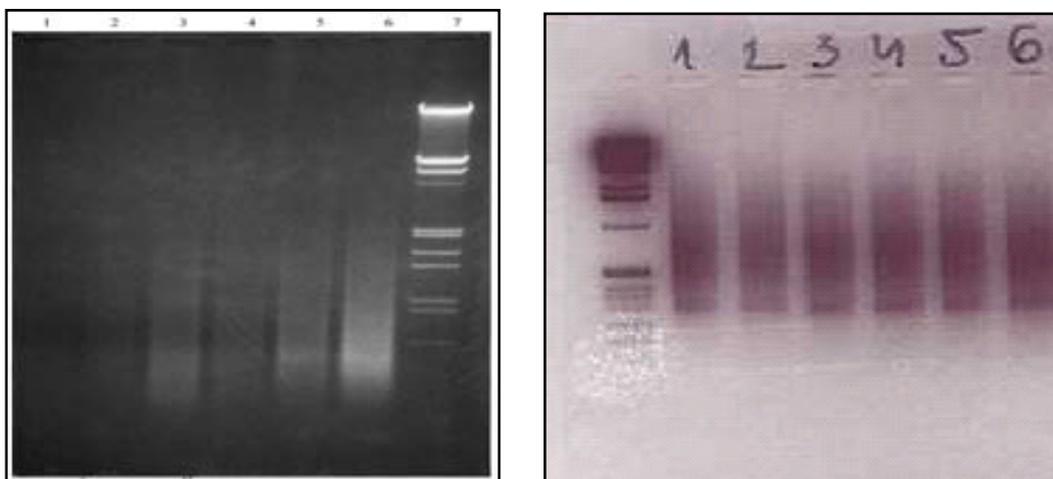


Fig. 25. Imagen de un gel de agarosa. A la izquierda observamos el ADN marcado con fluorocromo, el último pocillo contiene el marcador de peso molecular; a la derecha observamos todo el ADN que hemos corrido en el gel por medio de la tinción con bromuro de etidio, en este caso el primer pocillo contiene el marcador de peso molecular.

Día 2:

*Preparar la centrífuga a 4°C y un baño seco con un *ependorf* de agua destilada a 70°C .

- Centrifugar a 13.000 rpm 45 min y a 4°C .
- Decantar el sobrenadante, añadir 250 μ L etanol 80% frío.
- Centrifugar a 10.000 rpm 10 min y a 4°C .
- Decantar el sobrenadante sin perder de vista el *pellet*, secar boca abajo con punta.
- Secar totalmente 15-20 min a 37°C (sino está seco dejar más tiempo).

- Resuspender el *pellet* en 11 µL de agua destilada precalentada a 70°C.
- Guardar el *ependorf* envuelto en papel de plata a -20°C hasta su posterior utilización.

*Para comprobar que el BAC cultivado y marcado localiza en nuestra región de interés, antes de utilizarlo para un ensayo real de FISH realizaremos una comprobación previa por medio de un ensayo de FISH sobre metafases normales. Mediante la captura con DAPI (las bandas DAPI se corresponden con las bandas G) podremos comprobar la localización del BAC seleccionado.

3.2.4.4. Obtención de metafases a partir del cultivo de sangre periférica

*Previamente tener preparado medio de cultivo RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*), fijador (*Carnoy*) y solución hipotónica:

- **Medio de cultivo completo:**
 - Botella de 100 mL medio comercial RPMI 1640 -nevera- + 1 mL de heparina de sodio o de litio (de nevera) -1:100- (con aguja heparinizada).
 - Extraemos 20 mL de la mezcla anterior: repartimos 5 mL en 4 falcons - guardar en nevera y apuntar fecha-.
 - Añadir a la botella de 80 mL de medio RPMI + heparina:
 - 20 mL suero fetal (alícuota congelada en falcon).
 - 2 mL glutamina (alícuota congelada en tubos debe ser atemperada y resuspendida).
 - 1 mL penicilina/estreptomina (alícuota congelada en *ependorfs* que debe ser atemperada).
 - Repartir los 100 mL finales obtenidos en 10 falcons con 10 mL del medio preparado y rotular con C de constitucional (guardar en congelador). Una vez descongelados se pueden guardar un día en nevera para ser utilizados al día siguiente.
- **Hipotónico:**
 - 0,075 M cloruro sódico en agua destilada = 0,5592 g de cloruro sódico/ 1.000 mL agua. Preparamos 1 L y lo guardamos en nevera. Separamos unos 100 mL y los colocamos a 37°C para atemperarlo.

- **Fijador (*Carnoy*):**

- 3 partes de metanol : 1 parte de ácido acético

*La muestra de SP debe ser recogida con heparina sódica o litio, nunca utilizar EDTA como anticoagulante.

*En el caso en que la muestra de sangre viniera en medio con EDTA se rellenaría un tubo cónico con la SP + suero fisiológico. Centrifugar 10 min a 10.000 rpm, descartar sobrenadante y volver a lavar.

*Invertir el tubo heparinado para homogeneizar la muestra.

- Añadir 1 mL de sangre a falcón con medio RPMI stock atemperado en baño 37°C. Resuspender un par de veces con pipeta.
- Descongelar y atemperar PHA -fitohematoglutinina- (guardarla congelada en alícuotas de 0,5 mL). Añadir alícuota de PHA, para la estimulación de los linfocitos T.
- Homogeneizar. Introducir el cultivo en una cámara a 37°C y al 5% de CO₂, 72 h de cultivo. Tumbado y con el tapón rosca sin cerrar totalmente.
- Tras las 72 h, homogeneizar el cultivo y añadir 400 µL de colcemid de la botella stock de nevera (detiene la división celular en metafase). Incubar de pié en la estufa a 37°C 30 min.
- Transferir el contenido del falcon a tubo 15 mL correctamente etiquetado. Centrifugar 10 min a 2.000 rpm.
- Atemperar el hipotónico de la nevera.
- Descartar sobrenadante y resuspender el *pellet* manualmente en la pequeña cantidad de dilución que queda.
- Añadir poco a poco el hipotónico resuspendiendo manualmente el *pellet*.
- Dejar incubar el hipotónico en baño 37°C durante 20 min.
- Centrifugar a 2.000 rpm 10 min.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el *pellet*.
- Añadir 3-4 gotas de fijador y resuspender manualmente con fuerza. Repetir 3-4 veces y finalmente rellenar tubo hasta arriba.
- Centrifugar a 2.000 rpm 10 min.
- Repetir el lavado con fijador dos veces más (total 3 lavados).
- Después del último lavado decantamos sobrenadante y resuspendemos el *pellet* en la cantidad necesaria de fijador como para obtener una disolución celular adecuada.

- **Realizar las extensiones:**
 - Limpiar el portaobjetos (conservados a -20°C con metanol).
 - Señalizarlos con la referencia del caso y la sonda a utilizar.
 - Extender un par de gotas desde una altura mínima de 1 m.
 - Secar la extensión.
 - Visualizar las extensiones al microscopio de inversión (*CK2, Olympus*) para determinar la densidad celular y presencia de metafases.

- Dejar las extensiones toda la noche a temperatura ambiente para un correcto envejecimiento (deshidratación cromosómica).

3.2.4.5. FISH de BACs en extensión celular

*Realizar la extensión el día anterior a la hibridación y marcar la zona donde encontremos un mayor número de metafases.

Día 1:

3.2.4.5.1. Hibridación

*Previamente preparar un baño a 74°C (72-76°C) con un *coplin* de formamida 70%. Comprobar temperatura en su interior.

*Preparar una cámara húmeda en estufa a 37°C.

- Desnaturalizar el portaobjetos con extensión celular 5 min a 74°C en formamida 70%.
- Deshidratar en una serie de etanoles:
 - 2 min 70%.
 - 2 min 80%.
 - 2 min 100%.
- Dejar secar.
- Desnaturalizar 5 µL de mix de sonda de BACs 5 min a 74°C:
 - **Mix de sonda de BACs** (5 µL para porta 20x20):
 - 1 µL de sonda de BACs marcada.
 - 1 µL de agua destilada.
 - 3 µL de *buffer* de hibridación.

- Poner los 5 μL de la mix de sonda en un cubreobjetos, dejar caer la extensión encima y presionar ligeramente sin desplazar cubreobjetos. Sellar con *parafilm*.
- Dejar hibridar toda la noche en cámara húmeda a 37°C.

Día 2:

*Previamente preparar un baño a 45°C con res *coplins* con soluciones de formamida al 50%, 1 coplin con 2xSSC y otro con 2xSSC/0,1%NP40. Envolver todos los *coplins* en papel de plata para evitar pérdida de señal fluorescente de la sonda.

3.2.4.5.2. Lavados de post-hibridación

- Extraer cuidadosamente el *parafilm* que envuelve el porta.
- Realizar 3 lavados en formamida al 50% de 10 min cada uno.
- Realizar 1 lavado en la solución de 2xSSC de 10 min.
- Realizar 1 lavado en 2xSSC/0,1%NP40.
- Contrateñir con 5 μL DAPI y colocar un cubreobjetos.
- Introducir el portaobjetos en una caja opaca a -20°C durante un mínimo de 20 min.

3.2.4.5.3. Análisis

*Observar el portaobjetos en el microscopio de fluorescencia. Seleccionar las metafases y determinar si el brazo y cromosoma al que teóricamente pertenece la sonda de BAC coincide con la señal de hibridación que observamos. Si fuera así ya se puede utilizar esta sonda para realizar una prueba de FISH sobre tejido (**Fig. 26**).

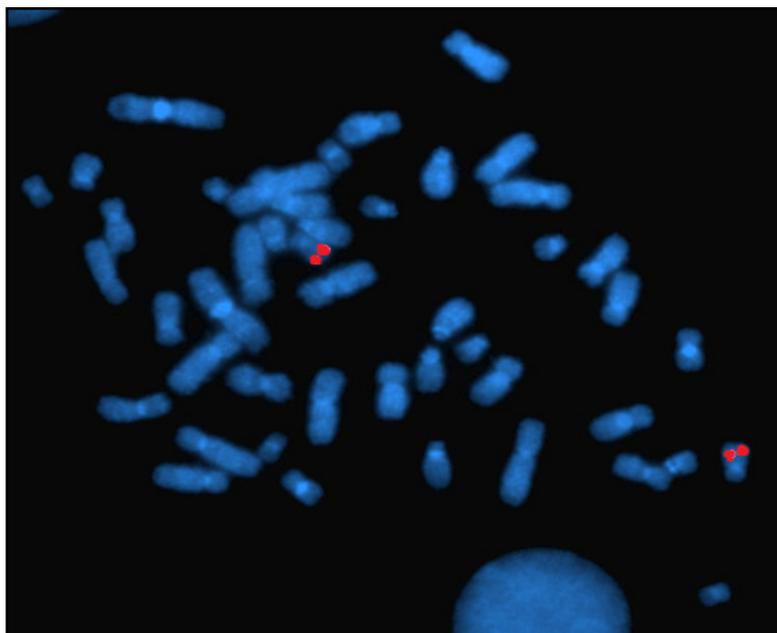


Fig. 26. Imagen del FISH en extensión celular, capturada con el microscopio de fluorescencia, del BAC RP11-51F16 utilizado en este estudio, que se localiza en el cromosoma 17 y representa al gen *MAP3K3* marcado con *spectrum red*. Observamos las dos señales presentes por duplicado en cada uno de los cromosomas 17 de esta metafase de la extensión celular.

3.2.5. FISH en tejido parafinado (sonda comercial y no comercial)

*Se aplicó la técnica de FISH sobre cortes (3-4 µm) de tejido parafinado de algunas de las muestras analizadas por el array de CGH para la comprobación de algunos de los resultados obtenidos y establecimiento de puntos de corte o *cut-offs* de ganancia para cada muestra.

Día 1:

3.2.5.1. Desparafinación

*Previamente tener preparadas soluciones atemperadas de etanoles al 100%, 80% y 70%.

- Dejar toda la noche el corte de tejido en una estufa a 65°C para que “llore” la parafina en la que está incluida.
- Realizar en una cubeta 3 lavados en xileno de 10 min cada uno.
- Realizar en un *coplin* 2 lavados en etanol al 100% de 5 min cada uno.
- Realizar en un *coplin* 1 lavado en etanol al 80% de 5 min.
- Realizar en un *coplin* 1 lavado en etanol al 70% de 5 min.
- Lavar los cortes en un *coplin* con agua destilada y dejarlos hasta realizar el siguiente paso.

3.2.5.2. Pretratamiento

*Previamente tener preparadas soluciones de EDTA al 1%.

- Introducir los portaobjetos en una cubeta con una solución fría de EDTA al 1%.
- Introducir ambas cubetas en un microondas y realizar 3 tandas de tratamiento: 7 - 5 - 7 min a máxima potencia. Es importante evitar que las soluciones hiervan para que el tejido no se desprenda. Si así fuera, detener el proceso, dejar enfriar unos minutos y a continuación finalizar los minutos restantes de esa tanda.
- Entre tanda y tanda dejar enfriar las cubetas y si fuera necesario en caso de evaporación, añadir más EDTA o agua destilada.

- Dejar secar los portaobjetos seguidamente a la finalización de la tercera tanda.

3.2.5.3. Digestión

*Previamente tener preparado un baño seco a 37°C, atemperar a 37°C una cámara húmeda (cajita con papel secante humedecido), preparar la solución de digestión y la solución *stop* (ver apartado “3.2.10.1. Soluciones de trabajo”).

- Colocar 40 µL de la solución de digestión sobre un cubreobjetos 24x40 mm. Colocar el portaobjetos encima e introducirlo en la cámara húmeda.
- Incubar en estufa a 37°C durante 15 min.
- Lavar portaobjetos en solución *stop* 5 min para detener la reacción de digestión.
- Vigilar que el cubreobjetos se desprende del portaobjetos.
- Lavar en agua destilada unos segundos para eliminar restos de la solución anterior.
- Dejar secar portaobjetos a temperatura ambiente. Podemos ayudarnos de papel absorbente o con ayuda de una placa calefactora (*Heraeus*).
- Observar la digestión al microscopio óptico invertido (*CK2, Olympus*).

*En una buena digestión deberíamos observar las células o grupos de células más o menos aisladas de su tejido adjunto, habiendo además desaparecido buena parte de él. En una sobredigestión observamos estructuras cristalinas que recuerdan la forma de la estructura de las ramas de un helecho y ausencia de estructura celular. Es posible que no todos los cilindros se hayan digerido correctamente. Podríamos volver a incubar el portaobjetos con la solución de digestión repitiendo los pasos anteriores hasta conseguir la digestión deseada.

3.2.5.4. Hibridación

*Realizar hibridación en condiciones de oscuridad.

*En este caso se utilizaron tanto sondas comerciales disponibles en nuestro laboratorio como sondas no comerciales fabricadas el mismo.

- Realizar una mix de sonda. Se utilizaron 5 µL de mix de sonda para cubreobjetos 20x20 mm ó 24x24 mm (**Tabla 11**).

Tabla 11. Preparación de la mix de sonda según si se trata de una sonda comercial o de una sonda no comercial. En algunos casos la sonda se coge del vial y se hibrida directamente sin tener que preparar la mix.

COMPONENTE	TIPO DE SONDA			
	Comercial		No comercial (BAC)	
	1 sonda	2 sondas	1 sonda	2 sondas
Sonda	1 µL	1 µL/sonda	1 µL	1 µL BAC + 1 µL CEP
Agua destilada	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Buffer de hibridación	3 µL	2 µL	3 µL	2 µL

- Sellar el portaobjetos y el cubreobjetos con *parafilm*.
- Desnaturalizar la sonda y el portaobjetos 5 min a 85°C y dejar hibridar a 37°C toda la noche en el hibridador (*Hybrite, Vysis*).

Día 2:

3.2.5.5. Lavados de post-hibridación

*Previamente preparar un baño a 45°C con tres *coplins* con soluciones de formamida al 50%, 1 *coplin* con 2xSSC y otro con 2xSSC/0,1%NP40. Envolver todos los coplins en papel de plata para evitar pérdida de señal fluorescente de la sonda por la luz.

- Extraer cuidadosamente el *parafilm* que envuelve el portaobjetos.
- Realizar 3 lavados en formamida al 50% de 10 min cada uno.
- Realizar 1 lavado en la solución de 2xSSC de 10 min.
- Realizar 1 lavado en 2xSSC/0,1%NP40 de 5-7 min.
- Contrateñir con unos 10-15 µL de 4,6-diamino-2-phenilindole (DAPI) y colocar un cubreobjetos 20x20 mm ó 24x24 mm.
- Introducir el portaobjetos en una caja opaca a -20°C durante un mínimo de 20 min antes de su análisis y para su conservación posterior.

3.2.5.6. Análisis y criterios de valoración

*Para analizar las muestras se utilizó un microscopio de fluorescencia (*Olympus BX51*) y el *Cytovision Software* (*Applied Imaging, Newcastle, UK*).

- La valoración de los resultados de FISH se llevó a cabo de la siguiente forma (283):
 - Contar el número de señales de la sonda de locus específico y centromérica en una media de 60-100 núcleos no superpuestos.

- Calcular el resultado de la FISH para cada caso en forma de ratio, dividiendo el valor más frecuente de la señal de la sonda por el valor más frecuente de la señal centromérica.
- Se consideró amplificación cuando la *ratio* fue ≥ 2 .
- Se consideró ganancia cuando encontramos tres señales de sonda de locus específico respecto a dos señales centroméricas por núcleo.
- Se consideró pérdida cuando encontramos menos de dos señales de sonda de locus específico en más del 50% de los núcleos.
- Se consideró polisomía cuando encontramos tres o cuatro señales de sonda de locus específico y de sonda centromérica.
- Se consideró monosomía cuando encontramos una sola señal de ambas sondas.

3.2.6. Rehibridación de FISH en tejido parafinado

*Este protocolo se utiliza en los casos en los que no se han obtenido buenos resultados con la técnica de FISH, ya sea por una mala hibridación de la sonda, por la existencia de un exceso de ruido de fondo o por la necesidad de más tiempo de digestión.

- Retirar el cubreobjetos en una cubeta con 2xSSC/1%NP40.
- Lavar el portaobjetos en una solución astringente (ver apartado “3.2.10.1. Soluciones de trabajo”) 5 min a 72°C +/-2°C.
- Deshidratar en una serie creciente de etanoles (70%, 80% y 100%) 1 min cada uno.
- Secar durante al menos 7 min a temperatura ambiente.
- A partir de aquí se realiza una nueva mix de sonda y se continúa con el resto del protocolo de FISH de la forma habitual.

3.2.7. Arrays de tejidos

*Se construyeron 4 TMAs con 25 muestras cada uno (245).

*Se utilizó tejido hepático sano para facilitar la lectura de los resultados.

3.2.7.1. Elaboración de la plantilla del TMA

*Inicialmente elaboramos un esquema en el que incluimos, según establecimos previamente, los números de biopsia de cada muestra por triplicado y el nombre del tejido hepático en forma de una diagonal central y alguno más en los extremos (**Fig.**

27). Incluimos 25 pacientes por TMA que incluyeron un total de 100 muestras (50 tumores ER+/PR+ y 50 ER+/PR-). Se elaboraron un total de 4 plantillas.

3.2.7.2. Selección del tejido

*A partir del corte de hematoxilina-eosina, que corresponde con el bloque de parafina escogido, observamos al microscopio óptico (*Olympus BX41*), con ayuda del patólogo, la zona de tejido tumoral que más nos interesa y la marcamos en el portaobjetos con un rotulador. Seleccionaremos tres zonas representativas de ese o de otro bloque tumoral del mismo paciente, en el caso de que no tuviéramos suficiente muestra con uno sólo.

04B4470	03B12383	07B812	07B4165	07B4165	04B4108	04B4108	07B9800	Liver	06B2698	Liver
04B4470	03B12383	07B812	07B4165	07B4546	04B4495	04B4108	Liver	03B11050	06B2698	
04B4470	03B12383	07B812	07B3780	07B4546	04B4495	Liver	07B9800	03B11050	06B2698	Liver
02B590	07B2208	07B11661	07B3780	07B4546	Liver	07B13623	07B9800	03B11050	05B4521	
02B590	07B2208	07B11661	07B3780	Liver	04B4495	07B13623	06B3680	03B8541	05B4521	
02B590	07B2208	07B11661	Liver	07B5744	07B7764	07B13623	06B3680	03B8541	05B4521	03B4806
04B2250	04B2250	Liver	03B12637	07B5744	07B7764	04B10750	06B3680	03B8541	05B4735	03B4806
04B2250	Liver	03B12637	03B12637	07B5744	07B7764	04B10750	04B10750	06B4735	05B4735	03B4806

Fig. 27. Ejemplo de plantilla de uno de los 4 TMAs elaborados en este estudio. Observamos las tres réplicas por paciente, así como la diagonal central de tejido hepático y algún cilindro más del mismo en los extremos.

3.2.7.3. Construcción del TMA

*Para la elaboración de un TMA necesitamos un *arrayer* de tejidos (*Manual Tissue Arrayer I, K7 BioSystems*), la plantilla previamente elaborada, el bloque de parafina en el que está incluido la muestra de tejido tumoral de uno de los pacientes y su correspondiente corte de hematoxilina-eosina ya marcado, el tejido hepático, un bloque de parafina en blanco y las agujas del diámetro que prefiramos para realizar los cilindros de tejido y del bloque en blanco. En este estudio la distancia entre cilindros y el diámetro de los mismos fue de 1 mm (**Fig 28**).



Fig. 28. Imagen de dos de los 4 TMAs contruidos en este estudio. Ambos TMAs contienen los cilindros de 25 muestras con tres réplicas para cada una de ellas, así como los cilindros de tejido hepático situados en la diagonal central -de color más oscuro- y en algunos extremos del TMA.

Los pasos a seguir son:

- Fijamos el bloque blanco de parafina en la parte inferior del *arrayer* y establecemos una posición inicial numérica con ayuda del sistema de medición del *arrayer*. Obtenemos un cilindro con la aguja correspondiente y desechamos la parafina extraída.
- Colocamos la bandeja, que viene con el *arrayer*, encima del bloque en blanco de parafina de forma que nos permite trabajar ahora con el bloque tumoral en el *arrayer* sin mover de su posición el bloque en blanco. Encima del bloque tumoral, colocamos el corte de hematoxilina-eosina intentando que coincida la zona marcada con el bloque tumoral, de forma que la aguja del *arrayer* apunte también hacia esa zona.
- Retiramos el corte de hematoxilina-eosina y obtenemos el cilindro de tejido tumoral con su aguja correspondiente sin desechar todavía su contenido.
- Retiramos el bloque tumoral y la bandeja del *arrayer*.
- Introducimos el cilindro tumoral en el agujero previamente realizado del bloque en blanco de parafina.
- Movemos el bloque en blanco, que ahora ya contiene el primer cilindro tumoral, 1 mm hacia la dirección y sentido en que vayamos a incluir el siguiente cilindro de tejido tumoral, siguiendo la plantilla correspondiente.
- Repetimos el proceso desde el principio hasta completar el total de la plantilla.
- Conservar los TMAs a temperatura ambiente hasta su utilización.

3.2.7.4. Corte del TMA

*A partir de los TMAs elaborados se realizan unos cuantos cortes de los mismos con un microtomo (*RM2255, Leika*). Es mejor no cortar todos los TMAs de una sola vez y hacerlo a medida que los cortes van siendo utilizados, para una mejor conservación del tejido. Previamente al uso del micrótopo, es importante colocarlos aproximadamente una hora antes en el congelador para facilitar su corte. Los cortes del TMA se van colocando en un baño a 38°C y de ahí se van recogiendo con un portaobjetos. Finalmente, estos portaobjetos se dejan secar a temperatura ambiente. En este estudio los cortes realizados fueron de 3 micras.

- La valoración de los resultados de FISH se llevó a cabo de la siguiente forma (283):
 - Contar el número de señales de la sonda de locus específico y centromérica en una media de 60-100 núcleos no superpuestos entre los tres cilindros de cada caso.
 - Calcular el resultado de la FISH para cada caso en forma de ratio, dividiendo el valor más frecuente de la señal de la sonda por el valor más frecuente de la señal centromérica por cada cilindro.
 - Se consideró amplificación cuando la ratio fue ≥ 2 .
 - Se consideró ganancia cuando encontramos tres señales de sonda de locus específico respecto a dos señales centroméricas por núcleo.
 - Se consideró pérdida cuando encontramos menos de dos señales de sonda de locus específico en más del 50% de los núcleos.
 - Se consideró polisomía cuando encontramos tres o cuatro señales de sonda de locus específico y de sonda centromérica.
 - Se consideró monosomía cuando encontramos una sola señal de ambas sondas.

3.2.8. FISH en tejido parafinado procedente del TMA

*En este estudio se aplicó la técnica de FISH para la extrapolación, en un mayor número de muestras, de los resultados de interés encontrados en el estudio del array de CGH.

