

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**



**PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA AL  
TRATAMIENTO CON DOXORRUBICINA  
DOCETAXEL EN CÁNCER DE MAMA MEDIANTE  
MODELOS PRONÓSTICOS UNIGÉNICOS Y  
POLIGÉNICOS.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Atocha Romero Alfonso**

Bajo la dirección de los doctores

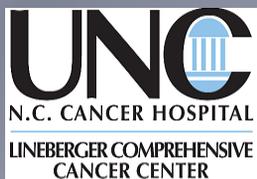
Miguel Martín Jiménez  
Trinidad Caldés Llopis

**Madrid, 2010**

- ISBN: 978-84-693-3368-6



Laboratorio de Oncología Molecular.  
Servicio de Oncología Médica.  
Hospital Clínico San Carlos.



Lineberger Comprehensive Cancer Center.  
Universidad de Carolina del Norte.  
Chapel Hill, NC.



Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular  
Facultad de Farmacia  
Universidad Complutense de Madrid

# PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON DOXORRUBICINA O DOCETAXEL EN CÁNCER DE MAMA MEDIANTE MODELOS PRONÓSTICOS UNIGÉNICOS Y POLIGÉNICOS

**Atocha Romero Alfonso**

**Directores:**

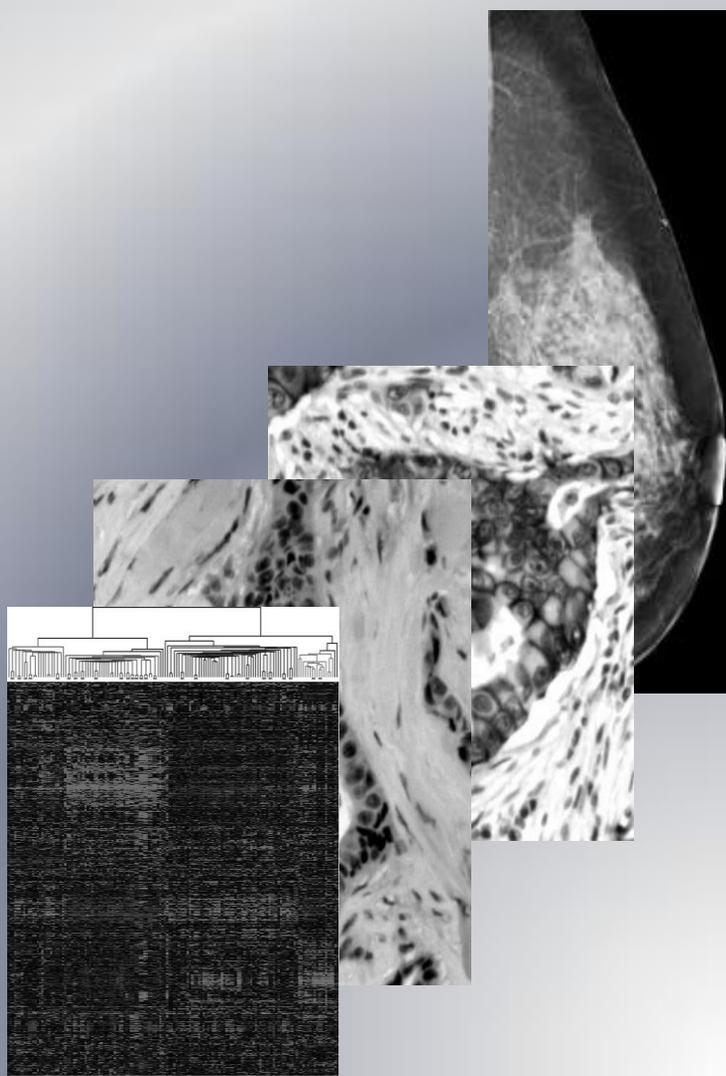
**Prof. Miguel Martín Jiménez**  
**Dra. Trinidad Caldés Llopis**

**Memoria presentada por Atocha Romero Alfonso para aspirar al Grado  
de Doctora en Bioquímica y Biología Molecular.**

**Madrid, 2009**

*A mis padres*

*A Juan*



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera expresar mis agradecimientos a la Dra. Trinidad Caldés Llopis y al Prof. Miguel Martín Jiménez por haberme dado la oportunidad de trabajar con ellos en este proyecto, sin sus apoyos, disponibilidad y conocimientos, difícilmente este proyecto habría prosperado.

También, quiero agradecer a todas las personas que de una forma u otra han posibilitado que este trabajo se llevara a cabo, en especial al Prof. Charles M Perou, por la magnífica estancia que he pasado en su laboratorio, por su voluntad, sentido práctico y optimismo que hacen que cualquier proyecto por imposible o irrealizable que parezca dé sus frutos y por todo lo que en su laboratorio he aprendido. Del mismo modo, quisiera dar las gracias a toda la gente del "*Perou lab*" especialmente a Xiaping, Olga, Kathie, Joel y Chris por su paciencia y por toda la ayuda prestada, y a Aleix por todo lo que de él y con él he aprendido, por los *lunch* que no hicimos enfrente del ordenador y por las charlas científicas que te mantienen despierta y son el motor que te hace querer saber más y seguir hacia adelante.

A toda la gente del laboratorio de Oncología Molecular, especialmente al Dr. Miguel de la Hoya por su buena disposición para ayudar y resolver dudas y a Alejandro por ayudarme con el *Bioanalyser*. Asimismo, agradecer a Alicia su control exhaustivo de las sangres. A los enfermeros del Servicio de Oncología Julio y Carmen, y a las data manager, en especial, a Sara Fernández. Igualmente, a Laura Barreales de estadística por su ayuda y buen talante. También, al Dr. López García-Asenjo y a Elena Molina Roldán del Servicio de Anatomía Patológica.

No me quiero olvidar de la gente de Análisis Clínicos, de mis compañeros residentes, especialmente de Carmen y Fiona con las que he compartido muchos buenos momentos durante estos años, de las tutoras la Dra. Dolores Ortega y la Dra. María Ángeles Cuadrado Cenxual, mencionar también a la Dra. Lautre, que con harta paciencia se ha leído partes de esta tesis y a la que debo el poder haberla terminado a tiempo. Además, quisiera dar las gracias al jefe del servicio, el Prof. Manuel Arroyo por su apoyo para que realizara una rotación externa de 7 meses fuera del servicio y a la SEQC y a la IFCC que promueven, mediante ayudas, la realización de estancias en el extranjero.

Finalmente, quisiera dar las a gracias los amigos que con su amistad hacen que todo resulte más fácil, particularmente a Sara Ocaña, Sara Vázquez, Arantxa, Manín, Ana, Marta, María, Helena y Violeta. A mis padres, por la educación que he recibido y por su apoyo incondicional, a mi tío Nacho por su asesoramiento, a mis hermanos por su

cercanía y a Carla que me ha dado muy buen embarazo y me ha dejado terminar de escribir esta tesis.

Por último, a Juan que me apoya, me ayuda y acompaña en todos mis proyectos.

Gracias.

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- A: absorbancia.  
AACR: American Association for Cancer Research.  
AC: adriamicina-ciclofosfamida.  
ADM: adriamicina.  
ASCO: American Society of Clinical Oncology.  
BCIRG: Breast Cancer International Research Group.  
CEF: ciclofosfamida-epirubicina-5-fluorouracilo.  
CEM: coeficiente de extinción molar.  
CGH: hibridación genómica comparada.  
CI50: concentración inhibitoria 50.  
CLAM: cáncer de mama localmente avanzado.  
Clau: subtipo genómico *claudin-low*.  
CM: cáncer de mama.  
CMF: ciclofosfamida-metrotexate-5-fluorouracilo.  
cols: colaboradores.  
CTRC: Cancer Therapy & Research Center.  
CTP: citosina trifosfato.  
d: diámetro.  
del: delección.  
dil: dilución.  
dNTP: deoxinucleótido trifosfato.  
DO: densidad óptica.  
EDTA: ácido etildiaminotetraacético.  
EMA: European Medicine Agency.  
FAC: 5-fluorouracilo-adriamicina-ciclofosfamida.  
FCAECC: Fundación Científica de la Sociedad Española Contra el Cáncer.  
FDA: Food and Drug Administration.  
FEC: 5-fluorouracilo-epirubicina-ciclofosfamida.  
FISH: *fluorescent in vitro hybridization*.  
G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos.  
GEICAM: Grupo Español de Investigación del Cáncer de Mama.  
GST: enzima glutation-S-transferasa.  
GSTM1: gen de la glutation-S-transferasa M1.  
GSTT1: gen de la glutation-S-transferasa T1.  
GSTP1: gen de la glutation-S-transferasa P1.  
GWAS: *genome-wide association studies*.  
HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico. (*Human epidermal growth factor receptor 2*).  
Her2: subtipo genómico *Her2-enriched*.

HR: *hazard ratio*.  
HETERO: heterocigoto.  
IC: intervalo de confianza.  
IFCC: International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.  
Ig: inmunoglobulina.  
IHQ: inmunohistoquímica.  
Ile: Isoleucina.  
iv: intravenoso.  
Kb: kilobase.  
KNN: *K-nearest neighbor*.  
LOWESS: *locally weighted scatterplot smoothing*.  
Lum A: subtipo genómico luminal A.  
Lum B: subtipo genómico luminal B.  
max: máximo.  
mín: mínimo.  
min: minuto.  
n: tamaño muestral.  
NC: Carolina del Norte.  
NCCN: National Comprehensive Cancer Network.  
NIH: National Institutes of Health.  
NKI: Nederlands Kanker Instituut (Instituto Holandés de Cáncer).  
NSABBP: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project.  
NYHA: New York Heart Association.  
OR: *odds ratio*.  
PAF: mostaza l-fenilalanina, adriamicina y fluorouracilo.  
PCR: *polymerase chain reaction*.  
QC-PCR: PCR cuantitativa.  
RIN: *RNA integrity number*.  
ROR: *risk of recurrence*.  
RBC: *residual cancer burden*.  
RCp: respuesta completa.  
RE: receptor de estrógenos.  
RP: receptor de progesterona.  
r.p.m: revoluciones por minuto.  
ROS: especies reactivas de oxígeno.  
RR: riesgo relativo.  
s: segundo.  
SAM: análisis supervisado de *microarrays*.  
SB: sobreexpresión.  
SEQC: Sociedad Española de Química Clínica y Patología Molecular.  
SMD: Stanford *Microarray Database*.  
SNP: *single nucleotide polymorphism*.

T: tumores.  
TAC: docetaxel-adriamicina-ciclofosfamida.  
Tam: tamaño.  
Taq: *Thermus aquaticus*.  
TC: docetaxel-ciclofosfamida.  
TEC: docetaxel-epirubicina-ciclofosfamida.  
Tm: temperatura de fusión.  
TNM: Tumor-Nódulo-Metástasis.  
TN: tumores triple negativos.  
TTOS: tratamientos.  
TOP2A: gen de la topoisomerasa II alfa.  
TXT: docetaxel.  
UICC: International Union against Cancer.  
UNC: University of North Carolina.  
UV: ultravioleta.  
Val: valina.  
vs: versus.  
V: volumen.

# ÍNDICE

	Pag.
1. <u>INTRODUCCIÓN</u> .....	11.
1.1. FARMACOGENÉTICA Y FARMACOGENÓMICA .....	12.
1.1.1. INTRODUCCIÓN.....	12.
1.1.2. FARMACOECONOMÍA Y FARMACOGENÓMICA.....	13.
1.1.3. IMPACTO DE LA FARMACOGENÉTICA/FARMACOGENÓMICA EN LA ONCOLOGÍA MÉDICA .....	15.
1.2. EL CÁNCER DE MAMA .....	18.
1.2.1. GENERALIDADES.....	18.
1.2.2. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA .....	20.
1.2.3. CÁNCER DE MAMA LOCALMENTE AVANZADO .....	21.
1.2.4. NUEVA TAXONOMÍA DEL CÁNCER DE MAMA.....	21.
1.3. LOS TRATAMIENTOS.....	26.
1.3.1. LA QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE.....	26.
1.3.2. LAS ANTRACICLINAS: ADRIAMICINA (DOXORRUBICINA).....	27.
1.3.3. LOS TAXANOS: DOCETAXEL.....	28.
1.4. EL ENSAYO CLÍNICO .....	30.
1.4.1. INTRODUCCIÓN.....	30.
1.4.2. CLASIFICACIÓN.....	30.
1.4.3. CARACTERÍSTICAS.....	30.
1.5. LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO.....	32.
1.5.1. LA CLASIFICACIÓN RCB (RESIDUAL CANCER BURDEN) DE SYMMANS.....	32.
1.5.2. LA CLASIFICACIÓN DE MILLER Y PAYNE.....	33.
1.6. BIOMARCADORES DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO.....	35.
1.6.1. GLUTATION-S-TRANSFERASA: SUS POLIMORFISMOS.....	35.
1.6.2. TOPOISOMERASA II ALFA (TOP2A) .....	37.
1.6.3. FIRMAS GENÓMICAS Y RESPUESTA AL TRATAMIENTO.....	39.
2. <u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u> .....	42.

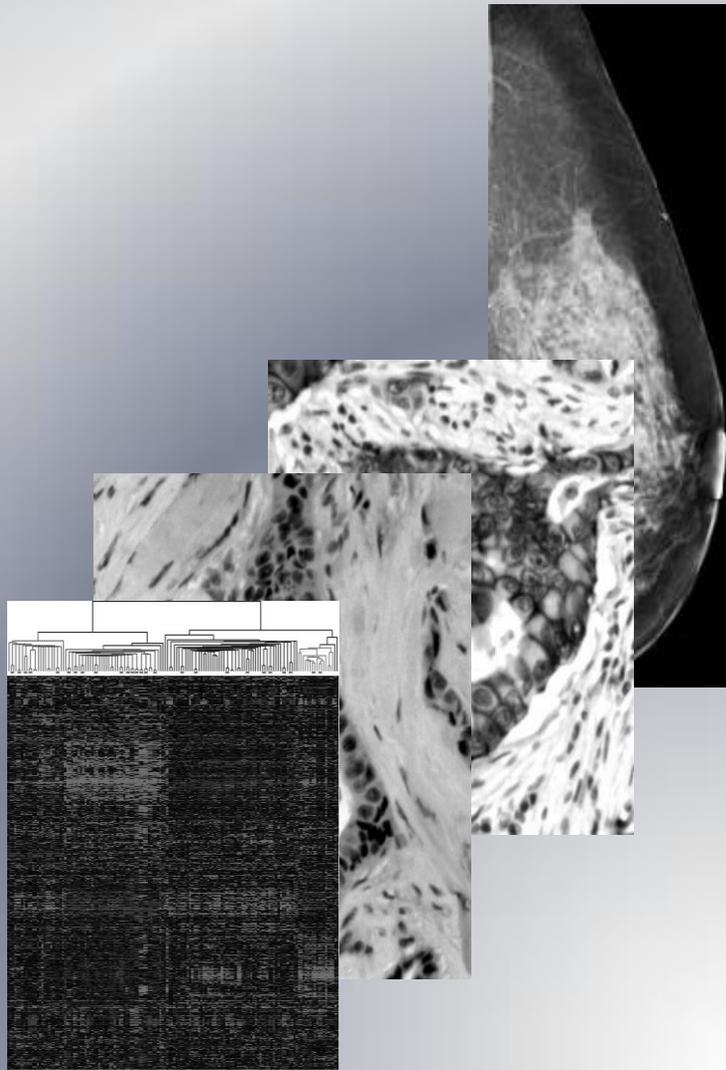
	Pag
<b>3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u></b> .....	<b>44.</b>
<b>3.1 SUJETOS DEL ESTUDIO</b> .....	<b>45.</b>
3.1.1 <b>CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO CLÍNICO</b> .....	<b>46.</b>
<b>3.2 OBTENCIÓN DE LAS MUETRAS</b> .....	<b>46.</b>
3.2.1 <b>OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO</b> .....	<b>46.</b>
3.2.2 <b>EXTRACCIÓN DEL DNA</b> .....	<b>46.</b>
3.2.3 <b>EXTRACCIÓN DEL RNA</b> .....	<b>47.</b>
3.2.4 <b>CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS</b> .....	<b>47.</b>
3.2.5 <b>CALIDAD DEL RNA</b> .....	<b>48.</b>
3.2.6 <b>OBTENCIÓN DEL cDNA</b> .....	<b>48.</b>
<b>3.3 ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS DE GSTM1 Y GSTT1</b> .....	<b>50.</b>
<b>3.4 ESTUDIO DEL SNP A342G EN EL GEN GSTP1</b> .....	<b>53.</b>
3.4.1 <b>PCR CUANTITATIVA. TECNOLOGÍA TAQMAN. DISCRIMINACIÓN ALÉLICA</b> .....	<b>53.</b>
<b>3.5 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE TOP2A POR PCR CUANTITATIVA</b> .....	<b>57.</b>
3.5.1 <b>CONDICIONES DE LA QC-PCR</b> .....	<b>57.</b>
3.5.2 <b>CÁLCULOS</b> .....	<b>59.</b>
3.5.3 <b>PUESTA A PUNTO DEL ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE TOP2A MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL</b> .....	<b>59.</b>
<b>3.6 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS TUMORES MEDIANTE MICROARRAYS</b> .....	<b>62.</b>
3.6.1 <b>MICROARRAYS</b> .....	<b>62.</b>
3.6.2 <b>MARCAJE E HIBRIDACIÓN DE LOS MICROARRAYS</b> .....	<b>63.</b>
3.6.2.1 <b>ESQUEMA DEL PROCESO.</b>	
3.6.2.2 <b>MARCAJE Y AMPLIFICACIÓN.</b>	
3.6.2.3 <b>HIBRIDACIÓN Y LAVADO.</b>	
3.6.3 <b>ESCANEADO Y ANÁLISIS DE LA IMAGEN</b> .....	<b>65.</b>
3.6.4 <b>PROCESAMIENTO DE DATOS</b> .....	<b>66.</b>
3.6.4.1 <b>UNC (UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA) MICROARRAY DATABASE.</b>	
3.6.4.2 <b>ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTOS.</b>	
3.6.4.3 <b>ANÁLISIS SUPERVISADO DE MICROARRAYS.</b>	

	Pag
3.6.4.4 ASIGNACIÓN DEL SUBTIPO GENÓMICO DE ACUERDO AL PREFIL DE EXPRESIÓN	
3.6.4.5 ANÁLISIS FUNCIONAL.	
<b>3.7 OTRAS DETERMINACIONES .....</b>	<b>74.</b>
3.7.1 ESTUDIO DE LA AMPLIFICACIÓN DE HER2 Y TOP2A POR FISH.....	74.
3.7.2 INMUNOHISTOQUÍMICA.....	74.
<b>3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>75.</b>
<b>ANEXO I. GENES PAM 50 .....</b>	<b>76.</b>
<b>ANEXO II. GENES <i>CLAUDIN-LOW</i> PREDICTOR.....</b>	<b>77.</b>
<b>4. <u>RESULTADOS</u> .....</b>	<b>95.</b>
<b>4.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS SUJETOS DEL ESTUDIO.....</b>	<b>96.</b>
<b>4.2 EFICACIA DE LOS TRATAMIENTOS.....</b>	<b>98.</b>
<b>4.3 ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS DE <i>GSTM1</i>, <i>GSTT1</i> Y <i>GSTP1</i> Y SU POSIBLE VALOR PREDICTIVO DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO.....</b>	<b>99.</b>
4.3.1 ESTUDIO DEL VALOR PREDICTIVO DE LA DELECIÓN HOMOCIGOTA DE LOS GENES <i>GSTM1</i> Y <i>GSTT1</i> .....	99.
4.3.2 ESTUDIO DEL VALOR PREDICTIVO DEL SNP A342G EN EL GEN <i>GSTP1</i> .....	101.
4.3.3 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>GSTT1</i> , <i>GSTM1</i> Y <i>GSTP1</i> EN TEJIDO MAMARIO.....	101.
4.3.4 CORRELACIÓN ENTRE EL GENOTIPO Y EL SUBTIPO GENÓMICO.....	103.
4.3.5 CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> Y <i>GSTP1</i> Y EL SUBTIPO GENÓMICO.....	105.
<b>4.4 ESTUDIO DEL POSIBLE VALOR DE HER2 COMO MARCADOR DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO.....</b>	<b>107.</b>
<b>4.5 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE TOP2A Y SU POSIBLE VALOR PREDICTIVO DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO.....</b>	<b>110.</b>
4.5.1 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE TOP2A POR <i>MICROARRAYS</i> Y PCR CUNTITATIVA.....	110.
4.5.2 CORRELACIÓN ENTRE LA EXPERSIÓN DE TOP2A Y VARIABLES CLINICOPATOLÓGICAS.....	112.

	Pag
4.5.3 LA EXPRESIÓN DE TOP2A Y LA RESPUESTA A ADRIAMICINA.....	114.
4.5.4 ALTERACIONES A NIVEL DEL DNA DE TOP2A Y LA RESPUESTA A ADRIAMICINA.....	116.
4.6 CLASIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS TUMORES .....	118.
4.6.1 CORRELACIÓN ENTRE EL SUBTIPO GENÓMICO Y LAS VARIABLES CLINICOPATOLÓGICAS.....	118.
4.6.2 QUIMISENSIBILIDAD DE LOS DIFERENTES SUBTIPOS GENÓMICOS.....	124.
4.7 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN TUMORES SENSIBLES Y RESISTENTES.....	129.
4.7.1 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN TUMORES TRATADOS CON ADRIAMICINA.....	129.
4.7.2 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN TUMORES TRATADOS CON DOCETAXEL.....	132.
4.7.3 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN TUMORES BASALES TRATADOS CON DOCETAXEL.....	135.
5. <u>DISCUSIÓN</u> .....	138.
5.1 BÚSQUEDA DE FACTORES PREDICTIVOS: ESTUDIOS GENÉTICOS VS CRIBADO GENÓMICO.....	139.
5.2 VALOR DE LA GST COMO MARCADOR DE RESPUESTA.....	142.
5.3 QUIMIOSENSIBILIDAD DE TUMORES HER2 POSITIVOS.....	146.
5.4 LA TOP2A MITOS Y REALIDADES.....	149.
5.5 GENÓMICA DEL CANCER DE MAMA. APLICABILIDAD CLÍNICA.....	152.
5.5.1 VALOR DE LA CLASIFICACIÓN GENÓMICA DEL CÁNCER DE MAMA.....	152.
5.5.2 <i>CLAUDIN LOW</i> : UN NUEVO SUBTIPO.....	155.
5.6 VALOR PREDICTIVO DE LAS FIRMAS GENÓMICAS.....	157.
5.6.1 GENES PREDICTIVOS DE LA RESPUESTA A ADRIAMICINA.....	157.
5.6.2 GENES PREDICTIVOS DE LA RESPUESTA A ADOCATEXEL.....	159.
5.6.3 FIRMAS PREDICTIVAS.....	160.

	Pag
6. <u>CONCLUSIONES</u> .....	162.
7. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	165.

# INTRODUCCIÓN





---

## 1.1 FARMACOGENÉTICA Y FARMACOGENÓMICA

### 1.1.1. INTRODUCCIÓN

La **farmacogenética** y **farmacogenómica** son campos que están avanzando muy rápido debido al impacto que está teniendo en la práctica clínica y en determinados aspectos de salud pública, así como al creciente interés de la industria farmacéutica por desarrollar estas ciencias.

El objetivo principal de ambas disciplinas es la selección de posibles candidatos para recibir un tratamiento determinado y la predicción de efectos adversos en base al genoma del paciente. En definitiva, los estudios farmacogenéticos y farmacogenómicos deben permitir seleccionar los tratamientos adecuados a las dosis adecuadas para cada paciente (1).

Habitualmente, se emplean los términos de farmacogenética y farmacogenómica indistintamente, sin embargo, no son sinónimos. Se denomina **farmacogenética** al estudio de las bases genéticas, de genes concretos, que influyen en la respuesta individual a los fármacos. La **farmacogenómica**, estudia la variabilidad en la expresión génica relacionada con la respuesta al tratamiento. Es decir, mientras que la farmacogenómica se refiere a abordajes que tienen en cuenta las características genómicas, mediante una visión integradora que incluiría interacciones entre genes, la expresión de los mismos... etc., la farmacogenética queda circunscrita a un estudio concreto de genes determinados (2).

Entre los genes candidatos a estudio se encuentran:

1. Genes relacionados con el metabolismo y transporte del fármaco.
2. Genes que codifican la diana molecular del fármaco.

#### Genes relacionados con el metabolismo de fármacos

Determinan la cantidad de fármaco activo que puede llegar a la zona afectada y por tanto su eficacia/toxicidad.

En general, el metabolismo de fármacos permite inactivar los sustratos, aumentar su solubilidad en agua para facilitar su excreción y la bioactivación de **profármacos**<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> **Profármaco**: sustancia que requiere ser transformada en el organismo por un proceso químico o enzimático para que se manifieste su efecto (3).

Las **reacciones metabólicas** se clasifican en reacciones de **fase I** y **fase II**. Las primeras están encaminadas a transformar los metabolitos para hacerlos más polares a través de procesos de oxidación, hidrólisis o reducción. La mayoría de estas reacciones están mediadas por enzimas del **citocromo P450 (CYPs)**. Las segundas catalizan reacciones de conjugación de metabolitos con ácido glucurónico, sulfatos, grupos metilos, acetilos, aminoácidos (como la glicina o glutamina) y glutatión (2).

### Genes diana de fármacos

Las dianas moleculares de los fármacos han sido objeto de numerosos estudios. Un ejemplo es la  **timidilato sintetasa (TS)**. Este enzima convierte a la deoxiuridinamonofofato (dUMP) en deoxitimidinamonofofato (dTMP) y su inhibición detiene el ciclo celular. El fármaco antineoplásico **5-fluorouracilo (5-FU)** ejerce su función bloqueando a este enzima. El 5-FU se activa *in vivo* a ácido 5-fluorodesoxiuridílico (5-FdUMP) y éste es un potente inhibidor del enzima. Debido a la electronegatividad del flúor el 5-FdUMP presenta una afinidad por el enzima miles de veces mayor que el sustrato normal (3).

La sobreexpresión del enzima TS se ha relacionado con la resistencia a tratamientos con 5-FU y otros inhibidores del enzima como el metotrexato y la capecitabina (profármaco del 5-FU) (4). Se han identificado varios polimorfismos, localizados en las regiones 5' y 3' no traducidas, que están implicados en la expresión del enzima. Uno de ellos es un polimorfismo en el número de repetición en tándem (TSER) de 28 pb que puede variar desde dos a nueve copias. Los alelos **TSER\*2** y **TSER\*3** son los más frecuentes. El alelo **TSER\*2** se asocia a mejor pronóstico en tumores colorrectales (5). Por otro lado, se ha descrito un SNP (polimorfismo de nucleótido único) localizado en el decimosegundo nucleótido, del segundo repetido, del alelo **TSER\*3**, que afecta a la expresión de TS al impedir la unión del factor de transcripción USF-1 (6). Esto supone una disminución de la tasa de transcripción que se traduce en una reducción de tres a cuatro veces de la expresión de TS (6). Además, se ha identificado una delección de seis pares de bases en el extremo 3' no traducido del gen que se asocia a peores respuestas a tratamientos con 5-FU (7).

### 1.1.2 FARMACOECONOMÍA Y FARMACOGENÓMICA

Un estudio realizado en el Reino Unido estima que el 7% de los pacientes sufren **reacciones adversas** como consecuencia de los tratamientos recibidos. La atención sanitaria que requieren estas reacciones supone un coste de 380 millones de libras al año (8).

Uno de las aplicaciones de la farmacogenómica y la farmacogenética es el asesoramiento pre-tratamiento de los pacientes, con el fin de disminuir dichos

efectos adversos y aumentar el porcentaje de éxito. Un ejemplo de esto es el estudio del gen **tiopurina metiltransferasa (TPMT)** en pacientes tratados con 6-mercaptopurina (**6-MP**).

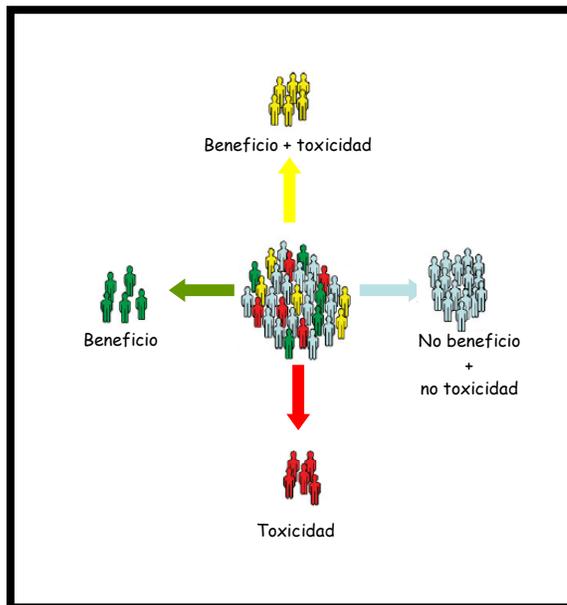
La 6-MP es un análogo de las bases púricas que se emplean comúnmente en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda. La 6-MP se transforma *in vivo* en su ribonucleótido, el ácido tioinosínico, que inhibe varias reacciones enzimáticas relacionadas con la síntesis de nucleótidos de purinas. Esta reacción compite con las reacciones de inactivación del fármaco, que son: la de metilación, catalizada por el enzima TPMT y la de oxidación catalizada por la xantina oxidasa (XO). La actividad de la XO es prácticamente nula en el tejido hematopoyético y, por tanto, es la TPMT quien determina la cantidad de fármaco activo en dicho tejido **(3)**.

El nivel de actividad de **TPMT** está determinado por varios polimorfismos genéticos, responsables de la variación interindividual de la eficacia y los efectos secundarios de la 6-MP. Los polimorfismos **TPMT\*3A**, **TPMT\*3C** y **TPMT\*2** determinan el 95% de los fenotipos de baja actividad enzimática **(9)**. Los pacientes con déficit de TPMT requieren dosis menores de 6-MP para evitar reacciones adversas severas. De hecho, la FDA ha decidido incluir información referente a la TPMT en los prospectos de 6-mercaptopurina y azatioprina (profármaco del anterior) detallando el riesgo de padecer una neutropenia atendiendo a variantes polimórficas de TPMT. **(10)**.

Por otro lado, las **autoridades sanitarias** de países que costean sistemas públicos de salud, ven poco factible la posibilidad de pagar los precios astronómicos de algunos medicamentos a todos los pacientes susceptibles, sin conocer, previamente, quiénes van a responder, por lo que existe un gran interés en el desarrollo e inclusión en la práctica clínica de test genéticos, capaces de identificar a los pacientes con mejor respuesta.

Varios trabajos de farmacoeconomía concluyen que los estudios farmacogenómicos y farmacogenéticos son coste-efectivos **(11)**.

También, la **industria farmacéutica** tiene un creciente interés en desarrollar estudios farmacogenéticos ya que cada vez son más necesarios para conseguir la autorización de comercialización de un fármaco. Además, al ser útiles en la práctica clínica pueden venderse como "pruebas predictivas". Tal es el caso del *Amplichip* de Roche® que está autorizado desde diciembre de 2004 por la FDA para la detección de deficiencias en las enzimas **CYP2D6** y **CYP2C19** del citocromo P450. **(12)**. En cualquier caso, la información obtenida por el resultado del test, no debe ser interpretada como definitiva sino que se debe considerar como un dato más a la hora de establecer la dosis y el tratamiento del paciente. **(13)**.



**Figura 1.** Los estudios genéticos pre-tratamiento deben de identificar a los pacientes que van a obtener beneficio de un fármaco sin padecer sus efectos secundarios. Dibujo modificado a partir de la figura publicada en el artículo "Pharmacogenomics: from bedside to clinical practice" (14)

### 1.1.3 IMPACTO DE LA FARMACOGENÉTICA/FARMACOGENÓMICA EN LA ONCOLOGÍA MÉDICA

Muchos de los agentes quimioterápicos presentan rangos terapéuticos muy estrechos y una alta variabilidad interindividual. De modo que una de las mayores necesidades de los médicos, que prescriben estos medicamentos, es disponer de herramientas que les permitan ajustar las dosis. En la mayoría de los casos, el ajuste se hace en función del peso y de la superficie corporal y muy pocas veces se dispone de pruebas que identifiquen a los pacientes que se van a beneficiar de los tratamientos. En una revisión de Phillips y cols (15) se estima que más del 50% de las reacciones adversas a fármacos se relacionan con la variabilidad genética de las enzimas que metabolizan el fármaco responsable de dicha reacción. Por lo tanto, uno de los mayores retos de la farmacogenética es establecer pruebas que faciliten establecer las dosis terapéuticas.

Como ejemplo de lo anterior está el **irinotecan** que es un fármaco que se emplea frecuentemente en el tratamiento del cáncer de colon. Un metabolito del irinotecan es el **SN-38** que es mil veces más potente que él. Tanto el irinotecan como el SN-38 son inhibidores del enzima **topoisomerasa I** (3). Este enzima alivia la tensión de torsión del DNA durante la replicación y la transcripción, rompiendo de forma transitoria una de las cadenas de la doble hélice, formándose un complejo DNA-topoisomerasa y volviéndola a soldar. Este fármaco se fija al complejo topoisomerasa-DNA e impide que se produzca esta soldadura. Por consiguiente, el irinotecan es muy

específico en la fase S del ciclo celular y ocasiona una parada del ciclo celular en la fase G2.

El **SN-38** se inactiva por conjugación con **ácido glucurónico**. Esta reacción es catalizada por las UDP-glucuroniltransferasas (UGT). En concreto, la isoforma **UGT1A1** es la responsable de la conjugación con glucurónico de SN-38 así como de la bilirrubina. El polimorfismo **UGT1A1\*28** se asocia a menores tasas de metabolización de SN-38 y por tanto a mayor toxicidad (diarrea y neutropenia). Este polimorfismo viene definido por una inserción del dinucleótido TA en la TATA box del promotor del gen lo que conlleva a una disminución en la expresión **(16)**.

En el 2005, la FDA aprobó que se incluyera en el prospecto del **irinotecan** la información referente al genotipado de UGT1A1 y un mes después aprobó la comercialización del test para el genotipado del polimorfismo UGT1A1\*28 **(17)**.

Además, la farmacogenómica es una herramienta útil a la hora de tomar una actitud terapéutica ya que selecciona a los pacientes que van a responder a un tratamiento. Así por ejemplo, el estudio del estatus del receptor **HER2** es indispensable para identificar a quienes se van a beneficiar del tratamiento con **trastuzumab**.

**HER2** es un receptor de membrana, con dominios tirosina kinasa, que se expresa en pequeñas proporciones en tejido mamario sano. Se cree que tiene funciones relacionadas con el crecimiento y la proliferación celular aunque todavía no se ha identificado su ligando endógeno en el cuerpo humano **(18)**. Aproximadamente, el 25% de los cánceres de mama invasivos sobreexpresan HER2. Esta sobreexpresión se atribuye, en la mayoría de los casos, a la amplificación del gen y se asocia a un mayor grado histológico de malignidad, alta tasa de replicación celular y ausencia de expresión de receptores hormonales. En definitiva, la sobreexpresión de HER2 se asocia a peor pronóstico **(18)**. Por otro lado, la sobreexpresión de HER2 se correlaciona claramente con la respuesta a **trastuzumab**. En este sentido, la incorporación del trastuzumab al arsenal terapéutico ha supuesto una revolución ya que ha cambiado drásticamente el pronóstico de las pacientes con tumores HER2 positivos **(19)**.

En principio, las pacientes susceptibles a recibir este tratamiento son aquellas que sobreexpresan el receptor. La sobreexpresión se puede poner de manifiesto midiendo la cantidad de proteína mediante técnicas inmunohistoquímicas (*Herceptest*, DAKO®), o mediante FISH<sup>2</sup> o PCR cuantitativa, que son técnicas que miden la

---

<sup>2</sup> **FISH** (*Fluorescent In Vitro Hybridization*): Técnica de biología molecular que se basa en la hibridación de una sonda fluorescente a una secuencia del DNA que se pretende estudiar.

amplificación del gen, siendo el FISH, por el momento, la técnica de elección pese a que no está exenta de limitaciones.

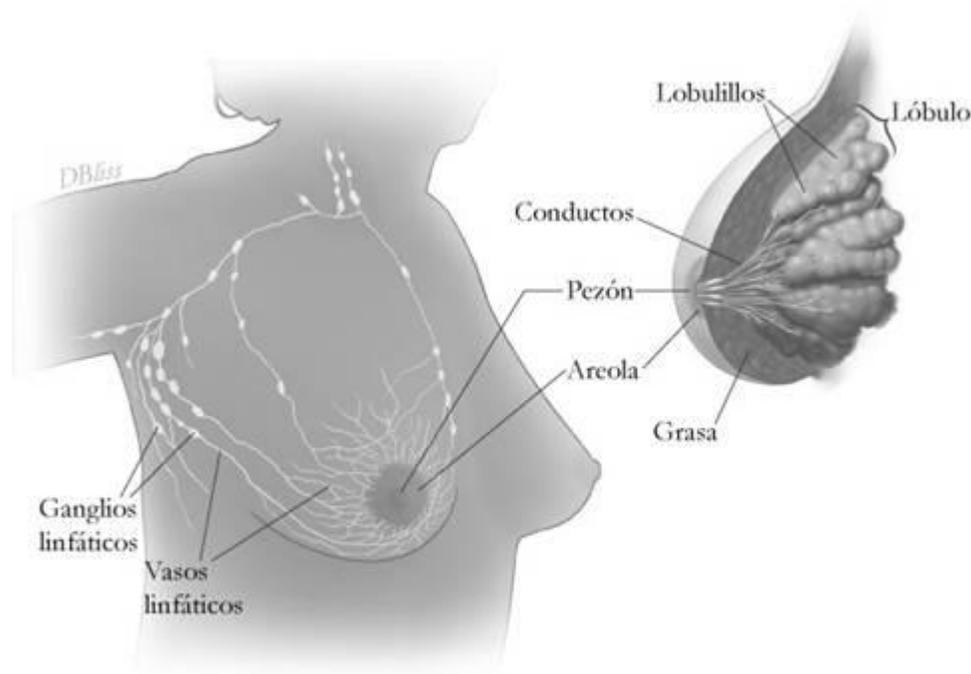
Del mismo modo, la firma DAKO®, basándose en los estudios de Knoop y cols (20) (21), ha comercializado el kit TOP2A FISH pharmDx™ diseñado para la determinación de cambios en el número de copias de la **topoisomerasa II alfa (TOP2A)** con fines diagnósticos. Las características y utilidad del test están establecidas en base a estudios hechos en población europea por el *Danish Breast Cancer Cooperative Group*. Según estos estudios, los tumores que presentan amplificación o delección de la TOP2A se asocian de forma significativa una menor supervivencia (20-21). Además, los cambios en el número de copias de la TOP2A podrían predecir la respuesta a regímenes terapéuticos con antraciclinas aunque aún existe polémica sobre esta relación.

Finalmente, en cáncer de colon avanzado los estudios retrospectivos han demostrado que aquellos pacientes con mutación en el gen **KRAS** no se benefician del tratamiento con inhibidores de factores de crecimiento epidérmico como el **cetuximab** o el **panitumumab** de manera que, actualmente, se considera obligatorio el estudio de dichas mutaciones antes de iniciar una terapia con dichos anticuerpos monoclonales (22).

## 1.2 EL CÁNCER DE MAMA

### 1.2.1 GENERALIDADES

En la mama femenina diferenciamos los **lobulillos** (glándulas productoras de leche), los **conductos** (conductos lácteos que comunican los lobulillos con el pezón) y el **estroma** (tejido adiposo y ligamentos que rodean los conductos y lobulillos, vasos sanguíneos y vasos linfáticos). La mayoría de los vasos linfáticos de la mama confluyen a los ganglios linfáticos axilares. (23)



**Figura 2.** Anatomía de la mama. Fuente: <http://www.meb.uni-bonn.de/cancer.gov/CDR0000256762.html> (24)

La mayoría de los tumores de la mama son benignos (fibroadenomas o papilomas) y, generalmente, son producidos por cambios fibroquísticos.

Los tumores malignos se originan en el epitelio glandular y se clasifican en infiltrantes y no infiltrantes dependiendo de si atraviesan o no la membrana basal limitante. En la tabla 1 se muestra dicha clasificación. De todos ellos, el carcinoma ductal infiltrante es el más habitual.

T. NO INFILTRANTES	T. INFILTRANTES
Carcinoma ductal <i>in situ</i> . Carcinoma lobulillar <i>in situ</i> .	Carcinoma ductal infiltrante. Carcinoma lobulillar infiltrante Carcinoma medular Carcinoma mucinoso Carcinoma tubular Otros

Tabla1.

Una vez las células malignas han infiltrado al estroma, la enfermedad progresa invadiendo vasos sanguíneos y linfáticos. Sin tratamiento, la muerte sobreviene por las metástasis invasivas. Cuando las células cancerosas de la mama llegan a los ganglios linfáticos axilares, pueden seguir reproduciéndose, lo que, a menudo, causa que esos ganglios se agranden. (23)

Atendiendo a diversos factores como el tamaño del tumor primario, presencia/ausencia de metástasis, la presencia de enfermedad a distancia... etc., se pueden clasificar a los pacientes en distintos grupos pronósticos. Uno de los sistemas utilizado, es el propuesto por el "American Joint Committee on Cancer Staging" que define estadios los 0, I, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IV. La supervivencia a los 5 años oscila entre 92% en el estadio 0 y 13% para el IV (25). La **clasificación TNM** se basa en el tamaño del tumor primario el número de ganglios afectados y numero de metástasis.

1. Tamaño del tumor primario.
2. Afectación de ganglios linfáticos y número de ganglios con metástasis.
3. Grado de diferenciación del tumor.
4. Tipo histológico del carcinoma: los tipos especializados tienen mejor pronóstico que los ductales
5. Infiltración linfovascular.
6. Presencia/ausencia de receptores de estrógenos y progesterona. La existencia de receptores implica un mejor pronóstico.
7. Grado de proliferación.
8. Aneuploidia. Los tumores aneuploides presentan un pronóstico ligeramente peor.
9. Sobreexpresión deHER2.

**Cuadro 1.** Variables que influyen en el pronóstico del cáncer de mama (23)

TABLA 2: CLASIFICACIÓN TNM DE CÁNCER DE MAMA						
TUMOR PRIMARIO (T)						
T1	T2	T3	T4A	T4B	T4C	T4D
≤2 cm	>2 cm y ≤5 cm	>5cm	Extensión a la pared torácica	Extensión a la piel	T4a y T4b	Carcinoma inflamatorio
GANGLIOS LINFÁTICOS (N)						
N0	N1	N2		N3		
No hay metástasis en ganglios linfáticos	Metástasis en ganglios linfáticos axilares ipsilaterales móviles	Metástasis en ganglios linfáticos axilares ipsilaterales fijos		Metástasis en ganglios linfáticos mamarios internos o supraclaviculares ipsilaterales		

### 1.2.2. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente entre las mujeres de todo el mundo. En España, se diagnostican, aproximadamente, unos 16.000 casos al año lo que representa casi el 30% de todos los tumores del sexo femenino en nuestro país y fallecen unas 6000 mujeres al año por cáncer de mama, que suponen el 16,7% de todos los fallecimientos por cáncer del sexo femenino. La mayoría de los casos se diagnostican entre los 35 y los 80 años, con un máximo entre los 45 y los 65.

Mientras que el número de casos y las tasas de incidencia aumentan lentamente, el número de muertes se está estabilizando en nuestro país debido, sobre todo, a un mejor resultado de los tratamientos y a la detección precoz de esta neoplasia (26).

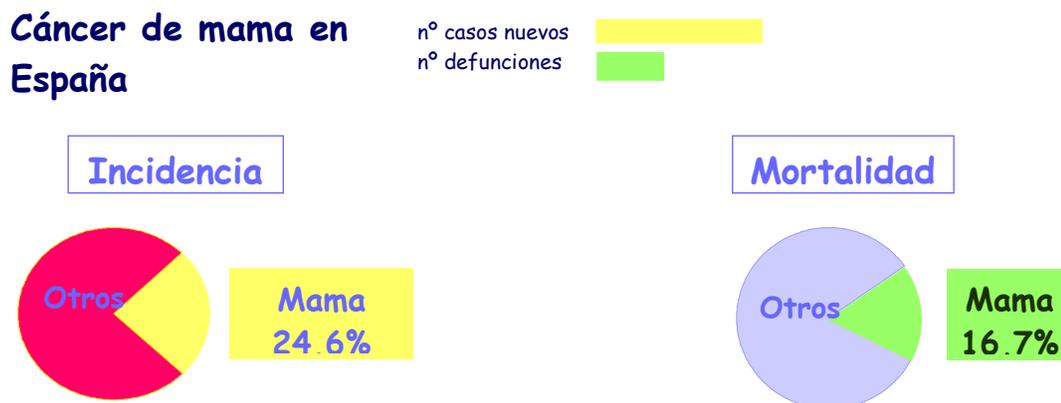


Figura 3. Fuente: López-Abente y cols. Centro Nacional de Epidemiología (2004) Elaboración: FCAECC.

### 1.2.3. CÁNCER DE MAMA LOCALMENTE AVANZADO

El carcinoma localmente avanzado de mama (**CLAM**) se caracteriza por una significativa afectación regional, definida por tumores muy grandes, o bien con afectación de la piel o pared torácica, o extensión ganglionar masiva, lo que clasifica a estas pacientes en estadio **III**. La incidencia del **CLAM** es muy variable, pero en nuestro medio, considerando la definición anterior, supone entre el 15-20 % de los tumores de mama. La supervivencia a los 5 años es de 30-40%. En algunos países en vías de desarrollo que no disponen campañas de cribado mamográfico, el estadio III es la forma más usual de presentación de la enfermedad. En un sentido más amplio, algunos investigadores, como los del MD Anderson Cancer Center de Houston, pioneros de la quimioterapia prequirúrgica, consideran como CLAM todo tumor de mama que no es candidato de inicio a cirugía conservadora a causa de su tamaño, lo que añade al grupo pacientes con tumores en estadio II.

### 1.2.4 NUEVA TAXONOMÍA DEL CÁNCER DE MAMA

En las últimas décadas, muchos grupos de investigación básica se han centrado en el estudio del cáncer. Por otro lado, los oncólogos médicos han apreciado la importancia de un conocimiento molecular del cáncer.

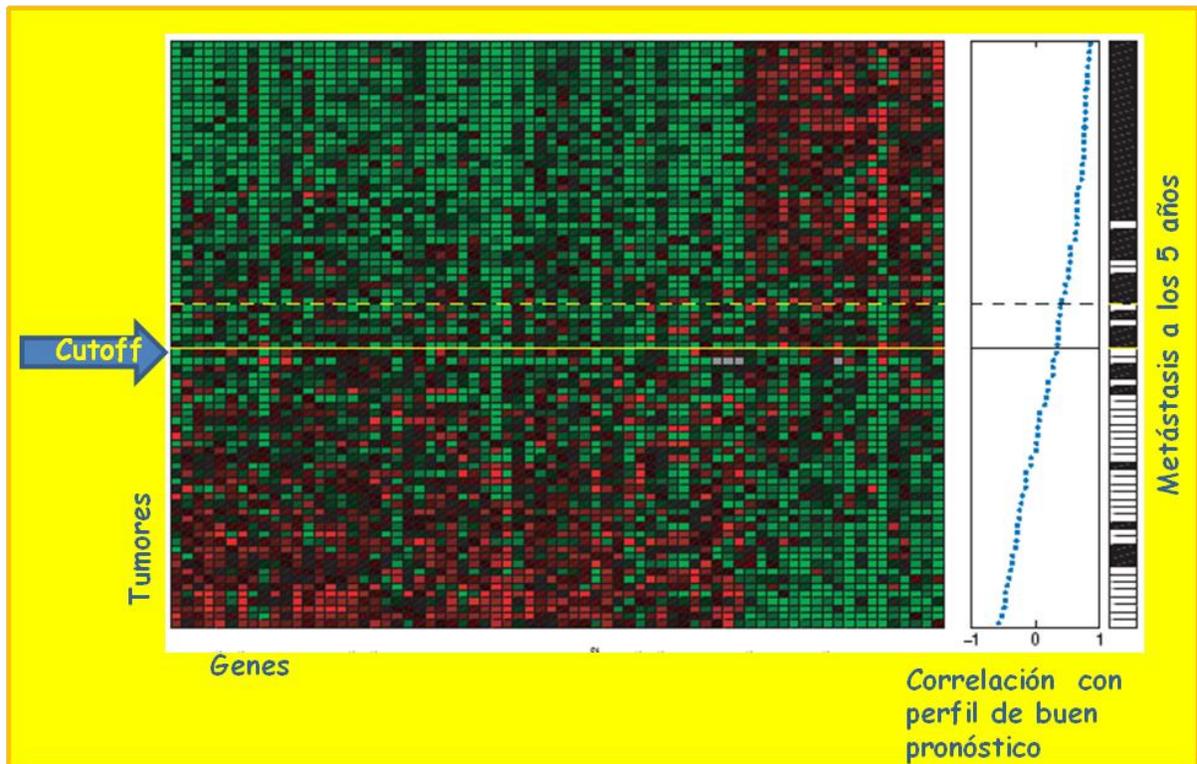
En el campo de la patología mamaria, existen varios estudios genómicos que han aportado mucha información acerca de la biología de la célula tumoral de la mama. Este conocimiento ha permitido establecer un pronóstico más fino de los pacientes así como terapias más específicas.

En este aspecto, destacan los estudios de *Laura van 't Veer* (Holanda) y *Charles M Perou* (EEUU).

En enero de 2002, se publicó el artículo de *Laura van 't Veer*, en el que se presentaba una **firma de 70 genes** para cáncer de mama capaz de pronosticar el curso de la enfermedad con mayor eficacia que los parámetros habitualmente utilizados (metástasis en ganglios, grado histológico) (27). Estos genes estaban implicados en el ciclo celular, los procesos de invasión y de metástasis, angiogénesis y transducción de señales, sugiriendo que todos ellos son mecanismos importantes implicados en la metastatización temprana. La firma había sido desarrollada en pacientes menores de 55 años, con ganglios negativos y tumores menores de 5 cm. En el mismo artículo, los autores cuestionan los regímenes de quimioterapia, ya que el 70% de los pacientes que responden al tratamiento hubieran tenido también un pronóstico favorable si no se hubieran tratado, señalando, por tanto, la importancia de las firmas genómicas para identificar; por un lado los pacientes que no necesitan quimioterapia y por otro los que

tienen alto riesgo de recaída y además pueden ser respondedores a la misma. Posteriormente, la firma ha sido validada en diferentes cohortes de pacientes. Así, por ejemplo, en diciembre del mismo año, el grupo holandés publicaba un artículo donde demostraban que la firma tenía valor pronóstico en un grupo de 295 pacientes, de las cuales 151 tenían ganglios negativos y 144 eran ganglios positivos (28). Aquellas pacientes en las que la firma predecía un buen pronóstico tenían una probabilidad de supervivencia, a los 10 años, del  $94.5\% \pm 2.6$  mientras que las pacientes de mal pronóstico la probabilidad era del  $54.6\% \pm 4.4$ .

Finalmente, tras validar la firma genómica en diferentes grupos de pacientes, la FDA aprobó la comercialización de esta firma con fines diagnóstico, en febrero del 2007. El nombre comercial de la firma es *MammaPrint®* y es la primera firma genómica con fines diagnósticos comercializada. La principal limitación práctica de este test es que precisa tejido fresco para su realización.

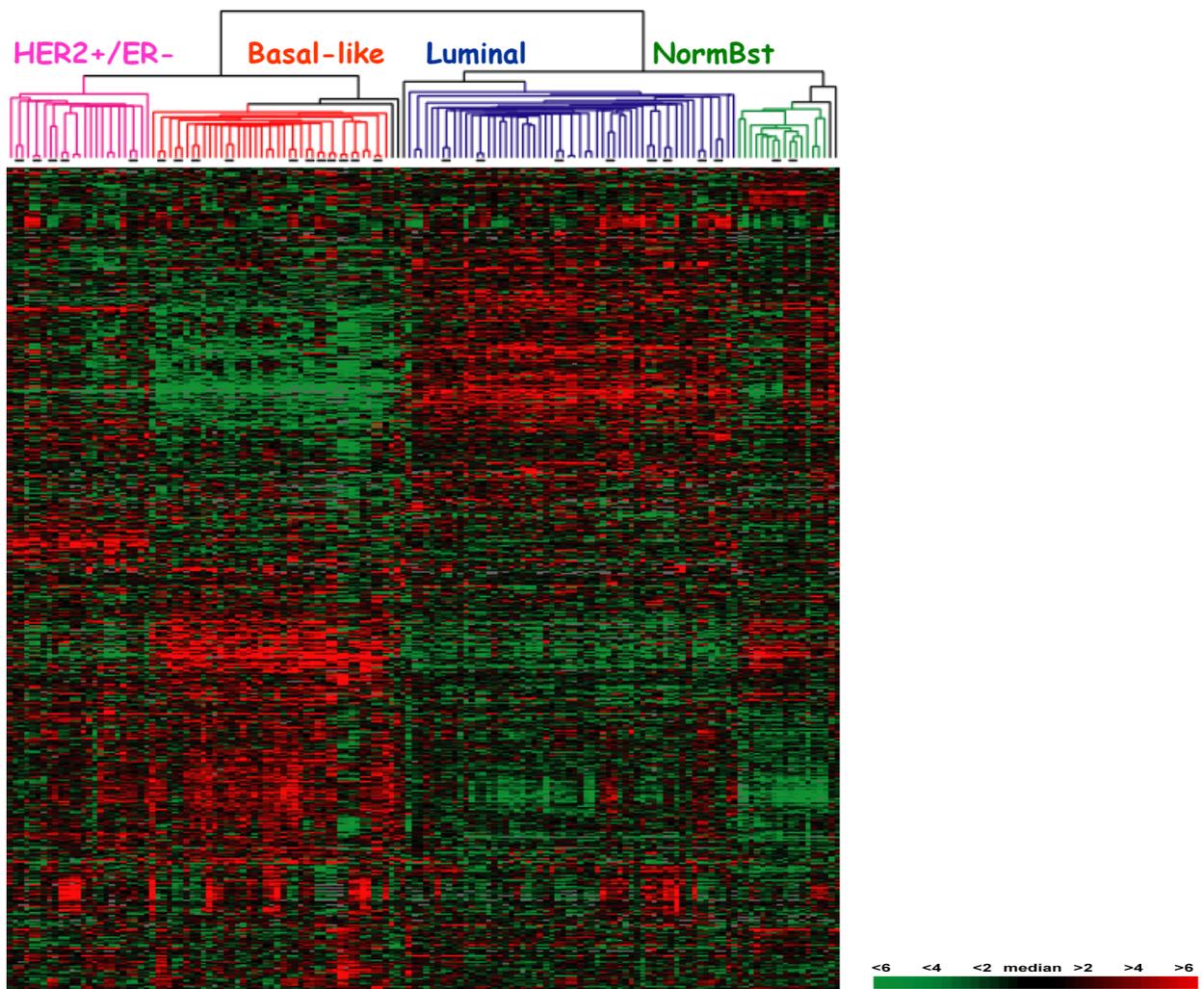


**Figura 4.** Modificada del artículo de Van 't Veer y cols (27). Matriz en la que se representa la expresión de los 70 genes en 78 tumores esporádicos. Se representa también la correlación entre la firma de buen pronóstico y las pacientes que desarrollaron metástasis a los 5 años (cuadros blancos y negros de la última columna).

