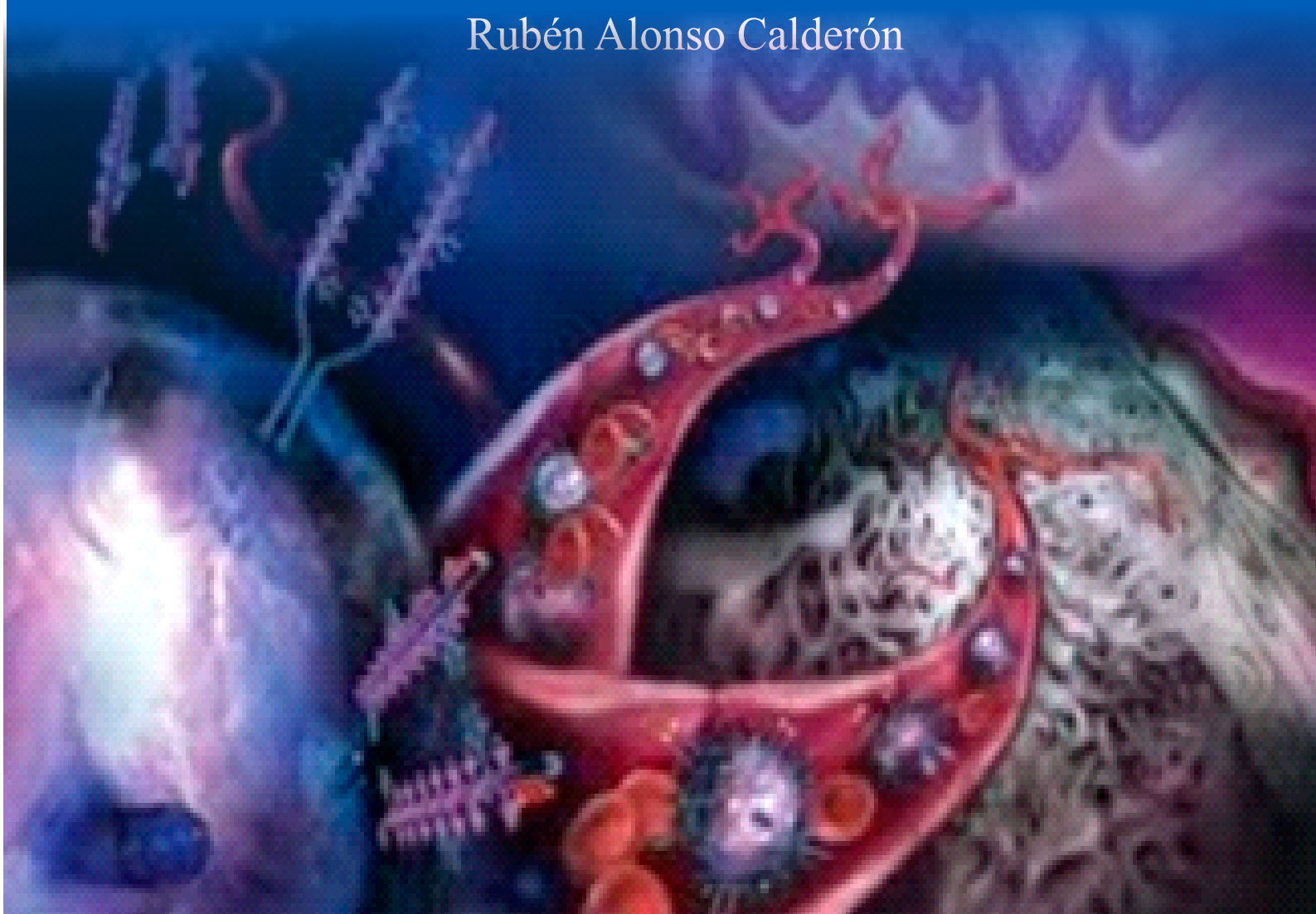


TESIS DOCTORAL

TESIS DOCTORAL

Implicación de HIF-1 α en los mecanismos moleculares
de respuesta a fármacos en el tratamiento
neoadyuvante del cáncer de mama.

Rubén Alonso Calderón



UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE LOS

ALIMENTOS

COMPLEJO HOSPITALARIO DE JAÉN



“IMPLICACIÓN DE HIF-1 α EN LOS MECANISMOS MOLECULARES
DE RESPUESTA A FÁRMACOS EN EL TRATAMIENTO
NEOADYUVANTE DEL CÁNCER DE MAMA”

TESIS DOCTORAL

RUBÉN ALONSO CALDERÓN

2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Rubén Alonso Calderón
D.L.: GR 757-2013
ISBN: 978-84-9028-436-0

Esta memoria de Tesis Doctoral forma parte del proyecto PI-0140/2008
concedido por la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (2008-2012).



D. César Luis Ramírez Tortosa. Jefe de Servicio de Anatomía Patológica, Complejo Hospitalario de Jaén.

D^a. María del Carmen Ramírez Tortosa. Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Universidad de Granada.

D. Pedro Sánchez Rovira. Jefe de Servicio de Oncología Médica, Complejo Hospitalario de Jaén.

CERTIFICAN:

Que los trabajos de investigación que se exponen en la Memoria de Tesis Doctoral: **“Implicación de HIF-1 α en los mecanismos moleculares de respuesta a fármacos en el tratamiento neoadyuvante del cáncer de mama”**, han sido realizados bajo nuestra dirección por el licenciado en Medicina y Cirugía Rubén Alonso Calderón y la encontramos conforme para ser presentada y aspirar al Grado de Doctor por la Universidad de Granada con el Tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendemos el presente en Granada a 24 de Septiembre de dos mil doce.

Dr. D. César Luis Ramírez Tortosa

Dra. D^a. María del Carmen Ramírez Tortosa

Dr. D. Pedro Sánchez Rovira



MEMORIA QUE PRESENTA EL LDO. RUBÉN ALONSO CALDERÓN PARA
ASPIRAR AL GRADO DE DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

ESTA TESIS DOCTORAL HA SIDO REALIZADA BAJO LA DIRECCIÓN DE:

Dr. D. César Luis Ramírez Tortosa

Dra. D^a. María del Carmen Ramírez Tortosa

Dr. D. Pedro Sánchez Rovira

Ldo. D. Rubén Alonso Calderón

Granada, 2012



El doctorando Rubén Alonso Calderón y los directores de la tesis D. César Luis Ramírez Tortosa , D^a. María del Carmen Ramírez Tortosa y D. Pedro Sánchez Rovira, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores al ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Dr. D. César Luis Ramírez Tortosa

Dra. D^a. María del Carmen Ramírez Tortosa

Dr. D. Pedro Sánchez Rovira

Ldo. D. Rubén Alonso Calderón

Granada, 24 de Septiembre, 2012

AGRADECIMIENTOS

Cuando terminé de escribir el último párrafo de la tesis tuve un inevitable sentimiento de egocentrismo que me llevaba a concentrar la mayor parte del mérito en el aporte que había hecho. Sin embargo, unos instantes más tardes, el análisis objetivo de estos últimos cinco años me mostró, de forma inmediata, que la magnitud de ese aporte hubiera sido imposible sin la colaboración de personas e instituciones que han facilitado el camino para que este proyecto fuera posible. Por ello, es para mí un verdadero placer escribir estas líneas para expresar todo mi agradecimiento.

A mis tres directores de tesis: César Ramírez Tortosa, Pedro Sánchez Rovira y M^a Carmen Ramírez Tortosa.

César, necesitaría otra tesis sólo para agradecerte todo lo que has hecho por mí a lo largo de todo este tiempo. Gracias por tus lecciones de anatomía patológica y tu paciencia durante mi aprendizaje. Sabes que uno de los puntos de inflexión de la tesis fue mi traslado a Cáceres, muy contento por volver a mi tierra, pero con cierta incertidumbre respecto al futuro del proyecto. Gracias por haber estado al otro lado del teléfono todos los martes a las 16:30 durante estos tres últimos años (lo voy a echar de menos..) para escucharme, orientarme, implicarte y sobre todo animarme, y no dejar que tirara la toalla. Eres una de las personas con más capacidad de trabajo que conozco; sin duda, un ejemplo a seguir.

Pedro, tú fuiste quien me embarcó en este proyecto, adentrándome en el mundo de la investigación. Muchas gracias por animarme a hacerlo y haber estado ahí siempre que te he necesitado, con la sonrisa y amabilidad que te caracteriza. Tienes la capacidad de hacer posible las cosas que parece que no lo son. Has sido mi jefe, director de tesis, pero sobre todo un gran amigo.

Mayca, muchas gracias por tu apoyo, orientación y rigurosidad en tus aportaciones, especialmente en la recta final del trabajo. Gracias por adaptarte a mis horarios de sprint final, y hacer posible que todos los trámites estuvieran a punto, aun a riesgo de sufrir un infarto, como bien sabes.

Además de los directores de tesis, han sido muchas las personas que han colaborado en la realización de este proyecto; a todas ellas quiero expresarles mi gratitud.

A M^a Dolores Martín, muchas gracias por tu colaboración en los inicios del trabajo. No olvidaré como, después de tu jornada laboral y siendo tus niños pequeños, regresabas a primera hora de la tarde para ayudarnos a preparar los bloques de parafina. Gracias por tus consejos y todos esos momentos de conversación y buena compañía que compartimos. Gracias Loli.

A Anabel Sáez y todo el equipo del Banco de Tumores de Granada por su interés, predisposición y excelente trabajo en la construcción de los tissues mycroarrays.

A Pedro Camacho, muchas gracias por tu amabilidad y profesionalidad en la puesta a punto de los anticuerpos e inmunotinción de las muestras.

A Angel Concha y a Manuel Florentino, muchas gracias por vuestra colaboración en el proceso de inmunotinción.

A M. Carmen Rosa, Sonia Domínguez y Manuela Expósito, muchas gracias por vuestra colaboración en el análisis estadístico del trabajo.

A Laura Vera, muchas gracias por tu implicación en el proyecto, tus valiosos consejos y todo el apoyo que me has ofrecido en estos años. Te deseo lo mejor en tu brillante carrera como científica.

A Pepe Quiles, muchas gracias por tu acogida en los comienzos del proyecto.

