

Genes de proliferación y apoptosis como factores predictivos y pronósticos en el cáncer de mama: hacia una medicina personalizada

Proliferation and apoptosis genes as prognostic and predictive factors in breast cancer: towards personalized medicine

Héctor Maldonado-Martínez,¹ Miguel Ángel Pluma-Jiménez,² Rocío Grajales-Álvarez,² Jorge Guadarrama-Orozco,² Vicente Valero-Castillo,³ Alejandro Silva,² Francisco Javier Ochoa-Carrillo,⁴ Isabel Baeza-Ramírez,⁵ Horacio Astudillo-de la Vega^{3,6}

▷ RESUMEN

Múltiples líneas celulares inmortales se caracterizan por diversas alteraciones genéticas, como mutaciones de genes clave en la apoptosis inducida por quimioterapia. Lo anterior explica porque algunas neoplasias sin haber recibido tratamiento previo son quimiorresistentes (resistencia tumoral innata). La co-amplificación de HER-2/*neu* y la topoisomerasa II juegan un papel determinante en la quimiosensibilidad. La apoptosis es un importante mecanismo regulador en el crecimiento y desarrollo celular que conduce a la carcinogénesis. Al perder el equilibrio entre la proliferación celular y la muerte celular o apoptosis, se favorece la tasa de crecimiento o de remisión

▷ ABSTRACT

*Multiple immortal cell lines are characterized by genetic alterations such as mutations of key genes in apoptosis induced by chemotherapy. This explains why some tumors without prior treatment are chemically resistant (innate tumor resistance). The coamplification of HER-2/*neu* and topoisomerase II plays a role in chemo-sensitivity. Apoptosis is an important regulatory mechanism in cell growth and development that leads to carcinogenesis. By losing the balance between cell proliferation and cell death or apoptosis, increases the rate of tumor growth or remission. Because many antineoplastic drugs require apoptotic pathway to induce cell death, the parameters of cellular proliferation and apoptosis are targets of study as predictors of response to chemotherapy. It has*

1Alumno del Programa de Doctorado Biomedicina y Biotecnología Molecular de la ENCB-IPN.

2Departamento de Oncología Médica, Hospital de Oncología Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

3Oncology Breast Department University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA.

4Departamento de Cirugía Oncológica, Instituto Nacional de Cancerología, Secretaría de Salud, México D. F.

5Departamento Bioquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México.

6Laboratorio de Investigación Transnacional y Terapia Celular, Hospital de Oncología Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. México D. F.

Correspondencia: Dr. Horacio Astudillo-de la Vega. Avenida Cuauhtémoc 330, Col. Doctores 06720. México, D. F. Teléfono: 525 56276900, ext. 22784; fax: 525 56276900.

Correo electrónico: hastud2@aol.com.

tumoral. Debido a que varios antineoplásicos requieren una vía apoptótica para inducir muerte celular, los parámetros de proliferación celular y apoptosis son blancos de estudio como predictores de respuesta a la quimioterapia. Se ha demostrado que la proliferación celular tumoral es un factor predictor en el cáncer de mama localmente avanzado (CMLA), utilizando doxorubicina como terapia neoadyuvante y valorando la frecuencia mitótica y los niveles de la proteína Ki-67. También se ha mostrado una asociación significativa entre la tasa de proliferación celular (frecuencia mitótica alta) y la resistencia a la doxorubicina en un subgrupo de tumores que expresan una proteína p53 silvestre y en donde el estado del gen p53 mutado ha sido el único factor predictivo de quimioresistencia. Hasta ahora, no se cuenta en la clínica con factores moleculares predictivos de respuesta o resistencia a la quimioterapia. Algunos marcadores ya han sido analizados en varios estudios de pacientes con cáncer de mama en los últimos años. Dentro de éstos se encuentran los genes HER-2/*neu* y p53, los cuales parecen ser los más importantes. Existe una relación entre las mutaciones del TP53 que afectan la respuesta a antraciclinas en pacientes con cáncer de mama locoregionalmente avanzado. Algunos estudios sugieren que la mutación específica de TP53 puede conferir resistencia a las antraciclinas. Los microarreglos de DNA representan una herramienta nueva para el estudio de los perfiles de expresión génica en tumores humanos. Otros estudios genómicos serán útiles para el estudio de los perfiles de expresión proteica (proteómica) en el cáncer.

Palabras clave: Cáncer de mama, p53, HER-2/*neu*, microarreglos, pronóstico, predictivo, México.

*been shown that tumor cell proliferation is a factor in locally advanced breast cancer (LABC) using doxorubicin as neoadjuvant therapy, and assessing the mitotic rate and the levels of Ki-67 protein. We have also shown a significant association between the rate of cell proliferation (high mitotic frequency) and resistance to doxorubicin in a subset of tumors expressing wild p53 protein and wherein the mutated p53 gene status was the only predictive factor of chemo-resistance. So far, there is no clinic in the molecular factors predictive of response or resistance to chemotherapy. Some markers have been analyzed in several studies of patients with breast cancer in recent years. Among these are the HER-2/*neu* and p53 genes, which appear to be the most important. There is a relationship between TP53 mutations that affect the response to anthracyclines in patients with locoregional advanced breast cancer. Some studies suggest that specific TP53 mutation can confer resistance to anthracyclines. DNA microarrays represent a new tool for studying gene expression profiles in human tumors. Other genomic studies will be useful for studying protein expression profiles (proteomics) in cancer.*

Keywords: Breast cancer, p53, HER-2/*neu*, microarrays, prognosis, predictive, Mexico.

▷ INTRODUCCIÓN

La quimiorresistencia es la principal causa de falla a la quimioterapia neoadyuvante (QTN).^{1,2} El estudio de los mecanismos de quimio-resistencia en la clínica como blanco primario tiene implicaciones importantes en la selección de regímenes terapéuticos.

Ante la exposición a un agente citotóxico *in vitro*, la sensibilidad y la resistencia se presentan en las células de manera simultánea estimulando o inhibiendo temporalmente su crecimiento; en contraste, debido a la heterogeneidad *in vivo* de las poblaciones celulares, la exposición a un agente citotóxico genera resultados variados en función del número de células sensibles o resistentes

dentro de dicha población.³ Este fenómeno se denomina clonalidad celular. El uso de modelos *in vitro* implementado por Skipper y Perry se ha utilizado desde hace 30 años para explicar la biología del cáncer humano;⁴ sin embargo, la inmortalización y los xenotrasplantes de líneas celulares en modelos murinos desafortunadamente no reflejan la misma heterogeneidad de los cánceres humanos *in vivo*.

Múltiples líneas celulares neoplásicas inmortales se caracterizan por presentar diversas alteraciones genéticas,^{5,6} como mutaciones en genes clave en la apoptosis inducida por quimioterapia.^{7,8} Lo anterior explica por qué algunas neoplasias son quimiorresistentes aún sin haber recibido tratamiento previo (resistencia tumoral innata). Sin embargo, la quimiorresistencia también puede ser adquirida, lo que se demuestra durante el tratamiento con segundas o terceras líneas de quimioterapia (QT). Otra posible causa que ha sido discutida es la misma propiedad mutagénica de los fármacos que podrían inducir resistencia a otros.⁹ Los estudios comparativos y las observaciones clínicas sugieren varias diferencias en los mecanismos de quimio-resistencia como: sobreexpresión de proteínas de bomba de membrana (tipo MDR y Glicoproteína-P), además de ciertos oncogenes, desregulación de enzimas metabolizadoras de fármacos (Citocromo P450) y mutaciones de genes involucrados en la apoptosis (genes de la familia Bcl-2, p53 y caspasas).