En agosto del 2000, *Charles M Perou* publicó una clasificación **genómica del cáncer de mama** (29). Esta clasificación ayudaría a comprender la biología de la célula tumoral. El artículo establece los grupos:

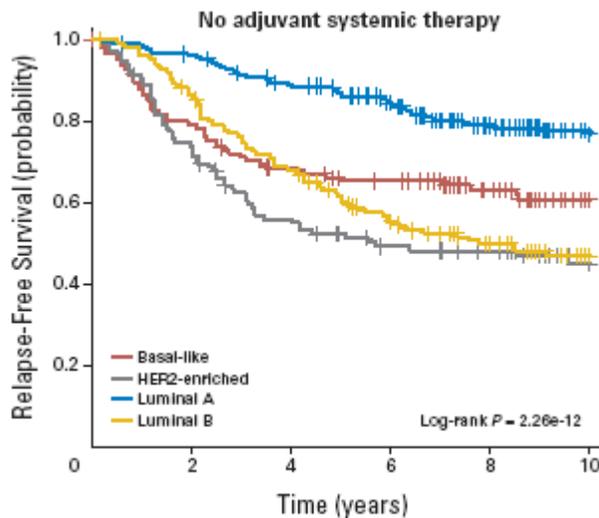
- Luminal**, con expresión de receptores hormonales. En artículos posteriores se distingue entre luminal A (con baja expresión de genes proliferativos y con buen pronóstico) y luminal B con mayor expresión de genes proliferativos.
- Her2-enriched**, caracterizado por la expresión del receptor que da nombre al grupo y con baja expresión de receptores estrogénicos.
- Basal**, de alto grado de proliferación celular y baja expresión de receptores hormonales y HER2.
- Normal-like**.

El mismo *Perou* ha ido perfeccionando esta clasificación definiendo firmas de genes capaces de discernir entre los distintos grupos. Además, ha visto que esta clasificación se mantiene a través de las diferentes plataformas genómicas (30). Más relevante es el hecho de que la clasificación tiene valor pronóstico.

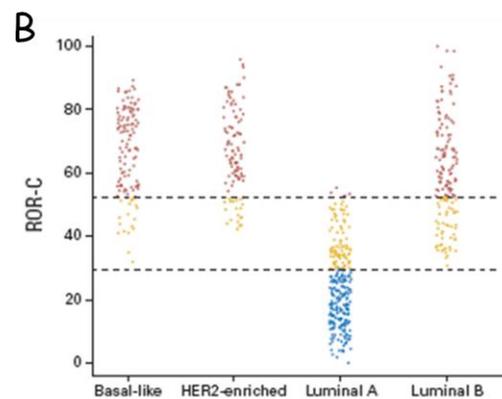
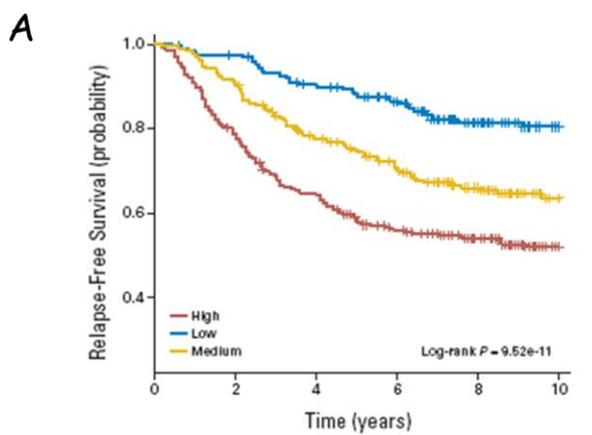


**Figura 5.** Dendrograma donde se representa la expresión génica en los distintos subtipos genómicos del cáncer de mama. El color verde representa genes con baja expresión y el rojo genes sobreexpresados.

Recientemente, el mismo grupo ha publicado una firma de 49 genes que determina el subtipo genómico (31). Como se había visto anteriormente, los distintos subtipos genómicos difieren en el pronóstico, siendo los tumores luminal A los de mejor pronóstico. Además, los autores desarrollan una puntuación o *score* de riesgo de recurrencia (ROR) que se asocia a cada subtipo. Dicho *score*, se ha desarrollado a partir de una cohorte de pacientes del NKI, con ganglios negativos, que no había recibido ningún tratamiento. En función de este parámetro desarrollan unos puntos de corte que estratifican el riesgo en bajo, medio y alto.



**Figura 6.** Curvas de Kaplan - Meier de los distintos subtipos en un set de 710 pacientes con ganglios axilares negativos. La figura está tomada del artículo de Parker et al. (31)



**Figura 7.** Tomada del artículo de Parker y cols (31). En la gráfica A se representa el *score* de riesgo de recurrencia de cada subtipo y en la grafica B las curvas de Kaplan-Meier de las categorías alta, media y baja establecidas atendiendo al *score* de riesgo de recurrencia.

En relación a los genes característicos de cada subtipo, se ha visto que: dentro de los genes, que definen el grupo **Her2-enriched**, se encuentran muchos genes del amplicón 17q11, como el propio **HER2** y **GRB7**. En el agrupamiento de genes característicos de tumores **basales** se encuentran genes como **c-KIT**, **FOXC1** y **P-Cadherin**, y en general, genes relacionados con el medio extracelular. Los tumores **luminales** se caracterizan por expresar genes como **ER**, **XBP1**, **FOXA1** Y **GATA3** (30).

Además de tener distinto pronóstico, los tumores de los diferentes subtipos presentan diferentes características. De este modo, se sabe que los tumores basales se diagnostican en pacientes más jóvenes y es más frecuente, en EEUU, en población afro-americana (32). Por otro lado, las mutaciones de p53, así como de BRCA1, se dan con más frecuencia en tumores basales (32-34).

Finalmente, en un artículo de Herschkowitz y cols se describe un posible nuevo subtipo denominado **claudin-low** (35) caracterizado por la baja expresión de genes que codifican proteínas claudinas. Una comunicación reciente de *Jenny Chang* y cols postula que este nuevo subtipo podría tratarse de tumores enriquecidos en *stem cells* tumorales (36).

A día de hoy, la mayor parte de oncólogos, clasifica el tumor mamario como receptores hormonales positivos, HER2 positivos (sobreexpresa el gen HER2) y triple negativos ya que esta clasificación se puede realizar de manera rutinaria en los servicios de Anatomía Patológica mediante técnicas de relativa sencillez. Esta clasificación dirige a las pacientes hacia un tratamiento u otro.

## 1.3 LOS TRATAMIENTOS

### 1.3.1 QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE

Aunque el tratamiento más eficaz contra el cáncer sigue siendo la cirugía, la quimioterapia antineoplásica o citotóxica es imprescindible para el tratamiento de muchos pacientes.

Los fármacos quimioterápicos actúan fundamentalmente inhibiendo el ciclo de división celular. El "*Development Therapeutic Program del National Cancer Institute*" los clasifica como: agentes alquilantes, antimetabólicos, inhibidores del enzima topoisomerasa I y II o antimetabolitos de los ácidos nucleicos.

Los diferentes tipos de quimioterapia, atendiendo al momento de la administración, se clasifican en:

- A- **Quimioterapia neoadyuvante:** Se realiza antes del tratamiento local, como la cirugía de extirpación tumoral o la radioterapia.
- B- **Quimioterapia concomitante.** Se administra a la vez que otro tratamiento, generalmente la radioterapia o la inmunoterapia.
- C- **Quimioterapia adyuvante:** Se administra tras el tratamiento local.

Respecto a la **quimioterapia neoadyuvante**, varios estudios han demostrado que el uso de quimioterapia durante el preoperatorio, en tumores de mama localmente avanzados, produce una disminución del tamaño del tumor en la mayoría de los casos. En grupos indiscriminados de mujeres con cáncer de mama se ha confirmado que la quimioterapia neoadyuvante (prequirúrgica) y la quimioterapia adyuvante (postquirúrgica) se asocian con idéntica supervivencia, por lo que ambas opciones son igualmente recomendables, aunque la primera parece aumentar la posibilidad de cirugía conservadora de la mama.

Las razones para iniciar un tratamiento de quimioterapia neoadyuvante o quimioterapia primaria son:

- Tratar de forma temprana la enfermedad micrometastásica,
- Valorar la respuesta al tratamiento en el tumor primario.
- En algunas ocasiones puede reducir el tamaño tumoral lo suficiente como para poder realizar cirugía conservadora.

La eficacia de la quimioterapia neoadyuvante en **CLAM** se ha establecido en los últimos 25 años; inicialmente las combinaciones de adriamicina (doxorrubicina) y, posteriormente, la asociación de antraciclinas y taxanos han sido la base del tratamiento. Lamentablemente, la experiencia con quimioterapia neoadyuvante en

CLAM se basa en estudios no comparativos de pequeño tamaño muestral. La experiencia con quimioterapia neoadyuvante en tumores operables es mucho más sólida (Tabla 3).

TABLA 3: QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE CON ANTRACICLINAS EN TUMORES OPERABLES			
	REGIMEN	RCp	Supervivencia
GRUPO MILAN (37)	A CMF	5%	69% a 8 años
MD ANDERSON (38)	FAC	12%	Mejor si RCp
NSABBP-18 (39)	AC	10%	70% a 9 años
UNC (40)	A CMF	15%	76% a 5 años
RCp: respuesta completa patológica; A: adriamicina, C: ciclofosfamida; M: metotrexato, F: 5-fluoruracilo			

Gracias a estos estudios el uso de tratamiento neoadyuvante con antraciclina se considera estándar en el manejo de las mujeres con carcinoma localmente avanzado de mama (T3-T4, N2); la adición de docetaxel reporta mayor tasa de respuestas completas patológicas y cirugías conservadoras. Por tanto, el uso de combinaciones de tres o cuatro fármacos incluyendo antraciclina y taxanos se considera actualmente estándar, con la adición de trastuzumab en las enfermas cuyos tumores presentan la alteración HER2. Sin embargo, con la excepción del trastuzumab, no disponemos de factores predictivos de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante con antraciclina o con taxanos, por lo que es obvio que estamos administrando unos u otros (o ambos) a muchas pacientes que no se benefician de ellos. Algunos de estos fármacos, como las antraciclina, presentan además una indudable toxicidad crónica (toxicidad cardíaca y leucemias/síndromes mielodisplásicos) que puede ser letal.

Es por ello muy importante investigar los parámetros predictivos que nos permitan establecer qué tumores se benefician de antraciclina, taxanos, ambos, o ninguno, de cara a establecer un tratamiento neoadyuvante más racional del CLAM.

### 1.3.2. ANTRACICLINAS: ADRIAMICINA (DOXORRUBICINA)

Las **antraciclina** son uno de los citostáticos más potentes de los que disponemos hoy en día. Estas moléculas se intercalan entre las bases del DNA formando un complejo que inhibe al enzima **DNA-topoisomerasa II** alfa impidiendo así la síntesis tanto de DNA como de RNA. Además, cuando estos fármacos son metabolizados aparecen

radicales libres que al oxidarse forman especies reactivas de oxígeno que son tóxicos para las células (3), por lo que el mecanismo de acción del fármaco no parece limitado exclusivamente a la inhibición de topoisomerasa II alfa.

La adriamicina (doxorubicina) es una de las drogas más efectivas para el tratamiento de tumores sólidos, como el carcinoma de mama, el carcinoma de células pequeñas de pulmón o el carcinoma de ovario (41).

En el cáncer de mama avanzado se emplea, comúnmente, la combinación ciclofosfamida, doxorubicina y 5-fluorouracilo, ya que ha demostrado mayor eficacia que el régimen clásico de ciclofosfamida, metotrexato y 5-fluorouracilo. Si bien, es cierto, que la toxicidad del primero es mayor (41). La combinación taxanos, adriamicina, ciclofosfamida se considera más potente que la primera aunque la toxicidad medular es también mayor.

Entre los **efectos secundarios** de las antraciclinas cabe de destacar la toxicidad gastrointestinal, alopecia, mielosupresión, inducción de segundas neoplasias hematológicas y, sobre todo la cardiotoxicidad (41). Las antraciclinas producen una **miocardiopatía tóxica** que es dependiente de dosis, por lo que nunca debe sobrepasarse un umbral de dosis acumulada, que se he establecido en 450 mg/m<sup>2</sup> para doxorubicina y aproximadamente el doble para epirubicina, ya que a partir de dicho umbral aparece insuficiencia cardíaca congestiva en cerca de un tercio de los casos. Lamentablemente, incluso sin alcanzar dicha dosis acumulada, el corazón de las mujeres tratadas con antraciclinas sufre un daño funcional y orgánico que, aún sin traducirse en clínica cardíaca a corto plazo, compromete la salud cardíaca de las enfermas a largo plazo.

### 1.3.3. TAXANOS: DOCETAXEL

El **docetaxel** es un taxoide semisintético obtenido a partir de las hojas del tejo europeo. Su principal mecanismo de acción consiste en promover la **polimerización de microtúbulos**, estabilizando los haces con la consiguiente paralización de la mitosis (3). Así, queda bloqueado el ciclo celular en la transición metafase-anafase induciéndose la apoptosis.

El docetaxel se considera, actualmente, un fármaco indispensable en el tratamiento del cáncer de mama, tanto en la enfermedad metastásica como localmente avanzada y operable.

Como toxicidades más importantes presenta: neutropenia, reacciones de hipersensibilidad, neurotoxicidad, diarrea, vómitos, toxicidad sobre piel y anejos

cutáneos, mucositis y retención hídrica con desarrollo de derrama pleural, pericárdico o ascitis.

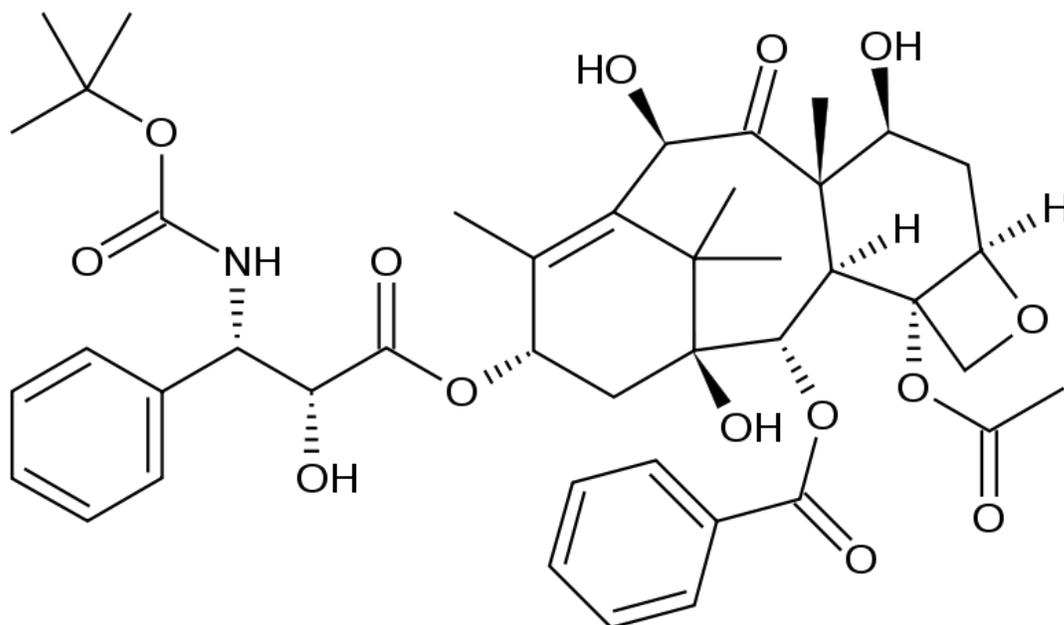


Figura 8. Estructura de la molécula de docetaxel.

## 1.4. EL ENSAYO CLÍNICO

### 1.4.1 INTRODUCCIÓN

Un ensayo clínico es una evaluación experimental de un producto, sustancia, medicamento, técnica diagnóstica o terapéutica a través de su aplicación a seres humanos y pretende valorar su eficacia y seguridad. Es el estudio clínico que posee el nivel de evidencia más alto para demostrar que el procedimiento médico que se realiza es el más adecuado (42).

### 1.4.2 CLASIFICACIÓN

Existen diferentes tipos de clasificaciones. Atendiendo al desarrollo clínico los podemos clasificar en ensayos de:

**Fase I:** Incluye a pocos pacientes (20-80). El objetivo es obtener información sobre el metabolismo, la biodisponibilidad, farmacodinámica, farmacocinética y bioequivalencia del fármaco.

**Fase II:** Incluyen entre 200-300 pacientes. El objetivo es definir la dosis terapéutica, eficacia y seguridad del tratamiento en pacientes con la patología de estudio, determinar el efecto farmacológico/terapéutico de un medicamento en una enfermedad concreta, completar datos de seguridad y evaluar datos farmacocinéticos.

**Fase III:** Incluyen entre 100 y 1000 pacientes. El objetivo es evaluar la seguridad y eficacia en gran número de pacientes con la dosis terapéutica bien definida así como establecer nuevas indicaciones (Fase IIIb).

**Fase IV:** Incluyen más de 1000 pacientes. El objetivo es determinar la seguridad en condiciones reales. Mediante estos ensayos se obtiene datos de farmacoeconomía y farmacovigilancia.

### 1.4.2 CARACTERÍSTICAS

Habitualmente, en un ensayo clínico en fase II-IV existe un grupo con el que se compara la intervención experimental. Este grupo sufre también una intervención con un procedimiento placebo o con un procedimiento estándar de referencia, ya validado para la situación objeto de estudio. Para que ambos grupos sean comparables todos los factores pronósticos, tanto los conocidos como los desconocidos, deben estar repartidos por igual entre los grupos antes de iniciar el tratamiento o procedimiento experimental, esto se puede conseguir mediante un proceso aleatorio que distribuya

los casos al azar en cada brazo del estudio. El objetivo es conseguir que los diferentes grupos sean comparables u homogéneos, evitar el sesgo del investigador en la asignación de casos a los grupos y garantizar que los tests estadísticos tendrán valores de significación estadística válidos **(43)**.

El ensayo clínico debe ser aprobado por un **comité de bioética**. Los pacientes que forman parte de un ensayo deben conocer los objetivos del estudio, sus riesgos y beneficios y firmar el **consentimiento informado** y podrán abandonar el estudio cuando quieran. El ensayo clínico finaliza cuando acaban los plazos de tiempo definidos en el protocolo, o cuando de forma prematura son manifiestamente perjudiciales o beneficiosos los efectos en el brazo experimental **(42)**.

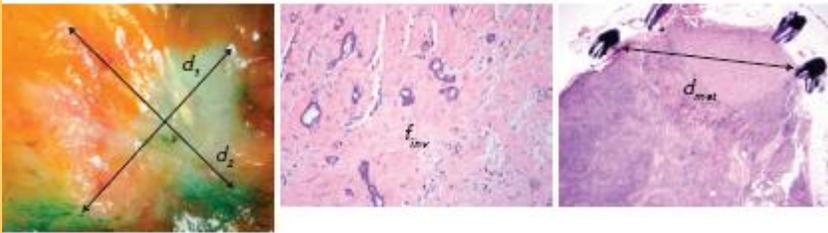
A la hora de realizar un estudio, debemos definir claramente a qué población va dirigido. La población a estudio debe representar fielmente las características de la población general. Si no se selecciona correctamente la **muestra poblacional** se produce un **sesgo de selección**. Para evitar esto es necesario definir unos criterios de selección que son pautas que definen determinados aspectos de una población y que en su conjunto delimitan a la población a estudio **(43)**. Los criterios de selección pueden ser criterios de inclusión o de exclusión. Además, en muchas ocasiones conviene "cegar" no solo al paciente sino al observador y a la persona que registra los datos para así tener una evaluación de los datos lo menos sesgada posible.

## 1.5 LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO

Un reto importante de los ensayos clínicos en neoadyuvancia es poder determinar la respuesta al tratamiento para poder predecir el pronóstico de las pacientes y tomar decisiones terapéuticas acertadas en el futuro. Por tanto, se requieren de métodos científicos que eviten la subjetividad del médico a la hora de valorar dicha respuesta.

### 1.5.1 LA CLASIFICACIÓN RCB (RESIDUAL CANCER BURDEN) DE SYMMANS

Esta clasificación estratifica la respuesta al tratamiento neoadyuvante y ha sido desarrollada por un grupo de patólogos del MD Anderson (44). Está basada en la variable continua **RCB** (*Residual Cancer Burden*) que se calcula teniendo en cuenta el tamaño y celularidad del tumor primario así como el tamaño y número de metástasis en ganglios tras la terapia neoadyuvante.



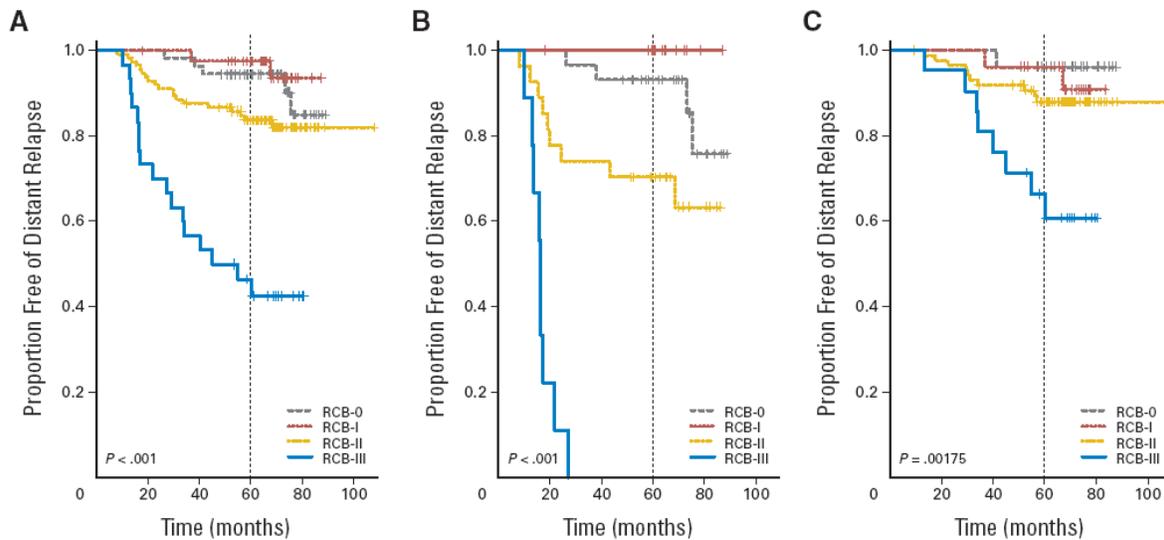
Variables:

Diámetro del tumor primario ( $\sqrt{d_1 d_2} = d_{\text{prim}}$ )  
 Fracción de celularidad cancerosa invasiva ( $f_{\text{inv}}$ )  
 Diámetro de la metástasis más grande ( $d_{\text{met}}$ )  
 LN: Número de metástasis en ganglios

$$\text{RCB} = 1.4(f_{\text{inv}} d_{\text{prim}})^{0.17} + [4(1 - 0.75^{\text{LN}}) d_{\text{met}}]^{0.17}$$

Cuadro 2. Cálculo de la variable RCB

Atendiendo a la variable RCB se establecen los grupos o categorías RCB-0, RCB-I, RCB-II y RCB-III, que tienen una importante capacidad pronóstica de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global. El primer grupo comprende aquellos tumores que desaparecen tras el tratamiento y por tanto tienen un RCB de 0. El punto de corte establecido entre las categorías RCB-I y RCB-II es 1.36 y entre las categorías RCB-II y RCB-III es 3.28.



**Figura 9.** Tomada del artículo de Symmans y cols (44). Se representan las curvas de Kaplan-Meier de las categorías RBC. **A:** incluye una cohorte de pacientes tratadas con paclitaxel seguidas de 5-fluorouracilo, adriamicina y ciclofosfamida. **B:** incluye un subgrupo, de la cohorte anterior, de pacientes no tratadas con hormonoterapia, en adyuvancia. **C:** representa el subgrupo de pacientes tratadas con hormonoterapia en adyuvancia.

Aunque esta clasificación ha sido ampliamente empleada, no considera, en el cálculo del RBC, el tamaño del tumor antes de iniciar la terapia. Por lo tanto, tumores de gran tamaño que se reducen significativamente pueden tener la misma puntuación que tumores más pequeños con una reducción menor.

### 1.5.2 CLASIFICACIÓN DE MILLER Y PAYNE

Esta clasificación se describió previa a la anterior. Comprende cinco categorías atendiendo a la reducción en la celularidad maligna en el tumor antes y después del tratamiento (45).

**Grado 1.** No hay una reducción en el número de células tumorales.

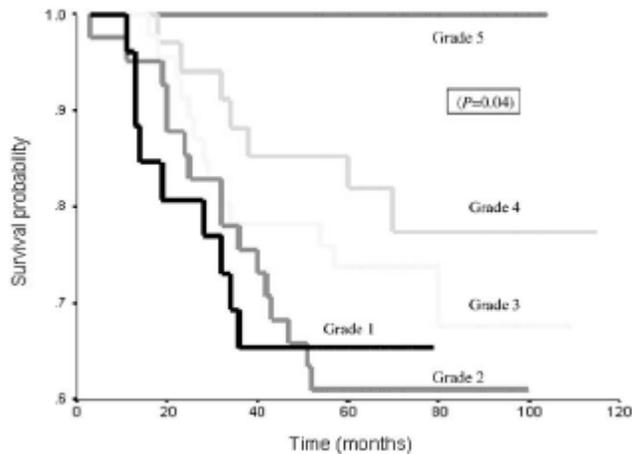
**Grado 2.** Hay una mínima reducción en el número de células cancerosas (hasta un 30%).

**Grado 3.** Se produce una reducción en el número de células tumorales de un 30-90%.

**Grado 4.** La reducción en el número de células tumorales es de más del 90%.

**Grado 5.** Hay una respuesta completa y por tanto no hay tumor residual.

Como en el caso anterior, los autores afirman que la clasificación se correlaciona con el pronóstico de las pacientes tal y como muestran las curvas de Kaplan-Meier de la figura 10.



**Figura 10.** Tomada del artículo de Keith y cols (45). Curvas de supervivencia de los distintos grados. Las pacientes fueron tratadas con quimioterapia neoadyuvante. Tras la cirugía recibieron radioterapia y hormonoterapia.

A pesar de tener valor pronóstico, esta clasificación no contempla el tamaño tumoral ni el número y tamaño de las metástasis en ganglios. Además, está sujeta a una mayor subjetividad por parte del patólogo.

Existen otros muchos sistemas de clasificación de la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante. Todos ellos distinguen las enfermas con respuesta completa o casi completa (enfermedad residual microscópica) de las restantes. Grosso modo, estas enfermas con buena respuesta son superponibles a los grupos RBC-0 + RBC-I (Symmans) y grados 4 y 5 (Payne y Miller).

## 1.6 BIOMARCADORES DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO

### 1.6.1. GLUTATION-S-TRANSFERASA: SUS POLIMORFISMOS

La **glutación-S-transferasa (GST)** es un enzima del metabolismo, que cataliza la conjugación con glutatión de tóxicos y fármacos. A nivel del fármaco, esta conjugación supone una inactivación del mismo y facilita su excreción. Por tanto, este enzima determina la cantidad de fármaco activo que puede existir en el tejido.

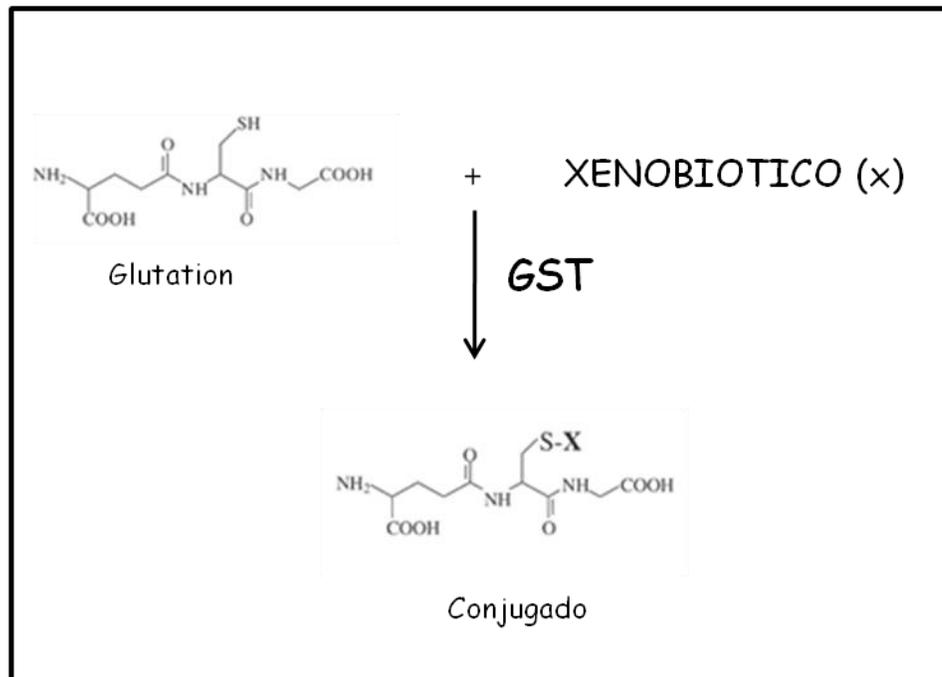


Figura 11. Esquema de la reacción de conjugación con glutatión.

La **GST** cataliza la **detoxificación** de muchas sustancias **oxidantes** que podrían dañar tanto al DNA como a los lípidos de membrana, tales como epóxidos, hidróxidos y aldehídos (46). Entre los tóxicos conjugados por este enzima se encuentran muchos fármacos antineoplásicos (47). Así, por ejemplo, los compuestos de platino son reducidos por este enzima, lo que determina una inactivación de los mismos, facilitando su excreción (48).

Existen varios genes que codifican para las distintas formas de este enzima. Algunos de los genes que codifican para estas isoformas están delecionados con una prevalencia alta en la población (49). Entre los genes que codifican para este enzima se encuentran **GSTM1**, **GSTT1** y **GSTP1**.

El gen **GSTM1** se encuentra localizado en 1p13 y codifica para un enzima de 218 aminoácidos. La presencia o ausencia del gen (delección homocigota) es polimórfica y

determina la actividad del enzima (50). La frecuencia del alelo nulo en población caucásica es 0.710 (51).

El gen **GSTT1** se encuentra localizado en la región 22q11. Codifica para una proteína de 240 aminoácidos (50) y, al igual que en el caso anterior, la delección del gen es un polimorfismo siendo la frecuencia del alelo nulo en población caucásica de 0.335 (51).

Finalmente, el gen **GSTP1** se encuentra en la región 11q13 y codifica para una proteína de 210 aminoácidos. Existen varios polimorfismos del gen, entre ellos el **SNP A342G** que produce el cambio de **Ile 105 Val (50)**. La sustitución Ile 105 Val afecta al sitio de unión enzima-sustrato. La frecuencia de individuos homocigotos Ile/Ile es del 51%, el 43% es Ile/Val y el 6% es homocigoto para la variante Val/Val en población caucásica (52). Las variantes polimórficas difieren en la actividad catalítica. Se sabe que la reducción catalítica de la droga tiotepa<sup>3</sup> es dos veces más eficiente en la variante Ile (53).

Varios estudios asocian los déficits enzimáticos de **GST** con una mayor susceptibilidad al cáncer. Así por ejemplo, los portadores de **BRCA2** que son homocigotos Val/Val para el gen **GSTP1** tienen mayor riesgo de cáncer de mama (54).

Por otro lado, algunos estudios encuentran que los déficits enzimáticos se relacionan con una mayor tasa de respuestas a fármacos antineoplásicos y una mayor supervivencia. Los efectos antineoplásicos tanto de la quimioterapia como de la radioterapia son debidos, en gran medida, a la generación de **especies reactivas de oxígeno**. Puesto que las isoformas de **GST** determinan un aclaramiento de estas sustancias, parece lógico encontrar que una actividad menor del enzima se asocie a mejores respuestas. En cualquier caso, hay otros estudios que concluyen que los déficits enzimáticos se asocian a una menor supervivencia. Estos resultados contradictorios, probablemente, se deban a que, en la mayoría de los casos, los regímenes terapéuticos contiene varios fármacos y por tanto, los resultados de los diferentes estudios no son comparables.

Un estudio retrospectivo, en pacientes con cáncer de mama tratadas con quimioterapia o radioterapia concluye que las pacientes con la delección homocigota de al menos de uno de los dos genes, **GSTT1** o **GSTM1** tienen mejor pronóstico que aquellas que presentan ambos genes (55). Otro estudio, también en pacientes de cáncer de mama, asocia el polimorfismo Val/Val de **GSTP1** con una mayor supervivencia (56). En el mismo sentido el estudio de Petros y colaboradores, realizado en pacientes de cáncer de mama, tratadas con quimioterapia convencional seguido de altas dosis de

---

<sup>3</sup> Tiotepa: agente alquilante empleado para tratar algunos tipos de cánceres.

ciclofosfamida, cisplatino y carmustina, concluye que la supervivencia es significativamente mayor en aquellas pacientes con delección del gen **GSTM1** (57).

Otro estudio, japonés, establece que la expresión de **GSTP1**, evidenciada por inmunohitoquímica, se relaciona con resistencia al tratamiento con taxanos en pacientes de cáncer de mama (58).

En cualquier caso, son muy pocos los estudios con fármacos en monoterapia. Probablemente, los déficits enzimáticos no afectan por igual a cada fármaco. Tampoco hay estudios prospectivos lo que hace difícil extraer conclusiones sólidas.

### 1.6.2 TOPOISOMERASA II ALFA (TOP2A)

La **topoisomerasa II** es un enzima dependiente de ATP que corta las dos hebras de DNA girándolas y sellándola después, alterando la topología del DNA. Su función es controlar el **grado de superenrollamientos** del DNA, estando implicada en procesos metabólicos como replicación, transcripción...etc., en los que se requiere una separación transitoria de las dos hebras de DNA. En mamíferos, la actividad catalítica de este enzima se produce por dos isoformas; la topoisomerasa II alfa (**TOP2A**) y la II beta. Ambas isoformas difieren en su localización nuclear y su contenido en las distintas fases del ciclo celular (59-60).

La **TOP2A** es la diana molecular de muchos agentes anticancerosos, entre ellos las **antraciclinas**, etopósido, mitoxantrone, que actúan impidiendo el ligamiento del DNA escindido por el enzima. Se forma así un complejo que impide la restauración del DNA, acumulándose múltiples escisiones. Este efecto puede ser letal para la célula.

El conocimiento de la función de TOP2A en el desarrollo del tumor, así como su implicación en la respuesta al tratamiento es controvertido. Existen varios mecanismos por los cuales se incrementa la concentración intracelular de TOP2A, y quizás, este aumento, sea importante en la progresión tumoral. No obstante, actualmente, no se sabe qué finalidad tiene dicho aumento, ni cuál es la consecuencia directa del mismo, ya que no se conoce qué papel desempeña este enzima en las células tumorales. Se ha visto que la sobreexpresión de TOP2A en líneas celulares conduce a apoptosis (61), circunstancia que no parece ocurrir en tumores humanos, puesto que, en ellos, la sobreexpresión de la TOP2A se relaciona con un peor pronóstico siendo más frecuente en tumores de alto grado. Además, la expresión del enzima se correlaciona con la de otros marcadores de proliferación celular como Ki 67 (62-63). Parece ser que los pacientes con tumores de mama de alto grado, con alta tasa de proliferación celular (ki 67 > 20%) y con inmunohistoquímica negativa para receptores hormonales presentan con frecuencia sobreexpresión de la TOP2A (63-64). Es decir, es probable que la expresión de TOP2A sea característica de tumores basales.

El gen de la TOP2A se encuentra localizado en el cromosoma **17q12-q21**, muy próximo al oncogén **HER2**. Se ha observado que un alto porcentaje de tumores que amplifican dicho gen amplifican también el gen TOP2A **(65)**. En un estudio llevado a cabo por Coon JS y cols **(66)**, se vio que todos los pacientes con amplificación de TOP2A tenían también amplificación de HER2 y se encontró una asociación con la respuesta local favorable al tratamiento con antraciclinas.

En el mismo sentido, se ha visto que la **amplificación de TOP2A** se asocia a mejores respuestas con antraciclinas en pacientes HER2 positivos **(67)**. Sin embargo, se ha visto que dicha amplificación no siempre se correlaciona con una sobreexpresión de la proteína **(68)**. Del mismo modo, se han descrito tumores que sobreexpresan el enzima sin amplificación del gen **(69)**. Por lo tanto, es difícil explicar que la mejor respuesta a las antraciclinas reportada en las enfermas con amplificación TOP2A sea debida a un aumento de la expresión de la proteína diana, al no existir una correlación entre la expresión y la amplificación del gen.

Por otro lado, estudios *in vitro*, sugieren que la sobreexpresión de la TOP2A disminuye la sensibilidad al tratamiento con determinados fármacos **(70-72)**. Sin embargo, esto no se ha podido corroborar en muestras de pacientes.

Algunos autores, han observado, que tras la administración de antraciclinas determinados tumores aumentan la expresión del enzima. Estos pacientes tienen más recaídas que aquellos en los que la expresión del enzima disminuye o permanece constante. A la vista de estos resultados, se ha sugerido que dicho incremento pudiera ser debido a una expansión clonal de células resistentes a antraciclinas que se han seleccionado durante el tratamiento **(73)**.

En definitiva, actualmente, existe una controversia en cuanto a si los niveles de **TOP2A**, en tumores de mama, son **predictivos de la respuesta a antraciclinas**. Los estudios publicados no son concordantes; mientras unos le atribuyen un valor predictivo a dicho enzima **(66,74)** otros no encuentran asociación entre la respuesta y el estado enzimático **(64)**.

Finalmente, dos comunicaciones recientes presentadas en San Antonio, en diciembre del 2008, sugieren que la respuesta a la adriamicina está condicionada por la **polisomía<sup>4</sup> cromosoma 17** más que por la amplificación de TOP2A o HER2 **(75-76)**. Se sabe que la polisomía ocurre en el cáncer de mama con una frecuencia estimada del 40%. La polisomía puede traducirse en un aumento de la expresión del gen **HER2**, sin

---

<sup>4</sup> **Polisomía:** condición por la cual un organismo presenta al menos un cromosoma más de lo habitual en su especie. Generalmete, se produce por la no disyunción de los cromosomas durante la meiosis aunque existen otras causas.

embargo, no está claro que estos tumores se beneficien de tratamiento con trastuzumab. Aunque la polisomía del cromosoma se asocia a un peor pronóstico, los tumores con esta característica son más sensibles a adriamicina. En cualquier caso, se trata de resultados muy recientes y hacen falta más estudios de corroboren dicha información.

### 1.6.3 FIRMAS GENÓMICAS Y RESPUESTA AL TRATAMIENTO

La tecnología de *microarrays* permite clasificar los tumores en quimiosensibles o resistentes. Recientemente, se han publicado varias firmas genómicas capaces de predecir la respuesta a un determinado tratamiento en esta patología. Sin embargo, se requieren ensayos clínicos prospectivos, con un mayor número de pacientes que validen dichas firmas. La validación de estas firmas así como su inclusión en los protocolos hospitalarios evitaría tratamientos innecesarios en las mujeres con cáncer de mama.

Uno de los estudios más relevantes es el llevado a cabo por la Universidad de Duke, North Carolina. Este grupo, primeramente, desarrolló una serie de firmas genómicas de sensibilidad a antineoplásicos, a partir de líneas celulares tratadas con dichos fármacos (77). El estudio fue duramente criticado, puesto que otros autores consideraban "increíble" el hecho de que a partir de datos *in vitro* se pudieran sacar firmas genómicas válidas para humanos. Además, el artículo original contenía algún error, lo que suscitó, aún más, una pérdida de credibilidad por gran parte de la comunidad científica. No obstante, en un estudio posterior, el grupo de Duke desarrolló dos firmas genómicas para predecir la respuesta de TEC (docetaxel, epirrubicina, ciclofosfamida) y FEC (fluorouracilo, epirrubicina, ciclofosfamida) a partir de las firmas desarrolladas para un único fármaco publicadas anteriormente (78). Las nuevas firmas fueron validadas en pacientes del ensayo clínico EORTC 10994/BIG 00-01, que habían sido tratadas con dichos regímenes. En el artículo, los autores defienden que si las pacientes hubieran sido seleccionadas hacia un tratamiento u otro atendiendo a los datos genómicos la tasa de repuestas hubiera aumentado de un 40% a un 70%.

Actualmente, la Universidad de Duke está desarrollando un ensayo clínico multicéntrico, en pacientes HER2 negativas. El identificador de este ensayo clínico es NCT00636441 y está registrado en la web <http://clinicaltrials.gov>. En este ensayo, las pacientes son tratadas con adriamicina y ciclofosfamida o docetaxel y ciclofosfamida en función de su perfil genómico. El objetivo del ensayo es validar las firmas previamente publicadas así como demostrar que la tasa de respuestas de pacientes guiadas genómicamente hacia un tratamiento es mayor que en aquellas en las que el tratamiento se asigna al azar.

Otra firma genómica a resaltar es la desarrollada por Jenny Chang para pacientes tratadas en neoadyuvancia, en monoterapia, con docetaxel **(79)**. Esta firma fue desarrollada en una cohorte de 24 pacientes. En este trabajo, se considera que los pacientes son sensibles al tratamiento si la enfermedad residual tras el tratamiento es menor al 25%. Posteriormente, el mismo grupo observa que los patrones genómicos de los tumores residuales tanto de los pacientes inicialmente sensibles como resistentes son muy similares y desarrollan una segunda firma genómica característica de tumores resistentes a docetaxel **(80)**. Esta firma incluye genes de parada de ciclo celular en G2M como las ciclinas y cdc2. Otro gen que destaca es mTOR, por lo que el grupo propone este gen como posible diana terapéutica para tumores resistentes.

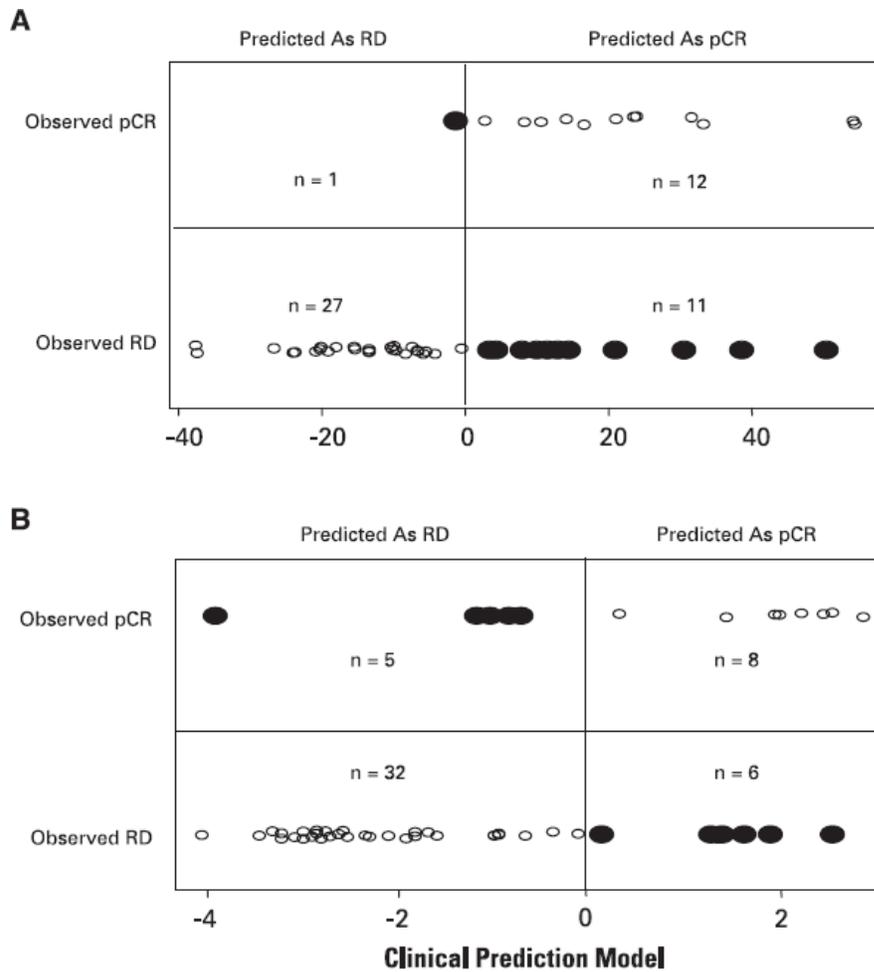
Otro estudio **(81)**, identificó un panel de expresión génica para predecir la respuesta a docetaxel en cáncer de mama, utilizando una técnica de procesamiento de alto rendimiento a partir de PCRs. El sistema identificó un modelo de expresión de 85 genes que predecía la respuesta clínica con una precisión del 80%, que es un nivel muy prometedor para una eventual aplicación clínica.

También, es interesante el estudio de Rouzier y cols del MD Anderson. Este estudio está basado en un grupo de 85 pacientes tratadas con paclitaxel seguido de FAC (fluorouracilo, adriamicina, ciclofosfamida) **(82)**. En este trabajo, los autores encuentran que los tumores más sensibles a este régimen son basales y Her2-enriched. Posteriormente, otros investigadores del MD Anderson publicaron una firma de 30 genes capaz de predecir la respuesta a este régimen (figura 12) **(83)**.

Finalmente, cabe resaltar el artículo Sorlie y cols **(84)**. En este trabajo se analiza la expresión genómica de tumores tratados con adriamicina en monoterapia y tumores tratados con fluorouracilo y mitomicina. Los autores no consiguen sacar una firma genómica robusta para cada rama de tratamiento pero encuentran que los diferentes subtipos descritos por Perou presentan distinta sensibilidad siendo los tumores luminal B son poco sensibles a adriamicina. Esto no sorprende ya que se sabe los tumores con receptores hormonales positivos son, en general, poco sensibles a la quimioterapia convencional.

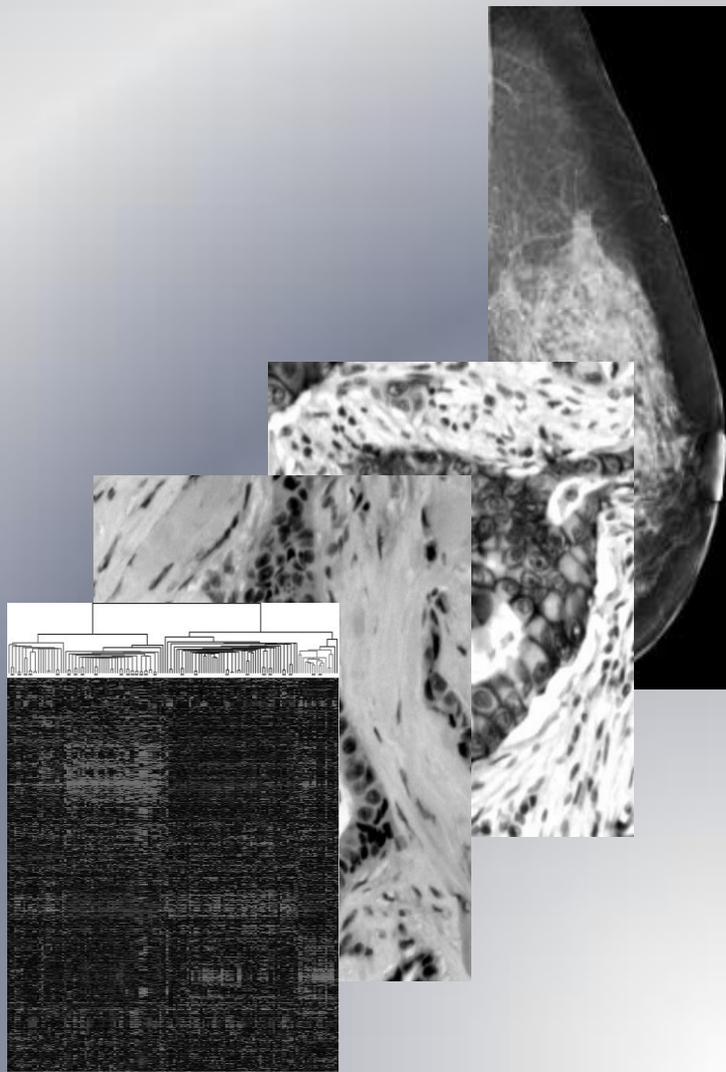
A pesar de estos resultados prometedores, se precisan más estudios para extraer conclusiones con repercusión clínica.

A día de hoy, no hay resultados de ensayos clínicos en los que el perfil genómico haya determinado el tratamiento. Por otro lado, las firmas genómicas tienen pocos genes en común lo que dificulta la comprensión de la biología de la célula tumoral sensible y resistente. Además, en muchas ocasiones, los investigadores no hacen accesible los datos genómicos por lo que se hace difícil comparar resultados.



**Figura 12.** Extraída del artículo del grupo del MD Anderson (83). Comparación de la capacidad predictiva de la respuesta al tratamiento de dos modelos A y B. El modelo A está basado en la expresión de 30 genes. El modelo B está basado en variables clínicas (receptor de estrógenos, edad, y grado histológico). Los puntos negros representan individuos bien clasificados por el modelo y los blancos los individuos que no se han clasificado correctamente. Se observa que el modelo A es más exacto y preciso que B.

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS





## HIPÓTESIS

El estudio genómico con *microarrays* puede identificar un patrón de expresión de genes que sirva para predecir la sensibilidad o resistencia a los citotóxicos adriamicina o docetaxel en mujeres con **CLAM**.

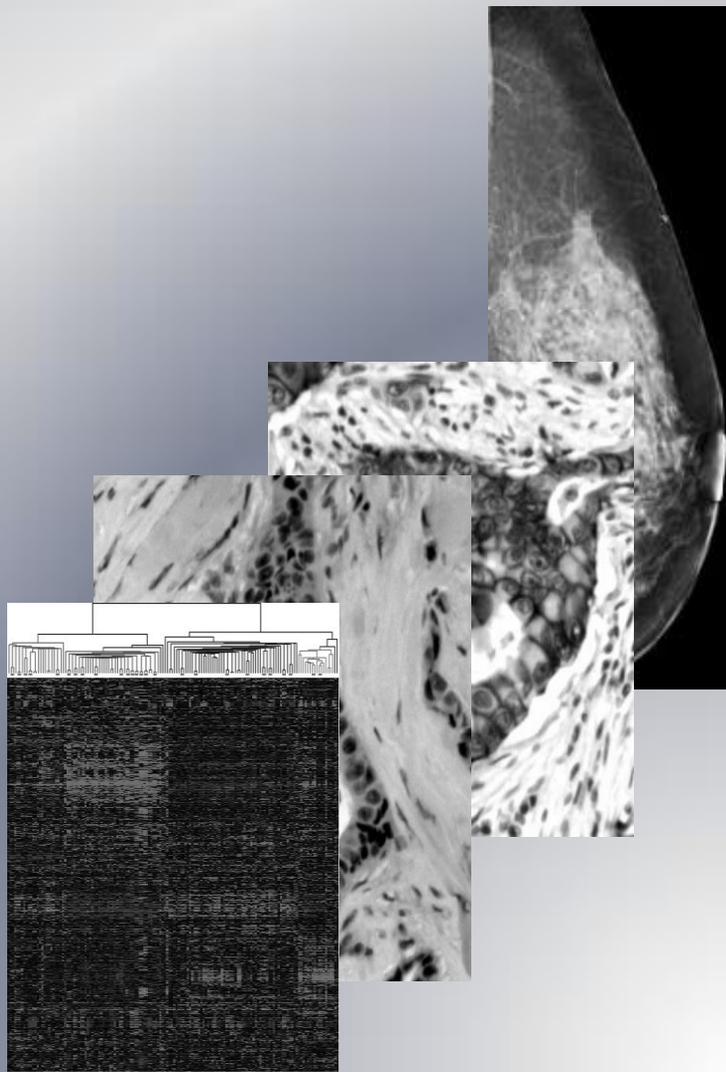
Puesto que el metabolismo de fármacos determina su concentración, puede ocurrir que alteraciones en genes que codifican para enzimas metabólicas influyan en la respuesta a los tratamientos.

Las alteraciones de amplificación y sobreexpresión del gen **TOP2A**, así como sus interacciones mutuas pueden predecir la sensibilidad o resistencia a la quimioterapia con adriamicina, ya que a este gen se le supone ser la diana molecular del fármaco.

## OBJETIVOS

- 1- Evaluar el efecto de las variantes polimórficas de los genes **GSTM1**, **GSTT1** y **GSTP1** en la respuesta al tratamiento con adriamicina o docetaxel.
- 2- Evaluar la influencia de las alteraciones del gen **TOP2A** en la respuesta a docetaxel y adriamicina.
- 3- Identificar un patrón de expresión génica que pueda predecir la sensibilidad o la resistencia a los agentes citotóxicos adriamicina o docetaxel.

# MATERIALES Y MÉTODOS





### 3.1. SUJETOS DEL ESTUDIO

En el presente trabajo se estudian muestras de tumor, obtenidas mediante biopsia *Tru-cut*, de pacientes con **carcinoma de mama localmente avanzado**, remitidas al servicio de Oncología Médica del Hospital Clínico San Carlos (Madrid). A estas pacientes, se les administró tratamiento quimioterápico, de manera que la mitad de las pacientes fueron tratadas, inicialmente, con 4 ciclos de adriamicina intravenosa, a dosis de 75 mg/m<sup>2</sup> cada 21 días, mientras las otras recibieron 4 ciclos de docetaxel intravenoso a dosis de 100 mg/m<sup>2</sup> con soporte G-CSF cada 21 días.

Tras haber recibido cuatro ciclos, se revaluó la enfermedad, remitiendo las pacientes candidatas a cirugía al Servicio de Ginecología, para ser intervenidas. El tratamiento, tras la cirugía, quedó a criterio del oncólogo médico. En la mayoría de los casos, las pacientes recibieron el fármaco que no recibieron previamente (doxorrubicina o docetaxel), asociado o seguido de trastuzumab y terapia hormonal.

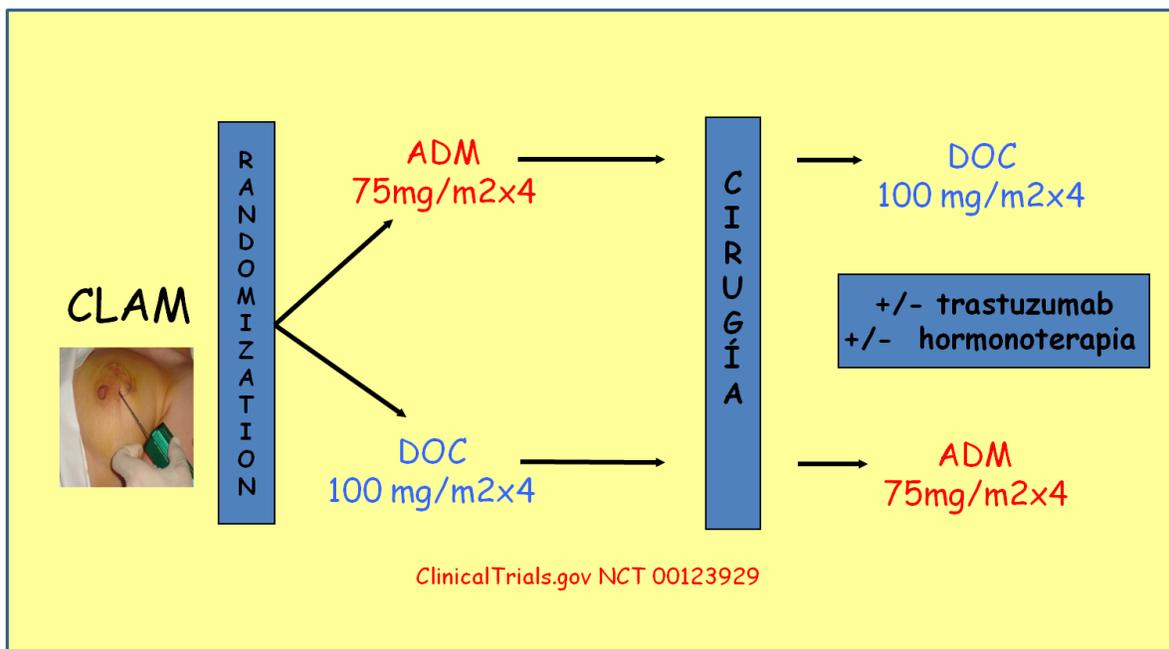


Figura 13. Esquema del ensayo clínico.

Las muestras de las pacientes fueron identificadas por un código único, garantizándose la confidencialidad de los datos de las enfermas de acuerdo con los requerimientos de la ley 15/99 de Protección de Datos de Carácter Personal.

### 3.1.1 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO CLÍNICO

Este trabajo pertenece a un ensayo clínico de fase II, desarrollado en el Hospital Clínico San Carlos. El protocolo fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del hospital (número de registro CEIC 05/117) y está registrado en la web <http://clinicaltrials.gov> con el código NCT 00123929.

