



Facultad de Medicina
Departamento de Ciencias Biomédicas
Magíster en Ciencias Médicas: Mención Biología Celular y
Molecular

“MECANISMOS MOLECULARES DE DESARROLLO Y PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE MAMA, IMPLICACIONES PRONÓSTICAS Y TERAPÉUTICAS. ROL DE LA TECNOLOGÍA EMERGENTE Y RE-EMERGENTE Y SUS ALCANCES A NIVEL MUNDIAL Y EN CHILE.”

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas, mención en Biología Celular y Molecular

AUTOR

LUISA ELENA MORALES GALINDO

Director de Tesis: Dr. Pablo Olivero Rebolledo

FECHA: 21 de Julio del 2010



**Facultad de Medicina
Departamento de Ciencias Biomédicas
Magíster en Ciencias Médicas: Mención Biología Celular y
Molecular**

**“MECANISMOS MOLECULARES DE DESARROLLO Y PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE MAMA,
IMPLICACIONES PRONÓSTICAS Y TERAPÉUTICAS. ROL DE LA TECNOLOGÍA EMERGENTE Y
RE-EMERGENTE Y SUS ALCANCES A NIVEL MUNDIAL Y EN CHILE.”**

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas, mención en Biología Celular y
Molecular**

AUTOR

LUISA ELENA MORALES GALINDO

Director de Tesis: Dr. Pablo Olivero Rebolledo

FECHA: 21 de Julio del 2010

INDICE DE CONTENIDO

	Pagina
1. Introducción _____	1
2. Epidemiología del cáncer de mama _____	1
3. Modelos de crecimiento y desarrollo tumoral _____	2
3.1. Modelo de muerte logarítmica _____	2
3.2. Hipótesis de Norton – Simon _____	2
3.3. Modelo estocástico _____	3
3.4. Modelo Koscielny _____	3
4. Biología celular y molecular del cáncer de mama _____	4
4.1. Patogénesis y mecanismos moleculares implicados en el desarrollo y progresión del cáncer de mama _____	4
4.1.1. Estrógeno _____	5
4.1.2. Factores de crecimiento _____	5
4.2. Genes implicados en el cáncer de mama _____	6
4.2.1. Oncogenes _____	7
4.2.2. Genes supresores de tumores _____	7
4.3. Marcadores moleculares en cáncer de mama con utilidad clínica _____	8
4.3.1. BCRA 1 _____	8
4.3.2. BCRA 2 _____	9
4.3.3. Receptores de estrógeno y progesterona _____	10
4.3.4. HER 2 _____	11
5. Técnicas de estudio molecular en cáncer de mama: Evaluación simultanea de múltiples genes _____	14
5.1. Tecnología de microarray del ADN _____	14

5.2. PCR cuantitativo múltiple _____	15
6. Alcances del desarrollo y aplicación de nuevas tecnologías a la investigación básico-clínica del cáncer de mama. _____	16
6.1. Desarrollo de una taxonomía _____	16
6.1.1. Cáncer de mama con receptores de estrógenos positivos _____	16
6.1.1.1. Luminal A _____	16
6.1.1.2. Luminal B _____	17
6.1.2. Cáncer de mama con receptores de estrógenos negativos _____	17
6.1.2.1. HER 2 positivo _____	18
6.1.2.2. Basal like _____	20
6.2. Cambio en el concepto de la carcinogénesis y desarrollo del cáncer de mama_	21
6.3. Desarrollo de perfiles de expresión génica o firmas con capacidad pronóstica y predictiva _____	22
6.3.1. Oncotype Dx _____	23
6.3.2. MammaPrint _____	24
6.3.3. Test del ratio de expresión HOXB1 3 / IL17BR _____	24
6.3.4. Índice de grado genómico (MapQuant Dx) _____	25
6.3.5. Firma de Rotterdam _____	25
6.4. Cambios en el abordaje clínico y terapéutico de la enfermedad. Desarrollo de nuevos fármacos _____	25
7. Perspectivas en Chile y el mundo acerca de los avances alcanzados en cáncer de mama _____	27
7.1. Situación en países desarrollados _____	27
7.2. Situación en Chile _____	29
8. Conclusiones _____	32
9. Recomendaciones _____	35
10. Bibliografía _____	37

RESUMEN

El cáncer de mama constituye un problema de salud pública en Chile y el mundo. En términos de morbi-mortalidad, en Chile el cáncer de mama está categorizado en el segundo lugar entre las causas de muerte por cáncer en la mujer con una tasa de 13,3 por 100.000. La hipótesis clásica de la carcinogénesis plantea, a la misma como un proceso escalonado de múltiples pasos (*multistage*) caracterizado por alteraciones genéticas sucesivas que influyen en puntos claves del crecimiento y desarrollo celular. En este contexto, el desarrollo de un cáncer de mama, se aprecia como el resultado de la acumulación temporal de alteraciones genéticas y cambios epigenéticos que involucran no solamente a la célula tumoral, sino a otras células peritumorales.

El estímulo determinante que inicia la transformación maligna del tejido de mamario no es del todo conocido, sin embargo se ha documentado ampliamente que el 17β estradiol contribuye significativamente al desarrollo del cáncer de mama “hormono – dependiente”. Asimismo, entre los genes involucrados, más comúnmente, en este proceso se encuentran: oncogenes, genes supresores de tumores y alteraciones en los genes reparadores del ADN.

Aunque numerosos genes han sido evaluados en cáncer de mama, solo aquellos que se restringen a aplicaciones diagnósticas, como los genes inherentes a la susceptibilidad (BCRA 1 y BCRA 2), genes de implicación pronóstica y predictiva como los receptores de estrógeno y progesterona, HER 2 y Ki 67, son determinados usualmente, por su utilidad clínica. Recientemente, con la incorporación de nuevas técnicas de estudio molecular, que permiten la determinación simultánea, en un solo paso, de varios cientos de genes (Microarray del ADN y el PCR cuantitativo múltiple) en la investigación básica oncológica, se ha establecido una clasificación molecular del cáncer de mama (Luminal A, luminal B, HER 2 positivo, basal like), se ha postulado un modelo jerárquico del proceso de carcinogénesis mamaria a partir de la transformación de un subconjunto de células “Stem Cell”, se han desarrollado firmas genéticas con capacidad pronóstica y predictiva y se ha cambiado el abordaje terapéutico de la enfermedad, con la introducción de nuevos

fármacos dirigidos a blancos moleculares. A nivel mundial, todos estos progresos obtenidos en el conocimiento de la patogénesis y comportamiento del cáncer de mama se han traducido en un sostenido descenso de la mortalidad, por cáncer de mama. En Chile existen grandes falencias y discrepancias en el abordaje y tratamiento del cáncer de mama. Así como, importantes limitaciones en el acceso de tecnología de punta y de terapias tanto convencionales (quimioterapia) como terapias blancas, específicamente en el servicio público de salud, problemática que se acentúa más en regiones.

En países como Chile el desarrollo de investigación realizada localmente producto de la integración y comunicación bidireccional entre el investigador básico y el médico oncólogo generará modificaciones de los comportamientos sociales y políticos e innovaciones de nuevos productos y/o servicios que tengan un impacto real en el consumidor final que es el enfermo. Para ello se requiere que el oncólogo tenga el interés y la oportunidad de incorporarse desde su práctica clínica a la investigación oncológica. En este sentido, el pensamiento debe estar dirigido a elevar la capacidad de creación de conocimiento, reforzando el sistema universitario por medio de programas de formación de capital humano, asegurando su posterior inserción en los organismos que hacen ciencia a fin de consolidar los grupos de investigación.

Palabras claves: cáncer de mama, carcinogénesis, microarray del ADN, PCR cuantitativo múltiple, investigación transnacional

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama constituye un problema de salud pública en Chile y el mundo. La incidencia por cáncer de mama en Chile, se conoce parcialmente a pesar de que la notificación de los casos nuevos es obligatoria desde el año 1995, con la implementación del Programa Nacional de Cáncer de Mama por parte del Ministerio de Salud, sin embargo esta ocurre principalmente en los Servicios públicos que representan el 72% de la población chilena. Con relación a la mortalidad general por cáncer en la población chilena, considerando ambos sexos, el cáncer de mama constituye la tercera causa de muerte.

En los últimos 20 años se ha producido un progreso real en la comprensión y el manejo del cáncer. Es así como la secuenciación completa del genoma humano en conjunto con la disponibilidad de tecnologías que permiten determinar niveles de expresión de miles de genes en un solo experimento ha causado un impacto contundente en la investigación sobre el cáncer.

En el presente informe se abordan los procesos moleculares implicados en la carcinogénesis y progresión del cáncer de mama así como se realiza una aproximación sobre el impacto que ha tenido la investigación oncológica de las últimas décadas, con la introducción de tecnología de punta, en la conceptualización de dicho proceso, sus implicaciones sobre el abordaje de la enfermedad a nivel mundial y en Chile

2. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama representa una causa importante de morbi-mortalidad en el mundo; es la neoplasia maligna más frecuente entre las mujeres de países desarrollados y su principal causa de muerte entre los 35 y los 50 años (Parkin *et al*, 2005). Según la

Organización Mundial de la Salud, en el año 2005, más de 1.2 millones de personas se diagnosticaron de cáncer de mama en todo el mundo (O.P.S 2002; Parkin *et al*, 2005).

En Chile el cáncer de mama constituye un problema de salud pública en términos de morbi-mortalidad, categorizado en el segundo lugar entre las causas de muerte por cáncer en la mujer con una tasa de 13,3 por 100.000, solo precedida por la mortalidad por cáncer de vesícula y vías biliares con una tasa de 17,8 por 100.000 (DEIS - MINSAL 2005)

3. MODELOS DE CRECIMIENTO Y DESARROLLO TUMORAL.

Conocer la historia natural de una enfermedad como el cáncer de mama, tiene importancia para establecer el pronóstico (Lee and Zelen, 2006) y evaluar el impacto de las intervenciones desde el punto de vista de screening, diagnóstico y tratamiento (Clare *et al*, 2000; Ribba *et al*, 2006), permitiendo un mejor planeamiento del abordaje de la misma.

El cáncer de mama ha tenido una evolución conceptual de modelos para explicar su comportamiento. Es así como, una variedad de modelos matemáticos han sido desarrollados para explicar la historia natural de esta enfermedad y predecir su posible respuesta al tratamiento indicado.

3.1. Modelo de muerte logarítmica:

Al inicio de la década de los 60, Skipper y colaboradores desarrollaron el primer modelo de crecimiento tumoral, llamado “log-kill model” o modelo de muerte logarítmica. El estudio desarrollado en ratones a los que se les inoculó células de leucemia murina 1210, las cuales crecieron logarítmicamente hasta alcanzar un volumen letal. Las células presentan un tiempo de duplicación constante e independiente del volumen del tumor (Holland and Frei, 1982). Además preconiza que la sensibilidad celular a la quimioterapia es homogénea, correspondiendo a una cinética de primer orden, donde cada dosis determinada de un fármaco destruye a una fracción constante de células. En base al modelo de Skipper, las estrategias para aumentar la eficacia de la quimioterapia

son: aumentar la dosis hasta la máxima tolerada o iniciar el tratamiento cuando aun el tumor es pequeño (Skipper et al, 1979).

3.2. Hipótesis de Norton – Simon:

El crecimiento tumoral varía notablemente en función del tamaño tumoral. En las fases iniciales el crecimiento es exponencial, con una alta tasa de crecimiento y un tiempo de doblamiento muy corto. A medida que el tumor crece el tiempo de duplicación tumoral aumenta y la tasa de crecimiento disminuye (Norton, 1988). Este tipo de comportamiento biológico es lo que se conoce como crecimiento Gompertziano. La ecuación de Gompertz, fue por mucho tiempo el pilar para los modelos de cinética tumoral de tumores sólidos, incluido el cáncer de mama

3.3. Modelo estocástico:

Speer y colaboradores proponen un proceso estocástico en el que el crecimiento del tumor es fundamentalmente Gompertziano, pero presenta alteraciones al azar (Speer et al, 1984). Esto permite un patrón de crecimiento por etapas, con la probabilidad de fases latentes. En este contexto la heterogeneidad del tumor es consecuencia de la aleatoriedad del proceso e implica que un tumor de gran tamaño tiene la misma probabilidad de sufrir una modificación que un tumor pequeño (Speer et al, 1984).