Por el contrario, ahora sabemos que un factor importante de la resistencia a las antraciclinas es por vía de la glicoproteína-P, la cual es codificada por el gen de resistencia a multifármacos (MDR), también desde hace algunos años implicado en la vía apoptótica.¹⁰ Otro mecanismo común de resistencia lo representa la desregulación de la glutación.

Estudios recientes se han enfocado en la sobreexpresión del protooncogén HER-2/*neu*,¹¹ en los defectos de la enzima topoisomerasa II¹² y en las mutaciones del gen p53.¹³

Existen múltiples mecanismos de resistencia a quimioterapia, y varios de éstos se encuentran vinculados,^{14,15} como se observa en la asociación de la sobreexpresión del oncogén HER-2/*neu*, la sensibilidad a antraciclinas y la sobreexpresión de la topoisomerasa II, enzima coamplificada por HER-2/*neu*.

Park K y colaboradores¹⁶ analizaron 67 pacientes con CMLA tratadas con Quimioterapia Neoadyuvante (QTN) basada en doxorubicina, y observaron mayores tasas de respuesta en quienes presentaron co-amplificación de HER-2/*neu* y topoisomerasa II (18/19), en comparación con pacientes que no la presentaban (17/36), con lo que se concluye el papel determinante de dichos genes en la sensibilidad de esta neoplasia.

▷ FACTORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS DE LA RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA

Los factores pronósticos son aquéllos relacionados con el desarrollo de metástasis de una neoplasia¹⁷ e influyen en el riesgo de recaída o muerte, independientemente de su tratamiento.¹⁸ Por su parte, los factores predictivos se asocian a la sensibilidad o resistencia al tratamiento citotóxico del tumor.

El estado de receptores hormonales (RE, receptor de estrógenos y RPg, receptor de progesterona) en cáncer de mama temprano son factores pronósticos débiles; sin embargo, son adecuados predictores de respuesta a la hormonoterapia.¹⁹ Su valor en enfermedad localmente avanzada es controversial.²⁰

La utilidad del estudio de la sensibilidad a la quimioterapia radica en: 1). La evaluación directa de la respuesta objetiva tumoral,²¹ así como la respuesta celular mediante la determinación del índice apoptótico,²² 2). El monitoreo de las lesiones medibles y por último, 3). La comparación, en biopsias de control, de los cambios en las características biológicas secundarias al tratamiento. Sin embargo, se desconoce si los efectos de la QTN pueden ser un parámetro de respuesta y considerarse de valor pronóstico.

Actualmente se están investigando los cambios histopatológicos y marcadores moleculares como factores pronósticos y predictivos de respuesta a quimioterapia.²³

▷ APOPTOSIS Y PROLIFERACIÓN CELULAR COMO BIOMARCADORES EN EL CÁNCER DE MAMA

La apoptosis es un mecanismo regulador importante en el crecimiento y desarrollo celular, que al inhibirse conduce a la carcinogénesis. Cuando existe pérdida del equilibrio entre la proliferación y la muerte celular o apoptosis, se favorece la tasa de crecimiento o bien, la remisión tumoral.²⁴

Debido a que varios antineoplásicos requieren una vía apoptótica para inducir muerte celular, se pueden estudiar la proliferación celular y apoptosis como predictores de respuesta a QT, considerando que sus vías principales convergen en varios puntos, igual que los procesos biológicos regulados por el gen supresor de tumor p53.²⁴

La apoptosis y la proliferación celular se han relacionado estrechamente en diversos reportes de pacientes con cáncer de mama previamente tratadas con QT.²⁵⁻²⁷ La población celular con mayores tasas de proliferación, también muestra elevadas tasas de apoptosis.

Lo anterior se asocia con tumores de alto grado, sobreexpresión del oncogén HER-2/*neu* y del gen supresor

de tumor p53; y de manera inversa, la expresión del oncogén Bcl-2 y de RE se asocia con un pobre pronóstico.²⁸

No obstante, la evidencia que permita señalar a la apoptosis como marcador pronóstico independiente en cáncer, no ha sido demostrada,²⁹⁻³² aun cuando se publicó en una gran serie de pacientes con cáncer de mama (más de 700) la relación entre apoptosis, sobrevida libre de enfermedad (SLE), sobrevida global (SG) y la presencia de ganglios positivos. En este estudio no se identifica a la apoptosis como un marcador pronóstico independiente,³⁰ lo cual no descarta esta posibilidad, pues otros estudios ha señalado a la apoptosis como una variable independiente cuando se correlaciona con otros indicadores pronósticos.³¹

Recientemente se ha identificado a una nueva familia de genes inhibidores de la apoptosis que pueden tener un mayor potencial como marcadores predictivos o pronósticos (XIAP, cIAP1, cIAP2, NIAP y survivina en humanos).³²

El producto proteico de estos genes inhibe la apoptosis por unión directa e inactivación de las caspasas. El inhibidor más potente hasta ahora, es el XIAP.

Por otra parte, otros estudios indican que los tumores con alto grado de proliferación celular (determinado por la expresión de las proteínas Ki-67 o MIB-1) están fuertemente asociados con una disminución en la SLE y SG, en gran parte debido a su quimiorresistencia.^{33,34} Si bien es sabido que el grado tumoral también se relaciona con la respuesta a los agentes citotóxicos, esta observación probablemente demuestra las diferencias genéticas asociadas con cada tejido tumoral. Esto se demostró en un meta-análisis que incluyó 46 ensayos (n = 12 155), en el que la positividad para Ki-67/MIB-1 se asoció con un riesgo significativamente mayor de recaída, tanto enfermedad con ganglios positivos (HR 1.59, 95% CI 1.35-1.87) como ganglios negativos (HR 2.31, 95% CI 1.83-2.92). También se encontró relación entre la positividad a Ki-67/MIB-1 y menor sobrevida, independientemente al estatus ganglionar.³⁵ No obstante, la falta de estudios prospectivos impide llevar estos resultados a la práctica clínica.

Aun cuando se ha demostrado en el tejido residual post-QT una reducción significativa en los niveles de apoptosis en clonas quimiorresistentes, el balance entre apoptosis y proliferación celular se mantiene sin variaciones, cuestionando si la disminución en ésta es el resultado de una sub-regulación proliferativa por una vía molecular inactiva, o bien, es resultado de células residuales menos proliferantes e intrínsecamente menos sensibles a la QT.