Los **criterios de selección** para entrar en el ensayo son: tener una edad comprendida entre los 18 y 75 años y estar diagnosticada de cáncer de mama localmente avanzado o cáncer de mama inoperable. Como **criterios de exclusión** están: la hiperbilirrubinemia y la insuficiencia cardiaca. Todas las pacientes firmaron un consentimiento informado antes de ser incluidas en el ensayo.

Este ensayo es prospectivo experimental aleatorizado randomizado.

La aleatorización se realizó mediante un programa informático de generación aleatoria de números, desde la unidad de protocolización del Servicio de Oncología

### 3.2. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

#### 3.2.1 OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Las muestras del tumor primario se extrajeron mediante biopsia *Tru-cut* de mama, en el servicio de Oncología del Hospital Clínico San Carlos. En algunas enfermas, con tumor muy superficial, se obtuvo la biopsia mediante incisión con bisturí y un *punch* de 6 mm. Se conservó una parte de la muestra a  $-70^{\circ}\text{C}$  en solución estabilizadora *RNAlater*, mientras que otra parte se introdujo en solución convencional de formalina para fijación y posterior inclusión en parafina en el Servicio de Anatomía Patológica. Previo a su congelación, se hizo una impronta del tejido con el fin de asegurar la presencia de tumor.

La sangre de las pacientes se extrajo en tubos con anticoagulante EDTA, por el personal de enfermería. Previamente, las pacientes dieron su consentimiento para la extracción y estudio de su DNA.

#### 3.2.2 EXTRACCIÓN DEL DNA

El DNA se purificó empleando el equipo *MagNA Pure Compact*, Roche®. Las operaciones realizadas por el equipo para extraer el DNA son: lisis, adición de partículas magnéticas que se unen al DNA, separación, mediante el uso de un imán, de las partículas magnéticas junto al DNA del resto del lisado y elución del DNA a unas

condiciones determinadas de pH y a altas temperaturas, lo que permite su separación de las partículas magnéticas.

### 3.2.3 EXTRACCIÓN DEL RNA

Para la obtención del RNA se empleo el Kit de *RNeasyMicro* Kit de Quiagen®. El protocolo utilizado fue el que la casa recomienda para tejidos. Sin embargo, los primeros pasos del protocolo (extracción del RNA) fueron modificados, ya que, de forma empírica, se vio que se obtenían rendimientos mayores.

A continuación se exponen los pasos del protocolo de que fueron modificados:

1. Homogenizar de la muestra (de 1 a 5 mg), en 1 ml de con *Trizol*<sup>5</sup> (Invitrogen®) con el homogenizador *Ultra Turrax T8* (S8N-5G), en hielo y durante 40 segundos.
2. Incubar la muestra durante tres minutos a temperatura ambiente.
3. Añadir 0,4 ml de cloroformo, agitar rigurosamente e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Centrifugar 15 minutos a 14000 rpm. Se obtienen tres fases: una acuosa donde está el RNA, otra orgánica donde están el resto de componentes de la célula y una tercera con el cloroformo y el componente fenólico.
5. Transferir la fase acuosa a un tubo limpio y añadir un volumen de etanol al 70% gota a gota.

A partir de este paso se siguió con el protocolo de purificación del RNA de la casa comercial.

### 3.2.4 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La cantidad de DNA y RNA obtenido así como la pureza se evaluó mediante la medición de la absorbancia ( $A^6$ ) con el espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000*. La concentración del ácido nucleico se calcula mediante la fórmula:

$$[\text{Ac. Nucleico}] (\text{ng}/\mu\text{l}) = A_{260} \times \text{CEM}^7 \times \text{dil}$$

---

<sup>5</sup> El Trizol es una solución monofásica de fenol e isocianato de guanidinio que ayuda a mantener la integridad del RNA mientras lisa las células permitiendo así su extracción.

<sup>6</sup> La concentración de la muestra es directamente proporcional a la absorbancia ( $A$ ) de la misma a 260 nm al cumplirse la Ley de Lambert Beer.

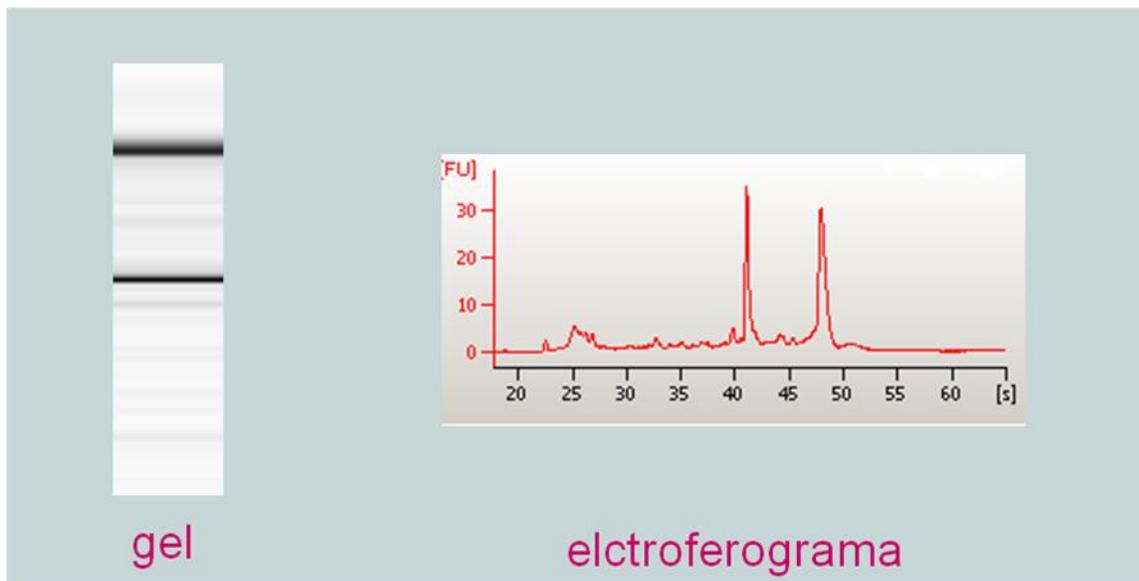
<sup>7</sup> CEM: Coeficiente de extinción molar. El CEM es igual a 50 para el caso del DNA y 40 para el RNA.

### 3.2.5 CALIDAD DEL RNA

Para comprobar la calidad del RNA, se empleó el método microfluídico del *Bioanalyser 2100* (Agilent® Technologies) que permite un menor consumo de muestra y un análisis mucho más sensible y preciso.

Este sistema consta de dos chips que contienen una red de microcanales y reservorios interconectados donde se realiza la electroforesis.

El *software*, que incorpora el método, permite determinar el perfil del RNA y establecer el cociente entre los picos de RNA ribosomal de 18S y 28S. Además, se puede detectar la existencia de contaminaciones con DNA genómico y obtener un índice, denominado **RIN** (*RNA Integrity Number*), que cuantifica la integridad y calidad de la muestra de una manera poco sesgada evitando la subjetividad del investigador (85-86).



**Figura 14.** Ejemplo de un electroferograma de RNA. Se observan los picos del RNA ribosomal 18S y 28S

### 3.2.6 OBTENCIÓN DEL cDNA

La obtención de cDNA a partir del RNA de las muestras se hizo por retrotranscripción, empleándose el Kit *SuperScript First -Strand Síntesis for RT-PCR*. Invitrogen® y siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial.

Este método, emplea una enzima retrotranscriptasa, que cataliza la reacción. Dicha enzima ha sido modificada reduciendo su actividad RNasa para obtener cDNA de mayor longitud y aumentar el rendimiento de la reacción. Además, se utilizan

*Random Hexamers* como cebadores, lo que permite que se retrotranscriban todas las poblaciones de RNA. En el último paso del proceso se emplea una RNAsa que degrada el RNA.

Para comprobar que la retrotranscripción había salido correctamente se realizaron PCRs con cebadores específicos para cDNA de  $\beta$ -actina tal y como se describe en el artículo de Kreuzer y cols (87).

### 3.3. ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS DE *GSTM1* Y *GSTT1*.

El estudio de las variantes polimórficas de *GSTM1* y *GSTT1* se realizó en el Laboratorio de Oncología Molecular del Servicio de Oncología Médica del hospital Clínico San Carlos.

El genotipado de las deleciones de *GSTM1* y *GSTT1* se hizo mediante una *PCR multiplex*, de manera que se amplificaron de forma simultánea cada gen y un gen control ( $\beta$ -actina) (88).

Nombre de los cebadores	Secuencia	Tamaño del producto (pb)
<i>GSTM1 directo</i>	GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C	215
<i>GSTM1 reverso</i>	GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G	
<i>GSTT1 directo</i>	TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC	480
<i>GSTT1 reverso</i>	TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA	
<i>B actina directo</i>	TGA GCG CGG CTA CAG CTT	60
<i>B actina reverso</i>	TCC TTA ATG TCA CGC ACG ATT T	

Tabla 4. Secuencias de los cebadores empleados en el genotipado de los genes *GSTT1* Y *GSTM1*.

Las condiciones de la PCR se detallan en las tablas 5, 6 y 7. Las condiciones de la mezcla de reacción son iguales para ambos genes.

Mezcla de reacción Vf=25ul	
DNA 50 ug/ul	1 ul
Cebador directo 10 uM	1 ul
Cebador reverso 10 uM	1 ul
Tampón 10X	2.5 ul
MgCl <sub>2</sub> 25 Mm	2 ul
dNTPs 2Mm	2.5 ul
H <sub>2</sub> O	14.5
Polimerasa	0.5 ul

Tabla 5.

Condiciones de temperatura <i>GSTM1</i>		
Desnaturalización	95°C	6 min
Desnaturalización	95°C	1min
Hibridación	57°C	1min
Extensión	72°C	1min
Elongación	72°C	1min

Tabla 6

Condiciones de temperatura <i>GSTT1</i>		
Desnaturalización	95°C	6 min
Desnaturalización	95°C	1min
Hibridación	60°C	1min
Extensión	72°C	1min
Elongación	72°C	1min

Tabla 7

La presencia/ausencia del gen *GSTM1* se confirmó mediante dos parejas de cebadores distintos (89) (tabla 8). Una de las parejas hibrida dentro de la secuencia del gen y determina un producto de 500 pb. La segunda pareja se encuentra

flanqueando los extremos del gen amplificando un fragmento de 3500 pb cuando *GSTM1* está deleciónado.

Gen	Banda	Secuencia del cebador directo	Secuencia cebador reverso	Tam
<i>GSTM1</i>	Presencia	CTTTCCTATACCACTGACACTGT	GCAGGGCTCAGAGTATAAGAGCT	500
<i>GSTM1</i>	Deleción	CACGGATCATTCTGCACTATTTTAGA	CTGTAATGGGACCTCTGGACTGGAT	3500

Tabla 8.

Las condiciones de ambas reacciones se especifican a continuación.

Condiciones de la mezcla de reacción para <i>GSTM1</i> deleción	
DNA 50 ug/ul	2 ul
Tampón 10x <sup>8</sup>	5 ul
Cebador directo 10 uM	2 ul
Cebadores reverso 10uM	2 ul
dNTPs 2mM	8 ul
H <sub>2</sub> O	30.5 ul
Polimerasa	0.5 ul

Tabla 9.

Condiciones de la mezcla de reacción para <i>GSTM1</i> presencia	
DNA 50 ug/ul	2 ul
Tampón 10x <sup>9</sup>	2.5 ul
Cebador directo 10 uM	1 ul
Cebador reverso 10 uM	1 ul
dNTPs 2mM	2.5 ul
H <sub>2</sub> O	15.5 ul
Polimerasa	0.5 ul

Tabla 10.

<i>GSTM1</i> deleción	
T <sup>a</sup>	tiempo
94	10 min
98	10 seg
60	30 seg
68	7 min
72	10 min

} 35 ciclos

Tabla 11.

<i>GSTM1</i> Presencia	
T <sup>a</sup>	tiempo
94	10 min
98	10 seg
57	30 seg
68	7 min
72	10 min

} 35 ciclos

Tabla 12.

Del mismo modo, la presencia del gen *GSTT1* se corroboró mediante una segunda PCR con los cebadores que se especifican en la tabla 13. Igualmente, la deleción del gen se confirmó por PCR usando unos cebadores que flanquean el gen y que amplifican un fragmento de 1460 pb cuando el gen está deleciónado (90).

<sup>8</sup> El tampón utilizado contiene MgCl<sub>2</sub>.

<sup>9</sup> El tampón utilizado contiene MgCl<sub>2</sub>.

Gen	Banda	Secuencia del cebador directo	Secuencia cebador reverso	Tam
GSTT1	Presencia	CCAGCTCACCGGATCATGGCCAG	CCTTCCTTACTGGTCCTCACATCTC	466
GSTT1	Delección	CAGTTGTGAGCCACCGTACCC	CGA TAG TTG CTG GCC CCC TC	1460

Tabla 13.

Las condiciones para esta reacción se especifican en la tabla 14.

T°	tiempo
95	10 min
94	30 seg
60	30 seg
72	1 min
72	10 min

Todos los fragmentos se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% con una concentración de 0.4 mg/ml de bromuro de etidio y se utilizaron los marcadores de de peso molecular 100-1,000 bp molecular ruler y 500-8,000 bp molecular ruler de la casa comercial Biorad®.

Tabla 14

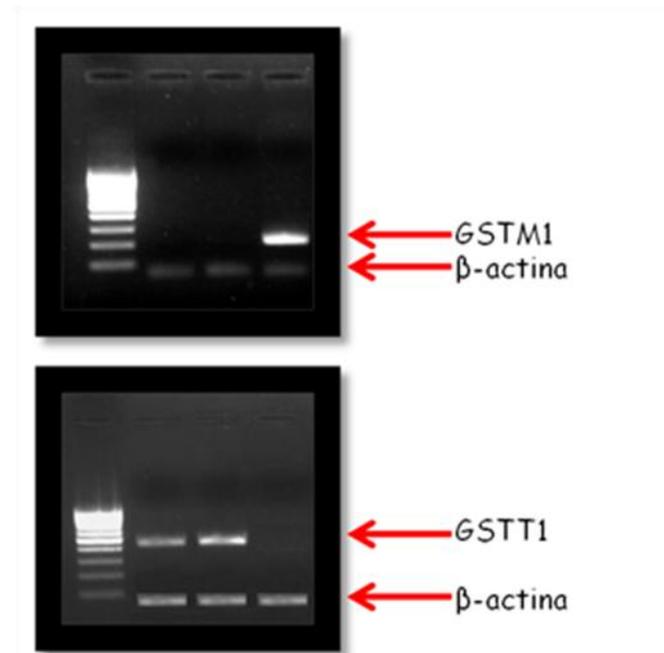


Foto 1. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos resultantes de la amplificación de los genes *GSTM1*, *GSTT1* y  $\beta$ -actina empleando los cebadores de la tabla 4.

### 3.4. ESTUDIO DEL SNP A342G EN EL GEN GSTP1

Se realizó en el laboratorio de Oncología Molecular del Servicio de Oncología Médica del hospital Clínico San Carlos.

La determinación del polimorfismo **A342G (rs1695)** se hizo por discriminación alélica, mediante PCR cuantitativa, empleando sondas *TaqMan*. Las sondas y cebadores empleados son los estandarizados para el ensayo C\_\_32371908\_20 de Applied Biosystems®.

El termociclador utilizado fue el *7900HT Fast Real-Time PCR System* de Applied Biosystems®.

#### 3.4.1 PCR CUANTITATIVA. TECNOLOGÍA TAQMAN. DISCRIMINACIÓN ALÉLICA

La **PCR a tiempo real** es una técnica donde los productos originados, durante la reacción de amplificación, son monitorizados según se van generando. Para ello, se utiliza un termociclador que lleva acoplado un detector que mide la intensidad de fluorescencia emitida por las sondas.

La **sonda *TaqMan*** es una sonda de 18-22 pares de bases que tiene un marcador fluorescente (*reporter*) unido al extremo 5' y una molécula (*quencher*), que inhibe la fluorescencia del anterior, en 3'. Generalmente, el *quencher* es también una molécula fluorescente que al estar próxima al *reporter* impide, por resonancia, la emisión de fluorescencia a la longitud de onda del *reporter*.

Si el gen diana está presente, la sonda se une a una secuencia del mismo. Durante el transcurso de la PCR el enzima *Taqman* rompe la sonda gracias a su actividad exonucleosidasa 5' -3'. De este modo, la molécula *reporter* ya no queda cerca del *quencher* y el detector es capaz de percibir la fluorescencia emitida por ella, de modo que la fluorescencia detectada aumenta al aumentar la degradación de las sondas, que incrementa según se va generando producto.

Una de las aplicaciones de la PCR cuantitativa es la discriminación alélica que permite la detección de mutaciones o polimorfismos como los SNP. Para ello, se emplean dos sondas marcadas con distintos fluorocromos para cada alelo. De manera que, para los individuos homocigotos, el aparato sólo registra una curva de amplificación, puesto que sólo mide la intensidad del fluorocromo cuya sonda se ha unido al DNA de estudio. En individuos heterocigotos, el aparato detecta ambos fluorocromos al unirse ambas sondas a la secuencia correspondiente.

Para el estudio del SNP A342G se emplearon sondas MGB (Minor Groove Binder). Estas sondas llevan un *quencher* que se une al surco menor del DNA y se caracterizan por no ser fluorescente. Esta propiedad, permite que los equipos midan la señal del *reporter* con mayor precisión. Además, estas sondas, al ser pequeño tamaño, determinan una mayor diferencia de la temperatura de *melting*, entre las sondas con la secuencia complementaria al DNA y las que difieren en un nucleótido, lo que hace que la discriminación alélica por esta técnica sea más robusta.

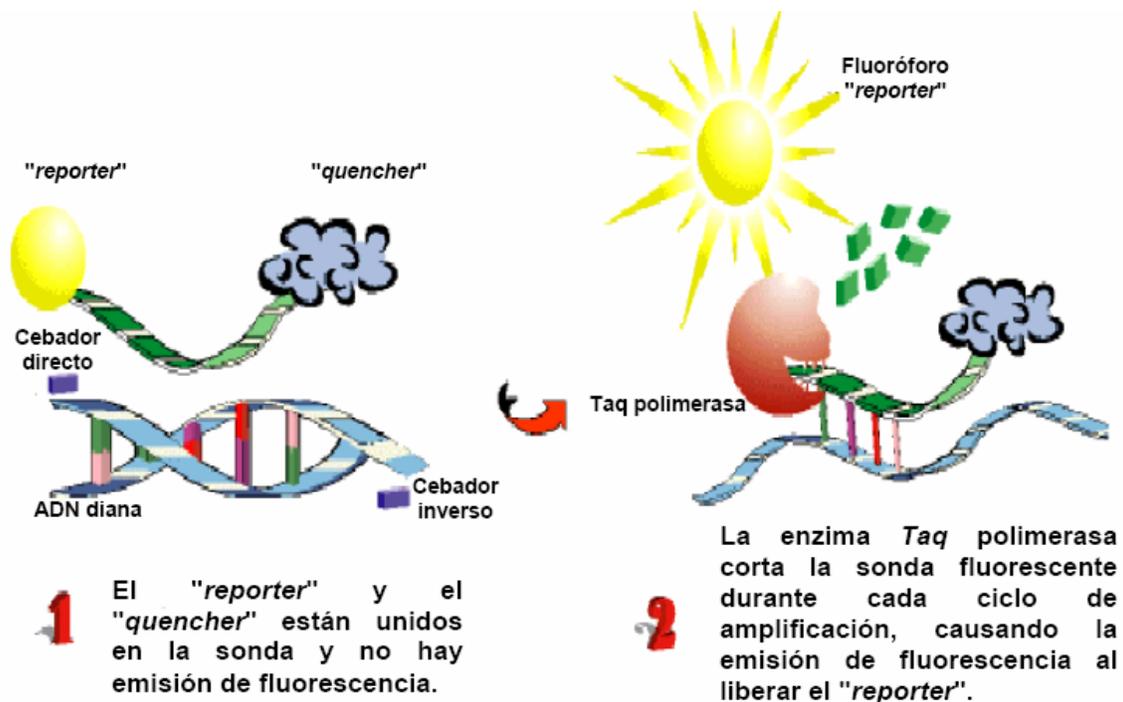


Figura 15. Esquema de la PCR cuantitativa.

Generalmente, la zona polimórfica queda en el centro de la secuencia de cada sonda, lo que permite que la sonda con la secuencia complementaria se una, preferentemente, al DNA. Aún así, existe un cierto porcentaje de hibridaciones inespecíficas que originan señal de fondo. En nuestro estudio, el alelo A, más frecuente, está marcado con el fluorocromo VIC y el alelo G con el fluorocromo FAM. De este modo, en los casos de homocigotos AA sólo se observa la curva de amplificación correspondiente al fluorocromo VIC, en los individuos GG sólo se obtiene la curva del fluorocromo FAM y en los individuos heterocigotos se obtienen ambas curvas.

Por otro lado, la *Master Mix* lleva otro fluorocromo, que en este caso es ROX. Este fluorocromo sirve para normalizar la fluorescencia de ambas sondas. Errores en el pipeteo de la mezcla de reacción pueden acarrear errores en la medida de la fluorescencia. Esto se puede minimizar dividiendo la fluorescencia de cada sonda por la fluorescencia emitida por ROX.

Las condiciones del ensayo para la determinación del SNP A342G se especifican en las siguientes tablas.

Mezcla de reacción:	V/pocillo
TaqMan Genotyping MasterMix 2X	10 ul
20x TaqMan Genotyping Assay Mix 20x (GSTP1)	1 ul
DNA 10 ug/ul	2 ul
Agua	7 ul
Total	20 ul

Tabla 15.

Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Activación enzimática.	Desnaturalización del DNA	Desnaturalización	Hibridación/Extensión
2 min 50°	10 min 95°	15 seg 92°	1 min 30 seg 60.

Tabla 16. Ciclo de temperaturas

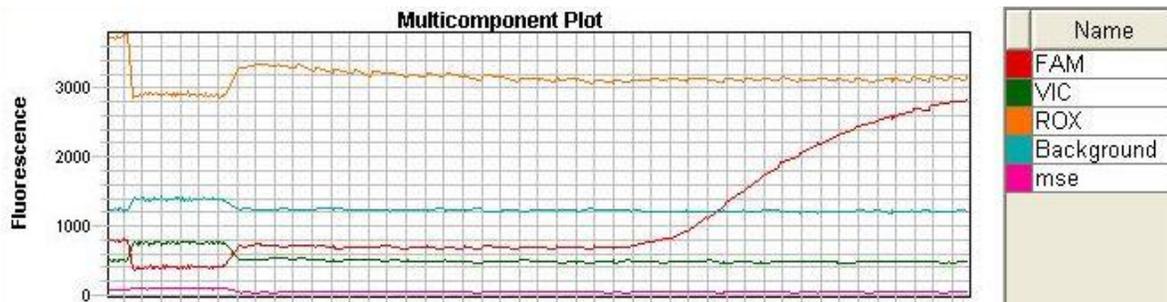


Figura 16. Curva de amplificación (fluorescencia) de un DNA homocigoto para el alelo marcado con FAM.

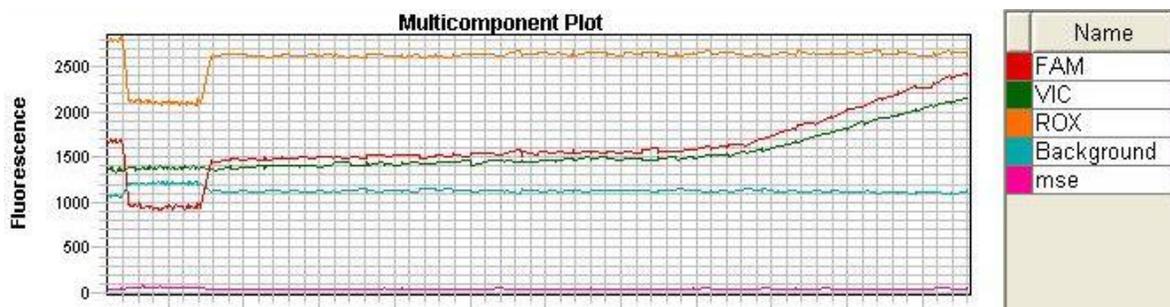


Figura 17. Curva de amplificación (fluorescencia) de un DNA heterocigoto.

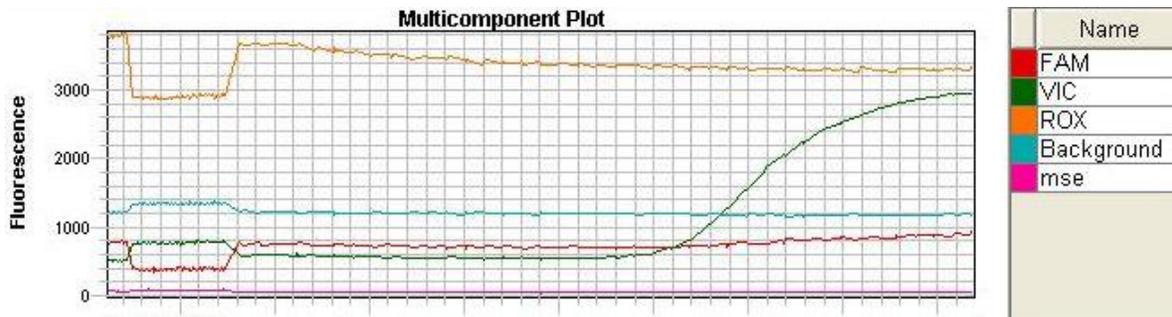


Figura 18. Curva de amplificación (fluorescencia) de un DNA homocigoto para el alelo marcado con VIC.

---

### 3.5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE TOP2A POR PCR CUANTITATIVA

#### 3.5.1 CONDICIONES DE LA QC-PCR

El estudio de la **expresión de TOP2A** se realizó en el laboratorio de Oncología Molecular del Servicio de Oncología Médica del hospital Clínico San Carlos. La técnica empleada fue la **PCR cuantitativa**, utilizando cebadores y sondas de ensayos *TaqMan on demand* (Applied Biosystems®) en los que la sonda y los cebadores vienen en el mismo tubo. Las sondas del *Kit* son MGB. Además, la casa comercial asegura que los cebadores sólo amplifican cDNA y no DNA genómico ya que, habitualmente, se trata de cebadores que se unen a secuencias entre exones. No obstante, comprobamos que esto último era cierto realizando una PCR con cDNA y DNA y confirmamos que no se amplificaba genómico.

Entre las aplicaciones de la PCR cuantitativa está la de ser útil para la realización de ensayos de expresión. Dichos ensayos se basan en la determinación del **Ct**, que se define como el ciclo a partir del cual la fluorescencia emitida sobrepasa el umbral de ruido. Lógicamente, a mayor cantidad de DNA de partida menor **Ct**, ya que la cantidad de amplificado capaz de ser detectada por el aparato se producirá antes.

Mediante PCR cuantitativa el DNA se puede cuantificar de manera absoluta o relativa. En los ensayos de expresión, generalmente, se hace una cuantificación relativa ya que no es posible conocer la cantidad de cDNA de partida, pues a día de hoy, no existe un método que nos permita cuantificar la eficacia de la retrotranscripción.

En la cuantificación relativa se refiere la cantidad del cDNA del gen diana respecto de la de un **gen endógeno**. Dicho endógeno debe de tener la peculiaridad de mantener constante su concentración celular bajo cualquier circunstancia. Evidentemente, no existe ningún gen con tal comportamiento. De todos modos, tradicionalmente y de forma aproximada, se emplean como endógenos genes que se expresan en alta proporción y en todas las células como son los genes *house keeping*<sup>10</sup>.

En este tipo de ensayos se asume que todos los factores que puedan modificar la concentración del RNA o cDNA durante el procesamiento de las muestras afectan por igual ambos genes. Por ejemplo: se presupone una misma eficacia de la retrotranscripción de los dos RNAs mensajeros.

En este estudio, realizamos reacciones en *multiplex*, es decir, en el mismo tubo se amplificaron el gen diana y el endógeno. Para ello se requiere que las sondas estén

---

<sup>10</sup> **genes house keeping**: grupo de genes que se expresan en todas las células del organismo y codifican para proteínas que son esenciales para el funcionamiento general de las células.

marcadas con fluorocromos distintos a una concentración tal que la eficacia de amplificación sea la misma tanto para el gen diana como para el gen endógeno. Para la amplificación del endógeno (beta-actina) utilizamos una sonda marcada con VIC y para el gen diana otra marcada con FAM. Ambos fluorocromos emiten a longitudes de onda lo suficientemente distantes como para evitar el solapamiento.

En la mayoría de los casos, el endógeno se expresa en mayor proporción que el gen diana. Esta diferencia de expresión hace que durante la PCR se amplifique con mayor eficacia el gen endógeno y en muchos casos no llega a amplificarse el gen diana ya que ambos compiten por los mismos reactivos. Por ello, es necesario limitar la concentración de cebadores del endógeno.

Las concentraciones de los reactivos que se emplearon para cada reacción de multiplex, así como las condiciones de temperatura, se exponen a continuación.

Reactivos:	V/pocillo
<i>TaqMan Universal PCR MasterMix 2X with AmpErase</i>	10ul
<i>20x Assay-on Demand Gene Expression Assay Mix (Topoisomerasa II alfa)</i>	1
<i>20x Assay-on Demand Gene Expresión Assay Mix . (Beta actina)</i>	1
cDNA	4
Agua	4
Total	20

Tabla 17.

Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Activación enzimática.	Desnaturalización del cDNA	Desnaturalización	Hibridación/Extensión
2 min 50°	10 min 95°	15 s 95°	1 min 60.

Tabla 18.

El termociclador utilizado fue el *7900HT Fast Real-Time PCR System* de Applied Biosystems®

### 3.5.2 CÁLCULOS

Todas las muestras se analizaron por triplicado y sólo se dieron por válidas aquellas cuyas gráficas se superponían y tenían Ct's con una desviación estándar menor de 0.3.

Como RNAs controles se utilizó un *pool* de RNAs de tejidos de 9 mamas sanas.

Los cálculos se realizaron por el método de comparación del Ct. Mediante este método se puede calcular la cantidad de gen diana a partir de fórmulas aritméticas. Así, la cantidad de gen diana normalizada respecto a un endógeno y a un control es igual a:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

donde;

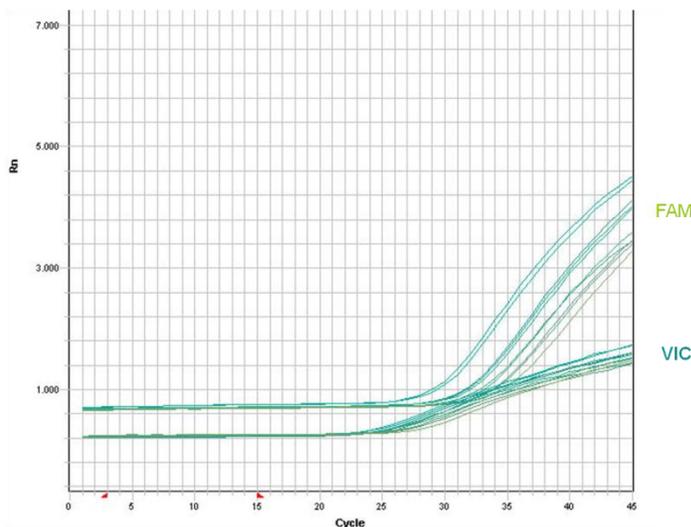
$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra a estudio}} - \Delta Ct_{\text{pool control}}$$

siendo;

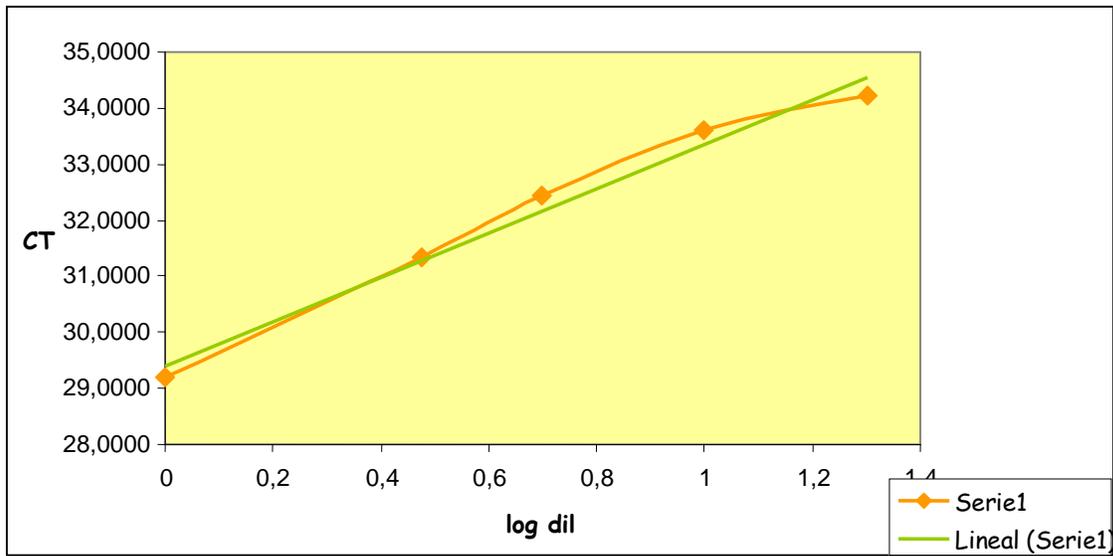
$$\Delta Ct = Ct_{\text{gen diana}} - Ct_{\text{gen endógeno}}$$

### 3.5.3 PUESTA A PUNTO DEL ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE TOP2A MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL

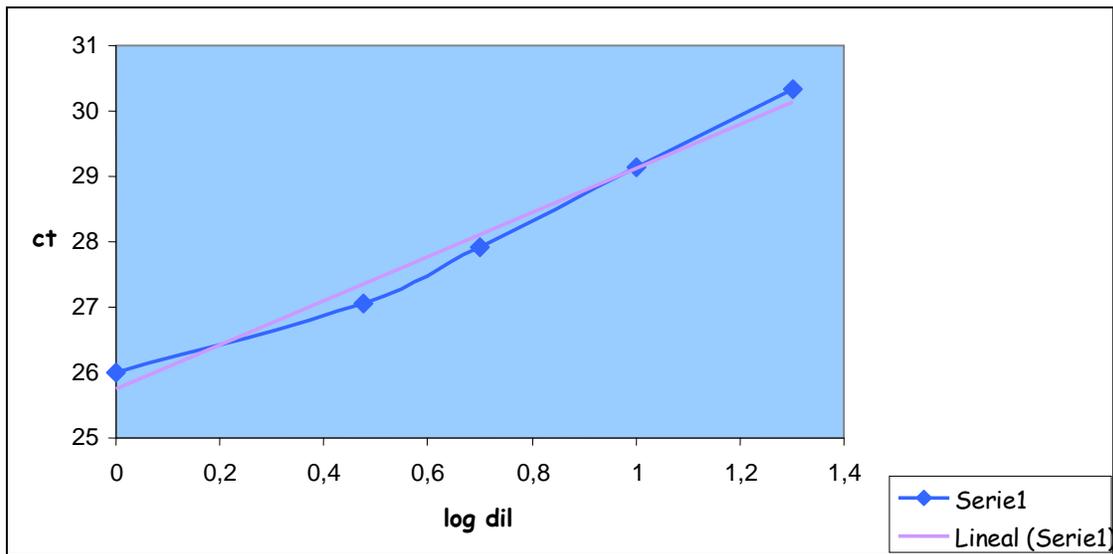
Para comprobar que utilizábamos concentraciones de cDNA que se encontraban dentro del límite de detección y de linealidad de la técnica se realizó una curva estándar con distintas concentraciones de cDNA.



**Gráfica 1.** Se representa el nivel de fluorescencia del gen diana (FAM) y endógeno (VIC) respecto del cT de distintas diluciones de cDNA. Las diluciones fueron 1/3, 1/5, 1/10, 1/20.

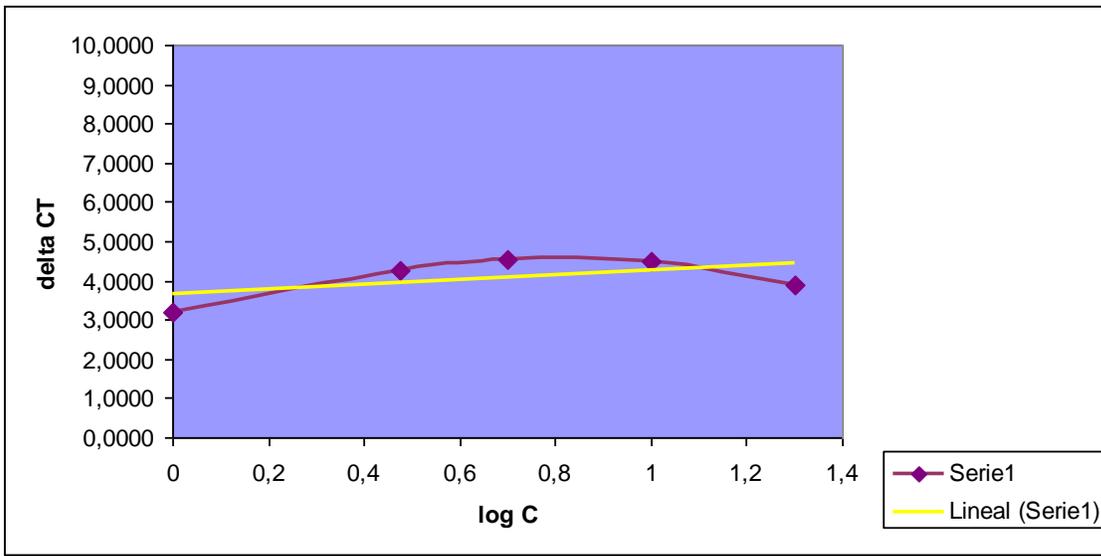


Gráfica 2. Representación del Ct del gen diana frente al logaritmo decimal de la dilución del cDNA.



Gráfica 3. Representación del Ct del gen endógeno frente al logaritmo de las diluciones del cDNA .

Para que el cálculo del  $\Delta\Delta Ct$  sea válido, se precisa que las eficacias de amplificación de los dos genes sean las mismas. Una manera sencilla de evaluar si dos amplicones tienen la misma eficacia es calcular el  $\Delta Ct$  de diluciones de un cDNA. Si el  $\Delta Ct$  se mantiene constante la eficacia es la misma.



Gráfica 4. Representación del deltaCT frente al logaritmo decimal de las diluciones del cDNA.

## 3.6 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS TUMORES MEDIANTE MICROARRAYS

### 3.6.1 MICROARRAYS

Los *microarrays* o micromatrices son soportes sólidos, generalmente, de cristal o de plástico sobre los que se disponen, de manera ordenada, una serie de sondas específicas de DNA que representan a una serie de genes. La técnica de *microarrays* está basada en la propiedad física de los ácidos nucleicos para hibridar con secuencias complementarias, a temperaturas y pH adecuados (91).

Esta tecnología permite el estudio simultáneo de varios miles de genes, lo que ha supuesto una revolución en el mundo científico. No obstante, se requieren unas condiciones de trabajo muy controladas, que minimicen las fuentes de variabilidad de la técnica, así como un análisis robusto y cuidadoso que garantice la fiabilidad y reproducibilidad de los resultados.

Por esta metodología se pueden llevar a cabo estudios de expresión génica (*microarrays* con sondas de cDNA o de oligonucleótidos de zonas codificante), de polimorfismos para escanear todo el genoma (GWAS), de hibridación genómica comparada (CGH)...etc. En este trabajo nos centramos en los *arrays* mediante sondas de oligonucleótidos de zonas codificantes de expresión para el estudio del transcriptoma celular.

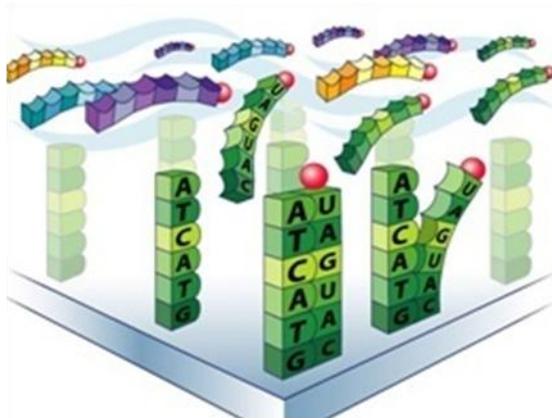


Figura 19. Representación de un *microarray*

Cuando un *microarray* se escanea, se aprecian miles de puntos que son del orden de 200 micras de diámetro. Cada punto está formado por miles de sondas iguales, es decir, cada punto corresponde a una sonda determinada que representa a un gen concreto (92).

En la actualidad se dispone de una amplia gama de arrays comercializados. En nuestro estudio utilizamos los *microarrays* "Whole Human Genome Oligo Microarray 4x44K" de la casa Agilent®. Estas micromatrices constan de 44.000 sondas, de las cuales 41.000 son sondas de genes humanos y las otras 3000 corresponden a sondas control que permiten conocer la eficacia y calidad de la hibridación y por tanto saber si los resultados son reproducibles.

En cuanto a la reproducibilidad de la técnica, la casa comercial establece que, utilizando estos *microarrays*, la media de la desviación estándar es 0,013.

El estudio de *microarrays* se realizó en el laboratorio dirigido por Charles M Perou del *Lineberger Comprehensive Cancer Center* de la Universidad de Carolina del Norte.

### 3.6.2 MARCAJE E HIBIDACIÓN DE LOS MICROARRAYS.

#### 3.6.2.1 ESQUEMA DEL PROCESO.

En primer lugar, se retrotranscribe el RNA a cDNA, a partir del cual se obtiene cRNA. Este último se une a las sondas del *microarray*. Este cRNA debe de estar marcado bien con un radioisótopo o con un fluorocromo para que pueda ser detectado. En los *arrays* de dos colores, se marcan de manera distinta el cRNA a estudio del cRNA de referencia. Ambos cRNAs se hibridan simultáneamente en el mismo *microarray* estableciéndose una hibridación competitiva. Por lo tanto, la cantidad de un RNA determinado está referida a un RNA de referencia que debe de ser el mismo para todas las muestras.

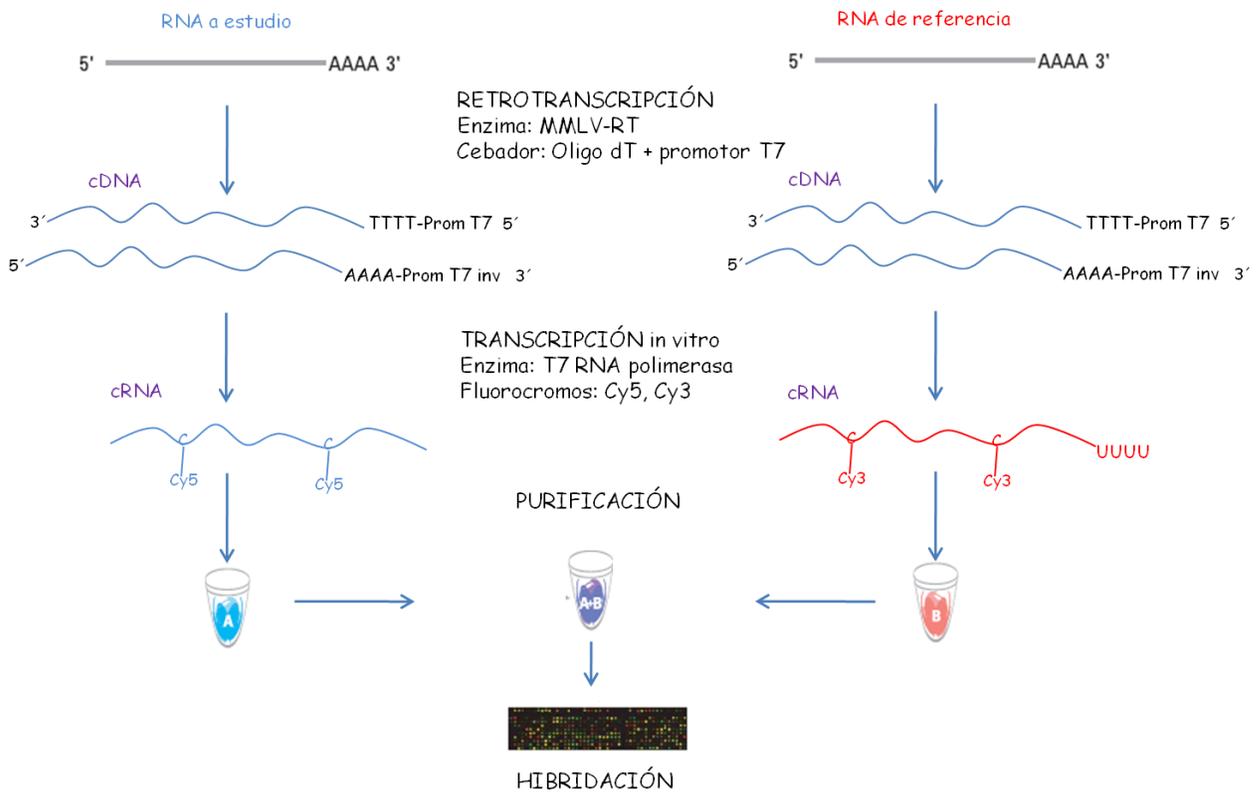


Figura 20. Esquema del proceso de marcaje e hibridación.

### 3.6.2.2 MARCAJE Y AMPLIFICACIÓN.

En todas las muestras, la cantidad de RNA de partida fueron 2.5 ug. El marcaje se hizo con Cy3-CTP<sup>11</sup> para el RNA de referencia y con Cy5-CTP<sup>12</sup> para el RNA de las muestras a estudio. Todo el proceso se hizo siguiendo el protocolo del kit "Agilent Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit" de Agilent®, basado en la técnica de Eberwine (93).

El RNA de referencia empleado contiene un *pool* de RNA de tejido mamario sano más RNA de tres líneas celulares de mama (MCF-7, SUM 102, SUM 149) en proporciones iguales.

La concentración del cRNA obtenido se midió en el espectrofotómetro (UV-visible) *Nanodrop ND-1000*. Se registraron las medidas de concentración de cRNA (ng/ul), de cianina 3 y cianina 5 (pmol/ul) y el ratio de absorbancia 260nm/280nm. Además, se calculó la cantidad de cRNA obtenido en ug, así como los pg de cianina por ug de cRNA (actividad específica). Todas las muestras que rindieron una concentración menor de 0,950 ug de cRNA se descartaron, así como las muestras con una actividad específica menor de 8 pmol de cianina por ug cRNA.

### 3.6.2.3 HIBRIDACIÓN Y LAVADO.

Por cada *microarray* se hibridaron 850 ng de cRNA de referencia y 850ng de cRNA de la muestra a estudio. Los cálculos realizados se especifican a continuación.

$$\text{Conc ajustada} = \frac{\text{ug obtenidos de cRNA}-2.5 \text{ ug (cantidad de partida)}}{\text{Volumen de elución}}$$

$$\text{ul de cRNA por array} = \frac{0.850 \text{ ug}}{\text{Conc ajustada}}$$

El protocolo que se siguió es el que recomienda la casa comercial. (*Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Quick Amp Labeling. Version 5.7*).

Todos los tampones y reactivos utilizados durante este proceso fueron los recomendados por la casa comercial. Para evitar hibridaciones inespecíficas se empleó *human cot-1 DNA* de la casa Invitrogen®. Durante el este proceso se intento minimizar la exposición del array al ozono a fin de evitar la degradación de las cianinas sensibles a ozono (Cy5).

<sup>11</sup> Cianina 3-CTP 10 mM

<sup>12</sup> Cianina 5- CTP 10 mM

### 3.6.3 ESCANEADO Y ANÁLISIS DE LA IMAGEN

El *scanner* empleado fue *GenePix 4000B*. Este aparato tiene dos **lámparas láser** que excitan a 532 (verde) y 635 (rojo). Además, tiene dos **filtros de emisión** 575DF35 (verde: 557-592 nm) y 670DF40 (rojo: 650-690 nm), optimizados para la emisión de las cianinas 3 y 5. Finalmente, el aparato tiene dos **tubos fotomultiplicadores**<sup>13</sup> que detectan la fluorescencia emitida. Este sistema permite que se pueda escanear con dos longitudes de onda simultáneamente.

Un parámetro importante, a la hora de escanear un *array*, es la **ganancia del fotomultiplicador**. Este parámetro se define como el cociente entre la corriente en el ánodo y la corriente en el cátodo, y depende del número de **dinodos**, así como del potencial entre dinodos. En el caso límite en que la corriente en el cátodo esté formada por un único fotón, la ganancia estará dada por el número total de electrones recogidos por el ánodo. A mayor voltaje (potencial) aplicado en el fotomultiplicador, mayor es el número de electrones generados y mayor es la sensibilidad del fotomultiplicador. En otras palabras, al aumentar la ganancia aumenta tanto la señal como el ruido de fondo.

El *software* del equipo permite seleccionar, al usuario, el voltaje aplicado en el fotomultiplicador a fin de conseguir que el ratio entre la ganancia de ambos fotomultiplicadores sea lo más próxima a la unidad. Es decir, que la sensibilidad para la detección de ambas cianinas sea la misma. Además, controlando este parámetro se controla la saturación de la señal de los puntos, así como el ratio entre la señal y el ruido de fondo.

Por otro lado, el programa permite delimitar el área a escanear.

Una vez escaneado el *array*, la imagen obtenida fue tratada con el programa *Gen Pix Pro 5.1*. Este programa permite delimitar el área que abarca cada punto del *array*, descartar puntos deformados, o puntos de zonas en los que haya habido un problema. Además, el programa cuantifica la señal midiendo la intensidad de los píxeles que componen cada punto. Los valores finales de intensidad de cada píxel, medidos a una determinada longitud de onda, se obtienen tras substrair los valores del ruido de fondo o *background*. Posteriormente, se calcula el ratio de intensidades medidos a ambas longitudes de onda.

---

<sup>13</sup> **Tubos fotomultiplicadores:** Son componentes ópticos que convierten los fotones, que inciden en la superficie activa del fotomultiplicador (cátodo), en electrones mediante el efecto fotoeléctrico. Posteriormente, los electrones generados fluyen hasta el ánodo pasando por una serie de multiplicadores (**dinodos**). La cantidad de electrones que llega hasta el ánodo es directamente proporcional a la cantidad de fotones que incidieron en el cátodo.

### 3.6.4 PROCESAMIENTO DE DATOS

El tratamiento informático de los datos persigue minimizar las variaciones inherentes a la técnica, optimizar la extracción fiable de los datos y correlacionar dichos datos con el proceso biológico.

#### 3.6.4.1 UNC (UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA) MICROARRAY DATABASE

Todos los resultados de los *microarrays* fueron volcados en la web <https://genome.unc.edu/> de la universidad de Carolina del Norte. Esta *web* permite el almacenamiento de los datos, filtrado y normalización del dato bruto y el análisis de los mismos.

Para el análisis de los datos, la web permite:

1. Seleccionar los *arrays* que se van a analizar conjuntamente.
2. Seleccionar los genes que se van estudiar en dichos *arrays*. Pueden ser todos los del *array* o bien se pueden emplear una lista con los genes de interés.
3. Determinar si en la matriz (*arrays/genes*) van a parecer todas las sondas o bien si los datos de expresión de cada gen van a tener incluidos los valores de cada una de las sondas que representan a dicho gen.
4. Seleccionar el tipo de sondas usadas.
5. Seleccionar el tipo de anotaciones que aparecerán en la matriz.

#### Normalización

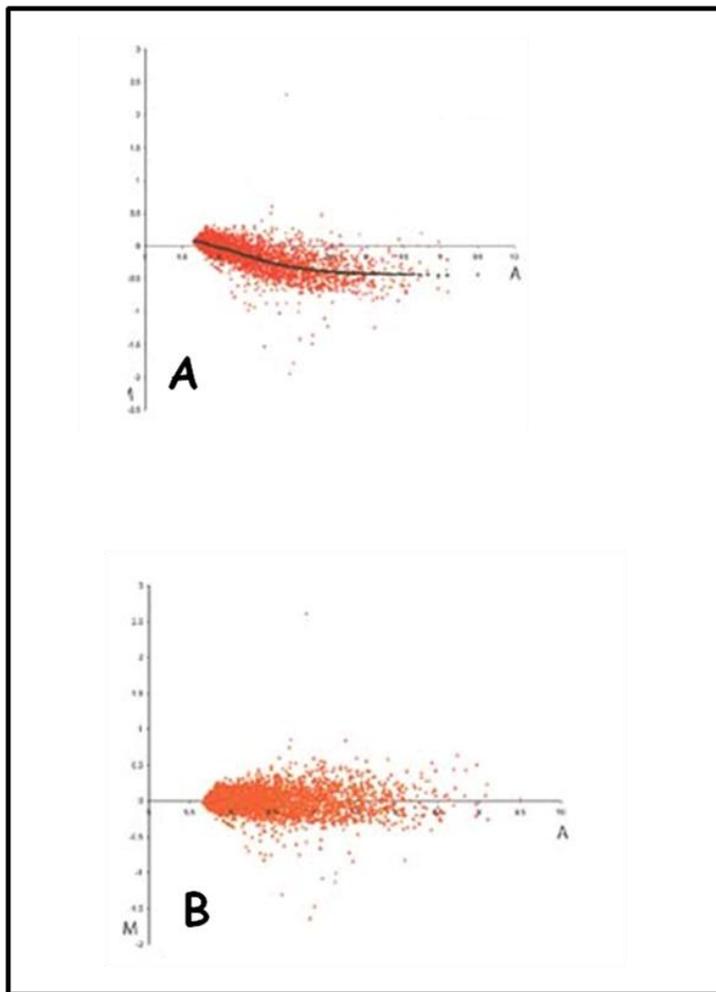
En este trabajo los datos de expresión génica están expresados como el logaritmo en base dos del ratio  $\left(\frac{\text{media de intensidad a } 635}{\text{media de intensidad a } 532}\right)$ , normalizado por el método **LOWESS**.

En estudios hechos con *arrays* de dos colores, con una referencia común, la cuantificación de la expresión génica en las muestras problema (marcadas con Cy5), es relativa a la expresión de genes en el RNA de referencia (marcado con Cy3). Sin embargo, se sabe que dado a las características químicas de las cianinas, los RNA marcados con las distintas cianinas no se unen con la misma eficacia a las sondas del array y que existen diferencias en la eficiencia de incorporación de los dos fluoróforos al RNA. Además, en función de los parámetros del escáner establecidos, las medidas de intensidad pueden ser distintas. Estas discrepancias deben de ser subsanadas mediante un proceso de **normalización**. La normalización puede hacerse entre los puntos de un mismo arrays y entre los distintos arrays. Respecto a la normalización entre los puntos de un mismo array, existen varios procedimientos para

llevar a cabo dicha normalización. En los casos de arrays de dos colores, el método de normalización **LOWESS** (**LO**cally **WE**ighted **Scatterplot** **S**oothing) es empleado comúnmente (94) e intenta reducir el sesgo o interferencia dependientes de la intensidad. Este método presupone que el promedio de los ratios de Cy5/Cy3 para todos los genes es cercano a 1 por lo que el promedio del logaritmo de los ratios es 0. El método se basa en el cálculo de una recta de regresión por segmentos sobre el gráfico M vs A y posterior substracción de la misma a los valores M en dicho segmento donde:

$$M = \log_2(Cy5/Cy3) \text{ y } A = 0.5 \times (\log_2(Cy5) + \log_2(Cy3))$$

De esta manera, se logra que los valores de M se centren en M=0 para todo el rango de A.



**Figura 21.** Gráficos MA. La figura A corresponde a datos no normalizados. La línea negra indica la curva de Lowess. En la figura B, los datos están normalizados, siendo M=0 para todo el rango de A.

Este método presupone que la mayoría de los genes no difieren en su expresión respecto al RNA de referencia, por lo que no debe de ser empleado en arrays en los que se espera que la mayoría de los genes cambien su expresión.

### Filtrado del dato bruto.

En cuanto a la selección de los puntos válidos, se establece que: el porcentaje de píxeles de un punto (sonda) con intensidades mayores que la desviación estándar de la intensidad del *background* debe de ser mayor al 65%. Si sólo el 10% de los puntos pasa este criterio entonces el programa baja el porcentaje al 55%. Además, la media de las intensidades medidas a ambas longitudes de onda y normalizadas debe de ser superior a 10 cuentas. Por otro lado, se descartan los puntos que no fueron dados como válidos por el programa *Gen Pix Pro 5.1*.