3.4. Modelo Koscielny (1984):

Intenta determinar la edad de las metástasis al momento del diagnóstico del tumor primario, el volumen del tumor primario cuando la metástasis se inicia, la duración del crecimiento metastático, la demora entre el diagnóstico primario y la aparición de la metástasis. Utilizando su modelo (Koscielny et al, 1984), observaron que sus datos mostraron que el inicio metastático se produjo en un volumen tumoral de la lesión primaria que fue sólo ligeramente menor que en el momento del diagnóstico del tumor, prediciendo que el inicio metastático se produce muy temprano en el desarrollo del tumor primario, que el tiempo de duplicación metastático es 2,2 más rápido que el del

tumor primario y la duración del crecimiento de las metástasis es mucho más corta que la duración previamente determinada por el crecimiento exponencial (3,8 Vs 17 años). A raíz de estas conclusiones, se estima que aproximadamente el 30% de los pacientes tienen metástasis de menos de 1 año de edad, y por lo tanto de revisión anual se espera que resulte en una disminución del 30% en la incidencia de metástasis, lo cual concuerda con las estrategias de seguimiento, actualmente propuestas internacionalmente, en pacientes con cáncer de mama.

Otros modelos han intentado dar respuesta sobre los efectos de la cirugía en la recurrencia (Demicheli et al, 1994; Demicheh et al, 1996) y las estrategias más eficaces de quimioterapia (Demicheli et al, 1995; Clare et al 2000) y radioterapia adyuvante (Ribba et al, 2006). Sin embargo muchas otras preguntas aun quedan sin respuesta. Es por esto que el desarrollo e investigación de modelos matemáticos por parte de los investigadores, ha sido una constante en los últimos años en un intento de explicar la heterogeneidad del comportamiento del cáncer de mama, identificar indicadores pronósticos, evaluar el por qué algunas estrategias fallan, y de sugerir mejoras a los actuales criterios clínicos basadas en estos modelos. Aunque el modelamiento no sustituye a los resultados experimentales y clínicos, ambos pueden reducir o sustituir estrategias de tratamiento, sugerir vías alternativas y predecir resultados.

4. BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA:

4.1. Patogénesis y mecanismos moleculares implicados en el desarrollo y progresión del cáncer de mama.

La carcinogénesis es un proceso con varias posibilidades de origen y múltiples etapas jerárquicas de desarrollo que comúnmente presentan alteraciones genéticas influyentes en puntos claves del crecimiento y control de la población celular (Loeb et al, 2000; Knudson, 2001). Este proceso escalonado (*multistage*) de mutaciones sucesivas plantea el desarrollo del cáncer de mama por la acumulación de alteraciones

genéticas en las células epiteliales mamarias (van de Vijver, 1999), donde la metástasis no sería más que un estado final de una enfermedad progresiva, iniciándose con la hiperplasia ductal atípica y el carcinoma in situ. Entre las alteraciones genéticas carcinogénicas se encuentra la amplificación de oncogenes y la inactivación o silenciamiento de genes supresores de tumores y el desarrollo de la capacidad de las células cancerígenas de eludir la apoptosis, ocasionando el desarrollo y crecimiento descontrolado del tumor y su progresión metastásica (van de Vijver, 1999).

El desarrollo de un cáncer de mama, así como de otras neoplasias malignas es el resultado de la acumulación temporal de alteraciones genéticas y cambios no genéticos (cambios epigenéticos) que involucran no solamente a la célula tumoral, sino a otras células peritumorales como las células del sistema inmune, células vasculares y principalmente células epiteliales (Elenbaas et al, 2001; Shedin et al, 2004).

4.1.1. Estrógenos:

Se ha documentado ampliamente que el tejido mamario es modulado en estructura y función por esteroides sexuales (Nilsson et al, 2001). Específicamente, el 17 β estradiol contribuye significativamente al desarrollo del cáncer de mama “hormono – dependiente” (Anderson et al, 2006; Katzenellenbogen et al, 2000). El receptor de estrógeno se encuentra expresado en alrededor del 75% de los cánceres de mama, sin embargo, el conocimiento actual sobre los diversos mecanismos de acción de los estrógenos y las nuevas posibilidades de regulación de su receptor, sugieren la revisión y actualización de los procedimientos terapéuticos. Por ejemplo, los RE activos pueden influir en la proliferación y desarrollo de los tumores por vías genómicas y/o no genómicas (Almeida et al, 2006; Kumar et al, 2007), así como de la existencia de un receptor de estrógeno de membrana, aun no completamente caracterizado (Filardo et al, 2006).

4.1.2. Factores de Crecimiento:

Entre el 20 a 25% de los cánceres de mama presentan una sobreexpresión de receptores de factores de crecimiento, entre los que se encuentran más frecuentemente el oncogén Her2 (Menard *et al*, 2001), el factor de crecimiento epidérmico (EGFR/Her1) y el receptor del factor de crecimiento insulina like (IGF-IR). La sobreexpresión de estos receptores tipo tirosina – kinasa tiene una relación inversamente proporcional con la expresión de los receptores de estrógeno y progesterona (Arpino *et al*, 2005). Además, existe evidencia de un entrecruzamiento de vías de señalización que conllevarían a una activación del receptor de estrógeno por una vía no clásica o no genómica (Arpino *et al*, 2006; Levin, 2002). En este contexto, la activación de la cascada de fosforilación de receptores de homo o heterodímeros de HER2 y HER1 pueden fosforilar zonas específicas del receptor de estrógeno activándolo, con independencia del estradiol, interactuando a través de sitio AP-1 con los oncogenes *jun* y *fos*, desencadenando la transcripción de genes de proliferación (Ring and Dowsett, 2004).

La sobreexpresión de HER2 se ha asociado al incremento de una proteína mediadora de metástasis, la cual promueve la salida del receptor de estrógeno del núcleo hacia el citoplasma celular donde forma complejos tri-moleculares como: ER α - Shc – IGF-IR y PELP1/MNAR – ER α – Src (Gururaj *et al*, 2006; Manavathi *et al*, 2006; Song *et al*, 2006). Estos complejos en presencia del estradiol activan al IGF- IR, el cual a su vez produce a lo menos dos eventos: (1) activación de la vía de fosforilación del IGF-IR activa el camino de IP3K/Akt con la consiguiente inhibición de la apoptosis e (2) incrementa los niveles de metaloproteinasa 1 (MMP-1) y del factor de crecimiento unido a la heparina (HB-EGF) el cual actúa como ligando del EGFR (Razandi *et al*, 2003; Roudabush *et al*, 2000; Song *et al* 2007). Entonces EGFR activa la cascada de fosforilación de las MAP-quinasas dirigiendo a la proliferación y la vía IP3K/Akt reforzando el proceso antiapoptótico (Knowlden *et al*, 2005). Todo este mecanismo conlleva a un incremento de la proliferación, inmortalidad celular, activación de la cascada metastásica y progresión de la enfermedad (Manavathi *et al*, 2006).

Este mecanismo descrito como entrecruzamiento (crosstalk) explica la resistencia a los “anti-estrógenos” como el tamoxifeno, en células de cáncer de mama que

sobreexpresan HER 2 y otros receptores tirosina kinasa (Cui et al, 2005; Fan et al, 2005; Osborne et al, 2005). Existe evidencia controvertida en cuanto a tumores que presentan expresión al receptor de estrógeno y a HER 2, responderían mejor a inhibidores de aromatasa (Cui et al, 2005; Normanno et al, 2005).

4.2. Genes implicados en el cáncer de mama

El número de genes implicados en los distintos pasos de la transformación neoplásica de la célula mamaria aumenta a medida que se investiga sobre el tema. Entre los genes involucrados, más comúnmente, en contribuir al fenotipo maligno del cáncer de mama se encuentran: oncogenes, genes supresores de tumores y alteraciones en los genes reparadores del ADN.

4.2.1. Los Oncogenes:

Se derivan de la mutación ocurrida en genes llamados protooncogenes, los cuales dirigen la producción de proteínas como ciclinas, factores de crecimiento, receptores, entre otros los cuales estimulan la proliferación celular (Croce, 2008).

Numerosos oncogenes han sido caracterizados en los cánceres de mama, entre ellos: El receptor HER 2, las ciclinas dependientes de kinasas D1 y E (Londen *et al*, 2002; Vermeulen *et al*, 2003), el oncogen c-myc que codifica una fosfoproteína nuclear que actúa como un regulador transcripcional involucrado en la proliferación celular, diferenciación y apoptosis. A pesar de que diversos estudios han demostrado la asociación entre la amplificación o sobreexpresión de estos oncogenes con el desarrollo de la enfermedad o a un peor pronóstico de la misma, relativamente pocos de ellos han sido encontrados como cruciales en la progresión del cáncer de mama (Osborne *et al*, 2004), a excepción del HER 2 cuya amplificación ha sido suficientemente demostrada como marcador pronóstico y predictivo, en un subgrupo de cáncer de mama.

4.2.2. Genes supresores de tumores

Los genes supresores de tumores controlan la proliferación celular, sin embargo, su inactivación por mutaciones induce que las células tumorales dejen de crecer normalmente y adquieren propiedades proliferativas atípicas (Osborne et al, 2004).

En el cáncer de mama las mutaciones de los genes supresores de tumores se producen generalmente en las líneas germinales por lo que son más frecuentemente asociado con el cáncer de mama hereditario. A pesar de ellos, las anomalías hereditarias representan una minoría de los casos de cáncer de mama, siendo alrededor del 5 al 10% de todos los casos.

Estos mismos genes también pueden albergar esporádicas mutaciones somáticas adquiridas. En algunos casos puede no existir una mutación del gen supresor tumoral sino más bien otro mecanismo que interfiere con la expresión o función, como por ejemplo: modificaciones epigenéticas del promotor y el incremento en la velocidad de degradación proteosomal afectan su abundancia.

Entre los genes supresores de tumores mas estudiados en cáncer de mama se encuentran BCRA 1 y BCRA 2, los cuales cobran importancia clínica en el diagnostico y susceptibilidad a la enfermedad. Otros genes supresores también han sido estudiados en cáncer de mama, como el gen p53, los reguladores negativos del ciclo celular p27 y Skp2, PTEN cuya perdida de la función aumenta las señales de inmortalidad vía Akt (descrita en el síndrome de Cowden), la Kinasa de punto de chequeo del ciclo celular (CHK2) alteración descrita en el síndrome de Li- Fraumeni, el gen de ataxia – telangectasia mutada (ATM), y el gen del Retinoblastoma (Rb) cuya mutación o perdida esta presente en más del 30% de los casos de cáncer de mama y esta asociado con rápida progresión de la enfermedad.

4.3. Marcadores moleculares en cáncer de mama con utilidad clínica.

Si bien numerosos genes han sido evaluados en cáncer de mama, los marcadores moleculares con utilidad clínica se restringen a aquellos con aplicaciones diagnosticas, entre ellos los genes inherentes a la susceptibilidad como BCRA 1 y BCRA 2 y genes de

implicación pronóstica y predictiva como los receptores de estrógeno y progesterona, HER 2 y Ki 67.

4.3.1. BRCA 1

En 1990, se describe que el locus del gen 17q21 esta asociado a familias con múltiples cánceres de mama. Subsecuentemente en 1994 este gen es identificado como BRCA 1. Ha sido estimado que aproximadamente el 0,12% de la población general tiene una mutación de BRCA1.

La mutación de BRCA1 ha sido estimada en el 5% de todos los cánceres de mama que ocurren por debajo de los 40 años, pero esto se eleva a cerca del 90% en el caso de historias familiares donde se han presentado cuatro o más cánceres de mama y más de un caso de cáncer de ovario. El riesgo de cáncer de mama, durante el tiempo de vida, de una persona con esta mutación es de un 49 a 73% a la edad de 50 años y de un 71 a 87% a la edad de 70 años, con un riesgo de un 20 a un 30%, a lo largo de la vida, para cáncer de ovario. Esta mutación no esta asociada con un incremento del riesgo de cáncer de mama en hombres.

BRCA1 codifica una proteína de 1863 aminoácidos con varios dominios estructurales que definen su función. En el extremo amino terminal interactúa con una proteína anular ejerciendo funciones de gen supresor tumoral. En el extremo carboxilo terminal presenta una estructura de enzima reparadora del ADN.