A Mónica Fernández y Capilla de la Torre, muchas gracias por vuestra ayuda en la búsqueda de historias clínicas.

Además de la ayuda técnica, durante estos años de trabajo me he dado cuenta de lo importante que es el apoyo emocional en los buenos y no tan buenos momentos. En este sentido son también muchas las personas a las que les estoy profundamente agradecido.

Gracias a Ana Lozano, Margarita Fernández, Miguel Angel Moreno, Nicolás Mohedano, Rosario Dueñas, Alfonso Sánchez, Begoña Medina, Esther García, Ana Jaén y María Lomas. Además de formarme como oncólogo, os tengo que agradecer vuestro ánimo y apoyo en la realización de la tesis. Gracias por escuchar mis agobios en mis descansos de por la tarde, y hacerme sentir como en casa.

A mi residente mayor Ana Laura Ortega, muchas gracias por tu ayuda en todos los aspectos. Y a mis residentes menores, Ricardo Collado (juntos hasta la muerte..) e Irene González.

A mis compañeros de residencia y amigos de Jaén y Granada, Lola, Pedro, Vanesa y Patricia. Muchas gracias por vuestro apoyo, generosidad, amistad y “sacarme de vez en cuando para que me diera el aire”...Os quiero mucho.

Por último, agradecer de todo corazón a mi madre y hermanos el apoyo y el cariño recibido, convirtiéndose en mi fuente de energía para poder llevar a cabo este trabajo.

A todos vosotros, gracias por creer en mí.

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado.
Un esfuerzo total es una victoria completa.”

Mahatma Gandhi

A mi madre.

A todas aquellas personas que luchan cada día
contra la enfermedad del cáncer.

ÍNDICE GENERAL	Página
ABREVIATURAS	23
RESUMEN	29
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	33
INTRODUCCIÓN	37
I. Cáncer de mama	39
I.1. Epidemiología	39
I.2. Factores pronósticos y predictivos	40
I.2.1 Factores pronósticos	40
I.2.1.1. Factores pronósticos convencionales	41
I.2.1.1.1. Afectación ganglionar	41
I.2.1.1.2. Tamaño tumoral	41
I.2.1.1.3. Tipo histológico	41
I.2.1.1.4. Grado histológico	42
I.2.1.1.5. Receptores hormonales	42
I.2.1.1.6. Oncogén Her2	42
I.2.1.1.7. Invasión vascular y linfática	43
I.2.1.2. Factores pronósticos reconocidos sin una completa implantación	43
I.2.1.2.1. Marcadores de proliferación	43
I.2.1.2.2. Angiogénesis	44
I.2.1.2.3. Activadores e inhibidores del plasminógeno	44
I.2.1.3. Factores pronósticos pendientes de validar	45
I.2.1.3.1. Células circulantes de cáncer de mama	45
I.2.1.3.2. Micrometástasis en médula ósea	45
I.2.1.3.3. Susceptibilidad genética	45
I.2.1.3.4. Perfiles genómicos	46
I.2.2. Factores predictivos	47
I.2.2.1. Estado hormonal	47

I.2.2.2. Her2	47
I.3. Estadificación del cáncer de mama	48
I.3.1. Sistema TNM	48
I.3.2. Evolución del sistema TNM	49
I.4. Diagnóstico del cáncer de mama	52
I.4.1 Tipos histológicos	55
I.4.1.1. Carcinoma ductal in situ	55
I.4.1.2. Carcinoma lobulillar in situ	55
I.4.1.3. Carcinoma ductal infiltrante NE	55
I.4.1.4. Carcinoma lobulillar infiltrante	56
I.4.1.5. Carcinoma tubular	56
I.4.1.6. Carcinoma cribiforme	57
I.4.1.7. Carcinoma medular	57
I.4.1.8. Carcinomas productores de moco	57
I.4.1.9. Carcinoma papilar	57
I.4.1.10. Carcinoma metaplásico	57
I.4.1.11. Carcinoma adenoide quístico	58
I.4.1.12. Carcinoma inflamatorio	58
I.5. Tratamiento neoadyuvante del cáncer de mama	59
I.5.1. Introducción	59
I.5.2. Selección del tratamiento según el estado de los receptores hormonales y Her2	60
I.5.3. Quimioterapia	61
I.5.4. Hormonoterapia	65
I.5.5. Quimioterapia + Trastuzumab	66
I.6. Valor pronóstico de la R _{Pc} tras la quimioterapia neoadyuvante	67
II. El proceso de carcinogénesis	68
II.1. Concepto	68

II.2. Vías bioquímicas alteradas en la carcinogénesis	70
II.2.1. Suficiencia en señales de crecimiento	70
II.2.2. Insensibilidad a señales antiproliferativas	71
II.2.3. Apoptosis	71
II.2.4. Potencial replicativo sin límite o inmortalización celular	72
II.2.5. Angiogénesis	73
II.3. Etapas del proceso de carcinogénesis	73
II.3.1. Iniciación	74
II.3.2. Promoción	74
II.3.3. Progresión	74
III. Hipoxia y cáncer	75
III.1. Rutas celulares implicadas en el reconocimiento del ambiente hipóxico y en la respuesta al mismo: HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1)	75
III.1.1. Estructura y función de HIF-1	76
III.1.2. Mecanismos de regulación de HIF-1 α	80
III.1.2.1. Regulación independiente de la concentración intracelular de oxígeno	80
III.1.2.2. Regulación dependiente de la concentración intracelular de oxígeno	85
III.1.2.3. Otras rutas moleculares reguladoras de la transcripción de HIF-1 α : los factores de transcripción STAT.	87
III.1.3. Efectos de la actividad transcripcional de HIF-1 α en el desarrollo tumoral: expresión de VEGF y Survivina	88
III.1.3.1. Expresión de VEGF	88
III.1.3.2. Expresión de Survivina	92
MATERIAL Y MÉTODOS	99
MATERIAL	101
MÉTODOS	102
I. Diseño experimental	102
II. Población de estudio.	104
II.1. Criterios de inclusión.	104

II.2. Criterios de exclusión.	104
III. Consideraciones éticas.	104
IV. Variables clínicas e histopatológicas.	105
IV.1. Variables clínicas.	105
IV.2. Variables histopatológicas.	105
IV.2.1. Variables histopatológicas de la biopsia diagnóstica inicial.	105
IV.2.2. Variables histopatológicas de la pieza quirúrgica.	109
V. Preparación de muestras biológicas.	110
VI. Confección de Tissues Microarrays.	111
VII. Inmunohistoquímica.	116
VII. 1. HIF-1 α	121
VII. 2. Phospho-AKT (pAKT).	122
VII. 3. Phospho-MAPK (pMAPK).	123
VII. 4. VEGF-A.	124
VII. 5. Survivina.	125
VII. 6. pSTAT3.	126
VII. 7. EGFR.	127
VIII. Análisis estadístico.	130
RESULTADOS	131
I. Características clínico-patológicas de las pacientes.	133
II. Relación entre las variables clínico-patológicas conocidas y la respuesta al tratamiento quimioterápico neoadyuvante. Análisis univariante.	136
II.1. Relación entre la edad de las pacientes y respuesta al tratamiento.	136

II.2. Relación entre el tamaño tumoral al diagnóstico y la respuesta al tratamiento.	137
II.3. Relación entre la afectación ganglionar al diagnóstico y la respuesta al tratamiento.	138
II.4. Relación entre el grado histológico y la respuesta al tratamiento.	138
II.5. Relación entre el marcador Ki 67 y la respuesta al tratamiento.	139
II.6. Relación entre los RE y la respuesta al tratamiento.	143
II.7. Relación entre los RP y la respuesta al tratamiento.	146
II.8. Relación entre el estado de Her2 y la respuesta al tratamiento.	149
II.9. Relación entre el fenotipo tumoral y la respuesta al tratamiento.	150
III. Expresión de proteínas en el tejido tumoral antes del tratamiento neoadyuvante.	152
III.1. HIF-1 α .	152
III.1.1 Análisis descriptivo.	152
III.1.2. Relación entre la expresión de HIF-1 α y la respuesta al tratamiento quimioterápico neoadyuvante.	153
III.1.3. Relación entre la expresión de HIF-1 α y las variables clínico-patológicas.	154
III.1.4. Relación entre la expresión de HIF-1 α y el resto de proteínas.	159
III.2. pAKT	161
III.2.1. Análisis descriptivo.	161
III.2.2. Relación entre la expresión de pAKT y respuesta al tratamiento quimioterápico neoadyuvante.	161
III.2.3. Relación entre la expresión de pAKT y las variables clínico-patológicas.	162
III.2.4. Relación entre la expresión de pAKT y el resto de proteínas.	168
III.3. pMAPK	169
III.3.1. Análisis descriptivo.	169
III.3.2. Relación entre la expresión de pMAPK y respuesta al tratamiento quimioterápico neoadyuvante.	170
III.3.3. Relación entre la expresión de pMAPK y las variables clínico-patológicas.	170
III.3.4. Relación entre la expresión de pMAPK y el resto de proteínas.	176

III.4. VEGF-A	177
III.4.1. Análisis descriptivo.	177
III.4.2. Relación entre la expresión de VEGF-A y respuesta al tratamiento quimioterápico neoadyuvante.	178
III.4.3. Relación entre la expresión de VEGF-A y las variables clínico-patológicas.	179
III.4.4. Relación entre la expresión de VEGF-A y el resto de proteínas.	183
III.5. Survivina	185
III.5.1. Análisis descriptivo.	185
III.5.2. Relación entre la expresión de Survivina y respuesta al tratamiento quimioterápico neoadyuvante.	185
III.5.3. Relación entre la expresión de Survivina y las variables clínico-patológicas.	186
III.5.4. Relación entre la expresión de Survivina y el resto de proteínas.	191
III.6. pSTAT3	193
III.6.1. Análisis descriptivo.	193
III.6.2. Relación entre la expresión de pSTAT3 y respuesta al tratamiento quimioterápico neoadyuvante.	193
III.6.3. Relación entre la expresión de pSTAT3 y las variables clínico-patológicas.	194
III.6.4. Relación entre la expresión de pSTAT3 y el resto de proteínas.	199
III.7. EGFR	200
III.7.1. Análisis descriptivo.	200
IV. Factores predictivos de respuesta al tratamiento. Análisis multivariante.	201
DISCUSIÓN	203
CONCLUSIONES	231
ANEXO	235
BIBLIOGRAFÍA	243