### Transformación de los datos y filtrado de genes

En este estudio se estableció que los genes válidos para ser considerados en la matriz (*arrays/genes*) debían de tener, al menos, los datos de expresión bien en al menos el 70% de los *arrays*.

Además, en cada muestra al dato de expresión de cada gen se le resta la media de expresión del gen considerando todas las muestras. De manera que, cada gen aparece sobreexpresado en el 50% de los *arrays* de la matriz (*genes/arrays*). Con esto se consigue centrar la media de expresión de cada gen en cero. Esta centralización se realiza frecuentemente en experimentos en los que se emplea el mismo RNA de referencia.

#### 3.6.4.2 ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTOS

Para el estudio de agrupamientos se emplearon los programas *Gene Cluster.3* y *Java Treeview.2*.

El programa *Cluster*, organiza y analiza los datos. El programa *Java Treeview* permite visualizar estos datos organizados en una matriz de *genes/arrays*.

Respecto al análisis de agrupamiento, este *software* permite agrupar elementos similares en un "árbol" o grupo por ramas, que son de menor longitud cuanto mayor es la similitud entre los elementos del árbol (**figura 22**).

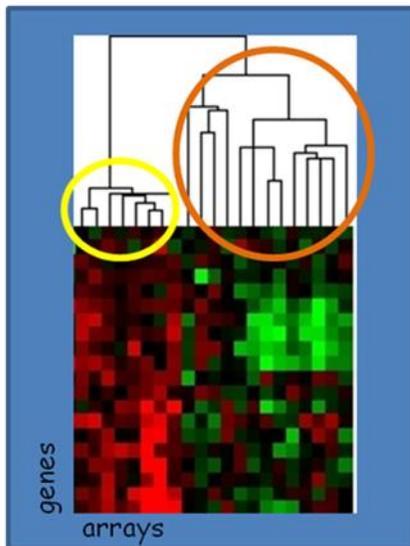
Para calcular la similitud o distancia entre elementos el programa hace una correlación de Pearson. El coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) entre dos series números  $X=\{X_1, X_2, \dots, X_N\}$  e  $Y=\{Y_1, Y_2, \dots, Y_N\}$  viene definido como:

$$r = \frac{1}{N} \sum_{i=1, N} \left( \frac{X_i - \bar{X}}{\sigma_X} \right) \left( \frac{Y_i - \bar{Y}}{\sigma_Y} \right)$$

Donde  $\bar{X}$  es la media de los valores de la serie X y  $\sigma_x$  la desviación estándar.

El coeficiente  $r$ , toma valores de 1 a -1. Cuando el valor es 1 significa que ambas series son idénticas, cuando es 0 que ambas series son completamente independientes y cuando es -1 que son perfectamente opuestas.

En un primer paso, el programa calcula la distancia (correlación) entre los elementos a ser agrupados. Posteriormente, el programa hace un agrupamiento jerarquizado uniendos aquellos elementos con menor distancia. Los dos elementos agrupados (o pseudoelemento) son reemplazados, en la lista de elementos a agrupar, por el nuevo pseudoelemento. Este pseudoelemento es considerado un vector a la hora de calcular las distancias con los demás elementos o pseudoelementos pendientes de agrupar.



**Figura 22.** Representación gráfica de la matriz genes arrays mediante las aplicaciones Cluster y Javatreeview. Los arrays englobados en el círculo amarillo presentan una alta similitud ( $r=0.77$ ) mientras que los arrays del círculo naranja son menos parecidos ( $r=0.07$ ).

### 3.6.4.3 ANÁLISIS SUPERVISADO DE MICROARRAYS

El análisis supervisado de *microarrays* (**SAM**) es una técnica de bioestadística desarrollada para encontrar genes diferencialmente expresados entre distintos arrays (**95**).

Existe una aplicación en Excel que realiza este análisis y que se puede descargar a través de la web de la Universidad de Stanford (<http://otl.stanford.edu>).

Esta aplicación presenta las siguientes características:

-La variable respuesta, que determina los grupos de arrays a comparar, puede ser dicotómica (ej: individuos tratados y no tratados con un cierto fármaco), con más de

una categoría o de una sola categoría. Por otro lado, puede ser cuantitativa, de supervivencia (tiempo hasta un evento) o dependiente del tiempo.

-El SAM calcula un estadístico, **di (SAM score)**, por cada gen, *i*, midiendo la fuerza de la relación entre la expresión de dicho gen y la variable respuesta.

A partir de los datos de expresión  $x_{ij}$ , donde  $i=1,2,\dots,p$  genes y  $j=1,2,\dots,n$  muestras, y de los datos de respuestas  $Y_j$  donde  $j=1,2,\dots,n$  categorías, la aplicación calcula el estadístico **di**. En nuestro caso  $y_j= 1$  o  $2$  puesto que analizamos genes diferencialmente expresados entre individuos respondedores (1) y no respondedores (2)

$$d_i = \frac{r_i}{s_i + s_0}$$

Siendo  $r_i$  el coeficiente de regresión lineal del gen *i*.  $s_i$  es la desviación estándar y  $s_0$  un factor que puede variar.

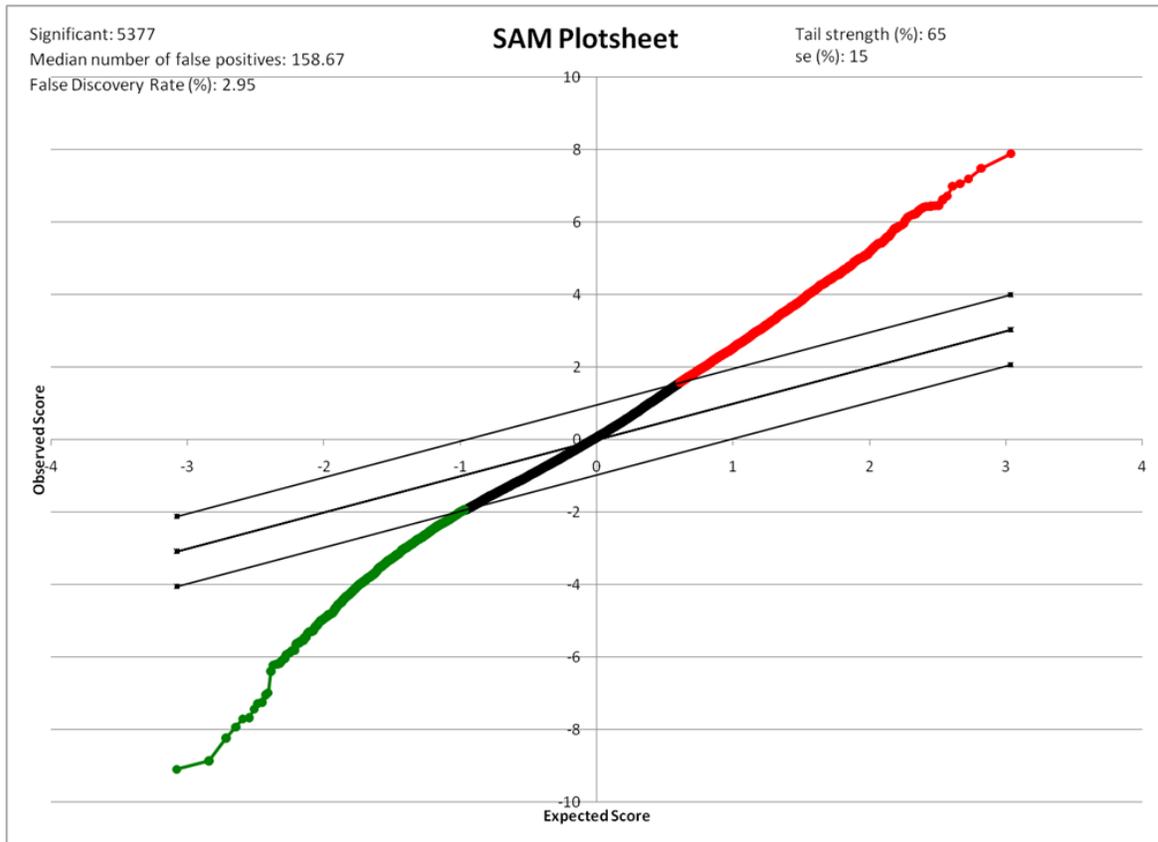
$$r_i = \bar{x}_{i2} - \bar{x}_{i1}$$

Además, mediante el uso de permutaciones determina si la expresión de cualquier gen está relacionada de forma significativa con la respuesta a través del **q-valor** (similar al p-valor), que es la mínima tasa de falsos positivos a la que un gen es considerado significativo según criterios de John Storey (96). Según aumenta  $d_i$  el valor correspondiente del q-valor disminuye.

-El punto de corte para la significación viene determinado por el parámetro **delta** cuyo valor es establecido a criterio del usuario basándose en el tanto por ciento de falsos positivos (*false discovery rate*, FDR) admisibles.

- Otro parámetro es el **fold change** que determina cuanto cambia la expresión de un gen entre los grupos.

-Antes de realizar cualquier cálculo, la aplicación calcula los valores perdidos a través del algoritmo de normalización **K-Nearest Neighbor (97)**.



**Gráfica 5.** Representación del SAM. Se compara la expresión de genes en tumores *claudin-low* y tumores que no pertenecen a este subtipo. El número de genes significativos es 5377. La tasa de falso positivos es de 2,95%

#### 3.6.4.4 ASIGNACIÓN DEL SUBTIPO GENÓMICO DE ACUERDO AL PREFIL DE EXPRESIÓN.

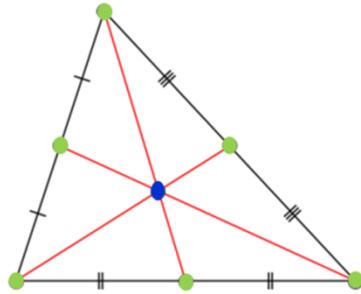
La asignación de los subtipos genómicos luminal A, luminal B, Basal, *Her2-enriched* y normal se realizó según el método establecido por Joel Parker y cols (31), empleando el software R<sup>14</sup>. A partir de ahora nos referiremos a este método como **PAM50**. Los tumores *claudin-low* se definieron como aquellos tumores clasificados como normales o basales según el método anterior y clasificados como *claudin-low* utilizando el *Claudin-low Predictor* (método no publicado).

#### **PAM50**

En un primer paso se calcula los valores perdidos a través del algoritmo de normalización **K-Nearest Neighbor**.

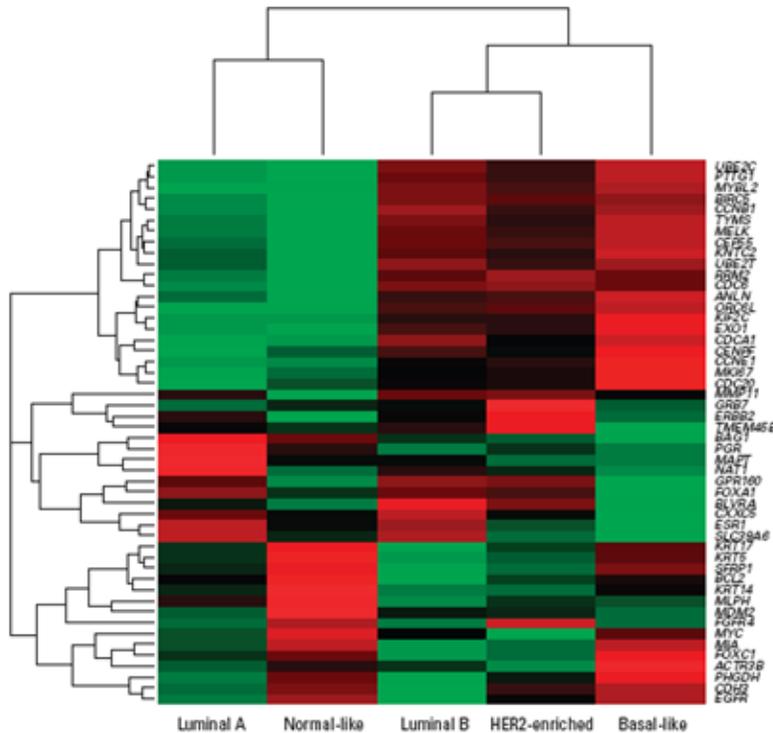
<sup>14</sup> El software R es un lenguaje, un entorno de ejecución para cómputo estadístico y gráficos que ejecuta programas guardados en archivos de tipo script. Su diseño fue influenciado por dos lenguajes existentes S y Scheme.

El PAM50 clasifica los tumores en los distintos subtipos descritos por Charles M Perou atendiendo a la expresión de 49 genes (**Anexo I**, al final de Materiales y Métodos). Para ello, se calcula la distancia al **centroide**<sup>15</sup> de cada subtipo mediante una **correlación de Spearman**<sup>16</sup>. A cada muestra se le asigna el subtipo con el que presenta mayor correlación (menor distancia).



**Figura 23.** Representación del centroide de un triángulo (punto azul).

La construcción del centroide de cada subtipo se realizó teniendo en cuenta la expresión de los 49 genes del anexo I, en las muestras de tumores de mama, de la *UNC Microarray Data Base*. El método empleado para la construcción del centroide fue el análisis predictivo de *microarrays* (**PAM**) (98).



**Figura 24.** Dendogramas de los centroides de cada subtipo. Figura extraída del artículo Parker et al (31).

<sup>15</sup> **Centroide o baricentro:** El centroide o baricentro de un objeto X perteneciente a un espacio n-dimensional se define como la intersección de todos los planos q dividen a X en dos partes de igual volumen con respecto al plano.

<sup>16</sup> **El coeficiente de correlación de Spearman:** es una prueba no paramétrica que mide la asociación o interdependencia entre dos variables continuas.

### *Claudin-low* Predictor

Debido a que el método PAM50 no es capaz de discriminar los tumores *claudin-low*<sup>17</sup>, se empleó este método para identificar a los tumores de este subtipo. Empíricamente, se ha observado que los tumores *claudin-low* corresponden a tumores normales o basales según la clasificación por el método PAM50.

Este método clasifica los tumores en *claudin-low* o no *claudin-low* basándose en la expresión de 703 genes (**Anexo II**). En este caso, la similitud con el subtipo se calcula por la **distancia euclídea**<sup>18</sup> al centroide.

#### 3.6.4.5 ANÁLISIS FUNCIONAL

Para este análisis se empleó el *software* DAVID (*Database for Annotation and Integrated Discovery*) disponible en la *web* <http://david.abcc.ncifcrf.gov>. Este programa proporciona una serie de aplicaciones de anotaciones funcionales lo que permite al investigador entender el significado biológico de una determinada lista de genes.

A través de la página *web* se pueden identificar **términos GO**<sup>19</sup> que estén enriquecidos en la lista, descubrir grupos de genes relacionados, visualizar las vías metabólicas donde intervienen los genes de la lista, buscar otros genes biológicamente relacionados que no están en la lista, asociar la lista de genes con alguna enfermedad, estudiar posibles interacciones entre las proteínas codificadas por los genes de la lista e identificar motivos o dominios proteicos relacionados de proteínas codificadas por los genes de la lista. Además, el *software* permite visualizar artículos donde aparezcan genes de la lista.

<sup>17</sup> Los tumores *claudin-low* se han descrito recientemente. El método de clasificación de los mismos no está aún publicado aunque existen ya varias publicaciones que hablan de este nuevo subtipo.

<sup>18</sup> **Distancia euclídea:** Es la distancia "ordinaria" entre dos puntos de un espacio euclídeo que se deduce a partir del Teorema de Pitágoras. La distancia euclídea entre dos puntos X e Y es:

$$d(X,Y)=\sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2}$$

<sup>19</sup> **Los términos GO**, o términos de ontología genética, proporcionan un esquema estructurado de clasificación jerárquica para describir los atributos de los genes. Cada término GO tiene un único identificador numérico (ej: GO:nnnnn) y un nombre común (ej: célula, factor de crecimiento fobrobástico...etc) y en la mayoría de los casos una definición. Además, cada término se asigna a una de las tres categorías ontológicas, a saber: función molecular, componente celular o proceso biológico.

### 3.7 OTRAS DETERMINACIONES

Los estudios de amplificación por FISH, así como los de expresión por inmunohistoquímica (IHQ) se realizaron en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos.

#### 3.7.1 ESTUDIO DE LA AMPLIFICACIÓN DE HER2 y TOP2A POR FISH

La amplificación de HER2 así como de TOP2A, se estudió por **FISH** con la sonda *Pathvision de Vysis* que incorpora un marcaje centromérico además de la sonda frente al gen a estudio. Un cociente superior a dos es admitido como existencia de amplificación.

#### 3.7.2. INMUNOHISTOQUÍMICA

La sobreexpresión del gen HER2 se estudio con el *kit* comercial *HercepTest* DAKO® siguiente las instrucciones de la casa comercial. La puntuación para valorar el grado de expresión se realizó según criterios ya publicados (99) en los que se establece un *score* de cero, uno dos y tres puntos. Se consideró el receptor HER2 positivo cuando presentaba tres puntos y negativo con uno y dos puntos. Aquellos receptores con dos puntos se consideran "dudosos" y se catalogan como positivos o negativos atendiendo al resultado del FISH.

Las determinaciones de expresión de receptores para estrógenos y progesterona, así como de ki-67, se realizaron según la técnica y los valores estándares del centro. Los resultados están expresados en tanto por ciento de células teñidas con anticuerpos específicos.

### 3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables cuantitativas se describieron empleado la media y la desviación estándar, en el caso de distribuciones normales, y con la mediana y rango intercuartílico en el caso de distribuciones no normales. Del mismo modo, las variables cualitativas se describieron con la frecuencia de distribución y el intervalo de confianza del 95%.

La asociación entre variables cualitativas se evaluó mediante el test estadístico  $\chi^2$  o mediante el test exacto de Fisher cuando fue requerido.

La asociación entre variables cualitativas se realizó mediante el test U Mann-Whitney o T-Student.

El análisis multivariable se hizo por regresión logística. Previamente, se evaluó la posible asociación de las variables con valor pronóstico (edad, tamaño del tumor, receptores hormonales...etc.) con la respuesta al tratamiento para considerarlas en el análisis. La hipótesis nula fue rechazada cuando el error tipo I fue menor de 0.05 ( $\alpha < 0.05$ ).

El análisis estadístico se llevó a cabo empleando los programas SPSS 12.0 y G-Stat Student.

## ANEXO I. GENES PAM50

CLID	Symbol	UGCluster	Gene name
57180	ACTR3B	Hs.647117	Actin-related protein 3-beta
54443	ANLN	Hs.62180	Anillin, actin binding protein (scraps homolog, Drosophila)
573	BAG1	Hs.377484	BCL2-associated athanogene
596	BCL2	Hs.150749	B-cell CLL/lymphoma 2
332	BIRC5	Hs.514527	Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)
644	BLVRA	Hs.488143	Biliverdin reductase A
891	CCNB1	Hs.23960	Cyclin B1
898	CCNE1	Hs.244723	Cyclin E1
991	CDC20	Hs.524947	CDC20 cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)
990	CDC6	Hs.405958	CDC6 cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)
83540	CDCA1	Data not found	Cell division cycle associated 1 (S. cerevisiae)
1001	CDH3	Hs.709226	Cadherin 3, type 1, P-cadherin (placental)
1063	CENPF	Hs.497741	Centromere protein F, 350/400ka (mitosin)
55165	CEP55	Hs.14559	Chromosome 10 open reading frame 3
51523	CXXC5	Hs.189119	CXXC finger 5
1956	EGFR	Hs.488293	Epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)
2064	ERBB2	Hs.446352	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
2099	ESR1	Hs.208124	Estrogen receptor 1
9156	EXO1	Hs.498248	Exonuclease 1
2264	FGFR4	Hs.165950	Fibroblast growth factor receptor 4
3169	FOXA1	Hs.163484	Forkhead box A1
2296	FOXC1	Hs.348883	Forkhead box C1
26996	GPR160	Hs.231320	G protein-coupled receptor 160
2886	GRB7	Hs.86859	Growth factor receptor-bound protein 7
29089	HSPC150	Data not found	HSPC150 protein similar to ubiquitin-conjugating enzyme
11004	KIF2C	Hs.69360	Kinesin family member 2C
10403	KNTC2	Data not found	Kinetochore associated 2
3861	KRT14	Hs.654380	Keratin 14 (epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara, Koebner)
3872	KRT17	Hs.2785	Keratin 17
3852	KRT5	Hs.433845	Keratin 5 (epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara/Kobner/Weber-Cockayne types)
4193	MDM2	Hs.567303	Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein (mouse)
9833	MELK	Hs.184339	Maternal embryonic leucine zipper kinase
8190	MIA	Hs.646364	Melanoma inhibitory activity
4288	MKI67	Hs.80976	Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67
79083	MLPH	Hs.102406	Melanophilin
4320	MMP11	Hs.143751	Matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)
4605	MYBL2	Hs.179718	V-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2
4609	MYC	Hs.202453	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
9	NAT1	Hs.591847	N-acetyltransferase 1 (arylamine N-acetyltransferase)
23594	ORC6L	Hs.49760	Origin recognition complex, subunit 6 homolog-like (yeast)
5241	PGR	Hs.32405	Progesterone receptor
26227	PHGDH	Hs.487296	Phosphoglycerate dehydrogenase
9232	PTTG1	Hs.350966	Pituitary tumor-transforming 1
6241	RRM2	Hs.226390	Ribonucleotide reductase M2 polypeptide
6422	SFRP1	Hs.713546	Secreted frizzled-related protein 1
25800	SLC39A6	Hs.79136	Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 6
120224	TMEM45B	Hs.504301	transmembrane protein 45B
7298	TYMS	Hs.592338	Thymidylate synthetase
11065	UBE2C	Hs.93002	Ubiquitin-conjugating enzyme E2C

**ANEXO II. GENES *CLAUDIN-LOW* PREDICTOR**

CLID	Symbol	Gene name
10	NAT2	N-acetyltransferase 2 (arylamine N-acetyltransferase)
10040	COX11	COX11 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein (yeast)
10092	ARPC5	actin related protein 2/3 complex, subunit 5, 16kDa
10095	ARPC1B	actin related protein 2/3 complex, subunit 1B, 41kDa
10140	TOB1	transducer of ERBB2, 1
10217	CTDSPL	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II) small phosphatase-like
1022	CDK7	cyclin-dependent kinase 7 (MO15 homolog, <i>Xenopus laevis</i> , cdk-activating kinase)
10247	HRSP12	heat-responsive protein 12
10248	POP7	processing of precursor 7, ribonuclease P subunit ( <i>S. cerevisiae</i> )
10278	EFS	embryonal Fyn-associated substrate
10279	PRSS16	protease, serine, 16 (thymus)
1029	CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)
10309	UNG2	uracil-DNA glycosylase 2
1032	CDKN2D	cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)
10330	TMEM4	transmembrane protein 4
10384	BTN3A3	butyrophilin, subfamily 3, member A3
10385	BTN2A2	butyrophilin, subfamily 2, member A2
10388	SYCP2	synaptonemal complex protein 2
10396	ATP8A1	ATPase, aminophospholipid transporter (APLT), Class I, type 8A, member 1
10406	WFDC2	WAP four-disulfide core domain 2
10412	TINP1	TGF beta-inducible nuclear protein 1
10449	ACAA2	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 (mitochondrial 3-oxoacyl-Coenzyme A thiolase)
10451	VAV3	vav 3 oncogene
1047	CLGN	Calmegin
10486	CAP2	CAP, adenylate cyclase-associated protein, 2 (yeast)
10529	NEBL	Nebulette
10551	AGR2	anterior gradient 2 homolog ( <i>Xenopus laevis</i> )
10560	SLC19A2	solute carrier family 19 (thiamine transporter), member 2
10610	ST6GALNAC2	ST6
10614	HEXIM1	hexamethylene bis-acetamide inducible 1
10628	TXNIP	thioredoxin interacting protein
1063	CENPF	centromere protein F, 350/400ka (mitosin)
10653	SPINT2	serine peptidase inhibitor, Kunitz type, 2
10788	IQGAP2	IQ motif containing GTPase activating protein 2
1081	CGA	glycoprotein hormones, alpha polypeptide
10867	TSPAN9	tetraspanin 9
10897	YIF1A	Yip1 interacting factor homolog A ( <i>S. cerevisiae</i> )

CLID	Symbol	Gene name
10916	MAGED2	melanoma antigen family D, 2
10969	EBNA1BP2	EBNA1 binding protein 2
10998	SLC27A5	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 5
11001	SLC27A2	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2
11040	PIM2	pim-2 oncogene
11042	LOC643784	similar to Baculoviral IAP repeat-containing protein 1
11059	WWP1	WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1
11092	C9orf9	chromosome 9 open reading frame 9
11122	PTPRT	protein tyrosine phosphatase, receptor type, T
11160	SPFH2	SPFH domain family, member 2
1119	CHKA	choline kinase alpha
112399	EGLN3	egl nine homolog 3 (C. elegans)
11240	PADI2	peptidyl arginine deiminase, type II
112476	PRRT2	proline-rich transmembrane protein 2
11257	TP53AP1	TP53 activated protein 1
112616	CMTM7	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 7
113622	ADPRHL1	ADP-ribosylhydrolase like 1
114327	EFHC1	EF-hand domain (C-terminal) containing 1
114569	MAL2	mal, T-cell differentiation protein 2
116228	FAM36A	family with sequence similarity 36, member A
116843	C6orf192	chromosome 6 open reading frame 192
117177	RAB3IP	RAB3A interacting protein (rabin3)
12	SERPINA3	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3
120224	TMEM45B	transmembrane protein 45B
123036	MTAC2D1	membrane targeting (tandem) C2 domain containing 1
123096	SLC25A29	solute carrier family 25, member 29
124220	LOC124220	similar to common salivary protein 1
124222	PKMYT1	protein kinase, membrane associated tyrosine/threonine 1
126823	KARCA1	kelch/ankyrin repeat containing cyclin A1 interacting protein
1287	COL4A5	collagen, type IV, alpha 5 (Alport syndrome)
129642	MBOAT2	membrane bound O-acyltransferase domain containing 2
1299	COL9A3	collagen, type IX, alpha 3
1301	COL11A1	collagen, type XI, alpha 1
131118	DNAJC19	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 19
1314	COPA	coatamer protein complex, subunit alpha
1337	COX6A1	cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 1
1345	COX6C	cytochrome c oxidase subunit VIc
135932	TMEM139	transmembrane protein 139
1364	CLDN4	claudin 4
1365	CLDN3	claudin 3

CLID	Symbol	Gene name
1366	CLDN7	claudin 7
1382	CRABP2	cellular retinoic acid binding protein 2
1384	CRAT	carnitine acetyltransferase
139231	CXorf39	chromosome X open reading frame 39
140576	S100A16	S100 calcium binding protein A16
143379	C10orf82	chromosome 10 open reading frame 82
1445	CSK	c-src tyrosine kinase
1465	CSRP1	cysteine and glycine-rich protein 1
147968	CAPN12	calpain 12
148327	CREB3L4	cAMP responsive element binding protein 3-like 4
1488	CTBP2	C-terminal binding protein 2
1495	CTNNA1	catenin (cadherin-associated protein), alpha 1, 102kDa
150	ADRA2A	adrenergic, alpha-2A-, receptor
1501	CTNND2	catenin (cadherin-associated protein), delta 2
151009	FLJ38359	hypothetical protein FLJ38359
1512	CTSH	cathepsin H
1513	CTSK	cathepsin K (pseudodysostosis)
151313	FAHD2A	hypothetical protein DKFZp434N062
1515	CTSL2	cathepsin L2
1520	CTSS	cathepsin S
1528	CYB5A	cytochrome b5 type A (microsomal)
1534	CYB561	cytochrome b-561
1537	CYC1	cytochrome c-1
155465	BCMP11	breast cancer membrane protein 11
157574	FBXO16	F-box protein 16
158584	AMDD	amidase domain containing
1602	DACH1	dachshund homolog 1 (Drosophila)
1627	DBN1	drebrin 1
163732	CITED4	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 4
1645	LOC648517	aldo-keto reductase family 1, member C2
166647	GPR125	G protein-coupled receptor 125
171546	C14orf147	chromosome 14 open reading frame 147
1717	DHCR7	7-dehydrocholesterol reductase
18	ABAT	4-aminobutyrate aminotransferase
1805	DPT	Dermatopontin
1829	DSG2	desmoglein 2
183	AGT	angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)
1832	DSP	Desmoplakin
1846	DUSP4	dual specificity phosphatase 4
1848	DUSP6	dual specificity phosphatase 6

CLID	Symbol	Gene name
1855	DVL1	dishevelled, dsh homolog 1 (Drosophila)
1875	E2F5	E2F transcription factor 5, p130-binding
1910	EDNRB	endothelin receptor type B
1917	EEF1A2	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2
1945	EFNA4	ephrin-A4
1952	CELSR2	cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 2 (flamingo homolog, Drosophila)
195814	RDHE2	retinal short chain dehydrogenase reductase isoform 1
196	AHR	aryl hydrocarbon receptor
1981	EIF4G1	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1
1999	ELF3	E74-like factor 3 (ets domain transcription factor, epithelial-specific )
200958	MUC20	mucin 20, cell surface associated
201294	UNC13D	unc-13 homolog D (C. elegans)
2017	CTTN	Cortactin
2034	EPAS1	endothelial PAS domain protein 1
204	AK2	adenylate kinase 2
2053	EPHX2	epoxide hydrolase 2, cytoplasmic
2064	ERBB2	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 (avian)
2099	ESR1	estrogen receptor 1
216	ALDH1A1	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1
2166	FAAH	fatty acid amide hydrolase
2167	FABP4	fatty acid binding protein 4, adipocyte
2170	FABP3	fatty acid binding protein 3, muscle and heart (mammary-derived growth inhibitor)
2173	FABP7	fatty acid binding protein 7, brain
2194	FASN	fatty acid synthase
2257	FGF12	fibroblast growth factor 12
2258	FGF13	fibroblast growth factor 13
2273	FHL1	four and a half LIM domains 1
22827	SIAHBP1	fuse-binding protein-interacting repressor
22880	MORC2	MORC family CW-type zinc finger 2
22976	PAXIP1	PAX interacting (with transcription-activation domain) protein 1
22977	AKR7A3	aldo-keto reductase family 7, member A3 (aflatoxin aldehyde reductase)
22981	RP4-691N24.1	KIAA0980 protein
22996	C1orf34	chromosome 1 open reading frame 34
23030	JMJD2B	jumonji domain containing 2B
23042	KIAA0251	KIAA0251 protein
23089	PEG10	paternally expressed 10
2317	FLNB	filamin B, beta (actin binding protein 278)
23170	TTL12	tubulin tyrosine ligase-like family, member 12
23199	KIAA0182	KIAA0182
23240	KIAA0922	KIAA0922

CLID	Symbol	Gene name
23288	IQCE	IQ motif containing E
2330	FMO5	flavin containing monooxygenase 5
23318	ZCCHC11	zinc finger, CCHC domain containing 11
23327	NEDD4L	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like
23347	SMCHD1	structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1
23463	ICMT	isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase
23464	GCAT	glycine C-acetyltransferase (2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase)
23484	LEPROTL1	leptin receptor overlapping transcript-like 1
23513	SCRIB	scribbled homolog (Drosophila)
2354	FOSB	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B
23542	MAPK8IP2	mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 2
23568	ARL2BP	ADP-ribosylation factor-like 2 binding protein
23640	HSPBP1	hsp70-interacting protein
23650	TRIM29	tripartite motif-containing 29
24141	C20orf103	chromosome 20 open reading frame 103
24147	FJX1	four jointed box 1 (Drosophila)
2517	FUCA1	fucosidase, alpha-L- 1, tissue
2537	IFI6	interferon, alpha-inducible protein 6
255743	NPNT	Nephronectin
255758	MGC33212	hypothetical protein MGC33212
2571	GAD1	glutamate decarboxylase 1 (brain, 67kDa)
25798	BRI3	brain protein I3
25800	SLC39A6	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 6
25805	BAMBI	BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog (Xenopus laevis)
2582	GALE	UDP-galactose-4-epimerase
25880	C16orf51	chromosome 16 open reading frame 51
2593	GAMT	guanidinoacetate N-methyltransferase
2597	GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
25984	KRT23	keratin 23 (histone deacetylase inducible)
26031	OSBPL3	oxysterol binding protein-like 3
260425	MAGI3	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 3
26047	CNTNAP2	contactin associated protein-like 2
26115	TANC2	tetratricopeptide repeat, ankyrin repeat and coiled-coil containing 2
26150	RIBC2	RIB43A domain with coiled-coils 2
26207	PITPNC1	phosphatidylinositol transfer protein, cytoplasmic 1
26227	PHGDH	phosphoglycerate dehydrogenase
2625	GATA3	GATA binding protein 3
2629	GBA	glucosidase, beta; acid, pseudogene
26499	PLEK2	pleckstrin 2
26509	FER1L3	fer-1-like 3, myoferlin (C. elegans)

CLID	Symbol	Gene name
26578	OSTF1	osteoclast stimulating factor 1
2674	GFRA1	GDNF family receptor alpha 1
26873	OPLAH	5-oxoprolinase (ATP-hydrolysing)
26996	GPR160	G protein-coupled receptor 160
26999	CYFIP2	cytoplasmic FMR1 interacting protein 2
27042	C1orf107	chromosome 1 open reading frame 107
27071	DAPP1	dual adaptor of phosphotyrosine and 3-phosphoinositides
27075	TSPAN13	tetraspanin 13
271	AMPD2	adenosine monophosphate deaminase 2 (isoform L)
27124	PIB5PA	phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate 5-phosphatase, A
27151	CPAMD8	C3 and PZP-like, alpha-2-macroglobulin domain containing 8
27240	SIT1	signaling threshold regulating transmembrane adaptor 1
27246	ZNF364	zinc finger protein 364
27299	ADAMDEC1	ADAM-like, decysin 1
2778	GNAS	GNAS complex locus
2806	GOT2	glutamic-oxaloacetic transaminase 2, mitochondrial (aspartate aminotransferase 2)
2819	GPD1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)
283234	CCDC88	coiled-coil domain containing 88
284252	KCTD1	potassium channel tetramerisation domain containing 1
2878	GPX3	glutathione peroxidase 3 (plasma)
288	ANK3	ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)
2882	GPX7	glutathione peroxidase 7
2886	GRB7	growth factor receptor-bound protein 7
2888	GRB14	growth factor receptor-bound protein 14
28978	TMEM14A	transmembrane protein 14 <sup>a</sup>
29028	ATAD2	ATPase family, AAA domain containing 2
29087	THYN1	thymocyte nuclear protein 1
29089	UBE2T	ubiquitin-conjugating enzyme E2T (putative)
29097	CNIH4	cornichon homolog 4 (Drosophila)
291	SLC25A4	solute carrier family 25, member 4
2919	CXCL1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)
2932	GSK3B	glycogen synthase kinase 3 beta
2934	GSN	gelsolin (amyloidosis, Finnish type)
2944	GSTM1	glutathione S-transferase M1
2947	GSTM3	glutathione S-transferase M3 (brain)
2952	GSTT1	glutathione S-transferase theta 1
2970	GTF2IP1	general transcription factor II, i
2971	GTF3A	general transcription factor IIIA
29803	REPIN1	replication initiator 1
29855	UBN1	ubiquitin 1

CLID	Symbol	Gene name
29899	GP5M2	G-protein signalling modulator 2 (AGS3-like, <i>C. elegans</i> )
29956	LASS2	LAG1 longevity assurance homolog 2 ( <i>S. cerevisiae</i> )
29982	NRBF2	nuclear receptor binding factor 2
29997	GLTSCR2	glioma tumor suppressor candidate region gene 2
3005	H1F0	H1 histone family, member 0
3006	HIST1H1C	histone 1, H1c
30061	SLC40A1	solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1
301	ANXA1	annexin A1
3012	HIST1H2AE	histone 1, H2ae
3017	HIST1H2BD	histone 1, H2bd
3018	HIST1H2BB	histone 1, H2bb
306	ANXA3	annexin A3
3149	HMGB3	high-mobility group box 3
3169	FOXA1	forkhead box A1
3225	HOXC9	homeobox C9
3226	HOXC10	homeobox C10
3229	HOXC13	homeobox C13
323	APBB2	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 2 (Fe65-like)
3249	HPN	hepsin (transmembrane protease, serine 1)
3294	HSD17B2	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2
3297	LOC642255	similar to Heat shock factor protein 1 (Heat shock transcription factor 1) (HSTF 1)
3306	HSPA2	heat shock 70kDa protein 2
3371	TNC	tenascin C (hexabrachion)
3396	ICT1	immature colon carcinoma transcript 1
339745	LOC339745	hypothetical protein LOC339745
3418	IDH2	isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial
3431	SP110	SP110 nuclear body protein
347	APOD	apolipoprotein D
3476	IGBP1	immunoglobulin (CD79A) binding protein 1
3483	IGFALS	insulin-like growth factor binding protein, acid labile subunit
3485	IGFBP2	insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa
3489	IGFBP6	insulin-like growth factor binding protein 6
358	AQP1	aquaporin 1 (Colton blood group)
36	ACADSB	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain
3608	ILF2	interleukin enhancer binding factor 2, 45kDa
3624	INHBA	inhibin, beta A (activin A, activin AB alpha polypeptide)
3625	INHBB	inhibin, beta B (activin AB beta polypeptide)
3662	IRF4	interferon regulatory factor 4
3667	IRS1	insulin receptor substrate 1
367	AR	androgen receptor

CLID	Symbol	Gene name
3691	ITGB4	integrin, beta 4
3728	JUP	junction plakoglobin
373156	GSTK1	glutathione S-transferase kappa 1
374	LOC653193	amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)
374882	UNQ501	MBC3205
375	ARF1	ADP-ribosylation factor 1
3775	KCNK1	potassium channel, subfamily K, member 1
378938	MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-coding RNA)
3790	KCNS3	potassium voltage-gated channel, delayed-rectifier, subfamily S, member 3
3855	KRT7	keratin 7
3866	KRT15	keratin 15
3875	KRT18	keratin 18
388720	RPS27A	ribosomal protein S27a
389336	MGC23985	similar to AVLV472
3898	LAD1	ladinin 1
3911	LAMA5	laminin, alpha 5
3930	LBR	lamin B receptor
3945	LDHB	lactate dehydrogenase B
3957	LGALS2	lectin, galactoside-binding, soluble, 2 (galectin 2)
397	ARHGDI3	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta
3980	LIG3	ligase III, DNA, ATP-dependent
400451	LOC400451	hypothetical gene supported by AK075564; BC060873
400793	FLJ13137	hypothetical gene supported by AK125122
4008	LMO7	LIM domain 7
4023	LPL	lipoprotein lipase
4050	LTB	lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)
4067	LYN	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog
4071	TM4SF1	transmembrane 4 L six family member 1
4094	MAF	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian)
4125	MAN2B1	mannosidase, alpha, class 2B, member 1
4151	MB	Myoglobin
4239	MFAP4	microfibrillar-associated protein 4
4257	MGST1	microsomal glutathione S-transferase 1
4283	CXCL9	chemokine (C-X-C motif) ligand 9
4291	MLF1	myeloid leukemia factor 1
4301	MLLT4	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 4
4324	MMP15	matrix metalloproteinase 15 (membrane-inserted)
4331	MNAT1	menage a trois homolog 1, cyclin H assembly factor (Xenopus laevis)
441168	RP1-93H18.5	hypothetical protein LOC441168
445	ASS	argininosuccinate synthetase

CLID	Symbol	Gene name
4477	MSMB	microseminoprotein, beta-
4582	MUC1	mucin 1, cell surface associated
4602	MYB	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)
4646	MYO6	myosin VI
4651	MYO10	myosin X
4701	NDUFA7	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 7, 14.5kDa
4716	NDUFB10	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 10, 22kDa
4718	NDUFC2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown, 2, 14.5kDa
4751	NEK2	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 2
4774	NFIA	nuclear factor I/A
4891	SLC11A2	solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 2
490	ATP2B1	ATPase, Ca <sup>++</sup> transporting, plasma membrane 1
4926	NUMA1	nuclear mitotic apparatus protein 1
493911	PHOSPHO2	phosphatase, orphan 2
4950	LOC647859	Occludin
4957	ODF2	outer dense fiber of sperm tails 2
5029	P2RY2	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 2
5037	PEBP1	phosphatidylethanolamine binding protein 1
50617	ATP6V0A4	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal V0 subunit a4
50619	DEF6	differentially expressed in FDCP 6 homolog (mouse)
50626	CYHR1	cysteine/histidine-rich 1
50805	IRX4	iroquois homeobox protein 4
50848	F11R	F11 receptor
5087	PBX1	pre-B-cell leukemia transcription factor 1
5104	SERPINA5	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 5
51062	SPG3A	spastic paraplegia 3A (autosomal dominant)
51087	YBX2	Y box binding protein 2
51127	TRIM17	tripartite motif-containing 17
51133	KCTD3	potassium channel tetramerisation domain containing 3
51142	CHCHD2	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2
51192	CKLF	chemokine-like factor
51280	GOLPH2	golgi phosphoprotein 2
51316	PLAC8	placenta-specific 8
5133	PDCD1	programmed cell death 1
51373	MRPS17	mitochondrial ribosomal protein S17
51514	DTL	denticleless homolog (Drosophila)
51529	ANAPC11	APC11 anaphase promoting complex subunit 11 homolog (yeast)
51561	IL23A	interleukin 23, alpha subunit p19
51571	FAM49B	family with sequence similarity 49, member B
51604	PIGT	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class T

CLID	Symbol	Gene name
51706	CYB5R1	cytochrome b5 reductase 1
51760	SYT17	synaptotagmin XVII
51806	CALML5	calmodulin-like 5
51809	GALNT7	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 7
5189	PEX1	peroxisome biogenesis factor 1
5204	PFDN5	prefoldin subunit 5
5264	PHYH	phytanoyl-CoA 2-hydroxylase
5327	PLAT	plasminogen activator, tissue
5349	FXYD3	FXYD domain containing ion transport regulator 3
5351	PLOD1	procollagen-lysine 1, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1
5364	PLXNB1	plexin B1
537	ATP6AP1	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal accessory protein 1
540	ATP7B	ATPase, Cu <sup>++</sup> transporting, beta polypeptide
54069	C21orf45	chromosome 21 open reading frame 45
54145	H2BFS	H2B histone family, member S
541469	LOC541469	hypothetical LOC541469 protein
5423	POLB	polymerase (DNA directed), beta
5437	POLR2H	polymerase (RNA II) (DNA directed) polypeptide H
5443	POMC	proopiomelanocortin
5446	PON3	paraoxonase 3
54502	FLJ20273	RNA-binding protein
5468	PPARG	peroxisome proliferative activated receptor, gamma
5476	PPGB	protective protein for beta-galactosidase (galactosialidosis)
54836	BSPRY	B-box and SPRY domain containing
54843	SYTL2	synaptotagmin-like 2
54845	RBM35A	RNA binding motif protein 35A
548596	CKMT1A	creatine kinase, mitochondrial 1 <sup>a</sup>
54894	RNF43	ring finger protein 43
54900	LAX1	lymphocyte transmembrane adaptor 1
54918	CMTM6	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 6
54933	RHBDL2	rhomboid, veinlet-like 2 (Drosophila)
54938	SARS2	seryl-tRNA synthetase 2
54970	TTC12	tetratricopeptide repeat domain 12
54972	TMEM132A	transmembrane protein 132A
5498	PPOX	protoporphyrinogen oxidase
54985	HCFC1R1	host cell factor C1 regulator 1 (XPO1 dependent)
55027	HEATR3	HEAT repeat containing 3
55039	TRMT12	tRNA methyltransferase 12 homolog (S. cerevisiae)
55040	EPN3	epsin 3
5507	PPP1R3C	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C

CLID	Symbol	Gene name
55093	C8orf32	chromosome 8 open reading frame 32
55108	BSDC1	BSD domain containing 1
55122	C6orf166	chromosome 6 open reading frame 166
55196	C12orf35	chromosome 12 open reading frame 35
55258	FLJ10916	hypothetical protein FLJ10916
55268	ECHDC2	enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 2
55270	NUDT15	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 15
55286	C4orf19	chromosome 4 open reading frame 19
55313	FLJ11151	hypothetical protein FLJ11151
55353	LAPTM4B	lysosomal associated protein transmembrane 4 beta
55450	CAMK2N1	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1
55466	DNAJA4	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 4
55503	TRPV6	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 6
55520	ELAC1	elaC homolog 1 (E. coli)
55630	SLC39A4	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 4
55638	FLJ20366	hypothetical protein FLJ20366
5567	PRKACB	protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, beta
55698	FLJ10324	hypothetical protein FLJ10324
5570	PKIB	protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor beta
55718	POLR3E	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide E (80kD)
55731	C17orf63	chromosome 17 open reading frame 63
55732	C1orf112	chromosome 1 open reading frame 112
55740	ENAH	enabled homolog (Drosophila)
55756	RC74	integrator complex subunit 9
55765	C1orf106	chromosome 1 open reading frame 106
5579	PRKCB1	protein kinase C, beta 1
55793	FAM63A	family with sequence similarity 63, member A
5584	PRKCI	protein kinase C, iota
55840	EAF2	ELL associated factor 2
55859	BEX1	brain expressed, X-linked 1
55862	ECHDC1	enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 1
55890	GPRC5C	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member C
55897	MESP1	mesoderm posterior 1 homolog (mouse)
5613	PRKX	protein kinase, X-linked
56133	PCDHB2	protocadherin beta 2
5621	PRNP	prion protein (Creutzfeldt-Jakob disease, Gerstmann-Strausler-Scheinker syndrome)
56521	DNAJC12	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 12
5653	KLK6	kallikrein 6 (neurosin, zyme)
56654	NPDC1	neural proliferation, differentiation and control, 1
5692	PSMB4	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 4

CLID	Symbol	Gene name
56925	LXN	Latexin
56937	TMEPAI	transmembrane, prostate androgen induced RNA
5699	PSMB10	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 10
56996	SLC12A9	solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters), member 9
57110	HRASLS	HRAS-like suppressor
57136	C20orf3	chromosome 20 open reading frame 3
57180	ACTR3B	ARP3 actin-related protein 3 homolog B (yeast)
57182	ANKRD50	ankyrin repeat domain 50
57348	TTYH1	tweety homolog 1 (Drosophila)
57402	S100A14	S100 calcium binding protein A14
57419	SLC24A3	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 3
57460	PPM1H	protein phosphatase 1H (PP2C domain containing)
57496	MKL2	MKL/myocardin-like 2
57504	MTA3	metastasis associated 1 family, member 3
5753	PTK6	PTK6 protein tyrosine kinase 6
57530	CGN	Cingulin
57535	KIAA1324	KIAA1324
5754	PTK7	PTK7 protein tyrosine kinase 7
57552	AADACL1	arylacetamide deacetylase-like 1
576	BAI2	brain-specific angiogenesis inhibitor 2
57619	SHROOM3	shroom family member 3
5768	QSCN6	quiescin Q6
57730	KIAA1641	KIAA1641
57758	SCUBE2	signal peptide, CUB domain, EGF-like 2
5792	PTPRF	protein tyrosine phosphatase, receptor type, F
5796	PTPRK	protein tyrosine phosphatase, receptor type, K
5797	PTPRM	protein tyrosine phosphatase, receptor type, M
58	ACTA1	actin, alpha 1, skeletal muscle
5805	PTS	6-pyruvoyltetrahydropterin synthase
5825	ABCD3	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 3
5827	PXMP2	peroxisomal membrane protein 2, 22kDa
5828	PXMP3	peroxisomal membrane protein 3, 35kDa (Zellweger syndrome)
5831	PYCR1	pyrroline-5-carboxylate reductase 1
58528	RRAGD	Ras-related GTP binding D
5860	QDPR	quinoid dihydropteridine reductase
5863	RGL2	ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 2
5870	RAB6A	RAB6A, member RAS oncogene family
5873	RAB27A	RAB27A, member RAS oncogene family
59084	ENPP5	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 5 (putative function)
5909	RAP1GAP	RAP1 GTPase activating protein

CLID	Symbol	Gene name
59277	NTN4	netrin 4
595	CCND1	cyclin D1
5971	RELB	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B (avian)
60	ACTB	actin, beta
6001	RGS10	regulator of G-protein signalling 10
6135	RPL11	ribosomal protein L11
6154	RPL26	ribosomal protein L26
6157	RPL27A	ribosomal protein L27a
6166	RPL36AL	ribosomal protein L36a-like
6228	RPS23	ribosomal protein S23
6235	RPS29	ribosomal protein S29
6271	S100A1	S100 calcium binding protein A1
6282	S100A11	S100 calcium binding protein A11 (calgizzarin)
6286	S100P	S100 calcium binding protein P
629	CFB	complement factor B
6297	SALL2	sal-like 2 (Drosophila)
6303	SAT	spermidine/spermine N1-acetyltransferase
631	BFSP1	beaded filament structural protein 1, filensin
6322	SCML1	sex comb on midleg-like 1 (Drosophila)
6337	SCNN1A	sodium channel, nonvoltage-gated 1 alpha
6362	CCL18	chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated)
638	BIK	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)
6382	SDC1	syndecan 1
64065	PERP	PERP, TP53 apoptosis effector
64087	MCCC2	methylcrotonoyl-Coenzyme A carboxylase 2 (beta)
6415	SEPW1	selenoprotein W, 1
64167	LRAP	leukocyte-derived arginine aminopeptidase
64215	DNAJC1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 1
64225	ARL6IP2	ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein 2
646469	CKS1B	CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B
647133	LOC647133	similar to Ig heavy chain V-I region V35 precursor
64768	CENPP	centromere protein P
64769	C1orf149	chromosome 1 open reading frame 149
6478	SIAH2	seven in absentia homolog 2 (Drosophila)
648164	LOC648164	similar to germinal histone H4 gene
6484	ST3GAL4	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 4
64841	GNPNAT1	glucosamine-phosphate N-acetyltransferase 1
64856	VWA1	von Willebrand factor A domain containing 1
64928	MRPL14	mitochondrial ribosomal protein L14
65005	MRPL9	mitochondrial ribosomal protein L9

CLID	Symbol	Gene name
6506	SLC1A2	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2
6508	SLC4A3	solute carrier family 4, anion exchanger, member 3
65094	JMJD4	jumonji domain containing 4
651278	dJ222E13.2	serine hydrolase-like
65251	ZNF649	zinc finger protein 649
65265	C8orf33	chromosome 8 open reading frame 33
653156	LOC387753	similar to ribosomal protein L21 isoform 1
6532	SLC6A4	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4
653610	HIST2H2AA3	similar to Histone H2A.o (H2A/o) (H2A.2) (H2a-615)
653689	GSTT2	glutathione S-transferase theta 2
655	BMP7	bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1)
6590	SLPI	secretory leukocyte peptidase inhibitor
6634	SNRPD3	small nuclear ribonucleoprotein D3 polypeptide 18kDa
6659	SOX4	SRY (sex determining region Y)-box 4
6662	SOX9	SRY (sex determining region Y)-box 9 (campomelic dysplasia, autosomal sex-reversal)
6713	SQLE	squalene epoxidase
6720	SREBF1	sterol regulatory element binding transcription factor 1
6775	STAT4	signal transducer and activator of transcription 4
6804	STX1A	syntaxin 1A (brain)
6809	STX3	syntaxin 3
6890	TAP1	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)
6920	TCEA3	transcription elongation factor A (SII), 3
6926	TBX3	T-box 3 (ulnar mammary syndrome)
6934	TCF7L2	transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box)
7021	TFAP2B	transcription factor AP-2 beta (activating enhancer binding protein 2 beta)
7022	TFAP2C	transcription factor AP-2 gamma (activating enhancer binding protein 2 gamma)
7031	TFF1	trefoil factor 1 (breast cancer, estrogen-inducible sequence expressed in)
7033	TFF3	trefoil factor 3 (intestinal)
7035	TFPI	tissue factor pathway inhibitor (lipoprotein-associated coagulation inhibitor)
7048	TGFBR2	transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa)
7089	TLE2	transducin-like enhancer of split 2 (E(sp1) homolog, Drosophila)
7102	TSPAN7	tetraspanin 7
7163	TPD52	tumor protein D52
7164	TPD52L1	tumor protein D52-like 1
7227	TRPS1	trichorhinophalangeal syndrome I
7264	TSTA3	tissue specific transplantation antigen P35B
7289	TULP3	tubby like protein 3
7317	UBE1	ubiquitin-activating enzyme E1
7323	UBE2D3	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3 (UBC4/5 homolog, yeast)
7349	UCN	Urocortin

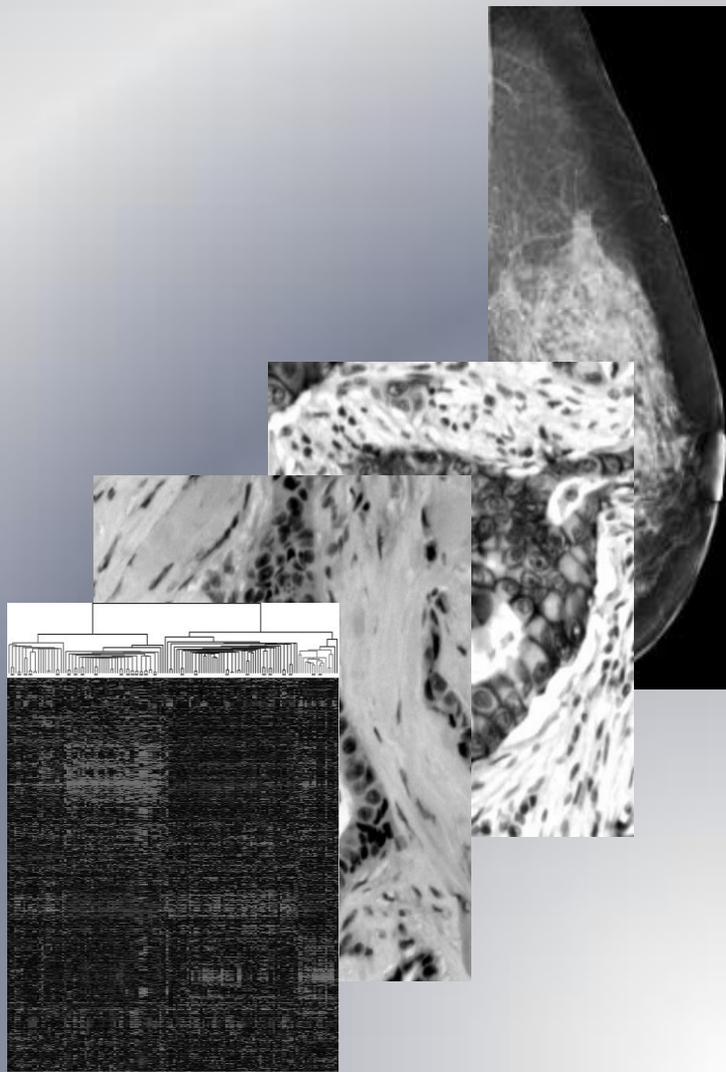
CLID	Symbol	Gene name
7364	UGT2B7	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B7
7374	UNG	uracil-DNA glycosylase
7409	VAV1	vav 1 oncogene
7450	VWF	von Willebrand factor
7473	WNT3	wingless-type MMTV integration site family, member 3
7474	WNT5A	wingless-type MMTV integration site family, member 5A
7494	XBP1	X-box binding protein 1
7553	ZNF7	zinc finger protein 7
767	CA8	carbonic anhydrase VIII
7718	ZNF165	zinc finger protein 165
7802	DNALI1	dynein, axonemal, light intermediate polypeptide 1
7805	LAPTM5	lysosomal associated multispinning membrane protein 5
7818	DAP3	death associated protein 3
7869	SEMA3B	sema domain, immunoglobulin domain, short basic domain, secreted, (semaphorin) 3B
79006	METRN	meteorin, glial cell differentiation regulator
79017	C7orf24	chromosome 7 open reading frame 24
79038	ZFYVE21	zinc finger, FYVE domain containing 21
79053	ALG8	asparagine-linked glycosylation 8 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> , alpha-1,3-glucosyltransferase)
79092	CARD14	caspase recruitment domain family, member 14
79144	C20orf149	chromosome 20 open reading frame 149
79152	FA2H	fatty acid 2-hydroxylase
79170	ATAD4	ATPase family, AAA domain containing 4
79173	MGC11271	hypothetical protein MGC11271
79412	KREMEN2	kringle containing transmembrane protein 2
79447	C16orf53	chromosome 16 open reading frame 53
79570	FAM77C	family with sequence similarity 77, member C
79584	FLJ12684	hypothetical protein FLJ12684
79669	C3orf52	chromosome 3 open reading frame 52
79710	MORC4	MORC family CW-type zinc finger 4
79713	TMEM149	transmembrane protein 149
79745	RSNL2	restin-like 2
79746	ECHDC3	enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 3
79781	IQCA	IQ motif containing with AAA domain
7979	SHFM1	split hand/foot malformation (ectrodactyly) type 1
79818	ZNF552	zinc finger protein 552
79875	THSD4	thrombospondin, type I, domain containing 4
7991	TUSC3	tumor suppressor candidate 3
79921	TCEAL4	transcription elongation factor A (SII)-like 4
79932	KIAA0319L	KIAA0319-like
79990	PLEKHH3	pleckstrin homology domain containing, family H (with MyTH4 domain) member 3