Sobre 200 mutaciones individuales han sido descritas en BCRA1, que incluyen delección, sustitución e inserción, las cuales son encontradas a lo largo de todo este gen. Aproximadamente en el 80% de los casos resulta una proteína BRCA1 truncada. Se ha sugerido que la severidad de la enfermedad puede estar ligada a la localización de la mutación, en tanto que tumores cuya mutación involucra tanto el extremo amino como carboxilo terminal están asociados a una alta tasa de proliferación.

En cuanto al impacto sobre el riesgo de recurrencia a distancia, relacionado con BCRA1 y comparado con casos esporádicos, es incierta. En promedio los tumores con

mutación de BRCA1 son de alto grado, están asociados con una negatividad del receptor de estrógeno, amplificación de c-myc, con patrones de expresión del fenotipo “basal like”.

4.3.2. BRCA 2

BRCA2 es un gen localizado en 13q12-q13. Este gen comparte algunas características con BRCA1, aunque su estructura es distinta. BRCA2 unida a Rad51 tienen un rol en la reparación de alta fidelidad del ADN, para lo cual requieren una plantilla análoga de cromatina.

Al igual que con la mutación de BRCA1, la mutación de este gen aumenta el riesgo de cáncer de mama y ovario. Pero a diferencia de BRCA1, BRCA2 se ha encontrado mutado en cerca del 40% de los cánceres de mama en hombres.

Sobre 100 mutaciones individuales han sido descritas en BRCA2, la mayoría de las veces causando una proteína truncada, al igual que en BRCA1.

El perfil de expresión de genes, por microarray, revela diferencias significativas entre los tumores que expresan BRCA1 y BRCA2, estos últimos están asociados a tumores de más bajo grado y un comportamiento menos agresivo, que los primeros.

4.3.3. Receptores de estrógeno y progesterona:

El receptor de estrógeno α se encuentra expresado en aproximadamente el 50-75% de las pacientes con cáncer de mama, haciéndolas susceptibles al beneficio de la terapia anti-estrógeno, una de cada cuatro pacientes presenta resistencia al tratamiento con progresión de la enfermedad. Esto se ha atribuido a su interacción con otros receptores como el IGFR y HER 2; conduciendo a la activación de las vías de AKT y MAPK (Cui et al, 2005; Fan et al, 2005; Osborne et al, 2005).

El receptor de estrógeno α pertenece a la superfamilia de receptores nucleares; que modulan la expresión génica al unirse a sus elementos de respuesta en el núcleo y además inducen respuestas rápidas (no genómicas). Estas últimas también pueden iniciarse por la transactivación del RE vía receptores tirosina cinasa (TK) y/o por los componentes de sus vías de señalización. Una vez activados, los RE activan a las MAPK y a

algunos intermediarios de la señalización (PI3K y AMPc). La interacción entre ambos tipos de respuesta conlleva a la regulación de la activación transcripcional y la modulación de su actividad específica.

La concentración de estrógenos bio-activo, estradiol, es diez veces mayor en el tejido del carcinoma mamario que en el plasma y es aproximadamente el doble en el tejido carcinomatoso mamario que en el considerado morfológicamente normal. No existe diferencia significativa entre la concentración de estradiol intratumoral entre pacientes pre y postmenopáusicas, pero el radio estradiol/estronea es mayor en carcinomas de mujeres post menopáusicas. Los datos sugieren que una gran proporción (aproximadamente un 75% antes de la menopausia y cerca del 100% posterior a la menopausia) del estrógeno biológicamente activo es producido localmente por células del carcinoma de mama (Kinoshita and Chen, 2003). Considerando que aproximadamente el 65 al 70% de los cánceres de mama en mujeres postmenopáusicas expresan receptores de estrógeno, la producción de estrógenos intratumoral juega un papel preponderante en el desarrollo y progresión de este cáncer.

Recientes estudios han demostrado la producción local de estrógeno por el tejido tumoral mamario, por enzimas como la aromatasa (Kinoshita and Chen, 2003). La aromatasa, una enzima citocromo p450 que convierte andrógenos en estrógenos, esta expresada en varios tipos de células del carcinoma de mama, tales como células del carcinoma, células del estroma intratumoral y adipositos adyacentes al carcinoma (Yasuhiro et al, 2007) y su expresión está regulada por varios factores que incluyen la interacción entre células del carcinoma y del estroma, citokinas y receptores nucleares (Suzuki et al, 2008). El receptor de estrógeno nuclear juega un rol importante en la modulación de la expresión de aromatasa en células de cáncer de mama, manteniendo baja su expresión a través de un elemento regulador negativo de la expresión de genes promotores de aromatasa, llamado S1 (Yang et al, 1998; Yang et al, 2002). La función de este último depende en forma directamente proporcional de los niveles nucleares del receptor de estrógeno.

4.3.4. HER 2 o ErbB2:

El receptor HER 2/ ErbB2 pertenece a la superfamilia de las llamadas hergulinas representada por cuatro receptores (HER1/EGFR, HER 2/ ErbB2, HER3/ ErbB3 y HER4/ ErbB4) localizados en la membrana citoplasmática los cuales presentan actividad tirosina quinasa intrínseca. Estos receptores comparten una extensa familia de ligandos de naturaleza polipeptídica y presentan un dominio extracelular que se pone en contacto con el ligando, un dominio citoplasmático que juega un papel fundamental en la transmisión de información a través de la membrana plasmática y un dominio intracelular catalítico responsable de la actividad tirosina kinasa.

Una vez que los ligandos se unen a los receptores, éstos forman homodímeros o heterodímeros que se activan y transfosforilan. Los residuos de tirosina fosforilados en estos receptores sirven como centros de reclutamiento y anclaje de proteínas adaptadoras y transductoras que contienen dominios SH2 (por *Src homology domain 2*) (Heldi, 1991; Koch *et al.*, 1991; Margolis, 1992) o dominios PTB (por *phospho-tyrosine-binding domains*) (van der Geer and Pawson, 1995) que pueden también ser fosforiladas, siendo así capaces de iniciar múltiples rutas de señalización en el interior celular que dan lugar, entre otros procesos, a la transcripción de diferentes genes implicados en la proliferación, diferenciación y supervivencia celular, así como en la prevención o inducción de apoptosis y motilidad celular.

En humanos, el gen que codifica el HER 2 se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17. La amplificación del gen del receptor HER 2 ha sido encontrada en aproximadamente el 20 al 25% de los carcinomas invasivos de mama (Menard *et al*, 2001) e interesantemente en la mayoría de los carcinomas ductales in situ de alto grado.

El estudio de la expresión del oncogén HER 2 se ha abordado a diferentes niveles, ADN, mRNA, y a nivel de proteína. Actualmente existen diferentes técnicas para la determinación del estatus de Her 2 con diferentes ventajas e inconvenientes

1. El método inmunohistoquímico (IHQ) mide la sobreexpresión de la proteína en la membrana de la célula tumoral, utilizando anticuerpos específicos contra los

receptores HER 2. El análisis de los resultados se realiza de forma semicuantitativa, expresándolos en una escala de 0 a 3+. 0 y 1+ se consideran negativos a efectos de tratamiento clínico. 2+ y 3+ se consideran positivos, sin embargo en 2+ se considera apropiada la confirmación por el método FISH (Thomson *et al*, 2001). Junto con la hibridación *in situ* fluorescente han sido las técnicas aprobadas por la FDA para la determinación del HER 2. Por razones prácticas la inmunohistoquímica ha sido mayoritariamente la técnica de elección. Se trata de una técnica estándar en todos los laboratorios de patología que puede ser utilizada sobre tejido parafinado, es de fácil realización y es económica. El mayor inconveniente de la IHQ es que es una técnica semicuantitativa con dificultades en el sistema de clasificación, además es susceptible de variaciones dependiendo de la interpretación del observador (Pauletti *et al*, 2000; Thomson *et al*, 2001). Igualmente existe variabilidad dependiendo del anticuerpo monoclonal anti-HER 2 empleado (Press *et al*, 1994), que conjuntamente con diferencias en el proceso de fijación del tumor, el método de desenmascaramiento antigénico, y la propia técnica de inmunohistoquímica empleada, contribuyen a la imprecisión del ensayo.

2. El método de hibridación *in situ* fluorescente (FISH), mide la amplificación del gen, indicando el número de copias presentes. Si dicho número de copias es mayor de 2 copias, el resultado se considera positivo. La técnica FISH es más difícil de realizar y más costosa que la IHQ. Sin embargo, también depende de la interpretación del operario, tiene una alta sensibilidad y especificidad de 91 y 93% respectivamente comparado con la IHQ (Thomson *et al*, 2001). Existe una discrepancia de aproximadamente un 13% de pacientes que muestran amplificación del gen por hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH) pero no presentan sobreexpresión de la proteína HER 2 a la inmunohistoquímica (IHQ), esto es coherente con la esperada pérdida de la sensibilidad asociados a la IHQ con el proceso de fijación e inclusión de los tejidos. La correlación positiva entre el análisis por FISH e IHQ del HER 2

tiene una concordancia entre un 95 a un 100% entre FISH positivo con Herceptest Dako positivo 3 cruces. Los estudios de Jiminez *et al*, 2000; Jacobs *et al*, 1999 sugieren que en algunos pocos casos, entre un 3 al 5%, se puede observar sobreexpresión de la proteína por IHQ, sin amplificación del gen, es decir, un FISH falsamente negativo.

Tanto la IHQ como el FISH miden el HER 2 en tejido tumoral, por lo que no son métodos válidos para el seguimiento de la enfermedad una vez extirpado el tumor primario.

3. La determinación del dominio extracelular del HER 2 también ha sido realizada mediante inmunoensayos tipo ELISA ó de quimioluminiscencia directa. Se trata de métodos sensibles y específicos que miden cuantitativamente el HER 2 en suero. La FDA aprobó esta determinación sérica para la monitorización de pacientes con cáncer de mama metastático. Niveles séricos en disminución se relacionan con una regresión de la enfermedad y adecuada respuesta al tratamiento. Niveles séricos en aumento son indicativos de no adecuada respuesta al tratamiento o progresión de la enfermedad. Las determinaciones de niveles séricos no reemplazan a los métodos FISH o IHQ, sino, que en la actualidad son complementarios. Sin embargo, se trata de técnicas que presentan la ventaja de no ser invasivas, y de permitir obtener resultados de la evolución en tiempo real.
4. La Reacción en cadena de polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT – qPCR): es una técnica cuantitativa que determina los niveles del gen Her 2 en tejido tumoral, esta puede realizarse a partir de la extracción del ADN ya sea de tejido fresco, muestras congeladas o conservadas en parafina. Además tiene la ventaja de ser un método rápido, de bajo costo, muy sensible y específico (Gjerdrum *et al*, 2004). Varios estudios han comparado los resultados de la determinación del gen Her 2 por RT-qPCR con la determinación por FISH encontrando una alta concordancia

entre ambos resultados (Cabrera Morales, 2005; Gjerdrum *et al*, 2004; Hernández 2009).

5. TÉCNICAS DE ESTUDIO MOLECULAR EN CÁNCER DE MAMA: EVALUACIÓN SIMULTÁNEA DE MÚLTIPLES GENES

Gracias a la masificación de tecnologías se han incorporado nuevas técnicas de estudio molecular en la investigación básica oncológica, que permiten la determinación simultánea de varios genes relevantes. Entre estas técnicas se encuentran:

5.1. *Tecnología de microarray del ADN:*

La técnica de análisis de microarray del ADN permite el análisis simultáneo de la expresión de cientos de genes de un tejido en un solo experimento.

El material obtenido de la muestra problema marcado ya sea con radioactividad o fluorescencia se pone en contacto con el array, hibridando en aquellas posiciones en que se complementa con las sondas. El patrón de hibridación es revelado empleándose un escáner midiendo en la imagen la frecuencia e intensidad de la radiación. El nivel de expresión de un gen se refleja en el número de copias de mRNA presentes en la muestra problema y, por tanto, es proporcional al nivel de señal detectado. La alta sensibilidad permite la identificación de muestras presentes en un bajo número de copias. Además las técnicas de revelado por fluorescencia ofrecen una elevada relación señal/ruido incluso en casos de transcritos poco abundantes. El gran volumen de datos generados debe ser tratado con herramientas y métodos bioinformáticos.