*El protocolo a seguir es el mismo que el indicado en el apartado “3.2.5. FISH en tejido parafinado (sonda comercial y sonda no comercial)”. Se utilizan 15 μ L de mix de sonda para cubreobjetos 24x60 mm:

- 10,5 µL de *buffer* de hibridación.
- 3 µL de agua destilada o 0,5 µL en el caso de sondas de BACs.
- 1,5 µL de sonda comercial o 3 µL de sonda de BAC + 1 µL de sonda CEP.

*Se utilizaron las siguientes sondas:

- *ZNF217-Spectrum Orange* / *20q11-Spectrum Green* (*Kreatech Diagnostics*, Amsterdam, *The Netherlands*) (**Fig. 29**) -15 µL directamente del vial-

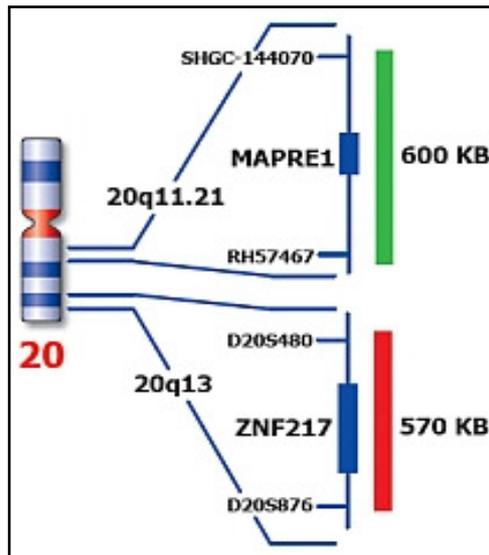


Fig. 29. Esquema de la sonda **KBI-10733 ZNF217 (20q13) / 20q11** (*Kreatech Diagnostics*, Amsterdam, *The Netherlands*).

- Sonda BAC RP11-51F16 (representa el gen *MAP3K3*) -marcada en *Spectrum red*- (**Fig. 30**).

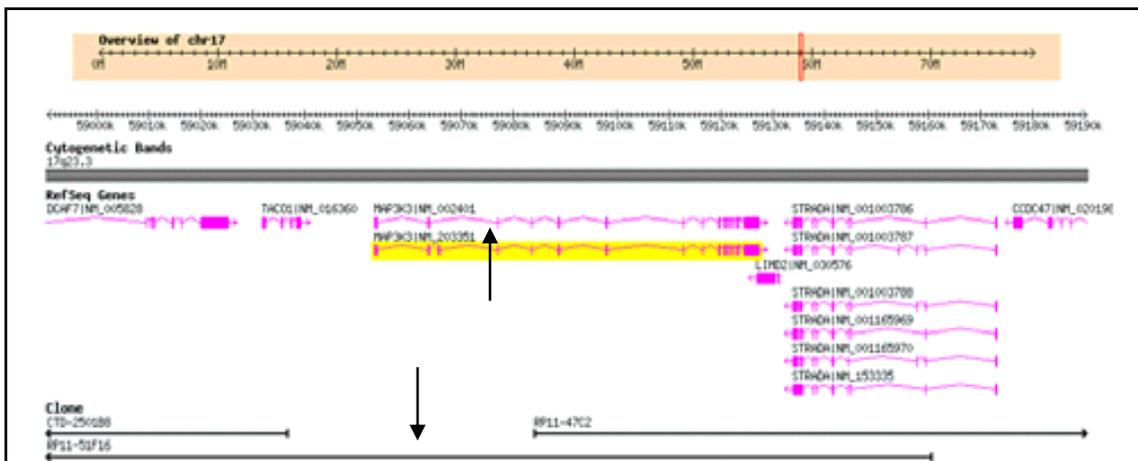


Fig. 30. Esquema de la localización del **BAC RP11-51F16** que localiza en la región 17q23.3 y contiene el gen *MAP3K3* (ambos indicados con las flechas).

- CEP17-*Spectrum Green* (Abbott Molecular).
- Sonda BAC RP11-168J8 (representa el gen *RPS6KB1*) -marcada en *Spectrum red*- (Fig. 31).

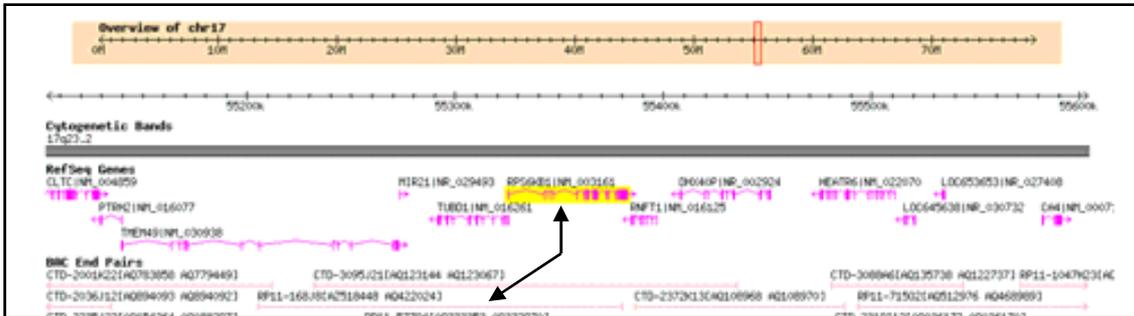


Fig. 31. Esquema representativo del **BAC RP11-168J8** que localiza en la región 17q23.2 y contiene el gen *RPS6KB1* (ambos indicados con las flechas).

3.2.9. Tests estadísticos utilizados para el análisis de la FISH

*Los resultados obtenidos de la técnica de FISH fueron analizados estadísticamente mediante el test de Chi-cuadrado de *Pearson* (X^2) y el test exacto de *Fisher*. Todos los tests estadísticos se realizaron con el *SPSS 16.0 Software* (*SPSS Inc*, Chicago, IL, USA). Un p valor de ≤ 0.05 se consideró estadísticamente significativo y un p valor de ≤ 0.1 se consideró marginalmente significativo.

3.2.10. Material de laboratorio

*(n) = guardar en nevera / (p) = preparar en cada proceso / (ta) = guardar a temperatura ambiente.

3.2.10.1. Soluciones de trabajo

- **Alícuotas de pepsina 100 mg/mL:** disolver 100 mg de pepsina en 1 mL de agua. Hacer alícuotas de 5 μ L y congelarlas.
 - **Azul de bromofenol 6x:** solución A + 0,125 g de xileno cianol. Filtrar y hacer alícuotas en eppendorfs de 1,5 mL. (n)
- *Solución A: 50 mL de sacarosa 40% (20 g de sacarosa + 50 mL de agua destilada) + 0,125 g de azul de bromofenol.
- **Etanol 80%:** 80 mL de agua destilada + 20 mL de etanol 100% (n).
 - **Etanol 70%:** 70 mL de agua destilada + 30 mL de etanol 100% (n).
 - **EDTA 1x:** 300 mL de agua destilada + 3 mL de EDTA 100x (n).

- **Formamida 50%:** 125 mL de formamida + 100 mL de agua destilada + 25 mL de 20xSSC + 6 gotas de HCl puro (n).
- **Formamida 70%:**
- **MgCl₂ 1M:** 20,33 g de MgCl₂ + 100 mL de agua destilada (ta).
- **Solución de digestión:** 10 mL de agua destilada + 100 µL de HCl 35% + 5 µL de alícuota de pepsina 100 mg/mL. Añadir la pepsina justo antes de realizar la digestión de la muestra (p).
- **NaAc 3M:** 24,6 g de acetato sódico + 100 mL de agua destilada (ta).
- **PBS 10x:** 1 sobre de PBS + 100 mL de agua destilada (ta).
- **Solución astringente:** 100 µL de 20xSSC + 40 ml de agua destilada (n).
- **Solución de bromuro de etidio:** 100 mL de agua destilada + 25 µL de bromuro de etidio.
- **Solución STOP:** 50 mL de PBS 1x + 2,5 mL de MgCl₂ 1M (p).
- **Solución TBE:** 100 mL de TBE 10x + 900 mL de agua destilada (ta).
- **2xSSC:** 100 mL de 20xSSC + 900 mL de agua destilada (n).
- **20xSSC:** 88,23 g/L de citrato trisódico (C₆H₅Na₃O₇) + 175 g/L de cloruro sódico (NaCl) + 1.000 mL de agua destilada. Ajustar pH 6,2-6,3 (ta).
- **2xSSC/0,1%NP40:** 499,5 mL de 2xSSC + 0,5 mL de NP40 o Tween 20 (n).
- **2xSSC/1%NP40:** 495 mL de 2xSSC + 5 mL de NP40 o Tween 20 (n).

3.2.10.2. Reactivos

- Acetato sódico (NaAc): Acetato de Sodio anhidro -Merck-.
- Acetonitrilo: Acetonitrile -Sigma-.
- Ácido acético: Ácido acético glacial -Merck-.
- Ácido clorhídrico (HCl): Ácido clorhídrico -Merck-.
- Agarosa: Agarosa AG 120 250 g -Ecogen-.
- Alu 1: Alu 1 -GE Healthcare Europe GmbH-.
- Azul de bromofenol: Azul de bromofenol -Merck-.
- Bromuro de etidio: *Ethidium Bromide Solution* 10 mg/ml -Bio-Rad-.
- Citrato sódico: Citrato sódico tribásico -Merck-.
- Cloramfenicol: Cloramfenicol -Sigma-.
- Cloruro magnésico (MgCl₂): Cloruro magnésico -Merck-.
- Cloruro sódico (NaCl): Cloruro de sodio -Merck-.
- Colcemid: Colcemid CMB -Herlan-Labclinic-.
- DAPI: DAPI II *Counterstain* -Vysis-.
- AND control: *Human genomic DNA: male & female* -Promega-.

- EDTA: EDTA 100x -*Biosystems*-.
- Etanol 100% (EtOH): Etanol absoluto -*Merck*-.
- Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (Phe:Clf:Iso): Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) -*Sigma*-.
- Fitohematoglutinina: *Phytohemagglutinin* -*Gibco*-.
- Fluorocromo Cy3: Cy3 dUTP -*GE Healthcare Europe GmbH*-.
- Fluorocromo Cy5: Cy5 dUTP -*GE Healthcare Europe GmbH*-.
- Formamida: Formamida -*Merck*-.
- Glicógeno: Ultra Pure Glycogen -*Invitrogen*-.
- Glicerol: Glicerol -*Merck*-.
- Glutamina: Glutamina -*Gibco*-.
- Heparina: Heparina 1% -*Mayne Pharma*-.
- Human Cot-DNA: Human COT-1 DNA 500 µL (1µg/µL) -*Roche Diagnostics S.L.*-.
- Isopropanol: 2-propanol -*Panreac*-.
- Lauryl: N-*Lauryl Sarcosine Solution* -*Sigma*-.
- Levadura: Levadura -*Pronadisa*-.
- Marcador de peso molecular: 100 bp DNA Ladder -*Invitrogen*-.
- Medio RPMI 1640: RPMI -*Biological Industries*-.
- Metanol: Metanol -*Merck*-.
- NP40: Nonidet p40 -*Fluka*-.
- OCT: Tissue – Tek OCT -*Sakura*-.
- PBS: PBS (*phosphate buffer saline*) -*Sigma*-.
- Penicilina/estreptomicina: Penicilina-Estreptomicina -*Gibco*-.
- Pepsina: Pepsin -*Sigma*-.
- RSA 1: RSA 1 -*GE Healthcare Europe GmbH*-.
- Sacarosa: Sacarosa -*Merck*-.
- *Spectrum green*: *Spectrum Green* dUTP -*Vysis*- (IZASA).
- *Spectrum red*: *Spectrum Red* dUTP -*Vysis*- (IZASA).
- SSPE 20x: 20x SSPE Buffer -*Invitrogen*-.
- Suero fetal: Suero fetal -*Biological Industries*-.
- SYBR: SYBR safe DNA gel stain -*Invitrogen*-.
- TBE: TBE 10x -*Bio-Rad*-.
- Triptona: Triptona -*Pronadisa*-.
- Xileno: Xileno -*Panreac*-.

3.2.10.3. Kits

- Extracción de ADN: *DNAeasy tissue Kit QiAmp (Qiagen)*.
- Extracción de BACs: *Plasmid Midi Kit Quiagen (Qiagen)*.
- Hibridación ADN en CGH-array: *Agilent Oligonucleotide aCGH Hybridization Kit (Agilent Technologies)*.
- Marcaje ADN en CGH-array: *BioPrime CGH labeling System kit (Invitrogen)*
- *Nick translation: Nick Translation with Control DNA (VYSIS)*.
- Purificación ADN en CGH-array: *Qiaprep Spin Miniprep kit (Qiagen)*.

4. RESULTADOS

“La locura es hacer la misma cosa una y otra vez esperando obtener diferentes resultados”

(Albert Einstein)

4.1. Perfil de alteración genómico

Los resultados de 25 muestras de tumores ER+/PR+ y de 23 ER+/PR- fueron analizados después de aplicar la técnica de CGH-array (**Tabla 12**). Todos los tumores mostraron al menos una alteración, inclusive aquellos que presentaban una baja infiltración tumoral. En este estudio no se consideraron los resultados de los cromosomas X e Y porque nos sirvieron como control interno de hibridación, ya que los controles utilizados fueron de sexo masculino. Cuando se compararon ambos tipos de tumores, se observó que la diferencia en el % de genoma perdido era estadísticamente significativa, así como la diferencia en las regiones alteradas por muestra y específicamente las regiones ganadas por muestra. La diferencia en el % del genoma alterado resultó marginalmente significativa y la del % de genoma ganado y de regiones perdidas por muestra no resultó significativa (**Tabla 12**).

Tabla 12. Perfil de alteración genómico de los tumores ER+/PR+ y ER+/PR-. Resultados estadísticamente significativos marcados en negrita. Abreviaciones: ER: receptor de estrógenos; PR: receptor de progesterona.

	25 ER+PR+	23 ER+PR-	p-value
% Genoma total alterado	20,6	29,4	0,056
% Genoma ganado	9,7	11,4	0,231
% Genoma perdido	10,9	18,0	0,029
Alteraciones / muestra	13,2	19,1	0,048
Ganancias / muestra	5,8	9,5	0,030
Pérdidas / muestra	7,3	9,6	0,113

4.2. Perfil de alteración cromosómico

En primer lugar, obtuvimos el perfil de alteración cromosómico para las 48 muestras tumorales (ER+/PR+ y ER+/PR-), estableciendo los cromosomas más alterados con ganancias y con pérdidas. Se observó que las regiones más ganadas estaban incluidas **1q (62% de las muestras)**, **16p (50%)**, **11q (46%)**, **8q (40%)**, **8p (40%)**, **17q (37%)** y **20q (37%)**, y las más perdidas en **16q (71%)**, **17p (46%)**, **1p (44%)**, **13 (44%)**, **11q (42%)**, **6q (37%)**, **8p (33%)**, **22q (33%)** y **9p (31%)** (**Figs. 32-38**). Además se observaron regiones recurrentes de **amplificación** localizadas en **8p12**, **8q21-q24**, **11q13.3**, **16p11.2**, **17q23** y **20q13**. Todas las regiones perdidas en este estudio estaban en forma heterocigota.

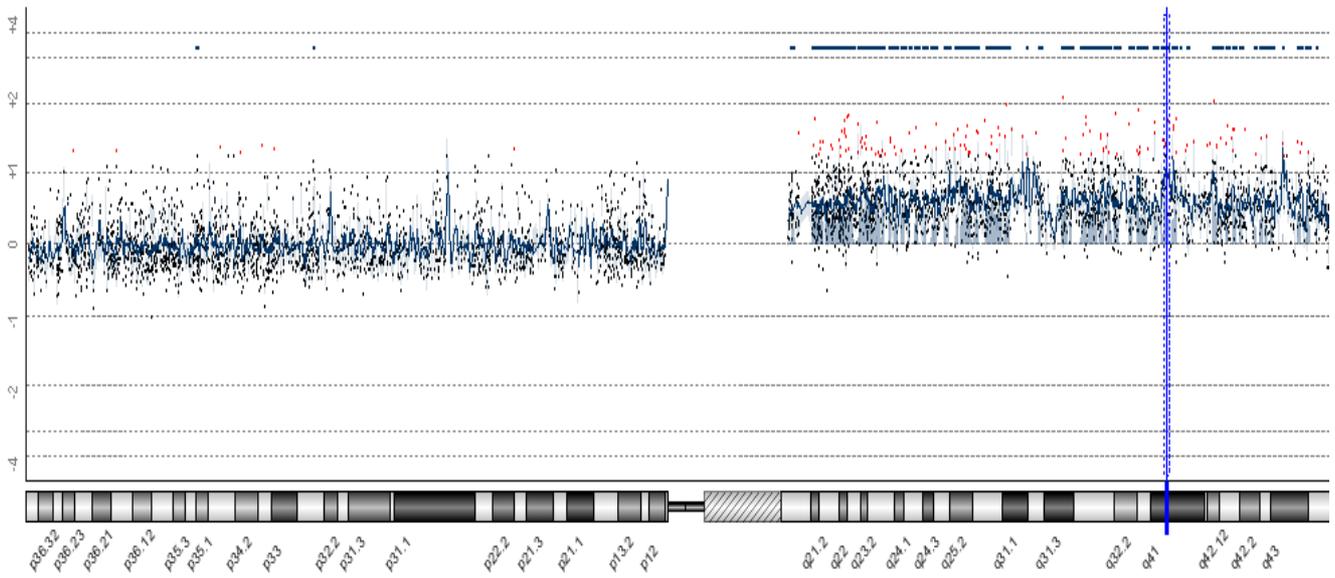


Fig. 32. Representación gráfica (visión cromosómica, *CGH Analytics Software*) que muestra el patrón de alteración del cromosoma 1 de una muestra después de realizarse la técnica de CGH-array. En la parte inferior de la imagen observamos el idiograma del cromosoma 1. En la parte superior observamos puntos que corresponden a cada uno de los oligonucleótidos o secuencias que representan a genes o partes de los mismos del cromosoma 1 y localizados en el array que hemos utilizado. Cuando los puntos tienden a localizarse alrededor de la línea central (0) hablaríamos en términos generales de una situación de normalidad. Cuando los puntos tienden a localizarse por encima de la línea central podría tratarse de una situación de ganancia o amplificación. Cuando los puntos tienden a localizarse por debajo de la línea central podría tratarse de una situación de pérdida. En este caso observamos una situación de normalidad del brazo corto (p) y ganancia de todo el brazo largo (q) del cromosoma 1.

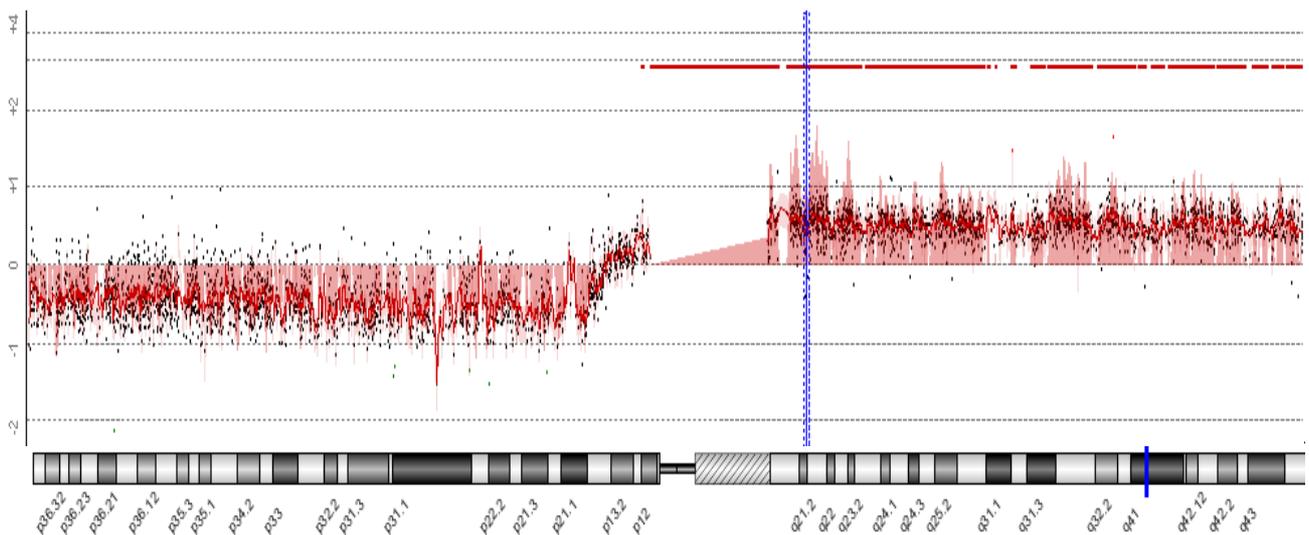


Fig. 33. Representación gráfica (visión cromosómica) que muestra el patrón de alteración del cromosoma 1 de una muestra después de realizarse la técnica de CGH-array. Observamos

pérdida del brazo corto (p) y al igual que en la muestra anterior, ganancia de todo el brazo largo (q) del cromosoma 1.

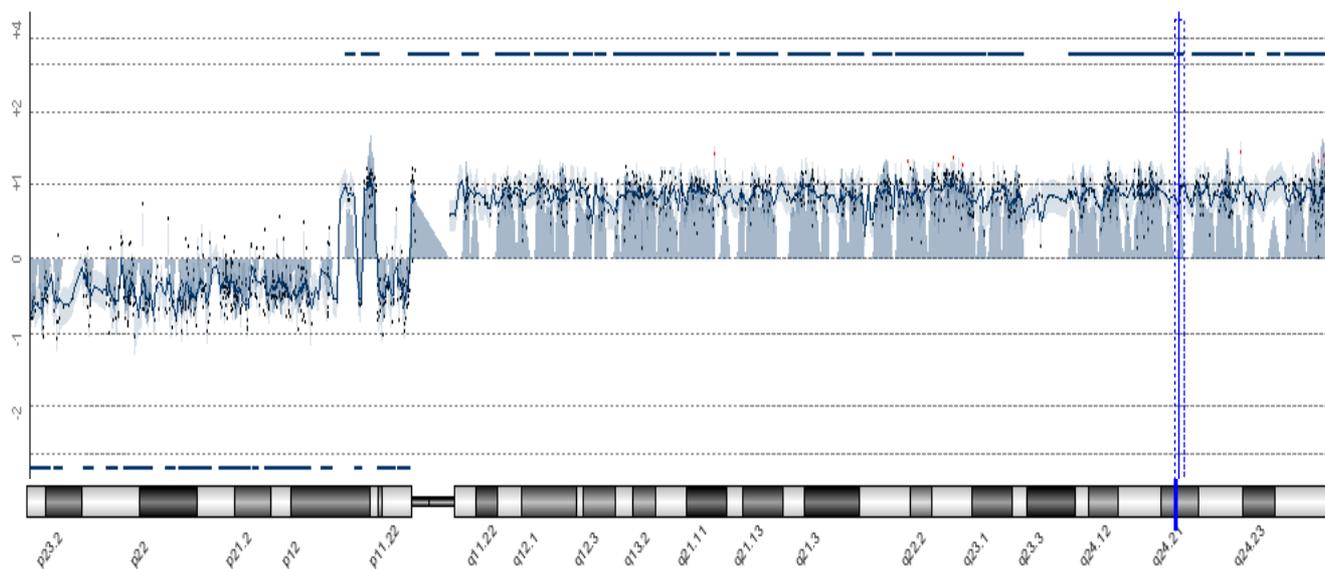


Fig. 34. Representación gráfica (visión cromosómica) que muestra el patrón de alteración del cromosoma 8 de una muestra después de realizarse la técnica de CGH-array. Observamos pérdida del brazo corto (p) y ganancia/amplificación de todo el brazo largo (q) del cromosoma 8, donde se encuentra el gen *MYC*.

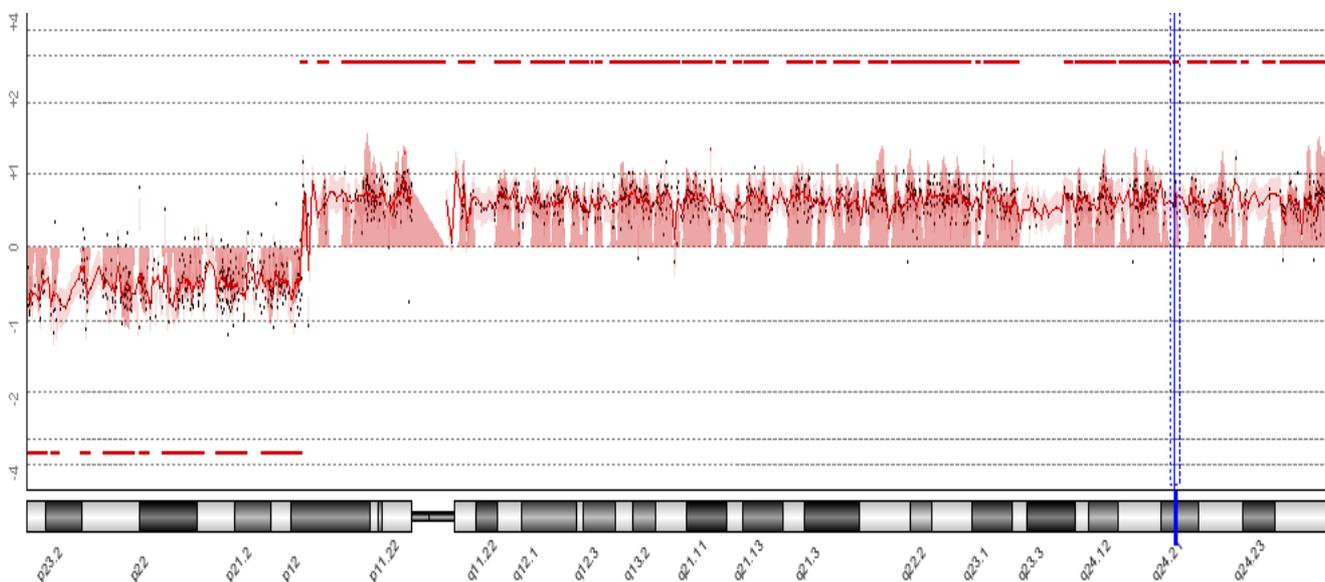


Fig. 35. Representación gráfica (visión cromosómica) que muestra el patrón de alteración del cromosoma 8 de una muestra después de realizarse la técnica de CGH-array. Observamos el mismo patrón de alteración que la muestra anterior: pérdida del brazo corto (p) y ganancia de todo el brazo largo (q) del cromosoma 8, donde se encuentra el gen *MYC*.

