

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

**Utilidad de las células tumorales circulantes en la predicción de la
respuesta al tratamiento en cáncer de mama metastásico**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Sara Custodio Cabello

Directores

Miguel Martínez Jiménez
Eduardo Díaz-Rubio García

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA**



**UTILIDAD DE LAS CÉLULAS TUMORALES
CIRCULANTES EN LA PREDICCIÓN DE LA
RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN CÁNCER DE
MAMA METASTÁSICO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Sara Custodio Cabello

Bajo la dirección de los doctores

Miguel Martín Jiménez

Eduardo Díaz-Rubio García

MADRID, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

TESIS DOCTORAL

**UTILIDAD DE LAS CÉLULAS TUMORALES
CIRCULANTES EN LA PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA
AL TRATAMIENTO EN CÁNCER DE MAMA
METASTÁSICO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Sara Custodio Cabello

Bajo la dirección de los doctores

Miguel Martín Jiménez

Eduardo Díaz-Rubio García

MADRID, 2014

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría en las siguientes líneas expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar agradecer a mis tutores la oportunidad y el apoyo recibido para crecer profesionalmente a través de este proyecto. Por una parte al Prof. Miguel Martín por su confianza y por su gran ayuda en cada paso que he dado desarrollando esta tesis, y por otra parte al Prof. Eduardo Díaz-Rubio por todos sus consejos.

Al Servicio de Oncología Médica del Hospital Clínico San Carlos, en especial a José Ángel García-Sáenz y a Julio-César de la Torre y al Servicio de Análisis Clínicos, en especial a María Luisa Maestro de las Casas, por su trabajo y su amabilidad.

A mis compañeros del Servicio de Oncología Médica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón por su estímulo constante y por su cariño. A Sara López-Tarruella por permitirme haber aprendido tanto de ella, y a Andrés Muñoz por haberme ayudado siempre. A José Ángel Arranz, Pilar Sabin y Cristina López por dejarme seguir aprendiendo con ellos.

A Sara Pérez, Ana Belén, Mercedes y Beatriz, que han sido mis compañeras y mis amigas todos estos años y por su apoyo incondicional sin el que no podría ser la oncóloga que espero llegar a ser.

Por último a mis padres y a mis hermanos porque además de invertir en mi educación como médico han invertido en mi educación como persona. A Eduardo que va a acompañarme el resto de mi vida.

1. ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	5
1. ÍNDICE	7
2. ABREVIATURAS.....	13
3. INTRODUCCIÓN	17
3.1 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA.....	19
3.1.1 Incidencia, prevalencia y mortalidad por cáncer de mama.....	19
3.1.2 Epidemiología del cáncer de mama metastásico.	22
3.2 BIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA.....	23
3.2.1 Morfología del cáncer de mama.....	23
3.2.2. Factores pronósticos y predictivos en cáncer de mama metastásico.	25
3.3 TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA METASTÁSICO.....	31
3.3.1 Principios generales del tratamiento del cáncer de mama metastásico.	31
3.3.2 Tratamiento específico de cáncer de mama metastásico en función de subtipos histológicos.	35
3.4 PRONÓSTICO DE CÁNCER DE MAMA METASTÁSICO.	39
3.4.1 Aspectos generales del pronóstico en cáncer de mama metastásico.	39
3.4.2 Modelos predictivos integrados.	39
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	41
5. MATERIAL Y MÉTODOS	45
5.1 SELECCIÓN DE LA MUESTRA	47
5.2 PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO.....	48
5.3 SELECCIÓN DE LAS VARIABLES A ESTUDIO	50
5.4 TAMAÑO MUESTRAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	52

6. RESULTADOS	55
6.1 DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA INCLUIDA EN EL ANÁLISIS FINAL DEL ESTUDIO.....	58
6.1.1 Características demográficas.....	59
6.1.2 Características del tumor.	59
6.1.3 Características de la diseminación metastásica del tumor.....	59
6.1.4 Características relacionadas con los tratamientos recibidos.....	60
6.2 CUANTIFICACIÓN DE CTCS.....	61
6.3 RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON QUIMIOTERAPIA.....	62
6.4 SEGUIMIENTO, SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN Y SUPERVIVENCIA GLOBAL.....	63
6.4.1. Seguimiento.	63
6.4.2 Supervivencia libre de progresión.	63
6.4.3 Supervivencia global.	64
6.5 CORRELACIÓN ENTRE EL NÚMERO DE CTCS CUANTIFICADO EN EL DÍA 21 (CTC-21) Y AL INICIO DEL ESTUDIO (CTC-0) CON LA SUPERVIVENCIA GLOBAL.....	66
6.5.1 Correlación CTC-21 y supervivencia global.	66
6.5.2 Correlación CTC-0 y supervivencia global	66
6.5.3 Analisis multivariante de factores predictores de supervivencia global	67
6.6 CORRELACIÓN ENTRE EL NÚMERO DE CTCS CUANTIFICADO EN EL DÍA 21 (CTC-21) Y AL INICIO DEL ESTUDIO (CTC-0) CON LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN.....	69
6.6.1 Correlación CTC día 21 (CTC-21) y supervivencia libre de progresión.	69
6.6.2 Correlación CTC-0 y supervivencia libre de progresión.	70

6.6.3 Análisis multivariante de factores predictores de supervivencia libre de progresión.	70
6.7 CORRELACIÓN NÚMERO DE CTCs CON LA RESPUESTA OBJETIVA AL TRATAMIENTO RECIBIDO.	72
6.7.1 Correlación CTC-0 con la respuesta objetiva al tratamiento con quimioterapia.....	72
6.7.2 Correlación CTC-21 con la respuesta objetiva al tratamiento con quimioterapia.....	75
7. ANÁLISIS ADICIONALES	79
7.1 CORRELACIÓN ENTRE SUPERVIVENCIA GLOBAL Y SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN CON EL NÚMERO DE CTCs DETECTADO TANTO EN EL DÍA 21 (CTC-21) COMO DE FORMA BASAL (CTC-0) ESTRATIFICADO EN 3 GRUPOS (0 VS 1-4 VS 5 O MÁS).	81
7.1.1. Correlación CTC-21 (0 vs 1-4 vs 5 o más) con supervivencia global.	81
7.1.2. Correlación CTC-0 (0 vs 1-4 vs 5 o más) con supervivencia global.	82
7.1.3. Correlación CTC-21 (0 vs 1-4 vs 5 o más) con supervivencia libre de progresión.	82
7.1.4. Correlación CTC-0 (0 vs 1-4 vs 5 o más) con supervivencia libre de progresión.	84
7.2. SUPERVIVENCIA GLOBAL Y SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN EN FUNCIÓN DE LA TRANSFORMACIÓN DE CTCs.	85
7.2.1 Supervivencia global en función de la transformación de CTCs.	85
7.2.2. Supervivencia libre de progresión en función de la transformación de CTCs.....	86
7.3 SUPERVIVENCIA GLOBAL EN FUNCIÓN DEL NÚMERO DE CTCs EN EL DÍA 21 Y SOBREEXPRESIÓN O ASUENCIA DE HER-2.....	87

7.3.1 Supervivencia global en función del número de CTCs en el día 21 en pacientes HER2 positivas.....	87
7.3.2 Supervivencia global en función del número de CTCs en el día 21 en pacientes HER2 negativas.....	88
8. DISCUSIÓN	91
8.1 NÚMERO DE CTCs TRAS HABER INICIADO EL TRATAMIENTO CON QUIMIOTERAPIA COMO FACTOR PREDICTIVO DE LA EVOLUCIÓN DE LAS PACIENTES.....	93
8.2 IMPACTO DE LA CUANTIFICACIÓN DE CTCs DESCRITO EN LA LITERATURA.....	94
8.3 LIMITACIONES DE NUESTRO ESTUDIO Y CARACTERÍSTICAS DE NUESTRA POBLACIÓN MUESTRAL.....	102
9. CONCLUSIONES.....	105
10. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	109
10.1 ÍNDICE DE FIGURAS.....	111
10.2 ÍNDICE DE TABLAS.....	113
11. BIBLIOGRAFÍA.....	115
12. SUMMARY.....	137

2. ABREVIATURAS

IARC: Agencia Internacional de Investigación del Cáncer.
CM: Cáncer de mama.
GEICAM: Grupo Español de Investigación en Cáncer de Mama.
OMS: Organización Mundial de la Salud.
CDI NOS: Carcinomas ductales infiltrantes “non otherwise specific”.
RE: Receptores estrogénicos.
ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group.
CMM: Cáncer de mama metastásico.
SG: Supervivencia global.
LDH: Lactato deshidrogenasa.
GC: Ganglio centinela.
RP: Receptores de progesterona.
IHQ: Inmunohistoquímica.
FISH: Fluorescent In Situ Hybridization.
CISH: Chromogenic In Situ Hybridization.
uPA: urokinase plasminogen activator.
uPAR urokinase plasminogen activator receptor.
PAI-1: Plasminogen activator inhibitor type I.
ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.
TP53: Tumor protein P53.
CTCs: Células tumorales circulantes.
EpCam: Epithelial cell adhesion molecule.
FDA: US Food and Drug Administration.
cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario.
DNA: Ácido desoxirribonucleico.
RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction.
RS: Recurrence score.
ARN: Ácido ribonucleico.
ROR: Risk of relapse.
RT-qPCR: Real time quantitative polymerase chain reaction.
LHRH: Hormona liberadora hormona luteinizante.
mTOR: mammalian Target of Rapamycin.
PARP: poli-adenosil-ribosa-fosfato.
EMA: Agencia Europea del Medicamento.

SLP: Supervivencia libre de progresión.
TC: Tomografía Computarizada.
RECIST: Response Evaluation Criteria in Solid Tumors.
AST: Aspartato aminotransferasa.
ALT: Alanina aminotransferasa.
HB: Hemoglobina.
QT: Quimioterapia.
PS: Performance Status.
CTC-0: Células tumorales circulantes basales.
CTC-21: Células tumorales circulantes en el día 21.
EDTA: Acido etilendiaminotetraacético.
DAPI: 4'6-diaminodino-2-phenylindole
CK: Citoqueratinas
HR: Hazard ratio.
Enf.: Enfermedad.
Núm.: Número.
RC: Respuesta completa.
RP: Respuesta parcial.
EE: Enfermedad estable.
PET-TC: Positron Emission Tomography/Computed Tomography.
SP: Sangre periférica.
OR: Odds ratio.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA

3.1.1 Incidencia, prevalencia y mortalidad por cáncer de mama.

El cáncer de mama es la primera causa de muerte por cáncer en la mujer y el tumor más frecuente en las mujeres de todo el mundo (a excepción de los tumores de piel no melanomas). La frecuencia de la enfermedad en la población mundial, así como la repercusión que tiene en la vida de las mujeres afectadas y en los sistemas sanitarios que las atienden, hacen que el cáncer de mama femenino sea un importante problema de salud pública.

El proyecto GLOBOCAN¹, desarrollado por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC), presenta las estimaciones de incidencia, mortalidad y prevalencia a nivel mundial del cáncer en 184 países. Dicho proyecto definió que anualmente se diagnosticaban 1,38 millones de nuevos casos de cáncer de mama (CM) en el mundo, representando el 23% de todos los cánceres en mujeres, siendo el segundo en frecuencia al considerar todos los tumores en ambos sexos (10,9% de todos los cánceres).

Es el cáncer más común tanto en mujeres en países desarrollados como aquellos en vías de desarrollo. Las tasas de incidencia varían de 19,3/100.000 mujeres en el Este de África, al 89,7/100.000 mujeres en el Oeste de Europa. Las tasas de incidencia más altas (>80/100.000 mujeres) se da en países desarrollados (excepto Japón) y las tasas más bajas (<40/100.000 casos) se da en la mayoría de los países en vías de desarrollo (Figura 1).

Estimated numbers (thousands)	Cases	Deaths	5-year prev.
World	1384	458	5189
More developed regions	692	189	2808
Less developed regions	691	269	2380
WHO Africa region (AFRO)	68	37	216
WHO Americas region (PAHO)	320	82	1272
WHO East Mediterranean region (EMRO)	61	31	215
WHO Europe region (EURO)	450	139	1770
WHO South-East Asia region (SEARO)	203	93	630
WHO Western Pacific region (WPRO)	279	73	1081
IARC membership (22 countries)	740	214	2865
United States of America	182	40	761
China	169	44	631
India	115	53	315
European Union (EU-27)	332	89	1329

International Agency for Research on Cancer

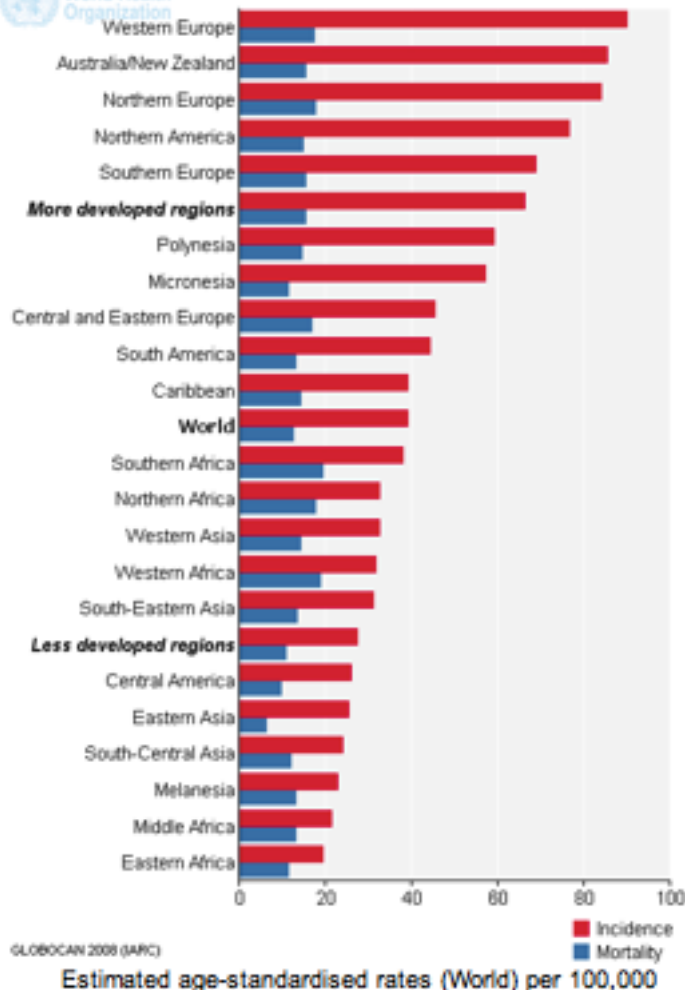


Figura 1. Tasas estandarizadas por edad de incidencia y mortalidad de cáncer de mama por 100.000 mujeres en las distintas zonas geográficas. GLOBOCAN 2008.

En cuanto a nuestro país, se estima que se diagnostican en España unos 22.000 casos nuevos cada año y mueren unas 6.000 mujeres por esta causa². Su incidencia está aumentando un 2-3% anual. En España, la tasa de

incidencia estandarizada por edad es de 61 por 100.000 mujeres/año, ocupando una posición intermedia entre los países Europeos que presentan desde una tasa de 109,2 por 100.000 mujeres-año en Bélgica a 36,5 por 100.000 mujeres-año en Bosnia-Herzegovina (Figura 2.)

BREAST - ESTIMATED INCIDENCE, ALL AGES				
POPULATION	Numbers	Crude Rate	ASR (W)	Cumulative risk
Belgium	9658	178.7	109.2	11.39
Denmark	4696	170.5	101.1	11.25
France (metropolitan)	51012	160.0	99.7	10.74
The Netherlands	13151	157.7	98.5	10.52
Iceland	204	131.8	95.5	10.22
Ireland	2754	124.3	93.9	9.88
Switzerland	5918	153.5	89.4	9.77
United Kingdom	46458	148.8	89.1	9.49
Finland	4111	152.0	86.3	9.40
Italy	47514	155.2	86.3	9.19
Luxembourg	334	137.8	82.3	8.20
Germany	64147	152.9	81.8	8.74
Sweden	6294	135.7	79.4	8.76
Norway	2735	114.0	73.5	7.86
Malta	250	122.2	72.2	7.60
Czech Republic	6486	123.2	70.9	7.91
Cyprus	423	95.5	67.5	7.49
Slovenia	1164	112.9	64.9	7.04
Croatia	2623	114.4	64.0	6.94
Austria	4665	109.1	62.1	6.65
Spain	22027	97.6	61.0	6.45
Portugal	5333	96.8	60.0	6.24
Serbia	4384	88.2	57.1	6.41
Hungary	5218	99.2	56.8	6.01
Bulgaria	3729	95.2	55.5	5.90
FYR Macedonia	750	73.4	53.5	5.70
Slovakia	2335	84.0	53.4	5.92
Estonia	635	87.8	50.2	5.56
Montenegro	228	72.0	50.0	5.48
Poland	15571	79.0	48.9	5.51
Albania	895	56.3	48.2	5.19
Latvia	1031	84.6	47.9	5.32
Lithuania	1396	78.9	46.4	5.10
Romania	7929	72.3	45.4	4.98
Russian Federation	52469	69.0	43.2	4.78
Belarus	3387	65.4	42.2	4.56
Greece	4349	77.4	41.4	4.27
Ukraine	16366	66.0	40.0	4.47
Republic of Moldova	1083	56.8	38.7	4.47
Bosnia Herzegovina	1100	56.2	36.5	4.01

Figura 2. Tasa de incidencia estandarizada por edad en cáncer de mama por cada 100.000 mujeres en los diferentes países Europeos.

Hay que destacar, que pese al aumento de incidencia, se ha dado un salto importante en nuestro país, incrementando en más de 10 puntos las expectativas de supervivencia del cáncer de mama. La supervivencia a 5 años observada en el proyecto El Álamo II³, desarrollado por el grupo GEICAM, en el que se incluyeron más de 10.000 mujeres españolas diagnosticadas de cáncer de mama en hospitales españoles entre 1994 y 1997, fue 82,8%, frente al 73%

observado entre 1990 y 1993. Este aumento en la supervivencia media se debe posiblemente tanto al esfuerzo en la mejoría de las medidas diagnóstico-terapéuticas, llevando a cabo un diagnóstico más temprano, como al desarrollo y aplicación de tratamientos más eficaces.

La evolución divergente de la incidencia y la mortalidad, ha supuesto un aumento considerable del número de casos prevalentes (prevalencia estimada a 5 años en España es de 69.993 casos)⁴, con el aumento que esto conlleva en cuanto a carga de enfermedad que soporta la población y los servicios asistenciales, convirtiendo el cáncer de mama en un problema de salud pública de primera magnitud en nuestro país.

3.1.2 Epidemiología del cáncer de mama metastásico.

A pesar de los programas de cribado poblacionales y del mayor conocimiento de la enfermedad, un 5-10% de las pacientes que son diagnosticadas de cáncer de mama, presentan afectación metastásica al diagnóstico, y en torno a un 20% de las pacientes con afectación local tratadas con intención curativa desarrollarán metástasis en los primeros 5 años de evolución de la enfermedad⁵.

En este estadio, el objetivo terapéutico principal en la mayor parte de los casos no es la curación, sino prolongar la vida y controlar la sintomatología secundaria a la enfermedad. A medida que ha ido aumentando el conocimiento sobre la biología y genómica de la enfermedad, así como el desarrollo y comercialización de terapias sistémicas dirigidas y más eficaces, la supervivencia de las pacientes con enfermedad metastásica ha ido aumentando progresivamente, sobre todo a lo largo de la última década. Actualmente la supervivencia global estimada es de 18-24 meses tras el diagnóstico de enfermedad metastásica, aunque puede variar bastante en función de las características biológicas del tumor así como la cantidad de carga tumoral y la localización de la afectación metastásica, siendo mayor en pacientes con enfermedad hormon sensible o pacientes con sobreexpresión

de Her2 tratadas con fármacos específicos anti-HER2 y en aquellas pacientes con afectación metastásica ganglionar o pulmonar.

3.2 BIOLOGIA DEL CÁNCER DE MAMA

3.2.1 Morfología del cáncer de mama.

En el estudio del cáncer de mama, el examen macroscópico de la muestra así como su posterior análisis microscópico, junto a las técnicas de inmunohistoquímica y estudio de marcadores biológicos como receptores hormonales y la sobreexpresión de Her2, son imprescindibles para determinar con exactitud el diagnóstico de la entidad.

En primer lugar la valoración macroscópica debe incluir la descripción de la lesión, su tamaño y localización, la evaluación de los márgenes de resección en las piezas quirúrgicas, y la selección de las muestras que serán preservadas y procesadas para su estudio microscópico.

El examen microscópico evalúa las características morfológicas de las células (tamaño y características de la cromatina y del núcleo, su relación con el citoplasma, presencia de mitosis, etc...), su disposición y patrón de crecimiento y su relación con las estructuras normales de los tejidos.

Existen una serie de parámetros clave en la evaluación morfológica en el diagnóstico de cáncer de mama. Estos parámetros se recogen en la escala de Scarff-Bloom-Richardson y fueron modificadas por Elson y Ellis (Nottingham)⁶. De forma general, se cuantifican tres aspectos en la diferenciación del tumor: la capacidad del tumor de formar estructuras tubulares, el grado de pleomorfismo o atipia de las células tumorales y el número de mitosis presentes en 10 campos microscópicos. Cada una de estas variables se gradúa de 1 a 3 y la combinación de los tres factores establece una escala de 3 hasta 9 que define el grado histológico del tumor (puntuaciones 3,4 y 5 se corresponde a tumores de bajo grado, puntuaciones 6 y 7 a aquellos de grado intermedio y puntuaciones 8 y 9 a tumores de alto grado y comportamiento agresivo).

Es fundamental además, aparte de la valoración del grado histológico, definir el diagnóstico morfológico, clasificando el tumor en uno de los subtipos de cáncer de mama recogidos en la clasificación de la OMS⁷, ya que cada subtipo presenta una conducta biológica distinta. De esta forma los carcinomas infiltrantes de mama con un pronóstico excelente (supervivencia a los 10 años mayor de 80%) son: los carcinomas de tipo tubular puro, cribiforme, mucinoso, carcinoma metaplásico con componente tipo fibromatosis y carcinoma adenoide quístico, carcinomas túbulo-lobulillares, y los carcinomas papilares. Tienen un buen pronóstico (supervivencia a 10 años del 60-80%): carcinoma tubular mixto y el lobulillar clásico. Los carcinomas medulares, que tradicionalmente se clasificaban como de buen pronóstico, en algunos estudios recientes no han demostrado una diferencia significativa en la supervivencia, con respecto a otros carcinomas ductales infiltrantes “non otherwise specific” (CDI NOS), y por tanto actualmente se deben considerar como de pronóstico intermedio (supervivencia a 10 años del 50%-60%), al igual que las variantes sólida, alveolar, túbulo-lobulillar, de células en anillo de sello e histiocitoide del carcinoma lobulillar. El carcinoma secretor de mama tiene muy buen pronóstico cuando se presenta en niños, pero un pronóstico similar al de otros CDI NOS cuando se ve en adultos. Existen variantes muy poco frecuentes y de pronóstico incierto como cistadenocarcinoma mucinoso y carcinoma mucinoso de células columnares de mama, carcinoma rico en lípidos, el carcinoma oncocítico, el carcinoma de células acinares y el carcinoma sebáceo. Tienen un mal pronóstico (supervivencia a 10 años menor del 50%) los carcinomas lobulillares pleomórficos y los CDI NOS. Tienen todavía peor pronóstico el micropapilar, neuroendocrino de tipo oat-cell, carcinoma de células claras, carcinoma inflamatorio, y carcinoma rico en glucógeno. Dentro de los carcinomas metaplásicos de la mama, los carcinosarcomas se comportan como tumores muy agresivos. El carcinoma pleomórfico es una variante más agresiva del CDI NOS, en el que al menos el 50% de las células tumorales muestra una morfología de células gigantes, pleomórficas, fusocelular o escamosa.

3.2.2. Factores pronósticos y predictivos en cáncer de mama metastásico.

En las últimas décadas, el manejo y tratamiento de las pacientes con cáncer de mama, ha experimentado muchos cambios, pudiendo ofrecer una gran variedad de opciones terapéuticas, locales y sistémicas. Conocer la información tanto histológica como molecular relevante, desde el punto de vista pronóstico y predictivo de respuesta al tratamiento, es imprescindible para elegir en cada paciente la opción terapéutica más adecuada.

3.2.2.1 Factores clínicos:

- **EDAD:** Se han realizado numerosos estudios sobre el efecto de la edad en el pronóstico de pacientes con cáncer de mama. Algunos de ellos detectaron una disminución de la supervivencia para pacientes jóvenes⁸, mientras que en otros el pronóstico empeoraba con el incremento de la edad^{9 10}. Aunque los datos son controvertidos, sí que parece que la edad puede influir en el pronóstico de forma indirecta, es decir, a través de otros factores que sí condicionan la supervivencia. De esta forma, se ha descrito en pacientes mayores de 55 años un comportamiento biológico menos agresivo de los tumores, y por lo tanto un pronóstico más favorable¹¹, con tumores con un mayor contenido de RE¹², baja tasa de proliferación celular, expresión normal de la P53 y ausencia de expresión del receptor para el factor de crecimiento epidérmico y c-erB-2¹³. Asimismo, en las pacientes más jóvenes se ha descrito un mayor porcentaje de tumores histológicamente indiferenciados, una mayor invasión de vasos linfáticos, asociado con un incremento en el riesgo de recidiva local y a distancia¹⁴, y una disminución en la prevalencia de RE positivos¹⁵.
- **ESTADO FUNCIONAL:** El valor de escalas como la escala ECOG o el índice de Karnofsky, que evalúan el impacto que la enfermedad ejerce sobre las capacidades de la vida diaria del paciente, es más notorio en fases avanzadas de la enfermedad¹⁶. En varios estudios se ha

destacado el valor pronóstico independiente del estado funcional en CMM en cuanto a SG^{17 18}.

- **ESTADO MENOPAUSICO:** El análisis de esta variable como factor pronóstico de forma aislada es difícil ya que está altamente relacionada con la edad. Se ha descrito una mayor supervivencia libre de enfermedad en pacientes postmenopáusicas respecto a las premenopáusicas¹⁹, pero no se han demostrado diferencias significativas en cuanto a supervivencia global^{20 21}.
- **LOCALIZACIÓN METÁSTASIS:** La relevancia pronóstica de esta variable está establecida tras numerosos estudios^{22 23 24}. De esta forma aquellas pacientes que presentan únicamente metástasis óseas, presentan mejor pronóstico²⁵, con una evolución más prolongada y mayores índices de respuesta a hormonoterapia, dada la frecuente expresión de receptores hormonales en pacientes cuya única afectación a distancia es la ósea²⁶. Por otra parte, aquellas pacientes con afectación visceral, clásicamente han sido definidas como pacientes con mal pronóstico²⁷, siendo necesario en la actualidad realizar puntualizaciones respecto a esto, ya que se han descrito determinados subgrupos que se pueden beneficiar de tratamientos multidisciplinarios mejorando su supervivencia^{28 29} y subgrupos con localizaciones metastásicas con una mejor evolución clínica como son aquellas pacientes con metástasis pulmonares de forma nodular³⁰.
- **NÚMERO DE LOCALIZACIONES METASTÁSICAS:** La carga tumoral metastásica se ha correlacionado con el pronóstico de la enfermedad diseminada en algunos estudios pero no de forma unánime^{31 32 33}.
- **NIVELES DE LDH SERICA:** La presencia de niveles séricos altos de esta enzima ha sido descrita de forma clásica como marcador pronóstico de supervivencia en cáncer de mama metastásico³⁴, aunque también se puede encontrar elevada en procesos no neoplásicos.