5.2. *PCR cuantitativo múltiple:*

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas. La reacción en cadena de la polimerasa fue desarrollada por Kary Mullis perteneciente a la Cetus Corporation en California SA, en la década de 1980, a la técnica original se le ha automatizado obteniendo resultados más rápidos e introducido variaciones que permiten cuantificar los datos en el mismo momento de la duplicación del ADN y amplificar múltiples segmentos a la vez.

La PCR en tiempo real (qPCR) tiene como principal característica la de permitir cuantificar la cantidad de ácidos nucleicos presentes en la muestra original, e identificar, con una muy alta probabilidad, muestras de ADN específicas.

La PCR realizada en tiempo real (qPCR), elimina cualquier proceso post-PCR puesto que monitoriza la progresión de la amplificación en el momento en que ocurre. A diferencia de la PCR convencional (en punto final), que mide la acumulación ADN al final de un número predeterminado de ciclos, con qPCR esto se hace durante el proceso de amplificación usando fluorescencia, de forma que su aumento es proporcional a la cantidad de ADN formada.

Además, con el fin de amplificar simultáneamente múltiples segmentos de ADN se puede combinar en una única reacción dos o más pares de partidores de los sistemas que queremos amplificar simultáneamente, junto con el resto de los reactivos de la reacción en cantidades suficientes o utilizar Amplificador múltiple dependiente de sonda (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification o MLPA) el cual permite amplificar varias secuencias objetivo con un único par de primers, todo ello con la finalidad de obtener la información de varios loci en una sola reacción, menor cantidad de molde para el análisis, menor cantidad de reactivos, con una rápida construcción de base de datos. Con ello se obtiene una gran información de datos en poco tiempo, pero a un mayor costo.

6. ALCANCES DEL DESARROLLO Y APLICACIÓN DE NUEVAS TECNOLOGÍAS A LA INVESTIGACIÓN BÁSICO-CLÍNICA DEL CÁNCER DE MAMA.

6.1. Desarrollo de una taxonomía

Clasificación molecular del cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad de una gran heterogeneidad clínica y molecular. Es así como tumores similares desde el punto de vista histológico, presentan distinta evolución clínica y diferente respuesta al tratamiento. Se ha propuesto que este comportamiento clínico diferente entre tumores histológicamente similares se deba a diferencias moleculares, entre ellos. Por lo que se han desarrollado líneas de investigación que buscan la identificación de subgrupos basados en diferencias moleculares que permitan identificar blancos terapéuticos. Es así como, los resultados de varios estudios utilizando la tecnología de microarray del ADN sugieren que el cáncer de mama es un grupo de desordenes neoplásicos molecularmente distintos. Los perfiles resultantes también apoyan la hipótesis de los cánceres de mama receptor de estrógeno positivos y receptores de estrógeno negativos son entidades disímiles, que se originan de distintos tipos celulares y distintos procesos biológicos gobiernan la progresión metastásica (Sotiriou and Pusztai, 2009). Las investigaciones de Perou et al, 2000, basada en tecnología de microarray del ADN, han distinguido principalmente cuatro subgrupos moleculares de cáncer de mama basada en un perfil de expresión de genes, con diferencias en cuanto a su relevancia pronóstica y terapéutica, ellos son: Luminal A, luminal B, Her 2 positivo y basal like.

6.1.1. ***Cáncer de mama con receptores de estrógenos positivos:***

6.1.1.1. Luminal A

Este subtipo está caracterizado por una alta expresión de receptores hormonales (receptores de estrógeno y progesterona) y una baja expresión o ausencia de factores de proliferación celular y p53.

Histopatológicamente esta asociado a tumores bien diferenciados, de bajo grado nuclear y estadios clínicos más precoces, con una menor afectación ganglionar. Están asociados a un buen pronóstico, alta tasa de respuesta al tratamiento hormonal y baja tasa de respuesta a la quimioterapia

6.1.1.2. Luminal B

Son tumores que expresan receptores de estrógeno y presenta una baja proporción o ausencia de expresión del receptor de progesterona. Por otra parte, también se ha evidenciado la expresión aumentada de factores proliferativos como Ki67. Histológicamente son tumores con un menor grado de diferenciación que los luminas A, exhiben un mayor grado nuclear y un índice de proliferación elevados.

Están asociados con tumores clínicamente más avanzados y con una significativa proporción de invasión ganglionar al momento del diagnóstico. Una de las hipótesis propuestas para explicar este comportamiento más agresivo, esta basada en que los receptores de estrógeno aumentan el estímulo proliferativo y la ausencia de receptores progesterona impediría la modulación de la diferenciación celular, probablemente dotando a las células de características asociadas a un peor pronóstico clínico (Lanari *et al*, 2002; Connely *et al*, 2004; Aupperlee *et al*, 2005). Otra hipótesis, basada en el hecho de que determinados factores de crecimiento pueden ocasionar una disminución en la expresión de receptores de progesterona, es que el fenotipo luminal B sólo sea un epifenómeno que refleje la situación de tumores en los que se da una relación de hiperfuncionalidad, de vías entrecruzadas, entre los receptores estrógenos y receptores de factores de crecimiento y que, en definitiva, inhiben la expresión de los receptores de progesterona (Martin, 2006).

Desde el punto de vista de su aplicación clínica, además, es importante reseñar que el patrón dependiente de la expresión o no de receptores de progesterona tendría

también importancia como factor a la hora de considerar pautas terapéuticas hormonales concretas. De forma general, y en relación con esto último, el subtipo luminal B, asociado a una pobre expresión de receptores de progesterona, predice una falta de respuesta al Tamoxifeno, por lo que la terapia con inhibidores de aromatasa estaría indicada.

6.1.2. **Cáncer de mama con receptores de estrógenos negativos:**

6.1.2.1. HER 2 positivo

En aproximadamente el 20 al 25% de los cánceres de mama invasivos en humanos se ha encontrado la mutación y amplificación génica de este gen que resulta en la sobreexpresión del receptor HER 2 (Menard *et al*, 2001). La activación de este receptor es iniciada por la unión de ligandos específicos u ocurre automáticamente, si se encuentra en suficiente densidad en la membrana celular, seguido por la dimerización y autofosforilación del receptor que inicia una serie de cascadas de señalización, entre las que se encuentran las proteínas activadoras de mitógenos (MAP) quinasas y la vía del fosfatidil- inositol 3 quinasa (PI3K)/Akt, con el eventual incremento de la proliferación, angiogénesis, interacción alterada célula – célula, metástasis y resistencia a la apoptosis.

Numerosos estudios dan cuenta de que la amplificación de este gen está asociada al aumento de la proliferación celular, a una evolución más agresiva de la enfermedad y en general a un peor pronóstico (Paterson *et al*, 1991). Este tipo de tumores tiene una distintiva historia natural, que en ausencia de tratamiento sistémico, está asociado a un corto intervalo libre de enfermedad y a un agresivo curso en la enfermedad metastásica. En pacientes con cáncer de mama temprano, tumores de un centímetro o menos, ganglios negativos, la sola presencia de un HER 2 positivo, sin otro factor pronóstico adverso, eleva la probabilidad de recaída local o a distancia en un 23%.

Alternativas terapéuticas en el cáncer de mama HER 2 positivo

Desde el punto de vista predictivo de respuesta al tratamiento, la presencia de un gran número de receptores HER 2 suele ir además asociada a una pérdida de la función de

los receptores de estrógenos, lo que explicaría la baja respuesta a las terapias basadas en el uso de antagonistas de estrógenos en estas pacientes (Kim and Muller, 1999).

Investigaciones dirigidas por Denis Slamon llevaron al diseño y producción de un anticuerpo monoclonal humanizado (Trastuzumab), el cual actúa bloqueando el dominio extracelular del receptor transmembrana, Her 2. En el 2001, se demostró, de acuerdo a los resultados de estudios clínicos fase II y III, que la combinación del Trastuzumab con quimioterápicos de tercera generación (Taxanos), mejora la sobrevida global entre las pacientes con cáncer de mama metastásico HER 2 positivo (incrementando la supervivencia de las pacientes de 18.3 meses a 27.7 meses). Recientemente, cinco ensayos clínicos randomizados han establecido la eficacia del tratamiento adyuvante con Trastuzumab, por un año, en mujeres con cáncer de mama HER 2 positivo, reduciendo el riesgo de recurrencia de enfermedad en alrededor del 50%. En la actualidad, otros estudios están probando este fármaco en el terreno de la neoadyuvancia.

A pesar de los buenos resultados obtenidos tanto en pacientes con cáncer avanzado como localizado, se han observado que existe un grupo de pacientes, que desarrollan resistencia adquirida o una ausencia de respuesta clínica al Trastuzumab en mujeres con cáncer de mama metastásico y HER 2 amplificado. Esto sugiere la existencia de diversos mecanismos de resistencia, entre los cuales se han postulado:

1. Pérdida del dominio extracelular del Her 2: Reportes tempranos sugieren que un grupo de pacientes HER 2 positivos también expresan p95HER 2, un receptor con el dominio extracelular amino-terminal truncado conservando el dominio tirosina – kinasa, condicionando una mala respuesta al Trastuzumab y respondiendo al Lapatinib, un inhibidor dual tanto de la tirosina – kinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico de tipo 2 (HER 2) y del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Se han desarrollado estudio donde se observa que Lapatinib es activo, en combinación con la Capecitabina, en las mujeres con cáncer de mama metastásico, positivo para HER 2, que presentan progresión de la enfermedad tras el tratamiento basado en Trastuzumab. Sin embargo, otros estudios ramdonmizados son necesarios.

2. La interacción con otros miembros de la familia HER. El tratamiento con Trastuzumab puede aumentar la expresión de HER 3 dando lugar a distintos heterodímeros capaces de activar la vía AKT. Pertuzumab un anticuerpo monoclonal, que actúa en el dominio extracelular de HER 2 pero dirigido contra una epítipo distinta a la empleada por el Trastuzumab, además de inhibir al HER 2, impide su dimerización con los otros miembros de la familia.
3. La participación de moléculas como el IGFR, AKT, MUC4, las cuales también pueden jugar un rol, en la producción de resistencia, activando vías alternativas.
4. Por otra parte, cabría mencionar que Trastuzumab, no permite la internalización del receptor HER 2; por el contrario se ha demostrado que induce su reciclaje y permanencia en forma constante en la membrana plasmática (Austin C D, *et al* 2004). Esta observación celular tiene implicaciones importantes a nivel terapéutico. Deben desarrollarse nuevos inmunocombinados que inhiban e internalicen al HER 2.

6.1.2.2. Basal like:

Es llamado así por su patrón de expresión semejante al de las células epiteliales basales y a las células mioepiteliales normales del tejido mamario. Este parecido es producto de la falta de expresión de receptores de estrógeno y genes relacionados, baja expresión de HER 2, intensa expresión de citoqueratinas 5, 6 y 17, y la expresión de genes relacionados con la proliferación celular como el receptor de factor de crecimiento epidérmico (HER1), c-Kit y factores de crecimiento, tales como: el factor de crecimiento de los hepatocitos y el factor de crecimiento insulín-like.

Desde el punto de vista clínico, el subgrupo basal like, se caracteriza por tener un mal pronóstico con un incremento del riesgo de recaídas los primeros tres años después del tratamiento primario, y una rápida progresión de enfermedad metastásica y muerte en los primeros cinco años (Dent, *et al.* 2007).

Los estudios sugieren un nexo entre el fenotipo basal like y la mutación de la línea germinal BCRA 1, ya que otro rasgo que distingue los tumores basal like esporádicos de los

tumores luminares es la disfunción de la vía BCRA 1 causado por la metilación del gen promotor de BCRA 1, la inactivación transcripcional de BCRA 1 o de ambos. La expresión de BCRA 1 es importante en la reparación de ADN, activación de puntos de chequeo del ciclo celular, mantenimiento de la estabilidad cromosómica y promoviendo la diferenciación de células precursoras (stem cell) RE negativas en células RE positivas del subtipo luminal.