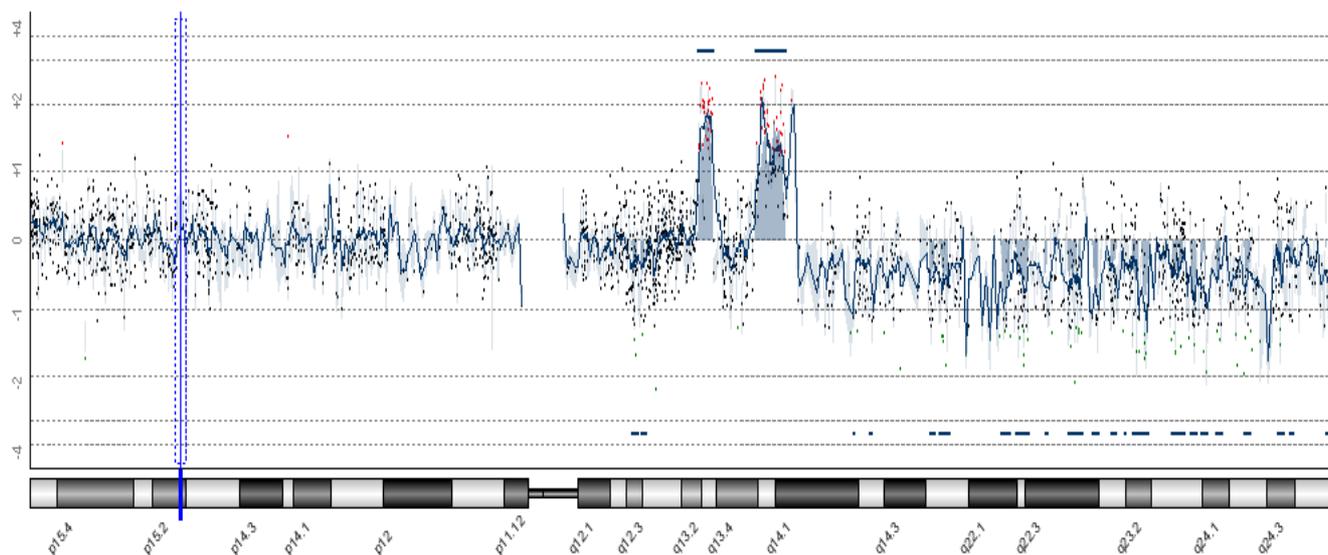


Fig. 36. Representación gráfica (visión cromosómica) que muestra el patrón de alteración del cromosoma 11 de una muestra después de realizarse la técnica de CGH-array. Observamos pérdida de parte del brazo q y varios puntos de amplificación en este mismo brazo (picos elevados) uno de los cuales corresponde a una amplificación de la región donde se localiza el gen **CCND1**.

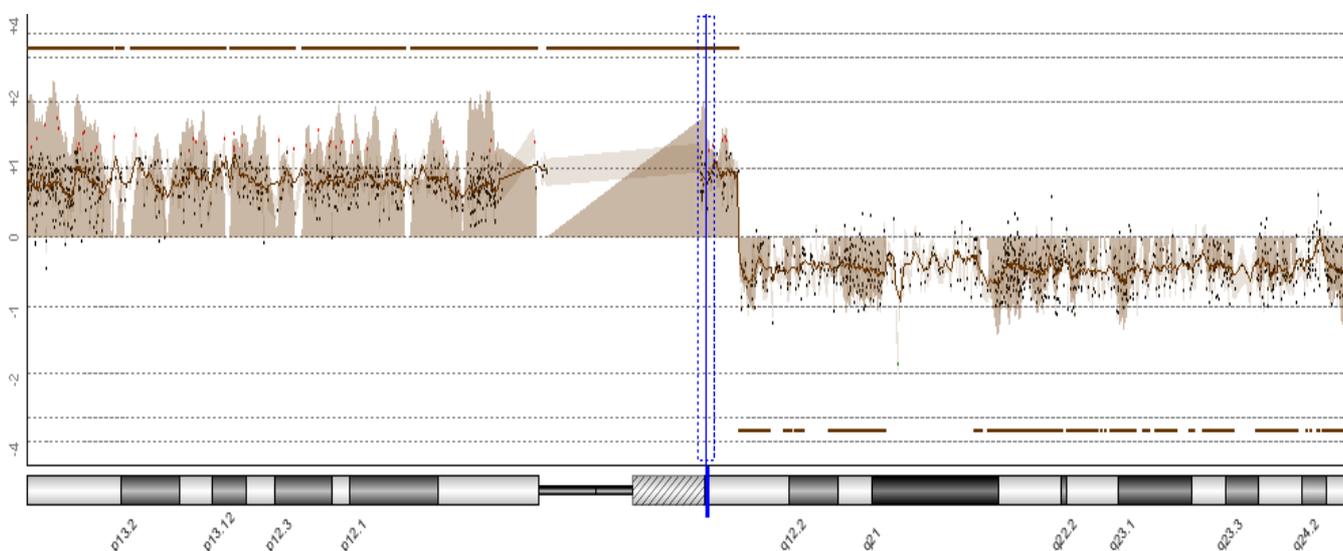


Fig. 37 Representación gráfica (visión cromosómica) que muestra el patrón de alteración del cromosoma 16 de una muestra después de realizarse la técnica de CGH-array. Observamos ganancia del brazo p y pérdida del brazo q, donde se encuentra el gen **CDH1**.

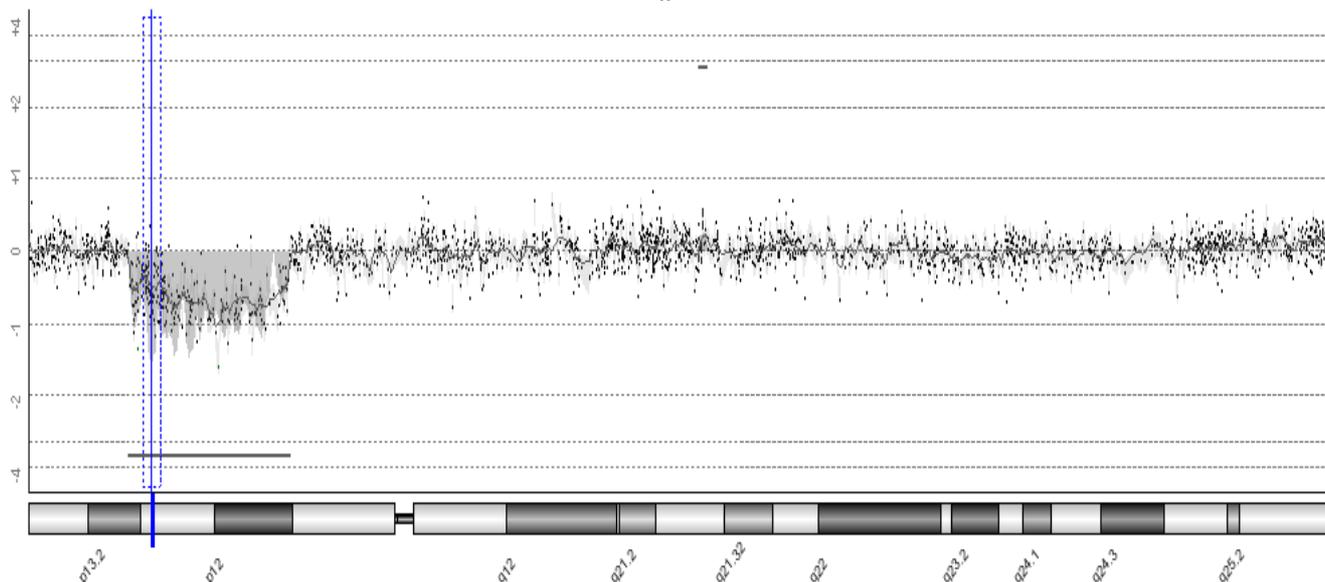


Fig. 38 Representación gráfica (visión cromosómica) que muestra el patrón de alteración del cromosoma 17 de una muestra después de realizarse la técnica de CGH-array. Observamos pérdida de una región del brazo p del cromosoma 17, donde se encuentra el gen **TP53**.

Seguidamente definimos para cada grupo por separado los cromosomas más alterados con ganancias y pérdidas ($\geq 30\%$ de casos alterados) (**Tabla 13**). Ambos grupos compartían los cromosomas **1, 8, 11 y 16** como los más alterados con ganancias, pero el grupo **ER+/PR-** presentaba además los cromosomas **5, 6, 17, 19, 20 y 21**. Por otra parte, ambos grupos compartían los cromosomas **1, 6, 11, 13, 14, 16 y 17** como los más alterados con pérdidas, pero el grupo **ER+/PR-** presentaba además los cromosomas **3, 5, 8, 9, 21 y 22**.

Tabla 13. Cromosomas más alterados con ganancias y pérdidas para cada grupo analizado (ER+/PR+ y ER+/PR-) por orden descendente respecto al % de casos alterados. En negrita las diferencias entre ambos grupos.

Grupo	Cromosomas + ganados	Cromosomas + perdidos
ER+/PR+	1 (68%), 16 (56%), 8 (48%), 11 (40%)	16 (76%), 1 (52%), 6 (44%), 11 (36%), 13 (32%), 14 (32%), 17 (32%)
ER+/PR-	1 (65%), 17 (65%), 11 (56%), 8 (48%), 16 (48%), 20 (48%), 19 (35%), 5 (30%), 6 (30%), 21 (30%)	16 (65%), 17 (65%), 13 (56%), 11 (56%), 1 (48%), 8 (43%), 9 (43%), 6 (39%), 22 (39%), 14 (35%), 3 (35%), 21 (35%), 5 (30%)

4.3. Regiones de alteración solapadas (regiones SORI)

De entre los cromosomas alterados obtuvimos las regiones alteradas solapadas (SORIs), y de entre los cromosomas alterados en $\geq 30\%$ obtuvimos las regiones alteradas solapadas recurrentes, es decir los SORIs recurrentes (**Tablas 14 y 15**) (**Fig. 39 y Fig. 40**).

Observamos que las regiones más alteradas con **ganancias recurrentes solapadas**, en el grupo **ER+/PR+** estaban en **1q (60% de las muestras)**, **16p (56%)**, **8q (36%) y 11q (36%)**; mientras que en el grupo **ER+/PR-** estaban en **1q (61%)**, **11q (52%)**, **17q (47%)**, **16p (44%)**, **8q (44%) y 20q (44%)**. Ambos grupos compartían los cromosomas **1, 11, 16 y 8** como los más alterados con **ganancias recurrentes solapadas**, pero el grupo **ER+/PR-** presentaba además los cromosomas **17 y 20** (**Tablas 14 y 15**).

Los **SORIs** con el mayor número de casos **amplificados** en **ER+/PR+** eran **8p12 (24% de los casos)**, **11q13.3 (24%) y 16p11.2 (20%)**; mientras que en **ER+PR-** eran **11q13.3 (43%)**, **20q13.12 (26%)**, **17q23.2-q23.3 (22%) y 8q21.11-qter (17%)**.

Por otra parte, las regiones más alteradas con **pérdidas recurrentes solapadas** en el grupo **ER+/PR+** estaban en **16q (76% de las muestras)**, **6q (36%)**, **11q (32%)**, **1p (32%)**, **17p (32%) y 13 (32%)**; mientras que en el grupo **ER+/PR-** estaban en **16q (61%)**, **17p (61%)**, **11q (52%)**, **13q (48%)**, **9p (44%)**, **6q (39%)**, **8p (39%)**, **22q (39%)**, **1p (34%)**, **3p (34%)**, **21q (34%) y 14q (30%)**. Ambos grupos compartían los cromosomas **1, 6, 11, 13, 16 y 17** como los más alterados con **pérdidas recurrentes solapadas**, pero de nuevo el grupo **ER+/PR-** presentaba también los cromosomas **3, 8, 9, 14, 21 y 22** (**Tablas 14 y 15**).

Tabla 14. SORs recurrentes (regiones de alteración solapadas presentes en $\geq 30\%$ de los casos) obtenidos a partir de las muestras del grupo ER+/PR+. Abreviaturas: chr: cromosoma; Mb: megabases; nAMP: número de casos con amplificaciones en la región.

Chr.	Región	Inicio	Fin	Tamaño (Mb)	Casos (%)	Genes en la región	nAMP
Ganancias							
1	q21.3-q23.3	148557393	158296814	9.73	15 (60%)	MUC1, RAB25	0
1	q25.3-q31.3	176949224	193442806	16.49	15 (60%)	COX2	0
1	q32.1-qter	196511064	245422419	48.91	15 (60%)	JARID1B, MDM4, ESRRG	0
16	p11.2	29581455	31701118	2.11	14 (56%)	FUS, ITGAX, MAPK3	5
8	p12	37782033	37847134	0.065	9 (36%)	GPR124, BRF2, RAB11FIP1	6
8	q21.11-q21.13	74087795	81695529	7.6	9 (36%)	IL7, TPD52	4
8	q21.3-q22.2	93040430	101356416	8.31	9 (36%)	CCNE2, MTDH,	4
8	q23.2-q24.3	111730288	140044221	28.31	9 (36%)	TRMT12, MYC,	4
11	q13.3	68943548	69731021	0.78	9 (36%)	CCND1	6
Pérdidas							
16	q13-qter	55837239	88651780	32.81	19 (76%)	CDH1	
6	q13-q14.1	75029877	80170505	5.14	9 (36%)	-----	
11	q14.2	86163054	88385818	2.2	8 (32%)	-----	
11	q14.3-q21	91297310	92916518	1.61	8 (32%)	-----	
11	q21-q22.3	96830209	107807730	10.97	8 (32%)	ATM, PGR	
11	q22.3-q24.3	108686289	130289408	21.6	8 (32%)	ZW10, H2AFX, CHEK1	
1	p21.3-p21.1	94609615	102480134	7.87	8 (32%)	-----	
1	p21.1	103875725	104009322	0.13	8 (32%)	AMY21A /1A	
13	#13	18601703	114077122	95.47	8 (32%)	RB1	
17	pter-q13.1	48539	7669786	7.66	8 (32%)	TP53	

Tabla 15. SORIs recurrentes (regiones de alteración solapadas presentes en $\geq 30\%$ de los casos) obtenidos a partir de las muestras del grupo ER+/PR-.
 Abreviaturas: chr: cromosoma; Mb: megabases; nAMP: número de casos con amplificaciones en la región.

Chr.	Región	Inicio	Fin	Tamaño (Mb)	Casos (%)	Genes en la región	nAMP
Ganancias							
1	q31.3-q32.2	188299952	204192297	15.89	14 (61%)	JARID1B, MDM4	2
11	q13.3	69165856	69907904	0.74	12 (52%)	CCND1	10
17	q23.2-q23.3	54543910	59917417	5.37	11 (47%)	RPS6KB1, PPM1D, BCAS3, MAP3K3,	5
20	q13.12	50753136	51624294	0.87	10 (44%)	ZNF217	6
20	q13.32	55179241	55531676	0.35	10 (44%)	BMP7, CTFC	5
20	q13.33	60434682	61045001	0.61	10 (44%)	GATA5	5
8	q21.11-qter	77779880	146250824	68.47	10 (44%)	TRMT12, MYC,	4
16	p13.3	36766	3687746	3.65	10 (44%)	PDPK1	1
Pérdidas							
	Región	Inicio	Fin	Tamaño (Mb)	Casos (%)	Genes en la región	
16	q12.2-q21	54784981	59778715	4.99	14 (61%)	RBL2	
16	q22.1-qter	66465414	88651780	22.18	14 (61%)	CDH1	
17	pter-p12	48539	14052556	14	14 (61%)	TP53	
11	q24.2-qter	95766077	122152221	26.38	12 (52%)	ATM, PGR, ZW10, H2AFX	
11	q21-q24.1	124151268	133951370	9.8	12 (52%)	CHEK1	
13	q12.13	24812646	25686236	0.87	11 (48%)	-----	
13	q14.2-q14.3	47414820	50925202	3.51	11 (48%)	RB1	
9	pter-p13.2	204367	67121585	66.91	10 (44%)	CDKN2A	
6	q14.3-q16.3	86242265	100165674	13.92	9 (39%)	-----	
8	pter-p21.11	181530	27458312	27.27	9 (39%)	DLC1, MTUS1	
22	q11.23-q13.32	22364741	47916687	25.55	9 (39%)	CHEK2, CYP2D6	
1	p36.32-p36.21	3699297	16040313	12.34	8 (34%)	PRDM2	
3	p21.32-p12.3	48486390	77084803	28.59	8 (34%)	RASSF1A, FHIT	
21	tel-q21.1	10013263	17905136	7.89	8 (34%)	BTG3	
14	q23.1-q32.11	57541514	89087275	31.54	7 (30%)	ESR2	

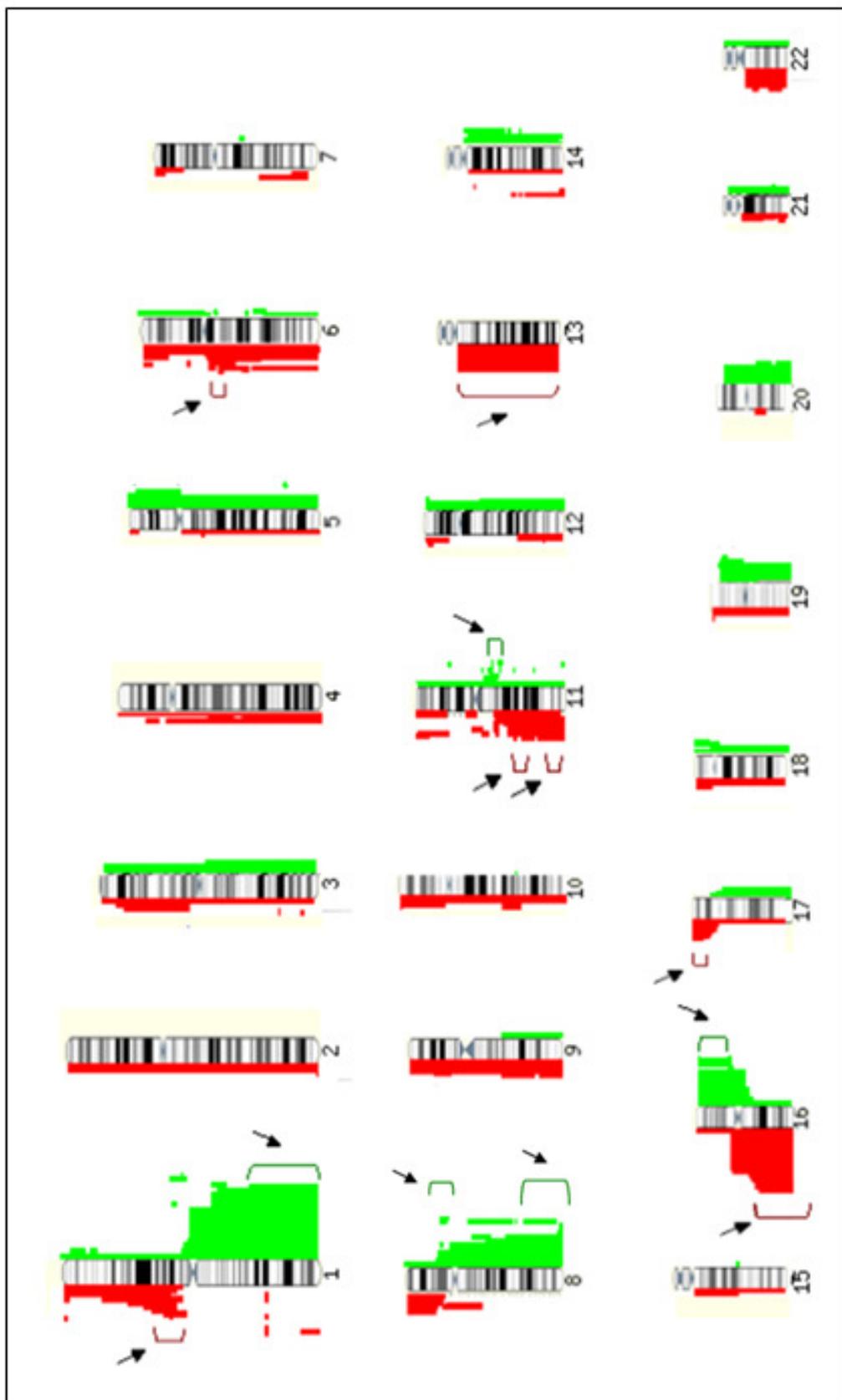


Fig. 39. Representación gráfica de las regiones alteradas presentes en las muestras del grupo ER+PR+. Todas las regiones aberrantes están representadas a lo largo de los cromosomas: las líneas continuas de la derecha en verde representan las regiones de ganancia, y las de la izquierda en rojo representan las de pérdida. Las flechas indican los SORIs recurrentes de este grupo, localizados en los cromosomas 1, 6, 8, 11, 13, 16 y 17.

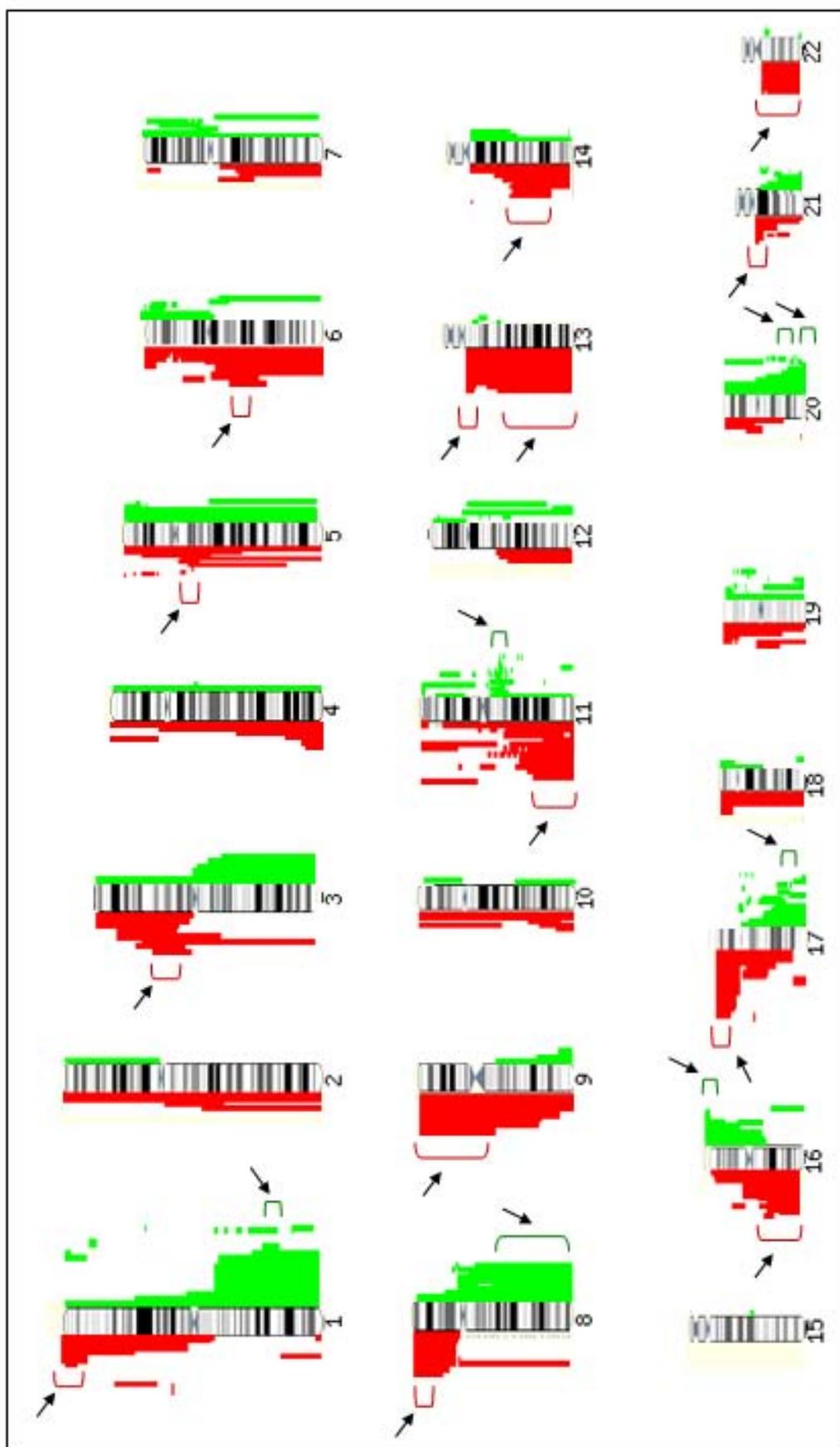


Fig. 40. Representación gráfica de las regiones alteradas presentes en las muestras del grupo ER+/PR-. Todas las regiones aberrantes están representadas a lo largo de los cromosomas: las líneas continuas de la derecha en verde representan las regiones de ganancia, y las de la izquierda en rojo representan las de pérdida. Las flechas indican los SORs recurrentes de este grupo, localizados en los cromosomas 1, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 13, 14, 16, 17, 20, 21 y 22.