3.2.2.2 Factores histológicos

- TIPO HISTOLÓGICO Y GRADO HISTOLÓGICO: Son factores pronósticos de categoría I³⁵ en enfermedad limitada pero su papel pronóstico o predictivo en enfermedad metastásica es controvertido, no incluyéndose en la mayoría de los trabajos, de forma habitual ninguna de las dos variables en los modelos multivariantes³⁶.
- TAMAÑO TUMORAL (CLASIFICACIÓN TNM): Es el factor pronóstico más importante tras la afectación ganglionar, en enfermedad localizada³⁷, pero en el caso de enfermedad metastásica su papel como factor pronóstico no está claramente definido.³⁸
- AFECTACIÓN GANGLIONAR: El número de ganglios afectados por el tumor es el factor pronóstico aislado más significativo en el cáncer de mama en los estadios precoces³⁹. De la afectación ganglionar metastásica y del número de ganglios afectos, depende la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global de estas pacientes⁴⁰. Sin embargo, pese a que la afectación ganglionar axilar tiene un claro valor pronóstico en la enfermedad limitada, su valor pronóstico en cuanto a SG en la enfermedad inicialmente metastásica no está tan claro. Esto es debido en parte a que sólo disponemos de información adecuada sobre la afectación ganglionar, en aquellas pacientes con cáncer de mama metastásico que fueron intervenidas del tumor primario y se realizó linfadenectomía. Si en el resto de las pacientes nos guiásemos únicamente por el estadio ganglionar clínico añadiríamos una heterogeneidad a la variable que nos dificultaría alcanzar conclusiones válidas, por lo que el valor pronóstico de la afectación ganglionar axilar en términos de SG en CMM tiene limitaciones^{41 42}. Chang et al. analizaron las características del tumor primario en pacientes con afectación ganglionar que presentaron recurrencia de la enfermedad tras el tratamiento, y definieron que tanto el tamaño tumoral como el número de ganglios linfáticos afectos eran importantes en la predicción del

riesgo de recurrencia. Sin embargo no pudieron correlacionar estos factores con supervivencia global una vez que las metástasis habían aparecido³⁸. Estos resultados se contradicen con aquellos presentados por Insa et al. en el que tanto el tamaño del tumor primario como el número de ganglios afectados por el tumor al diagnóstico presentaban significancia pronóstica independiente en enfermedad metastásica⁴³. En la serie de pacientes pertenecientes a la base de datos de El Álamo, la afectación ganglionar, considerada como ratio (número absoluto de ganglios afectos-número de ganglios resecados)⁴⁴, resultó ser un factor pronóstico relevante en pacientes con CMM.⁴⁵

3.2.2.3 Factores biológicos y moleculares

- **ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN CELULAR:** Para medirlo se puede utilizar el índice mitótico que ha demostrado una elevada correlación pronóstica⁴⁶. Un índice de proliferación celular alto se correlaciona con mal pronóstico, asociándose a tumores de alto grado histológico, afectación ganglionar o ausencia de receptores hormonales⁴⁷.
- **EXPRESIÓN RECEPTORES HORMONALES (RE/RP):** Se considera el mejor marcador pronóstico y predictivo de esta enfermedad⁴⁸ y su análisis se realiza de forma rutinaria puesto que los resultados predicen la respuesta a terapia hormonal tanto en la adyuvancia como en enfermedad metastásica⁴⁹.
- **SOBREEXPRESION HER2/NEU:** Su valoración se considera actualmente parte del estándar en todas las pacientes con cáncer de mama⁵⁰. La sobreexpresión de este receptor en la superficie de las células tumorales o la amplificación del gen que lo codifica supone una ventaja en su crecimiento y capacidad de diseminación, confiriendo una mayor agresividad a estas neoplasias⁵¹. Esta alteración se detecta en un 15-25% de los tumores de mama⁵². Se trata de un importante marcador pronóstico y predictivo de respuesta a los tratamientos específicos

contra el receptor así como a tratamientos determinados con quimioterapia como por ejemplo las antraciclinas⁵³. El método de detección es inmunohistoquímico (IHQ) y semicuantitativo, obteniéndose una gradación que va del 1 al 3, si bien se puede determinar también por técnicas de hibridación in situ con fluorescencia (FISH), o su equivalente CISH (chromogenic in situ hybridization)⁵⁴. La valoración de la amplificación génica de HER-2 mediante técnicas de hibridación in situ se realiza en aquellos casos en los que el resultado para la expresión del receptor mediante IHQ sea no concluyente o 2+⁵⁵. Al igual que con los receptores hormonales, es recomendable repetir la determinación del HER-2 en la pieza quirúrgica, cuando en la biopsia inicial el resultado es negativo, ya que el tratamiento y el impacto por tanto en la evolución de la enfermedad varía de forma importante⁵⁶.

- **CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES:** La presencia de células tumorales circulantes (CTCs) en pacientes con cáncer fue publicado por primera vez en 1869⁵⁷. Más recientemente se han desarrollado métodos para detectar, aislar y caracterizar CTCs en varios tumores sólidos como puede ser cáncer de mama, colon y próstata entre otros⁵⁸. El método más utilizado para su detección se llama CellSearch (Veridex) y se basa en la captura inmunomagnética de CTCs usando anticuerpos contra la molécula epitelial de adhesión celular (EpCam) que es expresada en la superficie celular de muchas células malignas. Posteriormente se caracterizan con una tinción de 4'6-diamidino-2-fenilindol (para demostrar que es una célula nucleada) y por un análisis de inmunofluorescencia con anticuerpos contra citokeratinas (para demostrar que es epitelial) y CD45 (para demostrar que no es un leucocito). Muchos estudios han demostrado que la presencia de un número elevado de CTCs determinadas por CellSearch se correlacionan con un peor pronóstico en pacientes con cáncer metastásico de mama⁵⁹, colon⁶⁰ y próstata⁶¹.

Aunque la FDA (US Food and Drug Administration) ha aprobado CellSearch para uso clínico, el "American Society of Clinical Oncology

Tumor Marker Guidelines Committee” no recomienda todavía la incorporación de niveles de CTCs en el manejo estándar de las pacientes con cáncer de mama metastásico⁶².

En cualquier caso algunos estudios sugieren que el método CellSearch puede infraestimar el número de células que expresan EpCam⁶³. Se ha desarrollado otro método que parece ser más sensible para la enumeración de CTCs, que consiste en estimar su presencia mediante el uso de reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa inversa, que detecta transcripciones epiteliales que presumiblemente no están presentes en células normales hematopoyéticas⁶⁴.

El papel pronóstico de la detección de CTCs en sangre periférica se ha establecido en ensayos publicados previamente⁶⁵, pero todavía queda por definir de forma más completa su papel predictivo así como la utilidad clínica en el manejo estándar de las pacientes con cáncer de mama metastásico, motivo por el cual se ha convertido en un importante objeto de investigación.

- **MUTACIÓN BRCA1 Y BRCA2:** Las mutaciones en diferentes segmentos del gen *BRCA-1* del cromosoma 17 y del gen *BRCA-2* del cromosoma 13 se encuentran relacionados con el cáncer de mama hereditario. El impacto pronóstico en el CM hereditario es hoy en la actualidad insuficientemente conocido⁶⁶.

3.2.2.4 Factores genómicos:

- **PERFILES GENÓMICOS:** Los estudios genómicos con *microarrays* de cDNA demuestran que los carcinomas de mama son una entidad extremadamente heterogénea, y se podrían subclasificar en 5 grupos, según sus diferentes perfiles de expresión génica (dos subtipos de carcinomas de células luminales: A y B; un subtipo basal-like, el fenotipo HER2-enriched, y el subtipo caracterizado de forma más reciente,

Claudin-low). El primer trabajo que examinó los patrones de expresión génica en cáncer de mama fue publicado por Perou en la revista Nature en el año 2000 clasificando los tumores mamarios en 4 grupos principales⁶⁷. Poco después Sorlie demostró que los Luminales A y B son de mejor pronóstico y que los subtipos con fenotipo de células basales y los Her-2 positivos tienen peor pronóstico⁶⁸. Las aplicaciones prácticas de esta subclasificación, por el momento dependen de la realización de estudios que demuestren si se puede realizar una nueva taxonomía de cáncer de mama según su perfil genético, la definición de índices pronósticos, la predicción de la respuesta al tratamiento antitumoral y la identificación de nuevas dianas terapéuticas moleculares⁶⁹.

3.3 TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA METASTÁSICO

3.3.1 Principios generales del tratamiento del cáncer de mama metastásico.

El manejo de la paciente con cáncer de mama metastásico debe ser multidisciplinar, involucrando en las decisiones diagnóstico-terapéuticas a oncólogos médicos, radioterapeutas, ginecólogos, cirujanos, radiólogos y especialistas en cuidados paliativos así como a psicooncólogos. El objetivo de un equipo multidisciplinar en la toma de decisiones, es ofrecer a la paciente un tratamiento lo más personalizado posible en función de su situación y características clínicas⁷⁰.

Es también fundamental en el manejo de dichas pacientes ofrecerles la participación en ensayos clínicos siempre que sea posible, de forma que puedan ampliar sus opciones terapéuticas.

3.3.1.1 Tratamiento sistémico:

El objetivo del tratamiento sistémico en la mayoría de estas pacientes es paliativo, con el objetivo principal de mejorar o mantener la calidad de vida y aumentar en la medida de lo posible la supervivencia⁷¹.

Las opciones de tratamiento sistémico son quimioterapia, tratamiento endocrino, fármacos dirigidos al hueso y terapias biológicas dirigidas

En la mayoría de las pacientes los resultados en supervivencia global tras ser tratadas de forma secuencial con citostáticos en monoterapia es similar a los resultados tras tratamientos con poliquimioterapia en combinación⁷². La elección entre uno u otro esquema debe tener en cuenta la necesidad de una respuesta rápida y significativa. En pacientes sin una enfermedad muy sintomática el uso de drogas en monoterapia es la mejor opción.

En cuanto a la duración del tratamiento con quimioterapia en aquellas pacientes que presentan respuesta al tratamiento, se trata de otro punto controvertido ya que no debemos olvidar que son fármacos con una toxicidad no desdeñable, sin embargo en un metaanálisis reciente se demostró un aumento de supervivencia global marginal y un aumento de supervivencia libre de progresión significativo en aquellas pacientes tratadas con primera línea de quimioterapia para enfermedad avanzada de forma prolongada, hasta progresión o toxicidad inaceptable⁷³. En cualquier caso es importante individualizar en cada paciente en función de la respuesta conseguida y de la tolerancia al tratamiento.

En el caso de pacientes con receptores hormonales positivos en el tumor y sin sobreexpresión de HER2, en las que no sea necesaria una respuesta clínica rápida, el tratamiento con hormonoterapia puede ser la primera elección⁷⁴.

Por otro lado, en aquellas pacientes con sobreexpresión de HER2 en la pieza tumoral, es necesario añadir al tratamiento de elección de primera línea

un agente diana antiHER2 como puede ser el trastuzumab, el lapatinib o el más recientemente aprobado pertuzumab⁷⁵.

Otros agentes terapéuticos que debemos tener en cuenta en el caso de pacientes con cáncer de mama metastásico que presenten afectación ósea, son los bifosfonatos o el anticuerpo frente al RANK-ligando, denosumab, con el fin de paliar la sintomatología secundaria de la afectación metastásica ósea, así como reducir el riesgo de eventos secundarios en el hueso. El tratamiento con estos agentes debe iniciarse justo después del diagnóstico de la afectación ósea. No se conoce la duración óptima del tratamiento, y de hecho, el tratamiento más allá de dos años no ha demostrado todavía beneficio en los ensayos clínicos, aunque al persistir el riesgo de eventos en el esqueleto, y puesto que los efectos secundarios (incluyendo osteonecrosis de mandíbula y nefrotoxicidad) son menores, y el beneficio en la mayoría de los pacientes sobrepasa los riesgos, parece apropiado mantener el tratamiento a largo plazo⁷⁶.

En resumen, la elección del tratamiento en las pacientes con cáncer de mama metastásico debe ser individualizado, teniendo en cuenta el perfil de toxicidad esperado, las comorbilidades existentes, la histología del tumor, la rapidez de la respuesta clínica necesitada, las preferencias de la paciente así como la adherencia esperada de la paciente al mismo y la experiencia clínica del médico y del centro especializado.

3.3.1.2 Tratamiento local:

No existen datos randomizados que evalúen el beneficio de la cirugía del tumor primario, aunque estudios retrospectivos apuntan que el tratamiento quirúrgico del tumor primario con márgenes libres en pacientes diagnosticadas de cáncer de mama metastásico puede aumentar la supervivencia en pacientes seleccionadas^{77 78}. El requisito más importante para valorar una cirugía del tumor primario es el control sistémico del tumor^{79 80}. Se están realizando estudios prospectivos para intentar establecer dicha indicación, el

beneficio obtenido con esta estrategia, y poder establecer qué tipo de pacientes se benefician de la resección del tumor primario.

Otro abordaje terapéutico local, en este caso sobre las localizaciones metastásicas, sería la radioterapia paliativa. Las indicaciones más frecuentes incluyen la radiación sobre metástasis óseas dolorosas pese a analgesia^{81 82}, o aquellas que tienen riesgo de fractura o complicaciones neurológicas⁸³⁸⁴. Otra indicación sería la radioterapia holocraneal en pacientes con afectación cerebral extensa⁸⁵. Aquellas pacientes que presentan una única lesión cerebral o varias de pequeño tamaño se pueden beneficiar de radiocirugía ya que aporta mejor control local y menos efectos secundarios que la radioterapia holocraneal⁸⁶. El tratamiento en pacientes con una única lesión cerebral y resto de lesiones en estabilidad tumoral debe ser la resección quirúrgica si la dificultad técnica lo permite y tras evaluar riesgo-beneficio teniendo en cuenta factores como la edad del paciente, seguida posteriormente de radioterapia holocraneal, aumentando de forma significativa el tiempo hasta la recurrencia y la supervivencia en estos pacientes⁸⁷.

Cabe destacar un subgrupo de pacientes con enfermedad metastásica confinada a un único órgano sólido y con poca carga tumoral (oligometastásica) en el que la cirugía de las metástasis parece desempeñar un papel importante al conseguir que la enfermedad metastásica esté controlada macroscópicamente tras el gesto quirúrgico. Para la realización de este tipo de cirugías que comprende cirugía de metástasis hepáticas^{88 89}, o bien pulmonares^{90 91}, o incluso óseas⁹² es fundamental contar con un equipo quirúrgico experto que pueda valorar la resección factible de dichas metástasis y preservar la funcionalidad del órgano en cuestión. En este subgrupo de pacientes oligometastásicas sometidas a cirugía de las metástasis y posterior tratamiento “adyuvante” podemos hablar de largas supervivientes e incluso discutir el concepto de curación en cáncer de mama metastásico.⁹³

3.3.2 Tratamiento específico de cáncer de mama metastásico en función de subtipos histológicos.

3.3.2.1 Tratamiento del fenotipo luminal en cáncer de mama metastásico

El tratamiento endocrino es la mejor opción terapéutica en estas pacientes excepto si presentan un curso clínico agresivo que requiera una rápida respuesta con el tratamiento o tengan datos de resistencia endocrina, casos en los cuales se debería ofrecer tratamiento con quimioterapia. La elección del tipo de tratamiento endocrino debe basarse en el estado menopáusico, comorbilidades, el tratamiento recibido en la adyuvancia y el perfil de efectos secundarios⁹⁴.

Aquellas pacientes que presentan beneficio clínico, es decir aquellas que presentan o bien criterios de respuesta objetiva o bien las que presentan estabilidad de su enfermedad por un mínimo de 6 meses, pueden ser tratadas a la progresión con una segunda línea de tratamiento hormonal, ya que se considera que cumplen criterios de hormonosensibilidad^{95 96}.

En el caso de pacientes que también presenten sobreexpresión del HER2 y que no tengan indicación de tratamiento con quimioterapia, se debe combinar la hormonoterapia con los tratamientos diana anti-HER2 para conseguir un aumento de la supervivencia libre de progresión⁹⁷.

- *Pacientes premenopáusicas:* El tratamiento óptimo como primera línea hormonal debe incluir tratamiento con tamoxifeno junto a castración ovárica (análogo LH-RH, cirugía o radiación ovárica)^{98 99 100}. En pacientes que han recibido tratamiento con tamoxifeno adyuvante se debe realizar castración ovárica y se debe añadir tratamiento con tamoxifeno en función del intervalo libre de progresión¹⁰¹. En cuanto a la decisión sobre una segunda línea hormonal dependerá del beneficio clínico a la línea previa. En caso de decidir dar una segunda línea de hormonoterapia, incluiría un inhibidor de la aromatasa manteniendo el análogo de LH-RH.

- *Pacientes postmenopáusicas:* Para la elección de la primera línea de hormonoterapia en pacientes con enfermedad metastásica postmenopáusicas, también es necesario tener en cuenta si han recibido tratamiento hormonal adyuvante y el tiempo hasta la progresión. En aquellas pacientes sin terapia hormonal previa o con intervalo a la progresión superior a un año, el tratamiento de elección de primera línea son los inhibidores de la aromatasa, siendo clásicamente elegidos los inhibidores de aromatasa no esteroideos (anastrozol o letrozol)^{102 103 104}. Por otro lado, en las pacientes con progresión a tamoxifeno adyuvante, se puede utilizar tanto los inhibidores de aromatasa, como fulvestrant^{105 106}, dependiendo la elección de uno u otro fármaco, de las preferencias del paciente, efectos secundarios esperados, etc. En el caso de segunda línea o en pacientes que hayan progresado en menos de 12 meses a la adyuvancia con inhibidores de aromatasa no esteroideos se pueden utilizar inhibidores de aromatasa esteroideos (exemestano), fulvestrant¹⁰⁷ o tamoxifeno, dejando relegados progestágenos¹⁰⁸ y estrógenos a altas dosis para terceras y cuartas líneas.

Estudios recientes parecen demostrar el beneficio de añadir el inhibidor de m-TOR, everolimus, al tratamiento con inhibidor de aromatasa esteroideo o tamoxifeno en pacientes en progresión a inhibidores de la aromatasa^{109 110}.

3.3.2.2 Tratamiento cáncer de mama metastásico triple negativo

El tratamiento con quimioterapia es el tratamiento principal, en ausencia de tratamientos específicos en este subgrupo de enfermedad¹¹¹. En aquellas pacientes que hayan recibido antraciclinas en adyuvancia, se recomienda la utilización de taxanos^{112 113}, solos o en combinación con otros citostáticos¹¹⁴, en función de si existe afectación visceral, curso clínico agresivo o riesgo de rápido deterioro clínico. En caso de no haber recibido previamente antraciclinas, se recomienda tanto taxanos¹¹⁵ como antraciclinas¹¹⁶, en monoterapia o en combinación¹¹⁷, como opciones terapéuticas válidas. Otra

opción terapéutica es la quimioterapia basada en sales de platino¹¹⁸, que parece particularmente eficaz en pacientes con BRCA1 alterado^{119 120}. Fármacos como inhibidores de PARP (poli-adenosil-ribosa-fosfato) parecen tener beneficio en este grupo de pacientes^{121 122 123} y están siendo estudiados en la actualidad mediante numerosos ensayos clínicos.

El bevacizumab, un antiangiogénico que ha demostrado beneficio en otros tumores sólidos, fue aprobado en un principio por la FDA y la EMA para primera línea de tratamiento de cáncer metastásico¹²⁴, siendo retirada posteriormente la aprobación por la FDA por no demostrar aumento en supervivencia global¹²⁵. En Europa, el bevacizumab permanece aprobado para su uso como primera línea de tratamiento en combinación con paclitaxel¹²⁶ o capecitabina¹²⁷.

3.3.2.3 Tratamiento cáncer de mama metastásico con sobreexpresión HER2.

Las pacientes con cáncer de mama metastásico, con sobreexpresión de HER2 en el tumor, deberían recibir de forma precoz tratamiento específico anti-HER2 (p.ej. trastuzumab o lapatinib) asociado o bien a quimioterapia¹²⁸, bien a tratamiento endocrino¹²⁹, incluso en monoterapia.

El desarrollo de trastuzumab supuso un cambio radical en el pronóstico de estas pacientes, aumentando tanto SLP como SG¹³⁰. Continuar el tratamiento con trastuzumab, en combinación con un régimen de quimioterapia distinto, después de la primera progresión de la enfermedad, es superior a el uso de sólo quimioterapia¹³¹. El beneficio de continuar el tratamiento anti-HER2 en sucesivas progresiones de la enfermedad, tiene menos datos que lo apoye, pero la evidencia disponible sugiere continuar con el tratamiento específico anti-HER2 el máximo tiempo posible.

Otro fármaco anti-HER2, el lapatinib, en combinación con capecitabina, comparado con capecitabina en monoterapia, aumenta el tiempo hasta la progresión en pacientes que han progresado a trastuzumab, antraciclinas o

taxanos¹³². La pregunta de si debe cambiarse de trastuzumab a lapatinib tras la primera progresión, es una cuestión todavía sin resolver.

La combinación de trastuzumab y lapatinib parece ser superior en términos de supervivencia global, a la administración de lapatinib en monoterapia en pacientes que han progresado a trastuzumab, taxanos o antraciclinas, pero todavía no se ha aprobado la combinación¹³³.

Combinar el trastuzumab o el lapatinib con tratamiento endocrino en lugar de con citostáticos^{134 135}, puede ser una opción para algunas pacientes con receptores hormonales positivos y sobreexpresión de HER2 en el tumor, que presenten comorbilidades que contraindiquen el tratamiento con quimioterapia y que no presenten afectación visceral extensa.

Recientemente se ha aprobado el uso de pertuzumab, un nuevo fármaco anti-HER2, para su uso asociado en combinación a tratamiento con quimioterapia de primera línea de cáncer de mama metastásico HER2 positivo, y trastuzumab, demostrando aumento en tasa de respuestas, en tiempo hasta la progresión y tendencia positiva en la curva de SG¹³⁶.

Otro fármaco, pendiente de aprobación por la EMA y la FDA en la actualidad, es el T-DM1 que ha demostrado superioridad en cuanto a SLP y un mejor perfil de toxicidad, comparado con la primera línea de tratamiento con docetaxel-trastuzumab.

El tratamiento con fármacos anti-HER2 ha cambiado totalmente el pronóstico y la calidad de vida de las pacientes con cáncer de mama metastásico y sobreexpresión de HER2. No obstante, ante el elevado precio de estos fármacos, sería interesante evaluar nuevos biomarcadores predictivos de respuesta, para que el tratamiento global de estas pacientes, sea lo más costo-eficaz posible, sin eliminar tratamientos eficaces que impacten en la calidad de vida y supervivencia de estas pacientes.

3.4 PRONÓSTICO DE CÁNCER DE MAMA METASTÁSICO.

3.4.1 Aspectos generales del pronóstico en cáncer de mama metastásico.

Tal y como se ha descrito anteriormente, la mediana de supervivencia global en pacientes con cáncer de mama y enfermedad metastásica, se encuentra en torno a los 18-24 meses¹³⁷, con una supervivencia a 10 años tras el diagnóstico de solo un 10%¹³⁸. Sin embargo, una pequeña fracción de pacientes con dicha enfermedad pueden alcanzar tras recibir tratamientos sistémicos consecutivos, una supervivencia prolongada. Resulta interesante y con implicaciones terapéuticas la identificación de este subgrupo de pacientes, así como de las pacientes que presentan peor pronóstico.

El papel de los factores pronósticos en enfermedad localizada ha sido estudiado y validado en numerosos estudios¹³⁹, mientras que por otro lado en enfermedad avanzada resulta escasa la información disponible sobre los mismos¹⁴⁰. Algunos factores pronósticos descritos en este estadio de la enfermedad serían la localización de las metástasis, el estado del receptor hormonal, el tratamiento adyuvante recibido, el estadio de la enfermedad al diagnóstico, el intervalo libre de enfermedad, y conseguir una respuesta objetiva a la primera línea de tratamiento⁴³. En una serie española de 439 pacientes con CMM la supervivencia global a 5 años era del 35% en pacientes que presentaban respuesta objetiva, siendo prácticamente de 0 en las pacientes que no respondían a la primera línea de tratamiento⁴³.

3.4.2 Modelos predictivos integrados.

En la actualidad, con el constante desarrollo y aparición de nuevas terapias, es imprescindible identificar los factores pronósticos más útiles para predecir la supervivencia y construir un modelo predictivo extrapolable a la práctica clínica habitual. Uno de estos modelos predictivos se realizó en el proyecto El Álamo en el que se analizaron los datos de 2322 pacientes con

CMM identificándose mediante un análisis multivariante los factores pronósticos más relevantes y construyendo consecuentemente un modelo predictivo en CMM⁴⁵. Estos factores pronósticos, que presentaron correlación significativa con supervivencia fueron: edad y estadio al diagnóstico, grado histológico, estado del receptor hormonal, ratio (ganglionar), administración de neo/adyuvancia, localización de las metástasis, número de líneas hormonales en enfermedad metastásica, y respuesta a la primera línea de tratamiento. Se asignó en función de los coeficientes de regresión de cada variable pronóstica independiente, una puntuación cuantitativa. La puntuación total para cada paciente se obtenía sumando la puntuación de cada variable pronóstica. Se realizaron tres grupos pronósticos en función de la puntuación total de cada paciente, demostrando en el análisis final una diferencia estadísticamente significativa entre cada uno de los grupos (3,69 años en el grupo de menor riesgo, 2,27 años en el grupo intermedio y 1,02 años en el grupo de mayor riesgo).

El problema que tienen la mayoría de modelos predictivos es que son únicamente orientativos, sin poder identificar con exactitud dentro de cada grupo de riesgo que paciente va a presentar un desarrollo de la enfermedad distinto a lo esperado. Por lo tanto, el estudio de factores pronósticos y predictivos en cáncer de mama metastásico, sigue siendo un interesante campo de estudio en desarrollo desde el punto de vista biológico tanto clínico.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El tratamiento del cáncer de mama metastásico tiene como objetivo principal paliar los síntomas pero también aumentar la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global en la medida de lo posible. Tanto el pronóstico como la selección del tratamiento más adecuado, están determinados por múltiples factores entre los que se encuentran la edad, la situación menopáusica, la existencia o no de afectación visceral, el estado del receptor de estrógeno y del receptor de progesterona y la amplificación del gen HER2/neu, entre otros. El conocimiento de técnicas diagnósticas que permitan determinar el pronóstico de estas mujeres con más exactitud constituye la oportunidad de ofrecer a las pacientes diferentes estudios de investigación clínica en función de su pronóstico, a la vez de representar la posibilidad de realizar cambios terapéuticos inmediatos en caso de que el tratamiento vaya resultando ineficaz, y por lo tanto, tomando una dirección hacia tratamientos individualizados.

La detección de células tumorales circulantes tiene importantes implicaciones pronósticas y terapéuticas. En estudios previos, se ha demostrado que el número basal de CTCs detectado en sangre periférica en pacientes con cáncer de mama metastásico, es un factor predictivo independiente de progresión libre de enfermedad y supervivencia global.

Nos planteamos la hipótesis de que la cuantificación de CTCs en el día 21 (inmediatamente antes del segundo ciclo de quimioterapia) pueda predecir el desarrollo de la enfermedad en pacientes con cáncer de mama metastásico de forma más precisa que la cuantificación basal ya que en la determinación del día 21 se recoge la influencia del tratamiento, siendo aquellas con menos de 5 CTCs las que tienen mejor pronóstico.

Para explorar esta hipótesis, planteamos como objetivos de esta tesis los que se exponen a continuación:

1. **Objetivo primario:** Estudiar qué papel predictivo de respuesta al tratamiento tienen la detección y la cuantificación de células tumorales

en sangre periférica, a los 21 días de haber comenzado el tratamiento de quimioterapia, en mujeres con cáncer de mama metastásico. Analizar la correlación entre el número de CTCs el día 21 (0-4 vs 5 o más) y supervivencia global. Se define SG como el tiempo entre el día 0 (día de la determinación de CTCs basal) y el día del fallecimiento de la paciente.