Se ha detectado una mayor concentración de proteína Bcl-2 en la población de células residuales, aunque

se considera que Bcl-2 podría ser el único factor relacionado con la disminución de la proliferación celular, gracias a sus propiedades reguladoras e inhibidoras de la apoptosis.^{28,29} Asimismo, un índice proliferativo elevado en el tumor residual se asocia con menor SG, lo que se refleja en los hallazgos de Vakkala y colaboradores,³⁶ en el que se aprecia que el aumento de la proliferación celular y la disminución del índice apoptótico en tumores de mama recurrentes predicen un peor pronóstico. Aas y colaboradores, determinaron la proliferación celular tumoral como factor predictivo en CMLA tratado con doxorubicina neoadyuvante a través de la frecuencia mitótica y los niveles de Ki-67. El análisis univariado mostró una asociación significativa entre la tasa de proliferación celular (frecuencia mitótica alta) y resistencia a la doxorubicina ($p = 0.001$); sin embargo, esta relación se limitó a un subgrupo de tumores que expresaron una proteína p53 silvestre ($p = 0.016$). El estado del gen p53 mutado fue el único factor predictivo de quimiorresistencia en el análisis multivariado. Se concluye que una frecuencia mitótica alta y una elevada expresión de la proteína Ki-67, se correlacionan con la mutación del gen p53 ($p = 0.001$ para ambos), lo cual es útil como predictor de la fármaco resistencia en los tumores mamaros, sin descartar que la proliferación celular podría jugar un papel adicional en los tumores que albergan un gen p53 tipo silvestre.³⁷

▷ PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN EL CÁNCER DE MAMA

Pese a que los predictores clínicos han demostrado utilidad, no se ha determinado su aplicación clínica concluyente. Las mediciones genómicas proporcionan información para identificar patrones de actividad de los mismos y subclasificarlos.³⁸

Huang y colaboradores,³⁹ observaron un patrón agrupado de expresión de genes (metagenes) con capacidad para predecir metástasis linfática ganglionar y recurrencia de la enfermedad de manera individual, con una especificidad de alrededor de 90%. Estos metagenes sugieren la participación de múltiples procesos biológicos en el cáncer de mama que incluyen a los genes inducidos por interferones, varias citocinas y sus receptores (RANTES, CXCL10, CCR2), algunos genes interferón-inducidos (IFI30, IFI35, IFI27, IFI44, IFIT1, IFIT4, IFITM3) y genes efectores de interferón (2'-5' oligo A sintetasa), además de genes codificadores de proteínas, genes mediadores de la inducción de éstos (STAT1 y IRF1), y genes involucrados en la función de células-T (TCRA, CD3D, IL2R, MHC).

▷ MARCADORES BIOMOLECULARES EN EL CÁNCER DE MAMA

En la actualidad no se cuenta con factores moleculares predictivos de respuesta o resistencia a la QT con utilidad clínica. Los marcadores a analizar incluyen: el gen MDR1 (gp170), la enzima topoisomerasa II, la fase-S del ciclo celular, el gen HER-2/*neu* y el gen p53, entre otros. De éstos, los más relevantes parecen ser HER-2/*neu* y p53.

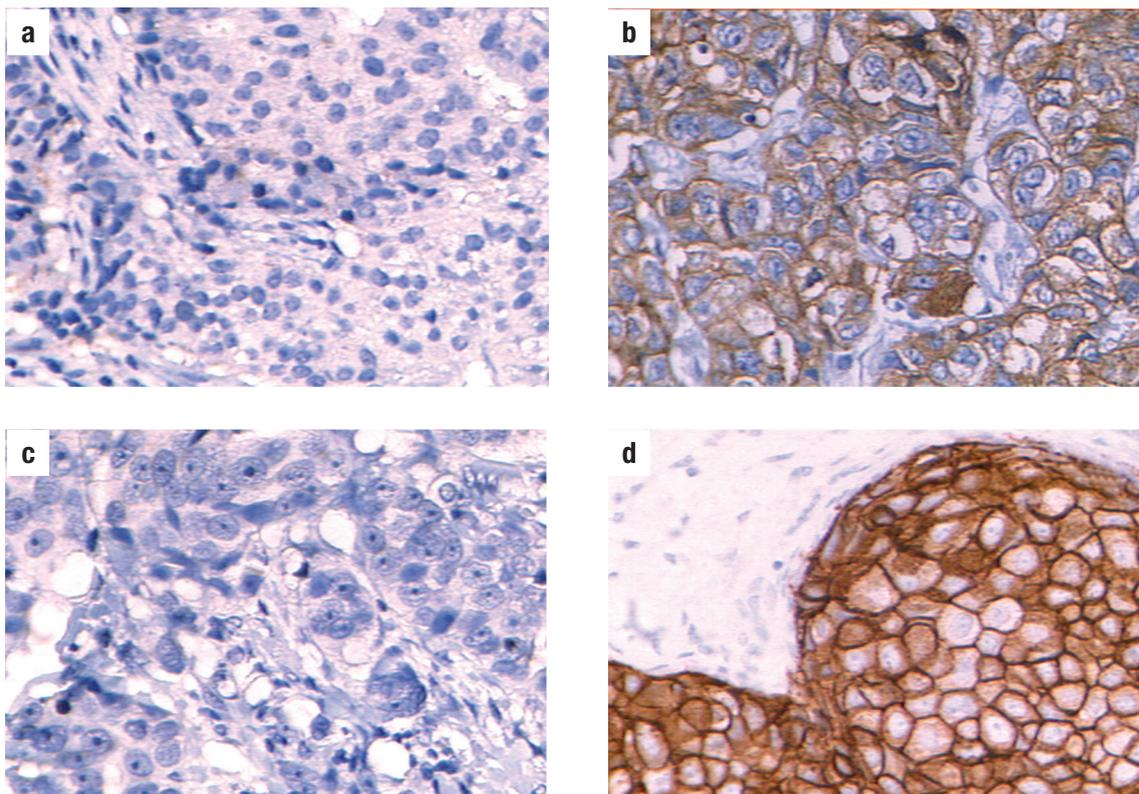
El HER-2/*neu*, localizado en el cromosoma 17q23, codifica para una glucoproteína transmembranal de 185-kD y es uno de los cinco miembros de la familia

del receptor del factor de crecimiento epidérmico; se sobreexpresa en 20% a 40% de los cánceres de mama, y confiere un mal pronóstico clínico (**Figura 1**). En estudios retrospectivos, se ha demostrado que es un factor predictivo de respuesta a QT, específicamente para antraciclinas (doxorubicina).⁴⁰

El papel clínico de HER-2/*neu* como factor predictivo de sensibilidad, específicamente con antraciclinas, ha sido analizado en diversos ensayos, con resultados poco uniformes. Dos meta-análisis sugirieron un mayor beneficio del tratamiento con antraciclinas en mujeres con tumores con sobreexpresión del HER-2/*neu*.^{41,42} En contraste, en el ensayo clínico fase III BR9601, que compara

Figura 1.

Análisis de expresión del biomarcador HER-2/*neu* en biopsias de cáncer de mama. (a). Biopsia negativa para el biomarcador HER-2/*neu*, (b). Biopsia positiva para el biomarcador HER-2/*neu* con un puntaje de (+); (c). Micrografía de un control negativo para la muestra de estudio del panel (b). En el panel (d) micrografía con un resultado de (++++) para el biomarcador HER-2/*neu* en una biopsia de cáncer de mama



CMF vs. Epirubicina seguido de CMF, se evidenció un mayor beneficio en sobrevida libre de progresión (SLP) y SG en pacientes con tumores que tenían una expresión normal de HER-1, HER-2 y HER-3. No se observó beneficio en administrar antraciclinas a pacientes con tumor que sobreexpresaba HER-2/*neu*.⁴³