4.4. Comparación de SORIs entre tumores ER+/PR+ y ER+/PR-

Una vez establecidos todos los SORIs y los SORIs recurrentes de cada grupo, éstos fueron comparados. Tras el análisis estadístico observamos que las regiones ganadas **17q23.2-q23.3** y **20q13.12**, así como las regiones perdidas de forma heterocigota **3p21.32-p12.3**, **9pter-p13.2**, **17pter-p12** y **21tel-q21.1** estaban alteradas de forma significativa en el grupo ER+/PR-. Todos estos SORIs fueron obtenidos específicamente a partir del análisis del grupo ER+/PR-. Se encontraron diferencias significativas respecto a los SORIs ganados y o amplificados de los cromosomas 17 y 20, y respecto a los SORIs perdidos de los cromosomas 3 y 17. Los SORIs de los cromosomas 9 y 21 presentaban significancia marginal (**Tabla 16**).

Tabla 16. Diferencias entre los grupos ER+/PR+ y ER+/PR-. El color verde hace referencia a un estado de ganancia y el rojo a uno de pérdida. En negrita regiones estadísticamente significativas. Abreviaturas: chr: cromosoma; alt: alteración; p: pérdida; g: ganancia; a: amplificación.

Chr.	Región	Genes de interés	Inicio	Fin	Alt.	ER+PR+ vs ER+PR-	p-value
3	p21.32-p12.3	<i>RASSF1A</i> <i>FHIT</i>	48486390	77084803	p	2 (8%) - 8 (34%)	0,033
9	pter-p13.2	<i>CDKN2A</i>	204367	67121585	p	5 (20%) - 10 (44%)	0,08
17	q23.2-q23.3	<i>RPS6KB1</i> <i>MAP3K3</i>	54543910	59917417	g / a	3 (12%) - 11 (47%)	0,006
17	pter-p12	<i>TP53</i>	48539	14052556	p	8 (32%) - 14 (61%)	0,045
20	q13.12	<i>ZNF217</i>	50753136	51624294	a	1 (4%) - 6 (26%)	0,044
21	tel-q21.1	<i>BTG3</i>	10013263	17905136	a	3 (12%) - 8 (34%)	0,061

- El **SORI ganado 17q23.2-q23.3** (**Fig. 41**) estaba presente únicamente en el grupo ER+/PR-, no sólo en forma de ganancia sino también en forma de amplificación (54% de los casos alterados), mientras que en el grupo ER+/PR+ estaba presente en la totalidad de los casos alterados en forma de ganancia pero siempre formando parte de todo o casi todo el brazo 17q que se encontraba alterado. Este SORI tiene un tamaño de 5.4 Mb e incluye 56 genes. Entre ellos, los genes *RPS6KB1* (284), *PPM1D* (285), *BCAS3* (286) y *MAP3K3* (287) han sido previamente relacionados con cáncer de mama. En nuestro estudio finalmente consideramos *RPS6KB1* y *MAP3K3* (**Fig. 42**) como los candidatos más interesantes a ser estudiados y que fueron analizados por FISH.

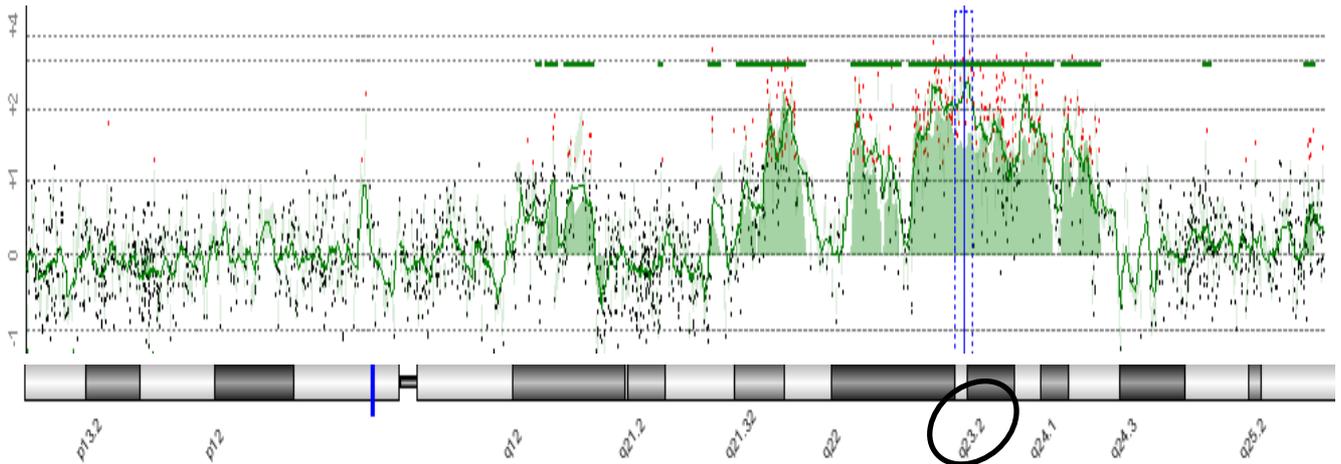


Fig. 41. Representación gráfica que muestra el patrón de alteración del cromosoma 17 de una muestra ER+/PR- después de realizarse la técnica de CGH-array. Observamos amplificaciones en el brazo q, entre las que se incluye el SORI **17q23.2-q23.3** (círculo). En la segunda muestra observamos además pérdida del brazo p.

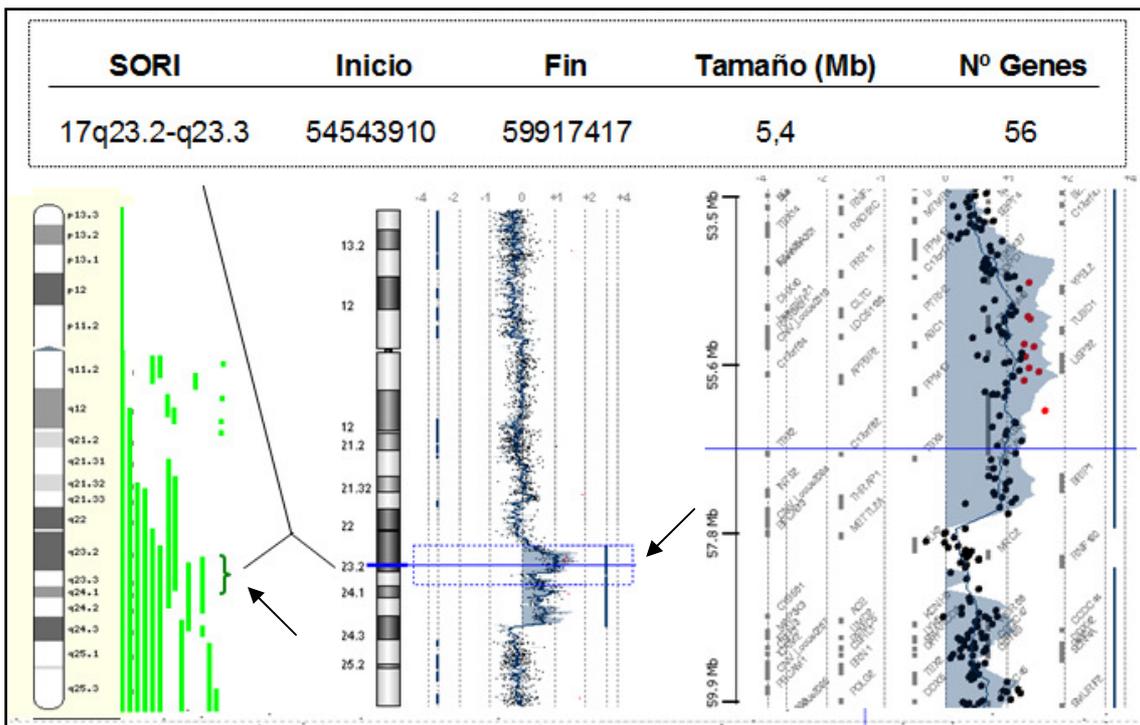


Fig. 42. Descripción del **SORI 17q23.2-q23.3** obtenido del grupo ER+/PR-. Izquierda: diagrama del cromosoma 17; las líneas en verde representan las regiones de ganancia de los casos alterados. La flecha indica la región más frecuentemente alterada y solapada (SORI recurrente). En el centro: vista cromosómica de un caso ER+/PR- (CGH Analytics Software). La flecha indica la banda q23 del cromosoma 17, donde está incluido el SORI. Derecha: vista génica del SORI 17q23.2-q23.3 (CGH Analytics Software). Los puntos representan el resultado

para cada oligonucleótido de la región localizado en el array, entre los que podemos encontrar los que representan a los genes **RPS6KB1** y **MAP3K3**.

- El **SORI Ganado 20q13.2 (Fig. 43)** estaba amplificado de forma significativa en el grupo ER+/PR-. Cuando se compararon ambos grupos de muestras, la diferencia respecto al número de casos alterados no resultó estadísticamente significativa, pero sí resultó serlo la diferencia respecto a la presencia de la amplificación de esta región entre los dos grupos ($p=0,044$). En el grupo ER+/PR-, el 60% de los casos alterados presentaban amplificación, mientras que tan sólo el 14% de los casos del grupo ER+/PR+ y el resto, ganancias de todo el cromosoma (polisomía 20). Este SORI tiene un tamaño de 0,87 Mb e incluye tres genes, de entre los cuales consideramos **ZNF217** como el gen de interés de este SORI, que posteriormente analizamos por FISH.

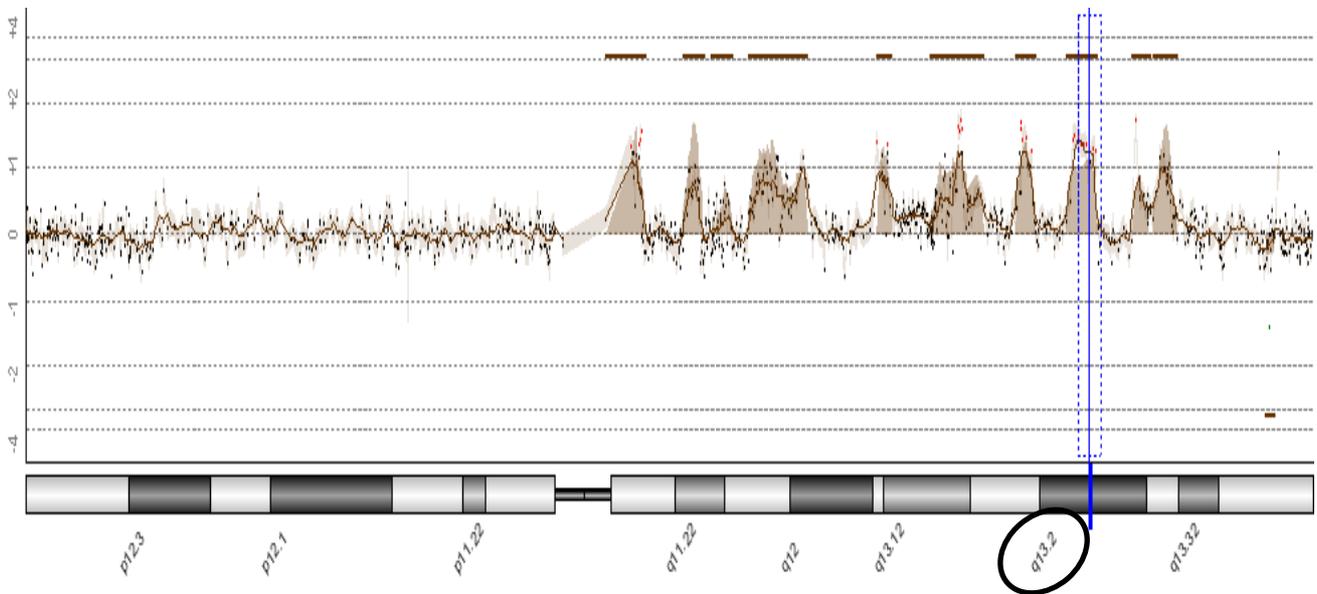


Fig. 43. Representación gráfica (visión cromosómica) que muestra el patrón de alteración del cromosoma 20 de una muestra ER+/PR- después de realizarse la técnica de CGH-array. Observamos amplificaciones en el brazo q, en una de las cuales se incluye el SORI **20q13.2** (círculo).

- El **SORI perdido 3p21.32-p12.3 (Fig. 44)** correspondía a un 8% de los casos del grupo ER+/PR+, mientras que en un 34% de los ER+/PR-. Este SORI incluye, entre otros, los genes **RASSF1** y **FHIT**.

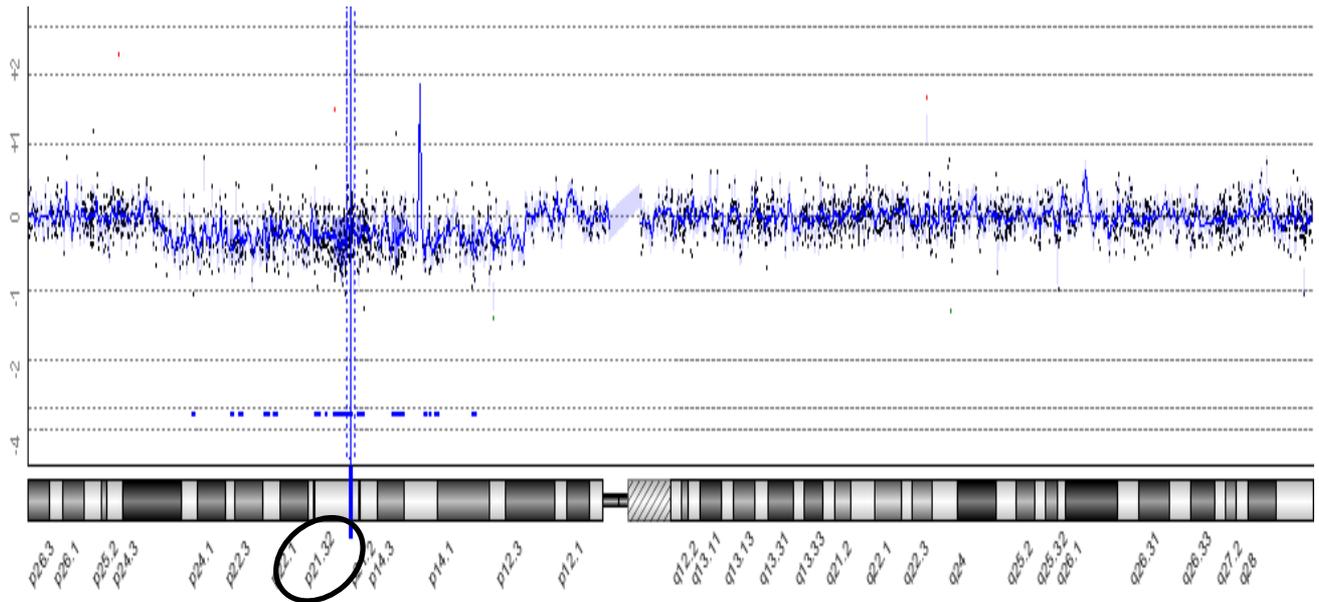


Fig. 44. Representación gráfica (visión cromosómica) que muestra el patrón de alteración del cromosoma 3 de una muestra ER+/PR- después de realizarse la técnica de CGH-array. Observamos la pérdida de parte del brazo p, entre la que se encuentra el SORI **3p21.32-p12.3** (círculo).

- El **SORI perdido 9pter-p13.2** (Fig. 45) correspondía a un 20% de las muestras del grupo ER+/PR-, mientras que en un 44% de los ER+/PR-. Este SORI incluye el gen **CDKN2A**.

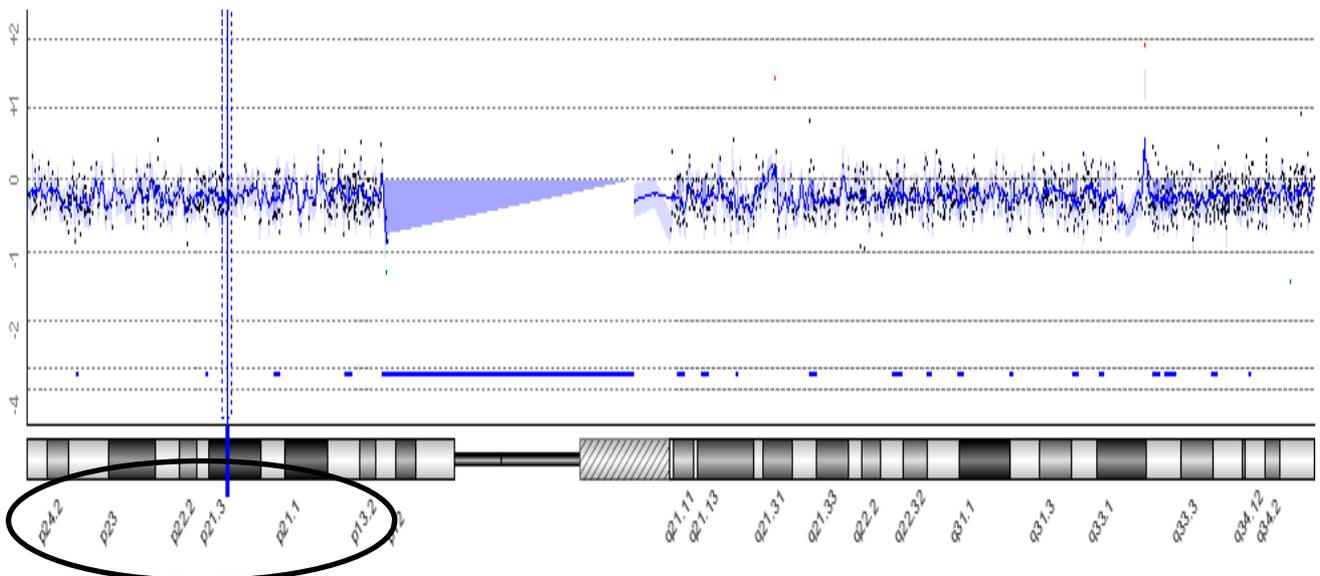


Fig. 45. Representación gráfica (visión cromosómica) que muestra el patrón de alteración del cromosoma 9 de una muestra ER+/PR- después de realizarse la técnica de CGH-array.

Observamos la pérdida de todo el cromosoma y por lo tanto también del SORI **9pter-p13.2** (círculo).

- El **SORI perdido 17pter-p12 (Fig. 38)** correspondía a un 32% de las muestras del grupo ER+/PR+, mientras que en un 61% de los ER+/PR-. Este SORI incluye el gen **TP53**.
- Finalmente, el **SORI perdido 21tel-q21.1 (Fig. 46)** correspondía a un 12% de las muestras del grupo ER+/PR+, mientras que en un 35% de los ER+/PR-. Este SORI incluye el gen **BTG3**.

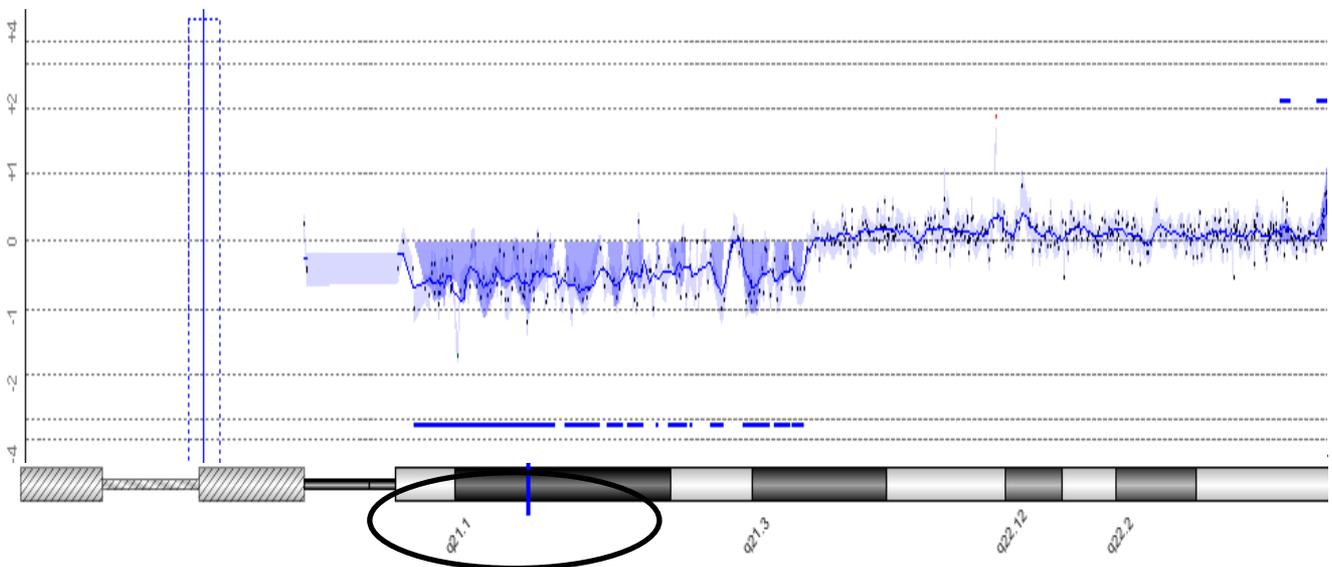


Fig. 46. Representación gráfica (visión cromosómica) que muestra el patrón de alteración del cromosoma 21 de una muestra ER+/PR- después de realizarse la técnica de CGH-array. Observamos la pérdida de parte del brazo q que incluye el SORI **21tel-q21.1** (círculo).

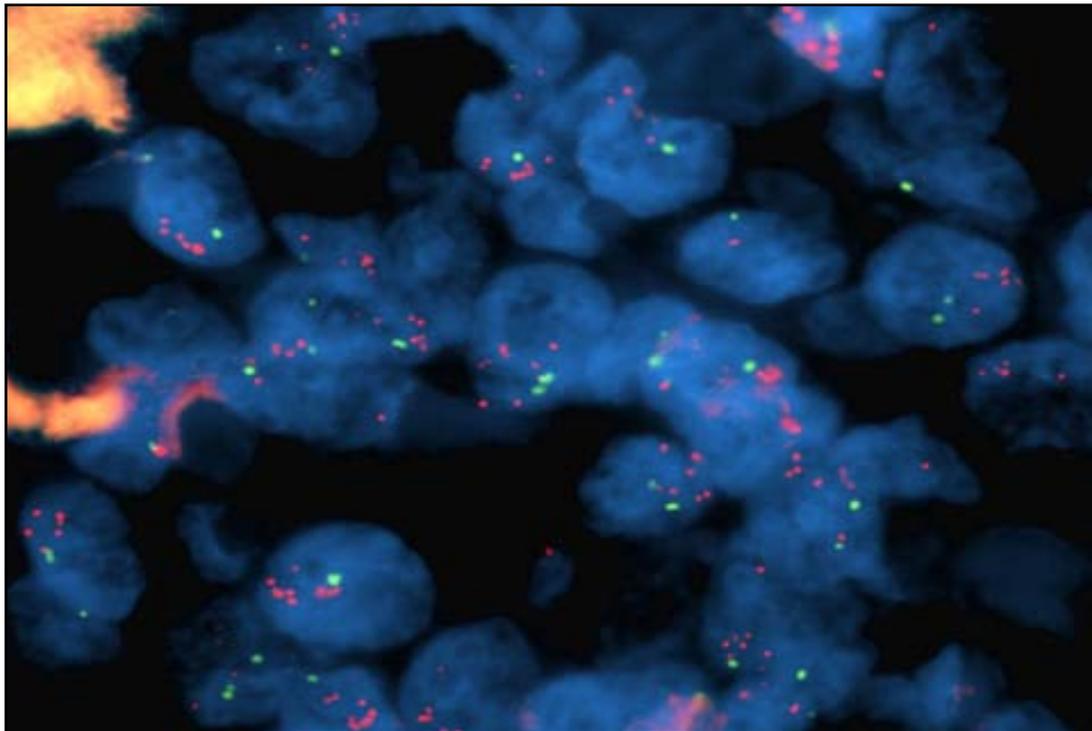
4.5. Validación mediante FISH, en las muestras de los TMAs, de los genes *MAP3K3*, *RPS6KB1* y *ZNF217* obtenidos a partir de los SORIs de ganancia diferentes entre los dos grupos

La técnica de FISH fue aplicada a las muestras presentes en los TMAs elaborados previamente, para el estudio del estado de los genes ***MAP3K3***, ***RPS6KB1*** y ***ZNF217*** (Tabla 17).