ABREVIATURAS

AC: adriamicina o doxorubicina-ciclofosfamida

ACR: American College of Radiology

AD: adriamicina o doxorubicina-docetaxel

ADN: ácido desoxirribonucleico

AJCC: Comité Americano de Cáncer

AKT: v-akt murine thymoma viral oncogene homolog-1 (proteína kinasa B)

Ang-1: angiopoyetina-1

Ang-2: angiopoyetina-2

ARN: ácido ribonucleico

ARNT: aryl hydrocarbon nuclear translocator

ASCO: American Society Clinical Oncology

BAD: bcl-2 antagonist of cell death

BAG: biopsia con aguja gruesa

BAK: bcl-2 antagonist/killer 1

BAX: bcl-2 associated x protein

Bcl-2: b-cell CLL/lymphoma 2

Bcl-xl: BCL-2 -like 1

Bcl-xs: bcl-2 -like 2

bHLH: basic helix-loop-helix

BID: bcl-2 interacting domain

BIG: Breast International Group

BIK/NBK: bcl-2 interacting killer

BIM/BOD: bcl-2 related ovarian death gene

BI-RADS: Breast Imaging and Reporting and Data Base Sytem

BIRC5: baculoviral IAP repeat-containing 5

BMF: bcl-2 modifying factor

BOK/MTD-2: bcl-2 related ovarian killer/matador

BOO/DIVA: bcl-2 homologue ovary or death induces binding to vBcl-2 & Apaf-1

BRCA 1: breast cancer 1.

BRCA 2: breast cancer 2.

BRM: biological response modifier

BSGC: biopsia selectiva del ganglio centinela

cADN: ácido desoxirribonucleico complementario

CA IX: anhidrasa carbónica 9

CBP/p300: coactivador transcripcional, CREB-binding protein/EP300

CDKs: quinasas dependientes del ciclo celular

CK: citoqueratina

c-MET: HNGG MOS Transforming gene

CMF: ciclofosfamida, metotrexate y 5FU

COX-2: ciclooxigenasa 2

CVAP: ciclofosfamida, vincristina, adriamicina y prednisolona

DAB: diaminobencidina tetrahidrocloruro

E2F: E2F transcription factor

EC: epirubicina, ciclofosfamida

ECTO: European Cooperative Trial in operable breast cancer

EGF: epidermal growth factor

EGFR: epidermal growth factor receptor

ELISA: enzyme linked immunosorbent assay

EORTC: European Organization for Research and Treatment of Cancer

EPO: eritropoyetina

ERK: quinasas reguladas por señales extracelulares

ERO: especies reactivas de oxígeno

ET-1: endotelina 1

FAC : 5-Fluorouracilo, doxorubicina, ciclofosfamida

FDA: Food and Drug Administration

FEC: 5-Fluorouracilo, epirrubicina, ciclofosfamida

FISH: fluorescence *in situ* hibridation

FLIPs: FLICE inhibitory protein

GEICAM: grupo español de investigación de cáncer de mama

GEPARDUO: The second German Preoperative Adriamycin Docetaxel

GEPARQUATTRO: The fourth German Preoperative Adriamycin Docetaxel

GEPARTRIO: The third German Preoperative Adriamycin Docetaxel

GLUT1: transportador de glucosa 1

Grb2: growth factor receptor bound protein 2

H₂O₂: peroxide de hidrógeno

HBS: HIF Binding Site

HIF-1: hypoxic inducible factor 1

HIF-1 α : hipoxic inducible factor 1 α

HIF-1 β : hipoxic inducible factor 1 β

Her2: Her2//c-neu o ErbB-2, factor de crecimiento epidérmico

HRE: Hipoxia Response Elements

HRK/DP5: Harakini/Death protein 5

HRP: peroxidasa de rábano

IAP: inhibidores de las proteínas de la apoptosis

IEO: Instituto Europeo de Oncología

IGF: insulin growth factor

IL-1 β : interluquina-1 β

ILE: intervalo libre de enfermedad

JAK: Janus kinase

JBCRG: Japan Breast Cancer Research Group

JNK: c-Jun NH₂ quinasa terminal

KDa: kilodaltons

LMNP: lesiones mamarias no palpables

M&P: Miller & Payne

MAPK: mitogen activated protein kinasa

MDACC: MD Anderson Cancer Center

MINDACT: Microarray In Node negative Disease may Avoid ChemoTherapy

ML-IAP: melanoma inhibitor of apoptosis protein

MMP9: metaloproteinasa 9

mTOR: mammalian target of rapamycin

MVD: densidad vascular (microvessels density)

NAIP: baculoviral IAP repeat containing protein 1

NASBP: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project

NIX: mitochondrial death protein

NOAH: neoadjuvant herceptin

NOS: sintasa de óxido nítrico

NOXA: PHAIPA, phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1

NR-13: antiapoptotic protein NR13

NX: vinorelbina, capecitabina

OR: odds ratio

PAAF: punción aspiración con aguja fina

PAI-1: inhibidor de la actividad del plasminógeno 1

PAI-2: inhibidor de la actividad del plasminógeno 2

pAKT: phospho protein kinase B

PARP-1: poliadenosin difosfato ribose polimerasa 1

PAS: Per-Arnt-Sim

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PDGF: plateled derived growth factor

PDGFR: plateled derived growth factor receptor

pERK $\frac{1}{2}$: phospho extracelular regulated kinases 1/2

PHDs: prolil-hidroxilasas

PI3K: phosphatidyl-inositol 3-kinase

PI3K/AKT: vía phosphatidyl-inositol 3-kinase/protein kinase B

pMAPK: phospho mitogen activated protein kinase

pRb: proteína del retinoblastoma

pSTAT 3: phospho signal transducers and transcription activators

PTEN: phosphatase and tensin homolog

PUMA: p53 upregulated modulator of apoptosis

QN: quimioterapia neoadyuvante

QRPC: quasi-RPc (grados 4 y 5 de Miller & Payne)

RE: receptor de estrógeno

Ref-1/APE: factor redox efector 1/endonucleasaapurínica/apirimidínica

RH: receptor hormonal

ROLL: radioguided occult lesion localization

RP: receptor de progesterona

RPc: respuesta patológica completa

RTKs: receptores tirosina quinasa

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

S: sensibilidad

SBR: Scarff-Bloom-Richardson

SLE: supervivencia libre de enfermedad

SLP: supervivencia libre de progresión

SG: supervivencia global

STATs: Signals Transducers and Activators of Transcription

TAC: docetaxel, doxorubicina, ciclofosfamida

TAD's: dominios de transactivación

TAILORx: assigning individualized options for treatment

TGF- α : transforming growth factor α

TMA: tissue microarray

t-PA: activador tisular del plasminógeno.

UICC: Unión Internacional Contra el Cáncer

uPA: activador del plasminógeno

VEGF: vascular endotelial growth factor

VEGFR: vascular endotelial growth factor receptor

VHL: Von Hippel-Lindau

VPN: valor predictivo negativo

VPP: valor predictivo positivo

VS: versus

XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis protein

RESUMEN

Introducción. El cáncer de mama es el tumor más frecuente entre las mujeres, constituyendo un importante problema de salud pública. Se trata de una enfermedad muy heterogénea en su evolución: existen pacientes cuyo curso evolutivo es muy lento, mientras que en otras mujeres la enfermedad se comporta de forma muy agresiva, presentando tumores con un gran crecimiento, con una rápida extensión metastásica y una supervivencia corta desde el momento del diagnóstico. Aquellas variables biológicas que se relacionan con la respuesta o resistencia a un tratamiento sistémico se denominan factores predictivos. En el cáncer de mama, actualmente, los receptores hormonales y el oncogén Her2, son los factores predictivos de respuesta más reconocidos.

La quimioterapia neoadyuvante (QN) es aquella administrada antes de cualquier tratamiento local, como la cirugía, y actualmente se considera indispensable en aquellos tumores localmente avanzados y los carcinomas inflamatorios de mama. Con la administración de QN se tiene la posibilidad de realizar un tratamiento quirúrgico conservador, además de poderse investigar esquemas terapéuticos más eficaces e individualizados sobre la base de marcadores biológicos y genéticos, al disponer de un modelo *in vivo* de sensibilidad como es la propia enferma. Actualmente el tratamiento de QN considerado estándar está basado en un régimen con antraciclinas y taxanos.

Otro objetivo primordial de la QN es obtener una respuesta patológica completa (RPC) que se define como la ausencia de restos tumorales, tras el profundo estudio de la pieza quirúrgica por parte del anatomopatólogo. Se ha demostrado que la RPC es el factor pronóstico más importante en términos de supervivencia libre de enfermedad (SLE) y supervivencia global (SG), probablemente por la erradicación de la enfermedad micrometastásica. De ahí, que la identificación de marcadores predictivos de respuesta haya sido objeto de estudio desde hace mucho tiempo.

Una de las características del microambiente tumoral es la hipoxia, que tiene como consecuencia la selección de células con fenotipos tumorales más agresivos, con tasas de mutación más alta y mayor potencial metastásico. El factor de transcripción HIF-1 (Factor Inducible por Hipoxia 1) parece ser el complejo molecular clave en la respuesta celular a la hipoxia, habiéndose centrado sobre él la mayor parte de la investigación relativa a la misma. HIF-1 es un heterodímero formado por dos subunidades: HIF-1 β , que se expresa de forma constitutiva, y HIF-1 α , cuya expresión se encuentra fuertemente regulada. La heterodimerización de HIF-1 α con HIF-1 β es necesaria para la estabilización del primero en el núcleo celular. Se considera que en condiciones de hipoxia, HIF-1 podría transcribir entre un 1 % y un 5 % del conjunto de los genes humanos, habiéndose identificado más de 80 genes sustratos directo de HIF-1. Algunos

de estos genes resultan especialmente relevantes para la progresión tumoral; en concreto, aquellos que codifican factores promotores de la invasividad celular y angiogénesis como el VEGF, o genes que permitan a la célula sobrevivir independientemente de la presencia de estímulos que desencadenaría la muerte celular programada, como la survivina.