La TOPO2A es el blanco de las antraciclinas y se ha sugerido que sus alteraciones están asociadas a quimiosensibilidad.^{44,45} Se conoce que este gen se encuentra adyacente a HER-2/*neu* en el cromosoma 17q12-21. El estudio TOP, es el primer ensayo prospectivo que ha intentado establecer si el gen de TOPO2A (y no la proteína) predice la sensibilidad a antraciclinas. Ciento cuarenta y nueve pacientes recibieron epirubicina neoadyuvante seguida de docetaxel adyuvante e irradiación. Se obtuvo una respuesta completa patológica (RCp) en 14.5% de las pacientes. La amplificación del gen TOPO2A (11% de los casos) sólo se observó en quienes presentaron amplificación de HER-2/*neu* (33%). Hubo correlación estadísticamente significativa entre la amplificación del gen TOPO2A y la RCp ($p = 0.0002$); sin embargo, ni la sobreexpresión de la proteína TOPO2A determinada por IHQ, ni la determinación del mRNA, ni la polisomía del cromosoma 17, mostraron correlación con la respuesta a epirubicina.⁴⁶

Otro estudio con antraciclinas neoadyuvante, contradice al anterior y menciona que la expresión de la proteína TOPO2A medido por IHQ, previo a la quimioterapia, tanto en el análisis multivariado como univariado, presenta correlación con la RCp ($p = 0.021$).⁴⁷

En cuanto a los taxanos, en un estudio preliminar con paclitaxel más radioterapia neoadyuvante (RTN) se observó que la sobreexpresión de la proteína HER-2/*neu* identificada por IHQ se asoció con una mejor respuesta clínica, comparada con tumores HER-2/*neu* negativos;⁴⁸ no obstante, en otro ensayo de paclitaxel más RTN en enfermedad locorregionalmente avanzada, los tumores HER-2/*neu* negativos mostraron una mayor tasa de respuesta.⁴⁹ Hasta el momento, diversos estudios aleatorios sugieren que la sobreexpresión de HER-2/*neu* (detectado por IHQ) se asocia a una baja probabilidad de beneficio con un esquema adyuvante de ciclofosfamida, metotrexate y 5-fluorouracilo (CMF), comparado con tumores que no expresan la proteína en pacientes con cáncer de mama en etapa temprana.⁵⁰

Por otra parte, el gen p53 ha surgido como un posible factor pronóstico y predictivo en el cáncer de mama, aunque su valor aún no está bien establecido, se ha observado que su asociación con HER-2/*neu* podría tener un mayor valor predictivo que utilizándolo solo.⁵¹

En un estudio realizado por Yamashita y colaboradores, la asociación de la sobreexpresión de HER-2/*neu* y la presencia del gen p53 en 506 muestras con carcinoma ductal infiltrante, fue un marcador molecular pronóstico. En el análisis multivariado, las pacientes con presencia de ambos genes presentaron recaída y fallecieron dentro de un periodo postquirúrgico significativamente corto ($p = 0.0001$ y $p < 0.0001$, respectivamente), con una disminución considerable en la SVG ($p = 0.04$).⁵²

De acuerdo a las características moleculares y bioquímicas tumorales en pacientes con carcinoma de mama inflamatorio, se está intentando establecer el tratamiento óptimo mediante el desarrollo de nuevos blancos terapéuticos, aunque éstos no han sido validados para su uso en la práctica clínica (**Tabla 1**).⁵³

Diversos estudios sobre factores biológicos en cáncer locorregionalmente avanzado o inflamatorio han analizado marcadores que incluyen: RE, RPg, MIB-1, HER-2/*neu*, p53 y ciclina D1 (todos por IHQ), tratando de determinar su valor pronóstico y predictivo mediante la respuesta clínica a cinco años. En el estudio de Bonnefoi y colaboradores⁵⁴ evidenciaron que la presencia de p53 se asoció con menor SLP y SG. Sin embargo, el RPg fue un predictor de mayor SG, sin correlacionarse de forma significativa con el grado de expresión del receptor hormonal (RH), MIB-1, HER-2/*neu* o p53, y con una respuesta clínica completa. En este estudio se concluyó que p53 fue un factor predictivo para la sobrevida y el análisis univariado demostró que la ciclina D1 negativa se asoció con una baja tasa de respuesta clínica completa ($p = 0.051$).

▷ GEN SUPRESOR DE TUMOR P53 Y CÁNCER DE MAMA

El anticuerpo específico de p53 (Ac-p53) fue descrito por primera vez en 1982;⁵⁵ actualmente se encuentran disponibles diversos sistemas de pruebas comerciales para su detección. La técnica utilizada inicialmente fue mediante inmunoprecipitación, desplazada posteriormente por inmunoblot y ELISA.

El gen p53 se localiza en el cromosoma 17, codifica para una fosfoproteína nuclear de 53 kD y juega un importante papel en la regulación del ciclo celular y la apoptosis como respuesta al daño del DNA. Su inactivación representa un paso crítico en el desarrollo de neoplasias, debido a su función determinante en múltiples vías celulares como: el control del ciclo celular en el punto de restricción G1/S, la reparación del DNA, la apoptosis y la neoangiogénesis, indispensables para mantener la integridad del genoma.⁵⁶

El daño al DNA causado por QT conduce a un incremento del nivel del gen supresor tumoral p53, que

Tabla 1.

Biomarcadores en cáncer de mama.

Estado	Biomarcador	Análisis	Papel biológico	Principal aplicación
Establecido	ER-alfa PgR	Proteína	Respuesta a estrógenos	Sensibilidad endócrina
		Proteína	Respuesta a progesterona	Sensibilidad endócrina
Prometedor	Her-2/neu	Proteína	Factor de crecimiento	Pronóstico / Quimioterapia
		Amplificación génica		Pronóstico / Quimioterapia
	EGFr	Receptor de factor de crecimiento	Sensibilidad endócrina	
	p53	Mutación	Integridad del DNA	Respuesta a quimioterapia
	Bcl-2	Proteína	Regulación de la apoptosis	Respuesta endócrina
	Ki-67	Proteína	Proliferación celular	Pronóstico / Quimioterapia
Fase-S	DNA	Proliferación	Pronóstico / Quimioterapia	
uPA/PAI-1	Proteína	Degradación de la matriz celular	Pronóstico	

ER-alfa, receptor de estrógenos alfa; PgR, receptor de progesterona; EGFr, receptor del factor de crecimiento epidérmico; uPA, activador de plasminógeno tipo uroquinasa; PAI-1, inhibidor del activador de plasminógeno tipo I.

detiene el ciclo celular en G1 y apoptosis, mediante lo cual, los agentes antineoplásicos logran su efecto citotóxico; por esta razón, TP53 se ha propuesto como un factor determinante de sensibilidad en las células neoplásicas.⁵⁷

▷ LA MUTACIÓN DEL GEN p53 COMO FACTOR PREDICTIVO DE RESPUESTA A LA QTN CON ANTRACICLINAS

El gen p53 es inactivado por una mutación puntual en aproximadamente 50% de todos los cánceres humanos.⁵⁸ Su mutación somática (TP53) se encuentra en 20% a 40% de los cánceres de mama. Anelli y colaboradores^{59,60} y otros grupos, la señalaron como la alteración genética única más frecuente y se asocia a mal pronóstico.

La mutación de p53 en el tejido tumoral se presenta con mayor frecuencia en tumores primarios voluminosos, de alto grado, con ganglios positivos y RPg negativos; clínicamente, las pacientes presentan una menor SLE y SG.⁶¹⁻⁶³ Esto sugiere que la mutación de p53 puede ser un factor pronóstico independiente y predictivo de resistencia a antraciclina. Sin embargo, Bertheau y colaboradores,⁶⁴ analizaron pacientes con CMLA (IIB, IIIA, y IIIB) tratadas con dosis altas de ciclofosfámido más epirrubicina como primera línea de tratamiento y no observó correlación entre el estado de TP53 (por IHQ) pre-tratamiento y la respuesta clínica, pero sí una asociación importante con el estado inicial de TP53 y la respuesta histológica del tumor ($p < 0.0001$).