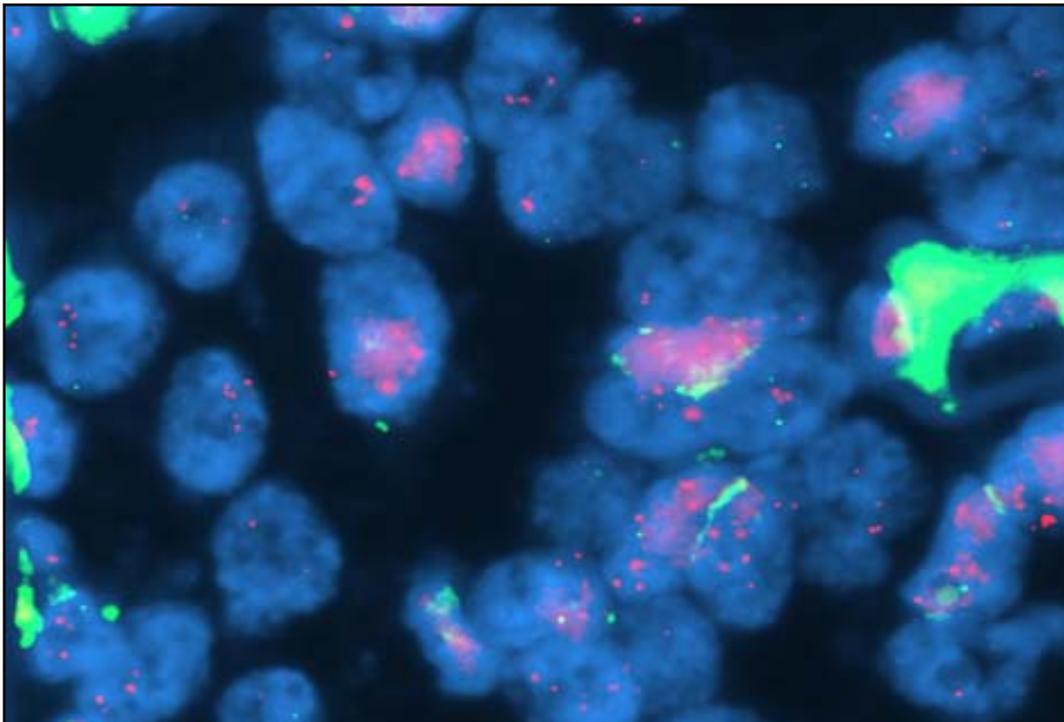
Tabla 17. Resultados de la técnica de FISH para los genes ***MAP3K3***, ***RPS6KB1*** y ***ZNF217*** de las muestras presentes en los TMAs. Entre paréntesis el número de casos alterados. Abreviaturas: n: número de casos.

Resultado	Validación de los TMAs por FISH (n=100)					
	<i>MAP3K3</i> (n=79)		<i>RPS6KB1</i> (n=78)		<i>ZNF217</i> (n=50)	
	ER+PR+ (n=34)	ER+PR- (n=45)	ER+PR+ (n=46)	ER+PR- (n=32)	ER+PR+ (n=32)	ER+PR- (n=18)
Normal	53% (18)	44% (20)	57% (26)	50% (16)	59% (19)	22% (4)
Polisomía	38% (13)	18% (8)	37% (17)	22% (7)	41% (13)	22% (4)
Ganancia	6% (2)	20% (9)	4% (2)	9% (3)	0% (0)	22% (4)
Amplificación	3% (1)	18% (8)	2% (1)	19% (6)	0% (0)	34% (6)

Respecto al FISH de *MAP3K3*, se obtuvieron los resultados de 79 muestras (Fig. 47 y 48). En el grupo ER+/PR+, un 53% de las muestras eran normales, un 38% presentaban polisomía y un 9% (6% + 3%) ganancia o amplificación. En el grupo ER+/PR-, un 44% era normal, el 18% presentaba polisomía y el 38% ganancia o amplificación (20% + 18%). El análisis de *MAP3K3* reveló diferencias estadísticamente significativas respecto al número de **casos alterados, amplificados y polisómicos** ($p=0,001$, $p=0,002$ y $p=0,0042$ respectivamente).



Figs. 47. FISH de *MAP3K3* sobre una muestra de tejido tumoral mamario incluida en un TMA. Observamos en gran parte de las células más de 3 señales rojas -*MAP3K3*-, y dos señales verdes -CEP17-, que dan como resultado una amplificación.



Figs. 48. FISH de *MAP3K3* sobre una muestra de tejido tumoral mamario incluida en un TMA. Observamos en gran parte de las células más de 3 señales rojas -*MAP3K3*-, y dos señales verdes -*CEP17*-, que dan como resultado una amplificación.

Respecto al FISH de *RPS6KB1*, se obtuvieron los resultados de 78 muestras (**Fig. 49**). En el grupo ER+/PR+, un 57% eran normales, un 37% presentaban polisomía y un 6% ganancia o amplificación (4% + 2%). En el grupo ER+/PR-, un 50% era normal, un 22% presentaba polisomía y un 28% ganancia o amplificación (9% + 19%). El análisis de *RPS6KB1* reveló diferencias estadísticamente significativas respecto al número de **casos amplificados** ($p=0,009$). La **polisomía**, aunque no alcanzó un rango estadístico significativo ($p=0,151$), debido probablemente al reducido número de casos comparables entre ambos grupos, presentaba diferencias: 21% en el grupo ER+/PR+ y 37% en el ER+/PR-.

Respecto al FISH de *ZNF217*, se obtuvieron los resultados de 50 muestras (**Fig. 50**). En el grupo ER+/PR+, un 59% eran normales, un 41% presentaban polisomía y ninguna muestra presentaba ganancia o amplificación. En el grupo ER+/PR-, un 22% era normal, un 22% presentaba polisomía y un 56% (22% + 34%) ganancia o amplificación. El análisis de *ZNF217* reveló diferencias estadísticamente significativas respecto al número **alterado y amplificado de casos** ($p=0,010$ y $p<0,001$ respectivamente). De nuevo la **polisomía** pese no alcanzar un rango estadístico significativo ($p=0,179$), era diferente en ambos grupos: 22% en el ER+/PR+ y 40% en el ER+/PR-.

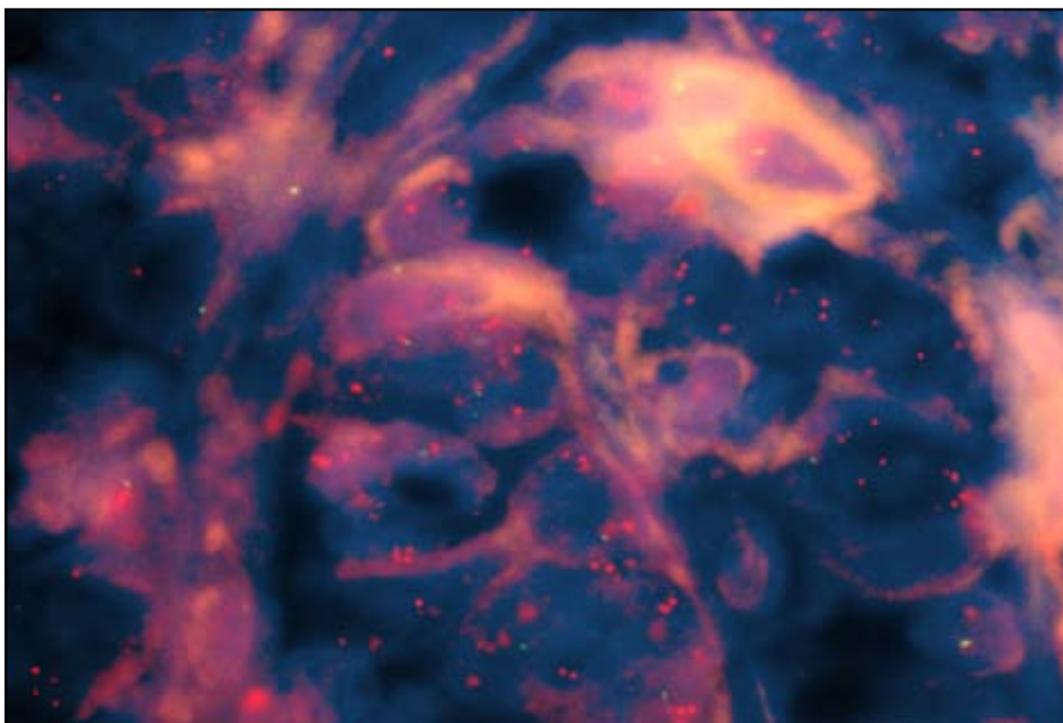


Fig. 49. FISH de *RPS6KB1* sobre una muestra de tejido tumoral mamario incluida en un TMA. Observamos en gran parte de las células más de 3 señales rojas -*RPS6KB1*-, y dos señales verdes -*CEP17*- (aunque en la imagen capturada no se aprecian lo suficientemente bien debido a la debilidad de la señal), que dan como resultado una amplificación.

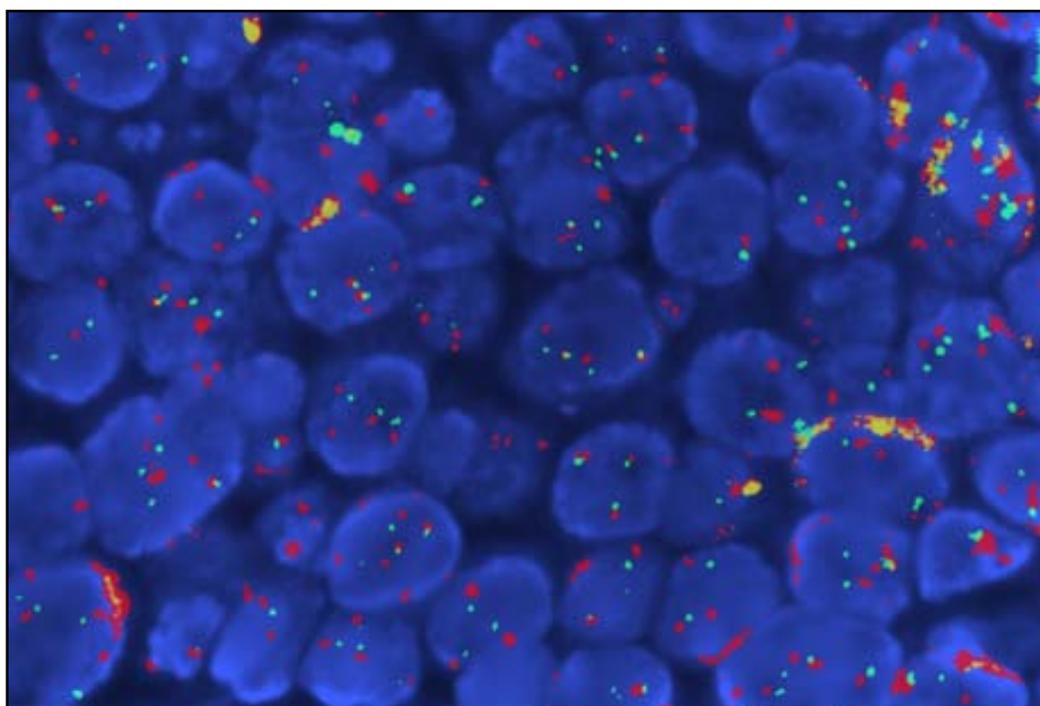


Fig. 50. FISH de *ZNF217* sobre una muestra de tejido tumoral mamario incluida en un TMA. Observamos en gran parte de las células más de 3 señales rojas -*ZNF217*-, y dos o más señales verdes -*CEP20*-, que dan como resultado una amplificación y polisomía.

4. DISCUSIÓN

“...si soy sabio, no trato de llevar a nadie a este extraño lugar de mis pensamientos, lo llevo al bosque y lo dejo entre los árboles, hasta que encuentre los árboles dentro de sí mismo, y se encuentre a sí mismo dentro de los árboles.”

(L. Patton)

5.1. Optimización de las técnicas utilizadas

5.1.1. Técnica de CGH-array

En este estudio se utilizó la plataforma de *Agilent Technologies* para la realización de la técnica de CGH-array. Inicialmente, la obtención de ADN de buena calidad supuso la pérdida de algunas de las muestras seleccionadas para el estudio, puesto que durante el proceso de purificación del mismo se obtenía un ADN más limpio pero a veces la concentración no era suficiente para su uso en la CGH-array, por lo que finalmente se decidió utilizar las muestras que presentaban una buena calidad de su ADN aunque no fuera óptimo.

El protocolo que utilizamos para la realización de la técnica de CGH-array es el propuesto inicialmente por la casa comercial, ajustándolo con el tiempo a los cambios que ella misma proponía, especialmente con el cambio del array 1x44 a 4x44. Inicialmente este cambio supuso la adecuación de algunas de las condiciones experimentales llevadas a cabo durante el protocolo, lo que provocó tener que probar el nuevo formato previamente y establecer las nuevas condiciones óptimas. Con la utilización de este nuevo formato se ahorró tiempo de hibridación (de 48 a 24 h) y el coste económico de la técnica fue menor, puesto que con la misma cantidad de reactivos se podían obtener los resultados para 4 muestras. Después de realizar la técnica y de llevar a cabo el escaneado de los resultados, algunas de las muestras no pudieron ser analizadas por no superar los estándares de calidad establecidos, en su mayoría este hecho se debió a la mala calidad de la muestra.

El análisis de los arrays de CGH y la obtención de los resultados fue muy laborioso debido a la inexistencia de un *software* específico de análisis que nos permitiera obtener los resultados directamente. Actualmente, la mayoría de casas comerciales, incluida *Agilent Technologies*, disponen ya o están en proceso de elaboración de softwares de análisis muy potentes que ahorran el tener que hacer el análisis manualmente.

5.1.2. Construcción del array de tejidos

Los TMAs permitieron el análisis de un elevado número de muestras a partir de un sólo experimento, lo que supuso una reducción del tiempo de obtención de resultados y del coste económico por el uso de menos sonda para hibridar las muestras mediante FISH en un TMA, a diferencia de haber realizado cortes morfológicos.

En nuestro estudio, utilizamos tres réplicas por muestra para obtener una mejor representación del tumor. Además, en el caso de perderse alguno de los tres cilindros, los dos restantes permiten seguir con el análisis. Se ha descrito que el uso de dos o tres cilindros por muestra presentarían resultados más fiables que el uso de tan sólo un cilindro por muestra, mientras que el uso de más de tres cilindros no supondría una mejora (251). Los cilindros de tejido hepático incluidos en diagonal en el TMA facilitaron la localización de cada muestra durante el posterior análisis de la técnica de FISH. La reducida distancia de 1 mm entre cilindros no dificultó la elaboración del TMA ni tampoco la realización de la técnica de FISH. Por cuestiones prácticas, en cada TMA incluimos 25 muestras con tres réplicas, no obstante se podría haber incluido un mayor número de muestras. Los cortes de 3 µm, aunque pudieran dificultar en algún grado el corte del TMA, permitieron obtener buenas hibridaciones con la técnica de FISH.

5.1.3. Técnica de FISH

La técnica de FISH utilizada en nuestro laboratorio permitió tanto obtener resultados de FISH sobre tejido parafinado procedente de un sólo corte histológico como en los TMAs.

En el caso de las hibridaciones sobre tejido parafinado con una sola muestra, algunas de ellas tuvieron que ser repetidas por el mal estado de la misma. En el caso de las hibridaciones sobre los TMAs, durante el protocolo, especialmente en la digestión del tejido en el microondas, se perdieron algunos de los cilindros, no obstante, su número fue muy reducido y en su mayoría se obtuvieron hibridaciones muy buenas. Algunas de las hibridaciones también tuvieron que ser repetidas por el mal estado de algunas de las muestras o por la dificultad de hibridación con alguna de las sondas, como es el caso de utilizar la sonda *ZNF217-Spectrum Orange / 20q11-Spectrum Green* (Kreatech Diagnostics, Amsterdam, The Netherlands).

5.2. Análisis de los resultados

En el presente estudio, se analizó un total de 48 muestras de CDI de mama (25 ER+/PR+ y 23 ER+/PR-) mediante la técnica de CGH-array. Se observó que los tumores mamarios ER+/PR-, presentan un perfil genético ligeramente diferente de los tumores mamarios ER+/PR+. Esto se basa principalmente en diversas regiones de ganancia y pérdida diferentemente alteradas entre ambos grupos, que además podrían ser en parte responsables del fenotipo más agresivo que presentan los tumores ER+/PR-.

5.2.1. Análisis del perfil de alteración genómico

El grupo ER+/PR- presentó un mayor perfil de alteración genómica (29,4% de genoma total alterado, 18% de genoma perdido, 19,1 alteraciones por muestra y 9,5 ganancias por muestra). Estas variables estaban de forma significativa en comparación con el grupo ER+/PR+ (**Tabla 12**). Estos resultados coinciden con el estudio previo de **Arpino et al.** (188), donde observaban que los tumores ER+/PR- tendían a presentar mayor grado de aneuploidía que los ER+/PR+. Además, **Creighton et al.** (191) describieron que los tumores ER+/PR- mostraban el doble de ganancias y pérdidas respecto a los ER+/PR+. Este perfil genómico más aberrante del grupo ER+/PR- es indicativo de la presencia de una mayor inestabilidad genómica en este tipo de tumores.

5.2.2. Análisis del perfil de alteración cromosómico

El perfil de alteración cromosómico de todas las muestras **ER+** (PR+ y PR-) mostró que las regiones más ganadas estaban en **1q, 8p, 8q, 11q, 16p, 17q y 20q**, y las pérdidas **1p, 6q, 8p, 9p, 11q, 13, 16q, 17p y 22q**. Estos resultados coinciden con los aportados por estudios previos de CGH-array aplicada a tumores mamarios (190, 276, 277, 279-281) y más concretamente a tumores ER+ (189-191, 278).

Se observaron las regiones recurrentes de **amplificación 8p12, 8q21-24, 11q13.3, 17q23, 20q13 y 16p11.2**, de las que las cinco primeras habían sido previamente descritas en este tipo de patología (189-190, 276-277). Mientras que la región **16p11.2** suele aparecer sólo en forma de ganancia en los tumores ER+ (190, 276, 288), no obstante esto puede ser debido a que la mayoría de los casos con amplificación (**Tablas 14 y 15**) pertenecen al grupo RE+/PR+ y por lo tanto podría pasar desapercibida en el estudio de grupos de tumores mamarios muy heterogéneos, o que sencillamente estuviera provocado por una desviación aleatoria de nuestras muestras.

Este perfil genómico común observado en nuestro estudio representaría el hecho de que todas las muestras eran CDIs del tipo luminal (ER+) y que por lo tanto tendrían un origen de alteración genético común.

Una vez definimos para cada grupo por separado los cromosomas más alterados con ganancias y pérdidas ($\geq 30\%$ de casos alterados) se observó que ambos grupos compartían los cromosomas **1, 8, 11 y 16** como los más alterados con **ganancias**, y los cromosomas **1, 6, 11, 13, 14, 16 y 17** como los más alterados con **pérdidas**. Sin embargo, el grupo **ER+/PR-** también presentaba los cromosomas **5, 6, 17, 19, 20 y 21** como los más alterados con **ganancias**, y los cromosomas **3, 5, 8, 9, 21 y 22** como los

más alterados con **pérdidas**, y que no aparecían en el grupo ER+/PR+. Se observó entonces que todos los cromosomas más alterados en el grupo ER+/PR+ lo estaban también en el grupo ER+/PR-, mientras que éste presentaba cromosomas alterados adicionales.

5.2.3. Análisis de las regiones de alteración solapadas

A partir de conocer los cromosomas más alterados definimos los SORIs recurrentes. Observando que ambos grupos compartían los cromosomas en **1, 8, 11 y 16** como los más alterados con **ganancias recurrentes solapadas**, y los cromosomas **1, 6, 11, 13, 16 y 17** como los más alterados con **pérdidas recurrentes solapadas**. Sin embargo, el grupo ER+/PR- también presentaba los cromosomas **17 y 20** como los más alterados con **ganancias solapadas**, y los cromosomas **3, 8, 9, 14, 21 y 22** como los más alterados con **pérdidas solapadas (Tablas 14 y 15)**.

Es de destacar que el cromosoma **14** no presenta una región recurrente de pérdida en el grupo ER+/PR+ a pesar de que en este grupo este cromosoma figura como uno de los más alterados con pérdidas. En cuanto a los cromosomas **5, 6 y 19** no presentan regiones recurrentes de ganancia en el grupo ER+/PR- aunque en este grupo estos cromosomas figuran como unos de los más alterados con ganancias. El cromosoma **5** tampoco presenta una región de pérdida recurrente en el grupo ER+/PR- pese a que en este grupo este cromosoma figura como uno de los más alterados con pérdidas.

Por lo tanto detectamos que el número y la frecuencia de los cromosomas más alterados con regiones solapadas eran diferentes para cada uno de los grupos, indicando la existencia de mecanismos moleculares alternativos para la adquisición de las alteraciones cromosómicas diferentemente observadas, que parecen estar presentes en un número mayor en el grupo ER+/PR-.

5.2.4. Análisis de regiones ganadas y perdidas con significancia estadística entre los grupos ER+/PR+ y ER+/PR-

Después de comparar las regiones de alteración de ambos grupos, obtuvimos que las regiones **ganadas, 17q23.2-q23.3 y 20q13.12**, y las regiones **perdidas, 3p21.32-p12.3, 9pter-p13.2, 17pter-p12 y 21tel-q21.1** estaban de forma **significativa** y se obtuvieron de forma específica en el grupo **ER+/PR-**.

En relación a estos resultados, **Creighton et al.** (191) analizaron una base de datos existente de CGH-array y arrays de expresión (190) dónde observaron que los tumores ER+/PR-, definidos por su perfil de expresión génica, tendían a presentar

regiones con **ganancias** en **11q13**, **12q14-15** y **17q21-q25** y regiones con **pérdidas** en **11q13-q25**. Además, añadía que la región **17q21-q25** en particular aparecía de forma exclusiva en los tumores ER+/PR- definidos por su perfil de expresión génica y no por su perfil clínico (ensayos de IHQ para el ER y PR).

Por su parte, **Letessier et al.** (189) en una serie de 547 tumores invasivos de mama analizados por FISH, asociaron la amplificación de **20q13**, por medio del estudio del gen *ZNF217*, con la negatividad de la expresión del PR.

5.2.4.1. Análisis del SORI perdido 3p21.21-p12.3

La región **3p21.21-p12.3**, observada más frecuentemente perdida en el grupo ER+/PR-, incluye dos regiones mínimas contiguas (**3p21.3** y **3p14.2**) descritas previamente como regiones de pérdida y regiones silenciadas por cambios epigenéticos (ej: hipermetilación) en cáncer de mama y más frecuentemente en otros tumores sólidos. Estas dos regiones contienen algunos genes candidatos a GSTs, puesto que su inactivación parece ser esencial para la transformación maligna y / o para establecer una ventaja selectiva asociada a la progresión de la enfermedad (289).

La región **3p21.3** presenta una región crítica de delección de 120 Kb que podría contener una agrupación de GSTs. Ésta contiene 8 genes, de entre los cuales **RASSF1A**, **BLU/ZMYND10** y **FUS1** parecen ser realmente GSTs (289). La inactivación de **RASSF1A** por factores genéticos y epigenéticos ha sido frecuentemente observada en tumores mamarios y podría representar el mejor gen candidato de esta región para este tipo de patología. Este gen interviene en la apoptosis celular, el dinamismo microtubular y la progresión mitótica a través de múltiples vías de señalización (290, 291)

La región **3p14.2** contiene el gen **FHIT** (*fragile histidine triad*). Este gen se localiza en el genoma humano donde se encuentra el mayor número de lugares frágiles, FRA3B. La delección e hipermetilación de **FHIT** se ha observado previamente en cánceres de mama esporádicos, así como en lesiones preneoplásicas, sugiriendo que estos cambios podrían tener lugar de forma temprana en una fracción significativa de tumores mamarios. Además, la pérdida de **FHIT** está asociada a la progresión tumoral y a la supervivencia total (292, 293).