Han sido varios los trabajos que han estudiado el papel de HIF-1 α como factor pronóstico en el cáncer de mama, habiéndose relacionado su sobreexpresión con una menor SLE y SG. Sin embargo, se sabe muy poco sobre el valor predictivo de respuesta de HIF-1 α en cáncer de mama. Hasta la fecha no hay ningún trabajo publicado que haya demostrado la relación entre la sobreexpresión de HIF-1 α y la tasa de RPc tras un tratamiento de QN basado en antraciclinas y taxanos, lo que convierte a esta molécula en un interesante punto de investigación, dentro del escenario de la neoadyuvancia en el cáncer de mama.

Objetivos. El **objetivo general** de este estudio es identificar el valor predictivo de respuesta de HIF-1 α , además de las rutas moleculares implicadas, en pacientes diagnosticadas de cáncer de mama y que habían recibido un régimen de QN basado en antraciclinas y taxanos.

Material y Métodos. El diseño experimental de este estudio comprende un total de 95 pacientes que recibieron un tratamiento neoadyuvante basado en antraciclinas y taxanos. De cada paciente se recopilaron las muestras histológicas, tanto de la biopsia diagnóstica, como de la pieza quirúrgica tras el tratamiento primario, ambas conservadas en bloques parafinados. En cada bloque se señalaron puntos de tejido tumoral y puntos de tejido sano, para posteriormente llevarse a cabo la elaboración de matrices tisulares “tissues microarrays” (TMAs), cuya técnica hace posible agrupar en una sola laminilla más de 100 tumores. Para el estudio inmunohistoquímico se utilizaron anticuerpos de las proteínas HIF-1 α , Survivina, VEGF-A, pAKT, pMAPK, EGFR y pSTAT3. De forma paralela se recogieron los datos de las diferentes variables clínicas de las pacientes, de la respuesta al tratamiento quimioterápico, así como de todas las variables morfológicas e inmunohistoquímicas, que de rutina se incorporan al diagnóstico anatomopatológico. El cruce estadístico de los resultados dieron respuesta a las diferentes premisas hipotéticas que se establecieron al inicio del estudio y a la resolución de los objetivos del mismo.

Resultados y Discusión. La negatividad de los receptores hormonales, los fenotipos basales, los tumores más indiferenciados y con mayor índice de proliferación (Ki 67), se

relacionaron con mayores tasas de RPc. Estos resultados coinciden con los datos descritos en la literatura.

La sobreexpresión de HIF-1 α se asoció de forma significativa con una mejor respuesta al tratamiento y mayores tasas de RPc, siendo el primer estudio en demostrar esta relación, en pacientes tratadas con un régimen de quimioterapia basado en antraciclinas y taxanos. Además, la sobreexpresión de HIF-1 α también se asoció a otras variables clásicas cuyo valor predictivo está mucho más establecido, como la negatividad de los receptores hormonales, valores altos de Ki 67 y tumores más indiferenciados.

La sobreexpresión de VEGF-A se relacionó con la ruta molecular RAS/RAF/MAPK, con tumores más indiferenciados, y además demostró ser factor predictivo de buena respuesta y de RPc al tratamiento quimioterápico neoadyuvante.

La sobreexpresión de Survivina se asoció a la ruta molecular PI3K/AKT y con una mayor resistencia al tratamiento citostático. También se relacionó con la positividad de los RE y con la sobreexpresión de STAT3; ésta, a su vez, con el fenotipo luminal A y con una mayor resistencia al tratamiento quimioterápico neoadyuvante.

Conclusión general. La sobreexpresión de HIF-1 α es factor predictivo de buena respuesta y de RPc, en aquellas pacientes que hayan recibido un régimen de quimioterapia neoadyuvante, basado en antraciclinas y taxanos. Además, HIF-1 α se relaciona con otras variables asociadas a un microambiente tumoral más agresivo e hipóxico, como la negatividad de los receptores hormonales, menor diferenciación tumoral, mayor índice proliferativo y el fenotipo basal, por lo que consideramos que la estabilización de HIF-1 α está directamente relacionado con las condiciones tisulares de oxígeno.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El cáncer de mama es el tumor más frecuente entre las mujeres, constituyendo un importante problema de salud pública. Se trata de una enfermedad muy heterogénea en su evolución: existen pacientes cuyo curso evolutivo es muy lento, mientras que en otras mujeres la enfermedad se comporta de forma muy agresiva, presentando tumores con un gran crecimiento, con una rápida extensión metastásica y una supervivencia corta desde el momento del diagnóstico.

La quimioterapia neoadyuvante (QN) es aquella administrada antes de cualquier tratamiento local, como la cirugía, y actualmente se considera indispensable en aquellos tumores localmente avanzados y los carcinomas inflamatorios de mama. Con la administración de QN se tiene la posibilidad de realizar un tratamiento conservador en un tumor cuya primera indicación quirúrgica sería una mastectomía (Kuerer y cols., 2001; Kaufmann y cols., 2007). Por otro lado, con el tratamiento neoadyuvante, se pueden investigar esquemas terapéuticos más eficaces e individualizados sobre la base de marcadores biológicos y genéticos, al disponer de un modelo *in vivo* de sensibilidad como es la propia enferma. Actualmente el tratamiento de QN considerado estándar está basado en un régimen con antraciclinas y taxanos (Bear y cols., 2003).

Otra meta primordial de la QN es obtener una respuesta patológica completa (RPC) que se define como la ausencia de restos tumorales, tras el profundo estudio de la pieza quirúrgica por parte del anatomopatólogo (Guarneri y cols., 2006). Se ha demostrado que la RPC es el factor pronóstico más importante en términos de supervivencia libre de enfermedad (SLE) y supervivencia global (SG), probablemente por la erradicación de la enfermedad micrometastásica (Jones y Smith, 2006). Actualmente, con el uso de las combinaciones de antraciclinas y taxanos las tasas de RPC oscila entre el 16-18 % (Kaufmann y cols., 2005) e incluso se sabe que hasta un 20 % de las pacientes no se benefician de recibir QN, siendo susceptibles de toxicidades farmacológicas, quedando expuestas a la progresión de enfermedad durante los meses que dura el tratamiento (Tewari y cols., 2008).

La cuestión es si hay alguna forma de predecir con exactitud la posibilidad de responder bien al tratamiento y sobre todo, la probabilidad de alcanzar una RPC tras la QN. La identificación de marcadores predictivos de respuesta han sido objeto de estudio desde hace mucho tiempo, siendo los receptores hormonales (RH) y el estatus del Her2 los más reconocidos (Darb-Esfahani y cols., 2009; Liedtke y cols., 2009).

Una de las características del microambiente tumoral es la hipoxia (Kimbrow y Simons, 2006), que tiene como consecuencia la selección de células con fenotipos tumorales más agresivos, con tasas de mutación más alta y mayor potencial metastásico (Hockel y Vaupel; Helczynska y cols., 2003; Dales y cols., 2005). El factor de transcripción HIF-1 (Factor Inducible por Hipoxia 1) parece ser el complejo molecular clave en la respuesta celular a la hipoxia, habiéndose centrado sobre él la mayor parte de

la investigación relativa a la misma (Semenza, 2002). HIF-1 es un heterodímero formado por dos subunidades: HIF-1 β , que se expresa de forma constitutiva, y HIF-1 α , cuya expresión se encuentra fuertemente regulada (Semenza, 2003).

Han sido varios los trabajos que han estudiado el papel de HIF-1 α como factor pronóstico en el cáncer de mama, habiéndose relacionado su sobreexpresión con una menor SLE y SG (Bos y cols., 2003; Chen y cols., 2007; Tratour y cols., 2007). Sin embargo, se sabe muy poco sobre el valor predictivo de respuesta de HIF-1 α en cáncer de mama. Hasta la fecha no hay ningún trabajo publicado que haya demostrado la relación entre la sobreexpresión de HIF-1 α y la tasa de RPc tras un tratamiento de QN basado en antraciclinas y taxanos.

Por todo ello, el **objetivo principal** de este estudio es identificar el valor predictivo de respuesta de HIF-1 α en pacientes diagnosticadas de cáncer de mama y que hayan recibido un régimen de QN estándar con antraciclinas y taxanos. Para llevar a cabo este objetivo se han establecido los siguientes **objetivos secundarios**:

- ✓ Estudiar las rutas de señalización intracelular implicadas en la regulación de HIF-1 α .
- ✓ Estudiar la sobreexpresión de genes relacionados con la actividad transcripcional de HIF-1.
- ✓ Estudiar la relación entre la sobreexpresión de HIF-1 α y otras variables clínico-patológicas cuyo valor pronóstico y predictivo está mucho más establecido.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

I. Cáncer de mama

I.1. Epidemiología

El cáncer de mama es el tumor más frecuente entre las mujeres, con aproximadamente 1.151.000 nuevos casos al año (22,7 % del total de la población femenina), por lo que constituye un importante problema de salud pública. Su incidencia aumenta en los países con mayor nivel económico. Más de la mitad de los casos se diagnostican en los países desarrollados, 370.000 casos al año en Europa (31,3 %) y 230.000 en Norteamérica (20 %) [Ferlay y col., 2007].

En España se diagnostican cada año unos 16.000 casos nuevos y mueren por esta causa 6.000 mujeres (López-Abente y cols., 2005). La mayoría de los casos se diagnostican entre los 45 y 65 años. Su incidencia es una de las más bajas de Europa aunque el número de casos nuevos aumenta lentamente tanto en nuestro país como en el resto del mundo, probablemente debido al envejecimiento de la población y a un diagnóstico cada vez más precoz.

La mortalidad por cáncer de mama ha tenido una evolución llamativa: en la mayor parte de los países desarrollados sufrió un importante aumento desde los años 50 hasta la década de los 80 (Botha y cols., 2003). Sin embargo, desde los años 90 esta tendencia se invierte debido al éxito de los nuevos tratamientos y al efecto de los programas de cribado sobre la mortalidad.