Por inmunohistoquímica (IHQ) este subtipo también se ha denominado como “triple negativo” por no expresar receptores de estrógeno, receptores de progesterona, ni HER 2. Sin embargo el método de inmunohistoquímica no ha sido ampliamente aceptado para la caracterización de este subgrupo porque la correspondencia con la clasificación molecular no es exacta y también porque las complejidades logísticas limitan la posibilidad de combinar cinco o más marcadores en IHQ en la práctica clínica rutinaria. Es así como, algunos cánceres triples negativos por IHQ, no necesariamente se corresponden con el subgrupo basal like.

6.2. Cambio en el concepto de la carcinogénesis y desarrollo del cáncer de mama.

El modelo clásico de la carcinogénesis propone que en primer lugar la transformación maligna se produce por múltiples mutaciones en una sola célula al azar y posteriormente hay una selección clonal. Como vimos anteriormente, en base a esta hipótesis, múltiples modelos matemáticos han sido desarrollados para explicar la evolución del cáncer de mama, sus posibles indicadores pronósticos e intentar predecir las mejores estrategias de screening, diagnóstico, tratamiento y seguimiento. Sin embargo, ha sido decepcionante que las terapias basadas en matar las células proliferantes como la quimioterapia a menudo no curen el cáncer. Por ejemplo, un porcentaje significativo de mujeres que son tratadas con poliquimioterapia, recaen y mueren de la enfermedad, (Según el informe de Oxford el porcentaje libre de recidiva y las tasas de supervivencia a los 10 años para estas mujeres se estima en un 44 y 51,3%, respectivamente). Los modelos, hasta este momento, propuestos no logran responder las interrogantes

relevantes del campo: ¿Por qué estos tratamientos no puede curar a un gran porcentaje de las mujeres? ¿Las células son resistentes a los tratamientos, ya sea cinéticamente o por medio de la evolución clonal? ¿Es un problema de la entrega ineficiente del fármaco por propiedades de la célula tumoral o un problema del microambiente del tumor? ¿Como se explica que en el cáncer de mama se producen recaídas hasta 20 años después del tratamiento del tumor primario?

La visión tradicional del proceso de carcinogénesis no es compatible con la investigación oncológica molecular de las últimas décadas. Ya que el estudio por técnicas de microarray y de hibridación genómica revela diferencias en el nivel de número de copias de genes particulares entre los distintos subtipos de cáncer de mama. Es así como en el subtipo basal like se observa un incremento bajo en el numero de copias de varias regiones cromosómicas, siendo infrecuente un alto nivel de amplificación de un locus lo cual revela una mayor inestabilidad genómica, a diferencia por ejemplo del subgrupo HER 2 positivo y luminal B donde se aprecia una alta amplificación del numero de copias de un gen específico. Es así como, las distintas aberraciones genómicas y transcripcionales de los cuatro diferentes subgrupos de cáncer de mama indican que estas variantes pueden elevarse de diferentes células progenitoras, cada una con distintas propiedades biológicas.

En base a esto, se ha postulado el "modelo jerárquico" de la carcinogénesis o de "células madre del cáncer" (CSC) la hipótesis sostiene que la transformación maligna ocurre en un subconjunto de las células progenitoras de la mama probablemente a través de la desregulación de las vías de auto-renovación (Charafe-Jauffret et al, 2009). Esto conduce a una expansión clonal de la células madre/ progenitoras que se someten adicionalmente a alteraciones genéticas y epigenéticas, hasta su transformación completa o final. Además, el modelo preconiza que los tumores se organizarían en una jerarquía celular en el cual las células madres cancerosas son las únicas con un potencial de proliferación ilimitada y capacidad para conducir el crecimiento y progresión del tumor. Esto explicaría porque la eliminación, con quimioterapia y/o radioterapia, de células con una capacidad de proliferación limitada, sin afectar las células madres cancerosas pueden dar lugar eventualmente a una recaída o reaparición de la enfermedad. Esta hipótesis ha

sido recientemente validada por varios estudios donde se demuestra que las células madres cancerosas de distintos tejidos son potencialmente resistentes a la terapia clásica antitumoral (Dean et al, 2005; Hambardzumyan et al, 2006; Li et al, 2008). En estos últimos años, los defensores de la hipótesis de CSC han propuesto que el tipo de evento carcinogénico y la célula blanco del mismo, podrían ser las causas subyacentes de la heterogeneidad del cáncer de mama: los acontecimientos de carcinogénesis en una stem cell o célula progenitora receptor de estrógeno negativa podría dar lugar a los subtipos basal-like, HER 2 positivo o luminal B, mientras que células progenitoras receptor de estrógeno positivo podría dar lugar al fenotipo luminal A.

6.3. Desarrollo de perfiles de expresión génica o firmas con capacidad pronóstica y predictiva

En la actualidad uno de los principales objetivos en la investigación sobre el cáncer de mama es el estudio de marcadores que puedan predecir el pronóstico o la respuesta al tratamiento de forma individual.

La aplicación de estas nuevas tecnologías en el cáncer de mama ha permitido ofrecer información pronóstica y predictiva, a través del descubrimiento de nuevos marcadores potenciales y el desarrollo de perfiles de expresión génica o firmas, compuesta por entre dos y varios miles de genes las cuales pretenden predecir la evolución de la enfermedad, la respuesta al tratamiento y la necesidad o no de tratamientos adicionales. Ejemplos de estos son:

6.3.1. El Oncotype Dx.

El Oncotype Dx fue desarrollado en colaboración de investigadores del National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) y científicos de Genomic Health, Inc, con el objetivo de cuantificar el riesgo residual de recaída a distancia en pacientes con cáncer de mama de aparente buen pronóstico: receptores de estrógeno positivos, ganglios negativos, tratadas con tamoxifeno (Paik, 2007). Los niveles de expresión de 16

genes relacionados con proliferación (*Ki67, STK15, Survivin, CCNB1, MYBL2*), respuesta al tratamiento endocrino (*ESR1, PGR, BCL2, SCUBE2*) y otros (*HER-2, GRB7, MMP11, CTSL2, GSTM1, CD68, BACG1*) y 5 genes de referencia son medidos por reacción en cadena de polimerasa de transcripción reversa cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR) y se desarrollo un algoritmo matemático para calcular el score de recurrencia (Paik, 2007). Este algoritmo fue establecido en un grupo de pacientes constituido por muestras del brazo que recibió tamoxifeno en el NSABP – B20, con un seguimiento de 10,9 meses y posteriormente validado en el brazo de tamoxifeno del NSABP – B14. La puntuación es dada como una medida continua de riesgo de recaída a distancia, en pacientes con cáncer de mama, tratadas con tamoxifeno, como bajo riesgo: menos del 10%, riesgo intermedio entre el 10 y el 30% y alto riesgo más del 30%. El score de recurrencia es independiente de la edad y el tamaño tumoral, es un factor predictivo de supervivencia global y predice la magnitud del beneficio de la quimioterapia en pacientes ganglios negativos, receptores de estrógeno positivos (Paik et al, 2006).

6.3.2. MammaPrint.

Utilizando tecnología de microarray de ADN se caracterizaron 70 genes en un ensayo clínico llamado MINDACT. Los genes utilizados en la prueba fueron identificados en un estudio caso-control de mujeres jóvenes con cáncer de mama, ganglios negativos y con un seguimiento igual o superior a los 10 años. Los tumores de los pacientes que sufrieron una recaída metastásica precoz tenían perfiles de expresión génica distintos de los que permanecieron libres de metástasis.

A diferencia del Oncotype Dx el MammaPrint requiere de muestras de tejido fresco, lo cual implica una mayor complejidad para su recolección y mantención, como por ejemplo un banco de tumores. Otra desventaja es que el MammaPrint no esta optimizado para aquellos pacientes con tumores receptores hormonales positivos que recibieron terapia endocrina, por lo que los genes relacionados con el impacto de este tipo de terapia son ahora incluidos en el MammaPrint por casualidad.

Otros tres conocidos ensayos de múltiples genes para clasificación pronóstica y predictiva en cáncer de mama, han sido sometidos a validación externa independiente y comercializados, estos son:

6.3.3. El test del ratio de expresión HOXB1 3 / IL17BR

Ma y colaboradores, realizaron el análisis de expresión génica de 60 tumores provenientes de 103 pacientes con cáncer de mama precoz, RE positivo, tratadas exclusivamente con tamoxifen entre 1987 y 1997, del Hospital General de Massachusetts. De allí se generó la relación entre dos genes: HOXB 13 y el receptor de la interleukina B17, encontrándose que el ratio entre ambos está significativa e independientemente asociado con una peor sobrevida libre de enfermedad en pacientes con tumores RE positivo, ganglios negativos, además predice resistencia al tamoxifeno. Los genes HOX controlan la morfogénesis y juegan un rol crucial en el mantenimiento de la especificidad tisular. HOXB 13 puede interactuar con el RE y su sobreexpresión puede contribuir a la resistencia al tamoxifeno. El IL17BR tiene un rol menos conocido en el cáncer de mama, pero se sabe que el gen del IL17BR, localizado en 3p21, frecuentemente se pierde en el cáncer de mama. Una hipótesis para explicar la relación de este gen con un mal pronóstico, es que su baja expresión esta correlacionada con la pérdida de genes supresores de tumores localizados en 3p21.

El ratio HOXB 13/ IL17BR ha sido validado por el North Central Cancer Treatment Group (NCCTG) en un estudio randomizado, con mujeres postmenopáusicas, cáncer de mama temprano, RE positivo, tratadas con tamoxifeno por 5 años. Se obtuvo el perfil de ambos genes en 211 bloques tumorales por la técnica de RT-PCR. El ratio de la expresión de HOXB 13 / IL17BR no se encontró asociada ni a recaída, ni a sobrevida en pacientes ganglios positivos. Sin embargo, en pacientes ganglios negativos, un ratio alto está significativamente asociado a una disminución de la sobrevida libre de enfermedad.

6.3.4. Índice de grado genómico (MapQuant Dx)

Combina el nivel de expresión de los genes que discriminan entre tumores grado histológico 1 y 3. A pesar de que el índice de grado genómico esta compuesto casi exclusivamente por genes de proliferación se correlaciona bien con la clasificación de tumores luminal A y B.

6.3.5. Firma de Rotterdam

Los investigadores de Rotterdam, utilizando tecnología de microarray, identificaron una firma de 76 genes (60 genes para pacientes con enfermedad RE positivo y 16 genes para pacientes con enfermedad RE negativo) evaluando muestras de 115 tumores. En un set de pruebas independientes de 171 pacientes ganglios negativos, la firma demostró un 93% de sensibilidad y un 48% de especificad para identificar pacientes con riesgo de desarrollar metástasis a distancia en 5 años. Además un análisis de subgrupo demostró que el perfil es un gran predictor tanto en mujeres pre como postmenopáusicas y con tumores pequeños, que miden entre 1 y 2 cms. Validaciones subsecuentes en pruebas independientes, multi-institucionales corroboraron la anterior afirmación en pacientes RE positivos, sin embargo la muestra de pacientes RE negativos fue muy pequeña para validarlo en este subgrupo.

6.4. Cambios en el abordaje clínico y terapéutico de la enfermedad. Desarrollo de nuevos fármacos

Hasta hace tan sólo unos 5 años, sólo contábamos con los fármacos antineoplásicos que atacaban a las células de una manera poco selectiva, reconocían únicamente las células que se multiplicaban con rapidez y las destruían.

El manejo clínico del cáncer de mama esta basado en factores pronósticos y predictivos tradicionales, que incluyen: factores histológicos, clínicos y algunos marcadores moleculares bien definidos (estado de los receptores de estrógenos, receptores de progesterona y del HER 2).

La importancia relativa de los factores pronósticos y predictivos se ha debatido durante muchos años. Hay muchos factores que muestran una propiedad mixta tanto

pronostica como predictiva a un tratamiento dado. Más recientemente se ha vuelto cada vez más aceptado la combinación que dos parámetros para definir el pronóstico en un tratamiento en particular puede ser de valor sustancial, ya que puede permitir la definición de riesgo residual y por lo tanto indican el valor potencial o no de un tratamiento adicional.