2. **Objetivos secundarios:**

- Detección, cuantificación y estudio del papel pronóstico de las células tumorales en sangre periférica de las pacientes con cáncer de mama metastásico antes de iniciar el tratamiento quimioterápico. Analizar la correlación entre el número de CTCs basal (0-4 vs 5 o más) y supervivencia global.
- Analizar la correlación entre el número de CTCs el día 21(0-4 vs 5 o más) y supervivencia libre de progresión. Se define SLP como el tiempo entre el día 0 (día de la determinación de CTCs basal) y el día de progresión de la enfermedad o muerte en función de lo que ocurra primero.
- Analizar la correlación entre el número de CTCs basal (0-4 vs 5 o más) y la supervivencia libre de progresión.
- Analizar la correlación entre el número de CTCs basal (0-4 vs 5 o más) con la tasa de respuesta objetiva al tratamiento antineoplásico. La respuesta al tratamiento se evaluará mediante técnicas radiológicas habituales (TC) en función de los criterios RECIST 1.0.
- Analizar la correlación entre el número de CTCs en el día 21 (0-4 vs 5 o más) con la tasa de respuesta objetiva en función de los criterios RECIST 1.0.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 SELECCIÓN DE LA MUESTRA

En nuestro estudio se seleccionó un grupo de pacientes con cáncer de mama metastásico en tratamiento en el Hospital Universitario San Carlos (Madrid). El estudio fue aprobado por el comité de ensayos clínicos del centro. Se pidió la participación en el estudio de todas las pacientes que cumplían los siguientes criterios de inclusión:

- Presentar el diagnóstico de cáncer de mama metastásico en el momento de inclusión en el ensayo, tratándose bien de pacientes con diagnóstico inicial de cáncer de mama metastásico o bien aquellas que presentaban al inicio cáncer de mama invasivo estadio I, II o III pero actualmente presentaban recurrencia de su enfermedad de forma diseminada.
- Pacientes pendientes de iniciar nueva línea de quimioterapia o bien por diagnóstico reciente de cáncer de mama metastásico o bien por progresión de enfermedad ya conocida. Se realizaba un estadiaje completo mediante TC y/o gammagrafia en las 2 semanas previas al reclutamiento.
- Enfermedad medible de acuerdo a los criterios RECIST 1.0
- ECOG Performance Status 0-1.
- Expectativa de vida de más de 3 meses.
- No presentar contraindicaciones para el tratamiento con quimioterapia.
- No haber recibido más de dos líneas de quimioterapias previas para enfermedad metastásica.
- Adecuada función renal (niveles creatinina sérica por debajo de 1.2 mg/dl)

- Adecuada función hepática (AST, ALT menores de 2,5 veces el límite superior de normalidad, bilirrubina < 1,5 mg/dl)
- Adecuada función médula ósea (niveles HB por encima 10 mg/dl, recuento neutrófilos por encima 1500 células/mm², niveles de plaquetas por encima de 100.000/mm³)

Todas las pacientes que cumplían los criterios de inclusión y que se mostraron de acuerdo en participar en el estudio firmaron un consentimiento informado antes de ser admitidas en el ensayo.

5.2 PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

Las pacientes tras el inicio de la nueva línea de quimioterapia eran seguidas en las consultas de Oncología cada tres semanas, antes de cada ciclo de quimioterapia. Se realizaba un análisis completo de sangre incluyendo hemograma y bioquímica (incluyendo enzimas hepáticas y creatinina) inmediatamente antes de cada ciclo de quimioterapia. Otras pruebas como resonancia magnética del cerebro o hueso, ecocardiograma para valorar la fracción de eyección del ventrículo izquierdo y ecografía abdominal, se realizaban según lo establecido en la práctica clínica habitual.

Los TC se realizaban cada 3 ciclos (11-12 semanas) para evaluar la respuesta clínica. En aquellos pacientes con síntomas o signos claros de progresión de la enfermedad se adelantaba la fecha del TC consecuentemente. La respuesta objetiva se evaluaba según los criterios RECIST 1.0 comparando los TC previos al inicio de la quimioterapia y posteriores. En cada paciente, la mejor respuesta conseguida se consideraba la respuesta final (por ejemplo, una respuesta parcial mantenida durante más de un mes seguida por progresión de la enfermedad era categorizada como respuesta parcial). Después de la progresión de la enfermedad a la línea de tratamiento que se había iniciado con el estudio, las pacientes podían recibir sucesivas líneas de quimioterapia o incluso participar en ensayos clínicos con nuevas terapias si

cumplían criterios de inclusión, normalmente hasta que el deterioro del PS de las pacientes limitaba la indicación del tratamiento con quimioterapia. Las pacientes con sobreexpresión HER2 recibían terapia antiHER2 adicional (trastuzumab, lapatinib o fármacos experimentales) en las líneas de tratamiento sucesivas.

Como parte del estudio se recogieron 2 muestras (7,5 ml cada una) de sangre periférica de cada paciente. La primera muestra era extraída inmediatamente antes del primer ciclo de quimioterapia (CTC-0) y la segunda 21 días después, normalmente inmediatamente antes de la administración del segundo ciclo de QT. La sangre se introducía en tubos de 10 ml con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y preservante celular (Cellsave® preservative tubes, Veridex™, LLC) que permiten preservar las células 72 horas a temperatura ambiente. Dichas muestras eran procesadas de acuerdo con las instrucciones del fabricante en las 72 horas siguientes. En este proceso en primer lugar la sangre se mezclaba con un ferrofluido con partículas inmunomagnéticas marcadas con anticuerpos anti-EpCAM (anticuerpos frente a la molécula de adhesión de la célula epitelial). Posteriormente las células aisladas eran teñidas mediante fluorescencia con 4´6-diaminodino-2-phenylindole (DAPI) para el núcleo celular, con anticuerpos monoclonales específicos para leucocitos (CD45) y células epiteliales (citoqueratinas 8, 18,19) (CK-PE) y posteriormente analizadas en el Cellspotter Analyzer (Veridex™, LLC). El análisis mostraba entonces imágenes de células que para ser definidas como CTCs necesitaban cumplir los siguientes criterios: morfología redonda u ovalada con un diámetro > 4 µm, citoplasma con tinción positiva para CK-PE y negativo para CD45 y finalmente > 50% del núcleo teñido con DAPI. Los resultados se expresaron como número de CTCs/7.5 ml de sangre. Las interpretaciones de los resultados fueron confirmados de forma independiente por tres especialistas entrenados sin que tuviesen información previa de las características clínicas de los pacientes.

5.3 SELECCIÓN DE LAS VARIABLES A ESTUDIO

Con estos criterios hemos creado nuestra propia base de datos en las que hemos incluido un total de 20 variables, con las que intentamos responder a los objetivos planteados anteriormente:

- Edad de las pacientes en años en el momento de inclusión en el estudio.
- Receptores hormonales (positivos, negativos, o no determinados) diferenciándose entre el estado de receptores de estrógenos y de progesterona.
- Estado de HER2 (positivo, negativo o no determinado).
- Localización de la enfermedad metastásica al diagnóstico, en función de presencia de afectación visceral o no (nódulos pulmonares, hueso, tejidos blandos, piel).
- Estratificación de los pacientes que presentan afectación metastásica de la enfermedad en un solo órgano frente a aquellos que presentan afectación de 2 o más órganos con independencia de la localización anatómica.
- Se recogió si las pacientes habían realizado o no previamente tratamiento adyuvante (en aquellos casos en los que al inicio presentaban estadios I, II o III y que posteriormente habían sufrido recurrencia y/o progresión a estadio IV).
- Número de líneas de quimioterapias previas para enfermedad metastásica que había recibido cada paciente (0,1 o 2).

- Se recogieron en cada paciente los citostáticos y terapias anti-Her 2 empleados en las líneas de quimioterapia previas para enfermedad metastásica.
- Se incluyó si las pacientes habían recibido tratamiento hormonal para enfermedad metastásica previamente (si/no).
- Fecha de realización de la prueba de imagen (TC/gammagrafía) previo al inicio del estudio en la que se había objetivado o bien progresión de la enfermedad en pacientes ya diagnosticadas de cáncer de mama o bien el diagnóstico nuevo de cáncer de mama metastásico en aquellas pacientes sin enfermedad conocida.
- Fecha de extracción de la primera muestra de sangre periférica para cuantificación de las células tumorales circulantes (CTC-0).
- Se recogieron los citostáticos y terapias anti-Her2 empleados en la nueva línea de quimioterapia para enfermedad metastásica iniciada justo después de la primera extracción de sangre periférica para cuantificación de CTCs.
- Número de CTCs observadas en la primera muestra de sangre periférica de nuestro estudio (CTC-0).
- Fecha de extracción de la segunda muestra de sangre periférica para cuantificación de las células tumorales circulantes en el día 21 (CTC-21) justo antes de la administración del segundo ciclo de quimioterapia.
- Número de CTCs detectadas en la segunda muestra de sangre periférica de nuestro estudio (CTC-21).
- La mejor respuesta radiológica obtenida en los TC de reevaluación según criterios RECIST 1.0. Los pacientes eran estratificados en función

de respuesta completa, respuesta parcial, estabilización de la enfermedad o progresión.

- Fecha de la realización del TC en el que se objetiva progresión de la enfermedad en caso de que la hubiese.
- Fecha del fallecimiento en el caso de que ocurriese.
- Fecha de la última revisión en aquellas pacientes que continúan vivas.

5.4 TAMAÑO MUESTRAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La supervivencia global estimada para la población total fue 24 meses, con 50% de pacientes vivas a los 2 años. En el momento del diseño del estudio no existían datos publicados en la literatura sobre la distribución y la supervivencia en función del número de CTCs en el día 21. Asumimos que la distribución de pacientes con 0-4 y 5 o más CTCs en el día 21 eran 50% y 50% respectivamente. Estimamos un porcentaje de pacientes vivas a 2 años del 35% en pacientes con 5 o más CTCs en el día 21 vs 65% para pacientes con menos de 5 CTCs en el día 21 para un hazard ratio (HR) de 1,8. Se estimó que un total de 100 pacientes serían necesarios para demostrar la diferencia de SG (α bilateral=0.05, β =0.8). Asumiendo una tasa de errores del 10% (imposibilidad de poder realizar el análisis de CTCs en alguna de las 2 determinaciones establecidas, pérdidas de seguimiento, etc...) se calculo un tamaño muestral para el estudio de un total de 110 pacientes.

La asociación entre variables cualitativas se determinó por chi-cuadrado, y en el caso de que más de un 25% de los esperados fuera menor de 5, por el test exacto de Fisher. La supervivencia libre de progresión fue definida como el tiempo transcurrido en meses, desde el comienzo del estudio con la primera determinación sanguínea en el día 0 justo antes de empezar el tratamiento de quimioterapia hasta el momento de progresión tumoral o muerte según lo que ocurriese en primer lugar. La supervivencia global fue definida como el

transcurso de tiempo en meses desde el día de la primera determinación de CTCs justo antes del inicio de la quimioterapia (día 0) hasta la fecha de fallecimiento del paciente. Tanto la supervivencia libre de progresión como la supervivencia global fueron estimadas usando el método de Kaplan-Meier y estratificadas en función al número de CTCs (0-4 vs 5 o más). Se presentan los gráficos de las curvas estimadas y la mediana de la distribución junto a su intervalo de confianza. La comparación de las funciones de supervivencia de los distintos subgrupos se realizó mediante el test exacto de log-rank que consiste en comparar el número de eventos observados (o bien muerte o bien progresión) en cada uno de los subgrupos con el número de eventos esperados en el caso de que la distribución de la variable dependiente fuera la misma en todas las categorías (hipótesis nula).

Se realizó también un análisis multivariante usando la regresión de Cox para estimar el HR de CTCs > o igual a 5 ajustado a edad, status HER2, status RE, número de sitios metastásicos, presencia o no de enfermedad visceral y número de líneas de quimioterapias previas. En todos los contrastes de hipótesis se rechazó la hipótesis nula con un error de tipo I menor a 0.05. Los datos fueron analizados usando el programa de software estadístico SPSS para Windows en su versión 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

6. RESULTADOS

Partiendo de una muestra inicial de 117 pacientes con cáncer de mama metastásico que cumplían los criterios para participar en el estudio, 109 pacientes firmaron finalmente el consentimiento informado y fueron incluidas. De esas 109 pacientes, en 10 de ellas (9,17%) no se pudo disponer de una de las dos determinaciones de sangre periférica por las siguientes razones: muerte tóxica tras el primer ciclo de quimioterapia (una paciente), falta de extracción de la muestra de sangre periférica del día 21 (dos pacientes), error en el procesamiento de la muestra dando lugar a un resultado inexacto (7 pacientes) o bien en la primera extracción (CTC-0) o bien en la segunda (CTC-21) o en ambas. Estas pacientes fueron excluidas del análisis final.

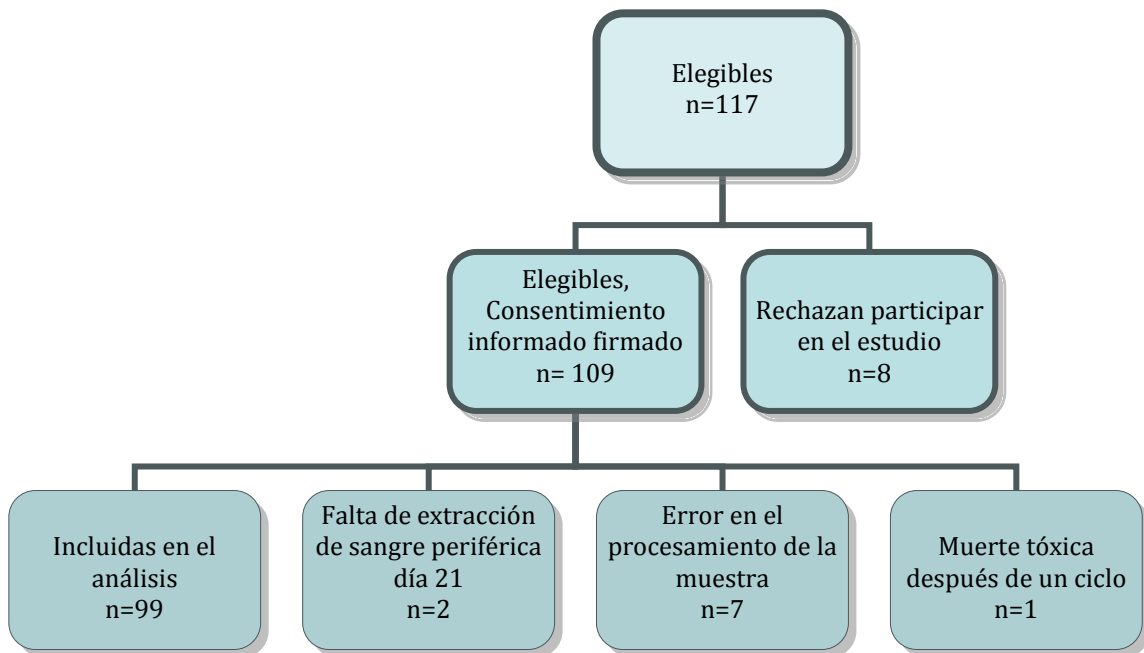


Figura 3. Diagrama inclusión y exclusión de pacientes para el análisis final.

6.1 DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA INCLUIDA EN EL ANÁLISIS FINAL DEL ESTUDIO.

Las características de las 99 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama metastásico incluidas finalmente en el análisis se resumen en la Tabla 1.

CARACTERÍSTICAS	N (%)
Número total pacientes evaluables	99
Edad (años)	
mediana	61
rango	33-88
Estado Receptor Estrógeno	
positivo	67 (67,7%)
negativo	31 (31,3%)
desconocido	1 (1%)
Estado Her2/neu	
Sobreexpresión	44 (44,4%)
Gen normal	54 (54,6%)
Desconocido	1 (1%)
Número de localizaciones metastásicas	
1	48 (48,5%)
2 o más	51 (51,5%)
Enfermedad visceral	
Si	76 (76,8%)
No	23 (23,2%)
Hormonoterapia previa para enf. metastásica	
Si	29 (29,3%)
No	70 (70,7%)
Número de líneas de QT previas para enf. metastásica	
0	54 (54,5%)
1	35 (35,4%)
2	10 (10,1%)
Tipo de Quimioterapia*	
Combinación taxanos	26 (26,3%)
Combinación antraciclinas	13 (13,1%)
Combinación capecitabina	40 (40,4%)
Otros	20 (20,2%)

*Pacientes con tumores con sobreexpresión Her2, recibieron trastuzumab o lapatinib además de la QT.

Tabla 1. Descripción de las características de la muestra final.

6.1.1 Características demográficas.

Desde el punto de vista demográfico la edad media de las pacientes era de 59,82 años, mediana de 61 años y un rango comprendido entre 33 y 88 años.

6.1.2 Características del tumor.

Revisando las características biológicas del tumor, en cuanto a la determinación de receptores de estrógenos es positiva en un 67,7% y negativa en un 31,3%, no teniendo datos sobre el mismo en una única paciente (1%). 54 pacientes presentaban sobreexpresión del Her2 (54,6%) por lo que recibieron tratamiento o bien con trastuzumab (normalmente en combinación con taxanos) o bien con lapatinib (normalmente en combinación con capecitabina) además del tratamiento con quimioterapia. El resto de pacientes eran Her2 negativas excepto una paciente de la que desconocemos el estado de Her2 por haberse realizado la biopsia al diagnóstico en otro centro y no haber podido facilitarnos la muestra para completar el estudio.

6.1.3 Características de la diseminación metastásica del tumor.

Una de las variables que hemos tenido en cuenta es el número de localizaciones afectadas por la diseminación de la enfermedad al inicio del estudio en cada una de las pacientes. En nuestra muestra el 48,5% de las pacientes presentaba afectación metastásica en una sola localización mientras que el 51,5% de las pacientes presentaban diseminación en 2 o más localizaciones.

En cuanto a las distintas localizaciones de la enfermedad, hemos dividido a las pacientes en función de si presentan afectación visceral (hígado, cerebro, pleura, etc.) o no (nódulos pulmonares, hueso, piel y partes blandas), de forma que todas las pacientes que presenten afectación visceral, tengan o no además afectación no visceral son codificadas en el primer grupo así como las pacientes que tengan afectación visceral exclusivamente. En nuestra muestra la mayoría de las pacientes (76,8%) presentan afectación visceral.

6.1.4 Características relacionadas con los tratamientos recibidos.

- En cuanto a la descripción de las características de los tratamientos sistémicos previos para enfermedad metastásica.

En nuestra muestra únicamente el 29,3 % de las pacientes habían recibido hormonoterapia para enfermedad metastásica, no teniendo en cuenta a aquellas pacientes que habían recibido este tratamiento durante la adyuvancia. Sin embargo un 45,5 % de los pacientes habían recibido tratamiento con quimioterapia previa para enfermedad metastásica, el 35,4 % de todos los pacientes una única línea de quimioterapia y sólo el 10,1% de los pacientes habían recibido 2 líneas previas a la inclusión en el estudio.

- En cuanto a la descripción del tipo de tratamiento sistémico para enfermedad metastásica en las pacientes incluidas en el estudio.

La nueva línea de quimioterapia iniciada al comenzar el estudio fue en un 40,4% de las pacientes o bien capecitabina o bien combinaciones basadas en ella. En el resto de pacientes se usaron regímenes basados en taxanos (26,3%), antraciclinas (13,1%) u otros (20,2%). Como hemos referido anteriormente el porcentaje de pacientes con sobreexpresión de Her2 recibieron además del tratamiento con citostáticos, tratamientos anti-Her2 específicos o bien con trastuzumab o bien con lapatinib.

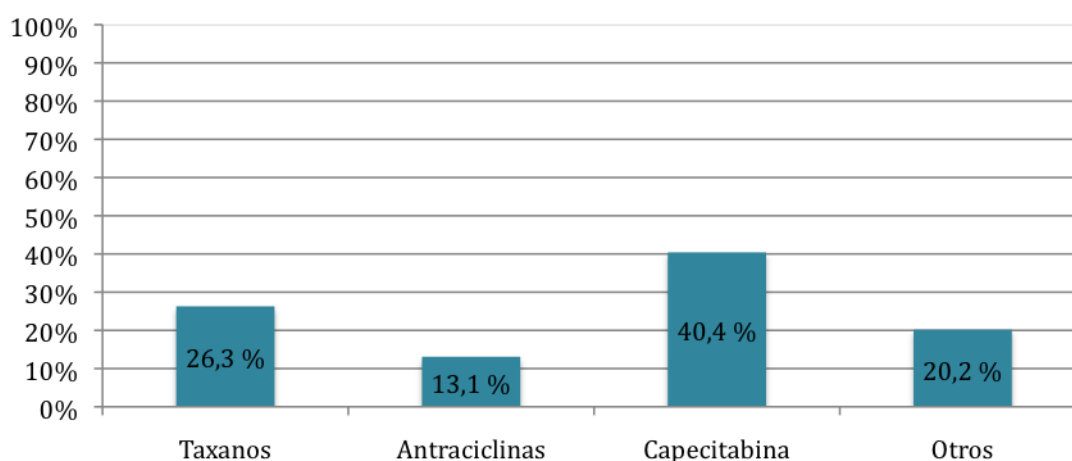


Figura 4. Distribución de los tratamientos sistémicos quimioterápicos administrados durante el estudio.

6.2 CUANTIFICACIÓN DE CTCs.

El número de pacientes con 0, 1-4 y 5 o más CTCs basales (CTC-0) fueron 26, 26 y 47 respectivamente. Para nuestro estudio decidimos agrupar a las pacientes en 2 poblaciones CTCs 0-4 y CTCs mayor o igual de 5, utilizando el punto de corte establecido en la literatura previa. En cualquier caso se realizaron análisis adicionales manteniendo los 3 grupos de 0,1-4 y 5 o más CTCs como se describe más adelante.

La distribución de pacientes en función del número de CTCs antes del inicio del tratamiento con Quimioterapia (CTC-0) fue similar en pacientes con tumores HER-2 positivos y HER-2 negativos, presentando en un 41% y un 54% respectivamente, 5 o más CTCs. Esto mismo se observó en función de la positividad en el tumor para el receptor de estrógenos, presentando 5 o más CTCs un 45% de los pacientes con tumores con receptores de estrógenos positivos y un 50% de los pacientes con tumores con receptores de estrógenos negativos.

La figura 5 muestra la transformación del número de CTCs desde el día 0 (antes del inicio del tratamiento con Quimioterapia) al día 21 (inmediatamente antes de la administración del segundo ciclo). De los 52 pacientes que presentaban de forma basal entre 0-4 CTCs, 49 tenían también entre 0-4 CTCs en la cuantificación del día 21 (CTC-21), mientras que 3 pacientes tuvieron 5 o más CTCs en dicha cuantificación. Por otro lado, de los 47 pacientes con 5 o más células tumorales circulantes en la primera determinación de CTCs (CTC-0), 25 pacientes mantuvieron el mismo rango de CTCs (5 o más) en la segunda determinación (CTC-21) y 22 pacientes presentaron un número menor, entre 0-4 CTCs.

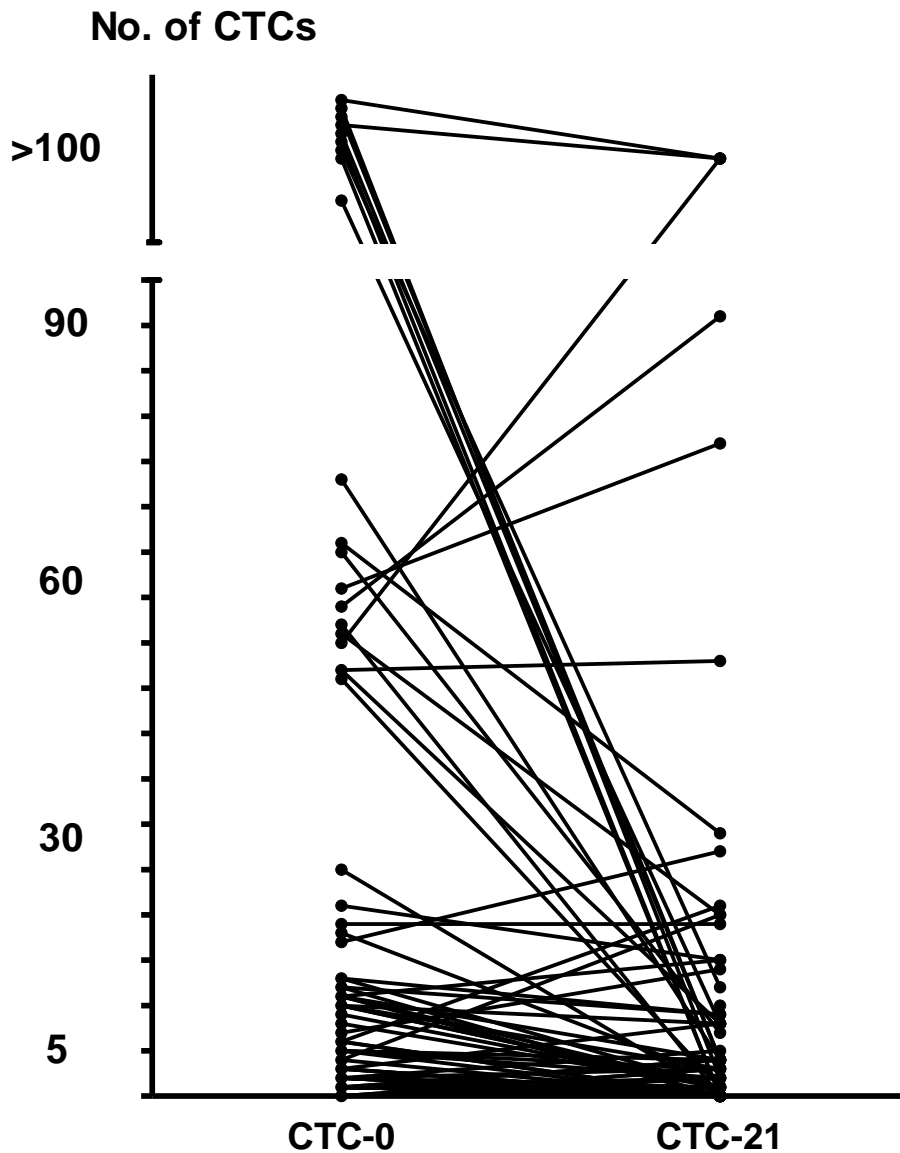


Figura 5. Transformación de CTCs (día 0 al día 21).

6.3 RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON QUIMIOTERAPIA.

La respuesta clínica objetiva al tratamiento con quimioterapia evaluada mediante TC toracoabdominopélvico en función de los criterios RECIST 1.0 fue la siguiente:

- Respuesta completa: 2 pacientes (2,02%)
- Respuesta parcial: 34 pacientes (34,34%)
- Enfermedad estable: 32 pacientes (32,32%)
- Progresión de la enfermedad: 31 pacientes (31,31%)

6.4 SEGUIMIENTO, SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN Y SUPERVIVENCIA GLOBAL.

6.4.1. Seguimiento.

En el momento del análisis, 41 pacientes permanecían vivas (41,4%) y 58 habían fallecido (58,6%). La mediana de seguimiento de las pacientes todavía vivas es de 35 meses. De las 99 pacientes únicamente 3 pacientes no presentaron en ningún momento del seguimiento progresión de la enfermedad.

6.4.2 Supervivencia libre de progresión.

La mediana de supervivencia libre de progresión del total de la muestra (99 pacientes), tal como refleja la figura 6, estimada por el método de Kaplan-Meier fue de 8,1 meses (95% IC 5,5-10,8).

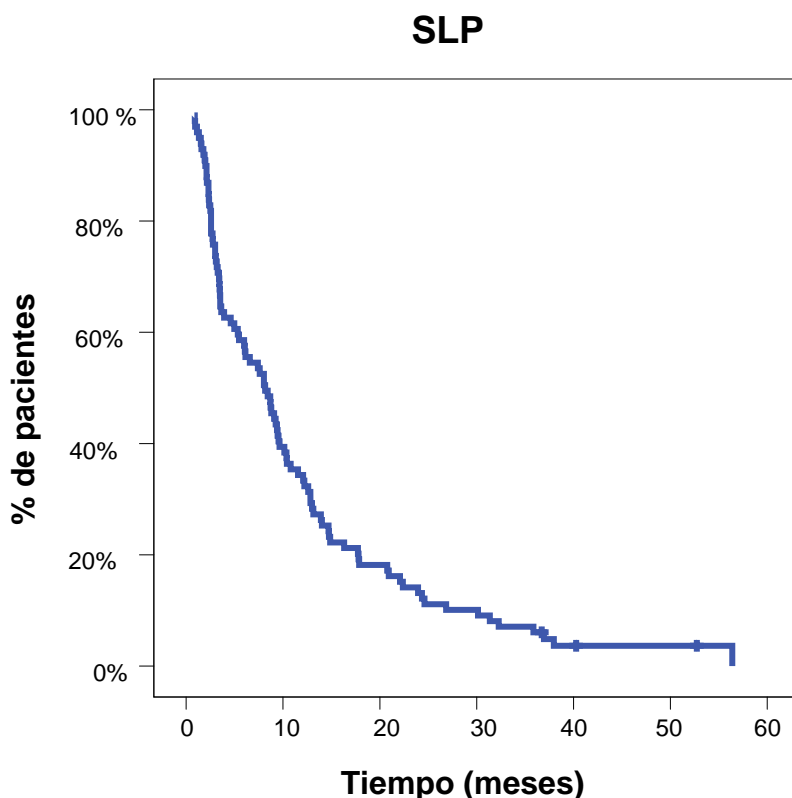


Figura 6 Supervivencia libre de progresión en las pacientes incluidas en el análisis.

Analizando la supervivencia libre de progresión en función de la sobreexpresión de HER2 en el tumor, observamos una mediana de SLP de 9,1 meses en las pacientes con cáncer de mama HER2 positivo y 5,3 meses en

aquellas HER2 negativas ($p=0.163$) (Figura 7). Hay que resaltar el hecho que para este análisis solo se tienen en cuenta los datos de las 98 pacientes de las que conocemos el estado de Her2.