Los principales factores de riesgo conocidos están relacionados con el carácter hormonal de este tumor. Los más importantes son la edad, la menarquia precoz, la menopausia tardía y la edad avanzada al primer parto (Dumitrescu y Cotarla, 2005; Colditz y cols., 2006). Otros factores de riesgo importantes incluyen la existencia de lesiones previas preneoplásicas tipo hiperplasia, sobre todo si se asocian a atipia nuclear, y la presencia de un patrón mamográfico denso en la mamografía (Boyd y cols., 2005). Entre las exposiciones que modifican el riesgo relacionadas con el estilo de vida destacan la obesidad, el sedentarismo y el consumo de alcohol (Singletary y Gapstur, 2001; World Cancer Research Fund, 2007). Sin embargo, a pesar del gran número de estudios epidemiológicos disponibles, los factores de riesgo conocidos no llegan a explicar más de un 50% de los casos observados de cáncer de mama.

El componente genético es importante, no sólo en las mujeres portadoras de mutaciones de alta penetrancia (BRCA1, BRCA2) (Chen y Parmigiani, 2007), sino también en el cáncer de mama esporádico, que probablemente sea el resultado de un efecto sinérgico de los factores hormonales, el estilo de vida y las exposiciones ambientales con el sustrato genético de la mujer. Sin embargo, el conocimiento sobre las variantes que determinan la susceptibilidad individual es, por el momento, insuficiente y su investigación plantea importantes retos metodológicos y logísticos.

I.2. Factores pronósticos y predictivos

El cáncer de mama es heterogéneo en su evolución. Existen pacientes cuyo curso evolutivo de la enfermedad es muy lento y por ende su expectativa de vida es equiparable a la de la población normal, mientras que en otras mujeres la enfermedad se comporta de forma muy agresiva, presentando tumores con un gran crecimiento, con una rápida extensión metastásica y una supervivencia corta desde el momento del diagnóstico.

Las variables que determinan la historia natural de la enfermedad, de forma independiente a la administración de un tratamiento, y que reflejan la mayor o menor agresividad de una neoplasia se denominan factores pronósticos. Algunos de ellos son la presencia o ausencia de afectación ganglionar, el tamaño del tumor, el tipo histológico, el grado de diferenciación histológico y la capacidad proliferativa celular. Algunas características demográficas de las pacientes, como son la edad en el momento del diagnóstico y el estado de la función ovárica, también pueden influir en el curso evolutivo de la enfermedad pero no deben ser consideradas como variables pronósticas.

De forma paralela, en el momento actual disponemos de un conjunto de variables biológicas que se han asociado con la respuesta o resistencia a un tratamiento sistémico. Estas variables se han agrupado bajo la denominación de factores predictivos de respuesta. Entre ellos destaca la expresión de los receptores hormonales y la existencia de la amplificación del oncogén HER-2; en ambos casos su presencia se asocia con un efecto terapéutico de la hormonoterapia en el primer caso y del trastuzumab en el segundo.

Algunos de estos factores tienen un doble papel pronóstico y predictivo, como sucede con HER-2, cuya amplificación se ha asociado con un peor pronóstico, una resistencia al tamoxifeno y una mayor sensibilidad a dosis altas de antraciclinas, y a la vez predice la respuesta a trastuzumab, en especial cuando este fármaco se combina con citostáticos (Chang y Hilsenbeck, 2004).

I.2.1 Factores pronósticos

Todo factor pronóstico debe jugar un papel biológico importante en el curso evolutivo de la neoplasia, debe estar validado, debe ser fácil de valorar y de reproducir por diferentes investigadores.

Entre los factores pronósticos debemos diferenciar a aquellos denominados convencionales de aquellos que aún no disponen de una implantación completa y de los que están pendiente de aceptación. Los primeros ya están validados de forma prospectivas por diferentes grupos y su presencia permite efectuar una estimación del riesgo de recidiva y mortalidad. El resto de variables se encuentran en diferentes etapas de validación y estudio.

I.2.1.1. Factores pronósticos convencionales

I.2.1.1.1. Afectación ganglionar

La ausencia o presencia de metástasis ganglionar axilar es el factor pronóstico independiente más importante en el cáncer de mama, existiendo una clara correlación con las tasas de supervivencia (Rosai, 2004). De forma aproximada, el intervalo libre de enfermedad (ILE) a los 5 años para las mujeres con tumores sin afectación ganglionar axilar es del 80 %. Este dato implica que el 20 % de mujeres con tumores con un hipotético bajo riesgo de recurrencia presentan un recaída de su neoplasia a lo largo de este tiempo.

Hasta hace algunos años se preconizaba la realización de un vaciamiento de la axila con la exéresis de un mínimo de 15 ganglios. No obstante, este tipo de procedimientos conlleva un alto riesgo de inducir una morbilidad innecesaria en aquellas enfermas que no presentan afectación ganglionar axilar. Desde hace aproximadamente 10 años, la progresiva implantación de la disección del ganglio centinela ha permitido ahorrar un vaciamiento ganglionar axilar en aquellos casos en los que el examen pormenorizado del ganglio centinela no demuestra la presencia de metástasis en el mismo (Guilliano y cols., 1994; Fraile y cols., 2000; Lyman y cols., 2005).

I.2.1.1.2. Tamaño tumoral

Después del estado ganglionar, el diámetro del tumor primario se considera el factor pronóstico más importante, con muy buena correlación con la incidencia de metástasis ganglionares y tasa de supervivencia (Seidman y cols., 1995).

Diferentes instituciones han observado cómo lesiones con un tamaño inferior a 1 cm tienen un riesgo de recurrencia a los 20 años de un 10-12 % (Fisher y cols., 2001), cuando estas enfermas no reciben ningún tratamiento complementario tras la cirugía. Lesiones con un tamaño inferior a 2 cm tienen un riesgo de recurrencia del 25 % a los 30 años. Este riesgo se incrementa al 35 % en los tumores con un tamaño comprendido entre 2 y 2.9 cm; es del 45 % para lesiones entre 3 y 3.9 cm y del 50 % en los tumores entre 4 y 4.9 cm.

La estimación del tamaño tumoral es un parámetro de suma importancia en el cáncer de mama porque justifica la indicación de un tratamiento complementario en neoplasias mayores de 1 cm. Para lesiones con un tamaño inferior a 1 cm existen otras variables, descritas a continuación, que justifican dicha terapia.

I.2.1.1.3. Tipo histológico

Aunque el grupo más importante de carcinomas mamarios lo constituye el carcinoma ductal infiltrante (80-90%), existen subgrupos reconocidos con pronóstico particular. Dentro de los de mejor pronóstico están el carcinoma cribiforme invasivo, mucinoso, adenoide quístico y papilar puro. Existe otro subtipo histológico, el

carcinoma medular, que posee un pronóstico mejor que el carcinoma ductal, pero no alcanza el de los otros. Dentro del grupo de peor pronóstico destaca el carcinoma inflamatorio. El lobulillar infiltrante presenta peor pronóstico que el ductal, aunque mejor que el inflamatorio (Mersin y cols., 2003).

I.2.1.1.4. Grado histológico

La determinación del grado histológico es una herramienta útil que ha demostrado buena correlación con el pronóstico clínico, siendo el grado 3 el que presenta un peor pronóstico (Hendon y cols., 1991). El sistema de gradación más utilizado es el de Scarff-Bloom-Richardson (SBR), que combina criterios arquitecturales con citológicos. Cada uno de los criterios debe puntuarse de 1 a 3, siendo el resultado definitivo la suma de los tres valores (entre 3 y 9). El grado definitivo será I (bien diferenciado) si puntúa 3-5, II (moderadamente diferenciado) si suma 6-7 ó III (pobrementemente diferenciado) si alcanza 8-9 puntos. Esta escala ha sido aceptada por diferentes grupos y reconocida como variable pronóstica independiente.

I.2.1.1.5. Receptores hormonales (RH)

La expresión de receptores de estrógenos (RE) y receptores de progesterona (RP) se ha asociado con una menor agresividad de los tumores y una mayor probabilidad de respuesta a la terapia hormonal. El grado de sensibilidad a la hormonoterapia ha sido asumida como un rasgo pronóstico diferencial, según el cual se efectúan las recomendaciones del tratamiento adyuvante (Hilsenbeck y cols., 1998). La ausencia de expresión de RP se ha asociado con una función defectuosa del RE. Por otra parte, la ausencia de expresión de los receptores hormonales se ha asociado con un mayor riesgo de diseminación a distancia en el grupo de enfermas sin afectación ganglionar axilar (Page, 1991).

I.2.1.1.6. Oncogén Her2

El protooncogén humano ERB2 o Her2 codifica la síntesis de un receptor transmembrana que tiene actividad tirosinquinasa y estimula la proliferación celular de las células que lo expresan. En el cáncer de mama se ha observado una amplificación de dicho gen entre el 15 y 30 % de los casos, y se ha asociado con un peor pronóstico en las pacientes con un tumor de mama con afectación ganglionar axilar (Ross y cols., 2003).

Tras la obtención del anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína del c-erbB2, la amplificación de este gen ha sido también considerada como factor predictivo de respuesta, tal y como se describe más adelante.

I.2.1.1.7. Invasión vascular y linfática

La presencia de signos de permeación vascular o linfática de células tumorales en el seno de los pequeños vasos linfáticos o sanguíneos que forman parte de un tumor o lo circundan, ha sido relacionada con un peor pronóstico en las mujeres con un tumor sin afectación ganglionar axilar (Wenger y cols., 1993).

I.2.1.2. Factores pronósticos reconocidos sin una completa implantación

I.2.1.2.1. Marcadores de proliferación

La capacidad de las células para dividirse es la que determina su potencial de crecimiento y diseminación de un tumor. La actividad proliferativa puede analizarse mediante diferentes procedimientos, entre los que destaca:

a) Índice mitótico

Este es el método más tradicional que consiste en el contaje de figuras de mitosis en 10 campos de gran aumento. Pocos estudios han validado su utilidad en la predicción de un mayor riesgo de recurrencia o de mortalidad.

b) Índice de captación de timidina

Este método consiste en contar el número de núcleos que captan timidina tritiada tras un breve periodo de incubación con la misma. De este modo es posible estimar el número de células que sintetizan ADN y las células que se encuentran en fase S y G₂M. Diferentes grupos han observado que los tumores que sin afectación ganglionar axilar y una capacidad replicativa baja tienen un mejor pronóstico, pero no está aceptada su utilización de forma universal.

c) Determinación de la fase S

Mediante la citometría de flujo es posible evaluar la proporción de células de un tumor que se encuentra en fase de síntesis de ADN; expresado de otro modo, que tienen un mayor contenido de ADN, superior al que se puede observar en la fase G₁ del ciclo celular y que es menor del doble que aparece en la etapa G₂/M. Diferentes grupos de investigadores han puesto de manifiesto que los tumores con una fase S elevada tienen un peor pronóstico, tanto en el grupo de enfermas con afectación ganglionar como sin ella.