En nuestro estudio, se observó una mayor frecuencia de la delección de 3p en el grupo ER+/PR-. Previamente, **Martínez et al.** (292) observaron la asociación entre un incremento de la pérdida alélica de 3p y el aumento del grado tumoral y la pérdida de la expresión del ER y PR. Además recientemente, **Guler et al.** (294) observaron una mayor frecuencia de la pérdida de **FHIT** en CDIs, y describieron una fuerte correlación

directamente proporcional de la expresión de *FHIT* y la expresión del ER y PR (fenotipo basal).

5.2.4.2. Análisis del SORI perdido 9pter-p13.3

La región **9pter-p13.3**, observada más frecuentemente perdida en el grupo ER+/PR-, incluye el gen **CDKN2A** que codifica para la proteína P16. Este gen está frecuentemente mutado, deleciónado o hipermetilado en una amplia variedad de tumores, como en los mamarios (295) Se le considera un importante GST que interviene en la progresión del ciclo celular en la transición G₁/S, en la senescencia celular, la anoikis (inducción de la apoptosis por la pérdida de contacto celular), la dispersión celular y la angiogénesis (296-298).

En el cáncer de mama, la alteración del estado de P16 tendría lugar de forma temprana en la progresión tumoral (299).

5.2.4.3. Análisis del SORI perdido 17pter-p12

La región **17pter-p12**, observada más frecuentemente perdida en el grupo ER+/PR-, incluye el gen **TP53**. Éste es un conocido GST que interviene en la detención temporal o prolongada del ciclo celular, en la detención permanente y en la apoptosis. También puede promover la reparación del ADN dañado así como la inhibición de la angiogénesis (300).

En el cáncer de mama, la pérdida de las funciones de **TP53** por su deleción o mutaciones puntuales ha sido asociada con características biológicas del tumor más agresivas y con una peor evolución clínica de la enfermedad. Además, su estado podría determinar qué pacientes se beneficiarían de la adición de quimioterapia como complemento a la terapia endocrina (37).

5.2.4.4. Análisis del SORI perdido 21pter-q21.1

La región **21tel-q21.1**, observada más frecuentemente perdida en el grupo ER+/PR-, incluye el gen **BTG3**, candidato a GST. Éste es un regulador negativo de la quinasa tirosina SRC y un gen diana de **TP53** y además, es capaz de inhibir la actividad del factor de transcripción E2F1 (301, 302).

Aunque se sabe poco acerca de esta región y de la importancia de este gen en el desarrollo del cáncer de mama, se ha descrito el posible papel que desempeñaría una copia adicional de **BTG3** en la reducida incidencia de cáncer de mama en personas con Síndrome de *Down* (301, 302).

5.2.4.5. Análisis del SORI ganado 20q13

La región **20q13**, observada más frecuentemente amplificada en el grupo ER+/PR-, incluye el gen **ZNF217**, considerado en este estudio como el gen diana de esta región.

La activación de este gen es capaz de inmortalizar células epiteliales mamarias humanas y su amplificación ha sido previamente asociada a un mal pronóstico, sugiriendo su posible papel tanto en el desarrollo temprano y tardío de la enfermedad. **ZNF217** puede atenuar señales apoptóticas generadas por la disfunción telomérica, así como de las generadas por el daño celular inducido por agentes quimioterapéuticos (303), por lo que su amplificación podría estar relacionada con la resistencia a cierto tipo de tratamientos tumorales. Además, niveles elevados de **ZNF217** promueven la supervivencia celular al menos en parte a través de la activación de la vía de señalización PI3K/Akt (304).

La amplificación de 20q13 es un evento común en el cáncer de mama. En este estudio se observó una frecuencia de amplificación de esta región más elevada en las muestras ER+/PR- por medio de la CGH-array. Además, en los estudios de FISH llevados a cabo en las muestras incluidas en los TMAs, **ZNF217** resultó estar también ampliamente amplificado en este tipo de tumores comparados con los ER+/PR+, lo que indicaría la asociación específica de esta alteración para los tumores ER+/PR-. Nuestros resultados están en concordancia con los previamente aportados por **Letessier et al.** (189) quienes observaron una asociación entre la amplificación de **ZNF217** y la negatividad del PR.

5.2.4.6. Análisis del SORI ganado 17q23.2-q23.3

La región **17q23.2-23.3**, observada más frecuentemente ganada y específicamente amplificada en el grupo ER+/PR-, incluye **RPS6KB1** y **MAP3K3** como nuestros genes diana candidatos para esta región. Recientemente **Lambros et al.** (285) observaron que la amplificación del gen **PPM1D** -también incluido en esta región- estaba significativamente asociado con la amplificación y sobreexpresión de ERBB2. Para evitar que la amplificación de **HER2** en el cromosoma 17 pudiera enmascarar la importancia de otros genes localizados en la misma región o cercana a ella, las muestras de este estudio eran en su mayoría HER2 negativas, por lo que decidimos no estudiar **PPM1D** por FISH.

MAP3K3 codifica para la proteína quinasa mitógeno activadora MEKK3. Esta proteína regula directamente la proteína quinasa activada por estrés (SAPK) y las

señales extracelulares que intervienen en las vías de señalización de la proteína quinasa (ERK) (305)

La elevada expresión de MEKK3 parece ser un evento frecuente en los cánceres de mama y ováricos (287). Su sobreexpresión en las células provoca el incremento de la actividad de NF- κ B. Éste regula la expresión de muchos genes esenciales para el crecimiento y diferenciación celular, como las citoquinas, factores de crecimiento y sus receptores y moléculas de adhesión (306-309); también regula positivamente la expresión de genes que participan activamente en el control de la supervivencia celular, la angiogénesis y la metástasis (307, 310). Además, la vía de señalización de MEKK3 contribuye a la proliferación, movilidad e invasión celular por medio de la expresión de factores celulares de supervivencia (311, 312), y contribuye a la resistencia a la apoptosis celular así como a la resistencia a la apoptosis inducida por citoquinas y agentes quimioterapéuticos como la doxorubicina (287).

RPS6KB1 codifica para P70S6K, una proteína localizada en la parte final de la vía de señalización de la PI3K/Akt/mTOR, que puede ser activada por los receptores HER, el receptor del factor de crecimiento de la insulina y el ER en el cáncer de mama (284). Su activación provoca un incremento de la síntesis proteica y de la supervivencia y proliferación celular (313).

La amplificación y sobreexpresión de P70S6K ha sido previamente descrita en un 10-30% de líneas tumorales mamarias y en cánceres primarios de mama (314, 315), y se ha asociado a una enfermedad más agresiva y un peor pronóstico de forma independiente a la amplificación de *HER2* (316).

En nuestro estudio, se observó la amplificación específica de esta región en las muestras ER+/PR- analizadas por CGH-array, y no en las ER+/PR+. Además, en los estudios de FISH llevados a cabo en las muestras incluidas en los TMA, *MAP3K3* *RPS6KB1* estaban también altamente amplificados en los tumores ER+/PR- comparados con los ER+/PR+, lo que podría indicar la asociación específica de la región en la que están incluidos estos genes (17q23.2-q23.3), junto con la amplificación de la región 20q13, con los tumores ER+/PR-.

En su estudio, **Creighton et al.** (191) observaron, como ya hemos señalado anteriormente, que los tumores ER+/PR- (identificados según su perfil de expresión génica) tendían a presentar de forma específica ganancias en la región 17q21-q25, en la que estaría incluida la región mínima de alteración (17q23.2-q23.3) encontrada en nuestro estudio. Además, observaron en cuatro bases de datos de perfiles de expresión génica (88, 109, 317, 318) que el perfil de expresión génica que presentan las vías de señalización de la **PI3K/Akt/mTOR** estaba significativamente enriquecida en los tumores ER+/PR- y los tumores ER-PR- (fenotipo basal y de gran agresividad) y

no en los ER+/PR+. Finalmente, cuando trataron cultivos tumorales mamarios ER+/PR- con inhibidores de PI3K e inhibidores de mTOR como la rapamicina, entre otros, la expresión de un significativo número de genes, que inicialmente estaban expresados de forma muy elevada en este tipo de tumores, quedaba reprimida.

Tanto **MAP3K3** y **RPS6KB1** -como también el gen **ZNF217**- participan en las vías de señalización de la **PI3K/Akt/mTOR**. Estas vías de señalización regulan varios procesos celulares, incluyendo la proliferación, crecimiento, supervivencia y movilidad y se encuentran comúnmente alteradas en cáncer (319). Es interesante remarcar que su activación provoca la disminución por factores de crecimiento de la expresión del PR a nivel del mRNA, y esta regulación es independiente del ER (144) lo que podría ser una de las causas por las que, al menos en parte, algunos tumores ER+ serían PR-. Estos tumores corresponderían a aquellos que presentarían una activación anómala de estas vías de señalización provocada por ejemplo por algún tipo de alteración a nivel genómico o proteico de alguno de sus componentes, como podrían ser las amplificaciones de **MAP3K3** y **RPS6KB1**. Además, esta señalización - independiente del ER- anómala, podría estar involucrada en la resistencia a terapias endocrinas basadas en el bloqueo de las vías de señalización dependientes del ER como el tamoxifen que bloquea directamente este receptor.

6. Conclusiones

“...cada momento es único, no hay instantes vacíos.”

“...conocimiento no equivale a sabiduría, la sabiduría consiste en hacerlo.”

(El guerrero pacífico, Dan Millman)

- **La técnica de CGH-array** ha permitido conocer que:
 - El grupo de tumores **ER+/PR-** presenta un **perfil genómico** con un **mayor número de alteraciones** que los tumores ER+/PR+.
 - Todos los tumores ER+ (PR+ y PR-) muestran un perfil de alteración cromosómico que incluye **1q, 8p, 8q, 11q, 16p, 17q y 20q** como las regiones con más **ganancias**, y **1p, 6q, 8p, 9p, 11q, 13, 16q, 17p y 22q** como las regiones con más **pérdidas**.
 - Los perfiles de alteración cromosómico de los grupos ER+/PR+ y ER+/PR- comparten los cromosomas **1, 8, 11 y 16** como los **más alterados con ganancias**, y los cromosomas **1, 6, 11, 13, 14, 16 y 17** como los **más alterados con pérdidas**. El grupo **ER+/PR-** presenta además los cromosomas **5, 6, 17, 19, 20 y 21** como los **más alterados con ganancias**, y los cromosomas **3, 5, 8, 9, 21 y 22** como los **más alterados con pérdidas**.
 - En ambos grupos de tumores los cromosomas **1, 8, 11 y 16** son los más alterados con **ganancias recurrentes solapadas** y los cromosomas **1, 6, 11, 13, 16 y 17** son los más alterados con **pérdidas recurrentes solapadas**. El grupo **ER+/PR-** presenta además los cromosomas **3, 8, 9, 14, 17, 21 y 22** como los más alterados con **pérdidas recurrentes solapadas**, y los cromosomas **17 y 20** como los más alterados con **ganancias recurrentes solapadas**.
 - Las regiones **3p21.32-p12.3, 9pter-p13.2, 17pter-p12 y 21tel-q21.1** se han **perdido de forma significativa en el grupo de tumores ER+/PR-**. Estas regiones incluyen genes supresores de tumores involucrados en apoptosis, mitosis, angiogénesis e invasión celular, como **RASSF1A, FHIT, CDKN2A, TP53 y BTG3**.
 - Las regiones **17q23.2-q23.3 y 20q13.12** se han **ganado de forma significativa en el grupo de tumores ER+/PR-**. Estas regiones incluyen genes como **MAP3K3, RPS6KB1 y ZNF217**, involucrados en el control de la división y supervivencia celular, angiogénesis, metástasis e invasión celular y cuya amplificación contribuye a la resistencia a la apoptosis celular, apoptosis inducida por citoquinas y agentes quimioterapéuticos, así como a una sobreactivación de las vías de la PI3K/Akt/mTOR.

- **La FISH** con los genes de interés en las muestras de los TMAs muestra que:
 - Respecto al gen **MAP3K3**, el número de **casos alterados, amplificados y polisómicos** se encuentra **de forma estadísticamente significativa** en el grupo **ER+/PR-**.
 - Respecto al gen **RPS6KB1**, el número de **casos amplificados** se encuentra **de forma estadísticamente significativa** en el grupo **ER+/PR-**.
 - Respecto al gen **ZNF217**, el número de **casos amplificados** se encuentra **de forma estadísticamente significativa** en el grupo **ER+/PR-**.
 - Los resultados de la técnica de FISH aplicada a 100 tumores ER+/PR+ y ER+/PR- confirman la **especificidad** de las amplificaciones de los genes **MAP3K3, RPS6KB1 y ZNF217** en los tumores **ER+/PR-**.

- Las alteraciones descritas en este estudio, especialmente las relacionadas con los genes **MAP3K3, RPS6KB1** y **ZNF217**, presentes en los tumores ER+/PR- podrían ser, al menos en algunos casos, las causantes de su mayor inestabilidad genética y agresividad tumoral, pérdida de la expresión del PR, así como de la resistencia a terapias endocrinas, tradicionalmente observada en este subtipo de tumores.

7. RESUMEN Y CONCLUSIONES EN INGLÉS

“...a veces los muros que nos separan no nos dejan ver los lazos que nos unen.”

7.1. Abstract

Development and progression of all types of breast cancer, and especially the hormone-dependent ones are widely influenced and determined by estrogen and progesterone receptors (ER and PR, respectively). Approximately 70% of all breast cancers are ER+ and more than half of them are also PR+.

It is widely accepted that ER status is a strong predictive factor of good response to endocrine therapy (ET), but ER positivity is not a guarantee of sensitivity to the treatment and some tumors fail to respond. Clinical observations indicate that ER+PR- breast cancers present a poorer response to ET and more aggressive phenotype than ER+PR+ ones. The aim of this study was to identify genetic differences between ER+PR+ and ER+PR- subgroups.

An array CGH technique was applied to 25 ER+PR+ breast tumors and 23 ER+PR- ones. Genes of interest were analyzed by Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in a validation series composed by 50 ER+PR+ tumors and 50 ER+PR- ones on TMAs.

As a result, it was observed that ER+PR- breast tumors have a smaller but different genetic profile. ER+PR- group presented a higher genomic aberrant profile with chromosomes **17** and **20** as the most **differently altered with overlapped gains**, and chromosomes **3, 8, 9, 14, 17, 21** and **22** as the most **differently altered with overlapped losses** respect to ER+PR+ group. The overlapped gained regions **17q23.2-q23.3** and **20q13.12**, and the overlapped lost regions **3p21.32-p12.3**, **9pter-p13.2**, **17pter-p12** and **21tel-q21.1** were found in a significant way in ER+PR- breast tumors.

Significant lost regions included genes (**RASSF1A**, **FHIT**, **CDKN2A**, **TP53** and **BTG3**) with tumor suppressor functions and involved in apoptosis, mitosis, angiogenesis and cell spreading. Significant gained regions included genes (**MAP3K3**, **RPS6KB1** and **ZNF217**) involved in cell cycle control, angiogenesis, resistance to apoptosis, metastasis and cellular spread, and activation of PI3K/Akt/mTOR pathways. All these alterations could contribute, at least in some cases, to explain the higher genomic instability, loss of PR expression, more aggressive phenotype and higher resistance to ETs, traditionally observed in ER+/PR- tumors.

7.2. Conclusions

- **The array CGH has allowed us to know that:**
 - **ER+/PR-** tumors show a genomic profile with a higher number of alterations than ER+/PR- ones.
 - All ER+ tumors (PR+ y PR-) show an altered chromosomal profile that includes **1q, 8p, 8q, 11q, 16p, 17q** and **20q** as the regions with more **gains**, and **1p, 6q, 8p, 9p, 11q, 13, 16q, 17p** and **22q** as the regions with more **losses**.
 - The altered chromosomal profiles of ER+/PR+ and ER+/PR- tumors share chromosomes **1, 8, 11** and **16** as the most altered with **gains**, and chromosomes **1, 6, 11, 13, 14, 16** and **17** as the most altered with **losses**. **ER+/PR-** tumors also show chromosomes **5, 6, 17, 19, 20** and **21** as the most altered with **gains** and chromosomes **3, 5, 8, 9, 21** and **22** as the most altered with **losses**.
 - In both groups of tumors, chromosomes **1, 8, 11** and **16** are the most altered with **overlapped recurrent gains** and chromosomes **1, 6, 11, 13, 16** and **17** are the most altered with **overlapped recurrent losses**. **ER+/PR-** tumors also show chromosomes **3, 8, 9, 14, 17, 21** and **22** as the most altered with **overlapped recurrent losses** and chromosomes **17** and **20** as the most altered with **overlapped recurrent gains**.
 - Regions **3p21.32-p12.3, 9pter-p13.2, 17pter-p12** and **21tel-q21.1** are **lost in a significant way in ER+/PR- tumors**. These regions include tumor suppressor genes involved in apoptosis, mitosis, angiogenesis and cellular spread such as **RASSF1A, FHIT, CDKN2A, TP53** and **BTG3**.
 - Regions **17q23.2-q23.3** and **20q13.12** are **gained in a significant way in ER+/PR- tumors**. These regions include genes such as **MA3PK3, RPS6KB1** y **ZNF217**, involved in cell cycle control, angiogenesis, metastasis and cellular spread and whose amplification contributes to the resistance to cellular apoptosis, cytokine- or drug-induced apoptosis and an hyperactivation of PI3K/Akt/mTOR signalling.

- **FISH** of the genes of interest in TMA's samples shows that:
 - Relative to the **MAP3K3** gene, the number of **altered, amplified and polysomic cases** are statistically significant in **ER+/PR-** tumors.
 - Relative to the **RPS6KB1** gene, the number of **amplified cases** are statistically significant in **ER+/PR-** tumors.
 - Relative to the **ZNF217** gene, the number of **amplified cases** are statistically significant in **ER+/PR-** tumors.
 - The results of the FISH applied to 100 ER+/PR+ and ER+/PR- tumors confirm the relation of **MAP3K3**, **RPS6KB1** and **ZNF217** amplifications to **ER+/PR-** tumors.

- The alterations of ER+/PR- tumors described in this investigation, specially those related to **MAP3K3**, **RPS6KB1** and **ZNF217** genes, could be, at least in some cases the cause of the higher genetic instability and tumoral aggressive, the lost of PR expression, and the resistance to endocrine therapies traditionally observed in this subtype of tumors.

8. BIBLIOGRAFÍA

***“...a disfrutar se aprende, es una asignatura importante de la vida.”
(Placer contra placer, Jesús Ruíz Mantilla)***

1. Parkin DM, Fernandez LM. Use of statistics to assess the global burden of breast cancer. *Breast J* 2006;12 Suppl 1:S70-80.
2. Tavassoli FA, Devilee P. Pathology and genetics. Tumours of the breast and female genital organs. World health organization classification of tumours. Primera ed. Fattaneh A, editor. Lyon: IARC Press; 2003.
3. Diez O, Gutierrez-Enriquez S, Ramon y Cajal T. Breast cancer susceptibility genes. *Med Clin (Barc)* 2006;126(8):304-10.
4. Coronato S, Laguens GE, Spinelli OM, Di Girolamo W. Tumor markers in breast neoplasm. *Medicina (B Aires)* 2002;62(1):73-82.
5. Jemal A, Clegg LX, Ward E, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival. *Cancer* 2004;101(1):3-27.
6. Vainio H, Bianchini F. Breast cancer screening. IARC handbook on cancer prevention, volumen 7. Primera ed. Lyon: Oxford University Press; 2002.
7. Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. the global picture. *Eur J Cancer* 2001;37 Suppl 8:S4-66.
8. El cáncer de mama en cifras [página web de Internet]. Madrid: Asociación Española Contra el Cáncer. Enero 2008 [citado diciembre 2009]. Disponible en:
www.muchovivir.org/index.jsp?seccion=37
9. Thull DL, Vogel VG. Recognition and management of hereditary breast cancer syndromes. *Oncologist* 2004;9(1):13-24.
10. Arai M, Utsunomiya J, Miki Y. Familial breast and ovarian cancers. *Int J Clin Oncol* 2004;9(4):270-82.
11. Ikeda N, Miyoshi Y, Noguchi S. Clinicopathological characteristics of hereditary breast cancer. *Nippon Rinsho* 2000;58 Suppl:533-6.
12. Verhoog LC, Brekelmans CT, Seynaeve C, et al. Survival and tumour characteristics of breast-cancer patients with germ line mutations of BRCA1. *Lancet* 1998;351(9099):316-21.
13. Pathology of familial breast cancer: Differences between breast cancers in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations and sporadic cases. Breast cancer linkage consortium. *Lancet* 1997;349(9064):1505-10.
14. Armes JE, Venter DJ. The pathology of inherited breast cancer. *Pathology* 2002;34(4):309-14.
15. Risk factors you can't control [página web de Internet]. Filadelfia: Breastcancer.org 2008 [citado diciembre 2009]. Disponible en:
www.breastcancer.org/risk/everyone/can't_control.jsp
16. Speer JF, Petrosky VE, Retsky MW, Wardwell RH. A stochastic numerical model of breast cancer growth that simulates clinical data. *Cancer Res* 1984;44(9):4124-30.
17. Norton L, Simon R. The norton-simon hypothesis revisited. *Cancer Treat Rep* 1986;70(1):163-9.
18. Spratt JA, von Fournier D, Spratt JS, Weber EE. Decelerating growth and human breast cancer. *Cancer* 1993;71(6):2013-9.

19. Koscielny S, Tubiana M, Valleron AJ. A simulation model of the natural history of human breast cancer. *Br J Cancer* 1985;52(4):515-24.
20. Norton L, Simon R, Brereton HD, Bogden AE. Predicting the course of gompertzian growth. *Nature* 1976;264(5586):542-5.
21. Norton L. A gompertzian model of human breast cancer growth. *Cancer Res* 1988;48(24 Pt 1):7067-71.
22. Heuser L, Spratt JS, Polk HC, Jr. Growth rates of primary breast cancers. *Cancer* 1979;43(5):1888-94.
23. Retsky MW, Swartzendruber DE, Wardwell RH, Bame PD. Is gompertzian or exponential kinetics a valid description of individual human cancer growth? *Med Hypotheses* 1990;33(2):95-106.
24. Modeling the natural history of breast cancer [Página web de Internet]. *Biology-online.org*. Diciembre 2006 [citado enero 2009]. Disponible en: http://www.biology.online.org/articles/molecular_biology_breast_metastasis/modeling_natural_history_breast.html
25. Goodale D, Phay C, Postenka CO, Keeney M, Allan AL. Characterization of tumor cell dissemination patterns in preclinical models of cancer metastasis using flow cytometry and laser scanning cytometry. *Cytometry A* 2009;75(4):344-55.
26. Sobin LH, Wittekind C, International Union against Cancer. *TNM classification of malignant tumours*. 6th ed. New York: Wiley-Liss; 2002.
27. Anatomy and physiology [página web de internet]. Canadá: *Cancer.ca* [citado enero 2009]. Disponible en: http://info.cancer.ca/CIS/E/CCE/HTML/10_183.html
28. Ganglios linfáticos axilares [Página web de internet]. Dallas: *Komen.org* [citado enero 2009]. Disponible en: www.komen.org/uploadedFiles/Content_Binaries/806-392-SP.pdf
29. Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 2004;4(6):448-56.
30. Zieglschmid V, Hollmann C, Bocher O. Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2005;42(2):155-96.
31. Gaforio JJ, Serrano MJ, Sanchez-Rovira P, et al. Detection of breast cancer cells in the peripheral blood is positively correlated with estrogen-receptor status and predicts for poor prognosis. *Int J Cancer* 2003;107(6):984-90.
32. Hayes DF, Bast RC, Desch CE, et al. Tumor marker utility grading system: A framework to evaluate clinical utility of tumor markers. *J Natl Cancer Inst* 1996;88(20):1456-66.
33. Solomon A, McLaughlin CL. Bence jones proteins and light chains of immunoglobulins. II. Immunochemical differentiation and classification of kappa-chains. *J Exp Med* 1969;130(6):1295-311.
34. *Tumor markers: Physiology, pathobiology, technology, and clinical applications*. Diamandis EP, editor. Washington, DC: AACCC Press; 2002.
35. Magdelenat H. Tumour markers in oncology: Past, present and future. *J Immunol Methods* 1992;150(1-2):133-43.