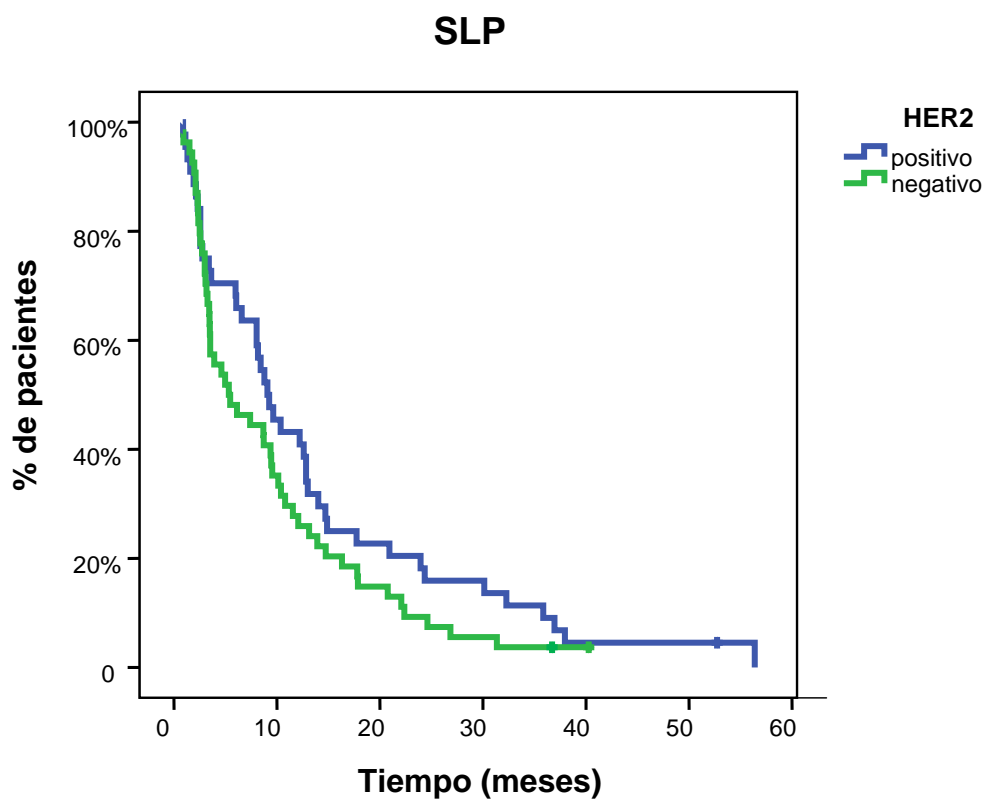


Figura 7. Supervivencia libre de progresión en función del estado de Her2.

6.4.3 Supervivencia global.

La mediana de supervivencia global de las 99 pacientes incluidas en el análisis fue de 26,1 meses (95% IC: 13.4-38.8) como se observa en la figura 8. La supervivencia global a los 2 años en las pacientes con sobreexpresión de Her2 en el tumor fue significativamente superior a aquellas Her2 negativas (59% vs 45%, log-rank test $p=0.026$) (Figura 9.)

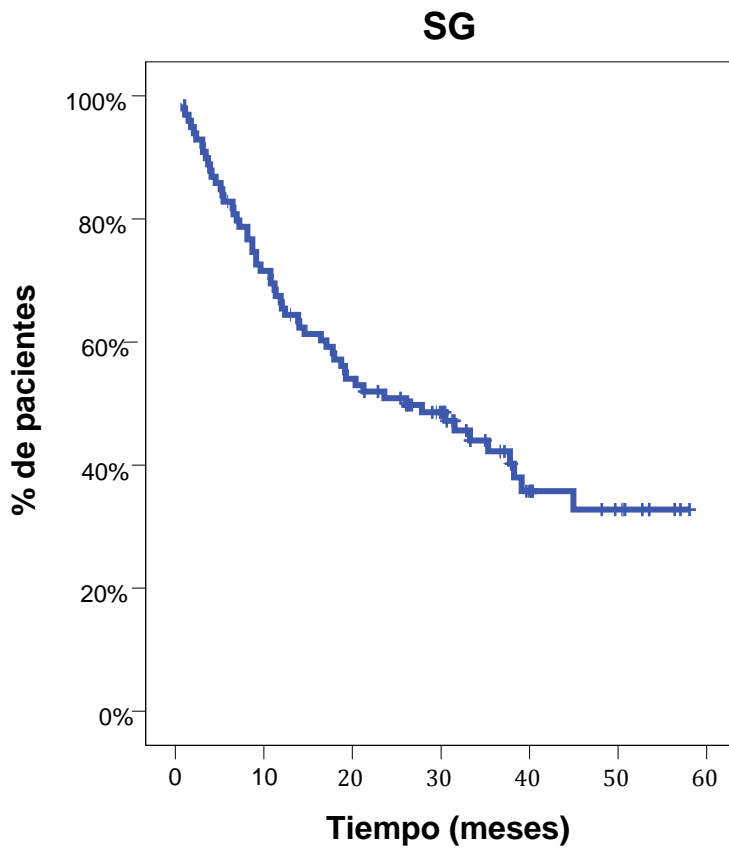


Figura 8. Supervivencia global de las pacientes incluidas en el análisis.

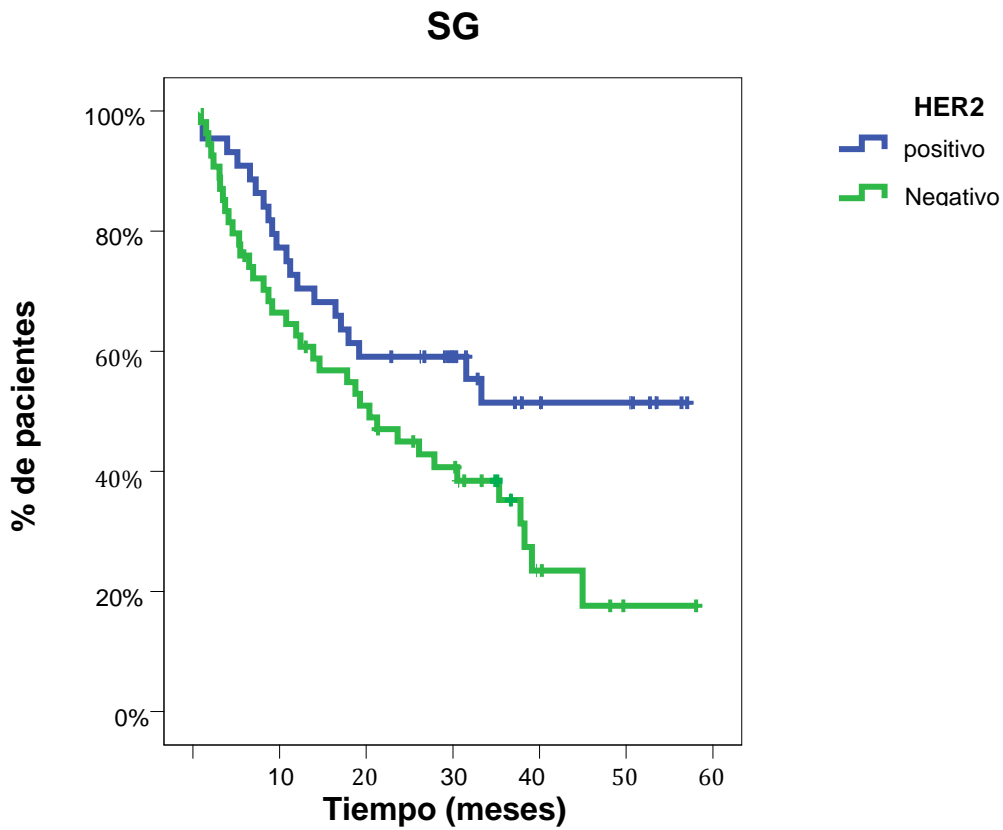


Figura 9. Supervivencia global en función del estado de Her2.

6.5 CORRELACIÓN ENTRE EL NÚMERO DE CTCs CUANTIFICADO EN EL DÍA 21 (CTC-21) Y AL INICIO DEL ESTUDIO (CTC-0) CON LA SUPERVIVENCIA GLOBAL.

6.5.1 Correlación CTC-21 y supervivencia global.

Las pacientes con 0-4 CTCs el día 21 tuvieron una supervivencia global mayor, de forma estadísticamente significativa, que aquellas con 5 o más CTCs en dicha determinación (objetivo primario del estudio). La mediana de supervivencia global fue de 38,3 meses (IC 95%: 26.1-50.4) para pacientes con 0-4 CTCs y 8,7 meses (IC 95%: 6,4 – 11,1) para pacientes con 5 o más de 5 CTCs (log-rank test $p < 0.001$). (Figura 10).

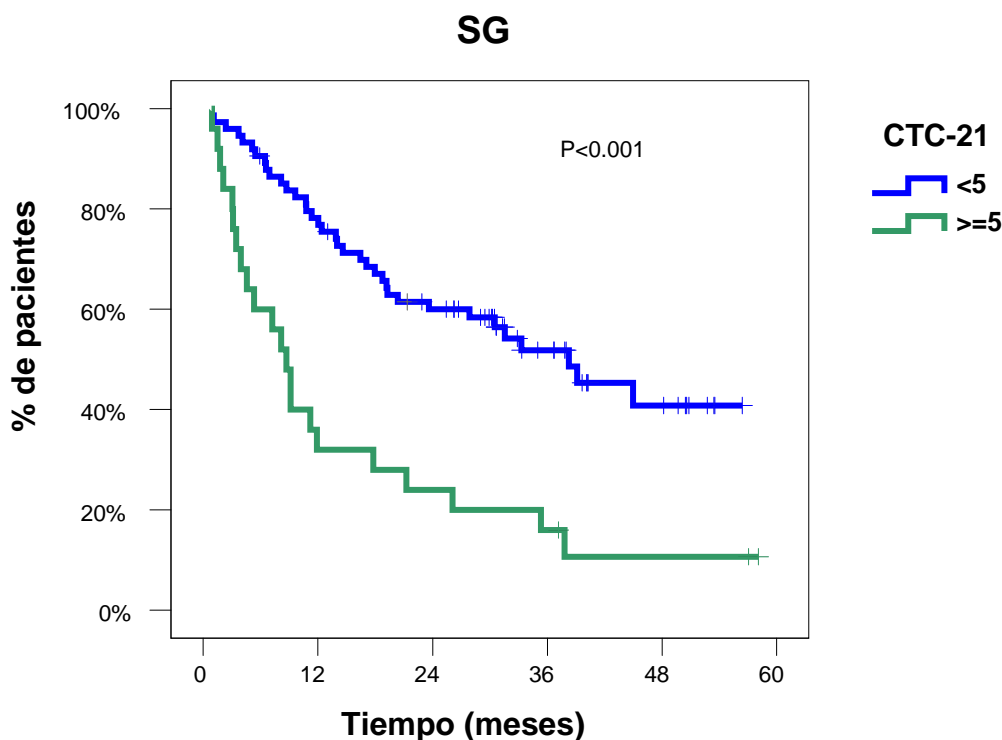


Figura 10. Supervivencia global de las pacientes con CMM incluidas en el estudio en función de la cuantificación de CTCs en el día 21 (0-4 vs 5 o más).

6.5.2 Correlación CTC-0 y supervivencia global.

La mediana de supervivencia global en pacientes con 0-4 y 5 o más CTCs antes de iniciar el tratamiento con quimioterapia (CTC-0) fue respectivamente de 33,3 meses (IC 95%: 21.8-44.8) y 17.8 meses (IC 95%:

10.7-24.9). La diferencia no fue estadísticamente significativa $p=0.105$, (log-rank test). (Figura 11).

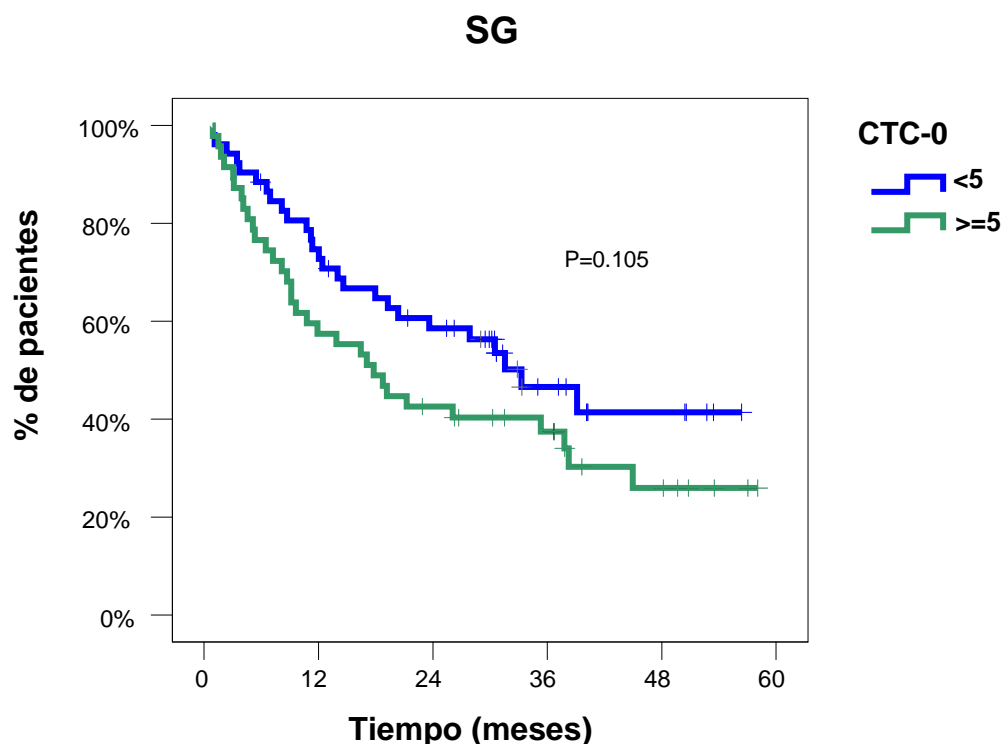


Figura 11. Supervivencia global en las pacientes con CMM incluidas en el estudio en función del número de CTCs en sangre periférica (0-4 vs 5 o más) previo al inicio del tratamiento con quimioterapia (CTC-0).

6.5.3 Análisis multivariante de factores predictores de supervivencia global

Para evaluar si el número de CTCs detectado en sangre periférica previo al inicio del tratamiento (CTC-0) y en el día 21 (CTC-21) tienen un valor predictivo independiente para supervivencia global, se elaboró un modelo de regresión múltiple de Cox en el que se incluyeron como variables independientes el número de CTCs basales (5 o más vs 0-4 CTCs), la edad (variable continua), sobreexpresión HER2 (positivo vs negativo), estado RE (positivo vs negativo), número de localizaciones metastásicas (2 o más vs 1), afectación visceral (sí vs no) y el número de líneas de quimioterapia previas (≥ 1 vs 0) y como variable dependiente la supervivencia global. Se realizó el mismo análisis con CTC-21. Se excluyeron de estos análisis 2 pacientes en las

que faltaban datos de las variables incluidas en el análisis (en una paciente desconocíamos el estado de HER2 y en el otro la positividad o negatividad de RE) (Tabla 2A y 2B)

Supervivencia Global				
Covariables	Hazard Ratio	Intervalo confianza 95%		Valor P
CTC-0 (0-4 vs >=5CTCs)	1,447	0,836	2,505	0,187
Edad	1,014	0,993	1,035	0,201
HER2 (positivo vs negativo)	0,592	0,334	1,048	0,072
RE (positivo vs negativo)	0,559	0,316	0,990	0,046
Núm. localizaciones metástasis (1 vs >=2)	1,639	0,885	3,038	0,116
Afectación visceral (si vs no)	1,759	0,791	3,909	0,166
Núm. Líneas previas de QT enf. Metastásica (0 vs >=1)	1,376	0,927	2,044	0,114

Tabla 2.A. Análisis multivariante regresión de Cox con número CTC basal.

Supervivencia Global				
Covariables	Hazard Ratio	Intervalo confianza 95%		Valor P
CTC-21 (0-4 vs >=5CTCs)	2,451	1,363	4,409	0,003
Edad	1,015	0,994	1,036	0,159
HER2 (positivo vs negativo)	0,652	0,361	1,175	0,154
RE (positivo vs negativo)	0,591	0,336	1,041	0,069
Núm. localizaciones metástasis (1 vs >=2)	1,303	0,696	2,440	0,409
Afectación visceral (si vs. no)	1,852	0,840	4,083	0,126
Núm. Líneas previas de QT enf. Metastásica (0 vs >=1)	1,335	0,880	2,024	0,174

Tabla 2.B. Análisis multivariante regresión de Cox con número CTC-21.

El número de CTCs en el día 21 fue la única variable fuertemente predictiva de supervivencia global de forma independiente ($p=0.003$)

6.6 CORRELACIÓN ENTRE EL NÚMERO DE CTCS CUANTIFICADO EN EL DÍA 21 (CTC-21) Y AL INICIO DEL ESTUDIO (CTC-0) CON LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN.

6.6.1 Correlación CTC día 21 (CTC-21) y supervivencia libre de progresión.

La mediana de supervivencia libre de progresión en función del número de células detectado en sangre periférica en el día 21 tras haber iniciado la nueva línea de tratamiento con quimioterapia fue de 9.4 meses (IC 95% 7.9-10.9) para pacientes con 0-4 CTCs y 3.0 meses (IC 95% 2.2-3.8) para pacientes con 5 o más CTCs ($p=0.001$). (Figura 12).

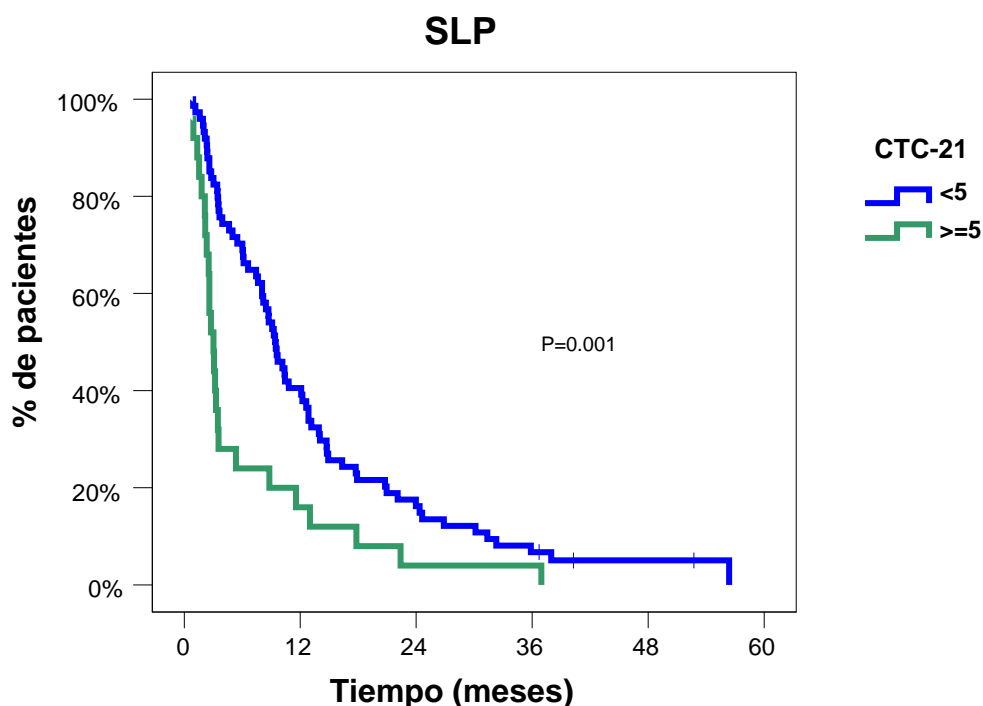


Figura 12. Supervivencia libre de progresión de las pacientes con CMM incluidas en el estudio en función de la cuantificación de CTCs en el día 21 (0-4 vs 5 o más).

6.6.2 Correlación CTC-0 y supervivencia libre de progresión.

Respecto a la supervivencia libre de progresión en las pacientes analizadas, en función al número de CTCs detectadas en sangre periférica al inicio del estudio (CTC-0) fue de 9.4 meses (IC 95% 7.6-11.3) en aquellas pacientes con 0-4 CTCs y de 3.5 meses (IC 95% 0-7.2) para aquellas pacientes con 5 o más CTCs ($p=0.045$). (Figura 13)

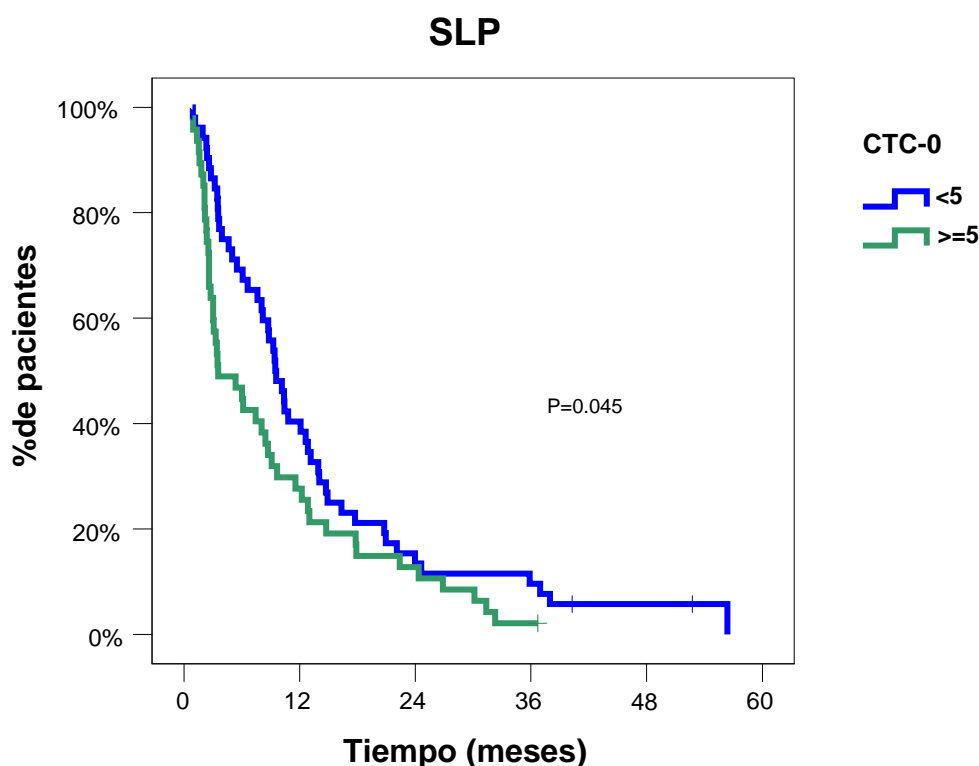


Figura 13. Supervivencia libre de progresión de las pacientes con CMM incluidas en el estudio en función de la cuantificación de CTCs previo al inicio del tratamiento con quimioterapia (CTC-0).

6.6.3 Análisis multivariante de factores predictores de supervivencia libre de progresión.

Para evaluar si el número de CTCs detectado en sangre periférica en el día 21 (CTC-21) y previo al tratamiento (CTC-0) tienen un valor predictivo independiente para supervivencia libre de progresión, se realizó un análisis de regresión de Cox en el que se incluyeron como variables independientes el

número de CTCs basales (5 o más vs 0-4 CTCs), la edad (variable continua), sobreexpresión HER2 (positivo vs negativo), estado RE (positivo vs negativo), número de localizaciones metastásicas (2 o más vs 1), afectación visceral (sí vs no) y el número de líneas de quimioterapia previas (≥ 1 vs 0) y como variable dependiente la supervivencia libre de progresión. Se realizó el mismo análisis con CTC-21. Se excluyeron nuevamente de estos análisis las 2 pacientes de las que desconocíamos alguna de las variables. (Tabla 3A y 3B).

El número de CTCs en el día 21 fue nuevamente la única variable independiente predictiva de supervivencia libre de progresión ($p=0.020$)

Supervivencia Libre de Progresión

Covariables	Hazard Ratio	Intervalo confianza 95%		Valor P
CTC-0 (0-4 vs ≥ 5 CTCs)	1,360	0,874	2,117	0,173
Edad	1,004	0,988	1,019	0,653
HER2 (positivo vs negativo)	0,787	0,506	1,225	0,289
RE (positivo vs negativo)	0,808	0,506	1,293	0,375
Núm. localizaciones metastásicas (1 vs ≥ 2)	1,565	0,985	2,486	0,058
Afectación visceral (sí vs no)	1,161	0,663	2,031	0,602
Núm. Líneas previas de QT enf. Metastásica (0 vs ≥ 1)	1,233	0,886	1,715	0,215

Tabla 3 .A. Análisis multivariante regresión de Cox con número CTC basal.

Covariables	Hazard Ratio	Intervalo confianza 95%		Valor P
CTC-21 (0-4 vs ≥ 5 CTCs)	1,850	1,102	3,106	0,020
Edad	1,005	0,990	1,020	0,538
HER2 (positivo vs negativo)	0,785	0,505	1,221	0,283
RE (positivo vs negativo)	0,880	0,552	1,402	0,591
Núm. localizaciones metástasis (1 vs ≥ 2)	1,339	0,835	2,147	0,226
Afectación visceral (si vs no)	1,314	0,742	2,329	0,349
Núm. Líneas previas de QT enf. Metastásica (0 vs ≥ 1)	1,237	0,889	1,720	0,207

Tabla 3.B. Análisis multivariante regresión de Cox con número CTC día 21.

6.7 CORRELACIÓN NÚMERO DE CTCs CON LA RESPUESTA OBJETIVA AL TRATAMIENTO RECIBIDO.

6.7.1 Correlación CTC-0 con la respuesta objetiva al tratamiento con quimioterapia.

Para estudiar la correlación entre el número de CTCs detectados en la muestra basal y la distribución de las distintas categorías de respuesta, estratificamos a las pacientes no solo en 4 categorías de respuesta objetiva sino en 2 grupos en función de CTCs basales (0-4 vs ≥ 5) tal y como queda reflejado en la tabla 4.A. De las 2 pacientes incluidas en el estudio que alcanzaron la remisión completa 1 paciente presentaba 0-4 CTCs basales y la otra paciente presentaba ≥ 5 CTC-0. 19 pacientes con respuesta parcial se encontraban en el grupo con 0-4 CTC-0 mientras que las 15 restantes tenían ≥ 5 CTC-0. Dentro del grupo de las pacientes que presentaron estabilización de la enfermedad, en 20 se detectaron 0-4 CTC-0 y en las otras 12, ≥ 5 CTC-0. Por último, en 12 de las pacientes con progresión de la enfermedad se

detectaron 0-4 CTCs en la determinación basal y en 19 \geq 5 CTCs en dicha determinación. Se realizó un análisis mediante test exacto de Fisher comprobando que no existe correlación de forma estadísticamente significativa ($p=0.230$) entre el número de CTCs previos al inicio del tratamiento con quimioterapia y la respuesta objetiva distribuida por categorías.

	CTC-0	
	0-4 CTCs N(%)	5 o más CTCs n(%)
Respuesta completa	1 (1.9%)	1 (2%)
Respuesta parcial	19 (36.5%)	15 (31.9%)
Enfermedad estable	20 (38.5%)	12 (25.5%)
Progresión	12 (23.1%)	19 (40.4%)
<i>Chi cuadrado de Pearson</i>	P=0.230	

Tabla 4A. Respuesta objetiva en función del número de CTCs basales (CTC-0)

La correlación entre la mejor respuesta radiológica obtenida mediante criterios RECIST y el número de CTCs detectado previo al inicio del tratamiento con quimioterapia, fue analizado también mediante Rho de Spearman no siendo estadísticamente significativo ($p=0.329$), no demostrando por tanto que a menos número de CTCs detectadas en sangre periférica de forma basal exista una menor progresión de la enfermedad.

Como parte del análisis se compararon la mediana de células tumorales circulantes basales en el grupo de pacientes que presentaron beneficio clínico (68 pacientes) y en aquellas con progresión (31 pacientes). Se definió como beneficio clínico aquellas pacientes que alcanzan la remisión completa, las que presentan respuesta parcial y aquellas pacientes que muestran estabilización de la enfermedad. Observamos que la mediana de células tumorales circulantes basales en el grupo de pacientes con progresión de la enfermedad (6.00) es mayor que en el grupo con beneficio clínico (2.00) (Tabla 4.B.)