Sin embargo, la utilización de la citometría de flujo como variable pronóstica tiene grandes limitaciones por tener una falta de estandarización, la necesidad de disponer de tejido fresco o congelado y la posible contaminación por células del estroma que dificultan la interpretación de los resultados. Por esta razón no es un instrumento que se utilice de forma generalizada.

d) Estudio de Ki 67

Otra posibilidad para conocer la capacidad proliferativa de un tumor es utilizando un anticuerpo monoclonal, el MIB-1, o bien el anticuerpo policlonal Ki 67 que se unen al antígeno que se expresa en las células que se hallan en la fase G₁ tardía, S, M y G₂. La expresión de Ki-67 ha sido relacionada con el pronóstico de las pacientes, de tal forma que un valor alto del mismo se asocia con un peor

pronóstico. Su presencia se asocia con otras variables de mal pronóstico, como el alto grado histológico, la afectación ganglionar o la ausencia de receptores hormonales (Gasparini y cols., 1989).

Existen otros marcadores, como el gen p53 que codifica la síntesis de una proteína implicada en el control del ciclo celular, la apoptosis y el mantenimiento de la estabilidad génica. La mutación de este gen es la alteración génica más común y descrita en mayor número de tumores, incluyendo el cáncer de mama (descrita en cerca de un tercio de ellos). Sin embargo, en las últimas recomendaciones de ASCO (American Society Clinical Oncology) no se contempla la determinación de p53 como marcador para el manejo de las pacientes con cáncer de mama.

I.2.1.2.2. Angiogénesis

En el proceso de desarrollo de un tumor de mama se induce la formación de nuevos vasos en el estroma circundante a las células tumorales que tiene la misión de garantizar el aporte energético necesario para mantener el crecimiento celular (Sauer G y cols., 2003). En las regiones de máximo crecimiento localizadas en los márgenes del tumor es donde se produce una mayor transformación de células endoteliales y de síntesis de moléculas de adhesión. Se ha sugerido que el incremento de densidad vascular (MVD) es un factor de peor pronóstico en los tumores de mama (Bosari S y cols., 1992); sin embargo, hasta el momento, la Sociedad Americana de Patología considera que la densidad vascular es una variable pronóstica pendiente de ser validada. El proceso de angiogénesis está mediado por diferentes polipéptidos entre los que destaca la familia del factor del endotelio vascular (VEGF), que se asocia con un incremento de la densidad vascular y un peor pronóstico (Fox y Harris, 2004).

I.2.1.2.3. Activadores e inhibidores del plasminógeno

El activador del plasminógeno (uPA) y el activador tisular del plasminógeno (t-PA) son miembros de una familia de proteínas con actividad serín-proteasa. Cuando son activadas son capaces de degradar varios componentes de la matriz extracelular y facilitar el crecimiento y la migración celular. Existen unas moléculas que actúan como inhibidores de este sistema, PAI-1 y PAI-2, los cuales son miembros de una familia de inhibidores de serín-proteasas. PAI-1 es el inhibidor inicial de la activación del plasminógeno y del activador tisular del plasminógeno.

Diferentes estudios retrospectivos que utilizaron técnicas de ELISA para detectar el complejo uPA-PAI-1 asociaron su presencia con un mayor riesgo de recurrencia y una mayor mortalidad (Look y cols., 2002). El papel de estas moléculas en el pronóstico del cáncer de mama está bien establecido gracias a la validación prospectiva que se ha realizado en diferentes estudios (Lamy y cols., 2010; Annecke y cols., 2008); no obstante, aún no se aplica de forma universal debido a algunas dificultades técnicas como es la utilización de un ensayo de ELISA estandarizado.

I.2.1.3. Factores pronósticos pendientes de validar

I.2.1.3.1. Células circulantes de cáncer de mama

La capacidad metastásica en el cáncer de mama se alcanza cuando las células tumorales adquieren la propiedad de invadir el estroma, entrar en el torrente circulatorio, llegar a ser retenidas en la red capilar de un órgano distante, invadir el tejido del huésped y proliferar en el mismo. Los nidos de células tumorales al crecer necesitan recibir aporte sanguíneo para poder garantizar su crecimiento. Las lesiones con un tamaño inferior a 2 mm ya disponen de un aporte sanguíneo que se origina mediante el proceso de angiogénesis. Ello explica el fenómeno de la aparición tardía de las metástasis clínicamente detectables.

Gracias al proceso de migración en el torrente circulatorio es posible detectar células tumorales circulantes del tumor mediante técnicas basadas en la PCR. Existen pocos estudios que hayan analizado la presencia de células tumorales circulantes y su posible relación con el pronóstico (Weigelt y cols., 2005), lo que hace necesario continuar esperando los resultados de nuevos análisis para poder confirmar o descartar su validez como variable pronóstica.

I.2.1.3.2. Micrometástasis en médula ósea

Al contrario que en el apartado anterior, existe información abundante sobre la presencia de células epiteliales en la médula ósea y su detección es relativamente sencilla mediante la utilización de técnicas de inmunohistoquímica. Diferentes grupos han mostrado una correlación significativa entre la existencia de micrometástasis en la médula ósea y un ILE y de supervivencia más cortos (Wiedswang y cols., 2003). No obstante, existen resultados discordantes en otros estudios en los que no se ha podido evidenciar el papel de las micrometástasis en médula ósea como variable pronóstica independiente (Ismael y cols., 2004).

I.2.1.3.3. Susceptibilidad genética

De forma global, la susceptibilidad genética heredada supone alrededor del 5-10 % de casos de cáncer de mama. Los genes implicados en mayor número de casos son los denominados BRCA1 (responsable del 20-40 % de casos hereditarios) y BRCA2 (10-30 %). La implicación pronóstica de este grupo de tumores se basa en que los tumores con mutación de BRCA1 suelen ser pobremente diferenciados, RE/RP/Her2 negativos, con fenotipo basal, EGFR positivos, con escaso componente de carcinoma *in situ*, e hipersensibles a esquemas de tratamiento basados en platino e inhibidores de PARP-1 (de Soto y Deng, 2006).

I.2.1.3.4. Perfiles genómicos

El hecho de que las pacientes con características clinicopatológicas similares tengan evoluciones completamente distintas, sugiere que deben existir características moleculares subyacentes que determinan su comportamiento.

Los primeros en clasificar los carcinomas en función de sus perfiles genéticos y su semejanza con tejidos normales fueron Perou y Sorlie en el año 2000. Según sus análisis se podrían definir cinco grupos: Luminal A (RE+/RP+, Her2 - y perfil genético similar al de las células luminales normales), Luminal B (RE+ , RP +/-, y Her2 +), Basal (RE-/RP-, Her2-, con perfil genético de célula basal/mioepitelial; CK 5/6 o CK 14+, p63+ y EGFR+), HER2 (sobrexpresión y amplificación de Her2, con RE y RP-) y todo negativo (RE-/RP-/Her2- CK 5/6-, CK 14-, p63-). Los resultados posteriores demostraron que la supervivencia global y libre de enfermedad se correlacionaba perfectamente con esta categorización, siendo el pronóstico de mejor a peor en este orden de exposición (Sorlie y cols., 2001; Sorlie y cols., 2003; Brenton y cols., 2005; Calza y cols., 2006; Rakha y cols., 2007; Irvin y Carey, 2008).

El reciente desarrollo de nuevas tecnologías y, en particular, el uso de microarrays de ácido desoxirribonucleico complementario (cADN) permiten el análisis simultáneo de miles de genes y el establecimiento de una clasificación más refinada del cáncer de mama basada en la expresión génica. Existen tres métodos en fase de validación que han seguido camino diferentes:

1.- El grupo de Rotterdam ha desarrollado mediante tecnología de microarrays (Affymetrix) una firma de 76 genes seleccionados entre miles estudiados (Foekens y cols., 2006).

2.- El Netherlands Cancer Institute desarrolló una firma pronóstica de 70 genes con los cuales era capaz de discernir el grupo de pronóstico favorable del desfavorable con gran precisión (van't Veer y cols., 2002). Esta herramienta se ha visto validada en estudios de seguimiento a 10 años, pudiendo ser confirmada en un futuro en función de los resultados que ofrezca el gran ensayo clínico prospectivo diseñado al efecto por la EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer) y el BIG (Breast International Group), el estudio "MINDACT" (Microarray In Node negative Disease may Avoid ChemoTherapy). Sin tener aún resultados definitivos, la FDA (Food and Drug Administration) ha autorizado la comercialización de esta prueba (MammaPrint^R) en EE.UU. el pasado febrero de 2007, siendo por tanto, el primer "mamochip" que consigue esta valiosa autorización.

3.- La tercera herramienta existente es el "Oncotype DX", basada en métodos de RT-PCR para cuantificar la expresión de genes seleccionados sobre tejido fijado en formol/parafina. Se analizaron 250 genes potenciales candidatos a la inclusión sobre un grupo de carcinomas recurrentes. De todos ellos se seleccionaron 16 genes relacionados con cáncer y 5 de control, con los cuales se compuso un algoritmo denominado "recurrence score", cuyo rango podía ir de 0 a 100. Este valor es la estimación del riesgo de recidiva en los 10 años siguientes al diagnóstico. Se ha diseñado un ensayo aleatorizado prospectivo para pacientes ganglios negativos, RE positivos (ensayo PACCT), que ofrecerá los resultados definitivos (Harris y cols., 2007).

A pesar de los resultados prometedores de estas nuevas herramientas, los paneles de expertos siguen sin aceptarlas para definir categorías de riesgo; tanto los microarrays de cADN (MammaPrint) como los multi-gene assay (Oncotype DX) requieren aún validaciones prospectivas para su implantación como herramienta rutinaria. Por otro lado, aún desconocemos la función de muchos de los genes incluidos en los modelos, lo cual requieren también ulteriores estudios. Hoy en día es una cuestión de máximo interés definir cuándo estarán estos test preparados para el salto a la clínica y cuál será el papel concreto que desempeñarán en la práctica cada uno de ellos.