Por otra parte, estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que tumores con p53 tipo silvestre responden

mejor con antraciclina que aquéllos con mutación del mismo.

Geisler S y colaboradores observaron la relación entre las mutaciones del TP53 que afectan el enlace L2/L3 (dominio obligatorio del DNA de la proteína p53) con la respuesta a las antraciclina en pacientes con CMLA.¹³ Los tumores con TP53 tipo silvestre fueron resistentes a la terapia, mientras aquéllos que presentaban mutación de TP53 en el dominio L2/L3 fueron quimio-sensibles. Para explicar esto, surgieron tres posibilidades: 1). La mutación del gen TP53 no fue la causa de la resistencia, sino una covariante de otros factores; 2). Las mutaciones pudieron ser la causa de resistencia en los pacientes analizados, pero no en otros y 3). La resistencia pudo ser debido a la inhibición de una cascada particular que involucra genes adyacentes a p53, pero que TP53 también interactúa con una vía que puede compensar la pérdida de la función.

Estas hipótesis explican la razón por la cual la mutación de TP53 se encuentra tanto en pacientes que responden al tratamiento como en los que no.

En contraste, Rahko y colaboradores⁶⁵ sugieren que el p53 mutado es un factor pronóstico independiente en pacientes con cáncer de mama así como predictor de quimiorresistencia a antraciclina y su co-expresión con HER-2/neu impacta negativamente en la SG. Asimismo, la actualización del estudio de Aas, también sugiere que la mutación específica de TP53 confiere resistencia a las antraciclina. Por el contrario, el efecto citotóxico de los taxanos no tiene relación con la mutación de p53, debido a que su mecanismo de acción es independiente.

Como se ha discutido, establecer un factor predictivo asociado a la causa de quimiorresistencia es complejo, ya que existe la posibilidad de que el factor predictivo sea una covariante de la causa de resistencia. Sin embargo, si una alteración biológica en particular es causa de quimio-resistencia, la restauración de esta función podría revertirla.

▷ NUEVAS TECNOLOGÍAS PARA LA BÚSQUEDA DE MARCADORES MOLECULARES EN EL CÁNCER: APLICACIÓN CLÍNICA DE LOS MICROARREGLOS DE CDNA

Los microarreglos de DNA representan una herramienta nueva para el estudio de los perfiles de expresión génica en tumores humanos. La tecnología de microarreglos permite investigar y determinar la expresión de miles de RNA mensajeros simultáneamente a partir de un espécimen biológico. La densidad de genes actualmente disponibles en un microarreglo, abarca un rango de cientos a más de 30 000 secuencias únicas.⁶⁶

Esta herramienta ha puesto de manifiesto la existencia de varios subtipos moleculares de cáncer de mama, con sensibilidades terapéuticas y evoluciones clínicas diferentes (**Tabla 2**).

▷ MODELO DE 70 GENES (MAMMAPRINT O FIRMA DE ÁMSTERDAM)

Se trata de la identificación de una huella genética pronóstica de 70 genes a partir del tejido congelado de 70 pacientes menores de 55 años las cuales no habían recibido tratamiento adyuvante y por lo tanto, reflejaban la evolución natural de la enfermedad.⁶⁷ Fue validado en una cohorte de 295 carcinomas de mama en estadios I

o II,⁶⁸ aunque recientemente se ha evaluado el papel de *Mammprint* en pacientes con axila positiva. Esta plataforma comienza a dar evidencia de la capacidad predictiva de respuesta a la QT. En un meta-análisis (n = 1637) se dividieron los pacientes en: bajo riesgo génico (47%) y alto riesgo génico (53%). Los pacientes de alto riesgo génico se beneficiaban de la QT, mientras que los pacientes de bajo riesgo génico parecían no hacerlo.⁶⁹⁻⁷¹

▷ MODELO DE 76 GENES (AFFYMETRIX O FIRMA DE ROTTERDAM)

Consiste en 76 genes con valor pronóstico, 60 para pacientes con RE positivo y 16 para pacientes con RE negativo. Esta firma se validó en un grupo de 286 pacientes con axila negativa sin haber recibido QT adyuvante. El modelo tuvo sensibilidad de 93% y especificidad de 48% para predecir metástasis a 10 años.⁷²

▷ MODELO DE EXPRESIÓN DE DOS GENES

Razón HOXB13/IL17BR. El grupo de Massachusetts elaboró un modelo de expresión génica en mujeres con cáncer de mama RE positivas tratadas con tamoxifeno. La razón de expresión de dos genes, compuestos por el gen homebox (HOXB13) y el receptor IL17BR de la interleuquina-17b (modelo HOXB13/IL17BR) fue la base para predecir la SLP.⁷³ Este modelo ha sido validado por tres estudios retrospectivos.

▷ MODELO DE 21 GENES (ONCOTYPE DX)

Se realiza en tejido tumoral fijado en formol o incluido en parafina. El *test* analiza la expresión, mediante la

Tabla 2.

Perfiles de expresión génica en cáncer de mama, actualmente validados.

Nombre	Tecnología usada	Número de genes	Valor pronóstico	Valor predictivo	Estudio de validación
Mammprint	cDNA (tejido fresco-congelado)	70	Sí	En estudio	van de Vijver. N Engl J Med 2002;347:1999-2009.
Firma de Rotterdam	cDNA (tejido fresco- congelado)	76	Sí	Sí	Foekens JA. J Clin Oncol 2006;24:1665-1671.
OncotypeDx	RT-PCR (tejido fijado)	21	Sí	Sí	Paik S. N Engl J Med 2004;351:2817.
Firma HOXB13:IL17BR	cDNA (tejido congelado)	2	Sí	Sí	Goetz MP. Clin Cancer Res 2006;12:2080-2087.

reacción en cadena de la polimerasa, de 21 genes implicados en la vía de los receptores hormonales, HER-2/*neu*, proliferación e invasión (16 genes relacionados al cáncer y cinco genes de referencia). El resultado es por medio de una puntuación, en escala continua, denominada RS (*recurrence score*, por sus siglas en inglés, o índice de recurrencia),⁷⁴ que ha permitido un algoritmo predictivo de riesgo basado en tres grados pronósticos: alto (>30%), intermedio (>18% y <30%) y bajo (<18%), los cuales permiten estimar tanto el valor pronóstico, en el riesgo de recurrencia, validado por el ensayo clínico NSABP B-14,⁷⁵ como el valor predictivo en el beneficio de la QT, validado por el ensayo NSABP-B20.⁷⁶