En los últimos años se ha hecho necesario completar el informe histológico habitual con un segundo informe en el que se determina por inmunohistoquímica la expresión de marcadores relacionados con el pronóstico y con la presencia o ausencia de dianas terapéuticas específicas para tratamientos actualmente disponibles (Tamoxifeno o inhibidores de la aromatasa en los casos que expresan receptores de estrógenos y Trastuzumab si expresan HER 2). La relevancia que actualmente ha adquirido este informe complementario para el manejo oncológico de las pacientes, permite suponer que la clasificación histológica clásica se está quedando obsoleta y que los nuevos marcadores están anticipando la llegada de una "era molecular" a la clasificación del cáncer de mama.

Esto es, los distintos fenotipos responderían diferencialmente a las terapias. Así los grupos luminales con expresión de receptores serían subsidiarios de tratamientos "hormonales", mientras que las pacientes del grupo HER 2 se beneficiarán de incorporar Trastuzumab a la quimioterapia. El triple negativo precisará quimioterapia únicamente. En este contexto, la asociación de la expresión de p53 con fenotipos de alto riesgo podría definir subgrupos que se beneficiarían de quimioterapias de alta dosis. En este subgrupo de pacientes, en la actualidad se están desarrollando estudios para otros posibles blancos terapéuticos, tales como: Los estudios AVADOS y RIBBON I – II, que evalúan la adición a la quimioterapia de fármacos antiangiogénicos como el Bevacizumab. Asimismo, la introducción de una nueva familia de fármacos como los inhibidores de la poli – adenosin ribo polimerasa (inhibidores de PARP), que impiden la reparación del ADN una vez que se produce el daño con la quimioterapia convencional, forzando a la célula tumoral a la apoptosis y el desarrollo de fármacos anti factor de crecimiento insulina like.

7. PERSPECTIVAS EN CHILE Y EL MUNDO ACERCA DE LOS AVANCES ALCANZADOS EN CÁNCER DE MAMA

7.1. Situación en países desarrollados

A nivel mundial, los progresos obtenidos en el conocimiento de la patogénesis y comportamiento del cáncer de mama han permitido un cambio tanto en el abordaje diagnóstico como terapéutico de la enfermedad. En USA y el Reino Unido, estos avances, se han traducido en un sostenido descenso de la mortalidad, por cáncer de mama a partir del año 1990, que se estima en 30% con tendencia a continuar descendiendo. La explicación a esta situación se atribuye tanto al diagnóstico molecular temprano de la enfermedad como también a los nuevos tratamientos adyuvantes a la cirugía y radioterapia.

En resumen se recopilan los siguientes avances:

- El screening mamográfico de rutina es aceptado como un estándar para la detección precoz del cáncer de mama. Ocho estudios randomizados han evaluado la efectividad de la mamografía: en Estados Unidos, Suecia, Reino Unido y Canadá (Van Dijck et al. 1996; Alexander et al, 1990; Miller et al. 2000; Miller et al, 2002), reclutando más de medio millón de mujeres, con seguimiento de más de 20 años, y varios meta-análisis. concluyen que el screening mamográfico disminuye la mortalidad por cáncer de mama en un promedio de 24 % (18 a 30%).
- La mastectomía conservadora (lumpectomía) combinada con radioterapia ha reemplazado a la mastectomía radical en el tratamiento del cáncer de mama temprano.

- La introducción de la técnica de ganglio centinela, en manos especializadas, permite un manejo menos agresivo de la axila, en pacientes con cáncer de mama temprano, disminuyendo la morbilidad asociada a la disección axilar.
- La quimioterapia neoadyuvante ha permitido disminuir el tamaño tumoral y realizar un mayor número de mastectomías conservadoras, así como la quimioterapia adyuvante es hoy por hoy un estándar del tratamiento con el objetivo de eliminar la enfermedad micrometastásica
- La introducción de técnicas de biología molecular para el estudio de la biopsia, ha permitido un mejor entendimiento de la biología tumoral, con una mejor caracterización de la enfermedad, así como la evaluación de factores pronósticos y predictivos.
- El análisis del perfil de expresión génica ha permitido la identificación de cuatro subgrupos, con diferentes características biológicas, comportamiento clínico y respuesta a la quimioterapia, esto permite, en la actualidad, el estudio y desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en las características individuales de cada tumor.
- Así mismo, el conocimiento obtenido ha permitido el desarrollo de nuevos fármacos, como por ejemplo: al tamoxifeno (modulador selectivo del receptor de estrógeno, SEER), se han sumado los inhibidores de aromatasa, para el tratamiento del cáncer de mama receptor de estrógenos positivo. Y la introducción de terapias blanco, tal como el Trastuzumab (Anticuerpo monoclonal anti Her2) para aquellos cánceres de mama que sobreexpresan el HER 2 en su membrana citoplasmática.

7.2. Situación en Chile

En Chile en el año 1995 se realiza la implementación, del Programa Nacional de Cáncer de Mama, el cual tuvo como principal objetivo: “Disminuir la mortalidad por cáncer de mama a través del aumento de la pesquisa de cánceres en etapas I y II, realizando tratamientos adecuados y oportunos”. Con ello se logro que el porcentaje de casos nuevos en etapas I y II mejorara de 53% en 1995 a 67,6% en el año 2000 y los canceres diagnosticados en etapa III disminuyeron de 38% a 26%. Y a pesar de los pocos recursos disponibles, se detectó ya un 4% de cáncer ductal *in situ*. Es de destacar, que sólo desde el año 2005 toda mujer a los 50 años tiene derecho por ley a una mamografía, independiente de los factores de riesgo o sintomatología que presente, como parte del Examen de Medicina Preventiva (MINSAL, 2005). Se trata de una sola mamografía en la vida de las chilenas.

La mortalidad por cáncer de mama se ha mantenido estable en los últimos años a pesar que se estima que existe aumento progresivo de la incidencia.

En 1997, el Cáncer de Mama fue definido entre las prioridades programáticas del MINSAL y es incorporado a los beneficios del Programa de Oportunidad de la Atención de FONASA. Asimismo, se definieron protocolos de atención en conjunto con la Sociedad Chilena de Mastología, que incluyen desde la detección precoz hasta la paliación. La quimioterapia, la radioterapia, hormonoterapia, el Alivio del Dolor y Cuidados Paliativos fueron incorporados al Programa de Prestaciones Complejas de FONASA.

En abril del 2004, el cáncer de Mama es Incorporado al Sistema de Acceso Universal de Garantías Explícitas (AUGE), que ha permitido garantizar plazos máximos para el acceso a confirmación diagnóstica y tratamiento.

Se deben destacar los esfuerzos legislativos, específicamente en el marco legal establecido para garantizar el acceso oportuno a las mujeres chilenas, tanto al diagnóstico como al tratamiento y seguimiento. Sin embargo, existen grandes falencias y discrepancias en el abordaje y tratamiento del cáncer de mama en Chile. Existen evidentes disparidades en cuanto a las oportunidades y los recursos disponibles entre el

sistema público de salud y el sector privado, e incluso entre el área metropolitana y regiones. Todo esto se evidencia en, a lo menos, los siguientes puntos:

- **El abordaje y tratamiento de esta patología**
- Existe una carencia de especialistas: oncólogos (médicos y cirujanos oncólogos) y radioterapeutas a nivel del país y los existentes están concentrados principalmente en el área metropolitana, y luego les siguen la Quinta, Octava y Décima Región. Esto conlleva a que pacientes de otras regiones sean tratados por médicos sin una formación oncológica, con la consiguiente disparidad de conductas o que los pacientes deban desplazarse muchos kilómetros para recibir tratamiento.
- En el AUGE no está garantizado el screening con mamografía en todas las mujeres. Es decir, este garantiza tratar a la mujer con cáncer, pero no garantiza el diagnóstico precoz de esta patología. Siendo que el screening mamográfico masivo es la única estrategia diagnóstica que ha permitido mejorar la sobrevida.
- A pesar de que el tratamiento multimodal (cirugía, radioterapia, quimioterapia, hormonoterapia) esta cubierto por el AUGE, al menos en el sistema público de salud, las pacientes con recaída o progresión de su cáncer de mama que requieren otras líneas de tratamiento de quimioterapia distintas a las basadas en antraciclinas o paclitaxel no tienen cobertura de otras drogas. En la actualidad a partir de Julio del 2010, fueron incorporadas la Capecitabina y la Gemcitabina, en el tratamiento del cáncer de mama avanzado que requiere quimioterapia.
- Asimismo, por su alto costo, no era factible el acceso a terapias tipo Trastuzumab, en el subgrupo de pacientes HER 2 positivas, ni en su modalidad de paliación en pacientes en etapa IV, ni en adyuvancia en pacientes con enfermedad localizada, a pesar de la amplia evidencia científica que avala su uso. Recién en Julio del 2010, se evaluarán un grupo restringido de pacientes HER 2 positivas, para recibir tratamiento adyuvante con Trastuzumab por un año. Es de destacar que quedan excluidas del tratamiento pacientes con ganglios histológicamente negativos, independientemente del tamaño tumoral o si clínicamente eran positivos previo a

la neoadyuvancia, pacientes que además presenten receptores hormonales positivos y los estadios IIIb y IIIc (localmente avanzados) y los estadios IV.

- El Ministerio de Salud exige la determinación de la amplificación del gen HER 2 por FISH, aun con una inmunohistoquímica positiva (3+). A pesar de que solo el estudio de IHQ esta incluido en el AUGE y es provisto por el estado, la determinación por FISH solo es realizada por la industria farmacéutica privada.

- **El empleo de tecnología de punta**

En Chile, el sistema de garantías explícitas (GES) contempla la determinación de los receptores de estrógeno, progesterona y la sobreexpresión del HER 2 por inmunohistoquímica, en las muestras tumorales embebidas en parafina.

En los últimos años la disponibilidad de tecnologías que permiten determinar niveles de expresión de miles de genes en un solo experimento ha causado un impacto contundente en la investigación sobre el cáncer y en especial el cáncer de mama. Ya no estamos limitados a monitorear un gen, sino que es posible medir efectos colectivos en una escala global. Además, en estos momentos estamos atravesando la era post-genómica caracterizada por el uso de plataformas tecnológicas de alto rendimiento para realizar análisis integrales, tales como la proteómica. Estos estudios de biología molecular son costosos, y aunque presentan una prometedora proyección en su utilidad clínica futura (información pronóstica y predictiva), en la actualidad su aplicación clínica en el país, no es factible dado el costo de estas técnicas. Por ejemplo, en la actualidad, en Chile:

- La determinación por FISH de la amplificación del gen HER 2, en los casos que lo requieren (Los HER 2: 2+ por IHQ o 3+ en IHQ según requerimientos del MINSAL) es provista por la industria farmacéutica privada.
- No existe posibilidad real de realización de estudios pronósticos tipo Oncotype Dx, el cual tiene un costo aproximado de 3000 dólares.
- En el contexto de estudios clínicos el MINSAL junto con representantes del National Cancer Institute (NCI) de Estados Unidos y representantes de otros

cuatro países (Brasil, Uruguay, Argentina y México) presentaron un protocolo de estudio, en las Jornadas de Cáncer de Mama de Santiago, organizada por las Clínica Las Conde en Abril 2010, que incluye pacientes con cáncer de mama en estadios localizados I – II – IIIa, las cuales serán reclutadas en tres centros del país, además de centros de los otros países latinoamericanos involucrados, donde se plantean dos objetivos: (1) Conocer la subclasificación molecular de los cánceres de mama, realizando la evaluación de las muestras histológicas por microarray (el cual se realizará en el caso de Chile en la Universidad Católica de Chile) y (2) Evaluar la respuesta al tratamiento y el pronóstico en correlación con el análisis molecular.

- **Desarrollo de investigación en cáncer de mama**

La investigación en salud es fundamental, para avanzar en consonancia con los objetivos sanitarios. En Chile existen por una parte la investigación básica, desarrollada generalmente en las universidades e institutos de investigación y por otra parte la investigación de ensayos clínicos generados frecuentemente por la industria farmacéutica privada y en la cual participan los médicos oncólogos, ya sea de forma individual o como parte de un grupo de investigación como por ejemplo el GOCCHI.