I.2.2. Factores predictivos

Hasta el momento actual existen dos variables reconocidas como factores predictivos de respuesta al tratamiento, a saber: los receptores hormonales y la amplificación del gen Her2.

I.2.2.1. Estado hormonal

Los RE y RP han sido reconocidos como la variable más importante para identificar si un tumor es capaz de responder al tratamiento endocrino. Desde hace mucho tiempo se conoce que los tumores sin expresión de receptores no deben ser tratados con hormonoterapia.

A pesar de que la mayor parte de tumores con receptores hormonales positivos responden a la hormonoterapia, existe una fracción de enfermas que no responde y otras que a pesar de presentar una respuesta inicial desarrollan una resistencia. Los mecanismos de aparición de esta resistencia no son del todo conocidos, pero se cree que en ellos intervienen diferentes proteínas que participan en el proceso de transducción de señales (Anderson, 2002; Song y Santen, 2006).

En aquellas pacientes que reciben tratamiento quimioterápico neoadyuvante, hay suficiente evidencia para decir que los tumores que no expresan receptores hormonales, responden mejor al tratamiento citostático y tienen una mayor probabilidad de alcanzar un respuesta patológica completa (RPc) [Pohl y cols., 2003; Colleoni y cols., 2004; Ring y cols., 2004].

I.2.2.2. Her2

El gen Her2 forma parte de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y se encuentra amplificado en el 18-20% de los carcinomas de mama. Se encarga de la síntesis de una proteína con actividad tirosinquinasa que se sobreexpresa en este grupo de tumores, habiéndose relacionado con la regulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Slamon y cols., 1987; Hynes y cols., 1994). Se ha demostrado su valor tanto pronóstico (mayores tasas de recurrencia y mortalidad) como predictivo (de respuesta desfavorable a los tratamientos endocrinos (Carlomagno y cols., 1996; Yamauchi y cols., 1997) en general y algunos quimioterápicos en particular, salvo a antraciclinas), aunque los mecanismos de su

potencial metastásico son aún motivo de estudio (Hicks y cols., 2008). Actualmente disponemos de guías de consenso para la determinación de Her2, bien mediante técnicas de inmunohistoquímicas que detectan la expresión proteica o mediante FISH midiendo la amplificación génica. Su principal valor práctico es la demostración de la efectividad de los tratamientos anti-Her2 tanto en cáncer metastático, como adyuvancia y neoadyuvancia (Pérez, 2007).

I.3. Estadificación del cáncer de mama

La agrupación de los tumores malignos en función de su comportamiento para asistir a la toma de decisiones terapéuticas es el sistema TNM, que fue ideado hace ahora más de 50 años por Pierre Denoix en el Institute Gustav Roussy, en Francia, y su aplicación al cáncer fue publicada 24 años después, en 1968 (Johnstone y cols., 2000). La clasificación se revisa cada cierto tiempo para introducir las mejoras en tratamiento y diagnóstico, pero manteniendo el sistema estable.

I.3.1. Sistema TNM

La clasificación TNM se utiliza para determinar la extensión de la enfermedad agrupando los pacientes en estadios usando tres variables:

- T = tamaño tumoral
- N = afectación de los ganglios linfáticos.
- M = metástasis a distancia

Para ello se pueden utilizar los datos suministrados por la exploración clínica (cTNM) o por la anatomía patológica (pTNM).

T = Tamaño tumoral

Se define como el mayor diámetro del tumor o del componente invasivo. El potencial metastático del tumor aumenta de forma lineal en relación con el incremento de su tamaño. Es decir, suele existir correlación entre el tamaño tumoral y la afectación de los ganglios axilares; sin embargo, hay tumores de pequeño tamaño que por su agresividad presentan metástasis axilares muy precozmente, y así mismo tumores de más de 5 cm (T3), sin afectación axilar, por lo que es fundamental también valorar el estado de los ganglios axilares (Bong y cols., 2005).

N = Afectación ganglionar

La supervivencia, tiempo libre de enfermedad y fracaso del tratamiento se correlacionan con el número de ganglios axilares positivos. Sin evidencia de metástasis ganglionares la supervivencia a los cinco años es del 87%; la supervivencia disminuye

al 75% en presencia de algún ganglio, al 64.5% con dos o tres ganglios positivos y al 34.5% con cuatro o más (Fiabrue y cols., 2002).

Dado que la progresión de la enfermedad en la axila suele ser ordenada, la afectación de los niveles II y III sin afectación del nivel I se observa sólo en el 3.5 % de las pacientes. Por ello, se acepta que la disección del nivel I es predictiva de la situación axilar real (Shokuhi y Clarke, 2007). En general, la disección de los niveles I y II, con la resección de al menos 10 ganglios, constituiría el estándar en ausencia de enfermedad macroscópica si no está indicada la biopsia del ganglio centinela (Morrow, 2004).

M = Metástasis a distancia

Lo habitual es que en el diagnóstico inicial de cáncer de mama, el tumor sea clasificado como M0, pues generalmente no se detectan metástasis a distancia en ese momento. Sin embargo, es mucho más frecuente que se objetiven durante la vida de la paciente, pudiendo aparecer hasta después de 20 años tras el diagnóstico inicial (Barrett y cols, 2008).

El diagnóstico de metástasis a distancia se relaciona con un peor pronóstico, estableciéndose que en general la supervivencia posterior varía entre 16 y 30 meses. Al igual que en otros tumores, las metástasis sistémicas en el cáncer de mama se establecen en sitios específicos. Abarca sobre todo tejidos blandos, huesos, hígado, pulmones, cerebro, pleura y pericardio (Schirrmester, 2007).

I.3.2. Evolución del sistema TNM

Las nuevas técnicas en diagnóstico y tratamiento de cáncer de mama: mamografía de cribado, biopsia del ganglio centinela y, por tanto, estudio de las micrometástasis mediante inmunohistoquímica y reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han puesto en evidencia la debilidad del sistema TNM y por ello generan una renovación.

La séptima edición del sistema TNM, que se utiliza en la actualidad, aúna la estadificación de la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) y la del Comité Americano de Cáncer (AJCC). La octava edición se estima que se publicará en el 2016 (Benson, 2003; Edge y cols., 2009).

TNM. 7 º Edición. 2009

Esta clasificación es rica en sufijos, algunos de los cuales pueden confundirse:

- T1(m): cancer multicéntrico
- T1mic: microinvasión
- pN1mi: micrometástasis

CLASIFICACION DEL T

Clasificación clínica :

Tx Imposibilidad de determinar el tamaño del tumor primario.

T0 Tumor primario no evidente

Tis:

Tis (CDIS)Carcinoma ductal in situ o carcinoma intraductal

Tis (CLIS) Carcinoma lobulillar in situ

Tis (Paget) Enfermedad de Paget sin tumor asociado. Si hay tumor asociado debe clasificarse acorde al tamaño del tumor

T1 Tumor de 2 cm o menos en su diámetro mayor

T 1 mic Microinvasión 0.1 cm o menos en su diámetro mayor

T1a Más de 0. 1 cm pero no más de 0.5 cm en su diámetro mayor

T1b > 0.5 a =< 1 cm

T1c > 1 a =< 2 cm

T2 Tumor > 2 cm a =< 5 cm en su diámetro mayor

T3 Tumor > 5 cm en su diámetro mayor

T4 Tumor de cualquier medida con extensión a pared torácica o piel

La pared torácica incluye costillas, músculos intercostales y serrato anterior

No incluye músculo pectoral

T4a Extensión a pared torácica

T4b Edema (incluye piel de naranja) o ulceración de la piel de la mama, o nódulos dérmicos satélites confinados a la misma mama

T4c Ambos

T4d Carcinoma inflamatorio

Clasificación patológica .

Las categorías pT, se corresponden con las categorías T

CLASIFICACION DEL N

Clasificación anatómica:

1- Axilares ;

Nivel I (base): ganglios hasta el borde externo del músculo pectoral menor.

Incluye los ganglios intramamarios

Nivel II (intermedios): ganglios entre los bordes interno y externo del músculo pectoral menor. Incluye los ganglios interpectores: Rotter

Nivel III (vértice): ganglios por dentro del borde interno del pectoral menor

2- Infraclavicular o subclavicular

3- Mamarios internos :ganglios en los espacios intercostales a lo largo del borde del esternón

4- Supraclavicular homolateral

Los ganglios cervicales y mamarios internos contralaterales son considerados metástasis a distancia (M1)

Clasificación clínica

Nx Ganglios regionales no determinados (ej. removidos previamente).

N0 Ausencia de ganglios metastásicos.

N1 Metástasis en ganglios axilares homolaterales móviles

N2:

N2a: Metástasis en ganglios axilares homolaterales (fijos entre sí o a otras estructuras)

N2b: Metástasis en ganglios mamarios internos clínicamente evidentes sin metástasis axilares clínicamente evidentes

N3:

N3a: Metástasis en ganglios subclaviculares

N3b: Metástasis en ganglios de la cadena mamaria interna y axila, ambos homolaterales y clínicamente evidentes

N3c : Metástasis en ganglios supraclaviculares homolaterales

CLINICAMENTE EVIDENTES: ganglios detectados por examen clínico o por imágenes(TAC y ecografía) excluida la linfografía radioisotópica

Clasificación patológica del N : pN

CLASIFICACIÓN DEL GANGLIO CENTINELA

Si no hay vaciamiento axilar asociado por tratarse de un ganglio centinela negativo deben emplearse las siguientes siglas:

pNX (sn): Ganglio centinela no determinado

pN0 (sn): Ganglio centinela sin metástasis

pN1 (sn): Ganglio centinela con metástasis

pNx. Los ganglios regionales no pueden evaluarse

pN0. Ganglios axilares sin metástasis

pN0 (i-). Sin evidencia histológica de metástasis, inmunohistoquímica negativa

pN0 (i+). Sin evidencia histológica de metástasis, inmunohistoquímica positiva > 0,2 mm

pN0 (mol-). Sin evidencia histológica de metástasis, hallazgos moleculares negativos

pN0 (mol+). Sin evidencia histológica de metástasis, hallazgos moleculares positivos

pN1

pN1m. Micrometástasis (ninguna mayor 0.2 cm)

pN1a: Metástasis en 1-3 ganglios axilares incluyendo al menos, uno mayor de 2 mm

pN1b:Metástasis en ganglios mamarios internos (microscopicas no clínicamente evidentes), detectada por ganglio centinela

pN1c Metástasis en 1-3 ganglios axilares e idem pN1b

pN2 :

pN2a: Metástasis en 4-9 ganglios axilares, incluyendo al menos, uno mayor de 2mm

pN2b:Metástasis en ganglios cadena mamaria interna en ausencia de metástasis axilares

pN3:

pN3a: Metástasis en 10 ó mas ganglios axilares o en ganglios subclaviculares

pN3b: Metástasis clínicamente aparente en la cadena mamaria en presencia de 1 o más ganglios axilares + o más de 3 ganglios axilares y ganglios en la mamaria interna con enfermedad microscópica detectada por ganglio centinela, sin ser clínicamente aparente.

pN3c: Metástasis en ganglios supraclaviculares ipsolaterales.