Mejor Respuesta RECIST		CTC -0
Beneficio (N=68)	Media	41,31
	Mediana	2,00
	Desv. típ.	148,495
	Mínimo	0
	Máximo	1121
	Percentiles	
	25	,00
	50	2,00
	75	12,75
Progresión (N=31)	Media	51,94
	Mediana	6,00
	Desv. típ.	181,044
	Mínimo	0
	Máximo	1009
	Percentiles	
	25	1,00
	50	6,00
	75	19,00

Tabla 4B. Descripción de frecuencias de CTC-0 en función de beneficio clínico vs progresión.

Al analizar la tasa de beneficio clínico en relación al número de CTCs ésta es mayor en los pacientes con 0-4 CTCs basales (76,9%) vs aquellos pacientes con 5 o más CTC-0 (59,6%) pero no alcanza la significación estadística (P=0.083). (Tabla 4.C.)

	CTC-0	
	0-4 CTCs n(%)	5 o más CTCs n(%)
Beneficio	40 (76.9%)	28 (59.6%)
Progresión	12 (23.1%)	19 (40.4%)
<i>Test exacto Fisher</i>	P=0.083	

Tabla 4C. Correlación CTC-0 con la tasa de beneficio clínico/progresión.

En el modelo de regresión logística, aquellos pacientes con CTC-0 mayor o igual de 5 presentan un riesgo de progresión (OR) 2,26 (IC 95% 0.948-5.395) no estadísticamente significativo ($p=0.066$).

Por lo tanto podemos concluir este apartado con la idea de que aunque observamos una tendencia en la asociación entre el número de CTCs basales y la respuesta objetiva, en ningún caso alcanza la significación estadística.

6.7.2 Correlación CTC-21 con la respuesta objetiva al tratamiento con quimioterapia

En el análisis de la correlación entre el número de células tumorales circulantes en el día 21 tras el inicio del tratamiento y la respuesta objetiva de la enfermedad estratificada por categorías, podemos observar como aquellas pacientes con 5 o más CTCs en el día 21 progresan más que aquellas con 0-4 CTCs (56% vs 23%) de forma estadísticamente significativa ($p=0.024$) por lo que si existe correlación entre el número CTC-21 y la respuesta objetiva radiológica medida por criterios RECIST y dividida en 4 categorías (RC, RP, EE, Progresión). (Tabla 5.A.)

	CTC-21	
	0-4 CTCs n(%)	5 o más CTCs n(%)
Respuesta completa	2 (2.7%)	0
Respuesta parcial	28 (37.8%)	6 (24%)
Enfermedad estable	27 (36.5%)	5 (20%)
Progresión	17 (23%)	14 (56%)
<i>Chi cuadrado de Pearson</i>	P=0.024	

Tabla 5.A. Respuesta objetiva en función número CTC-21.

La correlación entre la mejor respuesta radiológica obtenida mediante criterios RECIST y el número de CTCs detectado tras haber iniciado el tratamiento (justo antes del segundo ciclo), fue analizado también mediante

Rho de Spearman. Se demostró que a menor número de CTCs detectadas tras haber iniciado el tratamiento con quimioterapia (CTC-21), menor progresión de la enfermedad ($p=0.001$).

Observando las medianas y la distribución de frecuencias de las células tumorales circulantes detectadas el día 21, destaca que aquellas pacientes que presentan progresión de la enfermedad muestran un número de células tumorales circulantes mayor (mediana 3 CTCs) que aquellas que no progresan (mediana 0 CTCs). (Tabla 5.B). Esta distribución queda también reflejada en el siguiente diagrama de caja (Figura 14). Por otra parte reseñar también que recordando la distribución de CTCs previo al inicio del tratamiento con quimioterapia (CTC-0) visualizada en el apartado anterior, destaca que en los dos estratos (beneficio y progresión) la mediana de células tumorales circulantes es mayor en la primera detección, antes de haber iniciado el tratamiento con quimioterapia, que en el día 21.

Mejor Respuesta RECIST		CTC -21
Beneficio (N=68)	Media	3.54
	Mediana	0
	Desv. típ.	9.76
	Mínimo	0
	Máximo	72
	Percentiles	
	25	0
	50	0
	75	3,75
Progresión (N=31)	Media	33.48
	Mediana	3,00
	Desv. típ.	86.473
	Mínimo	0
	Máximo	453
	Percentiles	
	25	0
	50	3.00
	75	20.00

Tabla 5B. Descripción de frecuencias de CTC-21 en función de beneficio clínico vs progresión

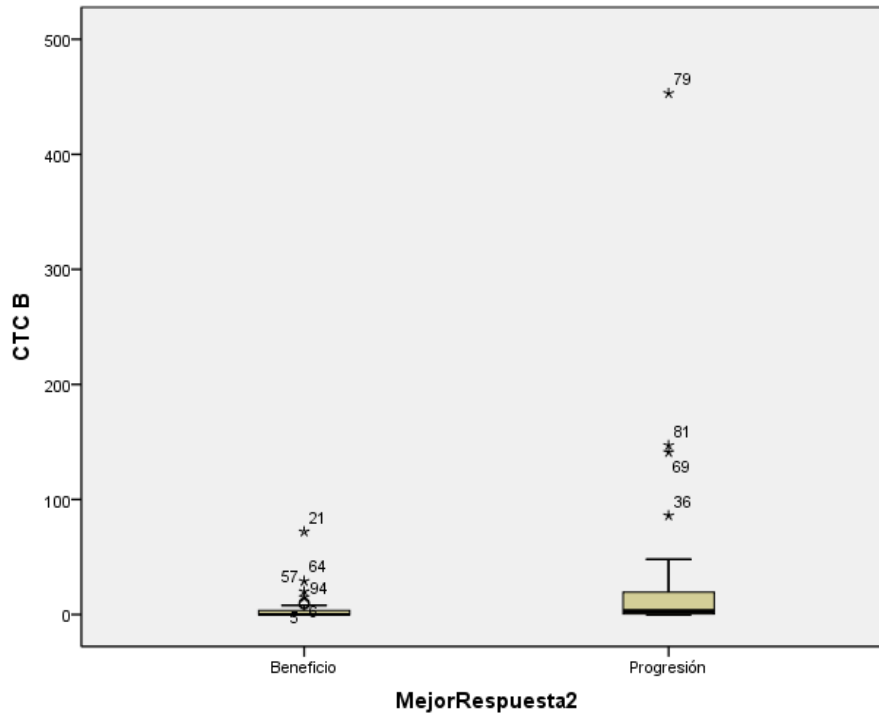


Figura 14. Diagrama de cajas de número de CTC-21 en función de respuesta vs progresión.

Al analizar la tasa de beneficio clínico, aquellas pacientes con 0-4 CTCs detectadas en el día 21 tras haber iniciado el tratamiento con quimioterapia fue mayor (77%) que aquellas pacientes en las que en ese momento se detectaron 5 o más CTCs (44%), de forma estadísticamente significativa ($p=0.005$). (Tabla 5.C)

	CTC-21	
	0-4 CTCs n(%)	5 o más CTCs n(%)
Beneficio	57 (77.0%)	11 (44.0%)
Progresión	17 (23.0%)	14 (56.0%)
<i>Test exacto Fisher</i>	P=0.005	

Tabla 5.C. Correlación CTC-21 con la tasa de beneficio clínico/ progresión.

En el modelo de regresión logística, aquellas pacientes con detección de 5 o más CTCs en el día 21 tras el inicio de la quimioterapia tienen un riesgo de progresión (OR) de 4,27 veces mayor que aquellas pacientes con una detección de 0-4 CTCs en esa determinación (IC 95% 1.64-11.12) (p=0.003).

A la vista del resultado de los diversos análisis previos, podemos concluir que existe una asociación estadísticamente significativa entre el número de CTCs detectado en sangre periférica en el día 21 tras el inicio de la quimioterapia (CTC-21) y la respuesta objetiva evaluada mediante técnicas radiológicas habituales (TC) según criterios RECIST 1.0.

7. ANÁLISIS ADICIONALES

7.1 CORRELACIÓN ENTRE SUPERVIVENCIA GLOBAL Y SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN CON EL NÚMERO DE CTCs DETECTADO TANTO EN EL DÍA 21 (CTC-21) COMO DE FORMA BASAL (CTC-0) ESTRATIFICADO EN 3 GRUPOS (0 VS 1-4 VS 5 O MÁS).

7.1.1. Correlación CTC-21 (0 vs 1-4 vs 5 o más) con supervivencia global.

Se analizó la supervivencia global mediante Kaplan-Meier de las pacientes con cáncer de mama metastásico incluidas en el estudio, dividiendo a dichas pacientes en 3 grupos en función de la cuantificación de CTC-21 (0 vs 1-4 vs 5 o más CTCs). No hubo diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia global entre las pacientes con 0 células y aquellas con 1-4 células (log-rank test $p=0.218$: la mediana de la supervivencia global de ambos grupos (45 meses y 31,6 meses respectivamente) fue significativamente superior a aquellas pacientes con 5 o más células (8,8 meses) (log-rank test $P<0.01$). (Figura 15).

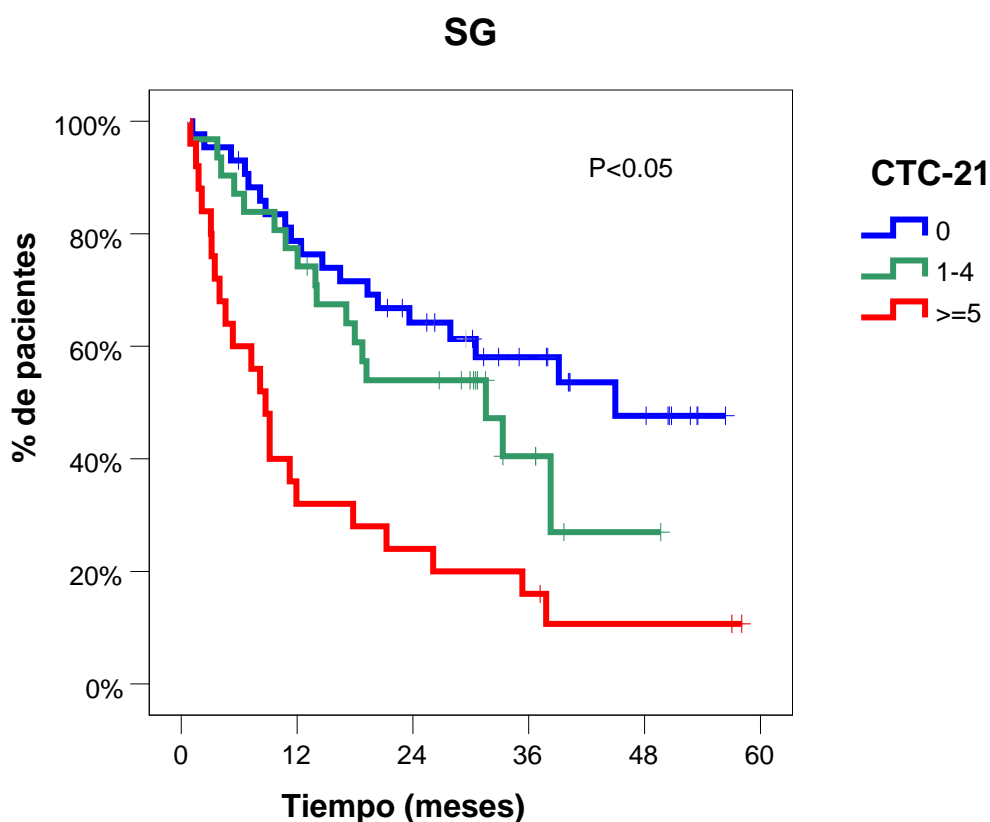


Figura 15. Supervivencia global en función de CTC-21 (0 vs 1-4 vs 5 o más).

7.1.2. Correlación CTC-0 (0 vs 1-4 vs 5 o más) con supervivencia global.

Las medianas de supervivencia global calculadas en las pacientes con cáncer de mama metastásico incluidas en el estudio, estratificadas en función del número de CTCs en la determinación basal (CTC-0), fueron de 33,3 meses para aquellas pacientes con 0 CTC-0, 27,9 meses en el grupo de pacientes con 1-4 CTC-0 y de 17,8 meses en aquellas pacientes con 5 o más CTC-0. Al comparar los grupos no hubo diferencias estadísticamente significativas de supervivencia global entre ninguno de ellos. (Figura 16).

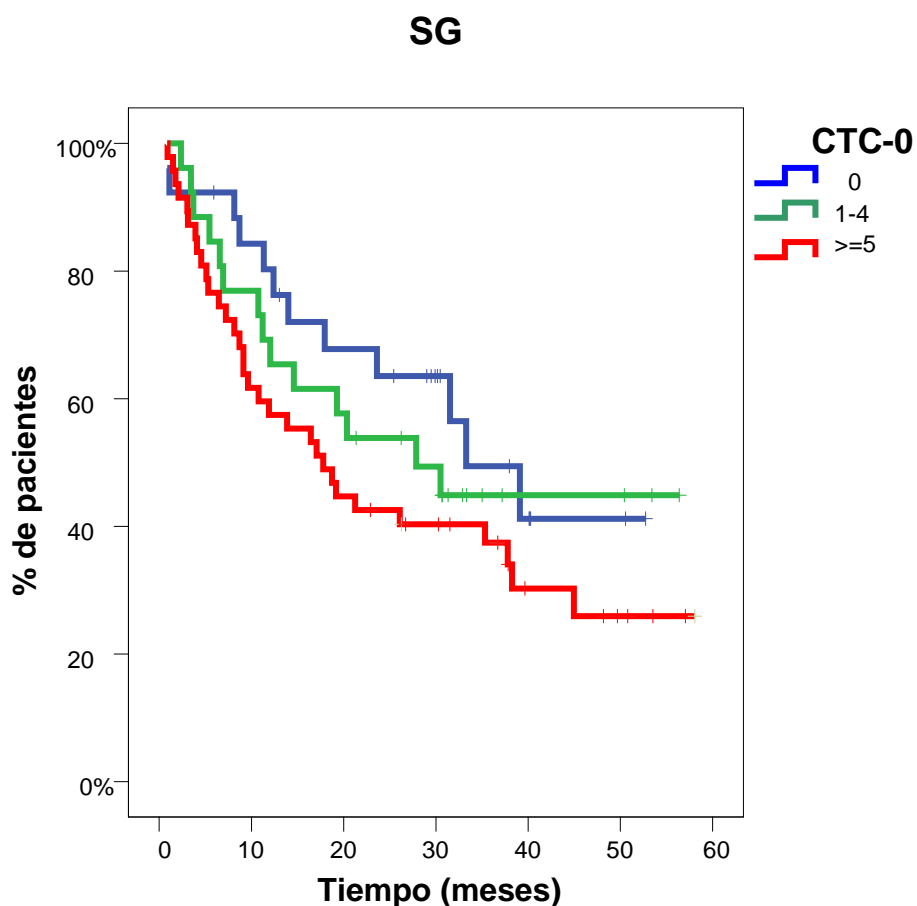


Figura 16. Supervivencia global en función CTC-0 (0 vs 1-4 vs 5 o más CTC)

7.1.3. Correlación CTC-21 (0 vs 1-4 vs 5 o más) con supervivencia libre de progresión.

Al analizar la supervivencia libre de progresión ocurre algo parecido que con la supervivencia global. Las medianas de supervivencia libre de progresión

en las pacientes con cáncer de mama metastásico incluidas en el estudio, en función del número de CTCs en el día 21 (CTC-21) fueron de 10,4 meses en aquellas con 0 CTC-21, 8 meses en las pacientes con 1-4 CTC-21 y de sólo 3 meses en las pacientes con 5 o más CTC-21. La diferencia entre los dos primeros grupos no fue estadísticamente significativa ($p=0.238$) pero si presentaron diferencias estadísticamente significativas al comparar la supervivencia libre de progresión de las pacientes de ambos grupos con aquellas pacientes con 5 o más CTC. Esta diferencia fue muy amplia entre 0 CTC y 5 o más CTC ($p=0.001$) y al límite de la significación estadística en el caso de 1-4 CTCs con 5 o más CTCs ($p=0.048$). (Figura 17).

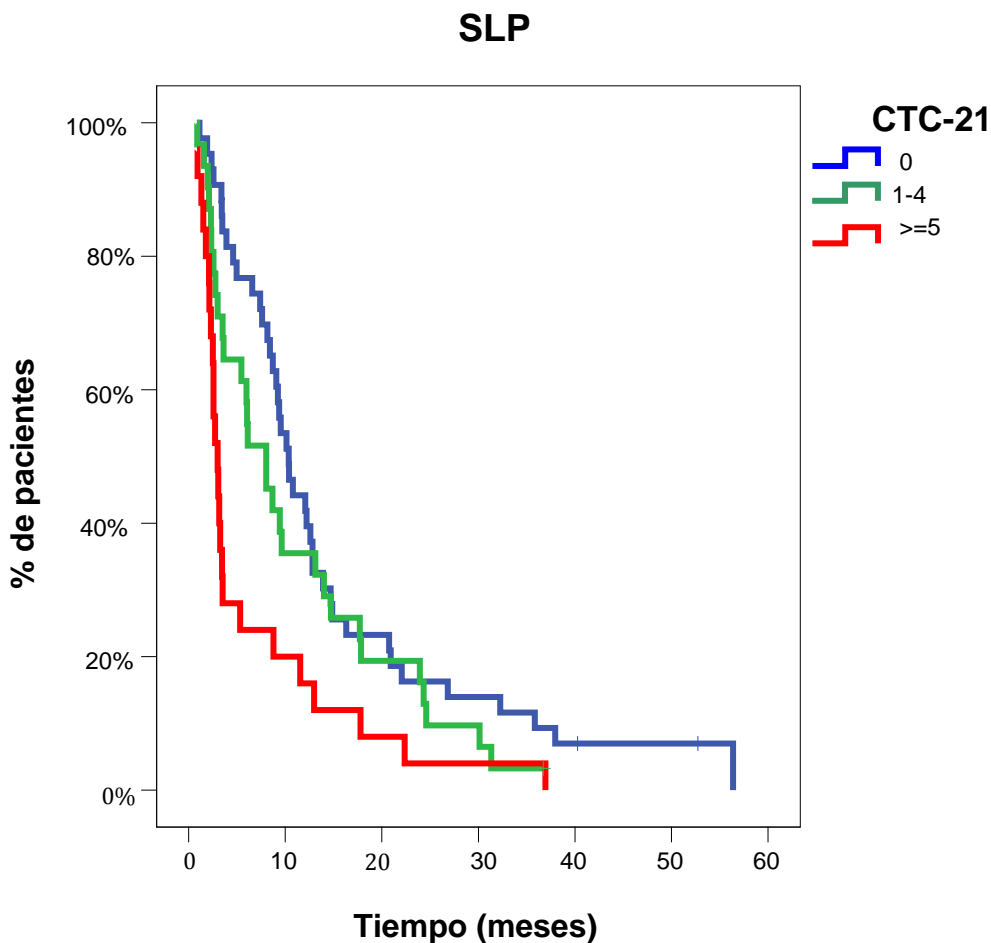


Figura 17. Supervivencia libre de progresión en función de CTC-21 (0 vs 1-4 vs 5 o más).

7.1.4. Correlación CTC-0 (0 vs 1-4 vs 5 o más) con supervivencia libre de progresión.

En cuanto a las medianas de supervivencia libre de progresión en función del número de CTCs detectado en la determinación basal del estudio, fue de 9,4 meses en aquellas pacientes con 0 CTC-0, 9,4 meses también en aquellas pacientes con 1-4 CTC-0 y de 3,5 meses en las pacientes con 5 o más CTC-0. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas de supervivencia libre de progresión entre ninguno de los grupos. (Figura 18.)

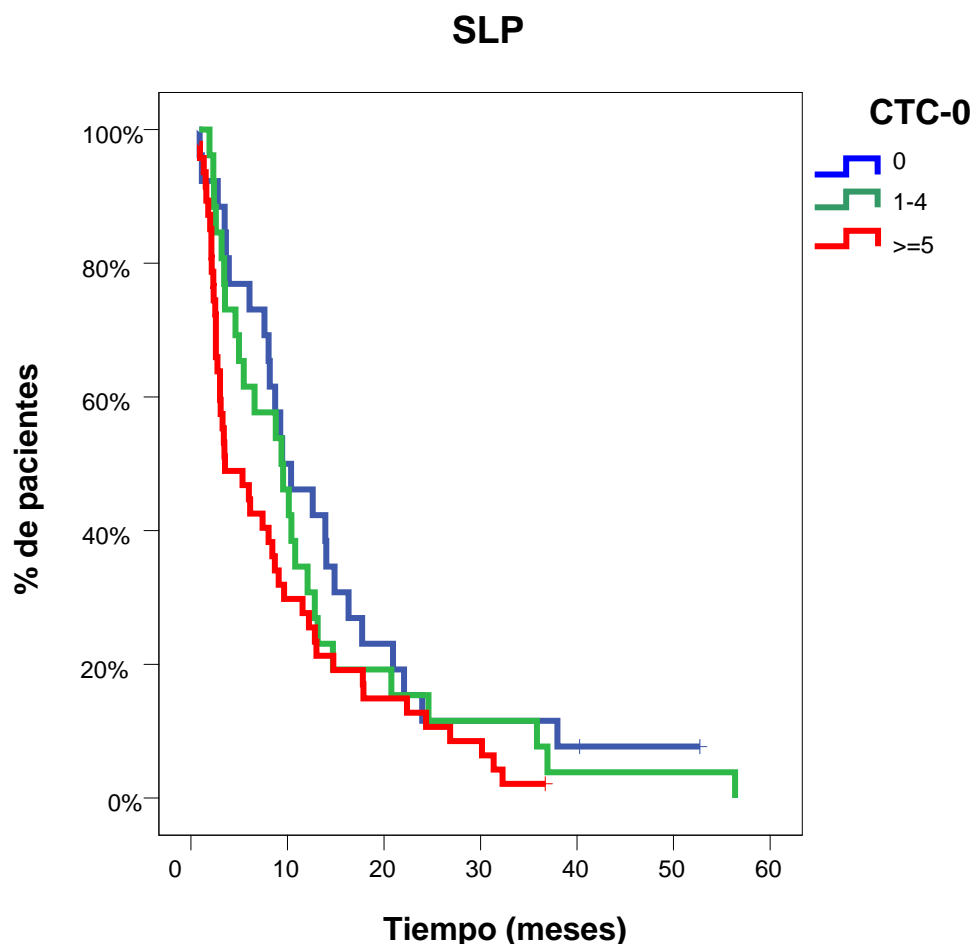


Figura 18. Supervivencia libre de progresión en función de CTC-0 (0 vs 1-4 vs 5 o más).

7.2. SUPERVIVENCIA GLOBAL Y SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN EN FUNCIÓN DE LA TRANSFORMACIÓN DE CTCs.

Para realizar este análisis de supervivencia mediante Kaplan-Meier las pacientes fueron divididas en tres grupos. El primer grupo fueron aquellas pacientes con CTCs basal y en el día 21 de 0-4 CTCs (49 pacientes), el segundo grupo aquellas que en la primera determinación presentaban 5 o más CTCs pero que en la determinación del día 21 ese número de CTCs era < 5 (25 pacientes), y por último las pacientes que tanto en la primera determinación como en la segunda presentaron un número de CTCs de 5 o superior (22 pacientes). El resto de las pacientes, es decir, aquellas con determinación de CTC basal menor a 5 CTCs pero que en el día 21 veían el número de CTCs aumentadas a 5 o más, no fueron incluidas en este análisis de supervivencia por ser únicamente 3 pacientes.

7.2.1 Supervivencia global en función de la transformación de CTCs.

La mediana de supervivencia global de las pacientes cuyo número basal de CTCs fue de 5 o más pero disminuyó a menos de 5 CTCs en la segunda determinación (CTC-21) fue similar que aquellas que tenían menos de 5 CTCs basales y que permanecían en ese rango después de haber iniciado el tratamiento con quimioterapia. Las medianas de supervivencia observadas fueron de 45 meses (IC 95% 10-80) y 33,3 meses (IC 95% 22-44,6) respectivamente, sin objetivarse diferencias estadísticamente significativas (log rank test $p=0.644$). Sin embargo si se observa una diferencia claramente significativa de ambas curvas con el grupo de pacientes que mantienen en ambas determinaciones un número de CTCs igual o mayor a 5 (log rank test $p<0.001$ en ambos casos). La mediana de supervivencia global observada en este último grupo fue de 8,2 meses (IC 95% 4,7-11,7). (Figura 19).

SG

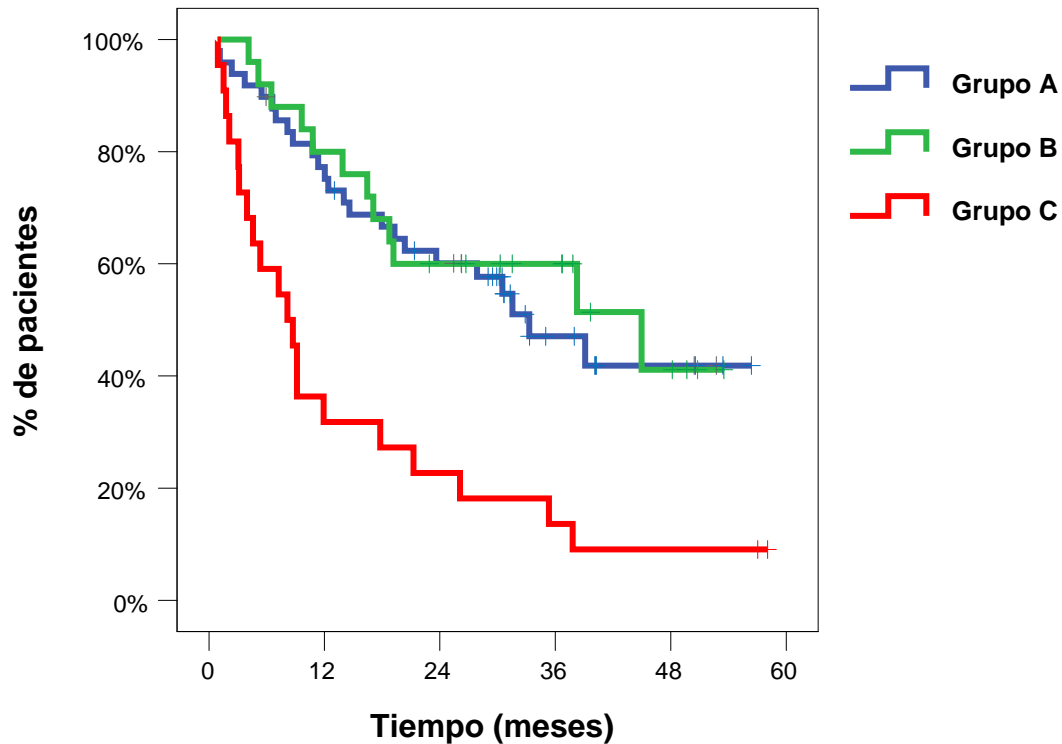


Figura 19. Supervivencia global en función de la transformación del número de CTCs del día 0 al día 21.

Curva azul: Pacientes con <5 CTCs en el día 0 y en el día 21. Curva verde: pacientes con ≥ 5 CTCs en el día 0 pero <5 CTCs en el día 21. Curva roja: Pacientes con ≥ 5 CTCs en el DIA 0 y en el día 21.

7.2.2. Supervivencia libre de progresión en función de la transformación de CTCs.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de supervivencia libre de progresión de las pacientes cuyo número basal de CTCs en el día 0 y en el día 21 fue de < 5 CTCs y en aquellas que en la primera determinación se detectaron 5 o más CTCs pero que disminuyeron a menos de 5 CTCs tras el inicio del tratamiento con quimioterapia (CTC-21). Las medianas de supervivencia libre de progresión observadas fueron de 9,4 meses (IC 95% 7,6-11,3) y 8,7 meses (IC 95% 7-10,4) respectivamente (log rank test $p=0.774$). Con respecto a aquellos pacientes que mantienen en ambas determinaciones un número de CTCs igual o mayor a 5 si que se

observa una diferencia estadísticamente significativa en la supervivencia libre de progresión (log rank test $p < 0.001$ y $p < 0.005$ respectivamente) con una mediana de supervivencia libre de progresión de 2,6 meses (IC 95% 2-3,1 meses). (Figura 20.)