En general existe poca o nula participación del médico oncólogo en investigación traslacional

8. CONCLUSIONES

Los avances científicos y tecnológicos, como la secuenciación completa del genoma humano, ha supuesto un cambio trascendental en la manera de entender, investigar y abordar el diagnóstico y el tratamiento del cáncer. En las últimas décadas, se ha incrementado el conocimiento acerca de la identificación de los genes específicos

involucrados en el desarrollo y progresión del cáncer de mama así como, el estudio de los mecanismos de señalización y regulación de los productos proteicos no sólo para el conocimiento de los sistemas de activación y control de la proliferación celular mediada por mitógenos, sino para comprender ciertos mecanismos responsables de la transformación oncogénica de la célula mamaria. En este contexto el desarrollo de la genómica, la proteómica, la bioinformática y las técnicas moleculares han generado un impulso tecnológico determinante en la investigación del cáncer, que ya está teniendo importantes consecuencias clínicas en cuanto al diagnóstico, pronóstico y tratamiento de los pacientes. En el caso específico del cáncer de mama la introducción de técnicas de biología molecular que permiten la determinación simultánea de varios genes ha permitido:

- Establecer una clasificación molecular del cáncer de mama en cuatro subgrupos, luminal A, luminal B, HER 2 positivo y Basal like, con distintas implicaciones pronósticas y terapéuticas.
- Plantear un nuevo modelo de carcinogénesis, modelo jerárquico, llamado modelo de células madres o progenitoras, el cual provee de una hipótesis o argumento para dar respuesta a preguntas sobre el fallo de terapias citotóxicas, o recaídas en pacientes una vez transcurrido un largo periodo desde el tratamiento del primario.
- La creación de firmas genéticas de carácter pronóstico, Oncotype Dx – MamaPrint y otras, que permitirían discriminar pacientes que aun teniendo un aparente buen pronóstico, por indicadores convencionales, se beneficiarían de terapia citotóxica adicional.
- La introducción de cambios en el abordaje terapéutico del cáncer de mama, de acuerdo a las características específicas de cada tumor, en el camino hacia una terapia individualizada. Este conocimiento provee de una gran oportunidad para el desarrollo de terapias específicas dirigidas contra los blancos terapéuticos identificados. Sin embargo, aun queda un largo camino en la investigación de este campo, ya que:

- Los caminos moleculares relacionados con el cáncer de mama son complicados y muchos de ellos se intersectan e interactúan (crosstalk), lo que deriva en que aún tengamos una comprensión limitada
- Los modelos preclínicos disponibles no reflejan efectivamente la enfermedad humana, por lo tanto no predicen con exactitud los modelos clínicos
- Existe una considerable heterogeneidad entre las moléculas blancos y sus funciones en individuos con aparente similares tipos de cáncer, por lo tanto los efectos clínicos de las terapias blancos son variables e impredecibles.
- Estos blancos moleculares no están totalmente confinados a las células cancerígenas, por lo que presentan efectos sobre tejidos normales que dan lugar a toxicidades esperadas y/o no esperadas.

En Chile el cáncer de mama es un problema de salud pública, desde el año 1995 se han hecho grandes esfuerzos para conformar un sistema de registro nacional, incentivar el diagnóstico precoz, unificar criterios de diagnóstico, tratamiento y seguimiento y con la inclusión en el Sistema de Garantías explícitas (GES), garantizar plazos desde el diagnóstico al tratamiento, así como el acceso al tratamiento en sus diferentes etapas. A pesar de todo esto existen grandes inequidades en cuanto al abordaje de esta patología según su atención se realice a nivel público o privado e incluso se realice en el área metropolitana o regiones.

Por otra parte los avances obtenidos de la investigación molecular con tecnología de punta a nivel mundial son vistas, al menos en el servicio público de salud, como una “utopía” ya que el acceso tanto a los test diagnósticos como pronósticos, así como a las terapias biológicas, no son factibles por los altos costos que estos suponen.

Una posible solución, que disminuiría los costos, sería el desarrollo de una tecnología propia, Test y tratamientos locales, derivados de investigación oncológica realizada en el país, para ello se requiere un mayor incentivo y apoyo logístico y económico de la investigación básica dedicada al tema del cáncer. Es necesario entonces,

incentivar desde la formación universitaria básica al médico, para que participe en investigación básico-clínica, desarrollando una verdadera investigación traslacional, estableciendo desde el comienzo un hilo comunicativo y de colaboración bidireccional entre el investigador básico y el médico oncólogo que garantice un mayor éxito en cuanto a que el producto generado en la investigación tenga un impacto real en el consumidor final que es el enfermo.

La investigación traslacional corresponde al modelo de aplicación en el cual los clínicos orientan los descubrimientos nuevos y relevantes de la investigación biomédica relacionados a la enfermedad humana tanto al mejoramiento del diagnóstico, tratamiento, pronóstico y prevención de las enfermedades, como a responder a las interrogantes científicas que surgen de la práctica clínica diaria. La medicina traslacional apoya a los investigadores clínicos para identificar a través de observaciones directas, nuevas hipótesis alternativas relevantes de la enfermedad e incide en mejorar la salud de los pacientes y, por consiguiente en la salud pública. La investigación traslacional integra herramientas novedosas en genómica, proteómica, farmacología, biomarcadores, diseños, métodos y tecnologías clínicas que aumentan la comprensión fisiopatológica de las enfermedades. La investigación traslacional no solo integra la participación de los dominios de investigación biomédica con los dominios clínicos, sino también las modificaciones de los comportamientos sociales y políticos que permiten optimizar el cuidado integral del paciente; uno de ellos es el requerimiento de reprogramar la educación biomédica de grado y posgrado.

9. RECOMENDACIONES.

En un artículo de Renart (1995) se señala que el desarrollo científico de un país es un parámetro indicador de la riqueza del mismo, tanto más cuanto que este desarrollo es la causa y no la consecuencia del desarrollo de los países.

El objetivo final de reducir la carga del cáncer en esta nación sólo puede lograrse a través de un fuerte compromiso con la investigación.

El proceso de valorización y transferencia de los resultados de investigación contribuye a que el conocimiento generado en Chile por la investigación básica, la investigación aplicada y/o el desarrollo experimental, se transfiera a empresas y otras organizaciones y se incorpore a innovaciones de nuevos productos o servicios mejorados. Este proceso, por lo tanto, transforma resultados de investigación realizada en Chile obtenidos a nivel experimental en tecnología nacional que puede ser transferida a productores chilenos o extranjeros. Y es diferente a los mecanismos de transferencia tecnológica más convencionales que importan tecnologías desarrolladas en el extranjero para ser incorporadas a productos, procesos o servicios en Chile. Para el desarrollo de un país, ambos procesos de transferencia tecnológica son útiles y complementarios. Sin embargo, a medida que aumenta la competitividad global y la demanda por productos y servicios de mayor valor agregado, más investigación y desarrollo local es demandada y, consecuentemente, una valorización y transferencia de sus resultados es requerida.

“La Oncología del siglo XXI”, comenta el doctor Miguel Ángel Piris, “se sustenta y fundamenta su desarrollo en los avances de la investigación básica. Pero sólo un esfuerzo común de investigación traslacional puede llevar estos avances a la cabecera del paciente. En los últimos años, la transferencia de tecnología de la investigación básica sobre el cáncer se ha acelerado tremendamente, especialmente en el área de terapias moleculares. El éxito de Trastuzumab, Imatinib, Gefitinib, Erlotinib, Bevacizumab, Cetuximab, entre otros ejemplifica claramente la habilidad de explotar nuestro conocimiento de la biología molecular del cáncer para producir drogas que tienen un impacto real en la vida de las personas. De hecho, estas nuevas terapias oncológicas están basadas en inhibidores específicos de dianas moleculares cuyo efecto terapéutico viene determinado por las características moleculares de cada tumor. De ahí la necesidad de que los especialistas en la clínica oncológica tengan la oportunidad de acceder en términos de calidad y actualidad a los conocimientos e incorporarse desde su práctica clínica a la investigación oncológica traslacional. El pensamiento entonces debe estar dirigido a elevar la capacidad de creación de conocimiento, reforzando el sistema universitario por medio de programas de formación de capital humano, asegurando su

posterior inserción en los organismos que hacen ciencia a fin de consolidar los grupos de investigación, y asignando recursos para mantener laboratorios de investigación en líneas de interés que permitan desarrollar avances tecnológicos. Por esta razón, el esfuerzo en formar personal altamente cualificado debe ser el primer eslabón para hacer ciencia de calidad traducible en tecnología, que permita a nuestros países la posibilidad de cimentar un desarrollo sostenido

10. BIBLIOGRAFÍA

- Alexander FE, Anderson TJ, Brown HK, et al. 14 years of follow-up from the Edinburgh randomised trial of breastcancer screening. *Lancet*. 1999; 353: 1903-1908.
- Almeida M, Han L, O'Brien C A, Kousteni S, Manolagas S C. Classical Genotropic *Versus* Kinase-Initiated Regulation of Gene Transcription by the Estrogen Receptor. *Endocrinology*. 2006; 147: 1986–1996.
- American Cancer Society. Breast Cancer Facts Figures 2009 – 2010
- Anderson E. The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Res*. 2002; 4: 197-20
- Arpino G , Weiss H , Lee A V, Schiff R, De Placido S , Osborne K , Elledge R M. Estrogen Receptor – Positive, Progesterone Receptor – Negative Breast Cancer: Association With Growth Factor Receptor Expression and Tamoxifen Resistance. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1254 – 1261
- Arpino G, Wiechmann L, Osborne K, Schiff R. Crosstalk between the Estrogen Receptor and the HER Tyrosine Kinase Receptor Family: Molecular Mechanism

and Clinical Implications for Endocrine Therapy Resistance. *Endocrine Reviews*. 2006; 29(2): 217–233.

- Aupperlee M, Kariagina A, Osuch J, Haslam SZ. Progestins and breast cancer. *Breast Dis*. 2005; 24:37-57.
- Austin CD, De Mazie`re AM, Pisacane P I, van Dijk S M, Eigenbrot C, Sliwkowski M X, Klumperman J and Scheller R H. Endocytosis and sorting of ErbB2 and the site of action of cancer therapeutics trastuzumab and geldanamycin *Mol Biol Cell* 2004;15:5268-5282
- Cabrera Morales C M. Estudio comparativo de la amplificación de Her2/neu mediante FISH y PCR cuantitativa en tiempo real en tumores de mama. *Oncología*, 2005; 28 (10):472-476
- Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Birnbaum D. Breast cancer stem cells: tools and models to rely on. *BMC Cancer* 2009, 9: 202 – 212.
- Clare S, Nakhlis F, Panetta J C. Molecular biology of breast metastasis: The use of mathematical models to determine relapse and to predict response to chemotherapy in breast cancer. 2000; *Breast Cancer Res*, 2: 430 – 435
- Connely OM, Jericevic BM, Lydon JP. Progesterone receptors in mammary gland development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2003; 8:205-214.
- Croce C M. Oncogenes and Cancer. *N Engl J Med* 2008; 358:502- 511
- Cui X, Schiff R, Arpino G, Osborne K, Lee A V. Biology of Progesterone Receptor Loss in Breast Cancer and Its Implications for Endocrine Therapy. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 7721-7735
- Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 2005, 5:275-284.