El estudio SWOG S8814, ensayo fase III en mujeres postmenopáusicas con cáncer de mama RE positivo y axila positiva, demostró que seis ciclos de FAC (5-fluorouracilo, adriamicina, ciclofosfamida) mejoraba la SG y SLP *vs.* tamoxifeno solo. Se obtuvo muestra tumoral para realizar Oncotype DX en un subgrupo de 367 pacientes. EL RS fue riesgo bajo en 40%, riesgo intermedio en 28% y riesgo alto en 32%. Las mujeres con RS de riesgo alto se beneficiaron más de la QT, mientras que las pacientes con riesgo bajo no obtuvieron ningún beneficio adicional.⁷⁷ Este tipo de perfiles génicos han sido utilizados para predecir el beneficio de la QTN o adyuvante, con resultados hasta ahora muy prometedores, pero con limitaciones de muestra y poder predictivo, aunque se precisan validaciones prospectivas antes de integrarlas en la práctica clínica. Se están realizando dos ensayos grandes de validación de estas plataformas; el ensayo MINDACT (*Microarray May Avoid Chemo Therapy*) donde se evalúa el riesgo en 600 pacientes con axila negativa, utilizando el modelo de 70 genes (*Mammaprint*), en el cual, si el riesgo es bajo no se administra QT.⁷⁸ El ensayo TAILORx está evaluando la plataforma de 21 genes (Oncotype DX). Las pacientes con cáncer de mama y axila negativa se asignan a tres brazos según el RS. Las pacientes con RS bajo recibirán hormonoterapia sin QT, las pacientes con riesgo intermedio se aleatorizarán a hormonoterapia o QT, seguido de tratamiento hormonal, y las de alto RS recibirán QT seguido de tratamiento hormonal.⁷⁹

En los próximos años estará disponible información sobre el alcance clínico de estas herramientas moleculares, contribuyendo a complementar el algoritmo terapéutico individualizado.

Entre las aplicaciones clínicas actuales de los microarreglos se encuentran: como pruebas de tamizaje para identificar moléculas individuales potencialmente relevantes como blancos terapéuticos, marcadores predictivos y pronósticos; como herramienta para el análisis del complejo comportamiento celular de las neoplasias

(estudio del perfil transcripción al genético bajo condiciones experimentales o durante la QT, identificación de vías moleculares involucradas en la patogénesis del cáncer); como instrumento para clasificar las neoplasias en base a la descripción de nuevas clases de moléculas o neoplasias histológicamente similares o a la identificación de resultados clínicos importantes, como la SVG o las tasas de respuesta al tratamiento.

En este contexto, actualmente puede ser posible lo enunciado por Karen Vousden (Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos): '*Si pudiéramos marcar como mínimo algunas de las proteínas mutantes que se comportan como p53 tipo silvestre, podría ser posible la restauración normal del control del crecimiento en tumores que expresan un p53 mutado*'.

Lo anterior retribuiría en mejores resultados con regímenes preestablecidos de quimioterapia.

▷ CONCLUSIONES

El papel del gen p53 como marcador de respuesta es controversial.⁸⁰ Se ha tratado de establecer una relación significativa entre sobreexpresión del gen p53 o mutaciones del mismo, por medio de: 1). La respuesta a la terapia convencional y 2). Los regímenes de QT basada en antraciclinas *vs.* QT sin antraciclinas.

Si bien, algunos estudios indican que las alteraciones del gen p53 son factores predictivos de quimio-resistencia, otros trabajos sugieren que podría considerarse como un factor predictivo de quimio-sensibilidad. La controversia en cuanto a su potencial papel predictor, según su estado estructural o su patrón de expresión, aún es materia de estudio en las neoplasias humanas⁸¹. Un factor importante que influye en esta disyuntiva, es que aun cuando se ha avanzado en el desarrollo de sistemas de detección comerciales, los resultados pueden variar de acuerdo a la técnica utilizada.

A partir de esta consideración, estudios como el publicado por Volkmann y colaboradores,⁸² en el que se analizaron 165 biopsias de neoplasias mediante un anticuerpo anti-p53, utilizando diferentes técnicas para su detección que incluyeron: ELISA, inmunoblot e inmunofluorescencia (Huh7) para su confirmación, además de inmunohistoquímica para determinar la expresión *in situ* del gen en el tejido tumoral. Los resultados del estudio mostraron que la tasa global de detección de la proteína p53 fue de 11%, valor muy bajo según lo señalado en la bibliografía. Asimismo, las determinaciones por inmunoprecipitación (9%), inmunofluorescencia (5%) y ELISA (12%) fueron menores. Lo anterior permite concluir que existe un nivel bajo de expresión de la proteína p53 en pacientes con carcinoma de mama. Por otra parte, otros

estudios que utilizaron distintos métodos moleculares de diagnóstico, establecieron que el estado del gen p53 es un marcador independiente y de mal pronóstico en el cáncer de mama, a pesar de los resultados obtenidos por IHQ que han mostrado ser controversiales.⁸³

Se puede inferir que la sobreexpresión de la proteína p53 detectada por IHQ se correlaciona de manera directa con mutaciones del gen p53. La falta de sensibilidad y especificidad en los métodos empleados en la detección de la proteína p53, explica los resultados contradictorios en los intentos de establecerlo como un marcador pronóstico o predictivo en cáncer de mama. Otro aspecto a considerar es que una gran cantidad de estudios de quimio-resistencia se realizan de manera retrospectiva y una limitante para estos estudios es que las muestras disponibles utilizadas son biopsias incluidas en bloques de parafina. Aun cuando estas preparaciones son útiles para realizar estudios de inmunodetección y análisis de DNA, no tienen utilidad para el estudio de las nuevas técnicas genómicas ni para el estudio de microarreglos, para los cuales necesariamente se requiere de la obtención de un-RNA mensajero de buena cantidad y calidad.

Entre los estudios genómicos, la purificación y caracterización de proteínas será útil para el estudio de los perfiles de expresión proteica en el cáncer (proteómica), y la limitante será, nuevamente, la calidad del material biológico de estudio.

Considerando que en una neoplasia se expresan múltiples genes, la simple inmunodetección resulta una técnica limitada para el análisis molecular masivo y nos obliga a utilizar técnicas que permiten el estudio de un mayor número de genes simultáneamente, para lo que requieren de la extracción de RNA mensajero de calidad.⁸⁴ Lo anterior evidencia las dificultades metodológicas en los estudios retrospectivos para determinar un papel predictivo del gen p53 en las neoplasias humanas.

Es imperativo continuar con investigación de nuevos blancos moleculares que puedan contribuir a establecer mejores estrategias terapéuticas (convencional, altas dosis o experimental), y aportar un mejor conocimiento de los genes relacionados con el crecimiento y la metástasis tumoral para identificar con mayor precisión a pacientes de alto riesgo.

Por último, si bien estudios de DNA y cDNA han determinado que mutaciones del gen p53 predicen la resistencia a diferentes regímenes de QT en el tratamiento del cáncer de mama,⁸⁵ más de 15 estudios no lo han demostrado. Cabe mencionar que la evaluación del estado del gen en estos estudios fue realizada por IHQ y en biopsias tumorales incluidas en parafina.

La posible explicación para la discrepancia entre la expresión de la proteína p53 y la resistencia a QT, es que las mutaciones del gen p53 asociadas con la quimio-resistencia no pueden ser detectadas por IHQ cuando se utiliza un anticuerpo anti-p53 convencional y de origen policlonal (como comercialmente se encuentran disponibles) y el uso de anticuerpos monoclonales para regiones peptídicas específicas de la proteína p53 implicaría el uso de un set de anticuerpos muy extenso para detectar de manera simultánea todas las posibles mutaciones inhibidoras de la función de la proteína p53.

El futuro inminente es analizar el papel pronóstico y predictivo de múltiples genes a través de modelos que determinen perfiles de expresión génica de los genes de funciones celulares, vías bioquímicas, proliferación celular y mecanismos de regulación del cáncer de mama.⁸⁶

▷ AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por la Coordinación de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y la Dirección del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Agradecemos a la Lic. Montserrat Guadarrama Orozco por la revisión de estilo de todo el presente trabajo.