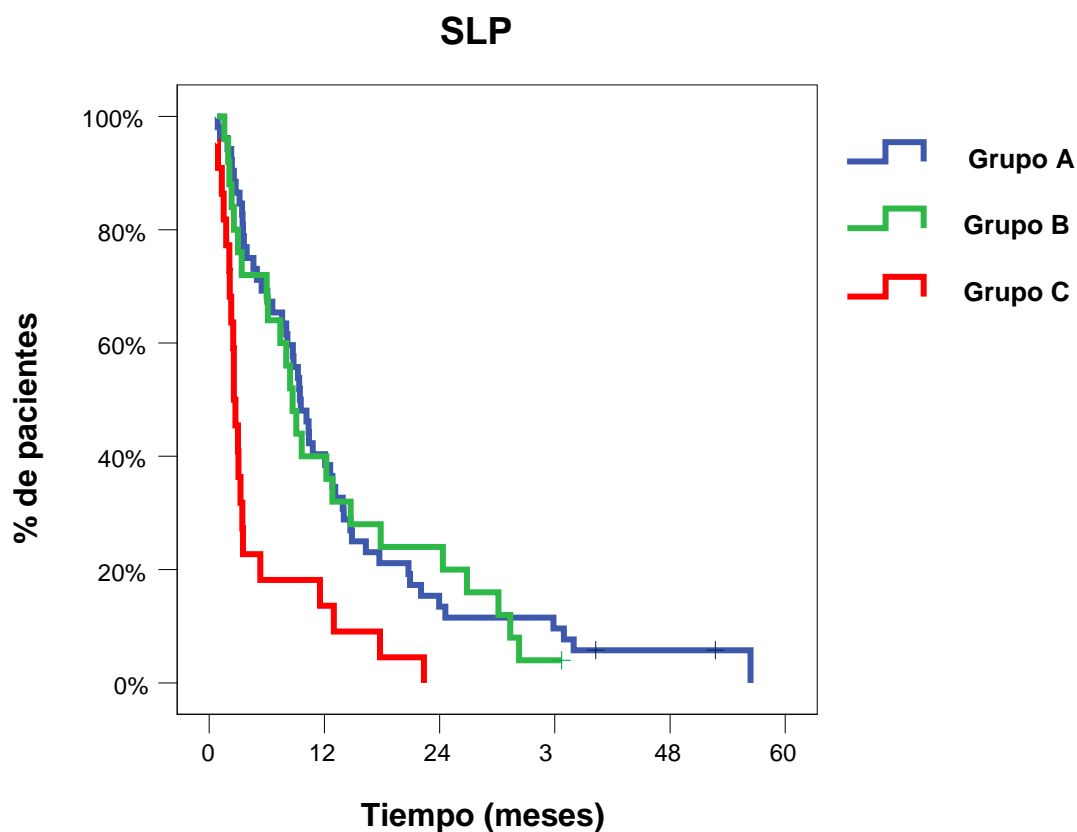


Figura 20. Supervivencia libre de progresión en función de la transformación del número de CTCs del día 0 al día 21.

Curva azul: Pacientes con < 5 CTCs en el día 0 y en el día 21. Curva verde: pacientes con ≥ 5 CTCs en el día 0 pero < 5 CTCs en el día 21. Curva roja: Pacientes con ≥ 5 CTCs en el día 0 y en el día 21.

7.3 SUPERVIVENCIA GLOBAL EN FUNCIÓN DEL NÚMERO DE CTCs EN EL DIA 21 Y SOBREENPRESIÓN O ASUENCIA DE HER-2.

7.3.1 Supervivencia global en función del número de CTCs en el día 21 en pacientes HER2 positivas

El valor predictivo del número de CTC-21 se estudió también en el grupo de pacientes con y sin amplificación HER-2.

En las pacientes con cáncer de mama metastásico HER-2 positivo se observó una tendencia a una mayor supervivencia en aquellas pacientes con menos de 5 células tumorales circulantes en el día 21 sobre aquellas con 5 o más sin llegar a alcanzar la significación estadística (mediana de supervivencia global de 9,1 meses con un 95% IC 8-10.2 para pacientes con 5 o más CTC, la mediana no se alcanzó durante el seguimiento en aquellas pacientes con CTCs en el día 21 < 5 , log-rank test- $p=0.051$). (Figura 21)

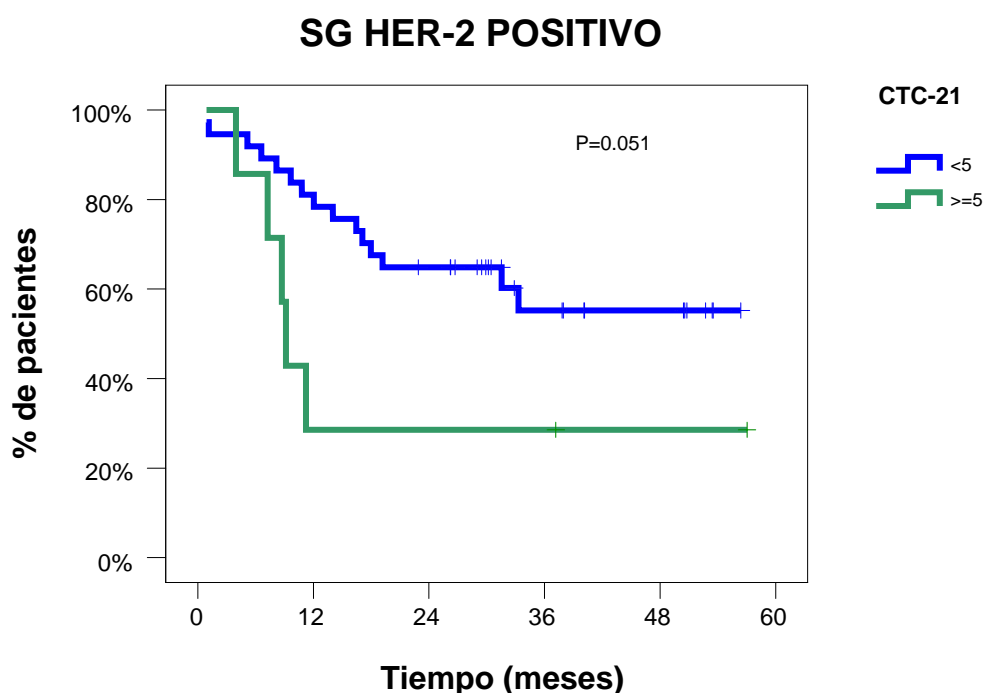


Figura 21. Supervivencia global en función del número de CTCs en el día 21 (0-4 vs 5 o más) en pacientes con cáncer de mama metastásico HER2 positivo incluidas en el estudio.

7.3.2 Supervivencia global en función del número de CTCs en el día 21 en pacientes HER2 negativas.

La diferencia de supervivencia global en las pacientes con cáncer de mama metastásico sin sobreexpresión de HER-2, fue estadísticamente significativa (log-rank test $p=0.001$). La mediana de supervivencia global en las pacientes con 5 o más CTCs en el día 21 fue de 5,3 meses (IC 95% 0-12,8) mientras que en las pacientes con 0-4 CTCs el día 21 fue de 30,5 meses. (Figura 22).

SG HER-2 NEGATIVO

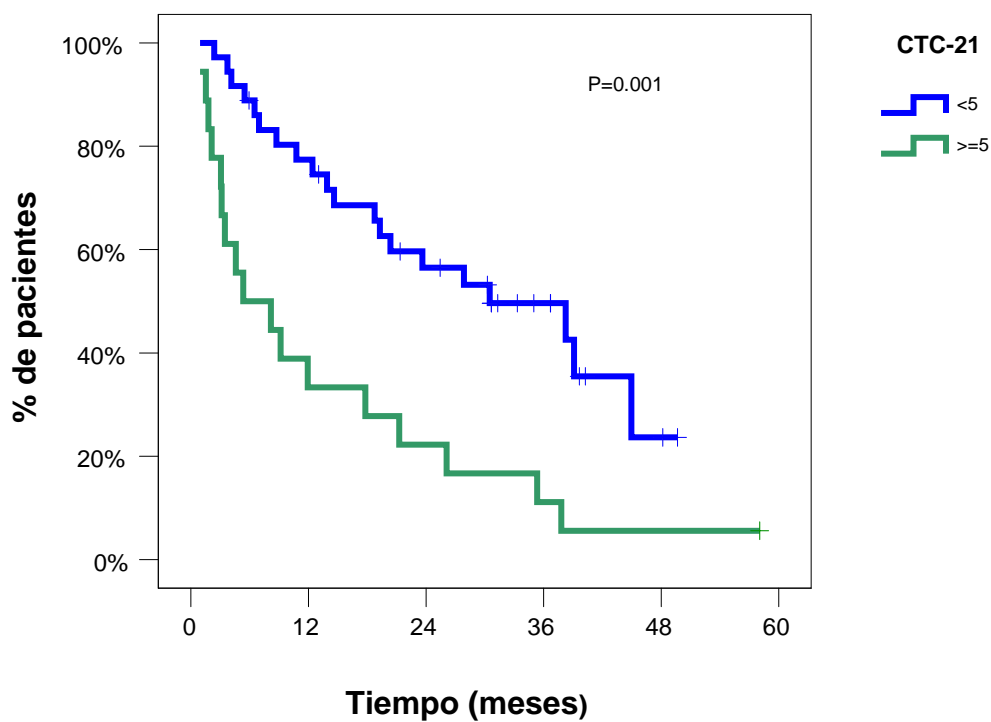


Figura 22. Supervivencia global en función del número de CTCs en el día 21 (0-4 vs 5 o más) en pacientes con cáncer de mama metastásico HER2 negativo incluidas en el estudio.

8. DISCUSIÓN

8.1 NÚMERO DE CTCs TRAS HABER INICIADO EL TRATAMIENTO CON QUIMIOTERAPIA COMO FACTOR PREDICTIVO DE LA EVOLUCIÓN DE LAS PACIENTES.

Nuestro estudio muestra que el número de células tumorales circulantes 21 días después de la administración del primer ciclo de quimioterapia en pacientes con cáncer de mama metastásico, predice la evolución y la respuesta de las pacientes.

El número de CTCs el día 21 se correlaciona de forma estadísticamente significativa con la respuesta clínica objetiva (evaluada mediante criterios RECIST 1.0), supervivencia libre de progresión y supervivencia global de las pacientes (objetivo primario del estudio), mientras que el número de células tumorales circulantes en la extracción basal previa al inicio del tratamiento no presentaba dichas correlaciones. El valor predictivo del número de CTCs en el día 21 se mantuvo en el análisis multivariante en el que se incluyeron factores pronósticos clásicos como la edad, la presencia o ausencia de RE, el estado de HER2, el número de sitios metastásicos así como la localización de la enfermedad metastásica, y el número de líneas de quimioterapia previas para enfermedad metastásica, indicando que el número de CTCs en el día 21 es un factor predictivo independiente.

Nosotros clasificamos a las pacientes en dos grupos (buen pronóstico y mal pronóstico) usando un punto de corte de 5 o más CTCs/7.5 ml de sangre, basado en la experiencia de Cristofanilli et al. Estos autores mostraron que este número de CTCs es el mejor umbral dicotomizador para la significancia pronóstica. En nuestro estudio este punto de corte también era apropiado puesto que al dividir a las pacientes del grupo de buen pronóstico en dos subgrupos (0 CTCs vs 1-4 CTCs) no conseguimos ninguna información relevante adicional.

El número de CTCs en el día 21 (inmediatamente antes del segundo ciclo de quimioterapia) es un predictor potente de respuesta, de hecho el factor predictivo independiente más potente. Las pacientes con menos de 5 CTCs en

el día 21, respecto a aquellas con 5 o más CTCs en dicha cuantificación, tuvieron una tasa de respuesta clínica objetiva significativamente mejor (tasa de beneficio clínico de 77% vs 44%. $P=0.051$), una supervivencia libre de progresión significativamente más larga (9.4 vs 3 meses, $p=0.001$) y una supervivencia global significativamente mejor (38.5 vs 8.7 meses, $p<0.001$).

Por el contrario, el número de CTCs basal, previo al inicio del tratamiento con quimioterapia presentó una débil correlación con la supervivencia libre de progresión y no se correlacionó de forma estadísticamente significativa con la respuesta clínica objetiva ni con la supervivencia global.

Tenemos que destacar que el grupo de pacientes con CTCs en la cuantificación basal de 5 o más pero que en la cuantificación del día 21 habían disminuido a menos de 5, tuvieron resultados similares que aquellas pacientes con menos de 5 CTCs en ambas determinaciones.

El significado biológico de estos resultados es un tema para especular. Puesto que el número de CTCs en el día 21 se correlaciona con la tasa de respuesta y supervivencia libre de progresión, esta determinación parece poseer un valor predictivo de respuesta al tratamiento inicial con quimioterapia. Sin embargo, también existe una importante correlación entre la cuantificación de CTCs en el día 21 y la supervivencia global. Puesto que las pacientes recibieron regímenes de quimioterapia posteriores al tratamiento del estudio, un bajo número de CTCs en el día 21 probablemente es indicativo de que la enfermedad no sólo es sensible a la línea de quimioterapia del estudio sino también a las siguientes.

8.2 IMPACTO DE LA CUANTIFICACIÓN DE CTCs DESCRITO EN LA LITERATURA.

Otros estudios publicados han investigado sobre el valor pronóstico y predictivo de las CTCs en cáncer de mama metastásico. Cristofanilli et al.¹⁴¹ publicaron los resultados de un estudio prospectivo, multicéntrico, de 177

pacientes con cáncer de mama metastásico con enfermedad medible en el que las CTCs eran determinadas antes de iniciar una nueva línea de quimioterapia y en la primera visita de seguimiento. El objetivo del estudio era evaluar la utilidad de la cuantificación de CTCs para predecir supervivencia libre de progresión y supervivencia global en pacientes con cáncer de mama metastásico. Los tratamientos incluían quimioterapia, inmunoterapia y tratamiento hormonal. En un análisis multivariante por regresión de Cox el nivel de CTCs basal y el de la primera visita fueron los factores más significativos en la predicción de supervivencia global y supervivencia libre de progresión. Al contrario que en nuestro estudio, estos autores no encontraron superioridad predictiva de la determinación de CTCs en la primera visita (3-4 semanas de haber iniciado el tratamiento) con respecto a la determinación basal. Esto se podría justificar con que alrededor del 30% de pacientes en el estudio de Cristofanilli et al¹⁵⁷ recibieron terapia hormonal o inmunoterapia, lo que nos puede hacer pensar que esas terapias podrían posiblemente producir una disminución de CTCs en sangre más lenta con respecto a la quimioterapia.

Pierga et al.¹⁴² publicaron los resultados del estudio IC 2006-04, un estudio multicéntrico que intentaba definir el valor predictivo de la cuantificación de CTCs basal y los cambios de CTCs en 267 pacientes con cáncer de mama metastásico tratadas con una primera línea de quimioterapia. La mediana de seguimiento de las pacientes fue de 14.9 meses y solo el 21% de ellas habían fallecido en el momento del análisis. Cuarenta y cuatro por ciento de las pacientes tenían 5 o más CTCs en la determinación basal. En un análisis multivariante, presentar 5 o más CTCs en la cuantificación basal fue un factor pronóstico independiente para supervivencia libre de progresión y supervivencia global. Considerando las determinaciones basales y tras el primer ciclo de quimioterapia, las pacientes con persistencia de número bajo de CTCs (menos de 5) y alto (5 o más) tuvieron el mejor y el peor resultado en términos de supervivencia global, respectivamente. Aquellas pacientes con número de CTCs mas alto en la cuantificación basal y que disminuían a número de CTCs bajo tras el primer ciclo de quimioterapia tenían una supervivencia global intermedia.

Liu et al.¹⁴³ correlacionaron el número de CTCs y la respuesta a la quimioterapia o tratamiento endocrino en 68 pacientes con cáncer metastásico. Las pacientes con 5 o más CTCs tenían 6.3 veces el riesgo de progresar de forma radiológica frente al resto de las pacientes. De forma similar, Budd et al.¹⁴⁴ estudiaron el valor predictivo de las pruebas de imágenes convencionales frente a la cuantificación de CTCs en 138 pacientes con cáncer de mama metastásico. En el momento del análisis, el 53% de las pacientes habían fallecido. Las pacientes sin progresión radiológica pero con 5 o más CTCs tuvieron una mediana de supervivencia global significativamente más corta que aquellas sin progresión radiológica pero con menos de 5 CTCs (15.3 vs 26.9 meses, $p=0.0039$). Por lo tanto la cuantificación de CTCs podría añadir información predictiva a las pruebas de imagen convencionales. Por otra parte, ante la importancia actual que está adquiriendo el PET-TC en la monitorización de la respuesta en algunas patologías oncológicas, sobre todo en aquellas pacientes en las que existen dudas razonables por las características de su patología tras realización de un TC convencional, Ugo de Giorgi et al.¹⁴⁵ compararon el valor pronóstico del PET-TC y la cuantificación de CTCs para la monitorización del tratamiento sistémico en pacientes con CMM en una población de 102 pacientes. En el análisis multivariante realizado, únicamente los niveles de CTCs a las 9-12 semanas permanecen estadísticamente significativos para predecir SG. La cuantificación de CTCs de 5 o más CTCs a las 9-12 semanas del inicio del tratamiento sistémico puede predecir el pronóstico de las pacientes con CMM más allá del PET-TC. El PET-TC sin embargo parece tener un papel al predecir la supervivencia en aquellas pacientes con resultados discordantes y CTCs < 5 durante la monitorización terapéutica.

En el siguiente cuadro se muestra un resumen del objetivo, tiempo de seguimiento y supervivencia y el diseño de alguno de los estudios arriba mencionados así como otros de nuestro interés (Tabla 6).

	Población y tamaño muestral	Objetivo principal	Seguimiento y supervivencia	Diseño
	CMM en progresión pendiente de iniciar nueva línea tratamiento con quimioterapia. 1 solo centro. Estudio prospectivo. 99 pacientes.	Correlacionar número de CTCs en el día 21 (justo antes del segundo ciclo de QT) con SG, SLP y respuesta objetiva.	Mediana seguimiento pacientes vivas 35 meses. SLP 8,1 m (IC 95% 5,5-10,8) SG 26,1 m (IC 95% 13,4-38,8 m)	-Se comparan y evalúan los niveles de CTCs antes de iniciar tratamiento con QT y justo antes del segundo ciclo de QT para explorar valor pronóstico y predictivo en cuanto a SG, SLP y respuesta objetiva al tratamiento.
<i>Cristofanilli et al.</i> ¹⁵⁷ . (2004)	CMM en progresión, enfermedad medible pendiente de iniciar nueva línea tratamiento sistémico. Estudio prospectivo, multicéntrico (20 centros). 177 pacientes.	El número de CTCs pueden predecir supervivencia en pacientes con CMM.	Mediana seguimiento truncado a los 9 m. SLP 5 m (IC 95% 4-6.4) SG 18 m (IC 95%14.6->18)	- Se comparan y evalúan los niveles de CTCs antes de iniciar el tratamiento sistémico y a las 3-4 semanas después del inicio para predecir SLP y SG.
<i>Hayes et al.</i> ¹⁴⁶ (2006)	Misma población y tamaño muestral que Cristofanilli et al.	El número de CTCs puede predecir respuesta al tratamiento, SLP y SG.	Mediana seguimiento truncado a los 9 m SLP 5 m (IC 95% 4-6.4) SG 18 m (IC 95%14.6->18) Mediana de seguimiento de las pacientes vivas 19.5 m	-Se comparan y evalúan los niveles de CTCs antes de iniciar el tratamiento sistémico y a las 3-5, 6-8, 9-15, 15-20 semanas después del inicio del tratamiento para predecir SLP y SG.
<i>Miguel Martin et al.</i> ¹⁴⁷ (2009)	Pacientes con CMM hospitalizadas por complicaciones de la enfermedad. En tratamiento sintomático excepto 3 pctes. con tratamiento con tamoxifeno y 4 pctes. pendientes de iniciar nueva línea de quimioterapia. 1 solo centro. 58 pacientes (51 evaluables)	Evaluar posibles variaciones circadianas en el número de CTCs en pacientes con CMM.		-Extracción de sangre periférica y cuantificación de CTCs en cohorte de pacientes hospitalizadas con CMM a las 8:00 y a las 20:00 h para evaluar si existe una variación circadiana en el número CTCs.
<i>Minetta C. Liu et al.</i> ¹⁵⁹ (2009)	Pacientes con CMM y enfermedad medible radiológicamente, pendientes de iniciar nueva línea de tratamiento sistémico . Estudio prospectivo, longitudinal. 3 centros. 74 pacientes evaluables para SLP, 68 pacientes evaluables para medir la correlación entre CTCs y la respuesta radiológica.	El número de CTCs puede correlacionarse a la vez o por adelantado con la progresión radiológica de la enfermedad	Mediana de seguimiento de 13.3 meses. SLP 4.5 m	-Extracción de sangre periférica y cuantificación de CTS previo al inicio de nuevo tratamiento sistémico, a las 3-5 semanas, y a las 7-9 semanas después de haber iniciado el tratamiento. Correlación del número de CTCs con el resultado radiológico de las pruebas de imagen realizadas cada 9-12 semanas. -Correlación de número de CTCs y SLP
<i>Ugo de Giorgi et al.</i> ¹⁶¹ (2009)	Pacientes con CMM incluidas en estudios prospectivos previos en MD Anderson. Pacientes con enfermedad metabólicamente detectable por PET-TC y pendientes de iniciar nueva línea de tratamiento sistémico. Estudio retrospectivo. 1 centro. 102 pacientes evaluables	Comparar el valor pronóstico del PET-TC y la cuantificación de CTCs para la monitorización del tratamiento sistémico en pacientes con CMM.	Mediana de seguimiento de las pacientes vivas 18,2 m. SG 15.7 m ± 7,8 m SLP 7,7 m ± 6.2 m	-Extracción de sangre periférica para cuantificación de CTCs y realización de PET-TC previo al inicio del tratamiento y a las 9-12 semanas. Comparación de niveles de CTCs y respuesta al tratamiento mediante PET-TC a las 9-12 semanas. -Comparación de cuantificación de CTCs y PET-TC como métodos para predecir supervivencia.

	Población y tamaño muestral	Objetivo principal	Seguimiento y supervivencia	Diseño
<i>Giuliano et al.</i> ¹⁴⁸ (2011)	Pacientes con CMM que habían recibido primera línea de tratamiento sistémico en MD Anderson. Estudio retrospectivo. 1 centro. 235 pacientes evaluables.	Estudiar el impacto pronóstico de la cuantificación basal de CTCs en función de los distintos tratamientos sistémicos en primera línea.	Mediana de seguimiento de 17 meses. Mediana de seguimiento en pacientes vivas 18 meses.	-Todas las pacientes tenían cuantificación basal de CTCs previo al inicio del tratamiento sistémico de primera línea. -Se realizó análisis de SLP y SG en función del número de CTCs (<5 o > o igual a 5). Posteriormente se realizó análisis por subgrupos en función de tipo de tratamiento sistémico (tratamiento endocrino, quimioterapia, quimioterapia+ bevacizumab, quimioterapia+antiHER2)
<i>Piarga et al.</i> ¹⁵⁸ (2011)	Pacientes con CMM pendientes de iniciar primera línea de tratamiento sistémico con quimioterapia +/- tratamiento dirigido antiHer2/bevacizumab. Estudio prospectivo. 5 centros. 267 pacientes evaluables.	Estudiar el valor pronóstico de los niveles de CTCs para SLP y SG. Comparar CTCs y marcadores séricos (tumoraes y no tumoraes) como factores pronósticos (correlación con SLP) antes y durante el tratamiento.	Mediana de seguimiento 14.9 meses.	-Extracción de sangre con marcadores tumorales (CEA, CA 15.3 y CYFRA 21.1) y no tumorales (LDH, fosfatasa alcalina) en la inclusión, antes del ciclo 2, antes del ciclo 3-4 y a la progresión. -Análisis de CTCs a la inclusión, antes del ciclo 2, antes del ciclo 3-4 y a la progresión. -Se realizó análisis de SLP para cada marcador y para CTCs, separando en 4 subgrupos para cada marcador en función de si se encontraba elevado o no antes del ciclo 1 y antes del ciclo 2.
<i>Giordano et al.</i> ¹⁴⁹ (2012)	Pacientes con CMM, enfermedad medible pendientes de iniciar nueva línea tratamiento sistémico. Estudio retrospectivo, 1 centro (MD Anderson). 517 pacientes	Comparar el valor pronóstico de los niveles de CTCs entre los distintos subtipos histológicos de CMM.	Mediana de seguimiento 24.6 meses.	-Se dividieron a las pacientes en 4 grupos en función de estado inmunohistoquímico de receptores hormonales y estado de Her2 (HR+/HER2 -; HR+/HER2+; HR-/HER2+; triple negativo). -Análisis del número de CTCs previo al inicio del tratamiento. -Correlación de SLP y SG en función de número de CTCs (<5 vs > o igual a 5) en cada subgrupo.

Tabla 6. Descripción de población muestral, objetivo, tiempo de seguimiento y diseño de estudios publicados en la literatura sobre CTCs.

Los objetivos de nuestro estudio eran de alguna forma distintos de los de los ensayos clínicos mencionados anteriormente, ya que fue diseñado para estudiar de forma específica el valor predictivo de CTCs en el día 21. Las implicaciones prácticas de nuestros resultados, que son consistentes con los resultados de otros estudios, son esencialmente dos. Primero, un número elevado de CTCs en el día 21 es un indicador precoz de pobre respuesta y puede identificar a un grupo de pacientes con baja sensibilidad no solo a la quimioterapia administrada, sino a la quimioterapia convencional en general. Esta información podría ser un valor añadido a la ya publicada habilidad de pronosticar la respuesta con la cuantificación de CTCs antes de la quimioterapia. Segundo, la determinación de CTCs en el día 21 podría ser utilizada para seleccionar pacientes, en función del grupo pronóstico, para su inclusión en tratamientos nuevos experimentales.

En el siguiente cuadro se describen los resultados obtenidos en diferentes estudios (Tabla 7). En cualquier caso, tras los datos publicados en sucesivos estudios así como los resultados descritos en el nuestro, está garantizada la realización de ensayos para probar el interés de una modificación terapéutica temprana en aquellos pacientes con 5 o más CTCs en el día 21 tras haber iniciado el tratamiento con quimioterapia.

	Características	Resultados
	<ul style="list-style-type: none"> -Tratamiento únicamente con quimioterapia. -Se estudia de forma adicional la correlación del número de CTCs basal con SG, SLP y respuesta objetiva. -Evalúa de forma adicional a correlación entre SG y SLP con el número de CTCs tanto en el día 21 como basal estratificado en 3 grupos (0, 1-4 vs 5 o más). -Analiza también la SG y la SLP en función de la transformación de CTCs entre las dos determinaciones en sangre periférica. -Analiza la SG en función del número de CTCs en día 21 según sobreexpresión de HER2. 	<ul style="list-style-type: none"> -Niveles de CTCs en el día 21, tras el inicio de nueva línea de QT, es un factor pronóstico de SG y SLP y predictivo de respuesta. Mantiene el valor predictivo en análisis multivariante. -Débil correlación de número de CTC basal con SLP. No existe correlación ni con SG ni con respuesta objetiva. -Aquellos pacientes que en la determinación de CTCs basal tienen 5 o más CTCs pero que disminuyen en la cuantificación del día 21 a <5, tienen supervivencia global similar a aquellos que ya tenían de inicio una cuantificación de CTCs < 5. - En pacientes HER2 positivo existe tendencia a un aumento de SG en aquellas pacientes con CTC-21 <5. En pacientes HER2 negativo existe diferencia estadísticamente significativa con mejor SG en pacientes con CTC-21 <5 respecto a aquellas con 5 o más.