- Demicheh R, Abbattista A, Miceli R et al. Time distribution of the recurrence risk for breast cancer patients undergoing mastectomy: Further support about the concept of tumor dormancy. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 41: 177- 185.
- Demicheli R, Terenziaru M, Valagussa P et al. Local recurrences following mastectomy: Support for the concept of tumor dormancy. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 45-48.
- Demicheli R, Valagussa P, Bonadonna G. The long-lasting effect of adjuvant CMF in node-positive (N+) breast cancer patients is mainly due to significant reduction of early relapses. *Anti-cancer Drugs* 1995; 6 (Suppl 2): 77.
- Dent R, Trudeau M, Pritchard K, Hanna W, Kahn H, Sawka C, Lickley L, Rawlinson E, Sun P, Narod S. Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clin Cancer Res* 2007; 13(15) 4429 – 4434.
- Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, Fleming M, Zimonjic D, Donaher J, Popescu N, Hahn W, Weinberg R Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev.* 2001 15: 50-65
- Fan P, Wang J, Santen RJ, Yue W. Long-term Treatment with Tamoxifen Facilitates Translocation of Estrogen Receptor A out of the Nucleus and Enhances its Interaction with EGFR in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* 2007; 67(3):1352–1360
- Fan P, Wang J, Santen RJ, Yue W. Long-term Treatment with Tamoxifen Facilitates Translocation of Estrogen Receptor A out of the Nucleus and Enhances its Interaction with EGFR in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Cancer Res* 2007;67(3):1352–1360
- Filardo EJ, Graeber CT, Quinn JA, Resnick MB, Giri D, DeLellis RA, Steinhoff MM, Sabo E. Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression. *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 6359 – 6366

- Gjerdrum LM, Sorensen BS, Kjeldsen E, Sorensen FB, Nexø E, Hamilton-Dutoit S. Real-time quantitative PCR of microdissected paraffin-embedded breast carcinoma: an alternative method for HER2/neu analysis. *J Mol Diag* 2004;
- Glass AG, Lacey JV Jr, Carreon JD, Hoover RN. Breast Cancer Incidence, 1980 – 2006: Combined Roles of Menopausal Hormone Therapy, Screening Mammography, and Estrogen Receptor Status. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 1152 – 1161
- Guía clínica, cáncer de mama en personas de 15 años o más. MINSAL 2005
- Gururaj A E, Rayala S K, Vadlamudi R K, Kumar R. Novel Mechanisms of Resistance to Endocrine Therapy: Genomic and Nongenomic Considerations. *Clin Cancer Res*. 2006; 12(1001s 3 Suppl).
- Hambardzumyan D, Squatrito M, Holland EC. Radiation resistance and stem-like cells in brain tumors. *Cancer Cell* 2006, 10:454-456
- Hanna WM, Kahn HJ, Pienkowska M, Blondal J, Seth A, Marks A. Defining a test for HER-2/neu evaluation in breast cancer in the diagnostic setting. *Mod Pathol*. 2001; 14: 677-85.
- Heldt CH. SH2 domains: elements that control protein interactions during signal transduction. *Trends in Biochemical Sciences*, 1991 Dec, 16 (12): 450-452.
- Hernandez Ch. Cuantificación del número de copias de HER-2 por PCR en Tiempo Real: Correlación entre el nivel de expresión y la amplificación genómica en biopsias de cáncer de mama. Tesis de Grado presentado en conformidad a los requisitos para obtener el Grado Académico de “Licenciado en Tecnología Médica con mención en Morfofisiopatología y Citodiagnóstico”. Universidad Católica de Valparaíso. 2009
- Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. Specificity of HercepTest in determining Her-2/neu status of breast cancers using the United States Food

and Drug Administration-approved scoring system. *J Clin Oncol* 1999; 17:1983–1987.

- Jimenez RE, Wallis T, Tabaszka P, Visscher DW. Determination of Her-2/Neu status in breast carcinoma: comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol* 2000; 13:37–45.
- Katzenellenbogen BS, Choi I, Delage-mourroux R, Ediger TR, Martini PGV, Montano M, Sun J, Weis K, Katzenellenbogen JA. Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands receptor pharmacology. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000; 74: 279–285.
- Kinoshita Y, Chen Sh Induction of Aromatase (CYP19) Expression in Breast Cancer Cells through a Nongenomic Action of Estrogen Receptor. *Cancer Research.* 2003; 63, 3546–3555
- Knowlden J M, Hutcheson I R, Barrow D, Gee J M W, Nicholson R I: Insulin-Like Growth Factor-I Receptor Signaling in Tamoxifen-Resistant Breast Cancer: A Supporting Role to the Epidermal Growth Factor Receptor. *Endocrinology.* 2005; 146: 4609–4618
- Knudson A. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer*, 2001; 1, 157–170.
- Koch CA; Anderson D; Moran MF; Ellis C; Pawson T. SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science*, 1991 May, 252 (5006): 668-674.
- Koscielny S, Tubiana M, Le MG, Valleron AJ, Mouriessse H, Contesso G, Sarrazin D: Breast cancer: relationship between the size of the primary tumour and the probability of metastatic dissemination. *Br J Cancer.* 1984; 49: 709-715.
- Kumar P, Wu Q, Chambliss K L, Yuhanna I S, Mumby S M, Mineo Ch, Tall G G, Shaul Ph W. Direct Interactions with G_i and G_q Mediate Nongenomic Signaling by Estrogen Receptor. *Molecular Endocrinology.* 2007; 21(6):1370–1380.

- Lanari C, Molinolo AA. Diverse activation pathways for the progesterone receptor: possible implications for breast biology and cancer. *Breast Cancer Res.* 2002; 4:240-243.
- Lee S, Zelen M. A Stochastic Model for Predicting the Mortality of Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2006; 36: 79 – 86
- Levin E. Bidirectional Signaling between the Estrogen Receptor and the Epidermal Growth Factor Receptor. *Molecular Endocrinology.* 2002; 17(3): 309–317
- Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 2008, 100: 672-679
- Loeb KR and Loeb LA. Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis.* 2000; 21, 379–385.
- Londen M, Stighall M, Nielsen N H, Roos G, Emdin S O, Ostlund H, Landberg G. The Cyclin D1 high and cyclin E high subgroups of breast cancer: separate pathways in tumorigenesis based on pattern of genetic aberrations and inactivation of the pRb node. *Oncogene.* 2002; 21: 4680 – 4690.
- Manavathi B, kumar R. Steering Estrogen Signals From the Plasma Membrane to the Nucleus: Two Sides of the Coin. *Journal of Cellular Physiology.* 2006; 207:594–604
- Margolis; B. Proteins with SH2 domains: transducers in the tyrosine kinase signaling pathway. *Cell Growth and Differentiation,* 1992 Jan, 3 (1): 73-80.
- Martin M. Molecular biology of breast cancer. *Clin Transl Oncol.* 2006; 8: 7-14.
- Menard S, Casalini P, Campiglio M, Pupa S, Agresti R, Tagliabue E: HER2 overexpression in various tumor types, focussing on its relationship to the development of invasive breast cancer. *Ann Oncol* 2001, 12(Suppl 1): S15-S19.

- Miki Y, Suzuki T, Sasano H. Controversies of aromatase localization in human breast cancer—Stromal versus parenchymal cells. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2007; 106: 97–101
- Miller AB, To T, Baines CJ, Wall C. Canadian National Breast Screening Study-2: 13-year results of a randomized trial in women aged 50-59 years. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92: 1490-1499
- Miller AB, To T, Baines CJ, Wall C. The Canadian National Breast Screening Study-1: breast cancer mortality after 11 to 16 years of follow-up: a randomized screening trial of mammography in women age 40 to 49 years. *Ann Intern Med.* 2002; 137: 305-315.
- Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tjuange M, Thomsen J, Anderson G, et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev.* 2001; 81: 1535-1565
- Normanno N, Di Maio M, De Maio E, De Luca A, de Matteis A, Giordano A, Perrone F. Mechanisms of endocrine resistance and novel therapeutic strategies in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer.* 2005; 12 721–747
- Norton L. A Gompertzian Model of Human Breast Cancer Growth. *Cancer Research.* 1988; 48: 7067-7071
- Organización panamericana de salud (O.P.S.). Programa especial de análisis de salud. Iniciativa de datos básicos en salud. Proceso de actualización datos. 2002. [Documento en línea].
- Osborne C, Wilson P, Tripathy D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: Potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist* 2004; 9: 361 – 377.
- Osborne K, Shou J, Massarweh S, Schiff R. Crosstalk between Estrogen Receptor and Growth Factor Receptor Pathways as a Cause for Endocrine Therapy Resistance in Breast Cancer. *Clinical Cancer Research.* 2005; 11: 865s–870s, (Suppl.).

- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74–108.
- Paterson M. C. Dietrich K. D, Danyluk J, Paterson A. H, Lees A. Y, Jamil N, Hanson J, Jenkins H, Krause B. E, McBlain W. A, Shimon D. J, and Fourney R.M. Correlation between c-erbB-2 Amplification and Risk of Recurrent Disease in Node-negative Breast Cancer. *CANCER RESEARCH* 1991, 51, 556-567.
- Pauletti G, Dandekar S, Rong H, Ramos L, Peng H, Seshadri R, Slamon DJ. Assesment of methods for tissue based detection of the Her-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence *in situ* hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2000, 18: 3651-3664.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406: 747- 752
- Press MF, Hung G, Godolphin W, Slamon DJ. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res.* 1994 May 15;54(10):2771- 2777.
- Razandi M, Pedram A, Park S T, Levin E R. Proximal Events in Signaling by Plasma Membrane Estrogen Receptors. 2003; 278(4): 2701–2712.
- Ribba B, Colin T, Schnell S. A multiscale mathematical model of cancer, and its use in analyzing irradiation therapies. *Theoretical Biology and Medical Modelling* 2006, 3:7
- Ridolfi RL, Jamehdor MR, Arber JM. HER-2/neu testing in breast carcinoma: a combined immunohistochemical and fluorescence *in situ* hybridization approach. *Mod Pathol.* 2000; 13: 866-873

- Ring A, Dowsett M. Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocrine-Related Cancer*. 2004; 11 643–658
- Roudabush F L, Pierce K I, Maudsley S, Khan K D, Luttrell L M. Transactivation of the EGF receptor mediates IGF-1 stimulated Shc phosphorylation and ERK1/2 activation in COS-7 cells. *The Journal Biology Chemistry*. 2000.
- Shedin P, Elias A. Multistep tumorigenesis and the microenvironment. *Breast Cancer Res*, 2004; 6: 93-101
- Skipper H, Schabel F Jr, Uoyd, H. Dose-response and tumor cell repopulation rate in chemotherapeutic trials. *Adv. Cancer Chemother*. 1979; 1: 205- 253.
- Skipper H, Schabel F Jr. Quantitative and cytokinetic studies in experimental tumor systems. En: Holland J F, Frei E. III (eds.), *Cancer Medicine*. 1982; 2: 636-648. Philadelphia: Lea and Febiger.
- Song R X, Fan P, Yue W, Chen Y, Santen R J. Role of receptor complexes in the extranuclear actions of estrogen receptor α in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 2006; 13 S3–S13
- Song R X, Zhang Z, Chen Y, Bao Y, Santen R J. Estrogen Signaling via a Linear Pathway Involving Insulin-Like Growth Factor I Receptor, Matrix Metalloproteinases, and Epidermal Growth Factor Receptor to Activate Mitogen-Activated Protein Kinase in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Endocrinology*. 2007; 148(8):4091–4101
- Sotiriou Ch and Pusztai L. Gene-Expression Signatures in Breast Cancer. *N Engl J Med* 2009; 360: 790-800
- Speer J F, Petrosky V E, Retsky M W, Wardwell R H. A Stochastic Numerical Model of Breast Cancer Growth That Simulates Clinical Data. *Cancer Research*. 1984; 44: 4124-4130
- Steeg P, Zhou Q. Cyclins and breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 1998; 52: 17 – 28.

- Suzuki T, Miki Y, Ohuchi N, Sasano H. Intratumoral estrogen production in breast carcinoma: significance of aromatase. *Breast Cancer*. 2008; 15:270–277
- Thomson TA, Hayes MM, Spinelli JJ, Hilland E, Sawrenko C, Phillips D, Dupuis B, Parker RL. HER-2/neu in breast cancer: interobserver variability and performance of immunohistochemistry with 4 antibodies compared with fluorescent *in situ* hybridization. *Mod Pathol*. 2001;14: 1079-1086.
- van de Vijver, M.J. Multistep model of the genetic alterations leading to breast cancer. *Advances in breast pathology*, 1999; 32 (3): 301
- Van der Geer P; Pawson T. The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction. *Trends in Biochemical Sciences*, 1995 Jul, 20 (7): 277-280.
- Van Dijck JA, Verbeek AL, Beex LV, *et al*. Mammographic screening after the age of 65 years: evidence for a reduction in breast cancer mortality. *Int J Cancer*. 1996; 66: 727-731.
- Vermeulen K, Van Bockstaele D R, Berneman Z N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*. 2003, 36: 131–149
- Yang, C., Yu, B., Zhou, D, and Chen, S. Regulation of aromatase promoter activity in human breast tissue by nuclear receptors. *Oncogene*, 21: 2854–2863, 2002.
- Yang, C., Zhou, D., and Chen, S. Modulation of aromatase expression in the breast tissue by ERR α -1 orphan receptor. *Cancer Res.*, 58: 5695–5700, 1998.