36. Bast RC, Jr, Ravdin P, Hayes DF, et al. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: Clinical practice guidelines of the american society of clinical oncology. *J Clin Oncol* 2001;19(6):1865-78.
37. Harris L, Fritsche H, Mennel R, et al. American society of clinical oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25(33):5287-312.
38. D'Alessandro R, Roselli M, Ferroni P, et al. Serum tissue polypeptide specific antigen (TPS): A complementary tumor marker to CA 15-3 in the management of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2001;68(1):9-19.
39. De La Lande B, Hacene K, Floiras JL, Alatrakchi N, Pichon MF. Prognostic value of CA 15.3 kinetics for metastatic breast cancer. *Int J Biol Markers* 2002;17(4):231-8.
40. Nicolini A, Tartarelli G, Carpi A, et al. Intensive post-operative follow-up of breast cancer patients with tumour markers: CEA, TPA or CA15.3 vs MCA and MCA-CA15.3 vs CEA-TPA-CA15.3 panel in the early detection of distant metastases. *BMC Cancer* 2006;6:269.
41. 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* 2006;24(31):5091-7.
42. Veronesi A, Talamini R, Longhi S, et al. Carcinoembryonic antigen (CEA) in the follow-up of disease-free breast cancer patients. *Tumori* 1982;68(6):477-80.
43. Gray BN. Value of CEA in breast cancer. *Aust N Z J Surg* 1984;54(1):1-2.
44. Hayes DF, Zurawski VR, Kufe DW. Comparison of circulating CA15-3 and carcinoembryonic antigen levels in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 1986;4(10):1542-50.
45. Thompson JA. Molecular cloning and expression of carcinoembryonic antigen gene family members. *Tumour Biol* 1995;16(1):10-6.
46. Clark GM, McGuire WL, Hubay CA, Pearson OH, Carter AC. The importance of estrogen and progesterone receptor in primary breast cancer. *Prog Clin Biol Res* 1983;132E:183-90.
47. Ravdin PM, Green S, Dorr TM, et al. Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated with Tamoxifen: Results of a prospective southwest oncology group study. *J Clin Oncol* 1992;10(8):1284-91.
48. Houghton J, George WD, Cuzick J, et al. Radiotherapy and Tamoxifen in women with completely excised ductal carcinoma in situ of the breast in the UK, Australia, and New Zealand: Randomised controlled trial. *Lancet* 2003;362(9378):95-102.
49. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: An overview of the randomised trials. *Lancet* 2005;365(9472):1687-717.
50. Colozza M, Azambuja E, Cardoso F, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart MJ. Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: Where are we now? *Ann Oncol* 2005;16(11):1723-39.

51. King CR, Kraus MH, Aaronson SA. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* 1985;229(4717):974-6.
52. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235(4785):177-82.
53. van de Vijver MJ, Mooi WJ, Wisman P, Peterse JL, Nusse R. Immunohistochemical detection of the neu protein in tissue sections of human breast tumors with amplified neu DNA. *Oncogene* 1988;2(2):175-8.
54. Paik S, Hazan R, Fisher ER, et al. Pathologic findings from the national surgical adjuvant breast and bowel project: Prognostic significance of erbB-2 protein overexpression in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1990;8(1):103-12.
55. Allred DC, Clark GM, Tandon AK, et al. HER-2/neu in node-negative breast cancer: Prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma. *J Clin Oncol* 1992;10(4):599-605.
56. Berns EM, Foekens JA, van Staveren IL, et al. Oncogene amplification and prognosis in breast cancer: Relationship with systemic treatment. *Gene* 1995;159(1):11-8.
57. Carlomagno C, Perrone F, Gallo C, et al. c-erb B2 overexpression decreases the benefit of adjuvant Tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases. *J Clin Oncol* 1996;14(10):2702-8.
58. Miles DW, Harris WH, Gillett CE, Smith P, Barnes DM. Effect of c-erbB2 and estrogen receptor status on survival of women with primary breast cancer treated with adjuvant cyclophosphamide/methotrexate/fluorouracil. *Int J Cancer* 1999;84(4):354-9.
59. Houston SJ, Plunkett TA, Barnes DM, Smith P, Rubens RD, Miles DW. Overexpression of c-erbB2 is an independent marker of resistance to endocrine therapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer* 1999;79(7-8):1220-6.
60. 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* 2000;92(24):1991-8.
61. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344(11):783-92.
62. Pritchard KI, Shepherd LE, O'Malley FP, et al. HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 2006;354(20):2103-11.
63. Fehm T, Maimonis P, Weitz S, Teramoto Y, Katalinic A, Jager W. Influence of circulating c-erbB-2 serum protein on response to adjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1997;43(1):87-95.
64. Mehta RR, McDermott JH, Hieken TJ, et al. Plasma c-erbB-2 levels in breast cancer patients: Prognostic significance in predicting response to chemotherapy. *J Clin Oncol* 1998;16(7):2409-16.

65. McManus DT, Yap EP, Maxwell P, Russell SE, Toner PG, McGee JO. P53 expression, mutation, and allelic deletion in ovarian cancer. *J Pathol* 1994;174(3):159-68.
66. Furihata M, Yamasaki I, Ohtsuki Y, et al. p53 and human papillomavirus DNA in renal pelvic and ureteral carcinoma including dysplastic lesions. *Int J Cancer* 1995;64(5):298-303.
67. Cuny M, Kramar A, Courjal F, et al. Relating genotype and phenotype in breast cancer: An analysis of the prognostic significance of amplification at eight different genes or loci and of p53 mutations. *Cancer Res* 2000;60(4):1077-83.
68. Liu S, Edgerton SM, Moore DH, Thor AD. Measures of cell turnover (proliferation and apoptosis) and their association with survival in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7(6):1716-23.
69. Joensuu H, Isola J, Lundin M, et al. Amplification of erbB2 and erbB2 expression are superior to estrogen receptor status as risk factors for distant recurrence in pT1N0M0 breast cancer: A nationwide population-based study. *Clin Cancer Res* 2003;9(3):923-30.
70. Goffin JR, Chappuis PO, Begin LR, et al. Impact of germline BRCA1 mutations and overexpression of p53 on prognosis and response to treatment following breast carcinoma: 10-year follow up data. *Cancer* 2003;97(3):527-36.
71. Westley B, Rochefort H. A secreted glycoprotein induced by estrogen in human breast cancer cell lines. *Cell* 1980;20(2):353-62.
72. Foekens JA, Look MP, Bolt-de Vries J, Meijer-van Gelder ME, van Putten WL, Klijn JG. Cathepsin-D in primary breast cancer: Prognostic evaluation involving 2810 patients. *Br J Cancer* 1999;79(2):300-7.
73. Stephens RW, Brunner N, Janicke F, Schmitt M. The urokinase plasminogen activator system as a target for prognostic studies in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998;52(1-3):99-111.
74. Janicke F, Prechtl A, Thomssen C, et al. Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J Natl Cancer Inst* 2001;93(12):913-20.
75. Harbeck N, Kates RE, Look MP, et al. Enhanced benefit from adjuvant chemotherapy in breast cancer patients classified high-risk according to urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (n = 3424). *Cancer Res* 2002;62(16):4617-22.
76. Schmitt M, Sturmheit AS, Welk A, Schnelldorfer C, Harbeck N. Procedures for the quantitative protein determination of urokinase and its inhibitor, PAI-1, in human breast cancer tissue extracts by ELISA. *Methods Mol Med* 2006;120:245-65.
77. Akli S, Keyomarsi K. Low-molecular-weight cyclin E: The missing link between biology and clinical outcome. *Breast Cancer Res* 2004;6(5):188-91.
78. Hwang HC, Clurman BE. Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene* 2005;24(17):2776-86.

79. Wingate H, Zhang N, McGarhen MJ, Bedrosian I, Harper JW, Keyomarsi K. The tumor-specific hyperactive forms of cyclin E are resistant to inhibition by p21 and p27. *J Biol Chem* 2005;280(15):15148-57.
80. Makretsov NA, Huntsman DG, Nielsen TO, et al. Hierarchical clustering analysis of tissue microarray immunostaining data identifies prognostically significant groups of breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10(18 Pt 1):6143-51.
81. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10(16):5367-74.
82. Abd El-Rehim DM, Ball G, Pinder SE, et al. High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses. *Int J Cancer* 2005;116(3):340-50.
83. Jacquemier J, Ginestier C, Rougemont J, et al. Protein expression profiling identifies subclasses of breast cancer and predicts prognosis. *Cancer Res* 2005;65(3):767-79.
84. Elrick MM, Walgren JL, Mitchell MD, Thompson DC. Proteomics: Recent applications and new technologies. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006;98(5):432-41.
85. Grassl J, Morishita M, Lewis PD, Leonard RC, Thomas G. Profiling the breast cancer proteome--the new tool of the future? *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2006;18(8):581-6.
86. Cekaite L, Hovig E, Sioud M. Protein arrays: A versatile toolbox for target identification and monitoring of patient immune responses. *Methods Mol Biol* 2007;360:335-48.
87. 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* 2001;98(19):10869-74.
88. 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* 2002;347(25):1999-2009.
89. Cronin M, Pho M, Dutta D, et al. Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues: Development and performance of a 92-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Am J Pathol* 2004;164(1):35-42.
90. Paik S, Tang G, Shak S, et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2006;24(23):3726-34.
91. Gerber B, Krause A, Muller H, et al. Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors. *J Clin Oncol* 2001;19(4):960-71.
92. Pantel K, Braun S. Molecular determinants of occult metastatic tumor cells in bone marrow. *Clin Breast Cancer* 2001;2(3):222-8.
93. Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells versus imaging-predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12(21):6403-9.
94. Gaforio JJ, Serrano MJ, Sanchez-Rovira P, et al. Detection of breast cancer cells in the peripheral blood is positively correlated with estrogen-receptor status and predicts for poor prognosis. *Int J Cancer* 2003;107(6):984-90.

95. *What you need to know about breast cancer* [Página web de internet]. San Francisco: Medem, Inc. 2009 [citado septiembre 2009]. Disponible en: <http://www.medem.com/?q=medlib/article/ZZSOTZD38C>.
96. Deneoix PF, Baclasse F. *Proposed clinical classification of breast cancers; statement of the international cancer union. Bull Assoc Fr Etud Cancer 1955;42(4):433-40.*
97. Sobin LH, Wittekind C, *International Union against Cancer. TNM: Classification of malignant tumours. 6th ed. New York: Wiley-Liss; 2002.*
98. Instituto Universitario Dexeus. *Comité de Mastología. Mastología. 2a ed. Barcelona etc.: Masson; 2000.*
99. *Staging and survival rates of breast cancer* [Página web de internet]. Greenville: Imaginis Corporation. 2008 [citado septiembre 2009]. Disponible en: <http://www.imaginis.com/about/contact.asp>.
100. Elston CW, Ellis IO. *The breast. systemic pathology. 3rd ed. C.W. Elston and Ellis I.O., editors. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1998.*
101. Azzopardi AG. *Classification of primary breast carcinoma. 1st ed. A.G. Azzopardi, editor. Philadelphia: WB Saunders; 1979.*
102. Tavassoli F.A. *Pathology of the breast. 1st ed. Tavassoli F.A., editor. Stanford: Appleton and Lange; 1992.*
103. Zafrani B, Aubriot MH, Mouret E, et al. *High sensitivity and specificity of immunohistochemistry for the detection of hormone receptors in breast carcinoma: Comparison with biochemical determination in a prospective study of 793 cases. Histopathology 2000;37(6):536-45.*
104. Revillion F, Bonnetterre J, Peyrat JP. *ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. Eur J Cancer 1998;34(6):791-808.*
105. Scarff RW. *Prognosis in carcinoma of the breast. Br J Radiol 1948;21(252):594-6.*
106. 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. C. W. Elston & I. O. Ellis. histopathology 1991; 19; 403-410. Histopathology 2002;41(3A):151,2, discussion 152-3.*
107. 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 1957;11(3):359-77.*
108. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. *Molecular portraits of human breast tumours. Nature 2000;406(6797):747-52.*
109. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. *Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100(14):8418-23.*
110. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, et al. *Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100(18):10393-8.*

111. Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: Ready for clinical application? *J Clin Oncol* 2005;23(29):7350-60.
112. Mackay A, Jones C, Dexter T, et al. cDNA microarray analysis of genes associated with ERBB2 (HER2/neu) overexpression in human mammary luminal epithelial cells. *Oncogene* 2003;22(17):2680-8.
113. Bertucci F, Borie N, Ginestier C, et al. Identification and validation of an ERBB2 gene expression signature in breast cancers. *Oncogene* 2004;23(14):2564-75.
114. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol* 2006;19(2):264-71.
115. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist* 2004;9(6):606-16.
116. Lonning PE. Breast cancer prognostication and prediction: Are we making progress? *Ann Oncol* 2007;18 Suppl 8:viii3-7.
117. Ruibal A. *El cáncer de mama: Biología y marcadores tumorales*. 1ª ed. Ruibal A, editor. Madrid: Abbott Científica; 1996.
118. Saez RA, McGuire WL, Clark GM. Prognostic factors in breast cancer. *Semin Surg Oncol* 1989;5(2):102-10.
119. 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* 1983;52(9):1551-7.
120. Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann Surg* 1994;220(3):391,8; discussion 398-401.
121. Albertini JJ, Lyman GH, Cox C, et al. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in the patient with breast cancer. *JAMA* 1996;276(22):1818-22.
122. Prognostic importance of occult axillary lymph node micrometastases from breast cancers. international (ludwig) breast cancer study group. *Lancet* 1990;335(8705):1565-8.
123. Hainsworth PJ, Tjandra JJ, Stillwell RG, et al. Detection and significance of occult metastases in node-negative breast cancer. *Br J Surg* 1993;80(4):459-63.
124. McGuckin MA, Cummings MC, Walsh MD, Hohn BG, Bennett IC, Wright RG. Occult axillary node metastases in breast cancer: Their detection and prognostic significance. *Br J Cancer* 1996;73(1):88-95.
125. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989;63(1):181-7.
126. Rosen PP, Groshen S, Kinne DW, Norton L. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: Analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol* 1993;11(11):2090-100.
127. Koscielny S, Tubiana M, Le MG, et al. Breast cancer: Relationship between the size of the primary tumour and the probability of metastatic dissemination. *Br J Cancer* 1984;49(6):709-15.

128. Marks JR, Humphrey PA, Wu K, et al. Overexpression of p53 and HER-2/neu proteins as prognostic markers in early stage breast cancer. *Ann Surg* 1994;219(4):332-41.
129. Press MF, Pike MC, Chazin VR, et al. Her-2/neu expression in node-negative breast cancer: Direct tissue quantitation by computerized image analysis and association of overexpression with increased risk of recurrent disease. *Cancer Res* 1993;53(20):4960-70.
130. Thor AD, Moore DH, II, Edgerton SM, et al. Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: An independent marker of prognosis in breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 1992;84(11):845-55.
131. Friedrichs K, Gluba S, Eidtmann H, Jonat W. Overexpression of p53 and prognosis in breast cancer. *Cancer* 1993;72(12):3641-7.
132. Silvestrini R, Benini E, Daidone MG, et al. P53 as an independent prognostic marker in lymph node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1993;85(12):965-70.
133. Hibberd AD, Horwood LJ, Wells JE. Long term prognosis of women with breast cancer in new zealand: Study of survival to 30 years. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1983;286(6380):1777-9.
134. 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* 1994;30(1):23-33.
135. Nixon AJ, Neuberg 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* 1994;12(5):888-94.
136. Albain KS, Allred DC, Clark GM. Breast cancer outcome and predictors of outcome: Are there age differentials? *J Natl Cancer Inst Monogr* 1994;(16)(16):35-42.
137. Kuru B, Camlibel M, Gulcelik MA, Alagol H. Prognostic factors affecting survival and disease-free survival in lymph node-negative breast carcinomas. *J Surg Oncol* 2003;83(3):167-72.
138. Practice guidelines in oncology: Breast cancer [Página web de internet]. Washington: National Comprehensive Cancer Network. 2006 [citado abril 2010]. Disponible en: http://www.nccn.org/professionals/physician_gsl/PDF/breast.pdf
139. Peters GN, Wolff M, Haagensen CD. Tubular carcinoma of the breast. clinical pathologic correlations based on 100 cases. *Ann Surg* 1981;193(2):138-49.
140. Carter D, Orr SL, Merino MJ. Intracystic papillary carcinoma of the breast. after mastectomy, radiotherapy or excisional biopsy alone. *Cancer* 1983;52(1):14-9.
141. Komaki K, Sakamoto G, Sugano H, Morimoto T, Monden Y. Mucinous carcinoma of the breast in japan. A prognostic analysis based on morphologic features. *Cancer* 1988;61(5):989-96.
142. Fisher ER, Kenny JP, Sass R, Dimitrov NV, Siderits RH, Fisher B. Medullary cancer of the breast revisited. *Breast Cancer Res Treat* 1990;16(3):215-29.
143. Berg JW, Hutter RV. Breast cancer. *Cancer* 1995;75(1 Suppl):257-69.
144. Cui X, Schiff R, Arpino G, Osborne CK, Lee AV. Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. *J Clin Oncol* 2005 Oct 20;23(30):7721-7735.

145. Russo J, Russo IH. *Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. Lab Invest* 1987 Aug;57(2):112-137.
146. Anderson E. *The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. Breast Cancer Res* 2002;4(5):197-201.
147. Humphreys RC, Lydon JP, O'Malley BW, Rosen JM. *Use of PRKO mice to study the role of progesterone in mammary gland development. J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1997 Oct;2(4):343-354.
148. Anderson E, Clarke RB, Howell A. *Estrogen responsiveness and control of normal human breast proliferation. J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1998 Jan;3(1):23-35.
149. Parker MG. *Steroid and related receptors. Curr Opin Cell Biol* 1993 Jun;5(3):499-504.
150. McInerney EM, Weis KE, Sun J, Mosselman S, Katzenellenbogen BS. *Transcription activation by the human estrogen receptor subtype beta (ER beta) studied with ER beta and ER alpha receptor chimeras. Endocrinology* 1998 Nov;139(11):4513-4522.
151. Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR, Chambon P. *Functional domains of the human estrogen receptor. Cell* 1987 Dec 24;51(6):941-951.
152. Saji S, Jensen EV, Nilsson S, Rylander T, Warner M, Gustafsson JA. *Estrogen receptors alpha and beta in the rodent mammary gland. Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Jan 4;97(1):337-342.
153. Bocchinfuso WP, Korach KS. *Mammary gland development and tumorigenesis in estrogen receptor knockout mice. J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1997 Oct;2(4):323-334.
154. Allred DC, Mohsin SK, Fuqua SA. *Histological and biological evolution of human premalignant breast disease. Endocr Relat Cancer* 2001 Mar;8(1):47-61.
155. Clarke RB, Howell A, Potten CS, Anderson E. *Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast. Cancer Res* 1997 Nov 15;57(22):4987-4991.
156. Ruggiero RJ, Likis FE. *Estrogen: physiology, pharmacology, and formulations for replacement therapy. J Midwifery Womens Health* 2002 May-Jun;47(3):130-138.
157. Ascenzi P, Bocedi A, Marino M. *Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. Mol Aspects Med* 2006 Aug;27(4):299-402.
158. Chen GG, Zeng Q, Tse GM. *Estrogen and its receptors in cancer. Med Res Rev* 2008 Nov;28(6):954-974.
159. Beato M. *Gene regulation by steroid hormones. Cell* 1989 Feb 10;56(3):335-344.
160. Osborne CK, Schiff R. *Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. J Clin Oncol* 2005 Mar 10;23(8):1616-1622.
161. Schiff R, Massarweh SA, Shou J, Bharwani L, Mohsin SK, Osborne CK. *Cross-talk between estrogen receptor and growth factor pathways as a molecular target for overcoming endocrine resistance. Clin Cancer Res* 2004 Jan 1;10(1 Pt 2):331S-6S.
162. Levin ER. *Cellular Functions of the Plasma Membrane Estrogen Receptor. Trends Endocrinol Metab* 1999 Nov;10(9):374-377.

163. Pearce ST, Jordan VC. *The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. Crit Rev Oncol Hematol* 2004 Apr;50(1):3-22.
164. Ascenzi P, Bocedi A, Marino M. *Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. Mol Aspects Med* 2006 Aug;27(4):299-402.
165. Horwitz KB, Sheridan PL, Wei LL, Krett NL. *Human progesterone receptors: synthesis, structure, and phosphorylation. Prog Clin Biol Res* 1990;322:41-52.
166. Jacobsen BM, Richer JK, Schittone SA, Horwitz KB. *New human breast cancer cells to study progesterone receptor isoform ratio effects and ligand-independent gene regulation. J Biol Chem* 2002 Aug 2;277(31):27793-27800.
167. Richer JK, Jacobsen BM, Manning NG, Abel MG, Wolf DM, Horwitz KB. *Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. J Biol Chem* 2002 Feb 15;277(7):5209-5218.
168. Mulac-Jericevic B, Mullinax RA, DeMayo FJ, Lydon JP, Conneely OM. *Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. Science* 2000 Sep 8;289(5485):1751-1754.
169. Mulac-Jericevic B, Lydon JP, DeMayo FJ, Conneely OM. *Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Aug 19;100(17):9744-9749.
170. Condon JC, Hardy DB, Kovaric K, Mendelson CR. *Up-regulation of the progesterone receptor (PR)-C isoform in laboring myometrium by activation of nuclear factor-kappaB may contribute to the onset of labor through inhibition of PR function. Mol Endocrinol* 2006 Apr;20(4):764-775.
171. Pratt WB, Toft DO. *Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. Exp Biol Med (Maywood)* 2003 Feb;228(2):111-133.
172. Lange CA. *Integration of progesterone receptor action with rapid signaling events in breast cancer models. J Steroid Biochem Mol Biol* 2008 Feb;108(3-5):203-212.
173. Anderson E. *The role of estrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. Breast Cancer Res* 2002;4(5):197-201.
174. Lawson JS, Field AS, Champion S, Tran D, Ishikura H, Trichopoulos D. *Low estrogen receptor alpha expression in normal breast tissue underlies low breast cancer incidence in Japan. Lancet* 1999 Nov 20;354(9192):1787-1788.
175. Shoker BS, Jarvis C, Clarke RB, Anderson E, Hewlett J, Davies MP, et al. *Estrogen receptor-positive proliferating cells in the normal and precancerous breast. Am J Pathol* 1999 Dec;155(6):1811-1815.
176. McGuire WL. *Hormone receptors: their role in predicting prognosis and response to endocrine therapy. Semin Oncol* 1978 Dec;5(4):428-433.
177. Osborne CK, Zhao H, Fuqua SA. *Selective estrogen receptor modulators: structure, function, and clinical use. J Clin Oncol* 2000 Sep;18(17):3172-3186.

178. Elledge RM, Green S, Pugh R, Allred DC, Clark GM, Hill J, et al. Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR), by ligand-binding assay compared with ER, PgR and pS2, by immuno-histochemistry in predicting response to tamoxifen in metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. *Int J Cancer* 2000 Mar 20;89(2):111-117.
179. Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM. 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* 2003 May 15;21(10):1973-1979.
180. Baum M, Buzdar A, Cuzick J, Forbes J, Houghton J, Howell A, et al. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early-stage breast cancer: results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination) trial efficacy and safety update analyses. *Cancer* 2003 Nov 1;98(9):1802-1810.
181. Howell A, Cuzick J, Baum M, Buzdar A, Dowsett M, Forbes JF, et al. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet* 2005 Jan 1-7;365(9453):60-62.
182. Horwitz KB, Koseki Y, McGuire WL. Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer: role of estradiol and antiestrogen. *Endocrinology* 1978 Nov;103(5):1742-1751.
183. Bloom ND, Tobin EH, Schreiber B, Degenshein GA. The role of progesterone receptors in the management of advanced breast cancer. *Cancer* 1980 Jun 15;45(12):2992-2997.
184. Winqvist R, Hampton GM, Mannermaa A, Blanco G, Alavaikko M, Kiviniemi H, et al. Loss of heterozygosity for chromosome 11 in primary human breast tumors is associated with poor survival after metastasis. *Cancer Res* 1995 Jun 15;55(12):2660-2664.
185. Tomlinson IP, Nicolai H, Solomon E, Bodmer WF. The frequency and mechanism of loss of heterozygosity on chromosome 11q in breast cancer. *J Pathol* 1996 Sep;180(1):38-43.
186. Lapidus RG, Ferguson AT, Ottaviano YL, Parl FF, Smith HS, Weitzman SA, et al. Methylation of estrogen and progesterone receptor gene 5' CpG islands correlates with lack of estrogen and progesterone receptor gene expression in breast tumors. *Clin Cancer Res* 1996 May;2(5):805-810.
187. Cui X, Zhang P, Deng W, Oesterreich S, Lu Y, Mills GB, et al. Insulin-like growth factor-I inhibits progesterone receptor expression in breast cancer cells via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin pathway: progesterone receptor as a potential indicator of growth factor activity in breast cancer. *Mol Endocrinol* 2003 Apr;17(4):575-588.
188. Arpino G, Weiss H, Lee AV, Schiff R, De Placido S, Osborne CK, et al. Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *J Natl Cancer Inst* 2005 Sep 7;97(17):1254-1261.