REFERENCIAS

1. Fisher B, Brown A, Mamounas E, et al. Effect of preoperative chemotherapy on local-regional disease in women with operable breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J Clin Oncol* 1997;15:2483-93.
2. van Der Hage JA, van De Velde CJ, Julien JP, et al. Preoperative chemotherapy in primary operable breast cancer: results from the European Organization for Research and Treatment of Cancer trial 10902. *J Clin Oncol* 2001;19:4224-37.
3. Eystein P. Study of suboptimum treatment response: lessons from breast cancer. *Lancet Oncol* 2003;4:177-85.
4. Skipper H, Perry S. Kinetics of abnormal and leukemic leukocyte populations and relevance to chemotherapy. *Cancer Res* 1970;30:1883-97.
5. Frizelle SP, Grim J, Zhou J, et al. Re-expression of p16 INK4a in mesothelioma cells results in cell cycle arrests cell death tumor suppression and tumor regression. *Oncogene* 1998;16:3087-95.
6. Kataoka M, Wiehle S, Spitz F, et al. Down-regulation of BCL-2 is associated with p16(INK4)-mediated apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Oncogene* 2000;19:1589-95.
7. Lowes SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. P53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993;74:957-67.
8. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis. A Link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 2002;108:153-64.
9. Kartner N, Evernden-Porelle D, Bradley G, Ling V. Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies. *Nature* 1985;316:820-23.
10. Johnstone RW, Ruefli AA, Smyth MJ. Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein? *Trends in Biochemical Sciences* 2000;25:1-6.
11. 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;90:1346-60.
12. DiLeoA, Larsimont D, Gancberg D, et al. HER-2 and topoisomerase II alpha as predictive markers in a population of node-positive breast cancer patients randomly treated with adjuvant CMF or epirubicin plus cyclophosphamide. *Ann Oncol* 2001;12:1081-89.

13. Geisler S, Lonning 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;61:2505-12.
14. Tanner M, Järvinen P, Isola J. Amplification of HER-2/neu and topoisomerase II alpha in primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res* 2001;61:5345-48.
15. Järvinen TAH, Tanner M, Rantanen V, et al. Amplification and deletion of topoisomerase II alpha associate with ERBB-2 amplification and effect sensitivity to topoisomerase II inhibitor doxorubicin in breast cancer. *Am J Pathol* 2000;156:839-47.
16. Park K, Kim J, Lim S, et al. Topoisomerase II-a (topo II) and HER2 amplification in breast cancers and response to preoperative doxorubicin chemotherapy. *Eur J Cancer* 2003;39:631-34.
17. Hayes DF, Trock BJ, Harris AL. Assessing the clinical impact of prognostic factors: when is 'statistically significant' clinically useful? *Breast Cancer Res Treat* 1998;52:305-319.
18. Henderson IC, Patek AJ. The relationship between prognostic and predictive factors in the management of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998;52:261-88.
19. Allred DC. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 1998;11:155-68.
20. Honkoop AH, van Diest PJ, de Jong JS, et al. Prognostic role of clinical, pathological and biological characteristics in patients with locally advanced breast cancer. *Br J Cancer* 1998;77:621-26.
21. Therasse P, Arbutck SG, Eisenhauer E, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:205-16.
22. Dowsett M, Detre S, Ormerod MG, et al. Analysis and sorting of apoptotic cells from fine-needle aspirates of excised human primary breast carcinomas. *Cytometry* 1998;32:291-300.
23. Fancette IF, Schrama JG, Peters JL, et al. Breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy: predictive markers and relation with outcome. *Br J Cancer* 2003;88:406-12.
24. Tamm I, Schriever F, Dorken B. Apoptosis: implications of basic research for clinical oncology. *Lancet Oncology* 2001;2:33-42.
25. Ellis PA, Smith IE, Detre S, et al. Reduced apoptosis and proliferation and increased Bcl-2 in residual breast cancer following preoperative chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 1998;48:107-16.
26. van Slooten HJ, van de Vijver MJ, van de Velde CJ, et al. Loss of Bcl-2 in invasive breast cancer is associated with high rates of cell death, but also with increased proliferative activity. *Br J Cancer* 1998;77:789-96.
27. Zhang GJ, Kimijima I, Abe R, et al. Apoptotic index correlates to Bcl-2 and p53 protein expression, histological grade and prognosis in invasive breast cancers. *Anticancer Res* 1998;18(3B):1989-98.
28. Hori M, Nogami T, Itabashi M, et al. Expression of Bcl-2 in human breast cancer: correlation between hormone receptor status, p53 protein accumulation and DNA strand breaks associated with apoptosis. *Pathol International* 1997;47:757-62.
29. Rochaix P, Krajewski S, Reed JC, et al. In vivo patterns of Bcl-2 family protein expression in breast carcinomas in relation to apoptosis. *J Pathol* 1999;187:410-15.
30. Liu S, Edgerton SM, Moore DH, et al. Measures of cell turnover (proliferation and apoptosis) and their association with survival in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:1716-23.
31. De Jong JS, van Diest PJ, Baak JP. Number of apoptotic cells as a prognostic marker in invasive breast cancer. *Br J Cancer* 2000;82:368-73.
32. Hinnis AR, Luckett JCA, Walker RA. Survivin is an independent predictor of short-term survival in poor prognostic breast cancer patients. *Br J Cancer* 2007;96:639-45.
33. Pinder SE, Wencyk P, Sibbering DM, et al. Assessment of the new proliferation marker MIB1 in breast carcinoma using image analysis: associations with other prognostic factors and survival. *Br J Cancer* 1995;71:146-49.
34. Brown RW, Allred CD, Clark GM, et al. Prognostic value of Ki-67 compared to S-phase fraction in axillary node-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 1996;2:585-92.
35. De Azambuja E, Cardoso F, de Castro G JR, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer* 2007;96:1504.
36. Vakkala M, Lahteenmaki K, Raunio H, et al. Apoptosis during breast carcinoma progression. *Clin Cancer Res* 1999;5:319-24.
37. Aas T, Geisler S, Eide GE, et al. Predictive value of tumour cell proliferation in locally advanced breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Eur J Cancer* 2003;39:438-46.
38. Yeoh E-J, Ross ME, Shurtleff SA, et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 2002;1:133-43.
39. Huang E, Cheng SH, Dressman H, et al. Gene expression predictors of breast cancer outcomes. *Lancet* 2003;361:1590-96.
40. Aas T, Borresen AL, Geisler S, et al. Specific p53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nat Med* 1996;2:811-14.
41. Dhesy-Thind B, Pritchard KI, Messersmith H, et al. HER2/neu in systemic therapy for women with breast cancer: a systematic review. *Breast Cancer Res Treat* 2008;109:209-29.
42. Gennari A, Sormani MP, Pronzato P, et al. HER2 status and efficacy of adjuvant anthracyclines in early breast cancer: a pooled analysis of randomized trials. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:14-20.
43. Bartlett JM, Munri A, Cameron DA, et al. Type 1 receptor tyrosine kinase profiles identify patients with enhanced benefit from anthracyclines in the BR9601 adjuvant breast cancer chemotherapy trial. *J Clin Oncol* 2008;26:5027-35.
44. Pritchard KI, Messersmith H, Elavanthil L, et al. HER2 and topoisomerase II as predictors of response to chemotherapy. *J Clin Oncol* 2008;26:736-744.
45. Tanner M, Isola J, Wiklund T, et al. Topoisomerase II alpha 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;24:2428-2436.
46. Desmedt C, Azambuja D, Larsimont D, et al. Predicting the efficacy of anthracyclines in breast cancer (BC) patients: Results for the neoadjuvant TOP trial. *J Clin Oncol* 2009;27:15s(A523).
47. Bertucci F, Houlgatte R, Benziane A, et al. Gene expression profiling of primary breast carcinomas using array of candidate genes. *Hum Mol Genet* 2000;9:2981-91.
48. Volm MD, Herma Y, Symmans WF, et al. Her2 status predicts response to preoperative paclitaxel in patients with breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1999;18:104a (abstr394).
49. Formenti SC, Spicer D, Skinner K, et al. Low HER2/neu gene expression is associated with pathological response to concurrent paclitaxel and radiation therapy in locally advanced breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;52:397-405.
50. Miles DW, Harris WH, Gillett CE, et al. Effect of c-erbB (2) and estrogen receptor status on survival of women with primary breast cancer treated with adjuvant cyclophosphamide/ methotrexate/fluorouracil. *Int J Cancer* 1999;84:354-59.
51. Tiezzi DG, Andrade JM, Ribeiro-Silva A, et al. HER-2, p53, p21 and hormonal receptors proteins expression as predictive factors of response and prognosis in locally advanced breast cancer treated with neoadjuvant docetaxel plus epirubicin combination. *BMC Cancer* 2007;7:36-45.
52. Yamashita H, Nishio M, Toyama T, et al. Coexistence of HER2 overexpression and p53 protein accumulation is a strong prognostic molecular marker in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2003;6:24-30.
53. Aziz SA, Pervez S, Khan S, et al. Case control study of prognostic markers and disease outcome in inflammatory carcinoma breast: a unique clinical experience. *Breast J* 2001;7:398-404.
54. Bonnefoi H, Diebold-Berger S, Therasse P, et al. Locally advanced/inflammatory breast cancers treated with intensive epirubicin-based neoadjuvant chemotherapy: are there molecular markers in the primary tumour that predict for 5-year clinical outcome? *Ann Oncol* 2003;14:406-13.
55. Crawford LV, Pim DC, Bulbrook RD. Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. *Int J Cancer* 1982;30:403-08.
56. Bykov VJN, Selivanova G, Wiman KG. Small molecules that reactivate mutant p53. *Eur J Cancer* 2003;39:1828-34.
57. Bonetti A, Zaninelli M, Leone R et al. Bcl-2 but not p53 expression is associated with resistance to chemotherapy in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 1998;4:2331-36.
58. Petitjean A, Mathe E, Kato S, et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* 2007;28:622-9.
59. Anelli A, Rosen PP, Francheschi D, Borgen PI. p53 gene mutations in male breast cancer. *Cancer* 1995;75:2233-38.
60. Anelli ARR, Brentani RR, Gadelha AP, et al. Correlation of p53 status with outcome of neoadjuvant chemotherapy using paclitaxel and doxorubicin in stage IIIB breast cancer. *Annals of Oncology* 2003;14:428-32.
61. Overgaard J, Yilmaz M, Guldborg P, et al. TP53 Mutation is an independent prognostic marker for poor outcome in both node-negative and node-positive breast cancer. *Acta Oncol* 2000;39:327-33.
62. Ferrero JM, Ramaoli A, Formento JL, et al. p53 determination alongside classical prognostic factors in node-negative breast cancer: an evaluation at more than 10-year follow-up. *Ann Oncol* 2000;11:393-97.
63. Turner BC, Gumbs AA, Carbone CJ, et al. Mutant p53 protein overexpression in women with ipsilateral breast tumor recurrence following lumpectomy and radiation therapy. *Cancer* 2000;88:1091-98.
64. Bertheau P, Plassa F, Espié M, et al. Effect of mutated TP53 on response of advanced breast cancers to high-dose chemotherapy. *Lancet* 2002;360:852-54.