CLID	Symbol	Gene name
80004	RBM35B	RNA binding motif protein 35B
80095	ZNF606	zinc finger protein 606
801	CALM1	calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta)
80221	FLJ20920	hypothetical protein FLJ20920
80237	ELL3	elongation factor RNA polymerase II-like 3
80318	GKAP1	G kinase anchoring protein 1
80319	CXXC4	CXXC finger 4
80757	TMEM121	transmembrane protein 121
80774	LIMD2	LIM domain containing 2
8100	IFT88	intraflagellar transport 88 homolog (Chlamydomonas)
81035	COLEC12	collectin sub-family member 12
81558	FAM117A	family with sequence similarity 117, member A
81569	ACTL8	actin-like 8
8165	AKAP1	A kinase (PRKA) anchor protein 1
81839	VANGL1	vang-like 1 (van gogh, Drosophila)
8208	CHAF1B	chromatin assembly factor 1, subunit B (p60)
8228	PNPLA4	patatin-like phospholipase domain containing 4
8309	ACOX2	acyl-Coenzyme A oxidase 2, branched chain
8323	FZD6	frizzled homolog 6 (Drosophila)
8330	HIST1H2AK	histone 1, H2ak
8334	HIST1H2AC	histone 1, H2ac
834	CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)
8340	HIST1H2BL	histone 1, H2bl
8343	HIST1H2BF	histone 1, H2bf
8344	HIST1H2BE	histone 1, H2be
8346	HIST1H2BI	histone 1, H2bi
83464	APH1B	anterior pharynx defective 1 homolog B (C. elegans)
8347	HIST1H2BC	histone 1, H2bc
8348	HIST1H2BO	histone 1, H2bo
8349	HIST2H2BE	histone 2, H2be
83541	C20orf55	chromosome 20 open reading frame 55
83543	C9orf58	chromosome 9 open reading frame 58
836	CASP3	caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase
83641	FAM107B	family with sequence similarity 107, member B
83752	LONPL	peroxisomal LON protease like
83940	TATDN1	TatD DNase domain containing 1
84080	C16orf48	chromosome 16 open reading frame 48
84138	SLC7A6	solute carrier family 7, member 6 opposite strand
8417	STX7	syntaxin 7
84189	SLITRK6	SLIT and NTRK-like family, member 6

CLID	Symbol	Gene name
84246	MED10	mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 10 homolog (NUT2, <i>S. cerevisiae</i> )
84262	MGC10911	hypothetical protein MGC10911
84269	CHCHD5	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 5
84299	C17orf37	chromosome 17 open reading frame 37
84419	C15orf48	chromosome 15 open reading frame 48
84440	RAB11FIP4	RAB11 family interacting protein 4 (class II)
84513	PPAPDC1B	phosphatidic acid phosphatase type 2 domain containing 1B
8470	SORBS2	sorbin and SH3 domain containing 2
84705	GTPBP3	GTP binding protein 3 (mitochondrial)
84706	GPT2	glutamic pyruvate transaminase (alanine aminotransferase) 2
84708	LNX1	ligand of numb-protein X 1
8476	CDC42BPA	CDC42 binding protein kinase alpha (DMPK-like)
84866	TMEM25	transmembrane protein 25
84886	C1orf198	chromosome 1 open reading frame 198
84900	TMEM118	transmembrane protein 118
84952	CGNL1	cingulin-like 1
84988	PPP1R16A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 16A
8500	PPFIA1	protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide, interacting protein, alpha 1
85014	TMEM141	transmembrane protein 141
8507	ENC1	ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain)
8537	BCAS1	breast carcinoma amplified sequence 1
85437	ZCRB1	zinc finger CCHC-type and RNA binding motif 1
8614	STC2	stanniocalcin 2
8685	MARCO	macrophage receptor with collagenous structure
875	CBS	cystathionine-beta-synthase
8848	TSC22D1	TSC22 domain family, member 1
8884	SLC5A6	solute carrier family 5 (sodium-dependent vitamin transporter), member 6
8914	TIMELESS	timeless homolog ( <i>Drosophila</i> )
8942	KYNU	kynureninase (L-kynurenine hydrolase)
8970	HIST1H2BJ	histone 1, H2bj
8991	SELENBP1	selenium binding protein 1
9	NAT1	N-acetyltransferase 1 (arylamine N-acetyltransferase)
90355	LOC90355	hypothetical gene supported by AF038182; BC009203
9111	NMI	N-myc (and STAT) interactor
9112	MTA1	metastasis associated 1
915	CD3D	CD3d molecule, delta (CD3-TCR complex)
91612	CHURC1	churchill domain containing 1
9168	TMSB10	thymosin, beta 10
91775	FAM55C	family with sequence similarity 55, member C
9179	TAF6	adaptor-related protein complex 4, mu 1 subunit

CLID	Symbol	Gene name
9185	REPS2	RALBP1 associated Eps domain containing 2
92291	CAPN13	calpain 13
9270	ITGB1BP1	integrin beta 1 binding protein 1
92840	REEP6	receptor accessory protein 6
9289	GPR56	G protein-coupled receptor 56
931	MS4A1	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1
9343	EFTUD2	elongation factor Tu GTP binding domain containing 2
9452	ITM2A	integral membrane protein 2 <sup>a</sup>
948	CD36	CD36 molecule (thrombospondin receptor)
952	CD38	CD38 molecule
9541	CIR	CBF1 interacting corepressor
961	CD47	CD47 molecule
9618	TRAF4	TNF receptor-associated factor 4
9620	CELSR1	cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 1 (flamingo homolog, Drosophila)
9636	ISG15	ISG15 ubiquitin-like modifier
965	CD58	CD58 molecule
973	CD79A	CD79a molecule, immunoglobulin-associated alpha
9823	ARMCX2	armadillo repeat containing, X-linked 2
9839	ZFHX1B	zinc finger homeobox 1b
987	LRBA	LPS-responsive vesicle trafficking, beach and anchor containing
9910	RABGAP1L	RAB GTPase activating protein 1-like
9914	KIAA0703	KIAA0703 gene product
9915	ARNT2	aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator 2
9919	KIAA0310	KIAA0310
9926	LPGAT1	lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1
999	CDH1	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)

# RESULTADOS



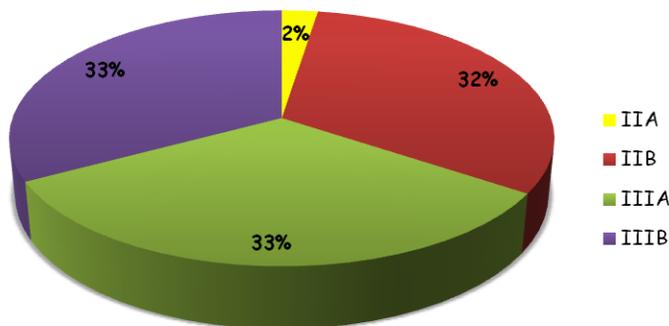


#### 4.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS SUJETOS DEL ESTUDIO.

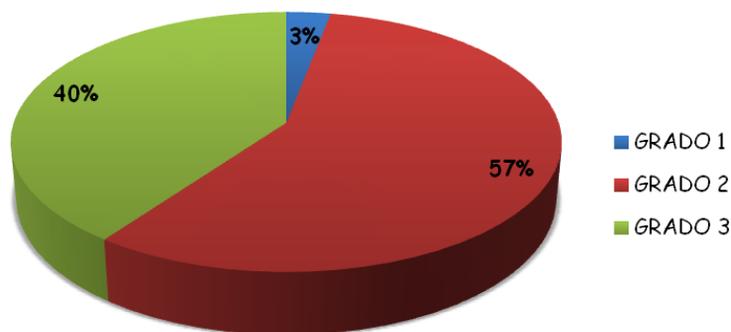
Un total de 227 mujeres fueron incluidas para los estudios que se presentan en esta tesis doctoral. De las 227 pacientes incluidas en el trabajo de estas, 212 fueron elegibles (biopsia previa suficiente, tratamiento previsto, cirugía según protocolo), mientras que 15 no fueron elegibles, por rechazar cirugía (2 pacientes), no disponerse de tumor suficientemente representativo para inmunohistoquímica en la biopsia previa (10 pacientes), demora injustificada en el tratamiento quirúrgico tras la neoadyuvancia (1 paciente), recibir por error un tratamiento antitumoral diferente (herceptin+docetaxel, 1 caso) o fallecer a causa del tratamiento antes de la cirugía (1 paciente). En la población elegible, 111 enfermas fueron tratadas con adriamicina y 101 fueron tratadas con docetaxel.

La media de edad al diagnóstico fue de **52,24** ( $\pm 12,9$ ) años. El diámetro promedio tumoral fue de **6,08** ( $\pm 2,53$ ) cm.

La distribución de los tumores, atendiendo al estadio tumoral y el grado histológico, se representa en los siguientes gráficos. Se observa que en nuestra población los tumores mayoritarios fueron del estadio **IIB**, **IIIA** y **IIIB** y de **grado histológico tipo dos**.



**Gráfico 6.** Clasificación de los tumores del estudio según el *American Joint Committee on Cancer Staging*.



**Gráfico 7.** Clasificación de los tumores del estudio en función del grado histológico.

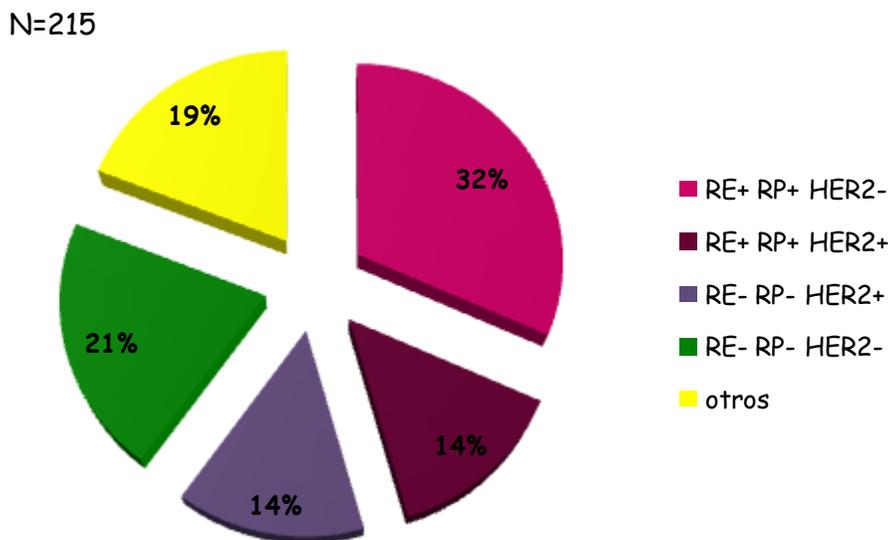
Respecto al grado de proliferación celular, el porcentaje promedio de células que sobreexpresan Ki67 fue del **36%**. La proporción de tumores con Ki67>25% (alto grado de proliferación celular) fue del **53%**.

En cuanto al estatus de los receptores hormonales encontramos que un **60%** de los tumores son positivos para el RE y el **51%** para el RP. Por otro lado, el **32%** de los tumores fueron HER2<sup>20</sup> positivos. Además, encontramos que un **21%** de los tumores fueron **triple negativos**.

	+	-
RE	130	87
RP	111	106
HER2	69	146

**Tabla 19.** Número de tumores con IHQ de RE, RP y HER positivos y negativos.

En el gráfico 8 se representan la distribución de los tumores en función del estatus de los receptores hormonales y HER2.



**Gráfico 8.**

<sup>20</sup> Se considera un tumor HER2 positivo cuando la IHQ es positiva en tres puntos y negativo cuando la tinción es negativa o positiva en un punto. Aquellos receptores con dos puntos se consideran "dudosos" y se catalogan como positivos o negativos atendiendo al resultado del FISH.

## 4.2 EFICACIA DE LOS TRATAMIENTOS.

Ambas ramas de tratamiento mostraron una eficacia global parecida. La tasa de repuestas es muy similar para ambos fármacos tanto si se evalúa la respuesta atendiendo a la clasificación de Symmans o según los criterios de Miller y Payne.

Además, se comprobó que la distribución de pacientes era homogénea en ambos grupos de tratamientos, no habiendo diferencias significativas en cuanto a la edad, grado histológico, ki67, tamaño del tumor y estatus de los receptores hormonales y HER2.

Atendiendo a la **clasificación de Symmans**, encontramos que la tasa de respuestas (pacientes con respuestas RBC-0 y RBC-I) se sitúa en torno al **20%**. En la tabla 20 se especifican el número y porcentaje de respuestas para ambos fármacos. Como se puede observar, la distribución de repuestas es similar en ambas ramas de tratamiento.

	ADM		TXT	
	n	%	n	%
<b>RBC-0</b>	13	12%	10	10%
<b>RBC-I</b>	8	7%	10	10%
<b>RBC-II</b>	45	41%	48	48%
<b>RBC-III</b>	45	41%	33	33%

Tabla 20. Respuestas según criterios de Symmans.

	ADM		TXT	
	n	%	n	%
<b>grado 1</b>	22	20%	19	19%
<b>grado 2</b>	21	19%	10	10%
<b>grado 3</b>	36	32%	43	43%
<b>grado 4</b>	16	14%	14	14%
<b>grado 5</b>	16	14%	15	15%

Tabla 21. Respuestas según criterios de Miller y Payne.

Si evaluamos las repuestas de las pacientes según la clasificación de **Miller y Payne**, encontramos que la tasa de respuestas<sup>21</sup> es mayor que en el caso anterior debido a que estos criterios son menos estrictos. Como se observa en la tabla 21, el porcentaje de respuestas fue del **28%** para las pacientes tratadas con adriamicina y del **29%** para las pacientes tratadas con docetaxel.

<sup>21</sup> Se considera que las pacientes que responden al tratamiento son aquellas con respuestas de grado 4 y 5 según la clasificación de Miller y Payne.

### 4.3 ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS DE GSTM1, GSTT1 Y GSTP1 Y SU POSIBLE VALOR PREDICTIVO DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO.

#### 4.3.1 ESTUDIO DEL VALOR PREDICTIVO DE LA DELECIÓN HOMOCIGOTA DE LOS GENES GSTM1 Y GSTT1.

Para este estudio se analizaron 171 muestras de DNA de **sangre**. De las 171 pacientes incluidas, 90 (52%) fueron tratadas con adriamicina y 81 (48%) con docetaxel. La mayoría de las pacientes incluidas en este estudio eran de nacionalidad española. Menos de un 5% de las pacientes incluidas procedían de otros países, entre los que se encuentran Marruecos, estados de Europa del Este y algunos países de Sudamérica.

La proporción de individuos con la delección homocigota para los genes **GSTM1** y **GSTT1** fue del **48,53%** y **19,29%** respectivamente. En este subgrupo de 171 pacientes no se encontró ninguna asociación entre la delección homocigota de estos genes y el grado histológico, edad, grado de proliferación celular (ki67), tamaño tumoral, estatus de receptores hormonales y del receptor de HER2. Del mismo modo, tampoco se encontró ninguna asociación, estadísticamente significativa, entre la respuesta al tratamiento y las variables anteriormente mencionadas, si bien cabe destacar que las pacientes HER2 positivas tienden a tener mejores respuestas ya que el 38% de ellas responden a ambos tratamientos mientras que dentro del grupo de las HER2 negativas sólo responde el 22% ( $p=0,09$ ).

La **delección** del gen **GSTM1** es más frecuente en los pacientes **respondedores a adriamicina** puesto que el 38% de los pacientes con delección homocigota responden<sup>22</sup> a este tratamiento frente al 24% de los pacientes que presentan el gen. Esta tendencia no se observa en los pacientes tratados con docetaxel. Por otro lado, se observa que el 32% de los pacientes con la delección homocigota de **GSTT1** responden a la adriamicina frente al 28% de los pacientes que presentan al menos una copia del gen. Sin embargo, en la rama del docetaxel el 21% de las mujeres con delección homocigota de **GSTT1** responden frente al 36% de las pacientes que presentan al menos una copia del gen. Es decir, la tendencia es inversa.

Si tenemos en cuenta el genotipado de ambos genes, observamos que los pacientes que presentan una **delección homocigota de al menos uno de los dos genes** responden mejor a la **adriamicina** que las pacientes que presentan ambos genes (gráfico 9). No obstante, esta tendencia no es estadísticamente significativa, si bien en la rama de

---

<sup>22</sup> En este estudio se considera pacientes respondedores aquellos con respuestas de grado 4 y 5 según la clasificación de Miller y Payne (45) y resistentes aquellos con respuestas de grado 1 y 2.

pacientes tratados con docetaxel observamos un comportamiento distinto ya que la tasa de respuestas es mayor en pacientes sin delección (tabla 22). Considerando únicamente los pacientes con respuestas de grados 1 (respuestas completas) y 5 (enfermedad progresiva) según la clasificación de Miller y Payne, observamos que la delección homocigota de al menos uno de los dos genes se asocia de forma significativa a las respuestas completas a adriamicina ( $p=0,032$ ;  $RR=3,1$ ;  $IC=1,09-9,376$ ) (gráfico 10). Al igual que antes, esta asociación no se da en pacientes tratados con docetaxel.

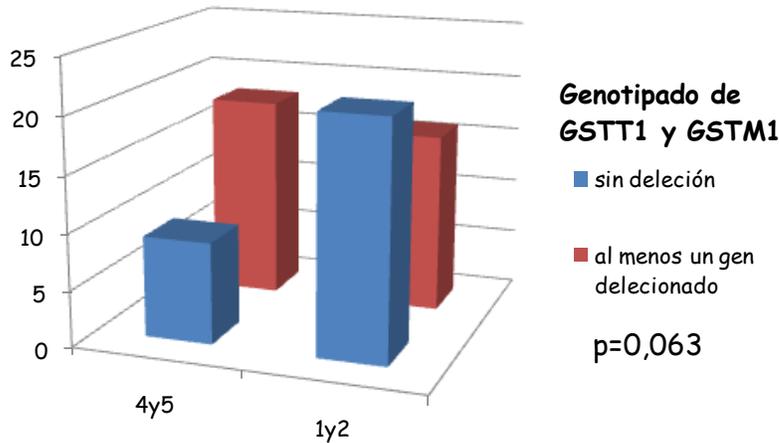


Gráfico 9. Respuestas a adriamicina en función del genotipado de los genes GSTT1 y GSTM1

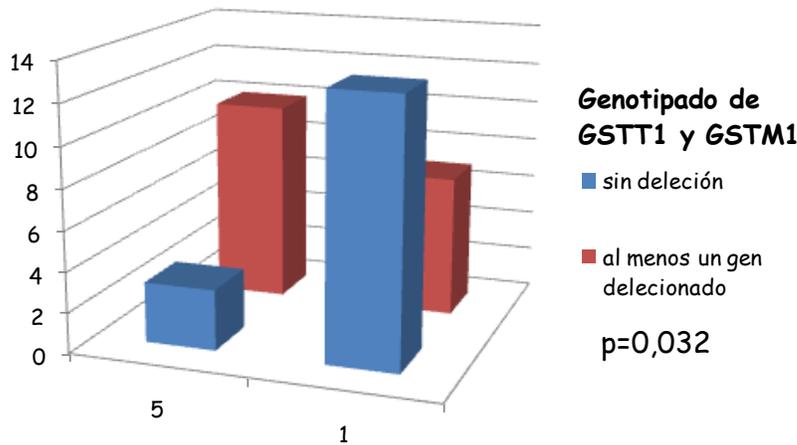


Gráfico 10. Respuestas de grado 1 y 5 según criterios de Miller y Payne en pacientes tratadas con adriamicina y genotipado de GSTM1 y GSTT1.

ADM	genotipo	4 y 5	1 y 2
ADM	M1-/- o T1-/-	18	16
	sin delección	9	21
TXT	M1-/- o T1-/-	16	14
	sin delección	11	6

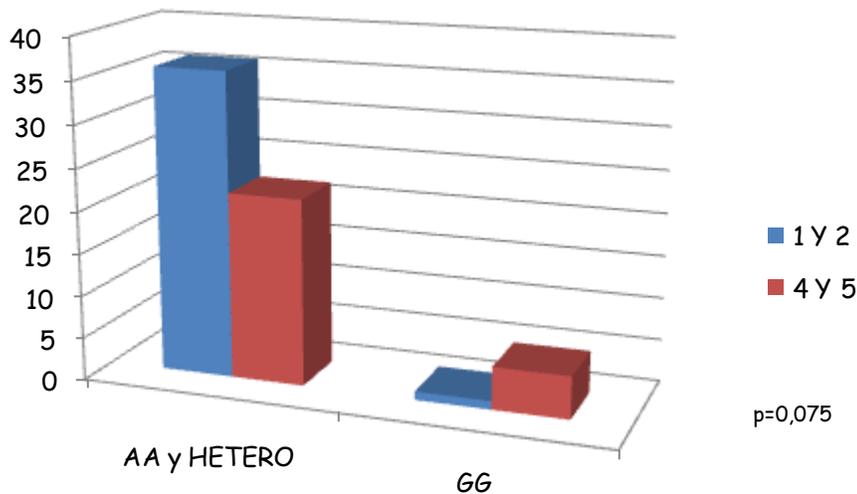
Tabla 22 Número de pacientes con respondedores (4 y 5) y resistentes (1 y 2) con delección homocigota de alguno de los dos genes y sin delección

### 4.3.2 ESTUDIO DEL VALOR PREDICTIVO DEL SNP A342G EN EL GEN GSTP1

Respecto al genotipado, en sangre, del **SNP A342G** del gen **GSTP1** encontramos que el **48%** de los individuos son homocigotos para el alelo **A**, el **13%** son homocigotos para el alelo **G** y el **39%** de los individuos son **heterocigotos**.

No hemos encontrado ninguna asociación entre el genotipado del SNP A342G y las variables clínicopatológicas ni el genotipado de **GSTT1** y **GSTM1**.

Dentro del grupo de pacientes tratadas con adriamicina, observamos que las pacientes con genotipos **GG** son más propensas a tener mejores respuestas. En cualquier caso esta asociación no llega a ser estadísticamente significativa. Además, el número de individuos **GG** es muy escaso (gráfico 11). En el grupo de pacientes tratadas con docetaxel no observamos diferencias en la tasa de respuestas entre los distintos genotipos.



**Gráfico 11.** Respuestas a adriamicina en función del genotipado de **GSTP1**

### 4.3.3 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES GSTT1, GSTM1 Y GSTP1 EN TEJIDO MAMARIO

Para los estudios de expresión de los genes del enzima **GST** se emplearon 96 tumores de las 171 pacientes estudiadas.

En general, podemos señalar que la expresión de los genes de **GST** está muy disminuida en el tejido mamario. Así, encontramos que la media de expresión de

**GSTM1** es de 0,00, la de **GSTT1** de -0,19 y la de **GSTP1** de -0,17. Todo esto parece indicar que la mama no es un tejido donde **GST** ejerza su función. Además, se sabe que **GST** actúa fundamentalmente a nivel hepático.

Respecto a **GSTM1**, hemos visto que su expresión, en la mama, es similar en los individuos quimiosensibles y resistentes.

En cuanto al gen **GSTT1** observamos que la media de expresión del gen es ligeramente mayor en individuos respondedores (0,233) a adriamicina respecto de los resistentes (-0,091). Esta tendencia es contraria a los resultados que obtenemos atendiendo al genotipado. En el grupo de docetaxel las medias de expresión de ambos grupos son muy similares. Además, como cabe esperar, encontramos que todos los pacientes con delección tienen valores de expresión negativos.

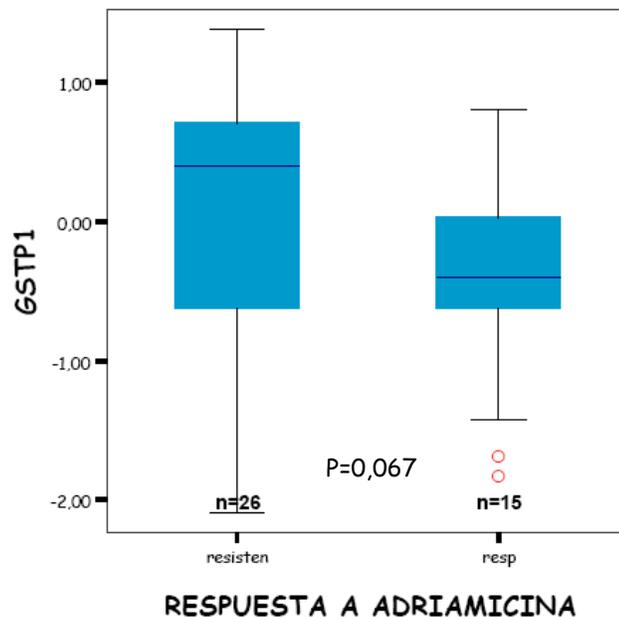
Respecto al gen **GSTP1** encontramos que la media de expresión del gen es mayor en los individuos AA, seguido de los heterocigotos y menor en individuos GG (tabla 23). Además, observamos que la media de expresión de **GSTP1** es menor en pacientes **respondedores** a adriamicina ( $p=0,067$ ) respecto de los individuos resistentes (gráfico 12) sin variar en los pacientes tratados con docetaxel.

Variable	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
AA	-2,180	1,890	0,007	1,045
GG	-2,250	1,310	-0,435	0,925
HETERO	-2,09	2,29	-0,15	1,08

Tabla 23. Expresión del gen **GSTP1** en función del genotipo.

Variable	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
RESP	15	-1,840	0,810	-0,453	0,730
RESIS	26	-2,090	1,390	0,078	0,937

Tabla 24. Expresión de **GSTP1** en tumores sensibles (RESP) y resistentes (RESIS) a adriamicina.



**Gráfico 12.** Expresión en la mama del gen *GSTP1* en individuos resistentes (Grado 1 y 2 de Miller Payne) y en pacientes sensibles a adriamicina (grados 4 y 5 de Miller y Payne).

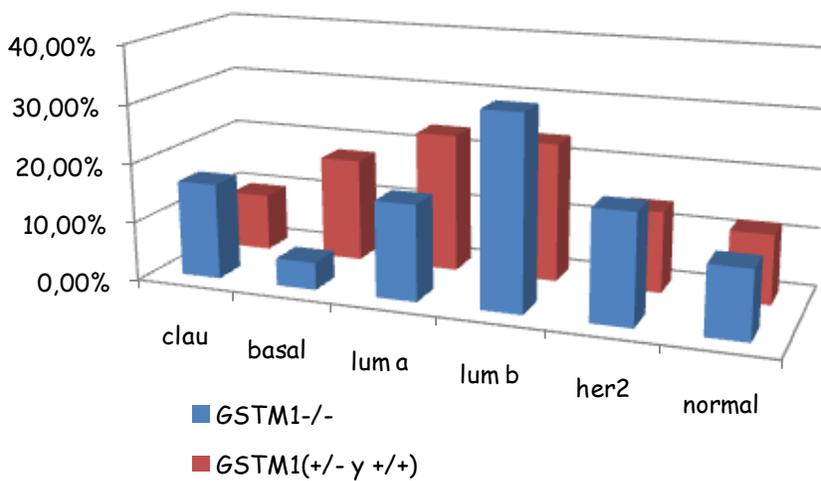
#### 4.3.4 CORRELACIÓN ENTRE EL GENOTIPO Y EL SUBTIPO GENÓMICO

Atendiendo a nuestros resultados, aproximadamente el 12% de la población diagnosticada de CLAM desarrolla un tumor basal. No obstante, este porcentaje desciende a un 5% en los pacientes que presentan una delección homocigota de *GSTM1*, mientras que el 18% de los individuos con al menos una copia del gen presentan este tipo tumor (gráfico 13). En otras palabras, las pacientes que presentan una **delección homocigota** del gen *GSTM1* tienen **menor riesgo** (RR=0.863; 95% IC=0,74-0,99) de desarrollar **tumores del tipo basal** que aquellas con al menos una copia del gen (p=0,060).

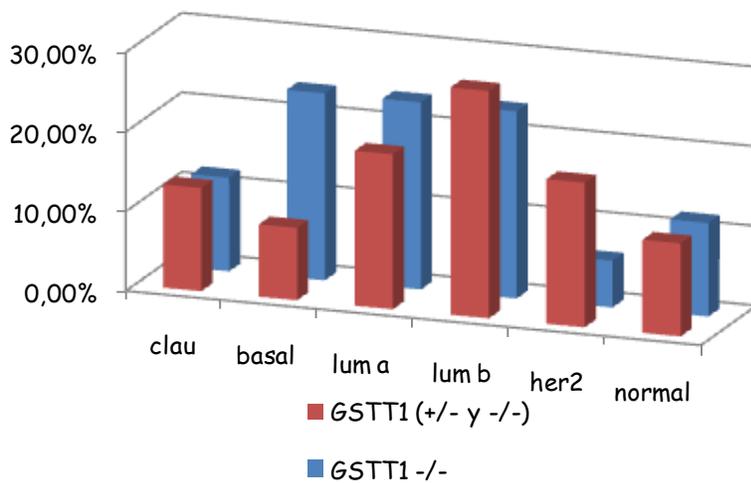
Por el contrario, un 24% de las pacientes con delección homocigota de *GSTT1* desarrolla un tumor **basal** frente al 9% de las pacientes que tienen al menos una copia del gen. Del mismo modo, sólo un 5% de las pacientes con delección homocigota del *GSTT1* desarrolla un tumor de tipo *Her2-enriched* frente al 18% de las pacientes que tienen el gen (gráfico 14).

Subtipo	total	GSTM1-/- (%)	GSTT1-/- (%)
clau	12 (13%)	7 (16%)	2 (12%)
basal	11 (12%)	2 (5%)	4 (24%)
lum a	19 (20%)	7 (16%)	4 (24%)
lum b	26 (28%)	14 (33%)	4 (24%)
her2	15 (16%)	8 (19%)	1 (6%)
normal	11 (12%)	5 (12%)	2 (12%)

**Tabla 25.** Relación entre la delección homocigota de GSTT1 y GSTM1 en sangre y el subtipo tumoral.



**Gráfico 13.** Relación de los subtipos genómicos en los individuos con delección homocigota de GSTM1 (azul) y las pacientes con al menos una copia del gen (rojo).



**Gráfico 14.** Relación de los subtipos genómicos en los individuos con delección homocigota de GSTT1 (azul) y las pacientes con al menos una copia del gen (rojo).

Respecto al genotipado del SNP A342G de GSP1 (en sangre), en el gráfico 15 se representan los subtipos tumorales de los individuos AA, GG y heterocigotos.

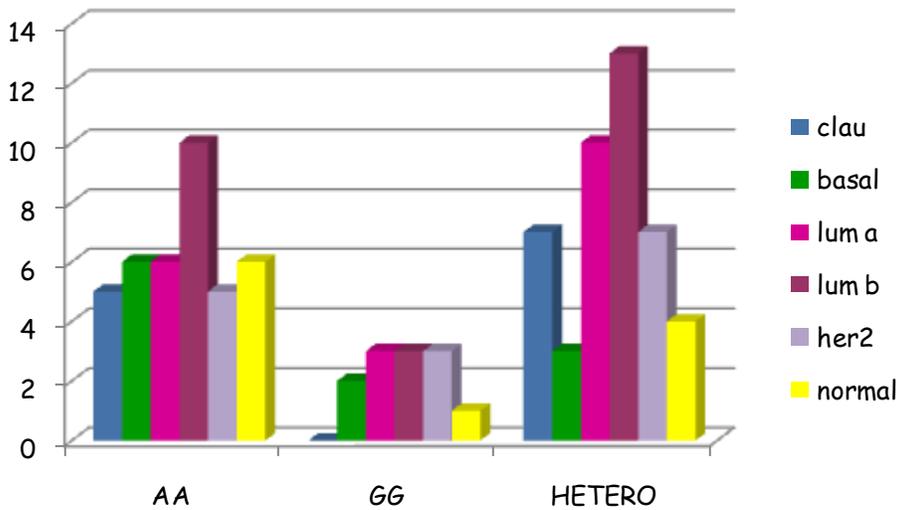


Gráfico 15.

#### 4.3.5 CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE *GSTM1*, *GSTT1* Y *GSTP1* Y EL SUBTIPO GENÓMICO

Hemos observado que la expresión en el tumor de *GSTM1* y de *GSTT1* no varía mucho en función del subtipo aunque en ambos casos se observa que los tumores basales presentan menores valores de expresión.

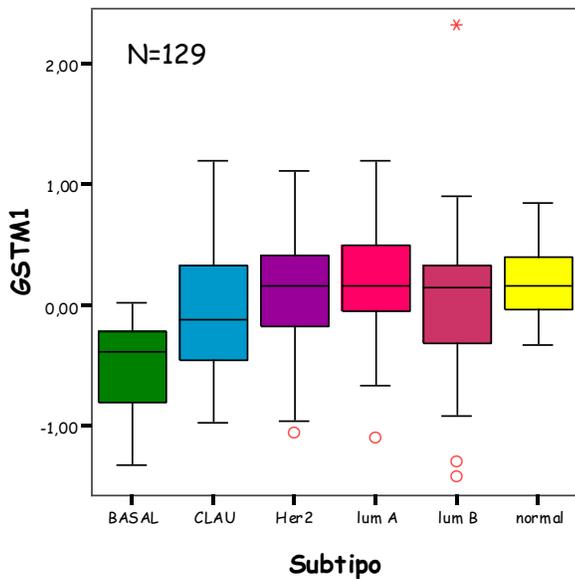


Gráfico 16. Valores de expresión de *GSTM1* y subtipo genómico.

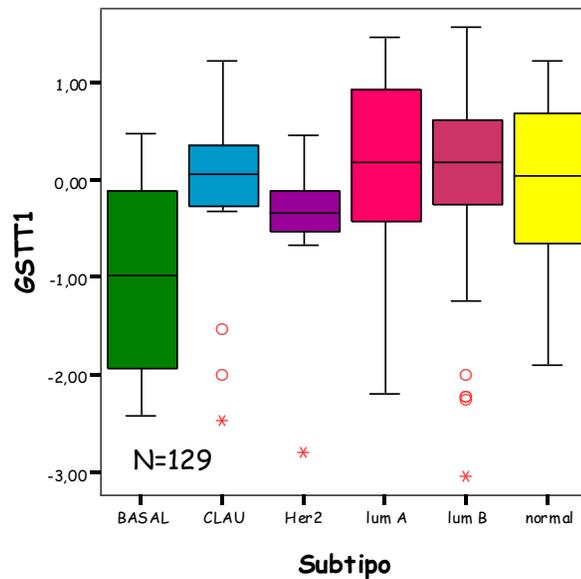
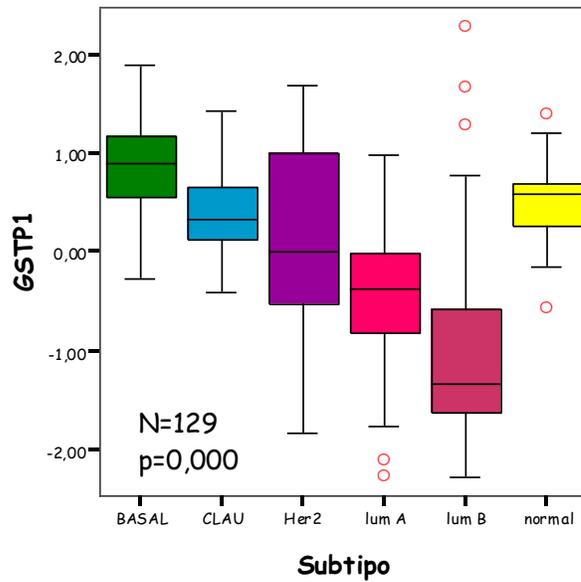


Gráfico 17. Valores de expresión de *GSTT1* y subtipo genómico.

En cambio, observamos que la expresión de **GSTP1** varía considerablemente en función del subtipo genómico siendo inferior en tumores luminales.

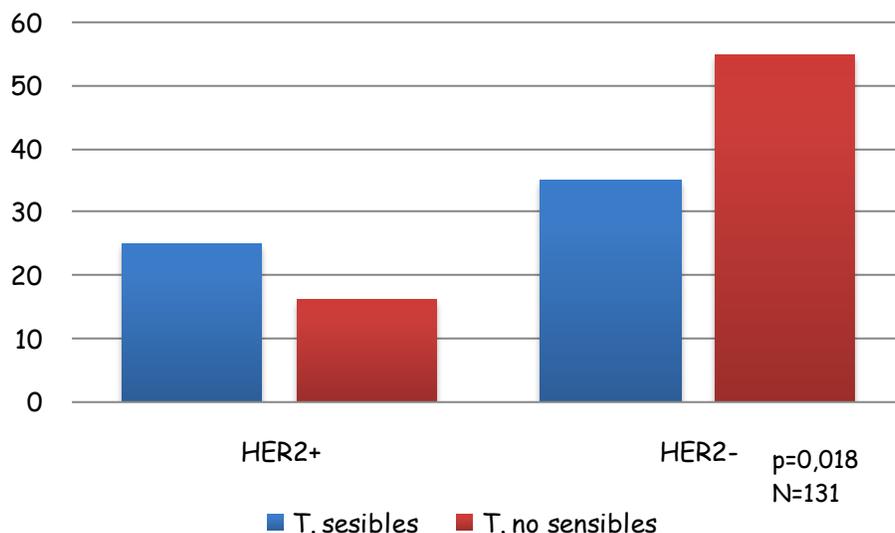


**Gráfico 18.** Valores de expresión de **GSTP1** y subtipo genómico.

#### 4.4 ESTUDIO DEL POSIBLE VALOR DE HER2 COMO MARCADOR DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO

Como se ha mencionado anteriormente, aproximadamente, el **32%** de los tumores evaluados en este estudio son **HER2<sup>23</sup>** positivos.

Hemos observado que, en general, los tumores **HER2** positivos responden mejor a ambos fármacos, tanto si se evalúa la respuesta en siguiendo los criterios de Symmans o de Miller y Payne. En el gráfico 19 se muestran el número de tumores sensibles<sup>24</sup> y resistentes<sup>25</sup> según criterios de Miller y Payne en función del estatus del receptor HER2. Se observa que los tumores **HER2 positivos son más sensibles** a quimioterapia que los HER2 negativos ( $p=0,018$ ).



**Gráfico 19.** Número de tumores HER2 positivos y negativos en tumores quimiosensibles y resistentes.

Si estratificamos por tratamiento y comparamos el número de tumores sensibles vs los tumores resistentes observamos que los tumores **HER2** positivos tienden a tener mejores respuestas tanto a la adriamicina ( $p=0,091$ ) como al docetaxel ( $p=0,078$ ) aunque esta asociación no es estadísticamente significativa.

<sup>23</sup> Se considera un tumor HER2 positivo cuando la IHQ es positiva en tres puntos y negativo cuando la tinción es negativa o es positiva en un punto. Aquellos receptores con dos puntos se consideran "dudosos" y se catalogan como positivos o negativos atendiendo al resultado del FISH.

<sup>24</sup> Consideramos tumores sensibles aquellos con respuestas 4 y 5 de Miller y Payne

<sup>25</sup> Consideramos tumores resistentes aquellos con repuestas 1 y 2 según criterios de Miller y Payne

En la tabla 26 se resumen las respuestas de los tumores **HER2** positivos y negativos según criterios de de Miller y Payne.

TTO	RESP	HER2+	HER2-
ADM	1	6 (15%)	15 (21%)
	2	5 (13%)	16 (23%)
	3	14 (35%)	22 (31%)
	4	9 (23%)	7 (10%)
	5	5 (13%)	10 (14%)
TXT	1	3 (10%)	16 (22%)
	2	2 (6%)	8 (11%)
	3	13 (44%)	29 (40%)
	4	5 (17%)	9 (12%)
	5	6 (20%)	9 (12%)

**Tabla 26.** Respuestas según criterios de Miller y Payne en tumores HER2 positivos y negativos

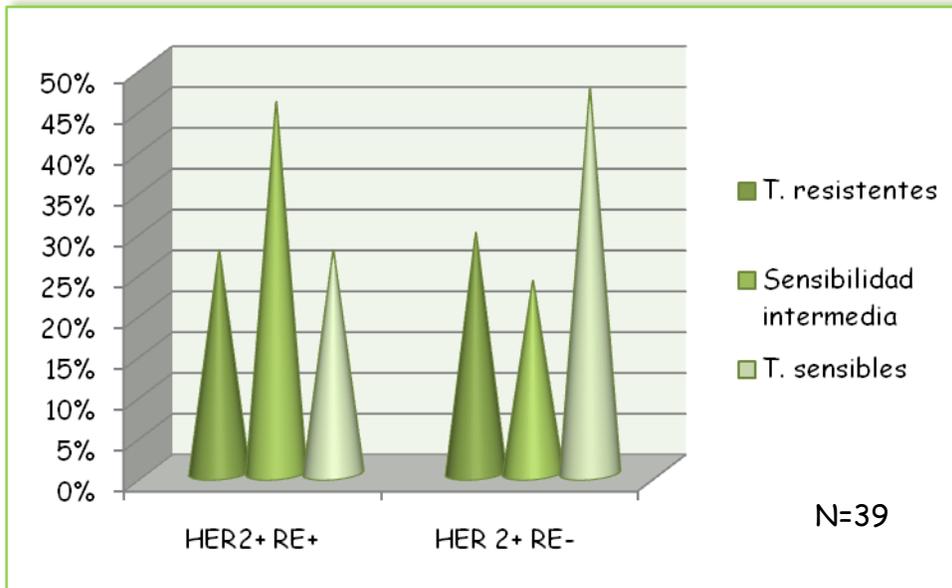
Si consideramos el estatus del RE, encontramos que los tumores **HER2 positivos RE negativos** responden mejor que aquellos que son RE positivos. Esto ocurre en ambas ramas de tratamiento, aunque es más llamativo en la rama de **docetaxel** en la que observamos que la positividad para el RE se asocia significativamente a respuestas 4 y 5 de Miller y Payne ( $p=0,001$ ) dentro del grupo de tumores HER2 positivos. No obstante, el número de casos es pequeño.

TTO	RESP	HER2+	HER2+ RE+	HER 2+ RE-
ADM	1	6 (15%)	4 (18%)	2 (12%)
	2	5 (13%)	2 (9%)	3 (17%)
	3	14 (35%)	10 (45%)	4 (23%)
	4	9 (23%)	4 (18%)	5 (29%)
	5	5 (13%)	2 (9%)	3 (18%)
TXT	1	3 (10%)	2 (18%)	1 (5%)
	2	2 (6%)	2 (18%)	0
	3	13 (44%)	7 (63%)	6 (33%)
	4	5 (17%)	0	5 (28%)
	5	6 (20%)	0	6 (33%)

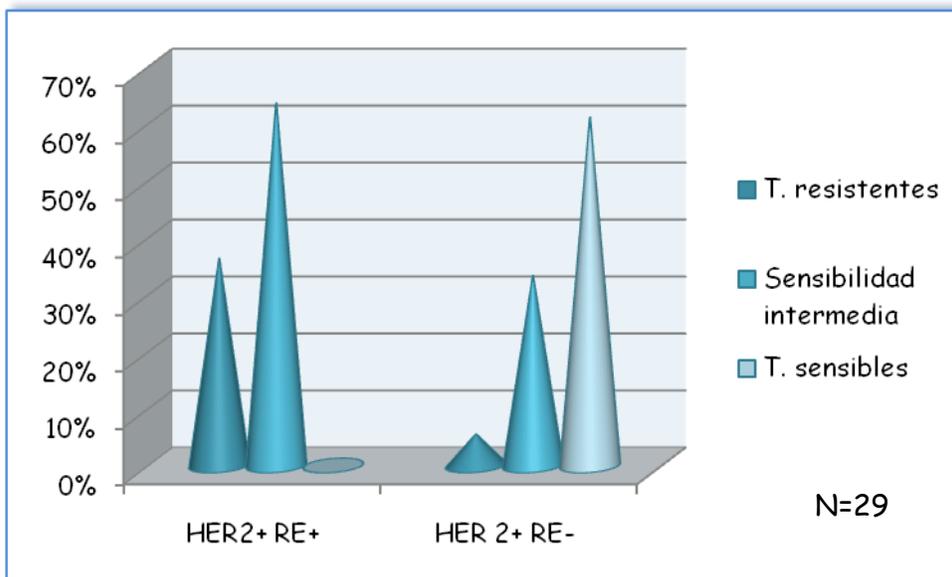
**Tabla 27.** Respuestas según criterios de Miller y Payne en tumores HER2+ HER2+RE+ y HER2+RE-

En los gráficos 19 y 20 se representa el porcentaje de tumores sensibles (respuestas de grado 4 y 5), resistentes (respuestas de grado 1 y 2) y los tumores de sensibilidad

intermedia (respuestas de grado 3) según criterios de Miller y Payne para ambas ramas de tratamiento.



**Gráfico 19.** Porcentaje de tumores HER2+ RE+ y HER2+ RE- resistentes, sensibles y con sensibilidad intermedia a la adriamicina.



**Gráfico 20.** Porcentaje de tumores HER2+ RE+ y HER2+ RE- resistentes, sensibles y con sensibilidad intermedia al docetaxel.

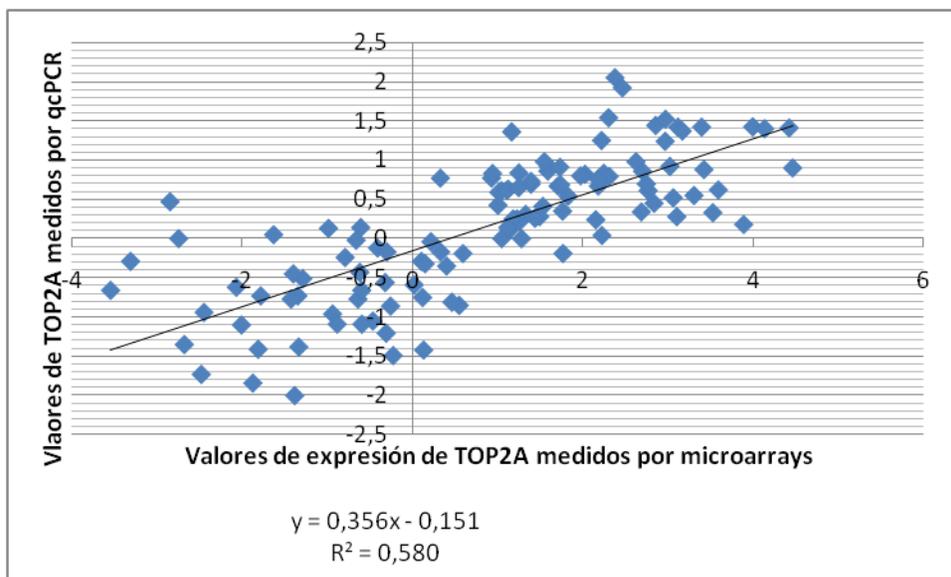
## 4.5 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE TOP2A Y SU POSIBLE VALOR PREDICTIVO DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO.

### 4.5.1 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE TOP2A POR *MICROARRAYS* Y PCR CUANTITATIVA

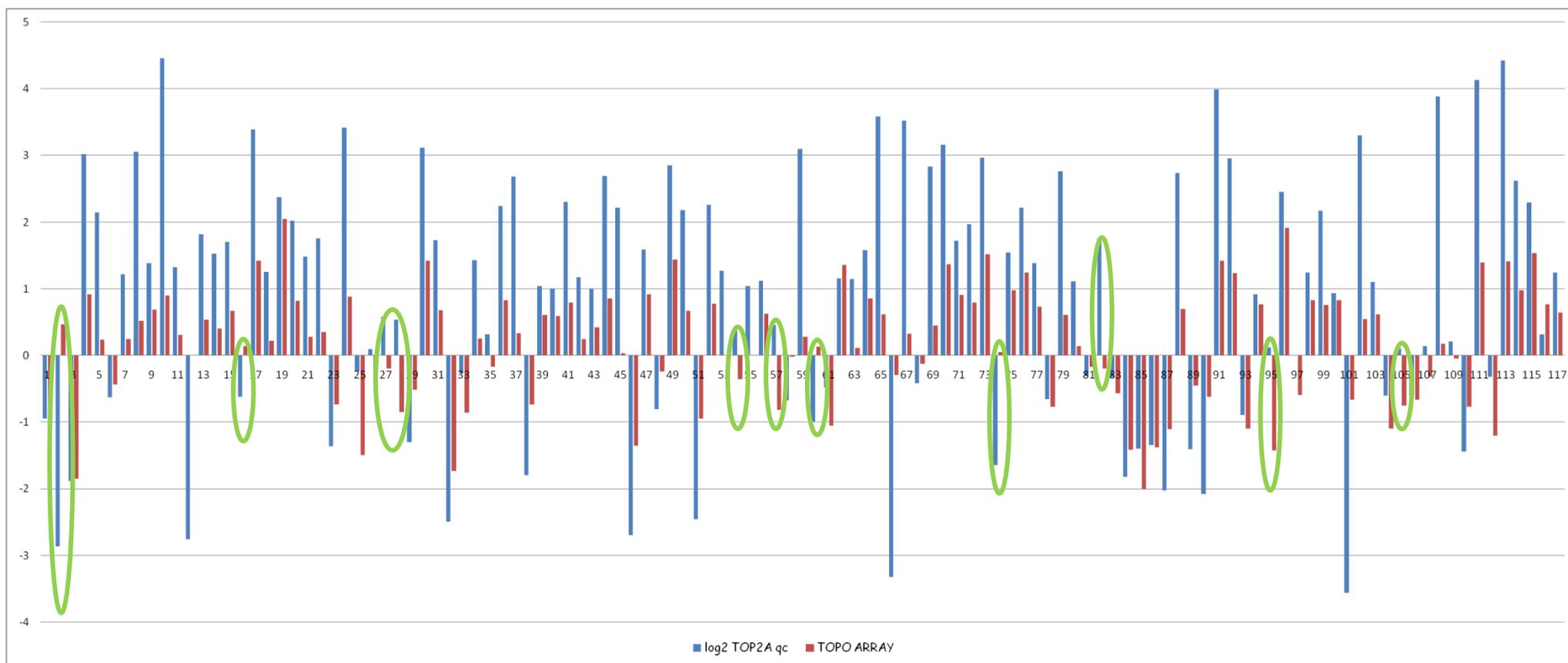
La expresión de **TOP2A** se estudió mediante **PCR cuantitativa** en **142** tumores de estos **117** fueron estudiados mediante *microarrays*.

Como se observa en los gráficos 21 y 22 existe una cierta correlación entre los valores de expresión de TOP2A medidos por *microarrays* y por PCR cuantitativa. No obstante, observamos que el rango de valores de TOP2A medidos por PCR cuantitativa es mucho mayor que en el caso de los valores de expresión del *microarray*. Probablemente, esto pueda ser debido a que se sature la unión del cRNA a la sonda en casos de sobreexpresión o bien, porque la eficiencia de la PCR cuantitativa se vea influenciada cuando la expresión de **TOP2A** esté muy disminuida o aumentada de forma que la eficiencia para la amplificación **TOP2A** y  **$\beta$ -actina** ya no sea la misma.

Además, en el 9% de las muestras los datos obtenidos por uno u otro método son contradictorios ya que atendiendo a uno u otro el tumor sobreexpresa o tiene expresión disminuida de TOP2A (gráfico 22).



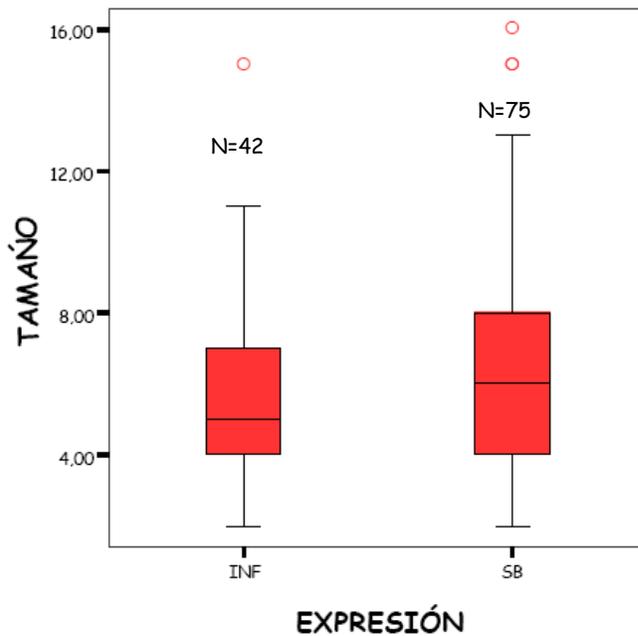
**Gráfico 21.** Correlación entre los valores de expresión de TOP2A medidos por *microarrays* y los valores de expresión medidos por QC-PCR. Debido a que los valores del *array* están en escala logarítmica (en base 2) los valores de TOP2A de QC-PCR han sido transformados a dicha escala.



**Gráfico 22.** Valores de expresión de TOP2A medidos por PCR cuantitativa (barras azules) y por *microarrays* (barras rojas) en los 117 tumores estudiados. Se observa que en 11 de ellos (delimitados en verde) los datos del *microarray* y la PCR cuantitativa son contradictorios.

#### 4.5.2 CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE TOP2A Y VARIABLES CLINICOPATOLÓGICAS

Según nuestros resultados la **sobreexpresión**<sup>26</sup> de **TOP2A** se da en el 57% de los tumores. Hemos observado que los tumores que sobreexpresan **TOP2A** suelen ser de mayor grado histológico y de mayor tamaño aunque esta asociación no es estadísticamente significativa.



TOP2A	Grado	N	%
SB	1	1	25%
INF		3	75%
SB	2	40	66%
INF		21	34%
SB	3	36	72%
INF		14	28%

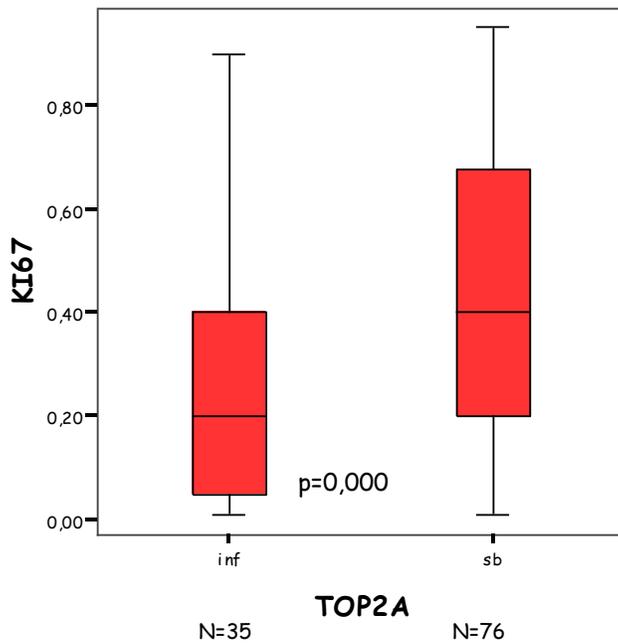
**Tabla 28.** Grado histológico de tumores que sobreexpresan TOP2A (SB) y tumores con baja expresión del gen (INF)<sup>27</sup>.