	Características	Resultados
Cristofanilli et al. ¹⁵⁷ (2004)	<ul style="list-style-type: none"> -Distintas modalidades tratamiento sistémico -Se estudia de forma adicional el número de CTCs en sangre periférica en pacientes sanas o con patología benigna de mama (grupo control) -Estudia el punto de corte de CTCs más adecuado para establecer un grupo de buen pronóstico y un grupo de mal pronóstico en pacientes con CMM en función de CTCs. 	<ul style="list-style-type: none"> -Niveles de CTCs antes de iniciar un nuevo tratamiento y en la primera visita son un fuerte predictor de progresión rápida y muerte en pacientes con CMM. -CTCs elevadas sólo aparecen en patología maligna. Grupo control: ningún paciente presenta > 2 CTCs -Establece punto de corte pronóstico en < 5 CTCs vs \geq 5/7.5ml.
Hayes et al. ¹⁶² (2006)	<ul style="list-style-type: none"> -Distintas modalidades tratamiento sistémico -Se estudia de forma adicional la SLP y la SG de las pacientes con CMM divididas en 4 subgrupos en función del cambio de número de CTCs entre la determinación basal y a las 15-20 semanas de haber iniciado el tratamiento. 	<ul style="list-style-type: none"> -Niveles de CTC en cualquier momento durante el tratamiento predicen progresión y mortalidad en pacientes con CMM. -Paciente con CTCs elevados en la primer visita, que pasan en la determinación de la 15-20 sem a < 5 CTCs tienen una SLP y una SG similar a aquellas pacientes que nunca han presentado CTCs elevados. -SG de pacientes que pasan de CTCs no elevadas a 5 o más CTCs es menor que aquellas cuyas CTCs en la determinación a las 15-20 sem son < 5 pero mayor que la SG de las pacientes que siempre han presentado CTCs elevadas.
Miguel Martin et al. ¹⁶³ (2009)	<ul style="list-style-type: none"> -Pacientes con CMM hospitalizadas, en tratamiento sintomático, excepto 3 pacientes en tratamiento con tamoxifeno y 4 pacientes pendientes de iniciar nueva línea de quimioterapia. -Una única extracción de 58 voluntarias sanas como grupo control (ninguna CTC aislada) 	<ul style="list-style-type: none"> -Únicamente 2 pacientes podrían ser clasificados en grupos pronósticos distintos (< 5 CTCs vs 5 o más) en función de las 2 determinaciones realizadas. -El número de CTCs en SP en CMM no es diferente de forma significativa a las 8:00 que a las 20:00 h por lo que se descarta la influencia de un ritmo circadiano en la cuantificación de CTCs.
Mintetta C. Liu et al. ¹⁵⁹ (2009)	<ul style="list-style-type: none"> -Distintas modalidades de tratamiento sistémico. -Se estudia de forma adicional la correlación entre el número de CTCs y la progresión radiológica de la enfermedad estratificada en función del tipo de tratamiento (quimioterapia o hormonoterapia) -No se estudia la correlación entre número de CTCs y supervivencia global. 	<ul style="list-style-type: none"> -Se demostró en pacientes recibiendo QT o tratamiento endocrino, correlación estadísticamente significativa entre los niveles de CTCs y la progresión radiológica en el mismo momento de la prueba de imagen (OR 6,3), 3 a 5 semanas previas a la imagen (OR 3,1) y 7 a 9 semanas previas a la imagen (OR 4,9). -Resultados de los análisis estratificados por tipo de tratamiento se mantuvo estadísticamente significativo excepto en el grupo de 7 a 9 semanas previas a la prueba de imagen en el que solo mantuvo la significación estadística el grupo tratado con QT. -Se observó una SLP más corta en aquellos pacientes con 5 o más CTCs a las 3 o 5 semanas (3.1 vs 5.1 m; p=0.07) y altamente significativo a las 7 o 9 semanas de haber iniciado el tratamiento (2.5 vs 6.7 m p<0.001). No asociación significativa entre SLP y número de CTCs previo al inicio del tratamiento.

	Características	Resultados
Ugo De Giorgi et al. ¹⁶¹ (2009)	<ul style="list-style-type: none"> -Distintas modalidades tratamiento sistémico -Se estudia de forma adicional la SG de las pacientes con CMM divididas en 4 subgrupos en función del cambio de número de CTCs entre la determinación basal y a las 9-12 sem de haber iniciado el tratamiento. -Se realiza de forma adicional análisis univariante y multivariante para determinar la asociación entre factores de interés y SG. 	<ul style="list-style-type: none"> -Niveles CTCs a las 9-12 semanas se correlaciona con respuesta en el PET-TC en el 67% de las pacientes. Los pacientes con respuesta completa tuvieron una mediana de CTCs a las 9-12 semanas de 0. --El PET-TC fue capaz de predecir la supervivencia en pacientes con resultados discordantes con < 5 CTCs a las 9-12 sem pero no en aquellos con ≥ 5 CTCs. -En el análisis multivariante únicamente los niveles de CTC a las 9-12 semanas permanecen estadísticamente significativos para predecir SG. La cuantificación de CTCs a las 9-12 sem fue superior al PET-TC en valor pronóstico. -La detección de 5 o más CTCs durante la monitorización terapéutica puede predecir el pronóstico en pacientes con CMM más allá del PET-TC. El PET-TC merece un papel en pacientes con <5 CTCs durante el tratamiento.
Giuliano et al. ¹⁶⁴ (2011)	<ul style="list-style-type: none"> -Pacientes con primera línea de tratamiento sistémico. -Distintas modalidades tratamiento sistémico. -Se explora de forma adicional el valor predictivo de CTCs en función del tratamiento. 	<ul style="list-style-type: none"> -Cuantificación basal de CTCs es un factor pronóstico independiente de SG y SLP (análisis multivariante). -En pacientes con sobreexpresión de Her2 que recibieron trastuzumab o lapatinib, la cuantificación basal de CTCs no fue pronostica (mediana SLP 14,5 m en pacientes con <5 CTCs vs 16,1 m en pacientes con ≥ 5 CTCs, $p=0.947$). -En la evaluación de CTCs como factor predictivo en función del tratamiento, se identificó a aquellos pacientes sin sobreexpresión de HER2 y con una cuantificación basal de CTCs ≥ 5 como la población que más se beneficia de tratamientos más agresivos como quimioterapia en combinación o quimioterapia + bevacizumab.
Pierga et al. ¹⁵⁸ (2011)	<ul style="list-style-type: none"> -Pacientes con primera línea de tratamiento sistémico con Quimioterapia. -Se explora de forma adicional la correlación de la cuantificación de CTCs y el nivel de los marcadores séricos con otros factores pronósticos ya conocidos. -Se realiza análisis adicional de cuantificación de CTCs en función del tratamiento recibido (quimioterapia sola, quimioterapia+bevacizumab, quimioterapia+antiHer2) 	<ul style="list-style-type: none"> -Los niveles de CTCs son un factor pronóstico independiente para SLP y SG. -La elevación de los marcadores séricos se correlacionaba con otros factores pronósticos conocidos como pobre performance status y número elevado de localizaciones metastásicas -Cambios en los niveles de los marcadores séricos durante el tratamiento se asocian significativamente con SLP (al igual que niveles CTCs) -No clara superioridad de ningún marcador sérico o CTCs para predecir SLP. -CTC es el único marcador asociado de forma independiente con SG.

Giordano et al. ¹⁶⁵ (2012).	-Distintas modalidades de tratamiento sistémico. -Se realizó análisis de SG y SLP en función de la cuantificación de CTCs así como en función del subtipo histológico. -Se analizó la correlación entre subtipo histológico y CTCs con SG y SLP.	-Excepto en Her2+, el valor pronóstico de la cuantificación basal de CTCs fue independiente del subtipo histológico y de la localización tumoral. -En pacientes HER2+ la SLP y la SG es similar entre aquellos pacientes con recuentos basales CTCs ≥ 5 y de aquellos con CTCs < 5 .
--	--	--

Tabla 7. Descripción de características y resultados de estudios publicados en la literatura sobre CTCs.

8.3 LIMITACIONES DE NUESTRO ESTUDIO Y CARACTERISTICAS DE NUESTRA POBLACIÓN MUESTRAL.

Nuestro estudio tiene a la vez solidez y limitaciones. Enfocado en determinar el valor predictivo de la cuantificación de CTCs en el día 21 (objetivo principal), fue diseñado específicamente con ese propósito.

El seguimiento de los pacientes es suficientemente largo para permitir conclusiones de respuesta a largo plazo, con un 59 % de las muertes y una mediana de seguimiento de 35 meses para las pacientes todavía vivas. Sin embargo, debemos destacar que el tamaño muestral, aunque apropiado para responder al objetivo primario del estudio, es insuficiente para establecer otras posibles asociaciones clínicas relevantes (ej. el valor predictivo de CTCs basal). La falta de correlación estadísticamente significativa entre el número de CTCs basal y supervivencia global en nuestro estudio, al contrario que lo publicado en los estudios anteriormente mencionados, debe ser tomada con cuidado puesto que nuestro estudio no es lo suficientemente potente para demostrar la asociación. De hecho, hay una tendencia en supervivencia global a favor de las pacientes con 0-4 CTCs con respecto a aquellas con 5 o más CTCs.

Por otro lado el estudio fue llevado a cabo en una única institución académica en las que las pacientes tenían acceso a tratamientos experimentales sucesivos en ensayos clínicos y eso podía haber impactado en

la supervivencia global. Por eso, no queda claro si estos resultados podrían ser extrapolados a una población diferente de pacientes con cáncer de mama metastásico tratadas en otros hospitales con tratamientos estándar.

En la siguiente tabla se comparan las características de nuestra población muestral con la de otros estudios con similares objetivos

CARACTERISTICAS		Cristofani Ili et al. ¹⁵⁷ /Hayes et al. ¹⁶²	Miguel Martin et al. ¹⁶³	Minetta C. Liu et al. ¹⁵⁹	Ugo de Giorgi et al. ¹⁶¹	Giuliano et al. ¹⁶⁴	Pierga et al. ¹⁵⁸	Giordano et al. ¹⁶⁵
Número total pacientes evaluables	99	177	51	74	102	235	267	517
Edad (años) mediana	61	58	59	51.5	53.6	53	57	49
Estado Her2/neu								
Sobreexpresión	44 (44,4%)	45 (26%)	14 (28%)	19 (26%)	24 (24%)	43 (18%)	45 (17%)	101 (20%)
Gen normal	54 (54,6%)	103 (58%)	18 (35%)		78 (76%)	192 (82%)	222 (83%)	416 (80%)
Desconocido	1 (1%)	29 (16%)	12 (24%)					
Enfermedad visceral								
Si	76 (76,8%)	144 (82%)		55 (74%)	91 (89%)	140 (59,6%)		319 (62%)
No	23 (23,2%)	32 (18%)		19 (26%)	11 (11%)	95 (40,4%)		198 (38%)
Tipo de tratamiento sistémico								
Quimioterapia +/- tratamiento antiHer2/bevacizumab	99(100%)	118 (70%)	4 (7,8%)	41 (55,4%)	70 (69%)	188 (80%)	267 (100%)	392 (76%)
Tratamiento hormonal, inmunoterapia o ambas		54 (30%)	3 (5,9%)	33 (44,6%)	32 (31%)	47 (20%)		125 (24%)
Tratamiento sintomático			44 (86,3%)					
Respuesta completa	2%	0%			8%		1%	
Respuesta parcial	34,3%	16%			44%		46%	
Enfermedad estable	32,3%	50%			10%		42%	
Progresión	31,3%	34%			38%		8%	
No valorable							3%	

Tabla 8. Descripción de las características de las muestras de los estudios publicados en la literatura sobre CTCs.

Finalmente, la población de nuestro estudio parece presentar un alto porcentaje de tumores con sobreexpresión de HER-2 (44% en total). Esto puede deberse a varias cosas. Primero, los tumores con sobreexpresión de HER-2 son más propensos a ser metastásicos al diagnóstico. Segundo,

cuando se diagnostican en estadios localizados y en ausencia de tratamiento con trastuzumab adyuvante, estos tumores tienen una probabilidad más alta de recaer. Nuestro estudio empezó en 2006, incluyendo pacientes con tumores HER-2 resecables al diagnóstico que no recibieron tratamiento adyuvante con trastuzumab. Por otro lado el tipo de cáncer de mama más frecuente (RE positivos, HER2 negativos), que abarca un 60% de todos los tipos de cáncer de mama, es tratado de forma habitual con varias líneas de hormonoterapia antes que con quimioterapia, por lo que este tipo de pacientes están infrarepresentadas en nuestro estudio. Una publicación reciente de Giordano et al ha confirmado que el número de CTCs basal es predictivo de supervivencia global en toda la población, pero ha sugerido también que no es predictivo en la población de pacientes HER-2 positivas tratadas con tratamientos diana anti-HER2. En nuestro estudio si objetivamos una tendencia no estadísticamente significativa a una mayor supervivencia global en aquellas pacientes con sobreexpresión del HER-2 con menos de 5 CTCs en el día 21, siendo esta diferencia en supervivencia global estadísticamente significativa en las pacientes sin sobreexpresión de HER-2.,

Como conclusión final, la determinación de CTCs en el día 21 constituye un método simple y efectivo de predecir la evolución de las pacientes con cáncer de mama metastásico tratadas con quimioterapia y podría identificar un subgrupo de pacientes con peor respuesta a los tratamientos convencionales.

9. CONCLUSIONES

1. El número de CTCs en el día 21 (previo a la administración del segundo ciclo de quimioterapia) es la única variable fuertemente predictiva de supervivencia global de forma independiente en el análisis multivariante realizado en nuestro estudio. La mediana de supervivencia global fue de 38,3 meses en aquellas pacientes con una cuantificación de 0-4 CTCs en la determinación del día 21 frente a 8,7 meses en aquellas pacientes con una detección en la misma determinación de 5 o más CTCs (log-rank test $p < 0.001$).
2. El número de CTCs en el día 21 es la única variable independiente predictiva de supervivencia libre de progresión en el análisis multivariante realizado en nuestro estudio. La mediana de supervivencia libre de progresión tras el inicio de la nueva línea de quimioterapia fue de 9,4 meses para pacientes con 0-4 CTCs en la determinación de sangre periférica del día 21, frente a 3 meses para pacientes con 5 o más CTCs en dicha determinación (log-rank test $p = 0.001$).
3. La determinación de CTCs en el día 21 se correlaciona con la respuesta objetiva al tratamiento mediante criterios RECIST 1.0, demostrándose que a menor número de CTCs detectadas tras haber iniciado el tratamiento con quimioterapia (CTC-21), menor porcentaje de pacientes con progresión de la enfermedad. Aquellas pacientes con detección de 5 o más CTCs en el día 21 tras el inicio de quimioterapia tienen un riesgo de progresión 4,27 veces mayor que aquellas pacientes con una detección de 0-4 CTCs en esa determinación ($p = 0.003$).
4. La determinación de CTCs en el día 21 tras haber iniciado una nueva línea de quimioterapia puede servir para identificar aquellas pacientes que no se benefician de dicho tratamiento y realizar un cambio de estrategia terapéutica de forma precoz, así como para identificar aquellas pacientes con mal pronóstico que no se benefician de terapias convencionales, permitiendo su inclusión en protocolos de investigación.

5. Las pacientes que presentaron en la determinación de CTCs basal 5 o más células tumorales circulantes, pero que en el día 21 tras el inicio del tratamiento con quimioterapia presentaban un descenso con una determinación de 0-4 CTCs, tuvieron una supervivencia global similar a aquellas pacientes que presentaban <5 CTCs en ambas determinaciones (mediana de SG de 45 meses y 33,3 meses respectivamente, sin diferencias estadísticamente significativas $p=0.644$)
6. En la población sin sobreexpresión de Her2 se mantiene la correlación entre el número de CTCs en el día 21 y la supervivencia global de forma estadísticamente significativa. En la población con sobreexpresión de Her2 se objetiva una tendencia a favor de una mayor SG en las pacientes con 0-4 CTCs en la determinación del día 21, pero no alcanza la significación estadística.

10. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

10.1 ÍNDICE DE FIGURAS.

<i>Figura 1. Tasas estandarizadas por edad de incidencia y mortalidad de cáncer de mama por 100.000 mujeres en las distintas zonas geográficas. GLOBOCAN 2008.</i>	20
<i>Figura 2. Tasa de incidencia estandarizada por edad en cáncer de mama por cada 100.000 mujeres en los diferentes países Europeos.</i>	21
<i>Figura 3. Diagrama inclusión y exclusión de pacientes para el análisis final. ..</i>	57
<i>Figura 4. Distribución de los tratamientos sistémicos quimioterápicos administrados durante el estudio.</i>	60
<i>Figura 5. Transformación de CTCs (día 0 al día 21).</i>	62
<i>Figura 6 Supervivencia libre de progresión en las pacientes incluidas en el análisis.</i>	63
<i>Figura 7. Supervivencia libre de progresión en función del estado de Her2. ...</i>	64
<i>Figura 8. Supervivencia global de las pacientes incluidas en el análisis.</i>	65
<i>Figura 9 Supervivencia global en función del estado de Her2</i>	65
<i>Figura 10. Supervivencia global de las pacientes con CMM incluidas en el estudio en función de la cuantificación de CTCs en el día 21 (0-4 vs 5 o más). 66</i>	66
<i>Figura 11. Supervivencia global en las pacientes con CMM incluidas en el estudio en función del número de CTCs en sangre periférica (0-4 vs 5 o más) previo al inicio del tratamiento con quimioterapia (CTC-0).</i>	67

Figura 12. Supervivencia libre de progresión de las pacientes con CMM incluidas en el estudio en función de la cuantificación de CTCs en el día 21 (0-4 vs 5 o más).....	69
Figura 13. Supervivencia libre de progresión de las pacientes con CMM incluidas en el estudio en función de la cuantificación de CTCs previo al inicio del tratamiento con quimioterapia (CTC-0).	70
Figura 14. Diagrama de cajas de número de CTC-21 en función de respuesta vs progresión.....	77
Figura 15. Supervivencia global en función de CTC-21 (0 vs 1-4 vs 5 o más). 81	
Figura 16. Supervivencia global en función CTC-0 (0 vs 1-4 vs 5 o más CTC)	82
Figura 17. Supervivencia libre de progresión en función de CTC-21 (0 vs 1-4 vs 5 o más).	83
Figura 18. Supervivencia libre de progresión en función de CTC-0 (0 vs 1-4 vs 5 o más).	84
Figura 19. Supervivencia global en función de la transformación del número de CTCs del día 0 al día 21.....	86
Figura 20. Supervivencia libre de progresión en función de la transformación del número de CTCs del día 0 al día 21.....	87
Figura 21. Supervivencia global en función del número de CTCs en el día 21 (0-4 vs 5 o más) en pacientes con cáncer de mama metastásico HER2 positivo incluidas en el estudio.	88

Figura 22. Supervivencia global en función del número de CTCs en el día 21 (0-4 vs 5 o más) en pacientes con cáncer de mama metastásico HER2 negativo incluidas en el estudio. 89

10.2 ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Descripción de las características de la muestra final. 58

Tabla 2.A. Análisis multivariante SG regresión de Cox con número CTC basal. 68

Tabla 2. B. Análisis multivariante SG regresión de Cox con número CTC día 21.68

Tabla 3.A. Análisis multivariante SLP regresión de Cox con número CTC día 21.71

Tabla 3.B. Análisis multivariante SLP regresión de Cox con número CTC día 21. 72

Tabla 4A. Respuesta objetiva en función del número de CTCs basales (CTC-0) 73

Tabla 4.B. Descripción de frecuencias de CTC-0 en función de beneficio clínico vs progresión.74

Tabla 4.C. Correlación CTC-0 con la tasa de beneficio clínico/progresión.74

Tabla 5.A. Respuesta objetiva en función número CTC-21. 75

Tabla 5.B. Descripción de frecuencias de CTC-21 en función de beneficio clínico vs progresión.76

Tabla 5.C. Correlación CTC-21 cola tasa de beneficio clínico/progresión.....77

Tabla 6. Descripción de población muestral, objetivo, tiempo de seguimiento y diseño de estudios publicados en la literatura sobre CTCs..... 97

Tabla 7. Descripción de características y resultados de estudios publicados en la literatura sobre CTCs. 99

Tabla 8. Descripción de las características de las muestras de los estudios publicados en la literatura sobre CTCs. 103

11. BIBLIOGRAFÍA

-
- ¹ Ferlay J, Shin H, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer* 2010; 127:2803-2917.
- ² Lopez-Abente G, Pollán M, Aragonés N, et al. Situación del cáncer en España: incidencia. *An. Sist. Sanit. Navar.* 2004;27(2):165-173.
- ³ Martín M, Mahillo E, Llombart-Cussac A, Lluch A, et al. The 'El Alamo' project (1990-1997): two consecutive hospital-based studies of breast cancer outcomes in Spain. *Clin Transl Oncol* 2006; 8(7):508-18.
- ⁴ Pollán M, García-Mendizabal MJ, Pérez-Gomez B, et al. *Psicooncología.* 2007; 4:231-248.
- ⁵ Jemal A, Siegel R, Ward E et al. Cancer statistics 2008. *CA Cancer J Clin* 2008;58:71-96.
- ⁶ Liu S, Dontu G, Mantle ID, Patel S, et al. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res* 2006 Jun 15;66 (12):6063-71.
- ⁷ Tavassoli FA, Devilee P, editors. *WHO Classification of Tumours Pathology of the Breast and Female Genital Organs.* Lyon: IARC Press 2003.
- ⁸ Marubini E, Mezzanotte G, Boracchi P, Veronesi V. Long term survival analysis: breast cancer and age at diagnosis. *Stat Med* 1990; 9: 737-48.
- ⁹ Host H, Lund E. Age as a prognostic factor in breast cancer. *Cancer* 1986; 57: 2217-21.
- ¹⁰ Bonnier P, Romain S, Charpin C, Lejeune C, Tubiana N, Martín PM, et al. Age as a prognostic factor in breast cancer: Relationship to pathologic and biologic features. *Int J Cancer* 1995; 62: 138-44.

¹¹ Diab SG, Elledge RM, Clark GM. Tumor characteristics and clinical outcome of elderly women with breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 550-556.

¹² Ashba J, Traish AM. Estrogen and progesterone receptor concentrations and prevalence of tumor hormonal phenotypes in older breast cancer patients. *Cancer Detect Prev* 1999; 23: 238-44.

¹³ Clark GM, Sledge GM, Osborne CK, McGuire WL. Survival from first recurrence: relative importance of prognostic factors in 1015 breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1987; 5: 55-61.

¹⁴ Holli K, Isola J. Effect of age on the survival of breast cancer patients. *Eur J Cancer* 1997; 33: 425-8.

¹⁵ Nixon AJ, Neuberg D, Hates D-F, Gelman R, Connolly JL, Schnitt S, 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: 888-94.

¹⁶ Coates AS, Hurny C, Peterson HF, et al. Quality-of-life scores predict outcome in metastatic but not early breast cancer. International Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 2000;18(22):3768-74.

¹⁷ Ryberg M, Nielsen D, Osterlind K, Skovsgaard T, et al. Prognostic factors and long-term survival in 585 patients with metastatic breast cancer treated with epirubicin-based chemotherapy. *Ann Oncol* 2001;12(1):81-7.

¹⁸ Pierga JY, Robain M, Jouve M, et al. Response to chemotherapy is a major parameter-influencing long-term survival of metastatic breast cancer patients. *Ann Oncol* 2001;12(2):231-7.

¹⁹ Sigurdsson H, Baldertop B, Borg A, et al. Indicators of prognosis in node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 1990;322:1045-53.

²⁰ Yamamoto N, Watanabe T, Katsumata N, et al. Construction and validation of a practical prognostic index for patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1998;16(7):2401-8.

²¹ Hortobagyi GN, Smith TL, Legha SS, et al. Multivariate analysis of prognostic factors in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1983;1(12):776-86.

²² Falkson G, Gelman R, Falkson CI, Glick J, Harris J. Factors predicting for response, time to treatment failure, and survival in women with metastatic breast cancer treated with DAVTH: a prospective Eastern Cooperative Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1991;9(12):2153-61.

²³ Vogel CL, Acevedo S, Hilsenbeck S, East DR, Ayub J. Survival after first recurrence of breast cancer. The Miami experience. *Cancer* 1992;70(1):129-35.

²⁴ Jubelirer S J, Wilson R, Summers L, Richardson S. Prognostic factors determining survival in breast cancer patients presenting with metastatic disease. *W V Med J* 1990;86(1):7-9.

²⁵ Solomayer EF, Diel IJ, Meyberg GC, Gollan C, Bastert G. Metastatic breast cancer: clinical course, prognosis and therapy related to the first site of metastasis. *Breast Cancer Res Treat* 2000;59(3):271-8.

²⁶ Briasoulis E, Karavasilis V, Kostadima L, Ignatiadis M, et al. Metastatic breast carcinoma confined to bone: portrait of a clinical entity. *Cancer* 2004;101(7):1524-8.

²⁷ Nomura Y, Tashiro H, Osaki A. Long term survival and the prognostic factors of advanced breast cancer patients treated with adreno-oophorectomy. *Breast Cancer Res Treat* 1995;33(1):47-54.

²⁸ Pentheroudakis G, Fountzilas G, Bafaloukos D, et al. Metastatic breast cancer with liver metastases: a registry analysis of clinicopathologic, management and outcome characteristics of 500 women. *Breast Cancer Res Treat* 2006;97(3):237-44.

²⁹ Zinser JW, Hortobagyi GN, Buzdar AU, Smith TL, et al. Clinical course of breast cancer patients with liver metastases. *J Clin Oncol* 1987;5(5):773- 82.

³⁰ Pedrazzini A, Cavalli F, Brunner KW, Goldhirsch A, Mermillod B. Complete remission following endocrine or combined cytotoxic and hormonal treatment in advanced breast cancer. A retrospective analysis. *Oncology* 1987;44(1):51-9.

³¹ Babiera GV, Rao R, Feng L, et al. Effect of primary tumor extirpation in breast cancer patients who present with stage IV disease and an intact primary tumor. *Ann Surg Oncol* 2006;13(6):776-82.

³² Blanchard D, Bathia P, Hilsenbeck S, Elledge R. Does surgical management of stage IV breast cancer affect outcome? *Breast Cancer Res Treat* 2006;100(Sup 1):S118. Abst 2110.

³³ Bafford AC, Burstein HJ, Barkley CR, et al. Breast surgery in stage IV breast cancer: impact of staging and patient selection on overall survival. *Breast Cancer Res Treat* 2008.

³⁴ Hayes DF. Prognostic and predictive factors for breast cancer: translating technology to oncology. *J Clin Oncol* 2005;23(8):1596-7.

³⁵ Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124(7):966-78.

-
- ³⁶ Vlastos G, Rapiti E, Bouchardy C, et al. Optimal loco-regional treatment of the primary tumor in metastatic breast cancer patients is associated with a significant survival advantage. *Breast Cancer Res Treat* 2007;106(Sup 1):S233. Abs 5077.
- ³⁷ Curda A, Herí M, Da han E, et al. Factors affecting relapse in node negative breast cancer. A multivariate analysis including the labeling index. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1989;25:351-6.
- ³⁸ Chang J, Clark GM, Allred DC, Mohsin S, Chamness G, Elledge RM. Survival of patients with metastatic breast carcinoma: importance of prognostic markers of the primary tumor. *Cancer* 2003;97(3):545-53.
- ³⁹ Tavassoli FADP, editors. *WHO Classification of Tumours Pathology of the Breast and Female Genital Organs* 2003.
- ⁴⁰ Mansel, RE, Fallowfield L, Kissin M, et al . Randomized multicenter trial of sentinel node biopsy versus standard axillary treatment in operable breast cancer: the ALMANAC Trial. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98(9):599-609.
- ⁴¹ Clark GM, Sledge GW, Jr., Osborne CK, McGuire WL. Survival from first recurrence: relative importance of prognostic factors in 1,015 breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1987;5(1):55-61.
- ⁴² Goldhirsch A, Gelber RD, Castiglione M. Relapse of breast cancer after adjuvant treatment in premenopausal and perimenopausal women: patterns and prognoses. *J Clin Oncol* 1988;6(1):89-97.
- ⁴³ Insa A, Lluch A, Prosper F, et al. (1999). Prognostic factors predicting survival form first recurrence in patients with metastatic breast cancer: analysis of 439 patients. *Breast Cancer Res Treat* 56:67-78.

⁴⁴ Woodward W, Ving-Hung V, Ueno N, et al. (2006). Prognostic value of nodal ratios in node-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 24:1910-1916.

⁴⁵ Puente J, López-Tarruella S, Ruiz A, et al. Practical prognostic index for patients with metastatic recurrent breast cancer: retrospective analysis of 2322 patients from the GEICAM Spanish El Alamo Register. *Breast Cancer Res. Treat.* 2010;122:591-600.

⁴⁶ Van Diest PJ, Baak JP, Matze-Cok P, et al : Reproducibility of mitosis counting in 2469 breast cancer specimens: results from the Multicenter Morphometric Mammary Carcinoma Project. *Hum Pathol* 1992; 23: 603-607.

⁴⁷ Railo M, Nordling S, von Boguslawsky K, et al: Prognostic value of Ki-67 immunolabelling in primary operable breast cancer. *Br J Cancer.* 1993;68:579-83

⁴⁸ 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;25:5287-312.

⁴⁹ Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologist guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol* 28:2784-95.