65. Rahko E, Blanco G, Soini Y, et al. A mutant TP53 gene status is associated with a poor prognosis and anthracycline-resistance in breast cancer patients. *Eur J Cancer* 2003;39:447-53.
66. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc-NatAcadSci USA* 2001;98:10869-74.
67. van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415:530-36.
68. Buysse M, Loi S, van't Veer L, et al. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:1183-92.
69. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin P, et al. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol* 2010;11:174-83.
70. Saghatelyan M, Mook S, Pruneri G, et al. Combining genomic profiling (70 gene- Mammaprint) with nodal status allows to classify patients with primary breast cancer and positive lymph nodes (1-9) into very distinct prognostic subgroups that could help tailor treatment strategies. *San Antonio Breast Cancer Symposium* 2009;A102.
71. Brender RA, Knauer M, Rutgers EJ, et al. The 70-gene profile and chemotherapy benefit in 1600 breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2009;27s:A512.
72. Wang Y, Klijn JGM, Sieuwerts AM, et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph node-negative primary breast cancer. *Lancet* 2005;365:671-79.
73. Wang Z, Dahiya S, Provencher H, et al. The prognostic biomarkers HOXB13, IL17BR, and CHDH are regulated by estrogen in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:6327-34.
74. Cronin M, Sangli C, Liu ML, et al. Analytical validation of the Oncotype DX genomic diagnostic test for recurrence prognosis and therapeutic response prediction in node-negative, estrogen receptor positive breast cancer. *ClinChem* 2007;53:1084-91.
75. 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.
76. Paik S, Tang G, Shak S, et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:3726-34.
77. Albain K, Barlow W, Shak S, et al. Prognostic and predictive value of the 21 gene recurrence score assay in postmenopausal, node-positive, ER-positive breast cancer. *Br Cancer Res Treat* 2007;106S:A10.
78. Cardoso F, van't Veer L, Rutgers E, et al. Clinical application of the 70-gene profile: the MINDACT trial. *J Clin Oncol* 2008;26:729-35.
79. Sparano JA, Paik S. Development of the 21-gene assay and its application in clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol* 2008;26:721-28.
80. Hamilton A, Piccart M. The contribution of molecular markers to the prediction of response in the treatment of breast cancer: A review of the literature on HER-2, p53 and BCL-2. *Ann Oncol* 2000;11:647-63.
81. Linn SC, Pinedo HM, van Ark-Otte J, et al. Expression of drug resistance proteins in breast cancer, in relation to chemotherapy. *Int J Cancer* 1997;71:787-95.
82. Volkmann M, Sinn H-P, Gaudel D, et al. Anti-p53 in breast cancer: Concordance of different assay procedures and association with p53 antigen expression. *Oncology* 2002;63:297-305.
83. Blaszyk H, Hartmann A, Cunningham JM, et al. A prospective trial of mid west breast cancer patients: a p53 gene mutation is the most important predictor of adverse outcome. *Int J Cancer* 2000;89:32-38.
84. Cianfrocca M and Gradishar W. New Molecular Classifications of Breast Cancer. *CA Cancer J Clin Oncol* 2009;59:303-13.
85. Ueda Y, Hijilata M, Takagi S, et al. Transcriptional activities of o73 splicing variants are regulated by intervariant association. *Biochem J* 2001;356:859-66.
86. Bertucci F, Houlgatte R, Benziane A, et al. Gene expression profiling of primary breast carcinomas using array of candidate genes. *Hum Mol Genet* 2000;9:2981-91.