**Gráfico 23.** Tamaño tumoral de tumores que sobreexpresan TOP2A (SB) y tumores con baja expresión (INF).

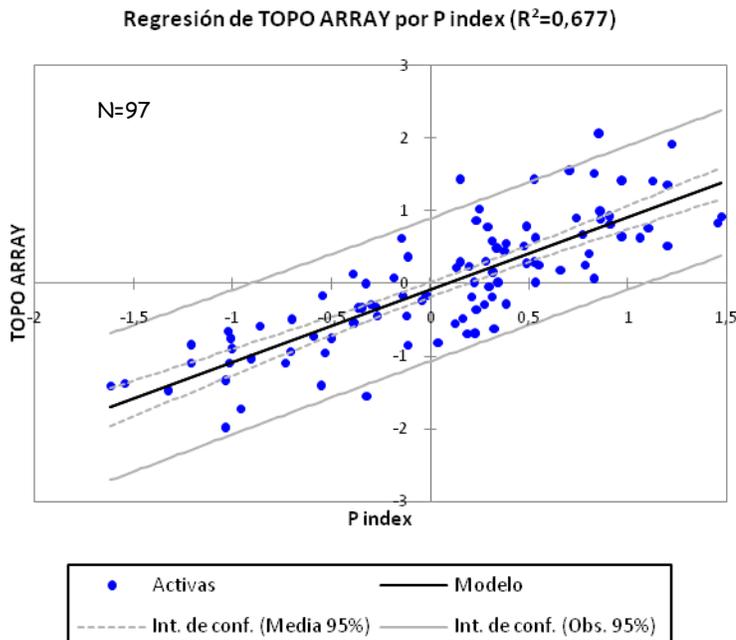
Además, **TOP2A** parece ser un marcador del grado de **proliferación** celular puesto que se asocia de forma significativa con la expresión de **Ki67** (gráfico 24). En el mismo sentido, observamos que **TOP2A** se correlaciona con la expresión de genes proliferativos, implicados en la regulación del ciclo celular (gráfico 25).

<sup>26</sup>Para este estudio se considera que los tumores que sobreexpresan TOP2A medida por QC-PCR son aquellos con valores de  $\Delta\Delta\text{ct}$  superiores a 2.

<sup>27</sup> Con valores de  $\Delta\Delta\text{ct} < 1$ .



**Gráfico 24.** Valores de Ki67 en tumores que sobreexpresan TOP2A (SB) y tumores con baja expresión (INF).



**Gráfico 25.** Correlación entre los valores de expresión de la TOP2A obtenidos por arrays y el índice de proliferación (P. index) que se calcula teniendo en cuenta los valores de expresión de genes de PAM50 relacionados con el ciclo celular.

Finalmente, observamos que la expresión de **TOP2A** es distinta en función del subtipo genómico siendo los tumores **basales** y **luminales B** los que presentan mayor expresión del gen. Por el contrario los tumores **luminales A**, **normal-like** y **claudin-low** expresan poco TOP2A (gráfico 27).

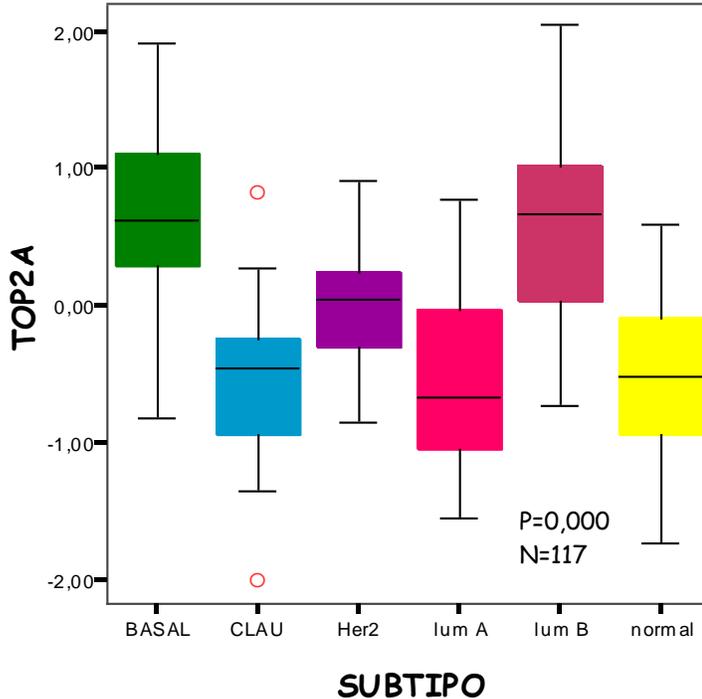


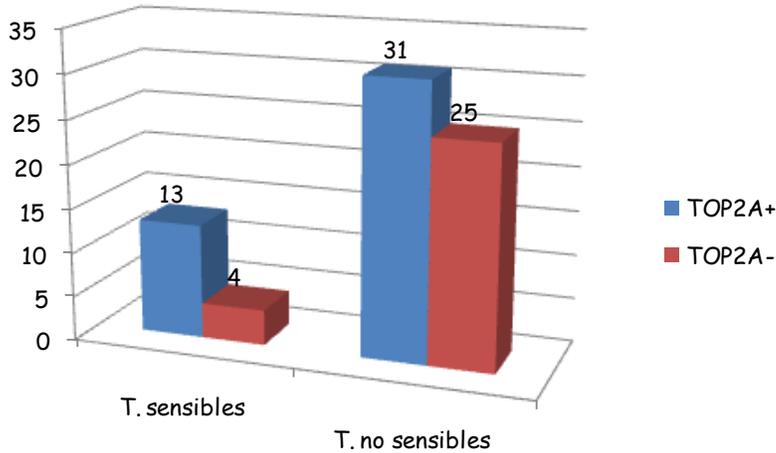
Gráfico 26. Expresión de TOP2A en función del subtipo genómico.

En resumen, podemos afirmar que **TOP2A** es un gen **marcador de la proliferación celular** ya que se asocia a marcadores clásicos como **ki67** y a la expresión de genes relacionados con el ciclo celular. Además, la sobreexpresión de **TOP2A** es más frecuente en tumores de mayor grado histológico así como de mayor tamaño.

#### 4.5.3 LA EXPRESIÓN TOP2A Y LA RESPUESTA A ADRIAMICINA

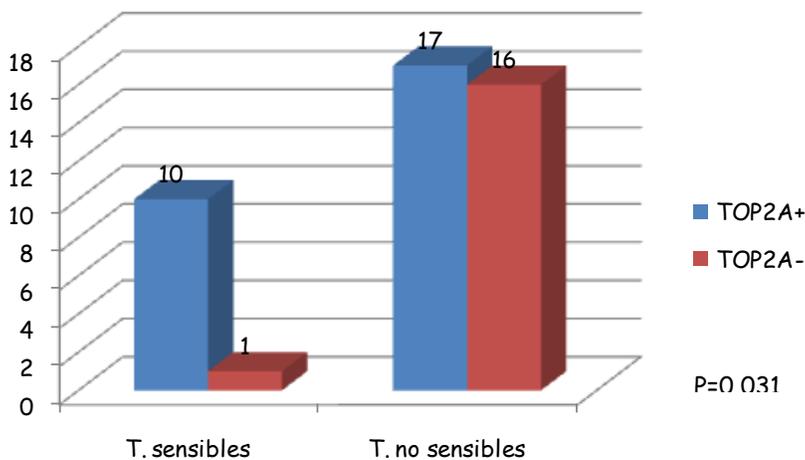
La **TOP2A** se considera que es la diana molecular de la **adriamicina**, si bien este fármaco es no fue diseñado para actuar contra una diana específica. En este estudio no hemos encontrado una asociación significativa entre la expresión de dicho gen y la tasa de respuestas a la adriamicina. Sin embargo, observamos que la tasa de respuestas a adriamicina es superior en los tumores que sobreexpresan TOP2A puesto que de estos el 30% responde<sup>28</sup> a la adriamicina frente al 14% de los tumores con baja expresión del gen (gráfico 27).

<sup>28</sup> Se consideran tumores sensibles aquellos con respuestas 4 y 5 según criterios de Miller y Payne.



**Gráfico 27.** Número de tumores que sobreexpresan TOP2A (en azul) y número de tumores con expresión baja del gen (en rojo) dentro de los grupos de tumores sensibles y resistentes.

Por otro lado, como se explica en el punto anterior, la expresión de **TOP2A** es mayor en tumores basales y luminales B. Estos tumores, como se comentará más adelante, parecen ser no sensibles a adriamicina (ver apartado 4.6.2). Concretamente, en este estudio no hemos encontrado ningún tumor **basal** que responda a la adriamicina. Además, los tumores del tipo *claudin-low* parecen ser los más sensibles a este fármaco, sin embargo, estos tumores expresan niveles bajos de TOP2A. Si excluimos los tumores basales y *claudin-low* encontramos que la sobreexpresión de TOP2A se asocia de forma significativa a la respuesta a adriamicina ya que el 37% de los tumores que sobreexpresan el gen responden frente al 5% de los tumores que no sobreexpresan TOP2A ( $p=0,031$ ). En cualquier caso el número de casos es pequeño (gráfico 28).



**Gráfico 28.** Número de tumores que sobreexpresan TOP2A (en azul) y número de tumores con expresión baja del gen (en rojo) dentro de los grupos de tumores sensibles y resistentes.

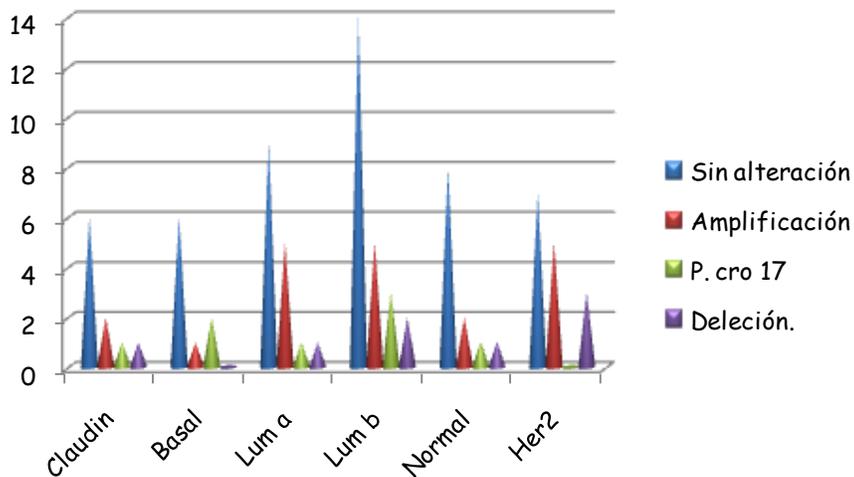
En el grupo de pacientes tratadas con **taxanos** observamos que la tasa de respuestas es muy similar en pacientes con tumores que sobreexpresan **TOP2A** y tumores con expresión normal del gen.

Por lo tanto, según nuestros resultados, la expresión de **TOP2A** podría ser un factor predictivo para algunos subtipos tumorales (tumores no triple negativos) tratados con adriamicina pero no con docetaxel.

#### 4.5.4 LAS ALTERACIONES A NIVEL DEL DNA DE TOP2A Y LA RESPUESTA A ADRIAMICINA

Las **alteraciones** a nivel del **DNA**, del gen **TOP2A**, se estudiaron en **160** pacientes mediante FISH.

Las alteraciones de TOP2A se encontraron en 57 (**35.6%**) de las muestras y corresponden a **amplificaciones** (31 casos), **deleciones** (14 casos), **polisomías del cromosoma 17** (10 casos) y **monosomías del cromosoma 17** (2 casos). Hemos observado que los tumores del subtipo *Her2-enriched* son los que más alteraciones presentan, siendo la amplificación y la deleción las alteraciones más frecuentes. Sin embargo, ningún caso de polisomía se asoció a este subtipo. Las dos monosomías encontradas corresponden a un tumor basal y otro *Her2-enriched*.

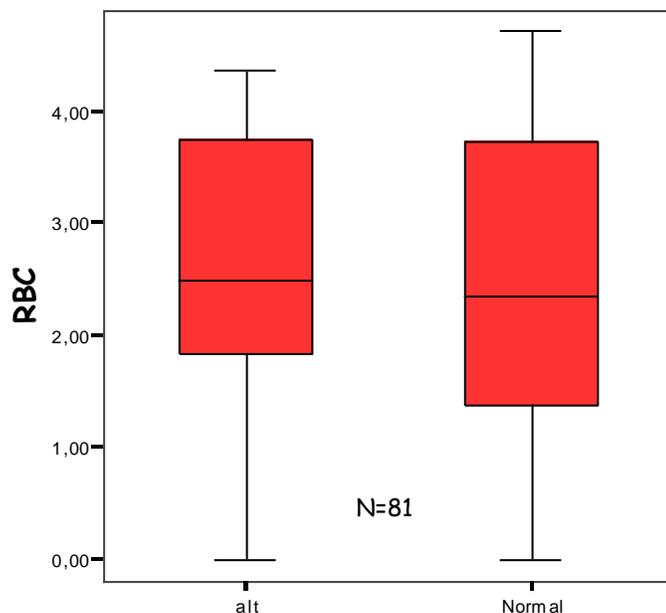


**Gráfico 29.** Alteraciones a nivel de DNA; amplificación, deleción y polisomía del cromosoma 17 (P. cro 17) en función del subtipo genómico.

Hemos observado la **coamplificación HER2-TOP2A** se da en el 64% (20/31) de los tumores analizados.

En cuanto a la correlación entre la **expresión y la amplificación** del gen, hemos estudiado la expresión de 86 muestras mediante *microarrays* y de 103 muestras se cuantificó la expresión de **TOP2A** por QC-PCR. No hemos encontrado una correlación entre la expresión y la amplificación de TOP2A. Si que observamos que los tumores con **delección** tienden a presentar bajos niveles de expresión.

Respecto a la **respuesta a antraciclinas**, no encontramos ninguna asociación entre las alteraciones mencionadas anteriormente y la quimiosensibilidad, siendo la tasa de repuestas muy similar en los tumores con alteraciones y en los normales. Esto también ocurre si sólo se consideran a las pacientes **HER2 positivas** tratadas con antraciclinas.



**Gráfico 30.** Variable continua de respuesta según criterios de Symmans (RBC) en tumores normales y con alteraciones a nivel de DNA (alt).

En cuanto al **docetaxel**, encontramos que las alteraciones de TOP2A a nivel de DNA son igual de frecuentes en los tumores sensibles y resistentes a este fármaco.

#### 4.6 CLASIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS TUMORES

Para este trabajo se incluyeron muestras tumorales de **133** pacientes. La distribución de los tumores atendiendo al subtipo genómico según la clasificación de Perou et al (29) se muestra en el gráfico 29. Se observa que, aproximadamente, el 50% de los tumores son luminales y la otra mitad está representada por el resto de subtipos en proporciones similares.

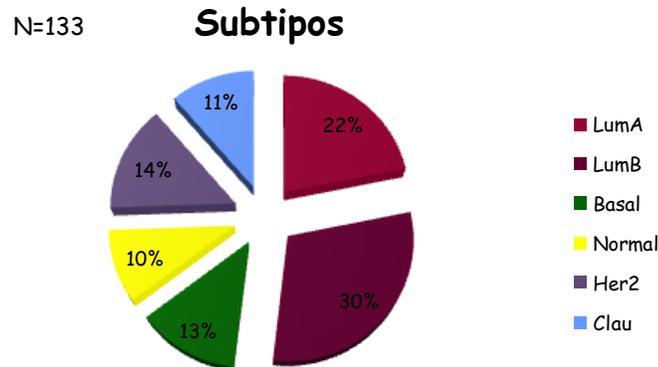


Gráfico 31.

##### 4.6.1 CORRELACIÓN ENTRE EL SUBTIPO GENÓMICO Y LAS VARIABLES CLINICOPATOLÓGICAS

Hemos comprobado que existe una correlación entre el subtipo genómico y el estatus de receptores hormonales y el receptor HER2. De este modo, observamos que los tumores con **receptores hormonales positivos** corresponden, en su mayoría, a tumores **luminales** tal y como se muestra en los gráficos 32 y 33.

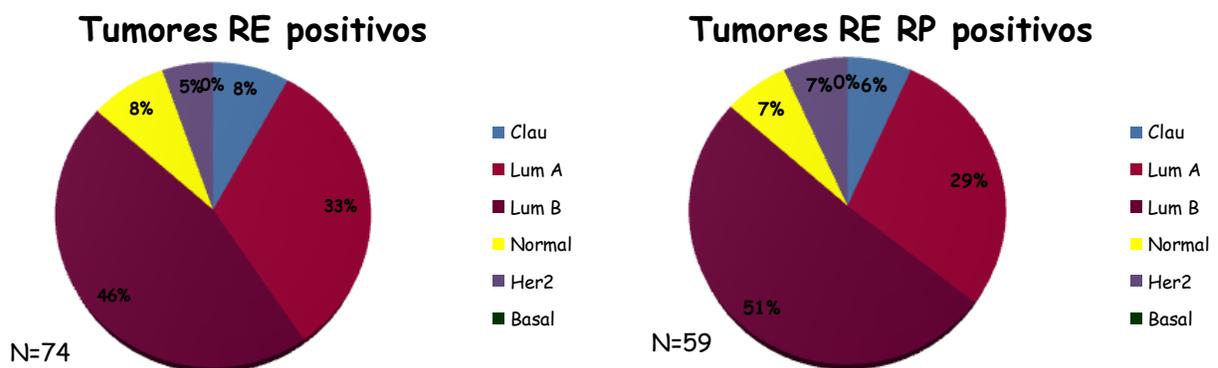
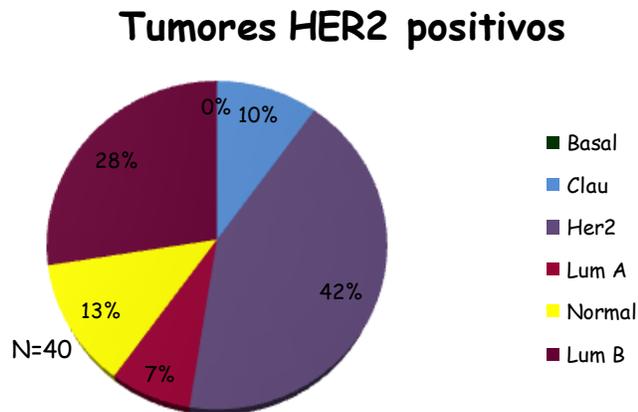


Gráfico 32. Subtipos genómicos de tumores RE positivos.

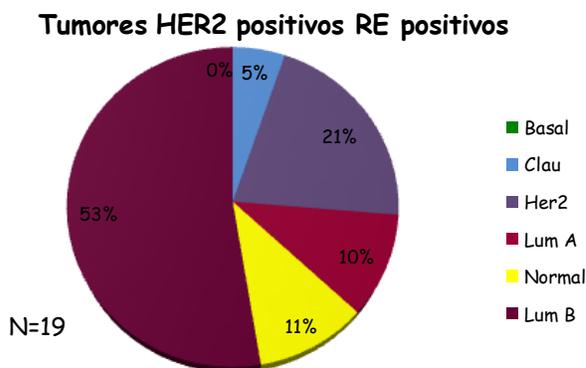
Gráfico 33. Subtipos genómicos de tumores RE y RP positivos.

Dentro de los tumores **HER2 positivos**, encontramos que el 42% corresponden a tumores *Her2-enriched* y el 28% a tumores **luminales B**.

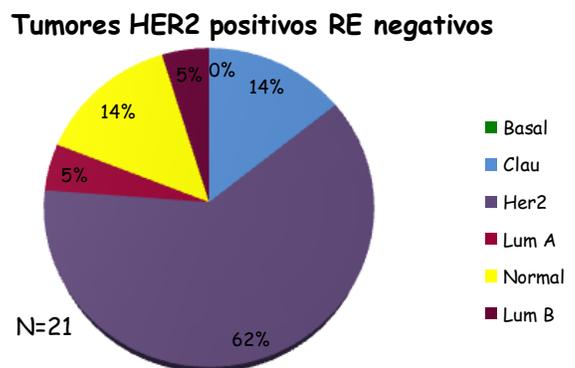


**Gráfico 34.** Distribución de subtipos genómicos en tumores HER2 positivos.

Sin embargo, si consideramos los tumores **HER2 positivos** con RE positivo, encontramos que fundamentalmente se trata de tumores **luminales B**. Por otro lado, los tumores HER2 positivos con RE negativo son mayoritariamente del subtipo *Her2-enriched*.



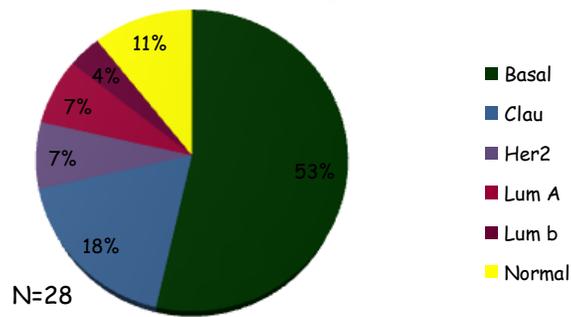
**Gráfico 35.** Distribución de subtipos genómicos en tumores HER2, RE positivos.



**Gráfico 36.** Distribución de subtipos genómicos en tumores HER2 positivos RE negativos.

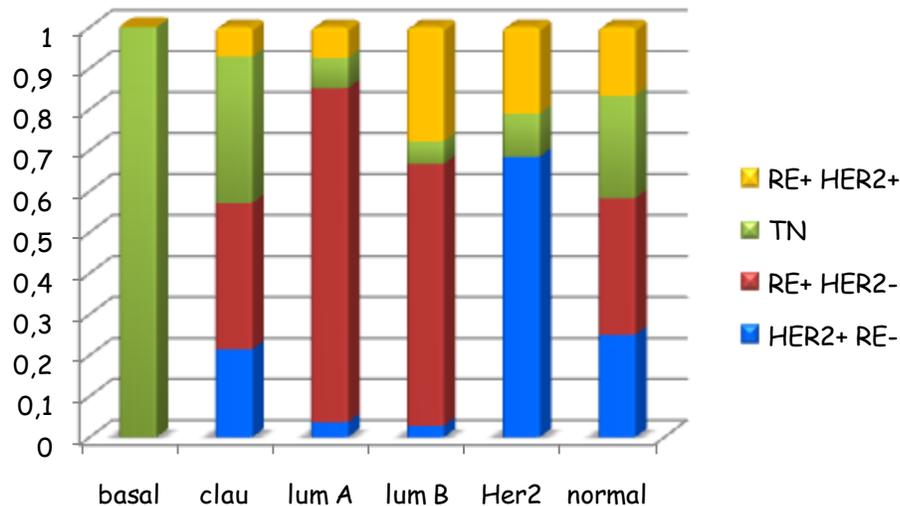
Los tumores **triple negativos** corresponden a tumores **basales** principalmente tal y como se aprecia en el gráfico 37.

### Tumores triple negativos



**Gráfico 37.** Distribución de subtipos genómicos en tumores triple negativos.

Si cambiamos de perspectiva y examinamos la IHQ de los subtipos genómicos (gráfico 38), observamos que todos los tumores basales son triple negativos y la gran mayoría de los tumores luminales son RE positivos. El subtipo *Her2-enriched* corresponde principalmente tumores HER2 positivo RE negativo aunque se aprecian también tumores RE y HER2 positivos.



**Gráfico 38.** IHQ de los subtipos genómicos.

Respecto a la **histología** del tumor encontramos que la mayoría de los tumores son ductales seguidos de los lobulares. Atendiendo a nuestros resultados, no existe una asociación entre los tumores ductales y el subtipo genómico. Sin embargo, observamos que los tumores lobulares son predominantemente luminales. En este estudio, hemos encontrado 4 tumores de tipo medular perteneciendo todos ellos al subtipo basal. Además, el único tumor de tipo mucinoso del conjunto de muestras corresponde a subtipo *claudin-low*.

### Histología tumoral

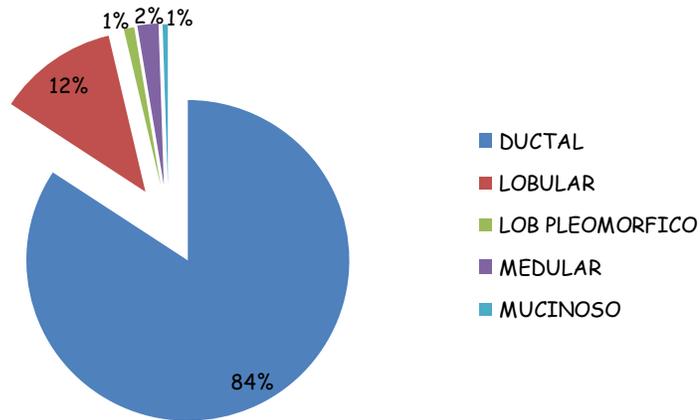


Gráfico 39. Histología de las muestras tumorales estudiadas.

### Tumores ductales

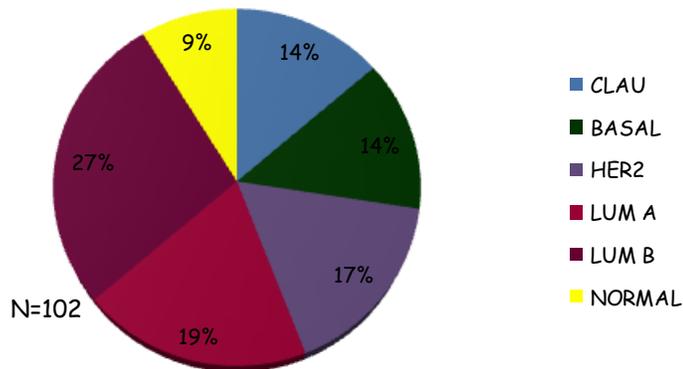


Gráfico 40. Subtipo genómico de los tumores ductales.

### Tumores lobulares

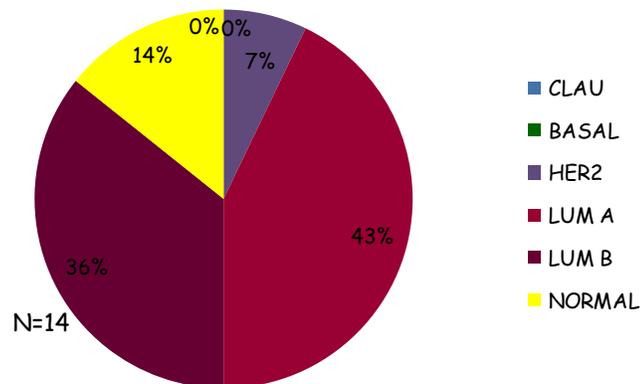


Gráfico 41. Subtipo genómico de los tumores lobulares.

Atendiendo al **grado histológico** hemos encontrado que los tumores luminales suelen ser de bajo grado, pues todos los tumores de grado 1 corresponden a este subtipo. Por otro lado, observamos que los subtipos basales y *Her2-enriched* son predominantemente de grado histológico de tipo 3. En la tabla 20 se muestran la proporción de cada subtipo genómico en tumores de grado 1, 2 y 3.

Grado	Subtipo	n	%
1	Lum A	4	80%
	Lum B	1	20%
2	Lum A	21	30%
	Lum B	23	32%
	Basal	6	8%
	Her2-enriched	5	7%
	Clau	8	11%
	Normal	8	11%
3	Lum A	2	4%
	Lum B	12	24%
	Basal	11	22%
	Her2-enriched	13	26%
	Clau	6	12%
	Normal	6	12%

Tabla 29.

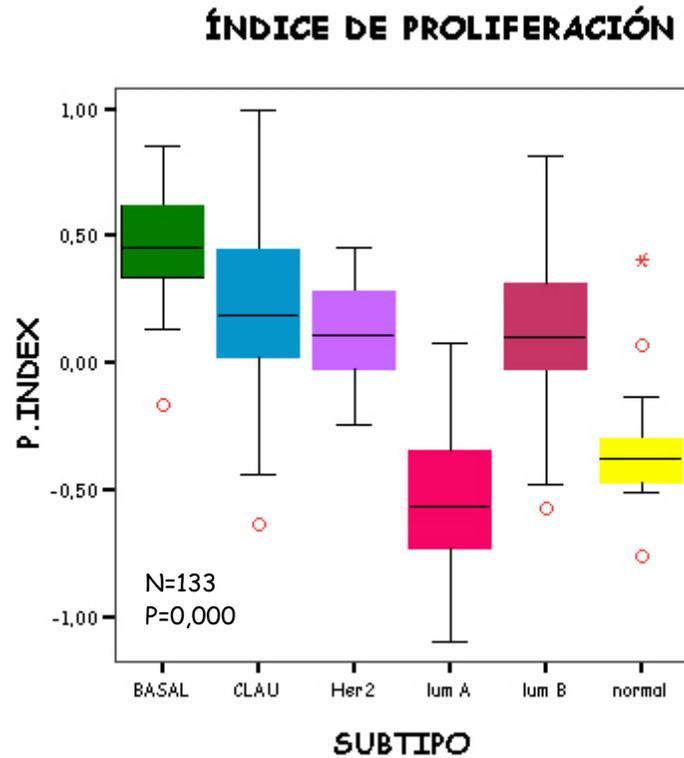
Del mismo modo, los tumores luminales A y *normal-like* suelen ser de baja **proliferación celular** y expresan en bajo grado genes relacionados con el ciclo celular. Por el contrario, los tumores basales se asocian a una mayor expresión de Ki67 y de genes relacionados con la proliferación celular.

KI67	Media	Mediana	MIN	MAX
CLAU	0,45	0,35	0,05	1
BASAL	0,53	0,6	0,1	0,8
HER2-enriched	0,5	0,6	0,05	0,8
LUM A	0,15	0,1	0,01	0,6
LUM B	0,44	0,5	0,01	0,95
NORMAL	0,19	0,2	0,02	0,5

Tabla 30. Valores de KI67 en función del subtipo genómico

P. index	Media	Mediana	MIN	MAX
BASAL	0,45	0,45054	-0,16	0,85
CLAU	0,19	0,188343	-0,64	0,99
HER2-enriched	0,11	0,109124	-0,24	0,45
LUM A	-0,51	-0,56939	-1,09	0,07
LUM B	0,14	0,098401	-0,57	0,8
NORMAL	-0,32	-0,37653	-0,76	0,4

Tabla 31. Índice de proliferación celular en función del subtipo genómico. Este índice se calcula en función de los valores de expresión de genes del PAM 50 relacionados con el ciclo celular.



**Gráfico 42.** Índice de proliferación celular en función del subtipo genómico

Finalmente, comentar que no hemos hallado diferencias en cuanto al tamaño del tumor y número de metástasis en ganglios y los distintos subtipos genómicos.

Si que observamos, que los tumores basales aparecen a **edades** más tempranas (media: 48 años) respecto del resto de los tumores ( $p=0,024$ ). Por otro lado la edad al diagnóstico de las pacientes con tumores tipo *claudin-low* o luminal A es mayor.

Subtipo	N	Media edad	Mínimo	Máximo	Desv. Stand
Basal	17	48,06	34	65	2,41
Claudin-low	15	57,13	33	78	3,77
Her2	18	50,94	32	77	3,96
Luminal A	27	57,48	36	83	2,46
Luminal B	36	53,89	27	78	2,13
Normal	12	52,83	38	73	2,95
Total	125	53,74	27	83	1,18

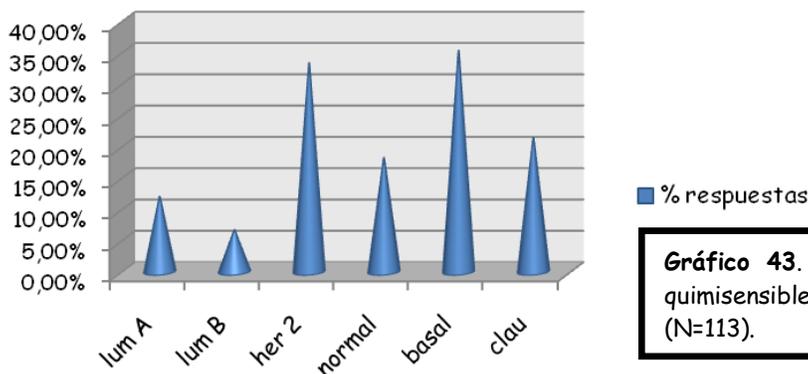
**Tabla 32.** Edad al diagnóstico y subtipo genómico.

#### 4.6.2 QUIMIOSENSIBILIDAD DE LOS DIFERENTES SUBTIPOS GENÓMICOS.

De los 133 tumores estudiados a nivel genómico 113 fueron evaluables clínicamente. Como se ha mencionado en el apartado 4.2, ambas ramas de tratamiento tuvieron una eficacia global parecida.

Considerando los pacientes sensibles aquellos con respuestas PCR y I de Symmans y no sensibles aquellos con respuestas II y III, se observa que los tumores con mejores respuestas a ambos tratamientos son los *Her2-enriched* y *basales*. Los tumores luminales son los que presentan peores respuestas.

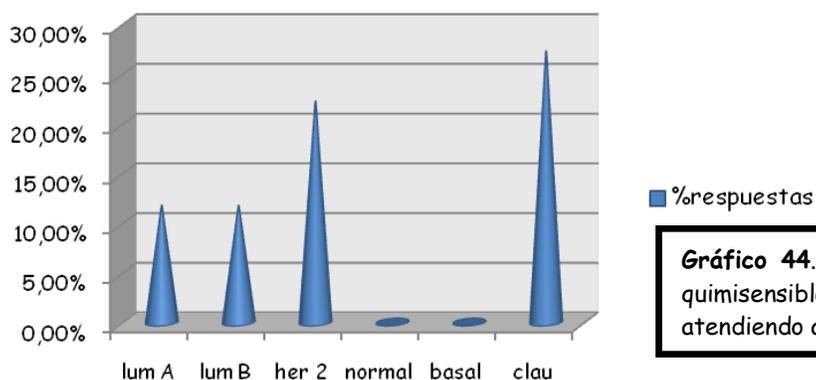
#### Ambos tratamientos



**Gráfico 43.** Frecuencia de tumores quimiosensibles atendiendo al subtipo. (N=113).

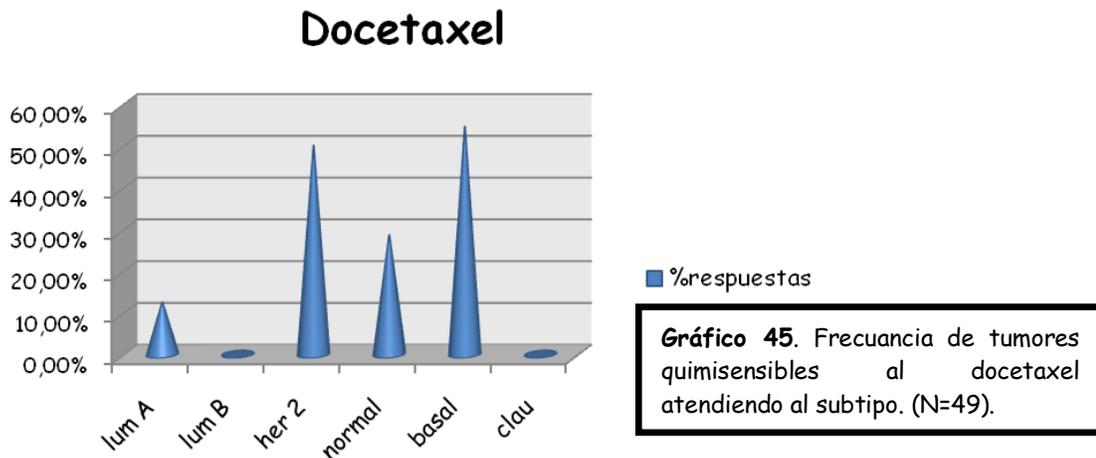
Sin embargo, si nos centramos en los tumores tratados con **adriamicina**, observamos que los tumores basales no responden a dicho fármaco y son los tumores *claudin-low* y *Her2-enriched* los más quimiosensibles.

#### Adriamicina



**Gráfico 44.** Frecuencia de tumores quimiosensibles a la adriamicina atendiendo al subtipo. (N=64).

Respecto al **docetaxel**, observamos que son los tumores **basales** los más sensibles junto con los tumores *Her2-enriched*.



Por lo tanto, podemos establecer que:

-Los tumores *Her2-enriched* son moderadamente sensibles a ambas drogas.

-Los tumores basales son los más sensible a docetaxel ( $p=0,016$ ). Además, la sensibilidad de los tumores basales a este fármaco es mucho mayor que a la adriamicina ( $p=0,043$ ), ya que la tasa de respuestas es del 55% frente al 0% de tumores que responden a la adriamicina. Esta asociación no es estadísticamente significativa en tumores triple negativos (considerando las categorías de Symmans), aunque sí que se observa que los tumores triple negativos tratados con docetaxel responden en un 44% frente a un 25% de los tratados con adriamicina, luego parece que el estudio a nivel genómico es más preciso a la hora de determinar la sensibilidad a los tratamientos.

- Los tumores tipo *claudin-low* resisten al tratamiento con docetaxel pero son los más sensibles a la adriamicina aunque esta asociación no es estadísticamente significativa, probablemente, debido al escaso tamaño muestral.

- Los tumores **luminales** son menos sensibles a quimioterapia respecto de los demás subtipos ( $p=0,009$ ), ya que sólo el 24% de los tumores sensibles a ambos fármacos son luminales. Del mismo modo, observamos que los tumores con receptores positivos suelen ser resistentes a ambos tratamiento.

Resultados muy similares se obtienen cuando se analizan las respuestas según la clasificación de Miller y Payne. A continuación se muestran una serie de tablas

donde se especifican las tasas de respuestas a ambos fármacos y a cada uno de ellos por separado, evaluadas según criterios de Symmans y de Miller y Payne.

Ambos TTOS	lum A	lum B	her 2	normal	basal	clau
III	12	11	5	7	7	7
II	10	18	5	2	4	4
I	1	0	2	2	3	0
PCR	2	2	3	0	3	3
III+II	22	29	10	9	11	11
PCR+I	3	2	5	2	6	3
total	25	31	15	11	17	14
% T.sensibles	12,00%	6,67%	33,33%	18,18%	35,29%	21,43%

Tabla 33. Respuestas de Symmans en función de los distintos subtipos genómicos.

ADM	lum A	lum B	her 2	normal	basal	clau
III	9	6	4	2	4	6
II	6	9	3	2	2	2
I	1	0	1	0	0	0
PCR	1	2	1	0	0	3
III+II	15	15	7	4	6	8
PCR+I	2	2	2	0	0	3
total	17	17	9	4	6	11
% T.sensibles	11,76%	11,76%	22,22%	0,00%	0,00%	27,27%

Tabla 34. Respuestas de Symmans en función de los distintos subtipos genómicos en pacientes tratadas con adriamicina. Se resaltan los tumores *claudin-low* y *Her2-enriched* por ser los que presentan mejores respuestas. Además se observa que ningún tumor basal responde a la adriamicina. Cabe destacar la baja tasa de respuestas de los tumores luminales.

TX	lum A	lum B	her 2	normal	basal	clau
III	3	5	1	5	3	1
II	4	9	2	0	2	2
I	0	0	1	2	3	0
PCR	1	0	2	0	3	0
III+II	7	14	3	5	5	3
PCR+I	1	0	3	2	6	0
total	8	14	6	7	11	3
% T.sensibles	12,50%	0,00%	50,00%	28,57%	54,55%	0,00%

Tabla 35. Respuestas de Symmans en función de los distintos subtipos genómicos en pacientes tratadas con docetaxel. Se resaltan los tumores *basales* y *Her2-enriched* por ser los que presentan mejores respuestas. Además, se observa que ningún tumor *claudin-low* responde al tratamiento. Igual que en el caso anterior se observa que la tasa de respuestas es muy pobre en tumores luminales.

Ambos TTOS	lum A	lum B	her 2	normal	basal	clau
1	3	4	3	6	5	2
2	8	6	1	2	1	3
3	9	15	5	0	5	4
4	3	3	3	3	2	2
5	2	3	3	0	4	3
1y2	11	10	4	8	6	5
4 y 5	5	6	6	3	6	5
ratio	0,45	0,60	1,50	0,38	1,00	1,00
total	25	31	15	11	17	14
% resp	20%	19%	40%	27%	35%	36%
% resis	44%	32%	27%	73%	35%	36%

Tabla 36. Respuestas según criterios de Miller y Payne en función de los distintos subtipos genómicos. Se observa que la tasa de respuestas es menor en los tumores luminales.

ADM	lum A	lum B	her 2	normal	basal	clau
1	2	2	2	1	3	2
2	6	3	1	2	1	2
3	6	7	3	0	2	2
4	2	3	2	1	0	2
5	1	2	1	0	0	3
1y2	8	5	3	3	4	4
4 y 5	3	5	3	1	0	5
ratio	0,38	1,00	1,00	0,33	0,00	1,25
total	17	17	9	4	6	11
% resp	18%	29%	33%	25%	0%	45%
% resis	47%	29%	33%	75%	67%	36%

Tabla 37. Respuestas según criterios de Miller y Payne en función de los distintos subtipos genómicos en pacientes tratadas con adriamicina. Se observa que los tumores *claudin-low* y *Her2-enriched* son los que presentan mejores respuestas mientras que los tumores basales son los de peor pronóstico.

TX	lum A	lum B	her 2	normal	basal	clau
1	1	2	1	5	2	0
2	2	3	0	0	0	1
3	3	8	2	0	3	2
4	1	0	1	2	2	0
5	1	1	2	0	4	0
1y2	3	5	1	5	2	1
4 y 5	2	1	3	2	6	0
ratio	0,67	0,20	3,00	0,40	3,00	0,00
total	8	14	6	7	11	3
% resp	25%	7%	50%	29%	55%	0%
% resis	38%	36%	17%	71%	18%	33%

**Tabla 38.** Respuestas según criterios de Miller y Payne en función de los distintos subtipos genómicos en pacientes tratadas con docetaxel. La tasa de respuestas es superior en el grupo de tumores basales y *Her2-enriched* mientras que los tumores *claudin-low* y luminales B se muestran resistentes al tratamiento con dicho fármaco.

## 4.7 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN TUMORES SENSIBLES Y RESISTENTES.

### 4.7.1 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN TUMORES TRATADOS CON ADRIAMICINA.

Para este estudio se realizó un análisis supervisado de *microarrays*. En la tabla 41 se presenta una lista de 22 genes que están diferencialmente expresados entre los tumores quimiosensibles a adriamicina (categorías RBC-0, RBC-I de Symmans) y tumores resistentes (RBC-II, RBC-III). Se trata de genes que están sobreexpresados o se que se expresan en mayor cuantía en tumores sensibles.

Utilizando el software DAVID observamos que:

- De los 22 genes de la lista 5 (22%) están relacionados con la **proliferación celular** ( $p=0,047$ )<sup>29</sup> (tabla 39).

Símbolo	Nombre
E2F1	E2f transcription factor 1 RG Homo sapiens
IGF2	insulin-like growth factor 2 (somatomedin a) RG Homo sapiens
SCGB3A1	secretoglobin, family 3a, member 1 RG Homo sapiens
MIA	melanoma inhibitory activity RG Homo sapiens
PCDH24	protocadherin24

Tabla 39.

-8 (36%) de los 22 genes codifican para proteínas secretadas con **función extracelular** ( $p=0,00034$ ) (tabla 40).

<sup>29</sup>p-valor (*Ease score*): obtenido mediante el test exacto de Fisher modificado. Indica el grado de enriquecimiento de genes con una misma función en una lista de genes y adquiere valores desde 0 a 1. Generalmente, cuando  $p \leq 0,05$  se puede decir que la lista está altamente enriquecida en genes con una función determinada. Por ejemplo, si se estima que en el ser humano tiene 30.000 genes y que hay 40 genes implicados en la vía de señalización de p53 y tenemos una lista de 300 genes de los cuales 3 están en esta vía podemos hacer una tabla de contingencia de la siguiente manera:

	Genes de la lista	Genoma
Genes implicados en la vía p53	3	40
Genes no implicados en la vía de p53	297	29960

En este caso el p-valor obtenido mediante el Test exacto de Fisher daría 0.008, con lo que podemos afirmar que la lista está enriquecida en genes relacionados con vía de p53. No obstante, el *EASE Score* es más estricto y en este caso el p-valor sería de 0,06.

Símbolo	Nombre
CCL28	chemokine (c-c motif) ligand 28 RG Homo sapiens
IGF2	insulin-like growth factor 2 (somatomedin a) RG Homo sapiens
LALBA	lactalbumin
STC1	stanniocalcin 1 RG Homo sapiens
CSN2	casein beta RG Homo sapiens
SCGB3A1	secretoglobin
ABP1	amiloride binding protein 1 (amine oxidase (copper-containing))
MIA	melanoma inhibitory activity RG Homo sapiens

Tabla 40.

-2 genes (**lactoalbúmina alfa y la caseína beta**) están implicados con la producción de la leche (p=0,004)

Además, encontramos en la lista, genes relacionados con el **metabolismo y transporte de fármacos** como son el gen que codifica la **glutación-S-transferasa A1**, el gen **MFSD9** implicado en el transporte celular de tetraciclinas, y el gen que codifica para la proteína de unión al amiloride con actividad aminooxidasa (**ABP1**).

Finalmente, podemos señalar el gen **MAML2** coactivador de **Notch** que se encuentra formando un gen de fusión en carcinomas mucoepidermoides en los que la vía de Notch está alterada (**100**). También, el gen **ARID3A** que está implicado en la embriogénesis y control del ciclo celular.

SONDA	SÍMBOLO	GEN	REF	Score	Numerador	Denominador	Fold Change	q-value(%)
AGI_OLIGO_NM_003155_1_3166	STC1	Stanniocalcin 1	NM_003155	3,62582369	0,98161765	0,27072956	2,19078459	0
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P116765	LALBA	Lactalbumin, alpha-	NM_002289	3,47932142	1,3102472	0,37658125	4,85964253	0
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P135417	GSTA1	GlutathioneS-transferase A1	NM_145740	3,08741267	1,09258193	0,3538827	2,22953015	0
AGI_OLIGO_AK025719_1_1799	IGF2	Putativeinsulin-like growth factor II associated protein	AK025719	3,01726126	1,43828431	0,47668537	5,02468337	0
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P144394	CSN2	Caseinbeta	NM_001891	2,97816422	1,24563344	0,41825546	7,14834806	0
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P154158	MFSD9	major facilitator superfamily domain containing 9	NM_032718	2,88276716	0,97664216	0,33878635	3,68267291	0
AGI_OLIGO_NM_000453_1_2220	SLC5A5	Solute carrier family 5 (sodiumiodidesymporter), member5	NM_000453	2,87744766	0,62273039	0,21641763	1,70405054	0
AGI_OLIGO_NM_016372_1_1026	GPR175	Gprotein-coupledreceptor175	NM_016372	2,8585184	0,94362745	0,33011068	3,56197879	0
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P59447	ABP1	Amiloride binding protein1 (amineoxidase copper-containing)	NM_001091	2,78626092	1,06544118	0,38239103	2,36991724	0
AGI_OLIGO_NM_005225_1_1602	E2F1	E2F transcriptionfactor 1	NM_005225	2,76157446	0,86463235	0,31309398	1,81546816	0
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P213403	CCL28	Chemokine (C-Cmotif) ligand 28	AF266504	2,75953652	1,72355392	0,62458094	2,77912521	0
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P117298	F7	CoagulationfactorVII(serumprothrombinconversionaccelerator)	NM_000131	2,74873522	1,04862745	0,38149453	2,97211291	0
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P30213	SCGB3A1	Secretoglobulin, family3A, member1	NM_052863	2,74828184	1,16279412	0,42309857	2,29196245	0
AGI_OLIGO_BC029475_1_253	MT1A	Metallothionein 1A (functional)	BC029475	2,72099061	1,2995098	0,47758702	2,68859241	0
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P4714	MIA	Melanoma inhibitory activity	NM_006533	2,72032631	1,65887255	0,60980646	2,5374031	0
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P133338	PCDH24	protocadherin 24	NM_017675	2,71135854	0,72552941	0,26758889	2,14098084	0
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P153937	C2orf34	chromosome2openreadingframe34	NM_024766	2,69419752	1,08651961	0,40328135	4,74064951	0
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P47674	HBE1	Hemoglobin, epsilon1	NM_005330	2,69398511	0,69558824	0,25820048	1,59954821	0
AGI_OLIGO_AA436007_1_93	MAML2	Mastermind-like2(Drosophila)	AA436007	2,68014311	0,61555828	0,22967366	1,53798095	0
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P94380	C9orf58	Chromosome 9 openreading frame 58	NM_001002260	2,64304907	1,25085784	0,47326319	2,09237724	0
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P16516	ARID3A	ATrichinteractivedomain3A(BRIGHT-like)	NM_005224	2,64172433	0,63377451	0,2399094	1,56851867	0

**Tabla 41.** Genes diferencialmente expresados entre tumores quimiosensibles (RBC-0, RBC-I) y resistentes (RBC-II, RBC-III). La lista ha sido obtenida haciendo un análisis supervisado de *microarrays*. En la tabla se refleja el *SAM score* (quinta columna) que mide la fuerza de la relación entre la expresión de un gen y la variable respuesta, el *fold change* (octava columna) que determina cuanto cambia la expresión de un gen entre los grupos y el *q-value* mínima tasa de falsos positivos a la que un gen es considerado significativo.

#### 4.7.2 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN TUMORES TRATADOS CON DOCETAXEL.

El análisis supervisado de *microarrays* obtuvo una lista de 34 genes que están diferencialmente expresados entre los tumores quimiosensibles y resistentes al fármaco docetaxel (tabla 45). Al igual que antes, se trata de genes que están sobreexpresados en tumores sensibles.

En este caso encontramos que tres genes (9%) están relacionados con la **replicación de DNA** ( $p=0,038$ ) (tabla 42):

Símbolo	Nombre
MSH5	mutS homolog 5 (e. coli)
CCNE1	cyclin e1
TERT	telomerase reverse transcriptase

Tabla 42.

Por otro lado, dos genes de la lista; la **ciclina E1** y **ATM** forman parte de la vía de señalización de **p53** ( $p=0,05$ ). ATM fosforila a p53 haciéndola más estable y libera a BRCA1 que al igual que p53 participa en la activación de genes reparadores del daño en el DNA (101).

Además, encontramos que 5 genes (15%) están relacionados con la **respuesta inmunológica** ( $p=0,03$ ) (tabla 43).

Símbolo	Nombre
CCL7	chemokine (c-c motif) ligand 7
IGLC2	immunoglobulin lambda constant 1 (mcg marker)
MS4A1	membrane-spanning 4-domains, subfamily a, member 1
TCF7	transcription factor 7 (t-cell specific, hmg-box)
SEMA4D	sema domain, immunoglobulin domain (ig), transmembrane domain (tm) and short

Tabla 43.

Finalmente, la mayoría de los genes de la lista (15 genes) están implicados en procesos metabólicos ( $p=0,06$ ) (tabla 44) aunque este término es muy ambiguo y engloba muchos procesos.

Símbolo	Nombre
SORL1	sortilin-related receptor, I(dlr class) a repeats-containing
SCLY	selenocysteine lyase
SLC34A2	solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2
CCNE1	cyclin e1
TERT	telomerase reverse transcriptase
PRKCB1	protein kinase c, beta 1
MSH5	mutS homolog 5 (e. coli)
IGLC2	immunoglobulin lambda constant 1 (mcg marker)
HMBS	hydroxymethylbilane synthase
UBE4A	ubiquitination factor e4a (ufd2 homolog, yeast)
RPUSD4	rna pseudouridylate synthase domain containing 4
DCPS	decapping enzyme, scavenger
ATM	ataxia telangiectasia mutated (includes complementation groups a, c and d)
TCF7	transcription factor 7 (t-cell specific, hmg-box)
IKZF1	zinc finger protein, subfamily 1a, 1 (ikaros)

Tabla 44.

SONDA	SÍMBOLO	GEN	Score	Numerador	Denominador	Fold Change	q-value
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P41476	LOC152573	Hypothetical protein BC012029	3,5622729	2,29608539	0,64455629	24,5222167	17,6828056
AGI_OLIGO_NM_021950_2_1560	MS4A1	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1	3,33841381	1,83510468	0,54969359	16,8087151	17,6828056
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P34031	XAGE2	G antigen, family D, 3	3,03268857	1,77211823	0,58433901	15,7306418	17,6828056
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P36843	KCNA5	Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 5	3,22218863	1,45359606	0,45112072	7,69043024	17,6828056
AGI_OLIGO_AF146796_1_3682	SLC34A2	Solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2	3,15337283	1,46753695	0,46538644	4,94996007	17,6828056
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P37840	C16orf3	Chromosome 16 open reading frame 3	3,3333428	1,28738916	0,38621565	4,7764937	17,6828056
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P133036	SLC34A2	Solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2	3,2939667	1,41223864	0,42873495	4,64123997	17,6828056
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P122655	FLJ13744	Hypothetical protein FLJ13744	3,36303747	1,29672906	0,3855827	4,55264516	17,6828056
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P45217	CSAG3	Similar to Taxol resistant associated protein 3 (TRAG-3)	3,00447407	1,40536946	0,46775889	4,09389213	17,6828056
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P78037	CCL7	Chemokine (C-C motif) ligand 7	3,04218187	1,28674959	0,42296932	3,99324136	17,6828056
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P209200	CCNE1	Cyclin E1	3,12522599	1,43689655	0,45977365	3,55333896	17,6828056
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P87049	SORL1	Sortilin-related receptor, L(DLR class) A repeats-containing	3,71959838	1,71206897	0,46028329	3,55150206	17,6828056
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P206585	PRKCB1	Protein kinase C, beta 1	2,97605902	1,57921182	0,53063861	3,38436508	17,6828056
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P21306	IGLC2	Immunoglobulin lambda constant 2 (Kern-Oz- marker)	3,05375086	1,76305419	0,57734054	3,27313836	17,6828056
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P116371	MS4A1	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1	3,53861647	1,09172414	0,30851723	3,20934556	17,6828056
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P19987	IMP-3	IGF-II mRNA-binding protein 3	3,06728911	1,79399015	0,58487807	3,12854736	17,6828056
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P148541	CTAG1B	Cancer/testis antigen 1B	3,01469635	1,30596059	0,43319805	3,04220802	17,6828056
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P168427	STAG3	Stromal antigen 3	3,16130558	1,57502463	0,49821967	2,70169738	17,6828056
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P165408	KLHL23	Hypothetical protein MGC2610	2,94462166	1,0564532	0,35877383	2,3155522	17,6828056
AGI_OLIGO_NM_025259_3_3778	MSH5	MutS homolog 5 (E. coli)	3,63824524	1,13423645	0,31175371	2,25113121	17,6828056
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P21943	SAGE1	Sarcoma antigen 1	3,28097548	0,87551177	0,26684496	2,21920333	17,6828056
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P52738	DCPS	MRNA decapping enzyme	2,95960262	1,00719212	0,34031329	2,14593414	17,6828056
AGI_OLIGO_NM_006378_1_3990	SEMA4D	Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and sho	2,97562761	1,15384236	0,38776437	2,06269393	17,6828056
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P163251	PAQR5	Membrane progesterin receptor gamma	3,04470591	0,97571429	0,32046257	2,03127867	17,6828056
AGI_OLIGO_NM_000051_2_9110	ATM	Ataxia telangiectasia mutated (includes complementation groups A, C and D)	3,52060839	0,98965517	0,28110345	2,02058042	17,6828056
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P79213	LCT	Lactase	3,22099986	0,8622671	0,26770169	2,0127362	17,6828056
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P28153	SCLY	Selenocysteine lyase	3,25001854	0,89029557	0,27393553	1,90372057	17,6828056
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P98431	HMBS	Hydroxymethylbilane synthase	3,04095246	0,74182266	0,24394418	1,88476124	17,6828056
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P75540	RPUSD4	Hypothetical protein FLJ14494	2,93102735	0,76344828	0,26047122	1,80122854	17,6828056
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P147043	IKZF1	Zinc finger protein, subfamily 1A, 1 (Ikeros)	2,93359139	0,81640394	0,27829504	1,79531789	17,6828056
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P203139	UBE4A	Ubiquitination factor E4A (UFD2 homolog, yeast)	2,96302608	0,77019704	0,25993596	1,77920564	17,6828056
AGI_OLIGO_AL834166_1_4574	TCF7	Transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box)	3,11519011	0,7229064	0,23205852	1,69948743	17,6828056
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P110851	TERT	Telomerase reverse transcriptase	2,96109378	0,74891626	0,25291879	1,63837953	17,6828056

**Tabla 45.** Genes diferencialmente expresados entre tumores quimiosensibles (RBC-0, RBC-I) y resistentes (RBC-II, RBC-III) obtenido mediante análisis supervisado de *microarrays*. Se muestran los valores del *SAM score*, *fold change* y *q value*.