189. Letessier A, Sircoulomb F, Ginestier C, Cervera N, Monville F, Gelsi-Boyer V, et al. Frequency, prognostic impact, and subtype association of 8p12, 8q24, 11q13, 12p13, 17q12, and 20q13 amplifications in breast cancers. *BMC Cancer* 2006 Oct 13;6:245.
190. Chin K, DeVries S, Fridlyand J, Spellman PT, Roydasgupta R, Kuo WL, et al. Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies. *Cancer Cell* 2006 Dec;10(6):529-541.
191. Creighton CJ, Kent Osborne C, van de Vijver MJ, Foekens JA, Klijn JG, Horlings HM, et al. Molecular profiles of progesterone receptor loss in human breast tumors. *Breast Cancer Res Treat* 2009 Mar;114(2):287-299.
192. Fisher B, Redmond C, Fisher ER, Caplan R. Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. *J Clin Oncol* 1988 Jul;6(7):1076-1087.
193. Hilsenbeck SG, Ravdin PM, de Moor CA, Chamness GC, Osborne CK, Clark GM. Time-dependence of hazard ratios for prognostic factors in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998;52(1-3):227-237.
194. Donegan WL. Prognostic factors. Stage and receptor status in breast cancer. *Cancer* 1992 Sep 15;70(6 Suppl):1755-1764.
195. Hull DF, Clark GM, Osborne CK, Chamness GC, Knight WA, McGuire WL. Multiple estrogen receptor assays in human breast cancer. *Cancer Res* 1983 Jan;43(1):413-416.
196. Gross GE, Clark GM, Chamness GC, McGuire WL. Multiple progesterone receptor assays in human breast cancer. *Cancer Res* 1984 Feb;44(2):836-840.
197. Balleine RL, Earl MJ, Greenberg ML, Clarke CL. Absence of progesterone receptor associated with secondary breast cancer in postmenopausal women. *Br J Cancer* 1999 Mar;79(9-10):1564-1571.
198. Treatment and side effects. *Breast Cancer* [Página web de internet]. Philadelphia. Breast Cancer.Org. 2008 [citado junio 2010]. Disponible en: <http://www.breastcancer.org/treatment/>
199. Recht A, Edge SB, Solin LJ, Robinson DS, Estabrook A, Fine RE, et al. Postmastectomy radiotherapy: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001 Mar 1;19(5):1539-1569.
200. Sauter G, Lee J, Bartlett JM, Slamon DJ, Press MF. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol* 2009 Mar 10;27(8):1323-1333.
201. Adjuvant treatment. Herceptin, trastuzumab. *Herceptin* [Página web de internet]. San Francisco. Genentech. 2008 [citado junio 2010]. Disponible en: <http://www.herceptin.com/adjuvant/what-is/index.jsp>
202. Middleton LP, Price KM, Puig P, Heydon LJ, Tarco E, Sneige N, et al. Implementation of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists HER2 Guideline Recommendations in a tertiary care facility increases HER2 immunohistochemistry and

- fluorescence in situ hybridization concordance and decreases the number of inconclusive cases. *Arch Pathol Lab Med* 2009 May;133(5):775-780.
203. Metcalfe KA. Oophorectomy for breast cancer prevention in women with BRCA1 or BRCA2 mutations. *Womens Health (Lond Engl)* 2009 Jan;5(1):63-68.
204. Love RR, Uy GB. Surgical oophorectomy for breast cancer: back to the future. *Future Oncol* 2008 Dec;4(6):785-792.
205. Osborne CK, Zhao H, Fuqua SA. Selective estrogen receptor modulators: structure, function, and clinical use. *J Clin Oncol* 2000 Sep;18(17):3172-3186.
206. Buckley MM, Goa KL. Tamoxifen. A reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use. *Drugs* 1989 Apr;37(4):451-490.
207. Lien EA, Solheim E, Ueland PM. Distribution of tamoxifen and its metabolites in rat and human tissues during steady-state treatment. *Cancer Res* 1991 Sep 15;51(18):4837-4844.
208. Dhingra K. Antiestrogens--tamoxifen, SERMs and beyond. *Invest New Drugs* 1999;17(3):285-311.
209. Ellis PA, Sacconi-Jotti G, Clarke R, Johnston SR, Anderson E, Howell A, et al. Induction of apoptosis by tamoxifen and ICI 182780 in primary breast cancer. *Int J Cancer* 1997 Aug 7;72(4):608-613.
210. Williams JK, Wagner JD, Li Z, Golden DL, Adams MR. Tamoxifen inhibits arterial accumulation of LDL degradation products and progression of coronary artery atherosclerosis in monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997 Feb;17(2):403-408.
211. Love RR, Mazess RB, Barden HS, Epstein S, Newcomb PA, Jordan VC, et al. Effects of tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women with breast cancer. *N Engl J Med* 1992 Mar 26;326(13):852-856.
212. Kristensen B, Ejlersen B, Dalgaard P, Larsen L, Holmegaard SN, Transbol I, et al. Tamoxifen and bone metabolism in postmenopausal low-risk breast cancer patients: a randomized study. *J Clin Oncol* 1994 May;12(5):992-997.
213. Fornander T, Rutqvist LE, Cedermark B, Glas U, Mattsson A, Silfversward C, et al. Adjuvant tamoxifen in early breast cancer: occurrence of new primary cancers. *Lancet* 1989 Jan 21;1(8630):117-120.
214. Fisher B, Costantino JP, Redmond CK, Fisher ER, Wickerham DL, Cronin WM. Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14. *J Natl Cancer Inst* 1994 Apr 6;86(7):527-537.
215. Marttunen MB, Hietanen P, Tiitinen A, Ylikorkala O. Comparison of effects of tamoxifen and toremifene on bone biochemistry and bone mineral density in postmenopausal breast cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1998 Apr;83(4):1158-1162.
216. Black LJ, Jones CD, Falcone JF. Antagonism of estrogen action with a new benzothioephene derived antiestrogen. *Life Sci* 1983 Feb 28;32(9):1031-1036.
217. Balfour JA, Goa KL. Raloxifene. *Drugs Aging* 1998 Apr;12(4):335-41; discussion 342.

218. Baum M. Current status of aromatase inhibitors in the management of breast cancer and critique of the NCIC MA-17 trial. *Cancer Control* 2004 Jul-Aug;11(4):217-221.
219. Carpenter R, Miller WR. Role of aromatase inhibitors in breast cancer. *Br J Cancer* 2005 Aug;93 Suppl 1:S1-5.
220. Cuzick J. Aromatase inhibitors for breast cancer prevention. *J Clin Oncol* 2005 Mar 10;23(8):1636-1643.
221. Wakeling AE. Use of pure antioestrogens to elucidate the mode of action of oestrogens. *Biochem Pharmacol* 1995 May 26;49(11):1545-1549.
222. Fisher B, Anderson S, Tan-Chiu E, Wolmark N, Wickerham DL, Fisher ER, et al. Tamoxifen and chemotherapy for axillary node-negative, estrogen receptor-negative breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-23. *J Clin Oncol* 2001 Feb 15;19(4):931-942.
223. Ferno M, Stal O, Baldetorp B, Hatschek T, Kallstrom AC, Malmstrom P, et al. Results of two or five years of adjuvant tamoxifen correlated to steroid receptor and S-phase levels. South Sweden Breast Cancer Group, and South-East Sweden Breast Cancer Group. *Breast Cancer Res Treat* 2000 Jan;59(1):69-76.
224. Lamy PJ, Pujol P, Thezenas S, Kramar A, Rouanet P, Guilleux F, et al. Progesterone receptor quantification as a strong prognostic determinant in postmenopausal breast cancer women under tamoxifen therapy. *Breast Cancer Res Treat* 2002 Nov;76(1):65-71.
225. Ellis MJ, Coop A, Singh B, Mauriac L, Llombert-Cussac A, Janicke F, et al. Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for ErbB-1- and/or ErbB-2-positive, estrogen receptor-positive primary breast cancer: evidence from a phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 2001 Sep 15;19(18):3808-3816.
226. Dowsett M, Harper-Wynne C, Boeddinghaus I, Salter J, Hills M, Dixon M, et al. HER-2 amplification impedes the antiproliferative effects of hormone therapy in estrogen receptor-positive primary breast cancer. *Cancer Res* 2001 Dec 1;61(23):8452-8458.
227. Mitelman F. *Catalog of chromosome aberrations in cancer*. Cuarta ed. New York: Wiley-Liss; 1991.
228. Rowley JD. *Cytogenetic analysis in leukemia and lymphoma: an introduction*. *Semin Hematol* 2000 Oct;37(4):315-319.
229. Patel AS, Hawkins AL, Griffin CA. *Cytogenetics and cancer*. *Curr Opin Oncol* 2000 Jan;12(1):62-67.
230. Lindblom A, Liljegren A. Regular review: tumour markers in malignancies. *BMJ* 2000 Feb 12;320(7232):424-427.
231. Chen Z, Morgan R, Berger CS, Sandberg AA. Application of fluorescence in situ hybridization in hematological disorders. *Cancer Genet Cytogenet* 1992 Oct 1;63(1):62-69.
232. Schrock E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996 Jul 26;273(5274):494-497.

233. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992 Oct 30;258(5083):818-821.
234. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998 Oct;20(2):207-211.
235. Pardue ML, Gall JG. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969 Oct;64(2):600-604.
236. Jones KW. Chromosomal and nuclear location of mouse satellite DNA in individual cells. *Nature* 1970 Mar 7;225(5236):912-915.
237. Gerhard DS, Kawasaki ES, Bancroft FC, Szabo P. Localization of a unique gene by direct hybridization in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981 Jun;78(6):3755-3759.
238. Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst* 1960 Jul;25:85-109.
239. Caspersson T, Zech L, Johansson C. Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp Cell Res* 1970 Jun;60(3):315-319.
240. Mitelman F, Mertens F, Johansson B. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat Genet* 1997 Apr;15 Spec No:417-474.
241. Thompson FH. *Cytogenetic Methods and findings in human solid tumors*. tercera ed. Barch M, Knutson T, Spurbeck JL, editores. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997:375-408.
242. Espinet B, Salido M, Solé F. Dossier del curso teórico-práctico de citogenética e hibridación in situ aplicada al diagnóstico hematológico. Barcelona: *Laboratori de Citogenètica Molecular*; 2005.
243. Teixeira MR, Pandis N, Heim S. Cytogenetic clues to breast carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 2002 Jan;33(1):1-16.
244. Espinet B, Salido M, Solé F. Dossier del curso Hibridación in situ fluorescente (FISH) aplicada al diagnóstico de los síndromes mielodisplásicos y otras neoplasias hematológicas. Barcelona: *Laboratori de Citogenètica Molecular*; 2009.
245. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998 Jul;4(7):844-847.
246. Skacel M, Skilton B, Pettay JD, Tubbs RR. Tissue microarrays: a powerful tool for high-throughput analysis of clinical specimens: a review of the method with validation data. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002 Mar;10(1):1-6.
247. Richani K, Romero R, Kim YM, Cushenberry E, Soto E, Han YM, et al. Tissue microarray: an effective high-throughput method to study the placenta for clinical and research purposes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2006 Aug;19(8):509-515.
248. Voduc D, Kenney C, Nielsen TO. Tissue microarrays in clinical oncology. *Semin Radiat Oncol* 2008 Apr;18(2):89-97.

249. Shergill IS, Shergill NK, Arya M, Patel HR. Tissue microarrays: a current medical research tool. *Curr Med Res Opin* 2004 May;20(5):707-712.
250. Jawhar NM. Tissue Microarray: A rapidly evolving diagnostic and research tool. *Ann Saudi Med* 2009 Mar-Apr;29(2):123-127.
251. Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet* 2001 Apr;10(7):657-662.
252. Giltmane JM, Rimm DL. Technology insight: Identification of biomarkers with tissue microarray technology. *Nat Clin Pract Oncol* 2004 Dec;1(2):104-111.
253. Rimm DL, Camp RL, Charette LA, Olsen DA, Provost E. Amplification of tissue by construction of tissue microarrays. *Exp Mol Pathol* 2001 Jun;70(3):255-264.
254. Mousses S, Bubendorf L, Wagner U, Hostetter G, Kononen J, Cornelison R, et al. Clinical validation of candidate genes associated with prostate cancer progression in the CWR22 model system using tissue microarrays. *Cancer Res* 2002 Mar 1;62(5):1256-1260.
255. Shergill IS, Shergill NK, Arya M, Patel HR. Tissue microarrays: a current medical research tool. *Curr Med Res Opin* 2004 May;20(5):707-712.
256. Breast Cancer Products [Página web de Internet]. Illinois. Abbott Laboratories. 2010 [citado febrero 2011]. Disponible en:
<http://www.abbottmolecular.com/products/oncology/fish/breast-cancer.html>
257. Torenbeek R, Hermsen MA, Meijer GA, Baak JP, Meijer CJ. Analysis by comparative genomic hybridization of epithelial and spindle cell components in sarcomatoid carcinoma and carcinosarcoma: histogenetic aspects. *J Pathol* 1999 Nov;189(3):338-343.
258. Bentz M, Plesch A, Stilgenbauer S, Dohner H, Lichter P. Minimal sizes of deletions detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1998 Feb;21(2):172-175.
259. du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schrock E, Popp S, Dohner H, et al. Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet* 1993 Feb;90(6):590-610.
260. Weiss MM, Hermsen MA, Meijer GA, van Grieken NC, Baak JP, Kuipers EJ, et al. Comparative genomic hybridisation. *Mol Pathol* 1999 Oct;52(5):243-251.
261. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 1997 Dec;20(4):399-407.
262. Ishkanian AS, Malloff CA, Watson SK, DeLeeuw RJ, Chi B, Coe BP, et al. A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. *Nat Genet* 2004 Mar;36(3):299-303.
263. Li J, Jiang T, Mao JH, Balmain A, Peterson L, Harris C, et al. Genomic segmental polymorphisms in inbred mouse strains. *Nat Genet* 2004 Sep;36(9):952-954.
264. Ylstra B, van den Ijssel P, Carvalho B, Brakenhoff RH, Meijer GA. BAC to the future! or oligonucleotides: a perspective for micro array comparative genomic hybridization (array CGH). *Nucleic Acids Res* 2006 Jan 26;34(2):445-450.

265. Pinkel D, Albertson DG. Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer. *Nat Genet* 2005 Jun;37 Suppl:S11-7.
266. Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Pergamenschikov A, Williams CF, et al. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet* 1999 Sep;23(1):41-46.
267. Mantripragada KK, Tapia-Paez I, Blennow E, Nilsson P, Wedell A, Dumanski JP. DNA copy-number analysis of the 22q11 deletion-syndrome region using array-CGH with genomic and PCR-based targets. *Int J Mol Med* 2004 Feb;13(2):273-279.
268. Dhami P, Coffey AJ, Abbs S, Vermeesch JR, Dumanski JP, Woodward KJ, et al. Exon array CGH: detection of copy-number changes at the resolution of individual exons in the human genome. *Am J Hum Genet* 2005 May;76(5):750-762.
269. Brennan C, Zhang Y, Leo C, Feng B, Cawwels C, Aguirre AJ, et al. High-resolution global profiling of genomic alterations with long oligonucleotide microarray. *Cancer Res* 2004 Jul 15;64(14):4744-4748.
270. Carvalho B, Ouwerkerk E, Meijer GA, Ylstra B. High resolution microarray comparative genomic hybridisation analysis using spotted oligonucleotides. *J Clin Pathol* 2004 Jun;57(6):644-646.
271. de Ravel TJ, Devriendt K, Fryns JP, Vermeesch JR. What's new in karyotyping? The move towards array comparative genomic hybridisation (CGH). *Eur J Pediatr* 2007 Jul;166(7):637-643.
272. Persson K, Pandis N, Mertens F, Borg A, Baldetorp B, Killander D, et al. Chromosomal aberrations in breast cancer: a comparison between cytogenetics and comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1999 Jun;25(2):115-122.
273. Struski S, Doco-Fenzy M, Cornillet-Lefebvre P. Compilation of published comparative genomic hybridization studies. *Cancer Genet Cytogenet* 2002 May;135(1):63-90.
274. van Beers EH, Nederlof PM. Array-CGH and breast cancer. *Breast Cancer Res* 2006;8(3):210.
275. Climent J, Garcia JL, Mao JH, Arsuaga J, Perez-Losada J. Characterization of breast cancer by array comparative genomic hybridization. *Biochem Cell Biol* 2007 Aug;85(4):497-508.
276. Nessling M, Richter K, Schwaenen C, Roerig P, Wrobel G, Wessendorf S, et al. Candidate genes in breast cancer revealed by microarray-based comparative genomic hybridization of archived tissue. *Cancer Res* 2005 Jan 15;65(2):439-447.
277. Shadeo A, Lam WL. Comprehensive copy number profiles of breast cancer cell model genomes. *Breast Cancer Res* 2006;8(1):R9.
278. Han W, Han MR, Kang JJ, Bae JY, Lee JH, Bae YJ, et al. Genomic alterations identified by array comparative genomic hybridization as prognostic markers in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer. *BMC Cancer* 2006 Apr 12;6:92.

279. Chin SF, Teschendorff AE, Marioni JC, Wang Y, Barbosa-Morais NL, Thorne NP, et al. High-resolution aCGH and expression profiling identifies a novel genomic subtype of ER negative breast cancer. *Genome Biol* 2007;8(10):R215.
280. Haverty PM, Fridlyand J, Li L, Getz G, Beroukhir R, Lohr S, et al. High-resolution genomic and expression analyses of copy number alterations in breast tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2008 Jun;47(6):530-542.
281. Fang M, Toher J, Morgan M, Davison J, Tannenbaum S, Claffey K. Genomic differences between estrogen receptor (ER)-positive and ER-negative human breast carcinoma identified by single nucleotide polymorphism array comparative genome hybridization analysis. *Cancer* 2010 Nov 29.
282. Eilers PH, de Menezes RX. Quantile smoothing of array CGH data. *Bioinformatics* 2005 Apr 1;21(7):1146-1153.
283. Salido M, Tusquets I, Corominas JM, Suarez M, Espinet B, Corzo C, et al. Polysomy of chromosome 17 in breast cancer tumors showing an overexpression of ERBB2: a study of 175 cases using fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *Breast Cancer Res* 2005;7(2):R267-73.
284. Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2005 Dec;4(12):988-1004.
285. Lambros MB, Natrajan R, Geyer FC, Lopez-Garcia MA, Dedes KJ, Savage K, et al. PPM1D gene amplification and overexpression in breast cancer: a qRT-PCR and chromogenic in situ hybridization study. *Mod Pathol* 2010 Oct;23(10):1334-1345.
286. Gururaj AE, Holm C, Landberg G, Kumar R. Breast cancer-amplified sequence 3, a target of metastasis-associated protein 1, contributes to tamoxifen resistance in premenopausal patients with breast cancer. *Cell Cycle* 2006 Jul;5(13):1407-1410.
287. Samanta AK, Huang HJ, Bast RC, Jr, Liao WS. Overexpression of MEKK3 confers resistance to apoptosis through activation of NFkappaB. *J Biol Chem* 2004 Feb 27;279(9):7576-7583.
288. Loo LW, Grove DI, Williams EM, Neal CL, Cousens LA, Schubert EL, et al. Array comparative genomic hybridization analysis of genomic alterations in breast cancer subtypes. *Cancer Res* 2004 Dec 1;64(23):8541-8549.
289. Hesson LB, Cooper WN, Latif F. Evaluation of the 3p21.3 tumour-suppressor gene cluster. *Oncogene* 2007 Nov 15;26(52):7283-7301.
290. Dammann R, Yang G, Pfeifer GP. Hypermethylation of the cpG island of Ras association domain family 1A (RASSF1A), a putative tumor suppressor gene from the 3p21.3 locus, occurs in a large percentage of human breast cancers. *Cancer Res* 2001 Apr 1;61(7):3105-3109.
291. Yang Q, Yoshimura G, Mori I, Sakurai T, Kakudo K. Chromosome 3p and breast cancer. *J Hum Genet* 2002;47(9):453-459.

292. Martinez A, Walker RA, Shaw JA, Dearing SJ, Maher ER, Latif F. Chromosome 3p allele loss in early invasive breast cancer: detailed mapping and association with clinicopathological features. *Mol Pathol* 2001 Oct;54(5):300-306.
293. Yang Q, Nakamura M, Nakamura Y, Yoshimura G, Suzuma T, Umemura T, et al. Two-hit inactivation of FHIT by loss of heterozygosity and hypermethylation in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002 Sep;8(9):2890-2893.
294. Guler G, Huebner K, Himmetoglu C, Jimenez RE, Costinean S, Volinia S, et al. Fragile histidine triad protein, WW domain-containing oxidoreductase protein Wwox, and activator protein 2gamma expression levels correlate with basal phenotype in breast cancer. *Cancer* 2009 Feb 15;115(4):899-908.
295. Rocco JW, Sidransky D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res* 2001 Mar 10;264(1):42-55.
296. Fahraeus R, Lane DP. The p16(INK4a) tumour suppressor protein inhibits alphavbeta3 integrin-mediated cell spreading on vitronectin by blocking PKC-dependent localization of alphavbeta3 to focal contacts. *EMBO J* 1999 Apr 15;18(8):2106-2118.
297. Harada H, Nakagawa K, Iwata S, Saito M, Kumon Y, Sakaki S, et al. Restoration of wild-type p16 down-regulates vascular endothelial growth factor expression and inhibits angiogenesis in human gliomas. *Cancer Res* 1999 Aug 1;59(15):3783-3789.
298. Plath T, Detjen K, Welzel M, von Marschall Z, Murphy D, Schirner M, et al. A novel function for the tumor suppressor p16(INK4a): induction of anoikis via upregulation of the alpha(5)beta(1) fibronectin receptor. *J Cell Biol* 2000 Sep 18;150(6):1467-1478.
299. Reynolds PA, Sigaroudinia M, Zardo G, Wilson MB, Benton GM, Miller CJ, et al. Tumor suppressor p16INK4A regulates polycomb-mediated DNA hypermethylation in human mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 2006 Aug 25;281(34):24790-24802.
300. Royds JA, Iacopetta B. P53 and Disease: when the Guardian Angel Fails. *Cell Death Differ* 2006 Jun;13(6):1017-1026.
301. Ou YH, Chung PH, Hsu FF, Sun TP, Chang WY, Shieh SY. The candidate tumor suppressor BTG3 is a transcriptional target of p53 that inhibits E2F1. *EMBO J* 2007 Sep 5;26(17):3968-3980.
302. Yu J, Zhang Y, Qi Z, Kurtycz D, Vacano G, Patterson D. Methylation-mediated downregulation of the B-cell translocation gene 3 (BTG3) in breast cancer cells. *Gene Expr* 2008;14(3):173-182.
303. Huang G, Krig S, Kowbel D, Xu H, Hyun B, Volik S, et al. ZNF217 suppresses cell death associated with chemotherapy and telomere dysfunction. *Hum Mol Genet* 2005 Nov 1;14(21):3219-3225.
304. Quinlan KG, Verger A, Yaswen P, Crossley M. Amplification of zinc finger gene 217 (ZNF217) and cancer: when good fingers go bad. *Biochim Biophys Acta* 2007 Jun;1775(2):333-340.
305. Ellinger-Ziegelbauer H, Brown K, Kelly K, Siebenlist U. Direct activation of the stress-activated protein kinase (SAPK) and extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)

- pathways by an inducible mitogen-activated protein Kinase/ERK kinase kinase 3 (MEKK) derivative. *J Biol Chem* 1997 Jan 31;272(5):2668-2674.
306. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999 Nov 22;18(49):6853-6866.
307. Huang S, DeGuzman A, Bucana CD, Fidler IJ. Nuclear factor-kappaB activity correlates with growth, angiogenesis, and metastasis of human melanoma cells in nude mice. *Clin Cancer Res* 2000 Jun;6(6):2573-2581.
308. Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 2002 Mar;3(3):221-227.
309. Boone DL, Lee EG, Libby S, Gibson PJ, Chien M, Chan F, et al. Recent advances in understanding NF-kappaB regulation. *Inflamm Bowel Dis* 2002 May;8(3):201-212.
310. Lin A, Karin M. NF-kappaB in cancer: a marked target. *Semin Cancer Biol* 2003 Apr;13(2):107-114.
311. Reddy KB, Nabha SM, Atanaskova N. Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 2003 Dec;22(4):395-403.
312. Chang F, Steelman LS, Lee JT, Shelton JG, Navolanic PM, Blalock WL, et al. Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia* 2003 Jul;17(7):1263-1293.
313. Heinonen H, Nieminen A, Saarela M, Kallioniemi A, Klefstrom J, Hautaniemi S, et al. Deciphering downstream gene targets of PI3K/mTOR/p70S6K pathway in breast cancer. *BMC Genomics* 2008 Jul 24;9:348.
314. Barlund M, Monni O, Kononen J, Cornelison R, Torhorst J, Sauter G, et al. Multiple genes at 17q23 undergo amplification and overexpression in breast cancer. *Cancer Res* 2000 Oct 1;60(19):5340-5344.
315. Monni O, Barlund M, Mousses S, Kononen J, Sauter G, Heiskanen M, et al. Comprehensive copy number and gene expression profiling of the 17q23 amplicon in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 May 8;98(10):5711-5716.
316. Barlund M, Forozan F, Kononen J, Bubendorf L, Chen Y, Bittner ML, et al. Detecting activation of ribosomal protein S6 kinase by complementary DNA and tissue microarray analysis. *J Natl Cancer Inst* 2000 Aug 2;92(15):1252-1259.
317. Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, Sieuwerts AM, Look MP, Yang F, et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* 2005 Feb 19-25;365(9460):671-679.
318. Miller LD, Smeds J, George J, Vega VB, Vergara L, Ploner A, et al. An expression signature for p53 status in human breast cancer predicts mutation status, transcriptional effects, and patient survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Sep 20;102(38):13550-13555.