⁵⁰ Pérez EA, Pusztai L, van de Vijver M. Improving patient care through molecular diagnostics. *Semin Oncol* 2004;31:14-20.

⁵¹ Gusterson BA, Gelber RD, Godhirsch A et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1992;10:1049-56.

⁵² Slamon DJ, Clark GM, Wong SG et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the Her2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-82.

⁵³ Piccart MJ, Di Leo A, Hamilton A. Her-2 a 'predictive factor' ready to use in daily management of breast cancer patients? *Eur J Cancer* 2000;36:1755-61.

⁵⁴ Ros JS, Fitcher JA, Linette GP, et al: The HER2/NEU/neu gene and protein in breast cancer. *Biomarker and target therapy* 2003, 8 :307-25.

⁵⁵ Marilyn A. Owens, Bruce C. Horten, Moacyr M Da Silva. HER-2 Amplification Ratios by Fluorescence In Situ Hybridation and Correlation with Immunohistochemistry in a cohort of 6556 Breast Cancer Tissues. *Clinical Breast Cancer* 2004; vol 5, N° 1, 63-69.

⁵⁶ Arens N, Bleyl U, Hildenbrand R. HER2/neu, p53,Ki67, and hormone receptors do not change during neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Virchows Arch* 2005 May; 446(5):489-96. Epub 2005 Apr 19.

⁵⁷ Ashworth TR: A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death . *Aust Med J* 1869;14:146-149.

⁵⁸ Hayes DF, Smerage J: Is there a role for circulating tumor cells in the management of breast cancer? *Clin Cancer Res* 2008;14:3646-3650.

⁵⁹ Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al.: Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351:781-791.

⁶⁰ Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, et al: Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26:3213-3221.

⁶¹ de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, et al: Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14:6302-6309.

⁶² 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; 25:5287-5312.

⁶³ Hayes DF, Smerage JB: Circulating tumor cells. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2010; 95:95-112.

⁶⁴ Pantel K, Alix-Parabières C: Circulating tumour cells in cancer patients: Challenges and perspectives. *Trends Mol Med* 2010; 16:398-406.

⁶⁵ Budd, G.T., M. Cristofanilli, M.J. Ellis, A. Stopeck, E. Borden, M.C. Miller, *et al.* *Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer.* *Clin Cancer Res* 2006; 12(21): 6403-9.

⁶⁶ Brekelmans CT, Tilanus-Linthorst MM, Seynaeve C. Tumour characteristics, survival and prognostic factors of hereditary breast cancer from BRCA-2 - BRCA-1 and non BRCA ½ families as compared to sporadic breast cancer cases. *Eur J Cancer* 2007;43(5):867-76.

⁶⁷ Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406:747

⁶⁸ Sorlie T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. *Eur J Cancer* 2004; 40:2667.

⁶⁹ Martin M, et al. Molecular biology of breast cancer. *Clin Transl Oncol* 2006; 8 (1):7-14.

⁷⁰ Cardoso F., Costa A, Norton L et al. First international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC 1). *Breast* 2012; 21(3): 242-252.

⁷¹ ESO-MBC Task Force. Metastatic breast cancer. Recommendations proposal from the European School of Oncology (ESO)-MBC Task Force. *Breast* 2007; 16: 9-10.

⁷² Cardoso F, Bedard PL, Winer EP et al on behalf of the ESO-MBC Task Force International Guidelines for management of metastatic breast cancer: combination vs sequential single-agent chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 2009;101: 1174-1181.

⁷³ Gennari A, Stockler M, Puntoni M et al. Duration of chemotherapy for metastatic breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *J Clin Oncol* 2011; 29: 2144-2149.

⁷⁴ Network NCC, 2008. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Breast Cancer, Version 2. ASCO-Edition 2008.

⁷⁵ 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;344:783-792.

⁷⁶ Stopeck AT, Lipton A, Body JJ et al. Denosumab compared with zoledronic acid for the treatment of bone metastases in patients with advanced breast cancer: a randomized, double-blind study. *J Clin Oncol* 2010;28:5132-5139.

⁷⁷ Khan SA, Stewart AK, Morrow M. Does aggressive local therapy improve survival in metastatic breast cancer? *Surgery* 2002;132:620-7.

⁷⁸ Babiera GV, Rao R, Feng L, Meric-Bernstam F, Kuerer HM, Single- tary SE, et al. Effect of primary tumor extirpation in breast cancer patients who present

with stage IV disease and an intact primary tumor. *Ann Surg Oncol*. 2006;13:776-82.

⁷⁹ Rapiti E, Verkooijen HM, Vlastos G, Fioretta G, Neyroud-Caspar I, Sappino AP, et al. Complete excision of primary breast tumor improves survival of patients with metastatic breast cancer at diagnosis. *J Clin Oncol* 2006;24:2743-9.

⁸⁰ Gnerlich J, Jeffe DB, Deshpande A, Beers C, Zander C, Margenthaler JA. Surgical removal of the primary tumor increases overall survival in patients with metastatic breast cancer: Analysis of the 1988- 2003 SEER Data. *Ann Surg Oncol*. 2007;14:2187-94.

⁸¹ Dy SM, Asch SM, Naeim A, Sanati H, Walling A et al. Evidence-based standards for cancer pain management. *J Clin Oncol* 2008 Aug 10; 26(23):3879-85.

⁸² Janjan N, Lutz ST, Bedwinek JM et al. American College of Radiology. Therapeutic guidelines for the treatment of bone metastasis: a report from the American College of Radiology Appropriateness Criteria Expert Panel on Radiation Oncology. *J Palliat Med* 2009 May;12(5):417-26.

⁸³ Chow E, Harris K, Fan G et al. Palliative radiotherapy trials for bone metastases: a systematic review. *J Clin Oncol* 2007 Apr 10;25(11):1423-36.

⁸⁴ Costelloe CM, Rohren EM, Madewell JE et al. Imaging bone metastases in breast cancer: techniques and recommendations for diagnosis. *Lancet Oncol* 2009;10:604-616.

⁸⁵ Suh JH, Barnett GH. Brain metastases refresher course. ASTRO 2007.

⁸⁶ Aoyama H, Shirato H, Tago M et al. Stereotactic radiosurgery plus whole-brain radiation therapy vs stereotactic radiosurgery alone for treatment of brain metastases: a randomized controlled trial. *JAMA* 2006;295:2483-2491.

⁸⁷ Patchell RA, Tibbs PA, Walsh JW, et al. A randomized trial of surgery in the treatment of single metastases to the brain. *N Engl J Med* 1990;322:494-500.

⁸⁸ Pocard M, Pouillart P, Asselain B, Salmon RJ. Hepatic resection in metastatic breast cancer: results and prognostic factors. *Eur J Surg Oncol*. 2000;26:155-9.

⁸⁹ Adam R, Aloia T, Krissat J, Bralet MP, Paule B, Giacchetti S, et al. Is liver resection justified for patients with hepatic metastases from breast cancer? *Ann Surg*. 2006;244:897-908

⁹⁰ Murabito M, Salat A, Mueller MR. Complete resection of isolated lung metastasis from breast carcinoma results in a strong increase in survival. *Minerva Chir*. 2000;55:121-7.

⁹¹ Friedel G, Pastorino U, Ginsberg RJ, Goldstraw P, Johnston M, Pass H, et al. Results of lung metastasectomy from breast cancer: prognostic criteria on the basis of 467 cases of the International Registry of Lung Metastases. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2002; 22: 335-44.

⁹² Incarbone M, Nava M, Lequaglie C. Sternal resection for primary or secondary tumors. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1997; 114:93-9.

⁹³ Paganì O, Senkus E, Wood W et al. International guidelines for management of metastatic breast cancer: can metastatic breast cancer be cured? *J Natl Cancer Inst* 2010;102:456-463.

⁹⁴ Robertson JF, Williams MR, Todd J et al. Factors predicting the response of patients with advanced breast cancer to endocrine therapy. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1989;25:469-475.

⁹⁵ Howell A, Mackintosh J, Jones M et al. The definition of the 'no change' category in patients treated with endocrine therapy and chemotherapy for advanced carcinoma of the breast. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1988;24:1567-72.

⁹⁶ Robertson JF, Willsher PC, Cheung KL, Blamey RW. The clinical relevance of static disease (no change) category for 6 months on endocrine therapy in patients with breast cancer. *Eur J Cancer* 1997;33(11):1774-1779.

⁹⁷ Brufsky A, Lembersky B, Schiffman K et al. Hormone receptor status does not affect the clinical benefit of trastuzumab therapy for patients with metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2005;6:247-252.

⁹⁸ Jonat W, Kaufmann M, Blamey RW et al. A randomized study to compare the effect of the luteinising hormone releasing hormone (LHRH) analogue goserelin with or without tamoxifen in pre-and perimenopausal patients with advanced breast cancer. *Eur J Cancer* 1995;31:137-142.

⁹⁹ Nicholson RI, Walker KJ, McClelland RA, Dixon A et al. Zoladex plus tamoxifen versus zoladex alone in pre-and perimenopausal metastatic breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1990;37:989-995.

¹⁰⁰ Klijn JG, Blamey W, Boccardo F, Tominaga T, Duchateau L, Sylvester R. For the combined hormone agents trialists group and the European organization for research and treatment of cancer, combined tamoxifen and luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonists versus LHRH agonists alone in premenopausal advanced breast cancer: a meta-analysis of four randomized trials. *J Clin Oncol* 2001;19:343-353.

¹⁰¹ Boccardo F, Rubagotti A, Perrota A et al. Ovarian ablation versus goserelin with or without tamoxifen in pre-perimenopausal patients with advanced breast cancer: results of a multicentric italian Study. *Ann Oncol* 1994;5:334-337.

¹⁰² Nabholz JM, Buzdar A, Polla M et al. Anastrozole is superior to tamoxifen as first-line therapy for advanced breast cancer in postmenopausal women: results of a North American multicenter randomized trial. *J Clin Oncol* 2000;18:3758-3767.

¹⁰³ Bonnetterre J, Robertson J, Thürlimann B et al. anastrozole versus tamoxifen as first-line therapy for advanced breast cancer in 668 postmenopausal women results of the TARGET (Tamoxifen or Arimidex Randomized Group Efficacy and Tolerability) Study. *J Clin Oncol* 2000;18:3748-3757.

¹⁰⁴ Mourisden H, Gershanovich M, Sun Y et al. Superior efficacy of letrozole (Femara) versus tamoxifen as first-line therapy for postmenopausal women with advanced breast cancer: results of a phase III study of the international letrozole breast cancer group *J Clin Oncol* 2001;19:2596-2606.

¹⁰⁵ Howell A, Robertston JF, Quaresma Albano J et al. Fulvestrant, formerly ICI 182,780, is as effective as anastrozole in postmenopausal women with advanced breast cancer progressing after prior endocrine treatment. *J Clin Oncol* 2002;20:3396-3403.

¹⁰⁶ Robertson JF, Llombart-Cussac A, Rolski J et al. Activity of fulvestrant 500 mg versus anastrozole 1 mg as first-line treatment for advanced breast cancer: results from the FIRST study . *J Clin Oncol* 2009;27:4530-4535.

¹⁰⁷ Chia S, Gradishar W J, Mauriac L et al. Double-blind, randomized placebo controlled trial of fulvestrant compared with exemestane after prior nonsteroidal aromatase inhibitor therapy in postmenopausal women with hormone receptor-

ositive, advanced breast cancer: results from EFFECT. *J Clin Oncol* 2008;26:1664-70.

¹⁰⁸ Lundgren S. Progestins in breast cancer treatment. A review *Acta Oncol* 1992;31(7):709-72..

¹⁰⁹ Bachelot T, Bourgier C, Cropet C, et al. Randomized phase II trial of everolimus in combination with tamoxifen in patients with hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer with prior exposure to aromatase inhibitors: a GINECO study. *J Clin Oncol* 2012; epub ahead of print May 7; pubMED PMID:22565002.

¹¹⁰ Baselga J, Campone M, Piccart M et al. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2012;366:520-529.

¹¹¹ Cleator S, Heller W, Coombes RC. Triple-negative breast cancer: therapeutic options. *Lancet Oncol* 2007 Mar;8(3):235-44.

¹¹² Chan S, Friedrichs K, Noel D et al. Prospective randomized trial of docetaxel versus doxorubicin in patients with metastatic breast cancer. *Oncologist* 2007;12:253-270.

¹¹³ O'Shaughnessy J, Miles D, Vukelja S et al. Superior survival with capecitabine plus docetaxel combination therapy in anthracycline-pretreated patients with advanced breast cancer: phase III trial results. *J Clin Oncol* 2002;20:2812-2823.

¹¹⁴ Seidman AD, Brufsky A, Ansari RH et al. Phase III trial of gemcitabine plus docetaxel versus capecitabine plus docetaxel with planned crossover to the alternate single agent in metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 2011;22:1094-1101.

¹¹⁵ Gherzi D, Wilcken N, Simes J, Donoghue E. Taxane containing regimens for metastatic breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2005;(2). Art. No. CD003366. DOI:10.1002/14651858.CD003366.pub2.

¹¹⁶ Miyoshi Y, Kurosumi M, Kurebayashi J, Matsuura N, et al. Predictive factors for anthracycline-based chemotherapy for human breast cancer. *Breast Cancer* 2012 Apr;17(2):103-9.

¹¹⁷ Alba E, Martín M, Ramos M et al. Multicenter randomized trial comparing sequential with concomitant administration of doxorubicin and docetaxel as first-line treatment of metastatic breast cancer: A Spanish Breast Cancer Research Group (GEICAM-9903) phase III study. *J Clin Oncol* 2004;22:2587-2593.

¹¹⁸ Silver DP, Richardson AL, Elund AC et al. Efficacy of neoadjuvant Cisplatin in triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2010 Mar 1;28(7):1145-53.

¹¹⁹ Wysocki PJ, Korski K, Lamperska K, Zaluski J et al. Primary resistance to docetaxel-based chemotherapy in metastatic breast cancer patients correlates with a high frequency of BRCA1 mutations. *Med Sci Monit* 2008 Jul 14(7):SC7-10.

¹²⁰ Byrski T, Huzarski T, Dent R. et al. Response to neoadjuvant therapy with cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2009 May;115(2):359-63.

¹²¹ Drew Y, Plummer R. The emerging potential of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors in the treatment of breast cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2010 Feb;22(1):67-71.

¹²² Tong WM, Yang YG, Cao WH et al. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 plays a role in suppressing mammary tumorigenesis in mice. *Oncogene* 2007 May 31;26(26):3857-67.

¹²³ Rottenberg S, Jaspers JE, Kersbergen A et al. High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs. *Proc Natl Acad Sci Usa* 2008 Nov 4;105(44):17079-84.

¹²⁴ Gray R, Bhattacharya S, Bowden C, Miller K, Comis RL. Independent review of E2100: a phase trial of bevacizumab plus paclitaxel versus paclitaxel in women with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:4966-72.

¹²⁵ Cortés J, Calvo E, Gonzalez-Martín A, et al. Progress against solid tumors in danger: the metastatic breast cancer example. *J Clin Oncol* 2012;30:3444-47.

¹²⁶ Miller K, Wang M, Gralow J et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2007;357:2666-2676.

¹²⁷ Lang I, Brodowicz T, Ryvo L et al. Bevacizumab plus paclitaxel versus bevacizumab plus capecitabine as first-line treatment for HER2-negative metastatic breast cancer: interim efficacy results of the randomised, open-label, non-inferiority, phase 3 TURANDOT trial. *Lancet Oncol* 2013;14:125-33.

¹²⁸ Andersson M, Lidbrink E, Bjerre K et al. Phase III randomized study comparing docetaxel plus trastuzumab with vinorelbine plus trastuzumab as first-line therapy of metastatic or locally advanced human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: the HERNATA study. *J Clin Oncol* 2011;29:264-271.

¹²⁹ Kaufman B, Mackey JR, Clemens MR et al Trastuzumab plus anastrozole versus anastrozole alone for the treatment of postmenopausal women with human epidermal growth factor receptor 2-positive, hormone receptor-positive metastatic breast cancer: results from the randomized phase III TAnDEM study. *J Clin Oncol* 2009;27:5529-5537.

¹³⁰ Marty M, Cognetti F, Marainchini D et al. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group. *J Clin Oncol* 2005;23:4265-4274.

¹³¹ Von Minckwithz G, Duo Bois A, Schmidt M et al. Trastuzumab beyond progression in human epidermal growth factor receptor 2-positive advanced breast cancer: a German breast group 26/breast international group 03-05 study. *J Clin Oncol* 2009;27:1999-2006.

¹³² Geyer CE, Foster J, Lindquist D et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2006;355:2733-2743.

¹³³ Blackwell KL, Burstein HJ, Storniolo AM et al. Randomized study of lapatinib alone or in combination with trastuzumab in women with Erb-B2 positive, trastuzumab-refractory metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:1124-1130.

¹³⁴ Huober J, Fasching PA, Barsoum M et al. Higher efficacy of letrozole in combination with trastuzumab compared to letrozole monotherapy as first-line treatment in patients with HER2-positive, hormone-receptor-positive metastatic breast cancer-results of the eLecTRA trial. *Breast* 2012;21:27-33.

¹³⁵ Johnston S, Pippen J, Pivot X et al. Lapatinib combined with letrozole versus letrozole and placebo as first-line therapy for postmenopausal hormone receptor-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:5538-5546.

¹³⁶ Baselga J, Cortés J, Kim SB et al. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2012;366:109-119.

¹³⁷ Hortobagyi GN (1998). Treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 1998;339:974-984.

¹³⁸ Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Database. Available at: <http://www.seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>

¹³⁹ Carter CL, Allen C, Henson DE (1989). Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989;63:181-187.

¹⁴⁰ De la Haba-Rodriguez J, Aranda E, Llombart A et al (2008). Time to progression in breast cancer: a stratification model for clinical trials *Breast* 2008;17(3):239-244.

¹⁴¹ Cristofanilli M, Budd GT, Ellis M, et al. Circulating tumor cells, disease progression and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351:781-791.

¹⁴² Pierga JY, Hajage D, Bachelot T, et al. High independent prognostic and predictive value of circulating tumor cells compared with serum tumor markers in a large prospective trial in first-line chemotherapy for metastatic breast cancer patients. *Ann Oncol* 2011;23:618-624.

¹⁴³ Liu MC, Shields PG, Warren RD et al. Circulating tumor cells: A useful predictor of treatment efficacy in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:5153-5159.

¹⁴⁴ Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ et al. Circulating tumor cells versus imaging predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:6403-6409.

¹⁴⁵ Ugo de Giorgi, Valero V, Rohren E et al. Circulating tumor cells and Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography/Computed Tomography for Outcome Prediction in Metastatic Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:3303-3311.

¹⁴⁶ Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, et al. Circulating Tumor Cells at Each Follow-up Time Point during Therapy of Metastatic Breast Cancer Patients Predict Progression-Free And Overall Survival. Clin Cancer Res 2006;12(14):4218-4224.

¹⁴⁷ Martín M, García-Sáenz JA, Maestro ML, et al. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: timing of blood extraction. Anticancer Res 2009;29:4185-4187.

¹⁴⁸ Giuliano M, Giordano A, Jackson S, et al. Circulating tumor cells as prognostic and predictive markers in metastatic breast cancer patients receiving first-line systemic treatment. Breast Cancer Res 2011;13:R67.

¹⁴⁹ Giordano A, Giuliano M, De laurentis M et al. Circulating tumor cells in immunohistochemical subtypes of metastatic breast cancer: Lack of prediction in HER-2 positive disease treated with targeted therapy. Ann Oncol 2012;23:1144-1150.

12. SUMMARY

BACKGROUND

The detection and enumeration of circulating tumor cells (CTCs) in patients with metastatic breast cancer is currently undergoing intense investigation. Several studies have shown that the number of CTCs at baseline is an independent predictor of progression-free survival and overall survival in metastatic breast cancer patients. The US Food and Drug Administration has approved a semiautomated immunomagnetic method, the CellSearch system (Veridex). CTC enumeration using the CellSearch system appears to be a reproducible method. A potential use for CTC enumeration with the CellSearch system in metastatic breast cancer patients is the early discrimination of patients with good response to treatment from those with poor response to systemic chemotherapy. We present the final results of a prospective study in which the prognostic value of CTC enumeration at baseline and after the first cycle of chemotherapy (on day 21) was determined.

PATIENTS AND METHODS

Consecutive metastatic breast patients scheduled to receive palliative chemotherapy in the Hospital Universitario San Carlos (Madrid, Spain) were eligible for the trial. The study was approved by the institutional review board. All patients signed an informed consent form before being enrolled in the trial. A complete staging workup, including body computed tomography (CT) scan and bone scan, had been carried out within the 2 weeks prior to recruitment into the study. Measurable disease according to Response Evaluation criteria in Solid tumors (RECIST 1.0) was required. Other inclusion criteria were Eastern Cooperative Oncology Group performance status 0-1; life expectancy > 3 months; no contraindications for chemotherapy treatment; no more than two lines of chemotherapy for metastatic disease; adequate kidney (serum creatinine <1.2 mg/dl), liver (aspartate transaminase, alanine transaminase <2.5 times the upper limit of normal, bilirubin <1.5 mg/dL), and medullar function (hemoglobin levels >10 mg/dL, absolute neutrophil count >1,500 cells per

square millimeter, platelets >100,000 per cubic millimeter); and absence of known central nervous system involvement.

STUDY OBJECTIVES

The study hypothesis was that CTC enumeration on day 21 (CTC-21; immediately before the second cycle of chemotherapy) could prognosticate the outcome of MBC patients, with the patients with < 5CTCs having the best prognosis.

The primary objective was to evaluate correlations between CTC-21 enumeration (0-4 vs ≥ 5 CTCs) and overall survival. Overall survival was defined as the time lapse between day 0 (day of baseline CTC determination) and the patient's death. Secondary objectives were to analyze the correlations between CTC-0 enumeration (0-4 vs ≥ 5 CTCs) and overall survival; between CTC-21 enumeration (0-4 vs ≥ 5 CTCs) and progression free survival (defined as the time lapse between day 0 and the first sign of progressive disease or death, whichever occurred first); between CTC-0 enumeration (0-4 vs ≥ 5 CTCs) and progression free survival; between CTC-0 enumeration (0-4 vs ≥ 5 CTCs) and objective response rate according to RECIST 1.0; and between CTC-21 enumeration (0-4 vs ≥ 5 CTCs) and objective response rate according to RECIST 1.0 criteria.

STUDY PROCEDURES

Patients were seen in the outpatient clinic every 3 weeks, prior to each chemotherapy cycle. All consecutive patients fulfilling the inclusion criteria were asked to participate in the trial. Complete blood cell counts and biochemistry tests (including liver enzymes and creatinine) were performed immediately prior to each chemotherapy administration. CT scans were repeated every three cycles (11-12 weeks) to evaluate response. Clinical response was evaluated

according to RECIST 1.0 comparing pre- and postchemotherapy CT scans. In each individual patient, the best response recorded was considered as the final response. After disease progression while on the study chemotherapy line, patients received subsequent chemotherapy lines (with or without anti Her-2 agents), usually until the performance status of the patient precluded the administration of further chemotherapy. The clinicians in charge of treating the patients enrolled in the study were blinded with respect to the CTC values.

Two samples (7.5 ml each) of peripheral venous blood were collected from the patients. The first sample was collected immediately before the first cycle of chemotherapy (CTC-0) and the second was collected 21 days later, usually at the end of the first cycle (before the administration of the second cycle of chemotherapy). The blood was processed (CellSearch system) and the CTCs isolated and enumerated according to the manufacturer's instructions. The interpretations of the results were independently confirmed by three trained specialists who were blinded with respect to the provenance of the samples.

SAMPLE SIZE AND STATISTICAL ANALYSES

The median OS estimated for the entire patient population was 24 months, with 50% of patients alive at 2 years. For statistical purposes we assumed that the distribution of patients with 0-4 CTCs and those with ≥ 5 CTCs on day 21 would be evenly split. We estimated the percentage of patients alive at 2 years as being 35% for patients with ≥ 5 CTCs on day 21 versus 65% for patients with < 5 CTCs on day 21, for a hazard ratio (HR) of 1.8. With these assumptions, 100 patients (50 in each arm) were necessary to demonstrate this difference in OS (bilateral $\alpha = 0.05$, $\beta=0.80$). Assuming a 10% dropout rate, 110 patients were planned for the study.

The associations between qualitative variables were determined by χ^2 or Fisher's exact test. Progression free survival and overall survival were

estimated using the Kaplan-Meier method and stratified according to CTCs. Differences were tested using the log-rank test. Multivariate analysis was performed using the Cox regression analysis to estimate the HR for survival according to CTC count adjusted by age, HER-2 status, ER-estrogen receptor status, number of metastatic sites, visceral disease, and number of previous chemotherapy lines. All tests were two sided, and values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. The outcome data were analyzed using the SPSS 18.0 software package (SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTS

Between May 2008 and July 2009, consecutive patients ($n = 117$) were initially registered as eligible. Of these, 109 patients signed the informed consent and were enrolled in the trial. In 10 patients (8%), the results of CTC-21 were not available for the following reasons: toxic death after the first cycle of chemotherapy (1 patient), lack of blood sample on day 21 (2 patients), sample processing error resulting in unreliable determinations on either CTC-0 or CTC-21 samples or on both (7 patients).

The numbers of patients with 0, 1-4 and ≥ 5 baseline CTCs (CTC-0) were 26, 26, and 47, respectively. The distributions of patients according to baseline CTCs were similar in patients with HER-2 positive and HER-2 negative tumors. The same was true for estrogen receptor –positive and –negative tumors.

Patients with 0-4 CTCs on day 21 had a significantly better overall survival than those with ≥ 5 CTCs (primary endpoint of the study). The median overall survival was 39 months (95% CI 26-50) for patients with 0-4 CTCs and 9 months (95% CI 6-11) for patients with ≥ 5 CTCs (log-rank test, $p < 0.001$). conversely, the median overall survival in patients with baseline (CTC-0) of 0-4 CTCs was 33 months (95% CI 22-45), whereas those with ≥ 5 CTCs had a

median overall survival of 18 months (95% CI 11-25). This difference was not statistically significant (log rank test, $p=0.105$)

To ascertain the independent prognostic value of CTC-21 enumeration on overall survival, a Cox regression analysis was performed and included the following variables: CTC-21 (0-4 vs ≥ 5 CTCs), CTC-0 (0-4 vs ≥ 5 CTCs), age (continuous variable), Her-2 status (positive vs negative), ER status (positive vs. negative), number of metastatic sites (1 vs. ≥ 2), visceral disease (yes vs. no), and number of previous chemotherapy lines (1 vs. ≥ 2) as independent variables and overall survival as the dependent variable. The results indicated that CTC-21 was the only independent variable significantly predictive of overall survival ($p=0.009$).

The median progression free survival duration segregated according to CTC-21 enumeration was 9 months (95% CI 8-11) for patients with 0-4 CTCs compared with 3 months (95% CI 2-4) for patients with ≥ 5 CTCs ($p =0.001$). With respect to CTC-0, the median progression free survival duration was 9 months (95% CI 8-11) for patients with 0-4 CTCs compared with 3.5 months (95% CI 0-7) for patients with ≥ 5 CTCs ($p=0.045$). A Cox regression analysis was performed to assess the independent predictive value of CTC-21 enumeration on progression free survival. The results indicated that CTC-21 was the only independent variable significantly predictive of progression free survival ($p=0.047$).

There was a statistically significant correlation between CTC enumeration on day 21 and the distribution of response categories ($p=0.020$), but not with the CTC values obtained on day 0. Specifically, the clinical benefit rate (complete response plus partial response plus stable disease) was 77% versus 44% for patients with < 5 and ≥ 5 CTCs on day 21, respectively (Fisher's exact test, $p=0.0051$).

The overall survival of patients who had ≥ 5 CTCs at baseline but dropped to <5 on day 21 was similar to those who had < 5 CTCs at baseline.

The predictive value of CTC-21 was also studied in the subgroups of patients with and without Her-2 amplification. In patients with Her-2 positive tumors, the difference in survival was of borderline significance (median OS of 9 months for patients with ≥ 5 CTCs compared with a median not reached for patients with 0-4 CTCs; log-rank test $p=0.051$). In patients with Her-2 negative tumors, the difference in overall survival was statistically significant (median OS of 5 months for patients with ≥ 5 CTCs vs. median OS of 31 months for patients with 0-4 CTCs; log-rank test $p=0.001$).

CONCLUSION

CTC determination on day 21 of the first cycle of chemotherapy constitutes a simple and effective method of predicting the outcome of metastatic breast cancer patients. The measurement could also identify the population of patients with a high likelihood of poor outcome with conventional therapies.