### 4.7.3 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN TUMORES BASALES TRATADOS CON DOCETAXEL.

Atendiendo a nuestros resultados, aproximadamente un 55% de los tumores basales responden al docetaxel en monoterapia. Con el fin de saber qué genes están diferencialmente expresados en los tumores basales resistentes y sensibles a docetaxel, se realizó un análisis supervisado de *microarrays* obteniéndose una firma de 24 genes. En la tabla 47 se especifican dichos genes. En rojo aparecen los genes sobreexpresados en tumores basales resistentes a docetaxel y en verde genes regulados a la baja en dichos tumores.

Si analizamos la lista con el programa DAVID, únicamente encontramos que 9 de los genes que aparecen en la lista están implicados en **procesos metabólicos** ( $p=0,09$ ) (tabla 46), algunos de los cuales codifican para proteínas con localización mitocondrial, como por ejemplo *IMMP1L*, que es una peptidasa de la membrana mitocondrial y el gen de la ornitina aminotransferasa.

Símbolo	Nombre
IMMP1L	imp1 inner mitochondrial membrane peptidase-like (s. cerevisiae)
RPL18	ribosomal protein l18
DYRK3	dual-specificity tyrosine-(y)-phosphorylation regulated kinase 3
WASF3	was protein family, member 3
PFDN4	prefoldin subunit 4
ERAP2	leukocyte-derived arginine aminopeptidase
EPHB4	eph receptor b4
HSPA14	heat shock 70kda protein 14
OAT	Ornithine aminotransferase (gyrate atrophy)

Tabla 46.

Sin embargo, si analizamos uno a uno los genes de la lista encontramos genes relacionados con la oncogénesis y la invasividad y agresividad tumoral como son:

-**EPHB4**, que codifica para un receptor de efrinas con funciones críticas para el desarrollo neural. Al mismo tiempo, se ha visto que **EPHB4**, estimula la migración y proliferación celular y es promotor de la angiogénesis, estando sobreexpresado en tumores de ovario avanzados (102).

-**NES**, que es un filamento intermedio que se expresa en células madre del SNC. También, este gen parece contribuir a la invasión neural y de tejido retroperitoneal por metástasis de cáncer de páncreas (103). Del mismo modo, se ha comprobado que facilita la movilidad e invasividad de metástasis de cáncer de próstata (104). Además, este gen es se expresa en tumores basales y triple negativos (105).

-**LMO4**, que codifica para una proteína reguladora de la transcripción. También puede actuar como oncogén. Por otro lado, se sabe que este gene inhibe la actividad de BRCA1 (106).

-**WASF3**, que se une a filamentos de actina y estimula la invasión y la movilidad celular (107,108).

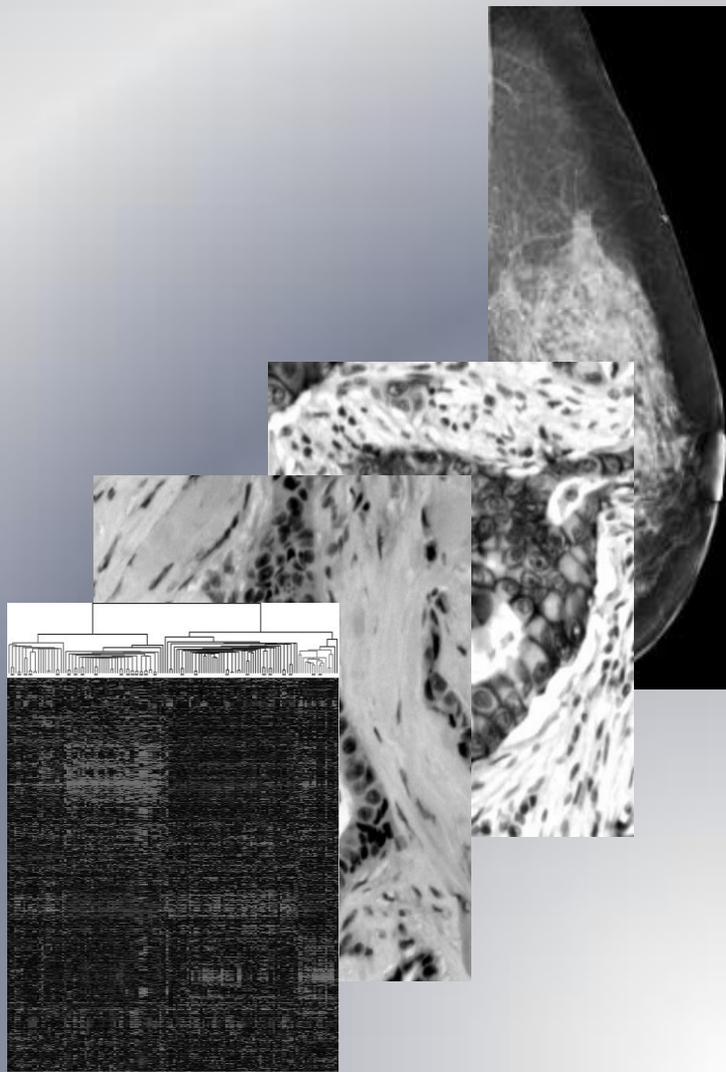
-**SLPI**, que codifica para un inhibidor de proteasas cuya función es proteger al epitelio. Además, se ha visto que la sobreexpresión de este gen se asocia a ganglios positivos en cáncer de mama. (109).

Por último, podemos destacar el gen **ELK1**, que es un factor de transcripción que se activa a través de la vía de señalización ras-raf-MAPK .Se ha observado que la activación de MAPK puede ocurrir tras la interacción de determinados fármacos como los taxanos con los microtúbulos (110).

SONDA	SÍMBOLO	GEN	Score	Numerador	Denominador	Fold Change	q-valor
AGI_OLIGO_NM_003064_2_225	SLPI	Secretory leukocyte protease inhibitor (antileukoproteínase)	7,17145045	3,5475	0,49466981	11,689785	0
AGI_OLIGO_NM_004378_1_441	CRABP1	Cellular retinoic acid binding protein 1	5,26098076	3,075	0,58449178	8,6901072	0
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P60776	PSPHL	Phosphoserine phosphatase-like	5,12825757	5,16525	1,00721345	40,0559742	0
AGI_OLIGO_NM_006769_2_1260	LMO4	LIM domain only 4	4,83111354	2,1075	0,43623483	4,43203446	0
AGI_OLIGO_NM_006645_1_767	STARD10	START domain containing 10	4,23147931	1,3375	0,31608331	2,48399207	8,27111842
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P166023	PFDN4	Prefoldin 4	4,12101149	1,04	0,25236523	2,05853781	8,27111842
AGI_OLIGO_NM_002858_2_3244	ABCD3	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 3	4,08964549	1,585	0,38756416	2,90682004	8,27111842
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P208208	ZNF649	Hypothetical protein FLJ12644	3,88273241	1,2625	0,32515761	2,40228103	11,3727878
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P12282	DYRK3	Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 3	3,78509977	1,755	0,46366017	3,51463633	11,3727878
AGI_OLIGO_NM_000900_1_59	MGP	Matrix Gla protein	3,76658002	2,71	0,71948558	7,08258489	11,3727878
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P98092	OAT	Ornithine aminotransferase (gyrate atrophy)	3,73045511	2,3375	0,62659915	4,52843518	11,3727878
AGI_OLIGO_NM_005229_2_2054	ELK1	ELK1, member of ETS oncogene family	3,72542062	0,8025	0,21541192	1,74737267	11,3727878
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P29975	C4orf19	Hypothetical protein FLJ11017	3,62981045	1,79	0,4931387	3,72802912	11,9713556
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P73717	RRAGB	Ras-related GTP binding B	3,62564776	1,115	0,30753125	2,17369583	11,9713556
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P203305	IMMP1L	Hypothetical protein FLJ25059	3,60427733	1,205	0,33432499	2,28101474	11,9713556
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P68486	C20orf108	Chromosome 20 open reading frame 108	3,54005203	1,0625	0,30013683	2,07590625	11,9713556
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P103675	NES	Nestin	3,52801087	2,0025	0,56760029	4,3250555	11,9713556
AGI_OLIGO_AK095824_1_1046	C9orf150	Chromosome 9 open reading frame 150	3,48425829	1,565	0,44916303	2,99401908	17,8715237
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P168443	EPHB4	EPH receptor B4	3,45457226	0,9325	0,26993212	1,91865603	17,8715237
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P142146	RPL18	Ribosomal protein L18	3,44984282	0,855	0,24783738	1,81842925	17,8715237
AGI_OLIGO_NM_006646_3_4682	WASF3	WAS protein family, member 3	3,35660436	1,95	0,58094425	4,1687052	17,8715237
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P63829	HSPA14	Heat shock 70KDa protein 14	3,33524682	1,2725	0,38153098	2,44711796	17,8715237
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P164912	LIN7B	Lin-7 homolog B ( <i>C. elegans</i> )	3,31298039	1,5475	0,46710207	2,91479969	17,8715237
AGI_HUM1_OLIGO_A_23_P30243	ERAP2	Leukocyte-derived arginine aminopeptidase	-7,09958362	-2,835	0,39931919	0,13746052	0

**Tabla 47.** Genes diferencialmente expresados entre tumores basales quimiosensibles (RBC-O, RBC-I) y resistentes (RBC-II, RBC-III) obtenido mediante análisis supervisado de *microarrays*. Se muestran los valores del *SAM score*, *fold change* y *q value*. Los genes en rojo están sobreexpresados en tumores resistentes y en verde aparece el gen ERAP2 regulado a la baja en tumores resistentes.

# DISCUSIÓN





---

## 5.1 FACTORES PREDICTIVOS: ESTUDIOS GENÉTICOS VS CRIBADO GENÓMICO.

La mejora en la detección precoz así como el avance en el conocimiento de las bases moleculares del cáncer de mama (con la consecuente aparición de tratamientos más eficaces) han permitido una reducción considerable de la mortalidad de esta enfermedad. No obstante, en torno al 30 % de las pacientes que se les diagnostica un tumor mamario en estadios iniciales tiene recaídas (111).

Actualmente, disponemos de agentes citostáticos, hormonoterapia e inmunoterapia para el tratamiento de esta enfermedad. Sin embargo, muchos de estos fármacos tienen toxicidades elevadas y por tanto, resulta imprescindible disponer de marcadores que ayuden a decidir al clínico, qué pacientes es necesario tratar y qué terapia elegir en cada caso.

Un **factor pronóstico** se define como un parámetro medible, disponible al diagnóstico, que informa sobre el curso de la enfermedad. Los factores pronósticos clásicos del cáncer de mama son el número de ganglios positivos, el tamaño del tumor, el grado histológico y el estatus de receptores hormonales. Un **factor predictivo** es un parámetro medible, que informa sobre el grado de respuesta hacia una terapia determinada. Los factores pronósticos y predictivos son empleados en la clínica para decidir a quién se trata y cómo se trata.

El consenso del NIH para el tratamiento del cáncer de mama (112) establece que la **terapia hormonal** debe de ser ofrecida a todos aquellos pacientes con **receptores hormonales positivos**. Igualmente, establece que la **poliquimioterapia** beneficia a la mayoría de las pacientes con tumores localizados con independencia de los ganglios linfáticos, el estatus de los receptores hormonales y la menopausia. Además, las pacientes con alto riesgo de recurrencia local (aquellas con 4 o más ganglios positivos o cáncer avanzado) deben de ser tratadas con radioterapia. Por otro lado, se ha demostrado que el tratamiento con **trastuzumab** beneficia a las pacientes **HER2** positivas (113-115).

En cualquier caso, se requieren más factores pronósticos que determinen qué pacientes tratar y más factores predictivos que establezcan cómo tratar. Además, se requieren fármacos más específicos que actúen frente a dianas características de tumores determinados. En ambos casos la genómica parece ofrecer muchas posibilidades.

El uso de **microarrays** permite medir miles de RNAs mensajeros en un solo experimento y establecer perfiles de expresión. Se ha visto que determinados perfiles expresión se correlacionan con el pronóstico de la enfermedad. En este sentido se han desarrollado varias firmas genómicas capaces de identificar los pacientes a tratar. En este

momento, la única firma con autorización por FDA para uso clínico es el *Mammaprint*<sup>®</sup> desarrollada por el grupo holandés (27). Esta firma clasifica a los pacientes en dos categorías de buen y mal pronóstico. La firma tiene autorización para comercialización como factor pronóstico en pacientes menores de 61 años, con estadios I o II, ganglios negativos y tamaño tumoral menor de 5 cm, aunque el grupo holandés ha demostrado la eficacia de la firma en pacientes con ganglios positivos (28, 116). Además, existen otras firmas en proceso de comercialización como, por ejemplo, *Oncotype DX*, desarrollada para predecir el riesgo de recurrencia en pacientes con tumores con RE positivos, ganglios negativos, tratados con **tamoxifeno** (117). Por lo tanto, los datos obtenidos a partir de *microarrays* pueden ser empleados para evaluar el pronóstico del paciente en función de las distintas firmas publicadas. Tal cantidad de información puede ser obtenida mediante un solo experimento, es decir, de manera muy eficiente.

En cualquier caso, la inclusión de la genómica en la clínica parece complicada; primero porque en muchos casos para la obtención de resultados fiables se requiere que el material de partida sea tumor fresco congelado y esto no es posible en muchas ocasiones. Por otro lado, los estudios genómicos requieren equipos multidisciplinares que incluyan personas formadas en biología molecular, bioestadística y bioinformática además de infraestructuras especiales. Esto parece poco viable en muchos casos, ya que son pocos los hospitales españoles que cuentan con Servicios de Genética y no existe, por el momento, en nuestro país, ningún hospital con un servicio de genómica potente capaz de llevar a cabo estos estudios. Por otro lado, apenas hay personal suficientemente formado en los hospitales como para establecer las necesidades y requisitos de un servicio de genómica que ofrezca garantías. Todo esto dificulta mucho hacer ensayos clínicos que evalúen la eficacia de firmas genómicas en nuestro país, así como el desarrollo de las mismas. En cualquier caso, todos los problemas expuestos anteriormente se podrían solventar con los programas de Redes y CIBER creados por el Instituto de Salud Carlos III. De hecho, ya se están haciendo trabajos en red pero el fruto de estas colaboraciones todavía no se ha podido evaluar ya que es poco tiempo de desarrollo.

Por el contrario, los estudios moleculares de genes determinados se hacen de rutina en muchos hospitales españoles. Por tanto, el estudio de genes concretos como **factores predictivos** de respuesta parece mucho más factible. Tal es el caso de **KRAS**, de mutaciones en el gen cKit, mutaciones en el dominio tirosina Kinasa del EGFR...etc. Así, por ejemplo, se ha visto que pacientes con mutación en el gen **KRAS** no se benefician del tratamiento con inhibidores de factores de crecimiento epidérmico como el **cetuximab** o el **panitumumab** (22,118,119), por lo que es necesario determinar si **KRAS** está mutado antes de iniciar el tratamiento con dichos fármacos. Sin embargo, se sabe que sólo el 60% de los pacientes con **KRAS** nativo se benefician de la terapia con inhibidores del **EGFR**. Por este motivo se están estudiando alteraciones en otros genes

implicados en la vía del **EGFR** y su posible valor predictivo de respuesta al tratamiento con dichos inhibidores.

La opinión, prácticamente unánime, en cuanto al uso de la genómica para el desarrollo de nuevos fármacos, es que esta tecnología es de gran utilidad ya que permite determinar qué genes están alterados en los distintos tumores, y por tanto, establecer posibles dianas farmacológicas de una manera notoriamente eficiente (120).

Además, el uso de la genómica en ensayos clínicos permite una selección de pacientes más precisa. En muchos casos, esto se traduce en una disminución del número de pacientes requeridos para probar la eficacia de un fármaco nuevo o bien demostrar el beneficio de un fármaco ya comercializado para una nueva indicación. La inclusión de un menor número de pacientes en el ensayo reduce considerablemente el coste y la duración del mismo, con lo que la autorización de comercialización se consigue antes y a menor precio (121).

Por todo esto, la búsqueda de factores predictivos mediante la genómica parece más eficaz que el estudio de genes particulares. Concretamente, en este estudio vemos que el valor informativo tanto del genotipado de **GST** como del estatus de la expresión de **TOP2A** es menor que el que ofrece el conocimiento del subtipo genómico. Por eso, a pesar de los recursos, tanto humanos como tecnológicos, que supone hacer estudios genómicos en los hospitales, se deben superar estas limitaciones y apostar por investigación traslacional desarrollada con tecnologías punteras.

También, la genómica ha sido primordial para establecer que el cáncer de mama no es una enfermedad sino varias y ha permitido caracterizar qué genes son importantes en cada subtipo, entendiendo por "importantes" aquellos genes que están altamente expresados o regulados a la baja en cada subtipo (29-30). Por el contrario, mediante esta tecnología es difícil identificar aquellos genes cuya expresión variase poco entre unos subtipos y otros pero que dicha variación fuera, aunque mínima, crucial para determinar un fenotipo concreto.

En definitiva, el uso de *microarrays* de cDNA ha permitido un avance considerable en el conocimiento de la biología de la célula tumoral. La próxima generación de *microarrays* de DNA (microRNA arrays, CGH arrays, SNP chips...etc.) va a permitir a los investigadores evaluar el potencial informativo de otras moléculas como los microRNAs, pseudogenes...etc., además de obtener más información de manera más eficiente.

Por último, la utilización de los *microarrays* como herramienta a la hora de elegir y pautar un tratamiento determinado debe de ser evaluado mediante ensayos clínicos y estudios prospectivos. Existen ya varios ensayos que intentan evaluar este potencial.

## 5.2 VALOR DE GST COMO MARCADOR DE RESPUESTA

Las frecuencias para los alelos nulos<sup>30</sup> de **GSTM1** y **GSTT1** varían en función de los distintos trabajos publicados. En nuestra población, la frecuencia del alelo nulo del gen **GSTM1** es de 0,696. Este valor es muy similar al que encuentran Ann Moyer y cols en población caucásica sana (0,710) (89) y Christine Ambrosone y cols (55) en pacientes caucásicas de cáncer de mama (0,678). Respecto al gen **GSTT1**, hemos visto que la frecuencia del alelo nulo es de 0,439. Según el trabajo de Ann Moyer y cols (89) la frecuencia del alelo nulo es de 0,335, mientras que Christine Ambrosone y cols (55) encuentran que en pacientes con cáncer de mama la frecuencia es de 0,509.

En relación al **SNP A342G** del gen **GSTP1**, observamos que el 48% de los individuos son homocigotos **AA**, el 39% de los individuos son heterocigotos y un 13% son homocigotos **GG**. Esta distribución es similar a la publicada en un trabajo de Carol Sweeney y cols (56) según el cual el 48% de individuos son **AA**, el 42% son heterocigotos y el 10% son homocigotos **GG**.

Existen muchos trabajos publicados que estudian la asociación entre la delección homocigota de **GSTM1**, **GSTT1** y el cambio **A342G** en **GSTP1** y el riesgo de padecer cáncer de mama. En un principio, el estudio de Helzlsouer KJ y cols (122) que analizaba los genotipos de 110 casos y 115 controles concluía que el alelo nulo de **GSTM1** se asociaba a un mayor riesgo de cáncer de mama, especialmente en mujeres postmenopáusicas (OR: 2.50; 95% IC: 1.34-4.65). Sin embargo, no encontraron una asociación estadísticamente significativa entre el alelo nulo de **GSTT1** y el genotipo **GG** del **SNP A342G** y un mayor riesgo para esta enfermedad.

Otro estudio más reciente (123) en el que se analizan 2048 casos de cáncer de mama y 1969 controles concluye que ni la delección homocigota de **GSTM1** ni de **GSTT1** confiere un mayor riesgo de tener un tumor mamario, siendo los OR para ambos genes de 0.98 (95% IC: 0.86-1.12), 1.11 (95% IC: 0.87-1.41) respectivamente. Del mismo modo, en el mismo estudio, establecen que el alelo **G** del **SNP A342G** de **GSTP1** no confiere riesgo para dicha enfermedad. Además, observaron que el riesgo no se modificaba al estratificar por factores reproductivos o por hábitos como el tabaco.

Por último, otro estudio realizado en pacientes portadores de mutaciones en **BRCA1** y **BRCA2** (54) encuentra que las mujeres portadores de mutaciones en **BRCA2** y del alelo **G** en **GSTP1** tienen un riesgo aumentado de padecer cáncer de mama, siendo el riesgo mayor en individuos homocigotos **GG**.

---

<sup>30</sup> Alelo nulo: se refiere al alelo que tiene el gen delecionado.

En el estudio de Christine Ambrosone y cols. (55) se evalúa de forma retrospectiva la asociación de la delección homocigota de *GSTM1* y *GSTT1* y la supervivencia, en una cohorte de 251 pacientes, de las cuales el 79% fueron tratadas con FAC. Tras ajustar por edad, raza y estadiaje encuentran que la delección homocigota de cualquiera de los dos genes aumenta la supervivencia aunque no de forma significativa. Además, exponen que la delección homocigota de al menos uno de los dos genes reduce en un tercio el riesgo de muerte (HR: 0,28; IC: 0,11-0,70). En nuestro estudio no hemos encontrado una asociación tan fuerte y sólo vemos esta tendencia en los pacientes tratados con adriamicina. Los pacientes tratados con docetaxel no muestran este comportamiento.

Como se ha comentado en la introducción, los enzimas *GST* aclaran sustancias tóxicas para las células cómo las **especies reactivas de oxígeno (ROS)**, por lo que la expresión de *GST* puede determinar potencia citotóxica de algunos fármacos.

La citotoxicidad de muchos agentes quimioterápicos se debe en muchos casos a la generación de **ROS**. Varios estudios muestran que los pacientes tratados con agentes citotóxicos presentan niveles aumentados de productos resultantes de peroxidación (124-125). En particular, se sabe que la exposición a adriamicina aumenta la formación de radicales libres responsables de la citotoxicidad del fármaco (126-127). Aun más, la peroxidación de lípidos subsecuente al tratamiento con adriamicina produce hidroalquenos que son substratos de las isoenzimas de **GST** (128). De hecho, algunos autores piensan que el mecanismo de **citotoxicidad** principal de la adriamicina es a través de la generación de **ROS** (129-130).

El tratamiento de cultivos celulares con paclitaxel, una molécula con estructura muy similar al docetaxel, también produce un aumento de **ROS** a través de la activación de la **NADPH oxidasa (NOX)** asociada a la membrana plasmática. Este incremento de **ROS** (fundamentalmente de  $H_2O_2$  y  $O_2^-$ ) se produce a nivel extracelular (131) y tiene un efecto letal sobre las células cancerosas adyacentes. Este mecanismo no se observa en células tratadas con adriamicina. Además, la  $CI_{50}$ <sup>31</sup> del paclitaxel puede aumentar en 4 veces cuando se añade glutatión reducido a cultivos celulares (132).

En cualquier caso, la citotoxicidad mediada por **ROS** en tumores humanos tratados con docetaxel está poco documentada y quizás sea un mecanismo secundario.

Nuestros resultados sugieren que la delección homocigota de al menos uno de los genes podría aumentar la eficacia de la adriamicina pero no ha docetaxel. Esto nos sugiere que la citotoxicidad mediada por **ROS** sea un mecanismo más relevante en tumores tratados con adriamicina, o bien que **GSTM1** y **GSTT1** codifiquen para isoenzimas que

---

<sup>31</sup> **CI50 (Concentración inhibitoria 50)**: Concentración de un tóxico a la que se produce la inhibición del crecimiento del 50% de las células de un cultivo.

preferentemente inactiven **ROS** generadas a partir del tratamiento con adriamicina (hidroalquenos) pero no de  $H_2O_2$  y  $O_2^-$  producidos a partir del tratamiento con docetaxel.

Según los datos obtenidos a partir de *microarrays*, la expresión de los genes **GSTM1** y **GSTT1** en tumores de mama es muy residual. Sin embargo, no sabemos si puede existir una activación de estos genes tras el tratamiento y si este hecho disminuiría la potencia de la adriamicina. En cualquier caso, esta activación no podría ser posible en aquellos individuos homocigotos para la delección.

La débil asociación encontrada en el grupo de adriamicina puede ser debida al escaso número de pacientes (90), o bien a que en nuestro estudio los pacientes están tratados en monoterapia mientras que en el de Christine Ambrosone y cols (55) las pacientes están tratadas en su mayoría con FAC. Se sabe que la ciclofosfamida también debe parte del efecto citotóxico a la generación de **ROS** (133-134). Además, muchas de estas pacientes fueron sometidas a radioterapia que también debe su efecto citotóxico al aumento de **ROS** (135).

El SNP **A342G** de **GSTP1** determina un cambio de aminoácidos **Ile**<sup>105</sup>**Val**. El enzima que contiene el aminoácido valina tiene menor actividad catalítica.

En el trabajo de Carol Sweeney y cols (56) encuentran que los pacientes de cáncer de mama homocigotos Val/Val tienen una mayor supervivencia respecto de los pacientes con genotipos Ile/Ile (HR: 0,3; IC: 0,1-1). En este estudio la mayoría de los pacientes fueron tratados con regímenes que contenían ciclofosfamida. En nuestro trabajo sólo encontramos que los pacientes Val/Val tienden a tener mejores respuestas a adriamicina pero no a docetaxel. Se sabe que **GSTP1** tiene especificidad para conjugar metabolitos intermedios de la ciclofosfamida (136). Este puede ser el motivo por el que no encontramos una asociación tan clara como la que encuentran Carol Sweeney y cols, ya que en nuestra cohorte no tenemos pacientes tratados con este fármaco. En cualquier caso, nuestros datos sugieren que **GSTP1** pudiera estar implicado en el metabolismo de la adriamicina pero no del docetaxel.

En nuestro trabajo hemos encontrado que la media de **expresión** de **GSTP1** es menor en pacientes quimiosensibles a adriamicina. El aumento de la expresión de este gen se ha correlacionado, en cultivos celulares (MCF-7), con la resistencia a adriamicina (137). En otro estudio en el que se evalúa la apoptosis de tejidos mamarios sometidos a estrés oxidativo, así como la expresión de **GSTP1** por IHQ encuentran que la tasa de apoptosis es menor en aquellos tumores que sobreexpresan **GSTP1** (138). Esto sugiere que el aumento de la expresión de **GSTP1** determina un aclaramiento celular de ROS, tóxicas para las células permitiendo a los tumores resistir al efecto de la adriamicina.

Además, hemos observado que la expresión de **GSTP1** se asocia al subtipo basal que es resistente a este fármaco. Al igual que nosotros, otros estudios encuentran una asociación entre la expresión de *GSTP1* y tumores con receptores hormonales negativos (139). También, en el mismo estudio, encuentran que la expresión del gen se asocia a una menor supervivencia.

El cribado del alelo nulo de *GSTM1* y *GSTT1* así como la detección del SNP A342G es sencillo y barato. A partir de nuestros datos no podemos concluir si el cribado de estos genes sería beneficioso para aquellas pacientes tratadas con adriamicina, pero parece razonable hacer estudios prospectivos que esclarezcan esta situación. Además, sería interesante estudiar la cardiotoxicidad tanto aguda como leve y moderada de estas pacientes y su relación con el genotipado.

---

### 5.3 QUIMIOSENSIBILIDAD DE TUMORES HER2

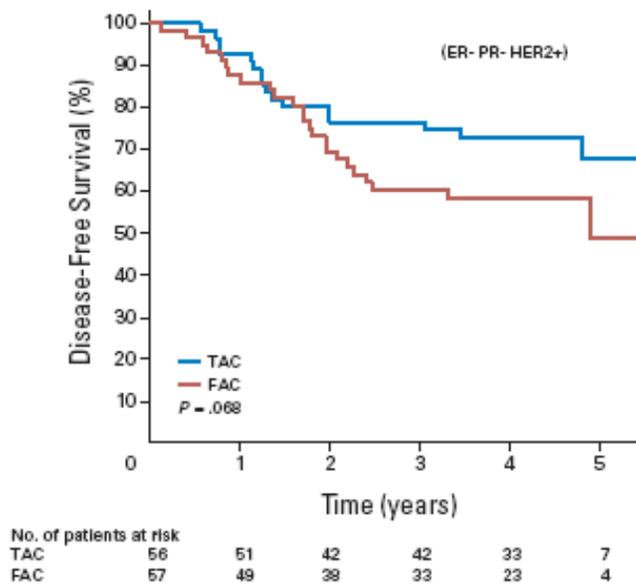
Varios estudios proponen que la sobreexpresión de **HER2** podría emplearse como marcador de la respuesta a **adriamicina**. Así, Thor y cols (140), en 1998 analizaron en 992 tumores de mama, con ganglios positivos, la expresión de HER2 y p53 con relación a la respuesta al tratamiento con FAC. En el análisis multivariante se objetivó el beneficio de la quimioterapia intensiva en los grupos con tinción positiva para HER2 y que habían recibido FAC. De manera similar, Paik y cols. (141) objetivaron un beneficio del tratamiento adyuvante PAF (mostaza L-fenilalanina, adriamicina y 5-fluorouracilo) sobre PF en tumores HER2 positivos. Este estudio se basó en el seguimiento durante una media de 13,5 años de 682 pacientes. El intervalo libre de enfermedad y la supervivencia global fueron significativamente mejores en el grupo con tumores HER2 positivos tratados con PAF. Igualmente, en otro estudio posterior del NSABBP (142), en el que los pacientes fueron tratados con AC, CMF o AC seguido de CMF se encuentra que la tasa de respuestas fue superior en pacientes HER2 positivos tratados con AC aunque esta asociación no llega a alcanzar significación estadística.

Por el contrario, un estudio similar al nuestro en el que 90 pacientes diagnosticadas de **CLAM** tratadas con adriamicina en monoterapia (143), establece que la sobreexpresión de HER2, objetivada por IHQ, se correlaciona con peores respuestas ( $p=0,041$ ). Otro estudio de T.Petit y cols (63) concluye que ni la sobreexpresión ni la amplificación de HER2 son factores predictivos de la respuesta a antraciclinas. En este caso las pacientes fueron tratadas con FEC.

En nuestro trabajo encontramos que los tumores HER2 positivos responden mejor a la adriamicina en monoterapia respecto de los HER2 negativos. Esto concuerda, por un lado, con nuestros datos obtenidos de los estudios genómicos, en los que observamos que los tumores de subtipo genómico *Her2-enriched* son los más quimiosensibles a la adriamicina junto con los tumores *claudin-low*. Por otro lado, nuestros resultados también coinciden con los de Thor y Paik (140-141) teniendo en cuenta que estos datos son lo suficientemente robustos ya que se llevaron a cabo en un gran número de pacientes. Otro estudio que ratifica nuestros resultados es el de Pritchard y cols (144). En este estudio se evaluó la eficacia de CMF vs CEF en 710 pacientes premenopáusicas con ganglios positivos (estudio canadiense MA.5). También, se estudió tanto la expresión de HER2 mediante IHQ así como la amplificación por FISH. Los autores concluyen que la amplificación de HER2 se asocia a un peor pronóstico con independencia de la rama de tratamiento. Además, el tratamiento CEF se asoció a una mayor supervivencia global y un mayor periodo libre de enfermedad en las pacientes con amplificación de HER2.

Respecto al **docetaxel**, algunos autores indican que es eficaz en tumores **HER2** positivos con la ventaja respecto a la adriamicina de que no es tan cardiotoxico y por tanto podría ser empleado en terapia concomitante con **trastuzumab (145)**.

Sólo hemos encontrado en la literatura un trabajo en el que establezca la tasa de respuestas al **docetaxel en monoterapia** pacientes **HER2** positivos **(146)**. Según este estudio, en el que sólo se incluyen 36 pacientes, el estatus del receptor de **HER2** no sería predictivo de la respuesta a dicho fármaco. Este resultado es opuesto al nuestro. Sin embargo, en otro estudio reciente de Judith Hugh y cols **(147)**, se analizaron datos de **IHQ** de 1350 tratadas con **FAC** vs **TAC**. Entre otros hechos los autores observan que la supervivencia de pacientes con tumores **HER2** positivos es superior en el grupo tratado con **TAC** respecto de **FAC** ( $p=0,068$ ) (gráfico 50), sugiriendo que el tratamiento con docetaxel beneficiaría a las pacientes **HER2** positivas. Aunque el resultado no es estadísticamente significativo, los datos parecen más robustos que en el caso anterior, que incluye sólo a 36 pacientes, mientras que en este último se trata de un estudio en el que se incluyeron 1350 pacientes.



**Gráfico 50.** Supervivencia libre de enfermedad en pacientes **HER2** positivos tratados con **TAC** y **FAC**.

Además, nuestros resultados parecen congruentes ya que, de manera independiente, observamos que tanto los tumores con subtipos genómicos *Her2-enriched* como los **HER2** positivos se benefician de la terapia con docetaxel.

Por último, a pesar de que los tumores HER2 positivos parecen beneficiarse de la terapia con adriamicina (140-142) el uso concomitante de este fármaco con **trastuzumab** tiene efectos cardiotoxicos severos, tal y como demuestra un estudio de Slamon y cols (148). En este estudio se pone de manifiesto que la adición de trastuzumab tanto a los regímenes con adriamicina o docetaxel aumenta de forma significativa tanto las tasas de respuestas como la supervivencia global respecto de los regímenes sin trastuzumab. Sin embargo, a pesar de la eficacia demostrada, la combinación trastuzumab-adriamicina se considera inaceptable según criterios de la NYHA (New York Heart Association) ya que la tasa de cardiotoxicidad severa (tipo III/IV) es muy elevada (16%). La combinación taxanos trastuzumab también se asocia a un incremento de cardiotoxicidad tipo III/IV pero en menor medida (148-149).

En nuestro estudio, no hemos objetivado una mayor eficacia de la adriamicina en los tumores HER2 positivos respecto de los tratados con docetaxel. Por lo tanto, según nuestros datos, la administración de combinaciones trastuzumab-taxanos sería ventajosa en las pacientes HER2 positivos ya que la toxicidad cardiaca sería menor. En este sentido nuestros datos coinciden con los ensayo BCIRG 006 presentados por Slamon y cols en SABCS 2005 (115). En este estudio se compara AC seguido de TXT con AC seguido de TXT y trastuzumab y TXT, carboplatino y trastuzumab (TCH) en pacientes HER2 positivas. Las dos ramas que contenían trastuzumab fueron significativamente superiores a la rama que no lo contenía. Según los resultados, la rama de tratamiento AC→TH no presentó una mayor supervivencia libre de enfermedad ni mayor supervivencia global de forma significativa respecto de la rama de tratamiento TCH. Sin embargo, las toxicidades tanto cardiacas como la leucemia asociada a los regímenes AC fueron significativamente mayor en la rama AC→TH.

---

## 5.4 LA TOP2A MITOS Y REALIDADES.

Dentro del arsenal terapéutico disponible para el tratamiento del cáncer de mama las antraciclinas suponen un elemento indispensable, ya que se emplean frecuentemente y desde hace tiempo en el tratamiento de la enfermedad. No obstante, no se conocen factores predictivos eficientes que establezcan que pacientes van a responder.

La **TOP2A** está considerada ser la diana molecular de las antraciclinas, es por ello que el posible **valor predictivo** de la TOP2A ha sido objeto de numerosas publicaciones. Sin embargo, actualmente, aún no está esclarecido este posible papel ya que los datos publicados son contradictorios, pues mientras unos le atribuyen un valor predictivo a la **expresión** de dicho enzima (**66,74**) otros no encuentran asociación entre la respuesta y el estado enzimático (**64**). Por otro lado, según algunos autores, la amplificación de TOP2A se asocia a mejores respuestas con **antraciclinas** en pacientes **HER2** positivos (**67**). No obstante, se ha visto que la amplificación no siempre se correlaciona con una sobreexpresión de la proteína (**68, 150**) lo que sugiere que el "gen predictivo" de la respuesta al tratamiento sea otro que coamplifique junto con TOP2A. Además, la amplificación del gen es un evento poco frecuente por lo que no parece interesante utilizar este parámetro como posible factor predictivo (**151**).

En cualquier caso, la búsqueda de factores predictivos de respuesta a antraciclinas continúa. Di Leo y cols (**152**) presentaron en el congreso de la CTRC-AACR en diciembre del 2008 los datos de un análisis conjunto de 4 estudios adyuvantes (canadiense, británico, danés y belga) que compararon combinaciones de antraciclinas con CMF. Analizaron TOP2A y HER2 por FISH en 1944 pacientes. Globalmente, tanto HER2 como TOP2A tuvieron un moderado poder predictivo (con significación estadística al límite) de la respuesta a antraciclinas. Del mismo modo, O'Malley y cols (**153**) estudiaron las alteraciones a nivel de DNA de TOP2A y HER2, por FISH, en 438 pacientes del estudio canadiense MA.5, que habían sido tratadas con CMF o CEF. Los autores encuentran que aquellas pacientes con **amplificación o delección de TOP2A** se beneficiaban del tratamiento con antraciclinas, ya que la supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad fueron mayores en las pacientes tratadas con CEF. En este ensayo HER2 había demostrado ser predictivo de la respuesta al tratamiento con antraciclinas (**144**).

Por otro lado, Barlett y cols (**75**) analizaron el valor predictivo de la **polisomía del cromosoma 17** en dos estudios adyuvantes de antraciclinas versus CMF en los que el valor predictivo de la amplificación de TOP2A fue opuesto (positivo en el estudio canadiense MA.5 y negativo en el británico BR9601). La polisomía del cromosoma 17 fue determinada por FISH con control centromérico, encontrando que existía polisomía de este cromosoma en el 40% de los casos, estando asociada una menor supervivencia. En las enfermas con polisomía del cromosoma 17, las combinaciones con antraciclinas fueron superiores a CMF, lo que no ocurrió en las restantes pacientes, por lo que

sugieren que la polisomía (y no la amplificación de **TOP2A**) podría ser el verdadero factor predictivo de respuesta a antraciclinas. En cualquier caso, no está claro que la determinación de polisomía del cromosoma 17 mediante FISH con control centromérico se pueda considerar como factor predictivo, como demostró un estudio de la Universidad de Texas presentado en el mismo congreso (154). La definición de polisomía de acuerdo con la técnica FISH se basa en la existencia de más de 3 copias del cromosoma, aunque la prueba realmente sólo determina la existencia de más de 3 centrómeros por célula tumoral. Los investigadores de Houston encontraron mediante hibridación genómica comparada, que el estatus del centrómero no reflejaba el estatus del cromosoma 17. En realidad, no encontraron ningún caso de polisomía real del cromosoma 17 en 95 cánceres de mama, aunque había 6 casos con **amplificación centromérica**. Por ello, sugieren que se utilice el término de amplificación centromérica del cromosoma 17 en lugar de polisomía del cromosoma 17.

Finalmente, comentar el estudio TOP (155) que incluyó 149 pacientes con cáncer de mama, sin expresión de RE, tratadas con epirrubicina neoadyuvante. En este estudio, la amplificación de **TOP2A** siempre ocurrió junto con la **amplificación de HER2** y se asoció a la respuesta a epirrubicina. Por otro lado, ni los niveles de mRNA ni la expresión de la proteína predijeron respuesta. La polisomía del cromosoma 17 tampoco se asoció a la respuesta a epirrubicina.

En resumen, a pesar de los múltiples trabajos realizados, todavía no está claro si **TOP2A** tiene o no un valor predictivo en pacientes tratadas con adriamicina. A raíz de los últimos datos publicados, parece ser que las alteraciones en el número de copias del gen (amplificaciones, deleciones) podrían ser predictivas de la respuesta a antraciclinas.

Según nuestros datos, no encontramos una asociación clara entre la respuesta a adriamicina y la **expresión de TOP2A**, si bien observamos que los tumores que sobreexpresan dicho enzima tienden a tener mejores respuestas, lo que no ocurre en tumores tratados con docetaxel. Únicamente encontramos una asociación estadística si no consideramos los subtipos basales y *claudin-low*. Tampoco encontramos ninguna asociación entre la respuesta y las **alteraciones a nivel del DNA del gen**. Quizás, sea más adecuado estudiar el posible valor predictivo de **TOP2A** en los distintos subtipos genómicos puesto que la tanto la expresión de este gen como las alteraciones a nivel de DNA difieren según el subtipo.

Según algunos autores **TOP2A** siempre coamplifica con **HER2 (155-156)** mientras que otros (como en nuestro caso) encuentran amplificaciones de **TOP2A** sin coamplificación de **HER2** en aproximadamente un tercio de las pacientes (153).

En cualquier caso, parece que el estatus de **HER2** predice la respuesta a antraciclinas y en este aspecto hay menos controversia. Del mismo modo, nosotros encontramos que

tanto los tumores HER2 positivos como del subtipo genómico *Her2-enriched* tienden a responder mejor a las antraciclinas que otros tumores. Sin embargo, **TOP2A** no nos ofrece información en cuanto a la sensibilidad a antraciclinas.

Más consenso hay en cuanto a la biología del enzima. Varios estudios coinciden en que la expresión de **TOP2A** se asocia con tumores de mama de alto grado, con alta tasa de **proliferación celular (63, 64, 157, 158)**. Así Järvinen TA y cols evaluaron la expresión de TOP2A por IHQ en 230 tumores y observaron que la expresión del gen se correlacionaba aneuploidías, la expresión de HER2 y de forma más llamativa con la proliferación celular **(159)**. Esto no sólo se observa en tumores de mama sino que también ocurre en otros tipos tumorales como hepatocarcinomas, en los que la expresión del enzima se asocia a un mayor grado histológico, microvascularización, menor edad al diagnóstico y menor supervivencia **(160)**. También, en carcinomas de laringe la expresión de TOP2A parece asociarse a una mayor agresividad del tumor **(161)**. En este aspecto nuestros resultados coinciden con los datos ya publicados, ya que observamos una correlación entre la expresión del enzima y la proliferación celular. Además, observamos que la expresión del enzima difiere según el subtipo genómico siendo mayor en los subtipos **basal** y **luminal B** de tipo proliferativo. Aunque, a día de hoy, no hay publicaciones en las que se correlacione el subtipo genómico con la expresión de TOP2A, en un trabajo de Tan DS encuentran que los tumores triple negativos expresan TOP2A en altos niveles **(162)** coincidiendo, por tanto, con nuestros resultados.

Por último, se puede concluir que **TOP2A** es un **marcador del grado de proliferación celular** y de la **agresividad** del tumor tanto en cáncer de mama como en otros tipos de tumores mientras que su valor predictivo de la respuesta a adriamicina está en entredicho y debería de ser estudiado para cada subtipo. Por consiguiente, parece más razonable emplear esta variable como un **factor pronóstico** y no cómo factor predictivo.

---

## 5.5 GENÓMICA DEL CÁNCER DE MAMA. APLICABILIDAD CLÍNICA

### 5.5.1 VALOR DE LA CLASIFICACIÓN GENÓMICA DEL CÁNCER DE MAMA

Tal y como otros investigadores han establecido anteriormente (30,32, 33), existe una estrecha correlación entre el subtipo genómico y las características fenotípicas del tumor como son: el estatus de RE, RP y HER2, el grado histológico, el grado de proliferación celular, el pronóstico de la enfermedad...etc. Así, por ejemplo, varios autores han constatado la agresividad de los tumores basales con peor pronóstico y alta capacidad proliferativa (69,163). Esto parece lógico ya que estos tumores, al igual que los tumores *Her2-enriched*, expresan genes de tipo proliferativo (29,164).

Dada la alta **correlación entre el subtipo y el estatus de los receptores**, son varios los estudios que intentan determinar qué proteínas se pueden medir por IHQ a fin de tipificar los tumores según la clasificación de Perou pero de una forma más sencilla, aplicable a la rutina en la clínica. De este modo, se ha establecido que los tumores **basales** se identifican por ser triple negativos y por ser EGFR o bien citoqueratinas 5 y 6 positivos. Este panel de 5 marcadores identifica a los tumores basales con una especificidad del 100% aunque la sensibilidad es del 76% (165). Es decir, por este método no se detectarían un 25% de posibles tumores basales. Por otro lado, Maggie Cheang y cols establecen que para distinguir entre los tumores **luminal A y B** se deben de medir el RE, RP, HER2 y Ki67. De manera que los tumores luminales B son aquellos con RE positivos y que expresan o bien HER2 o bien Ki67, siendo el punto de corte de Ki67 adecuado para distinguir entre tumores luminales A y B de 13.25% (166).

En este trabajo observamos una alta correlación entre la IHQ y la genómica. No obstante, el 21% de los tumores con RE positivos no son luminales, el 38% de los tumores RE negativos y HER2 positivos no son *Her2-enriched* y hasta 47% de los tumores triple negativos no son basales. En otras palabras, los datos son discordantes en un porcentaje no desdeñable. Desde nuestro punto de vista, creemos que las características fenotípicas atribuidas a los tumores triple negativos (mayor proliferación, mayor agresividad...etc.) son las características de los tumores basales que son el subtipo mayoritario de este grupo. Lo mismo pensamos acerca de los demás grupos. Por otro lado, parece lógico pensar que una clasificación que tiene en cuenta la expresión de 50 genes discrimina mejor que otra que sólo considera la expresión de tres (RE, RP y HER2). La discriminación precisa del subtipo tumoral es importante, ya que puede determinar el pronóstico de los pacientes puesto que las decisiones clínicas son distintas en función del tipo de tumor. Puesto que la clasificación genómica parece más precisa que la clasificación por IHQ, pensamos que el estudio genómico de los tumores puede traducirse en una mayor calidad asistencial.

Por otro lado, los diferentes subtipos genómicos difieren considerablemente desde el punto de vista molecular ya que el estatus transcripcional es muy distinto entre los subtipos. Además, el análisis de tumores de mama por CGH ha puesto de manifiesto que las **aberraciones genómicas** a nivel de DNA tumoral son distintas en función de los subtipos. Así, por ejemplo, se ha visto que las alteraciones en el número de copias de genes son más frecuentes en los subtipos basales, lo que induce a pensar que estos tumores tienen una mayor inestabilidad genética (167-169). Al mismo tiempo, los tumores basales se caracterizan por ganancias, de bajo nivel, en el número de copias de genes, y que afectan a regiones cromosómicas concretas, siendo infrecuente, en estos tumores, las grandes amplificaciones que ocurren al azar en cualquier locus. Esto último es más frecuente en tumores del tipo luminal B o *Her2-enriched* (170-171).

Estas diferencias genómicas sugieren que los tumores provienen de células iniciadoras de tumores diferentes (172-173) que originan tumores biológicamente muy distintos con distinto pronóstico y quimiosensibilidad.

Respecto a la **quimiosensibilidad**, se sabe que los tumores **luminales A** presentan un buen pronóstico y responden al tratamiento con **antiestrógenos**. Por otro lado, los tumores **luminales B** y los tumores que son HER2 y RE positivos responden parcialmente a la **hormonoterapia**. Los tumores de subtipo *Her2-enriched* son sensibles al **trastuzumab** y a la terapia con anticuerpos monoclonales anti-HER2. Finalmente, se ha visto que los tumores basales son relativamente sensibles a la quimioterapia convencional (82).

Nuestros datos apoyan la idea de que los diferentes subtipos genómicos presentan quimiosensibilidades distintas a los diversos fármacos y por tanto es importante conocer el subtipo antes tomar una decisión terapéutica.

No existe ningún artículo publicado que evidencie que los tumores **basales** son los más quimiosensibles al **docetaxel**. No obstante, en un trabajo de Rouzier y cols (82) analizan la expresión génica de 82 tumores tratados con docetaxel seguido de FAC y encuentran que los tumores basales y *Her2-enriched* son los más sensibles (45% de respuestas completas), mientras que los tumores luminales responden escasamente a dicha quimioterapia (6% de respuestas completas). Estos datos son muy similares a los nuestros, a pesar de que se trata de un estudio en el que los pacientes están sometidos a un régimen de poliquimioterapia. Sin embargo, puede ser que la respuesta se vea altamente influenciada por el efecto del docetaxel ya que este se administró en monoterapia en primer lugar y es después de 12 semanas de tratamiento con este fármaco cuando se administra la combinación FAC.

Respecto a la sensibilidad a la **adriamicina**, hay un trabajo de Sorlie y cols muy parecido al nuestro en el que se estudia genómicamente los tumores de 51 pacientes,

diagnosticadas de CLAM, tratadas en monoterapia con adriamicina (84). En cuanto a la respuesta a la adriamicina, los únicos resultados estadísticamente significativos del estudio son; que los pacientes con tumores luminales A son los que menos enfermedad progresiva presentan (pero no los que más respuestas completas tienen) y que los tumores luminales B son los que más habitualmente desarrollan enfermedad progresiva.

La tabla 48 muestra los resultados de Sorlie y cols.

Subtipo	Proporción T. sensibles	% t. sensibles
basal	2/5	40%
Her2	5/8	63%
LumA	10/25	40%
Lum B	4/11	36%
Normal	0/1	0%

Tabla 48 Proporción de tumores sensibles a la adriamicina en función del subtipo atendiendo a los resultados de Sorlie y cols (84).

Podemos observar que los tumores *Her2-enriched* son los más quimiosensibles. Por otro lado, los tumores basales presentan una tasa de respuestas del 40%. No obstante, cuando el artículo fue publicado no se había descrito el subtipo *claudin-low* y estos tumores eran clasificados habitualmente como basales o normales. De hecho, hemos analizado de nuevo estos datos y hemos podido comprobar que uno de los 2 tumores basales con respuesta parcial a la adriamicina es del tipo *claudin-low*. Por lo tanto, parece que la distribución de respuestas sería similar a la que hemos encontrado aunque la tasa de respuestas es mayor en este ensayo, probablemente porque emplearon criterios más laxos.

A día de hoy, una de las terapias más habituales en pacientes triple negativas es la combinación TAC. Varios estudios como BCIRG 001 (174) o GEICAM 9805 (175) coinciden en que este régimen produce un aumento de la supervivencia libre de enfermedad respecto de la combinación FAC. No obstante, la combinación TAC es más tóxica que FAC. A raíz de nuestros resultados, nos cuestionamos si la mayor supervivencia libre de enfermedad de las pacientes tratadas con TAC vs FAC puede ser debida a un aumento del espectro de tumores sensibles a esta quimioterapia, ya que estarían cubiertos tanto los tumores basales (sensibles a docetaxel) como los *claudin-low* (aparentemente sensibles a adriamicina), o bien esta combinación tiene un efecto de sinergia. Si se tratase de la primera hipótesis, la terapia con TAC no aumentaría la supervivencia de una paciente basal respecto de otra paciente basal tratada exclusivamente con T sino que únicamente la pondría en riesgo de padecer más efectos adversos. En cualquier caso, este hecho pone de manifiesto, una vez más, la importancia de clasificar genómicamente a las pacientes además de la necesidad de hacer ensayos

---

clínicos en monoterapia para averiguar a qué fármaco son sensibles los diferentes subtipos.

En resumen, cada vez va cogiendo más peso la idea de que el cáncer de mama no es una enfermedad sino que corresponde a varias entidades clínicas. Esto hace que sea obligatorio que el oncólogo médico conozca a qué tipo de tumor mamario se está enfrentando y así, informar al paciente a cerca del pronóstico y opciones terapéuticas. La clasificación de Perou ha demostrado ser válida y apropiada para este cometido. Además, el conocimiento del subtipo, así como del transcriptoma tumoral puede aportar información necesaria para el desarrollo de nuevos fármacos. Así, por ejemplo, moléculas que intervienen en las vías de reparación del DNA pueden ser posibles dianas terapéuticas en tumores de portadores de BRCA1 y BRCA2 como de tumores basales (176).

### 5.5.2 CLAUDIN LOW: UN NUEVO SUBTIPO

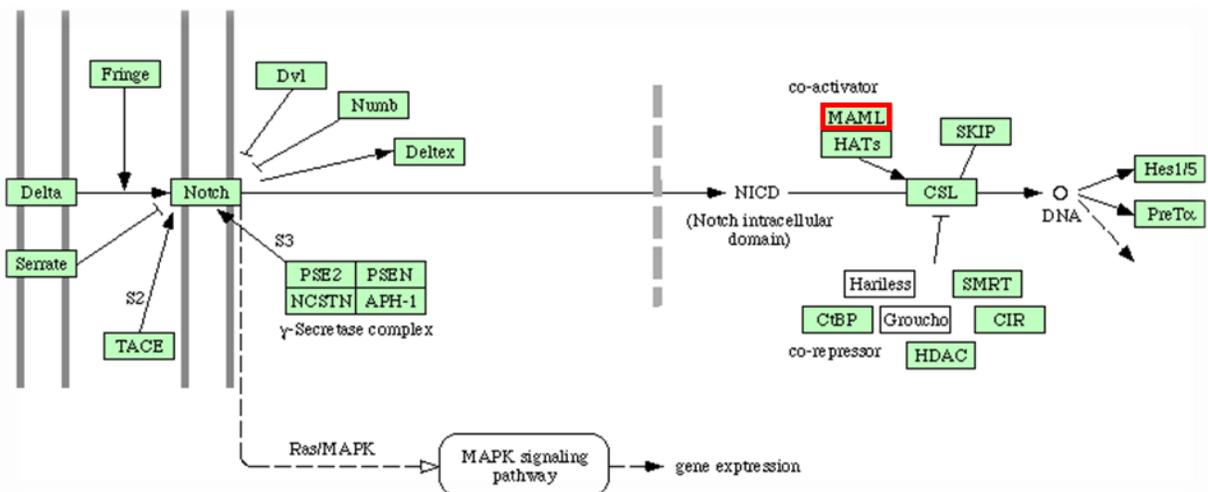
El subtipo *claudin-low* fue descrito por primera vez por Herschkowitz y cols (35). Según los autores el subtipo está caracterizado por la baja expresión de genes que codifican para proteínas claudinas que forman parte de las uniones estrechas (*tight junctions*) entre las células. Posteriormente, una comunicación de Jenny Chang y cols postulaba que este nuevo subtipo podría tratarse de tumores enriquecidos en *stem cells* tumorales (36). Según la conferencia que Charles M Perou dio en la reunión anual de la AACR en abril del 2009 (177) los tumores *claudin-low* representan entre el 3-10% de todos los tumores de mama, tienden a ser triple negativos, parecidos a los basales, y suelen ser de alto grado. Además, Perou coincide con Jenny Chang en que estos tumores parecen estar enriquecidos en células *stem* iniciadoras de tumores. Por otro lado, un estudio de Hennessy y cols (178) analiza genómicamente 12 tumores de cáncer de mama metaplásico y observan que de los 12 tumores 2 pertenecen al subtipo *claudin-low*, 2 son basales, 2 son *normal-like* y 6 constituyen un nuevo subgrupo con características a caballo entre los tumores basales y los tumores *claudin-low*.

La incidencia de tumores tipo *claudin-low* en nuestras pacientes es del 11%. Además observamos que estos tumores tienden a ser proliferativos siendo muchos de ellos triple negativos. También, hemos observado que este grupo parece ser el más quimiosensible a la adriamicina aunque este hecho no deja de ser más que una mera observación pues no hemos podido corroborarlo estadísticamente.

Actualmente, no tenemos datos en cuanto a la quimiosensibilidad de los tumores tipo *claudin-low* aunque se ha propuesto que estos tumores podrían ser tratados con inhibidores de la vía **Notch** (179), puesto que esta vía se ha relacionado con las *stem cells* siendo esencial para el correcto desarrollo embrionario (180-182). Además, la vía de Notch está alterada en muchos tumores. Concretamente, en cáncer de mama, se ha

visto que los tumores triple negativos (como los tumores *claudin-low*) suelen tener perturbada esta vía (179).

Tal y como se refleja en el apartado 4.7.1 uno de los genes diferencialmente expresado entre los tumores sensibles y resistentes a adriamicina es **MAML2**, este gen es un coactivador de Notch. Este hallazgo puede ser debido a que los tumores tipo *claudin-low* están altamente representados en el grupo de tumores sensibles a adriamicina. Por otro lado, este hecho apoyaría la hipótesis de que los tumores *claudin-low* son susceptibles de ser tratados con fármacos anti-notch.



**Figura 25.** Vía de señalización de NOTCH tomada del KEGG PATHWAY database. Los receptores de Notch se activan por los ligandos de las familias Delta y Serrate. La activación de la vía determina una ruptura proteolítica del receptor liberando el dominio intracelular (NICD) que se transloca al núcleo donde puede formar complejos con la proteína de unión al DNA CSL. Algunas proteínas como MAML pueden ser reclutadas por el complejo NICD-CSL esto determina una activación de la transcripción de genes dianas de Notch.

---

## 5.6 VALOR PREDICTIVO DE LAS FIRMAS GENÓMICAS.HACIA UNA MEDICINA PERSONALIZADA

### 5.6.1 GENES PREDICTIVOS DE LA RESPUESTA A ADRIAMICINA

Varios de los genes que se presentan en la tabla 41 se han relacionado con la oncogénesis, el cáncer de mama y la respuesta a adriamicina. De este modo podemos destacar:

-**E2F1** que juega un papel crucial en el control del ciclo celular y de proteínas supresoras de tumores pudiendo mediar tanto la proliferación como la apoptosis. Concretamente, en cáncer de mama se ha visto que puede actuar como un gen supresor de tumores (183). Por otro lado, un estudio de Dong y cols (184) demuestra que la citotoxicidad de la adriamicina aumenta en células de melanoma que sobreexpresan E2F1, además corroboran estos resultados en ratones, ya que ven que la combinación adriamicina junto con la coinfección de adenovirus portadores de E2F1 reduce en un 87% el tamaño del tumor respecto a los controles ( $p < 0,002$ ).

-**SCGB3A1** (HIN-1), que codifica para una proteína pequeña, que se expresa en alta cantidad en epitelio mamario sano (HIN: *high in normal*). Por el contrario, su expresión se pierde en la mayoría de los tumores de mama debido a la hipermetilación del promotor (185). HIN-1 inhibe el crecimiento, migración e invasión celular (186). Según un estudio de Krop y cols (187) la metilación del promotor es infrecuente en tumores de portadores de BRCA1. En cualquier caso, nosotros hemos observado que la expresión de este gen es mayor en tumores tipo *claudin-low* no expresándose en otro tipo de tumores (ni siquiera basales).

- **PCDH24**, que inhibe el crecimiento por contacto (188). Al igual que en el caso anterior se trata de genes que se expresan más en tumores tipo *claudin-low* comparado con el resto de tumores.

-**STC1**. Este gen codifica para una glicoproteína que es excretada al medio extracelular, con funciones autocrinas y paracrinas. Su función se ha relacionado con la homeostasis del calcio y fosfatos (189). En un estudio de Joensuu y cols (190) observaron que la expresión de STC1 era significativamente mayor en las metástasis que en tumores mamarios primarios. Si se analizan los resultados que los autores presentan en el artículo se observa, además, que la expresión de STC1 es mayor tanto en tumores como en metástasis de pacientes que tuvieron recaídas más tardías (cuadro 3).

	STC-1p	STC-1 m	p	STC-2 p	STC2 m	p	ERp	ERm	p
Group 1, n = 19									
Mean	27.7	25.2	0.66	2.5	3.3	0.54	30.3	30	0.95
Std. deviation	32.3	31.3		3.3	5.4		35.4	40.6	
Group 2, n = 35									
Mean	30.8	53.3	0.0012	13.2	26.1	0.004	29.2	34.4	0.38
Std. deviation	27.2	33.7		19.6	26.2		37.5	38.7	
Group 3, n = 18									
Mean	39.2	70.5	0.0017	17.4	57.5	0.0001	24.1	45.6	0.019
Std. deviation	32.7	32.7		16.3	36.9		35.5	40.2	

Group 1 represents tumors with metastasis within two years. In Group 2, metastases were detected from 5 to 10 years, and in Group 3 after 10 years. Paired samples t-test was used.

**P=0.0001**

**Tabla 49.** Media de expresión y desviación estándar de STC1 en tumor primario (STC-1p) y en metástasis (STC-1m). Cuadro extraído del artículo de Joensuu y cols (190).

-**LALBA1 (lactoalbúmina alfa)**, que es una proteína mayoritaria de la leche. Los estudios llevados a cabo por Svanborg C (191-192), demostraron que un plegamiento determinado de los monómeros de lactalbumina alfa humana junto con ácido oleico determinaba un complejo; **HAMLET (human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells)** capaz de inducir la apoptosis en cultivos celulares de células tumorales.

-**CSN2 (caseína beta)**, que es otra proteína de la leche. Uehara N y cols vieron que esta proteína se expresa en mayor cuantía en ratas de Lewis que han tenido descendencia respecto de ratas de la misma edad vírgenes, por lo que relacionan la expresión de este gen con la protección al cáncer de mama producida por el embarazo (193).

-**MAML2**, coactivador de Notch. Como se ha explicado en el punto anterior esta vía está particularmente afectada en tumores triple negativos como *claudin-low*.

-**GSTA1**, que codifica para una isoenzima de la **glutación-S transferasa**. Al igual que con *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, varios autores han estudiado la asociación entre las alteraciones en este gen y la respuesta a los tratamientos que producen estrés oxidativo. Se ha visto que un polimorfismo del gen determina la expresión del mismo en hígado (194-195), de modo que los individuos que portan la variante *GSTA1\*B* expresan menos niveles enzimáticos. Carol Sweeney y cols (196) estudiaron este polimorfismo en 245 pacientes de cáncer de mama sometidas a quimioterapia y observaron que los individuos homocigotos *GSTA1\*B/\*B* tenían un menor riesgo de muerte (HR= 0.3; 95% IC= 0.1-0.8). En el mismo sentido, nosotros encontramos que la expresión de *GSTA1* en mama se asocia a mejores respuestas a adriamicina pero no a docetaxel. Además, hemos observado que *GSTA1* es, de todos los genes que codifican para enzimas GST, el que se expresa en mayor cuantía en la mama. En principio, la mama no es el tejido encargado de aclarar los xenobioticos, no obstante, los tumores que sobreexpresan este gen están inactivando el fármaco *in situ* inhibiendo por tanto su citotoxicidad.

### 5.6.2 GENES PREDICTIVOS DE LA RESPUESTA A DOCETAXEL

Varios de los genes de la tabla 45 se relacionan con la inestabilidad genómica. La **ciclina E1** se encuentra sobreexpresada en muchos tumores con alta inestabilidad cromosómica. Además, la expresión de la ciclina E1 es característica de los tumores basales y puede ser que su expresión se asocie a mejores respuesta al ser este subtipo el más quimiosensible. Por otro lado, **MSH5**, **ATM**, y el **gen de la telomerasa** tienen funciones relacionadas con el mantenimiento de la integridad del genoma (197, 101, 198). Probablemente la expresión de estos genes sea imprescindible para la progresión de tumores con alta tasa de replicación celular como son los tumores basales.

Por otro lado, hemos encontrado que el 15% de los genes de la lista están relacionados con la **respuesta inmunológica**. Respecto a este hallazgo, pensamos que el valor de expresión de estos genes puede estar influenciado por la expresión de células del estroma. En las muestras de biopsias tumorales, adyacente al tumor, existen células no tumorales del estroma como fibroblastos, adipocitos...etc. La expresión de estas células se encuentra "contaminando" los perfiles de expresión tumorales. Martin Buess y cols (199) analizaron los perfiles de expresión de cultivos de células tumorales de mama, células endoteliales y co-cultivos de ambas líneas celulares en proporción 1 a 1. Los autores encuentran que, como era de esperar, los perfiles de expresión de las células endoteliales y tumorales eran muy distintos. Además, el perfil de expresión del co-cultivo era muy similar al del cultivo de células tumorales. No obstante, la expresión de algunos genes difería entre el co-cultivo y el cultivo de células tumorales. Un estudio de Finak y cols (200) analiza 53 muestras en las que se había separado por microdissección con láser el tumor del estroma. El análisis de genómico de las muestras del estroma puso de manifiesto la existencia de tres *clusters* que se asociaban con el pronóstico de los tumores. Muchos de los genes que determinan el *cluster* de buen pronóstico están relacionados con la respuesta inmunológica.

Respecto a los genes de la tabla 47 tal y como se comentan en los resultados observamos que algunos de ellos se relacionan con la agresividad tumoral, por lo tanto parece lógico que estén sobreexpresados en tumores basales resistentes.

En el estudio de Rouzier y cols (82) se presenta una lista de genes diferencialmente expresado en tumores basales sensibles y resistentes. A pesar de que nuestros resultados se parecen, en el sentido de que en ambos casos los tumores más quimiosensibles son los basales y los *Her2-enriched*, y a pesar de que se trata de genes diferencialmente expresados en tumores basales en ambos casos, no encontramos ningún gen en común. Esto puede ser debido a que en el estudio de Rouzier y cols los tumores fueron analizados con chips de Affimetrix y existen genes (pocos) que no están en ambas plataformas. Además, en cada caso las sondas son distintas. En otras

---

palabras, aunque ambos estudios están midiendo lo mismo lo hacemos de distinta forma. También, puede influir el hecho de que las pacientes recibieron distinta quimioterapia.

El hecho de que distintas firmas genómicas con fines parecidos tengan pocos genes en común parece sorprendente. Sin embargo, no deja de ser habitual. Un estudio realizado por Chris Fan y cols (201) evalúa 5 firmas en la misma *dataset* de pacientes y encuentra que, a pesar del escaso número de genes en común entre las firmas, 4 de ellas proporcionaban los mismos resultados.

### 5.6.3. FIRMAS PREDICTIVAS

Como se ha comentado en la introducción existen varias firmas genómicas en principio capaces de predecir la respuesta a determinados fármacos. Hemos probado las firmas publicadas por los científicos de la Universidad de Duke (77) en nuestro grupo de pacientes y hemos comprobado que, en nuestro caso, las firmas fallaron al predecir la respuesta. Del mismo modo, hemos probado la firma desarrollada por Jenny Chang y cols (79) que tampoco funcionó para nuestras pacientes tratadas con docetaxel. En el primer caso, se trata de firmas desarrolladas a partir de datos de líneas celulares que no han sido validadas en humanos (firmas para fármacos únicos). Respecto al trabajo de Jenny Chang, podemos decir que la firma fue desarrollada a partir de datos de sólo 24 pacientes. Además, la respuesta al tratamiento no fue valorada según métodos estándares, publicados, que hayan demostrado tener correlación con la supervivencia.

La capacidad de las firmas genómicas para seleccionar a los pacientes susceptibles de responder a determinados tratamientos parece prometedora. De este modo, existen algunos grupos de investigadores que se afanan en probar la eficacia de sus firmas. Así, por ejemplo, la universidad de Duke está llevando a cabo un ensayo en el que las pacientes reciben AC o TC en función de las firmas genómicas desarrolladas por ellos con dos ramas controles en las que las pacientes se randomizan al azar para ambos tratamientos (identificador: NCT00636441).

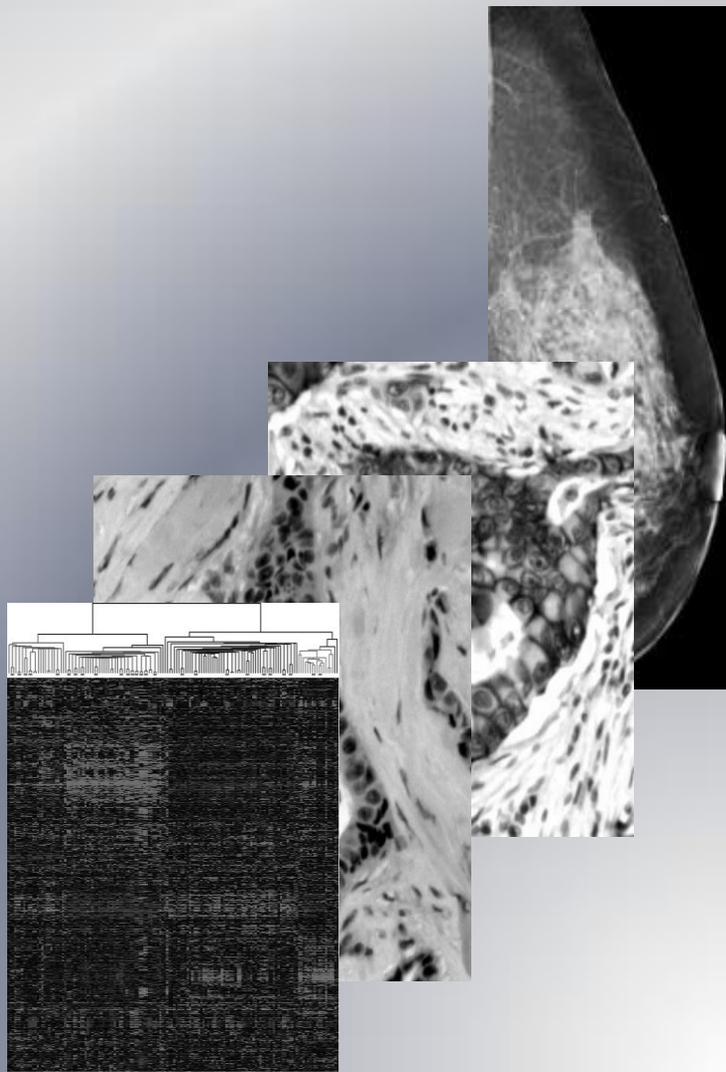
Aunque la experiencia en el campo de la farmacogenómica es escasa existen ya varias firmas genómicas que han demostrado ser eficaces a la hora de seleccionar pacientes. Así, por ejemplo, el ensayo **Oncotype DX** ha sido considerado por ASCO como un marcador tumoral y por NCCN como una ayuda a la hora de tomar decisiones terapéuticas en pacientes con RE positivos y ganglios negativos (202).

Desde nuestro punto de vista, pensamos que las firmas deben de ser elaboradas a partir de un número no pequeño de pacientes y deben de presentar una sensibilidad y especificidad adecuada. Además, deben de ser validadas en una cohorte de pacientes independiente de la que se empleo para desarrollar la firma. Ambas cohortes deben de tener características similares y la respuesta debe ser evaluada de misma manera.

Según Christos Sotiriou y Lajos Pusztai (203) el estudio en neoadyuvancia que recoge más pacientes de forma prospectiva, cuyos tumores se hayan evaluado genómicamente, es el de Rouzier y cols (82-83). Este estudio incluye a 133 pacientes; el mismo número de pacientes analizados genómicamente que en nuestro estudio.

Es evidente que la genómica ha abierto un nuevo campo de investigación aplicada en el cáncer de mama de potencial aun incalculable, y cuyos resultados prácticos estamos sólo comenzando a percibir. En el futuro, los estudios clínicos en cáncer de mama deberían realizarse teniendo en consideración la información genómica hasta ahora disponible y deberían incluir un componente traslacional sistemático que nos permita adquirir nuevos conocimientos de forma prospectiva en el contexto más favorable: el ensayo clínico prospectivo.

# CONCLUSIONES

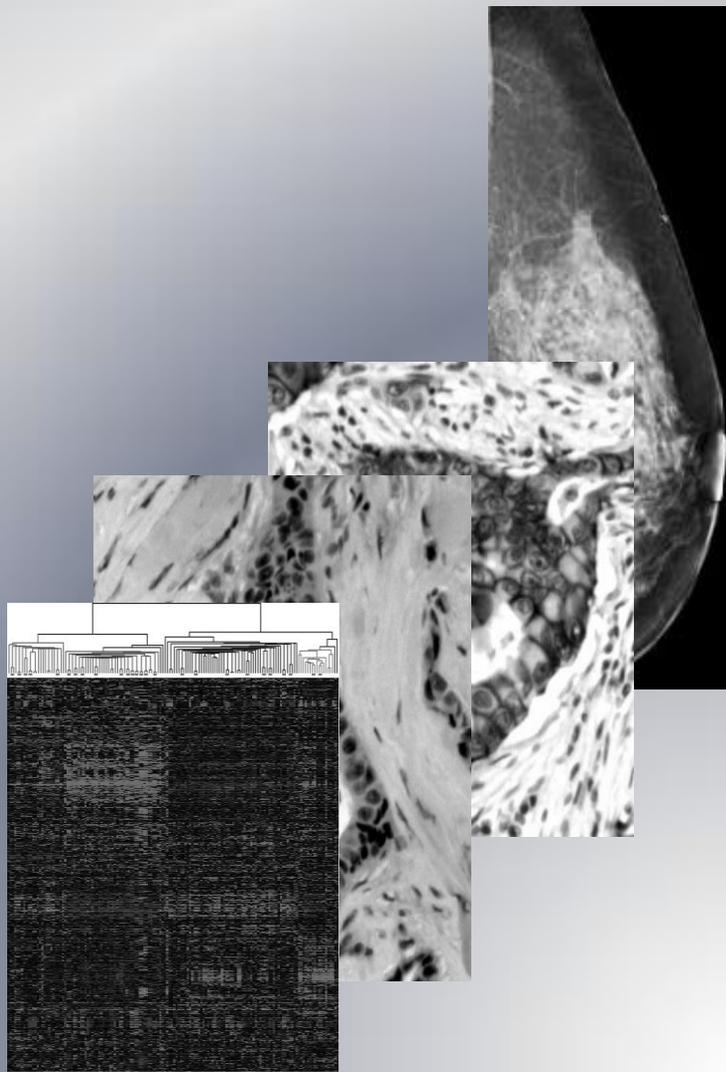




1. Ni la delección homocigota de **GSTM1** y ni la de **GSTT1** se asocian con la respuesta a docetaxel. La delección homocigota de al menos uno de los dos genes se asocia, débilmente, con la respuesta a antraciclinas.
2. Los pacientes con delección homocigota de **GSTM1** tienden a desarrollar tumores basales en menor proporción que los pacientes con al menos una copia del gen.
3. Los individuos homocigotos **GG** para el **SNP A342G** del gen **GSTP1** tienden a tener mejores repuestas a la adriamicina. El genotipo **GG** tiende a expresar **GSTP1** en menor grado en la mama. La menor expresión del gen en la mama tiende a asociarse con mejores respuestas.
4. Los tumores **HER2 positivos por IHQ/FISH** son más sensibles a quimioterapia sin apreciarse diferencias entre docetaxel y doxorrubicina.
5. **TOP2A** es un marcador claro de la **proliferación celular** y se expresa en mayor proporción en tumores grandes de mayor grado histológico. Por tanto, puede ser empleado como **factor pronóstico**.
6. La **expresión de TOP2A** difiere según el subtipo genómico siendo mayor en tumores basales y luminales B. La expresión de **TOP2A** no predice la respuesta a adriamicina si se considera todos los subtipos genómicos. Su posible papel como marcador de respuesta debe de estudiarse para cada subtipo.
7. En nuestro estudio, **las alteraciones a nivel de de DNA de TOP2A** no predicen la respuesta a antraciclinas ni a docetaxel. Estas alteraciones parecen más frecuentes en los subtipos *Her2-enriched*.
8. Los tumores genómicamente definidos como *Her2-enriched* tienen una quimiosensibilidad moderada a la adriamicina y al docetaxel. La tasa de respuestas es muy similar para ambos fármacos por lo que el tratamiento de las pacientes **HER2 positivas** con combinaciones de trastuzumab con docetaxel sería ventajoso respecto de combinaciones con antraciclinas al ser menos cardiotóxicas.
9. Los **tumores basales** son los más quimiosensibles al **docetaxel** y no responden a la adriamicina.
10. Los tumores *claudin-low* tienden a responder mejor a la **adriamicina** que al docetaxel.

11. Los **tumores luminales** tienen bajas tasas de respuestas tanto a la adriamicina y al docetaxel.
12. Los tumores tipo claudin-low no se pueden identificar por IHQ y sí mediante su estudio genómico. Estos tumores presentan fenotipos y quimiosensibilidades características.
13. Los distintos subtipos genómicos presentan quimiosensibilidades distintas por lo que la **clasificación genómica** de los tumores puede ayudar a tomar decisiones terapéuticas.

# BIBLIOGRAFÍA



 BIBLIOGRAFÍA

- 
- (1) McMillin GA, Linder MW, Bukaveckas BL. Pharmacogenetics. En: Burtis C, Ashwood E, Brunns E, eds. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnosis*. Elsevier Saunders; 2006: 1589-1616.
- (2) Weinshilboum RM, Wang L. Pharmacogenetics and pharmacogenomics: development, science, and translation. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2006;7:223-45.
- (3) Avedaño C Espada M. Fármacos que actúan sobre receptores intracelulares (II). Fármacos que interaccionan con ácidos nucleicos. En: Avedaño C. *Introducción a la Química Farmaceutica*. Interamericana-McGraw-Hill; 1996: 525-548.
- (4). Marsh S, McLeod HL. Cancer pharmacogenetics. *Br J Cancer*. 2004 90: 8-11.
- (5) Villafranca, E., Okruzhnov, Y., Dominguez, M.A. et al. Polymorphisms of the repeated sequences in the enhancer region of the thymidylate synthase gene promoter may predict downstaging after preoperative chemoradiation in rectal cancer. *J. Clin. Oncol*. 2001; 19: 1779-1786.
- (6) Mandola, M.V., Stoehlmacher, J., Muller-Weeks et al. A novel single nucleotide polymorphism within the 50 tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. *Cancer Res* 2003; 63: 2898-2904.
- (7). Ulrich C.M., Bigler J., Velicer C.M., Greene E.A., Farin F.M., Potter J.D. Searching expressed sequences tag databases: discovery and confirmation of a common polymorphism in the thymidylate synthase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 1381-1385.
- (8) Wiffen P., Gill M., Edwards J. and Moore, A. Adverse drug reactions in hospital patients. *Bandolier Extra* 2002;1-16.  
<http://www.jr2.ox.ac.uk/bandolier/Extraforbando/ADRPM.pdf//>.
- (9) McLeod HL., Siva C. The thiopurine S-metiltransferase gene locus- implications for clinical pharmacogenomics. *Pharmacogenomics*. 2002;3: 89-98.
- (10) [http://www.fda.gov/medwatch/SAFETY/2003/03DEC\\_PI/Tabloid\\_PI.pdf//](http://www.fda.gov/medwatch/SAFETY/2003/03DEC_PI/Tabloid_PI.pdf//).
- (11) Thierry D., Mohan VB. Overview of the pharmacoeconomics of pharmacogenetics. *Pharmacogenomics*. 2006; 7: 1175-1184.
- (12) AmpliChip CYP450 test. *Med. Lett. Drugs Ther*. 2005; 47, 71-72.
-

- 
- (13) Jain KK. Application of AmpliChip. *Mol. Diagn.* 2005; 9: 119-27.
- (14) Marsh S., McLeod HL. Pharmacogenomics: from bedside to clinical practice. *Human Molec Genetics.* 2006; 15: R89-R93.
- (15) Phillips KA., Veenstra DL., Oren E., Lee JK., Sadee W. Potential role of pharmacogenomics in reducing adverse drug reaction: a systematic review. *JAMA* 2001; 286: 2270-9.
- (16) Bosma PJ., Choudhury JR., Bakker C., Gantla S et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronil transferasa 1 in Gilbert's Syndrome. *N Engl J Med* 1995; 333: 1171-5.
- (17) FDA clears third wave pharmacogenomics test. *Pharmacogenomics* 2005; 6: 671-672
- (18) Slamon DJ., Clark GM., Wong SG. Human breast cancer correlation of relapse and survival with amplification of HER2/neu oncogene. *Science.* 1987; 235: 177-82.
- (19) Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20: 719-26.
- (20) Knoop AS, Knudsen H, Balslev E et al. Retrospective analysis of topoisomerase IIa amplifications and deletions as predictive markers in primary breast cancer patients randomly assigned to cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil or cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil: Danish Breast Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol* 2005; 23: 7483-90.
- (21) Knoop A, Knudsen H, Balslev E, et al. TOP2A aberrations as predictive and prognostic marker in high-risk breast cancer patients. A randomized DBCG Trial (DBCG89D). en: *J Clin Oncol, ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 24, No. 18S* (June 20 Supplement), 2006: 532.
- (22) Jimeno A, Messersmith WA, Hirsch FR, Franklin WA Eckhardt SG. Kras mutation and sensitivity to Epidermal Growth factor receptor inhibitors in colorectal Cancer: Practical application of patient selection. *J Clin Oncol* 2009; 27 (7): 1130-1136
- (23) Crum CP, Lester SC, Cotran RS. El aparato genital femenino y la mama. En: Kumar V, Cortan R, Robbins S, Patología Humana. Madrid, Elsevier; 2004:679-717.
- (24) <http://www.meb.uni-bonn.de/cancer.gov/CDR0000256762.html>
-

- 
- (25) Breast. En: American Joint Committee on Cancer.: AJCC Cancer Staging Manual. 6th ed. New York, NY: Springer; 2002: 171-180.
- (26) La situación del cáncer en España. Centro de Epidemiología. Instituto Carlos III. Ministerio de Sanidad y Consumo; 2005.
- (27) Van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002;415(6871):530-6.
- (28) Van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*. 2002 ;347(25):1999-2009
- (29) Perou CM, Sorlie T, Eisen MB et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406:747-752.
- (30) Hu Z, Fan C, Oh DS et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics*. 2006; 7:96.
- (31) Parker JS, Mullins M, Cheang MC et al. Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. *J Clin Oncol*. 2009;27(8):1160-7
- (32) Carey LA, Perou CM, Livasy CA et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 2006;295(21):2492-502
- (33) Sorlie T, Tibshirani R, Parker J et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(14):8418-23.
- (34) Foulkes WD, Narod SA, Swenerton K, Panabaker K, Gilbert L. Re: Gynecologic surgeries and risk of ovarian cancer in women with BRCA1 and BRCA2 Ashkenazi founder mutations: an Israeli population-based case-control study. *J Natl Cancer Inst*. 2003 Nov 5;95(21):1640.
- (35) Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*. 2007;8(5):R76.
- (36) Chang JC, Creighton C, Landis M et al. Gene signature of cancer stem cells in an intrinsic subgroup of breast cancers with mesenchymal properties. 2008 ASCO Annual Meeting. *J clin Oncol* 26:2008 (May 20 suppl;abstr 11009)
-

- (37) Bonadonna G, Valagussa P, Brambilla C, et al. Primary chemotherapy in operable breast cancer: eight-year experience at the Milan Cancer Institute. *J Clin Oncol* 1998; 16: 93-100
- (38) Hortobagyi GN, Spanos W, Montague ED, et al. Treatment of locoregionally advanced breast cancer with surgery, radiotherapy, and combination chemoimmunotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1983; 9: 643-50.
- (39) Hortobagyi GN, Gutterman JU, Blumenschein GR, et al. Combination chemoimmunotherapy of metastatic breast cancer with 5-fluorouracil, adriamycin, cyclophosphamide, and BCG. *Cancer* 1979; 43:1225-33.
- (40) Hortobagyi GN, Frye D, Buzdar AU, et al. Decreased cardiac toxicity of doxorubicin administered by continuous intravenous infusion in combination chemotherapy for metastatic breast carcinoma. *Cancer*. 1989; 63: 37-45.
- (41) Souhami R, Tannock I, Hohenbreg P, Horiot JC. *Oncology*, Oxford University Press, 2002. Capítulo 11.8 y 11.7.
- (42) Armijo JA, Adin J. Farmacología Clínica: Objetivos y Metodología. En: Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A, ed. *Farmacología Humana*, 4ª edición. Masson. Barcelona; 2003: 191-218.
- (43) Hulley, S.B., Cummings S.R. *Diseño de la investigación clínica. Un enfoque epidemiológico*. Ed. Doyma. Barcelona 1.993
- (44) Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C et al. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2007; 25(28):4414-22.
- (45) Ogston KN, Miller ID, Payne S, et al. A new histological grading system to assess response of breast cancers to primary chemotherapy: Prognostic significance and survival. *Breast* 2003; 12:320-327.
- (46) Hayes, J. D., McLellan, L. I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic. Res*. 1990; 31: 273-300.
- (47) Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:51-88.

- (48) Ishikawa T, Ali-Osman F. Glutathione-associated cis diamminedichloroplatinum (II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance. *J Biol Chem* 1993;268:20116-25
- (49) Board PG. Biochemical genetics of glutathione-S-transferase in man. *AmJHum Genet.* 1981;33:36-43.
- (50) Bosch TM, Meijerman I, Beijnen JH, Schllens JHM. Genetic polymorphisms of Drug-Metabolising Enzymes and Drug Transporters in the Chemotherapeutic Treatment of Cancer. *Clin Pharmacokinet* 2006;45 (3):253-285.
- (51) Moyer AM, Salavaggione OE, Hebring SJ et al. Glutathione S-Transferase T1andM1: Gene Sequence Variation and Functional Genomics. *Clin Cancer Res.* 2007 Dec 1;13(23):7207-16.
- (52) Harries, L. W., Stubbins, M. J., Forman, D., Howard, G. C., and Wolf, C. R. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis* 1997;18: 641-644.
- (53) Srivastava, S. K., Singhal, S. S., Hu, X., Awasthi, Y. C., Zimniak, P. Singh, S. V. Differential catalytic efficiency of allelic variants of human glutathione S-transferasePi in catalyzing the glutathione conjugation of thiotepa. *Arch. Biochem. Biophys.* 1999;366: 89-94.
- (54) Kadouri L, Kote-Jarai Z, Hubert A et al. Glutathione-S-transferase M1, T1 and P1 polymorphisms, and breast cancer risk, in BRCA1/2 mutation carriers. *Br J Cancer.* 2008;98(12):2006-10
- (55) Ambrosone CB, Sweeney C, Coles BF et al. Polymorphisms in Glutathione S-Transferases (GSTM1 and GSTT1) and Survival after Treatment for Breast Cancer. *Cancer Res.* 2001;61(19):7130-5
- (56) Sweeney C, McClure GY, Fares MY et al. Association between Survival after Treatment for Breast Cancer and Glutathione S-Transferase P1 Ile105Val Polymorphism. *Cancer Res.* 2000;60(20):5621-4.
- (57) Petros WP, Hopkins PJ, Spruill S et al. Association between drugs metabolism genotype, chemotherapy pharmacokinetics, and overall survival in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23(25):6117-25.

- (58) Arai T, Miyoshi Y, Kim SJ et al. Association of GSTP1 expression with resistance to docetaxel and paclitaxel in human breast cancers. *Eur J Surg Oncol.* 2008;34(7):734-8.
- (59) Osheroff N. Biochemical basis for the interaction of type I and type II topoisomerases with DNA. *Pharmacol Ther* 1989;41: 233-241.
- (60) Wang JC. DNA topoisomerase. *Annu Rev Biochem.* 1996;58: 635-692.
- (61) McPherson JP, Goldenberg GJ. Induction of apoptosis by deregulated expression of DNA topoisomerase II alpha. *Cancer Research.* 1998;58: 4519-4524.
- (62) Fritz P, Cabrera CM, Dippon J et al. C-erbB and topoisomerase II alfa protein expression independenbtly predict poor survival in primary human breast cancer: a retrospective study. *Breast Cancer Res.* 2005;7: R374-R384.
- (63) Petit T, Wilt M, Velten M et al. Comparative value of tumor grade, hormonal receptors, Ki-67, HER-2 and topoisomerase II alpha status as predictive markers in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy. *Eur J Cancer.* 2004;40: 2005-211.
- (64) Nakopoulou L, Lazaris AC, Kavantzas N. DNA topoisomerase II alfa immunoreactivity as a marker of aggressiveness in invasive breast cancer. *Pathobiology.* 2000;68: 137-43.
- (65) Tanner M, Järvinen P, Isola J. Amplification of Her2/Neu and topoisomerase II alpha in primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res.* 2001;61: 5345-5348.
- (66). Coon JS, Marcus E, Gupta-Burt S et al. Amplification and overexpression of topoisomerase II alpha predict response to anthracycline-based therapy in locally advanced breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 2002;8(4), 1061-1067
- (67) Tanner M, Isola J, Wiklund T et al. Topoisomerase IIalpha gene amplification predicts favorable treatment response to tailored and dose-escalated anthracycline-based adjuvant chemotherapy in HER-2/neu-amplified breast cancer: Scandinavian Breast Group Trial 9401. *J Clin Oncol.* 2006;24(16):2428-36
- (68) Durbecq V, Desmed C, Paesmans M. Correlation between topoisomerase II alpha gene amplification and protein expression in Her-2 amplified breast cancer. *Int J Oncol.* 2004;25: 1473-1479.

- 
- (69) Sotiriou C, Neo SY, McShane LM et al. Breast Cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from population-based study. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100: 10393-10398.
- (70) Asano T, Nakamura K, Fujii H et al. Altered expression of topoisomerase II alpha contributes to crossresistant to etoposide K562/MX" cell line by aberrant methylation. *Br J Cancer*. 2005;92: 1486-1492.
- (71) Asano T, An T, Mayes J, Zwelling LA, Kleinerman ES. Transfection of human topoisomerase II alpha gene into etoposide-resistant human breast tumor cells sensitizes the cells to etoposide. *Biochem J*. 1996;319:307-13.
- (72) Zhou Z, Zwelling LA, Kawakami Y et al. Adenovirus-mediated human topoisomerase IIalpha gene transfer increases the sensitivity of etoposide-resistant human breast cancer cells. *Cancer Res*. 1999;59: 4618-4624
- (73) Tinari N, Lattanzio R, Natoli C et al. Changes in topoisomerase II alfa expression in breast tumors after neoadjuvant chemotherapy predicts relapse-free survival. *Clin Cancer Res*. 2006;12:1501-06.
- (74) Durbecq V, Paesmans M, Cardoso F et al. Topoisomerase II alpha expression as a predictive marker in a population of advanced breast cancer patients randomly treated either with a singled-agent doxorubicin or singled agent docetaxel. *Mol Cancer Ther* 2004;10: 1207-1214.
- (75) Bartlett JMS, Desmedt C, Munro A et al. Chromosome 17 polysomy: a unifying hypothesis underlying benefit from adjuvant anthracyclines? *Cancer Res* 2009, 69 (suppl 2): 375s (abstract 6059).
- (76) Bartlett JMS, Munro A, Dunn JA et al. Chromosome 17 polysomy (Ch17) as a predictor of anthracycline response: emerging evidence from the UK NEAT adjuvant breast cancer trial. *Cancer Res* 2009, 69 (suppl 2): 375s (abstract 45).
- (77) Potti A, Dressman HK, Bild A et al. Genomic signatures to guide the use of chemotherapeutics. *Nat Med*. 2006;12(11):1294-300.
- (78) Bonnefoi H, Potti A, Delorenzi M et al. Validation of gene signatures that predict the response of breast cancer to neoadjuvant chemotherapy: a substudy of the EORTC 10994/BIG 00-01 clinical trial. *Lancet Oncol*. 2007;8(12):1071-8.
-

- 
- (79) Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A et al. Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer. *Lancet*. 2003;362(9381):362-9.
- (80) Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A et al. Patterns of resistance and incomplete response to docetaxel by gene expression profiling in breast cancer patients. *J Clin Oncol*. 2005;23(6):1169-77.
- (81) Iwao-Koizumi K, Matoba R, Ueno N, et al. Prediction of docetaxel response in human breast cancer by gene expression profiling. *J Clin Oncol*. 2005;23:422-31
- (82) Rouzier R, Perou CM, Symmans WF et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2005;11:5678-85
- (83) Hess KR, Anderson K, Symmans WF et al. Pharmacogenomic predictor of sensitivity to preoperative chemotherapy with paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24(26):4236-44
- (84) Sørlie T, Perou CM, Fan C et al. Gene expression profiles do not consistently predict the clinical treatment response in locally advanced breast cancer. *Mol Cancer Ther*. 2006;5(11):2914-8.
- (85) Dove A. Sample preparation takes on good, the bad and the messy. *Genomics and proteomics*. 2004: 41-43.
- (86) Max C. RNA quality: defining the good, the bad, and the ugly. *Genomics and proteomics*. 2004: 14-21.
- (87) Kreuzer K. Highly sensitive and specific fluorescence reverse transcription PCR Assay for Pseudogene-free detection of b-actin transcripts as quantitative Reference. *Clin Chem*. 1999;45: 297-300.
- (88) Arand M, Mühlbauer R, Hengstler J et al. Multiplex polymerase chain reaction protocol for the simultaneous analysis of the glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms. *Anal Biochem*. 1996;236(1):184-6
- (89) AM Moyer, OE Salavaggione, SJ Hebring et al. Glutathione S-Transferase T1 and M1: Gene Sequence Variation and Functional Genomics. *Clin Cancer Res* 2007; 13(23): 7207-7216.
- (90) Sprenger R, Schlagenhauer R, Kerb R et al. Characterization of the glutathione S-transferase GSTT1 deletion: discrimination of all genotypes by polymerase chain
-

---

reaction indicates a trimodular genotype-phenotype correlation. *Pharmacogenomics* 2000;10(6): 557-65.

(91) Goldsmith ZG, Dhanasekaran N. The microrevolution: applications and impacts of microarray technology on molecular biology and medicine. *Int J Mol Med.* 2004;35: 36-39.

(92) Álvarez L, Gayá F. Análisis de expresión génica mediante arrays de DNA. En Díez Gilbert O. *Técnicas de Genética Molecular II.* SEQC, Barcelona 2006:141-149.

(93) Van Gelder RN, von Zastrow ME, Yool A, Dement WC, Barchas JD, Eberwine JH. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87 (5):1663-7.

(94) Quackenbush J. Microarray data normalization and transformation. *Nat Genet.* 2002;32 Suppl:496-501

(95) Tusher V, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to transcriptional responses to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98:5116-5121.

(96) Storey JD. A direct approach to false discovery rates. *J Roy Stat Soc Ser.* 2002;64:479-498.

(97) Troyanskaya O, Cantor M, Sherlock G et al. Missing value estimation methods for dna microarrays. *Bioinformatics.* 2001;17:520-525.

(98) Tibshirani R, Hastie T, Narasimhan B, et al. Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:6567-6572.

(99) Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, et al. Specificity of HercepTest in determining Her-2/neu status of breast cancer using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system. *J Clin Oncol.* 1999;17:1983-1987.

(100) Tonon G, Modi S, Wu L et al. t(11;19)(q21;p13) translocation in mucoepidermoid carcinoma creates a novel fusion product that disrupts a Notch signaling pathway. *Nat genetics.* 2003;33(2):208-13.

(101) Li S, Ting NS, Zheng L et al. Functional link of BRCA1 and ataxia telangiectasia gene product in DNA damage response. *Nature.* 2000;406:210-215

---

(102) Alam SM, Fujimoto J, Jahan I, Sato E, Tamaya T. Coexpression of EphB4 and ephrinB2 in tumour advancement of ovarian cancers. *Br J Cancer*. 2008;98(4):845-51.

(103) Kawamoto M, Ishiwata T, Cho K et al. Nestin expression correlates with nerve and retroperitoneal tissue invasion in pancreatic cancer. *Hum Pathol*. 2009;40(2):189-98.

(104) Kleeberger W, Bova GS, Nielsen ME et al. Roles for the stem cell associated intermediate filament Nestin in prostate cancer migration and metastasis. *Cancer Res*. 2007;67(19):9199-206.

(105) Parry S, Savage K, Marchiò C, Reis-Filho JS. Nestin is expressed in basal-like and triple negative breast cancers. *J Clin Pathol*. 2008 Sep;61(9):1045-50.

(106) Sum EY, Peng B, Yu X et al. The LIM domain protein LMO4 interacts with the cofactor CtIP and the tumor suppressor BRCA1 and inhibits BRCA1 activity. *J Biol Chem*. 2002; 277(10):7849-56

(107) Sossey-Alaoui K, Ranalli TA, Li X, Bakin AV, Cowell JK. WAVE3 promotes cell motility and invasion through the regulation of MMP-1, MMP-3, and MMP-9 expression. *Exp Cell Res*. 2005;308(1):135-45

(108) Sossey-Alaoui K, Li X, Ranalli TA, Cowell JK. WAVE3-mediated cell migration and lamellipodia formation are regulated downstream of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*. 2005;280(23):21748-55.

(109) Kluger HM, Chelouche Lev D, Kluger Y et al. Using a xenograft model of human breast cancer metastasis to find genes associated with clinically aggressive disease. *Cancer Res*. 2005 65(13):5578-87.

(110) McDaid HM, Horwitz SB. Selective potentiation of paclitaxel (taxol)-induced cell death by mitogen-activated protein kinase kinase inhibition in human cancer cell lines. *Mol Pharmacol*. 2001;60(2):290-301

(111) Gonzalez-Angulo AM, Morales-Vasquez F, Hortobagyi GN. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2007;608:1-22.

(112) Adjuvant therapy for breast cancer. : NIH Consens Statement. 2000;17(4):1-35.

(113) Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353:1659-1672.

- (114) Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353:1673-1684.
- (115) Slamon D, Eiermann W, Robert N et al. Phase III randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel (AC→T) with doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel and trastuzumab (AC→TH) with docetaxel, carboplatin and trastuzumab (TCH) in HER2 positive early breast cancer patients: BCIRG 006 study. *Breast Cancer Res Treat* 2005;94(suppl 1):S5
- (116) Buyse M, Loi S, van't Veer L, et al. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:1183-92.
- (117) Paik S, Shak S, Tang G, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351:2817-26.
- (118) Amado RG, Wolf M, Peeters M et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(10):1626-34.
- (119) Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2008;359(17):1757-65.
- (120) Kuhlmann J. Alternative strategies in drug development: clinical pharmacological aspects. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 1999;37(12):575-83.
- (121) Ohashi W, Mizushima H, Tanaka H. Economic advantage of pharmacogenomics clinical trials with genetic information. *Stud Health Technol Inform*. 2008;136:585-90.
- (122) Helzlsouer KJ, Selmin O, Huang HY et al. Association between glutathione S-transferase M1, P1, and T1 genetic polymorphisms and development of breast cancer. *Natl Cancer Inst*. 1998;90(7):484-5.
- (123) Vogl FD, Taioli E, Maugard C et al. Glutathione S-transferases M1, T1, and P1 and breast cancer: a pooled analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13(9):1473-9.
- (124) Look MP, Musch E. Lipid peroxides in the polychemotherapy of cancer patients. *Chemotherapy*. 1994;40(1):8-15.
- (125) Faber M, Coudray C, Hida H, Mousseau M, Favier A. Lipid peroxidation products, and vitamin and trace element status in patients with cancer before and after

---

chemotherapy, including adriamycin. A preliminary study. *Biol Trace Elem Res.* 1995 Jan-Mar;47(1-3):117-23

(126) Doroshow JH, Locker GY. Role of oxygen radical formation in anthracycline cardiac toxicity. En: F. M. Muggia, C. W. Young, and S. K. Carter (eds.), *Anthracycline Antibiotics in Cancer Therapy*. The Hague: Martinus Nijhoff; 1982:317

(127) Doroshow JH, Akman S, Chu FF, Esworthy S. Role of the glutathione-glutathione peroxidase cycle in the cytotoxicity of the anticancer quinones. *Pharmacol Ther.* 1990;47: 359-370.

(128) Sellin S, Holmquist B, Mannervik B, Vallee BL. Oxidation and reduction of 4-hydroxyalkenals catalyzed by isozymes of human alcohol dehydrogenase. *Biochemistry.* 1991;30: 2514-2518.

(129) Ravid A, Rucker D, Machlenkin A et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 enhances the susceptibility of breast cancer cells to doxorubicin-induced oxidative damage. *Cancer Res.* 1999;59: 862-867.

(130) DeAtley SM, Aksenov MY, Aksenova MV, Jordan B, Carney JM., and Butterfield, D. A. Adriamycin-induced changes of creatine kinase activity in vivo and in cardiomyocyte culture. *Toxicology.* 1999;134: 51-62.

(131) Alexandre J, Hu Y, Lu W, Pelicano H, Huang P. Novel action of paclitaxel against cancer cells: bystander effect mediated by reactive oxygen species. *Cancer Res.* 2007;67(8):3512-7.

(132) Alexandre J, Batteux F, Nicco C et al. Accumulation of hydrogen peroxide is an early and crucial step for paclitaxel-induced cancer cell death both in vitro and in vivo. *Int J Cancer.* 2006;119(1):41-8.

(133) Sulkowska M, Sulkowski S, Skrzydlewska E, Farbiszewski R. Cyclophosphamide-induced generation of reactive oxygen species. Comparison with morphological changes in type II alveolar epithelial cells and lung capillaries. *Exp Toxicol Pathol.* 1998;50: 209-220.

(134) Kaya H, Oral B, Ozguner F, Tahan V, Babar Y, Delibas N. The effect of melatonin application on lipid peroxidation during cyclophosphamide therapy in female rats. *Zentralbl. Gynakol.* 121: 1999;499-502.

(135) Hellman S. Principles of radiation therapy. En: DeVita VT, Hellman S,

---

Rosenberg SA (eds.). *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. Philadelphia: J. B. Lippincott Co. 1993;248-275.

(136) Dirven HA, Van Ommen B, Van Bladeren PJ. Involvement of human glutathione S-transferase isoenzymes in the conjugation of cyclophosphamide metabolites with glutathione. *Cancer Res*. 1994;54: 6215-6220.

(137) Kalinina EV, Chernov NN, Saprin AN, Kotova YN, Remizov VI, Shcherbak NP. Expression of genes for redox-dependent glutathione S-transferase isoforms GSTP1-1 and GSTA4-4 in tumor cell during the development doxorubicin resistance. *Bull Exp Biol Med*. 2007;143(3):328-30.

(138) Huang J, Tan PH, Tan BK, Bay BH. GST-pi expression correlates with oxidative stress and apoptosis in breast cancer. *Oncol Rep*. 2004;12(4):921-5.

(139) Gilbert L, Elwood LJ, Merino M et al. A pilot study of pi-class glutathione S-transferase expression in breast cancer: correlation with estrogen receptor expression and prognosis in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 1993;11(1):49-58.

(140) Thor AD, Berry DA, Budman DR et al. ErbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90:1346-1360.

(141) Paik, SM., Bryant J, Park CH et al. erbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst*. 1998;90: 1361-1370.

(142) Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E et al. HER2 and choice of adjuvant chemotherapy for invasive breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-15. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(24):1991-8.

(143) Geisler S, Lønning PE, Aas T et al. Influence of TP53 gene alterations and c-erbB-2 expression on the response to treatment with doxorubicin in locally advanced breast cancer. *Cancer Res*. 2001;61(6):2505-12.

(144) Pritchard KI, Shepherd LE, O'Malley FP et al. HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med*. 2006;354(20):2103-11.

(145) Glück S, McKenna EF Jr, Royce M. Xena: capecitabine plus docetaxel, with or without trastuzumab, as preoperative therapy for early breast cancer. *Int J Med Sci*. 2008;5(6):341-6.

- (146) Mimae T, Taira N, Ohsumi S et al. Correlations between hormonal receptor and HER2 status or nuclear grades and response rate in breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy of docetaxel alone. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2009;36(4):619-22.
- (147) Hugh J, Hanson J, Cheang MC et al. Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *J Clin Oncol*. 2009;27(8):1168-76.
- (148) 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
- (149) Seidman A, Hudis C, Pierri MK, et al. Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical trials experience. *J Clin Oncol* 2002;20:1215-1221
- (150) Mueller RE, Parkes RK, Andrulis I, O'Malley FP. Amplification of the TOP2A gene does not predict high levels of topoisomerase II alpha protein in human breast tumor samples. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004;39(4):288-97
- (151) Park K, Han S, Gwak GH, Kim HJ, Kim J, Kim KM. Topoisomerase II-alpha gene deletion is not frequent as its amplification in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2006;98(3):337-42
- (152) Di Leo A, Isola J, Piette F et al. A meta-analysis of phase III trials evaluating the predictive value of HER2 and topoisomerase II alpha in early breast cancer patients treated with CMF or anthracycline-based adjuvant therapy. *Cancer Res* 2009, 69 (suppl 2): 375s (abstract 705).
- (153) O'Malley FP, Chia S, Tu D et al. Topoisomerase II alpha and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*. 2009 May 6;101(9):644-50.
- (154) Yeh I-T, Martin MA, Robetorye RS, Gunn S. "Polysomy 17" by FISH for HER2 in breast cancer is a misnomer: Results of chromosome 17 analysis by array comparative genomic hybridization *Cancer Res* 2009, 69 (suppl 2): 375s (abstract 3008).
- (155) C. Desmedt, E. Azambuja, D. Larsimont et al. Predicting the efficacy of anthracyclines in breast cancer (BC) patients: Results of the neoadjuvant TOP trial. *J Clin Oncol* 27:15s, 2009 (suppl; abstr 523).

- (156) Slamon DJ, Press MF. Alterations in the TOP2A and HER2 genes: association with adjuvant anthracycline sensitivity in human breast cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(9):615-8.
- (157) Lynch BJ, Guinee DG Jr, Holden JA. Human DNA topoisomerase II-alpha: a new marker of cell proliferation in invasive breast cancer. *Hum Pathol.* 1997;28(10):1180-8.
- (158) Koren R, Rath-Wolfson L, Ram E et al. Prognostic value of Topoisomerase II in female breast cancer. *Oncol Rep.* 2004;12(4):915-9.
- (159) Järvinen TA, Kononen J, Pelto-Huikko M, Isola J. Expression of topoisomerase IIalpha is associated with rapid cell proliferation, aneuploidy, and c-erbB2 overexpression in breast cancer. *Am J Pathol.* 1996;148(6):2073-82
- (160) Wong N, Yeo W, Wong WL et al. TOP2A overexpression in hepatocellular carcinoma correlates with early age onset, shorter patients survival and chemoresistance. *Int J Cancer.* 2009;124(3):644-52
- (161) Shvero J, Koren R, Shvili I, Yaniv E, Sadov R, Hadar T. Expression of human DNA Topoisomerase II-alpha in squamous cell carcinoma of the larynx and its correlation with clinicopathologic variables. *Am J Clin Pathol.* 2008;130(6):934-9
- (162) Tan DS, Marchió C, Jones RL et al. Triple negative breast cancer: molecular profiling and prognostic impact in adjuvant anthracycline-treated patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;111(1):27-44.
- (163) Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:10869-10874.
- (164) Whitfield ML, Sherlock G, Saldanha AJ, et al. Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors. *Mol Biol Cell.* 2002;13:1977-2000.
- (165) Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10:5367-74.
- (166) Cheang MC, Chia SK, Voduc D et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101:736-50.

- 
- (167) Chin K, DeVries S, Fridlyand J, et al. Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies. *Cancer Cell*. 2006;10:529-41.
- (168) Melchor L, Honrado E, Garcia MJ, et al. Distinct genomic aberration patterns are found in familial breast cancer associated with different immunohistochemical subtypes. *Oncogene*. 2008;27:3165-75.
- (169) Chin SF, Teschendorff AE, Marioni JC, et al. High-resolution aCGH and expression profiling identifies a novel genomic subtype of ER negative breast cancer. *Genome Biol*. 2007;8:R215.
- (170) Bergamaschi A, Kim YH, Wang P, et al. Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with different clinicopathological features and gene expression subtypes of breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006;45:1033-40.
- (171) Vincent-Salomon A, Gruel N, Lucchesi C, et al. Identification of typical medullary breast carcinoma as a genomic subgroup of basal-like carcinomas, a heterogeneous new molecular entity. *Breast Cancer Res*. 2007;9:R24.
- (172) Glinsky GV. Stem cell origin of death from cancer phenotypes of human prostate and breast cancers. *Stem Cell Rev*. 2007;3:79-93.
- (173) Kakarala M, Wicha MS. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. *J Clin Oncol* 2008;26:2813-20.
- (174) Martin M, Pienkowski T, Mackey et al. Adjuvant docetaxel for node-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;352(22):2302-13
- (175) Martín M, Lluch A, Seguí MA et al. Toxicity and health-related quality of life in breast cancer patients receiving adjuvant docetaxel, doxorubicin, cyclophosphamide (TAC) or 5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide (FAC): impact of adding primary prophylactic granulocyte-colony stimulating factor to the TAC regimen. *Ann Oncol*. 2006;17(8):1205-12
- (176) Ashworth A. A synthetic lethal therapeutic approach: poly(ADP) ribose polymerase inhibitors for the treatment of cancers deficient in DNA double-strand break repair. *J Clin Oncol*. 2008;26:3785-90.
- (177) Charles M. Perou, Ph.D. Genetic profiling of triple negative cancers: What drives them, really?. AACR 100th Annual Meeting 2009 April 20, 2009. La charla esta
-

disponible en:

<http://app2.capitalreach.com/esp1204/servlet/tc?cn=acr&c=10165&s=20420&e=11892&m=1>

(178) Hennessy BT, Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K et al. Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Res.* 2009;69(10):4116-24

(179) Prat A, Karginova O, FanC, Perou CM. Notch-associated expression profiles in basal-like and claudin-low breast cancer molecular subtypes J Clin Oncol 27:15s, 2009 (suppl; abstr 11017)

(180) Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini ME. Notch signaling. *Science.* 1995;268:225-232

(181) Jarriault S, Brou C, Logeat F et al. Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature.* 1995;377:355-358.

(182) Milner LA, Bigas A, Kopan R. Inhibition of granulocytic differentiation by mNotch1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:13014-13019.

(183) Worku D, Jouhra F, Jiang GW, Patani N, Newbold RF, Mokbel K. Evidence of a tumour suppressive function of E2F1 gene in human breast cancer. *Anticancer Res.* 2008;28(4B):2135-9.

(184) Dong YB, Yang HL, Elliott MJ, McMasters KM. Adenovirus-mediated E2F-1 gene transfer sensitizes melanoma cells to apoptosis induced by topoisomerase II inhibitors. *Cancer Res.* 2002;62(6):1776-83.

(185) Krop IE, Sgroi D, Porter DA, et al. HIN-1, a putative cytokine highly expressed in normal but not cancerous mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:9796-801.

(186) Krop I, Parker MT, Bloushtain-Qimron N et al. HIN-1, an inhibitor of cell growth, invasion, and AKT activation. *Cancer Res.* 2005;65(21):9659-69.

(187) Krop I, Maguire P, Lahti-Domenici J. Lack of HIN-1 methylation in BRCA1-linked and "BRCA1-like" breast tumors. *Cancer Res.* 2003;63(9):2024-7.

(188) Ose R, Yanagawa T, Ikeda S, Ohara O, Koga H. PCDH24-induced contact inhibition involves downregulation of beta-catenin signaling. *Mol Oncol.* 2009;3(1):54-66

- (189) Wendelaar Bonga SE, Pang PK. Control of calcium regulating hormones in the vertebrates: parathyroid hormone, calcitonin, prolactin, and stanniocalcin. *Int Rev Cytol.* 1991;128:139-213.
- (190) Joensuu K, Heikkilä P, Andersson LC. Tumor dormancy: elevated expression of stanniocalcins in late relapsing breast cancer. *Cancer Lett.* 2008;265(1):76-83.
- (191) Håkansson A, Zhivotovsky B, Orrenius S, Sabharwal H, Svanborg C. Apoptosis induced by a human milk protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92(17):8064-8.
- (192) Svensson M, Håkansson A, Mossberg AK, Linse S, Svanborg C. Conversion of alpha-lactalbumin to a protein inducing apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97(8):4221-6.
- (193) Uehara N, Unami A, Kiyozuka Y, Shikata N, Oishi Y, Tsubura A. Parous mammary glands exhibit distinct alterations in gene expression and proliferation responsiveness to carcinogenic stimuli in Lewis rats. *Oncol Rep.* 2006;15(4):903-11.
- (194) Morel F, Rauch C, Coles B, Ferrec EL, Guillouzo A. The human glutathione transferase alpha locus: genomic organization of the gene cluster and functional characterization of the genetic polymorphism in the hGSTA1 promoter. *Pharmacogenetics.* 2002; 12: 277-86.
- (195) Coles BF, Morel F, Rauch C et al. Effect of polymorphism in the human glutathione S-transferase A1 promoter on hepatic GSTA1 and GSTA2 expression. *Pharmacogenetics.* 2001; 11: 663-9.
- (196) Sweeney C, Ambrosone CB, Joseph L et al. Association between a glutathione S-transferase A1 promoter polymorphism and survival after breast cancer treatment. *Int J Cancer.* 2003;103(6):810-4.
- (197) Her C, Zhao N, Wu X, Tompkins JD. MutS homologues hMSH4 and hMSH5: diverse functional implications in humans. *Front Biosci.* 2007;12:905-11.
- (198) Herbert BS, Wright WE, Shay JW et al. Telomerase and breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2001;3:146-9.
- (199) Buess M, Nuyten DS, Hastie T, Nielsen T, Pesich R, Brown PO. Characterization of heterotypic interaction effects in vitro to deconvolute global gene expression profiles in cancer. *Genome Biol.* 2007;8(9):R191.

(200) Finak G, Bertos N, Pepin F et al. Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med.* 2008;14(5):518-27.

(201) Fan C, Oh DS, Wessels L, et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med* 2006;355:560-9.

(202) 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.

(203) Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med.* 2009;360:790-800.