CLASIFICACION DEL M

Mx. No puede determinarse metástasis a distancia.

M0. Sin metástasis a distancia.

M1. Metástasis a distancia

Por estádios

Estadio T N M

0 Tis N0 M0

I T1 N0 M0

IIA T0 N1 M0
T1 N1 M0
T2 N0 M0

IIB T2 N1 M0
T3 N0 M0

IIIA T0 N2 M0

T1 N2 M0
T2 N2 M0
T3 N1-2 M0

IIIB T4 N0,N1,N2 M0

IIIC © T N3 M0

IV © T© N M1

©: Cualquier

El sistema TNM ha demostrado de esta forma su correlación con el pronóstico de la paciente permitiendo la clasificación de cada caso en un estadio, simplificando así su manejo a la hora de adecuar el tratamiento.

I.4. Diagnóstico del cáncer de mama

La mamografía es el método de detección más importante de las lesiones mamarias y es siempre obligada en pacientes sintomáticas, si bien en algunos casos es necesario complementarla con otras técnicas como son la ecografía, la galactografía y la resonancia magnética. Los diferentes estudios han demostrado que los programas de cribado mamográfico y la detección precoz del cáncer de mama han conseguido disminuir la mortalidad en un 25-30 % (Tabar y col., 2003). Para ello, la calidad de la imagen es fundamental y la única técnica que se ha demostrado eficaz para la detección precoz es la mamografía de calidad, interpretada por radiólogos con experiencia.

Actualmente, la American Cancer Society recomienda mamografía anual en mujeres asintomáticas a partir de los 40 años (Smith y col., 2003).



La mamografía (Figura 1) tiene una sensibilidad cercana al 90 %, aunque varía con la edad de la paciente, de forma que es mayor en mujeres mayores de 50 años y postmenopáusicas, que en mujeres jóvenes y premenopáusicas; esto es debido a que la densidad mamaria disminuye con la edad, sustituyéndose por grasa, facilitándose así la observación de las lesiones. Una mamografía normal no excluye la posibilidad de que exista un cáncer de mama y, por tanto, la presencia de una masa palpable va a requerir una evaluación con otras técnicas e incluso la realización de biopsia.

Figura 1. Mamografía

El American College of Radiology (ACR) ha editado la 4ª edición del Breast Imaging and Reporting and Data Base System (BI-RADS), que utiliza un lenguaje común para describir los hallazgos radiológicos e incluirlos en las diferentes categorías con un diferente valor predictivo positivo (VPP) para cáncer (American College of Radiology, 2003). Este sistema y lenguaje BI-RADS es de uso obligado en EE.UU. y aconsejado su manejo por la mayoría de las Sociedades Científicas del resto de países (D'Orsi and Newell, 2007).

La detección de lesiones mamarias no palpables (LMNP) se ha incrementado significativamente gracias al extendido uso de la mamografía como método de cribado del cáncer de mama. Con la introducción del sistema BI-RADS se han clasificado las LMNP en 6 categorías que facilitan el manejo de las pacientes. A las lesiones clasificadas en las categorías BI-RADS 4 y 5 se les debe realizar biopsia debido a su moderado o alto valor predictivo positivo (VPP) para cáncer. Para las lesiones de categoría BI-RADS 3 (lesiones probablemente benignas con una probabilidad de malignidad menor de un 2 %) la primera opción de manejo se relaciona con la edad de la paciente. En mujeres menores de 35 años se aconseja la realización de una Punción Aspiración con Aguja Fina (PAAF) y para mayores de esa edad, una Biopsia con Aguja Gruesa (BAG).

Los tumores primarios no palpables en estadios iniciales se tratan mediante tumorectomía y biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC). Para la tumorectomía se necesita de marcaje previo de la lesión mediante la colocación de un arpón metálico que permita al cirujano localizar las lesiones. El principal problema de la localización de lesiones no palpables con guías metálicas es la alta incidencia de resecciones incompletas y presencia de márgenes quirúrgicos afectos (Gray y cols., 2001; Chadweik y Shorthouse, 1997). En 1997, el Instituto Europeo de Oncología de Milán (IEO), describió una técnica para la localización de lesiones no palpables mediante la inyección intralesional de radiofármacos (Luini y cols., 1998), que denominó R.O.L.L.

(radioguided occult lesion localization). Además, la utilización de la técnica de detección del ganglio centinela en los tumores en estadios precoces planteó la posibilidad de integrar en un solo procedimiento ambas técnicas (Van Rijk y cols., 2006; De Cicco y cols., 2004; Barros y cols., 2002).

La BSGC supone la sustitución de la linfadenectomía axilar tradicional por una extirpación limitada a uno o dos ganglios. La base fisiopatológica de la BSGC en el cáncer de mama, la comparte con otros tumores como el melanoma o el cáncer de pene, y es la existencia de un drenaje selectivo que finaliza en un ganglio determinado y que depende de la localización del tumor dentro de un órgano (Cody y cols., 1999; Cox y cols., 2000). Ese ganglio linfático, es por definición, el primer sitio de enfermedad metastásica antes de progresar hacia ganglios linfáticos más alejados. Para su identificación se utilizan isótopos y colorantes que son selectivamente drenados por los vasos linfáticos mamarios, y cuyo trayecto será visualizado a través de una gammagrafía (Figura 2). El análisis histológico de este ganglio centinela determina así la necesidad o no de realizar una linfadenectomía axilar.

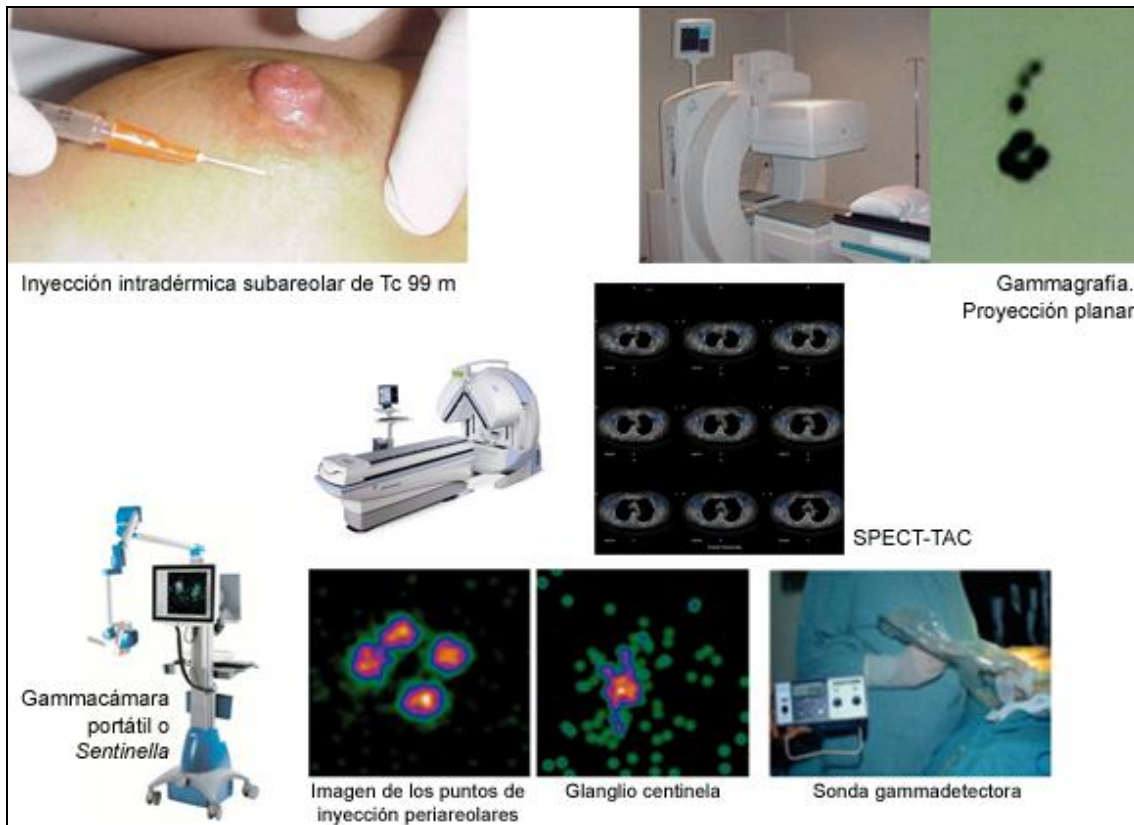


Figura 2. Proceso de estudio del ganglio centinela.

I.4.1 Tipos histológicos

Existen numerosas clasificaciones anatomopatológicas, pero la más empleada actualmente es la establecida por la Organización Mundial de la Salud (Tavassoéli y Devilee, 2003). La mayoría de las neoplasias mamarias se originan en la unión terminal ductolobulillar clasificándose como tipo ductal o lobulillar en relación a sus características morfológicas e inmunohistoquímicas específicas. Ambos grupos presentan variedades infiltrantes o invasivas y no infiltrantes o *in situ*.

I.4.1.1. Carcinoma ductal *in situ*

El carcinoma ductal *in situ* (CDIS) se define como una proliferación de células epiteliales malignas, que crece en el interior de los conductos sin evidencia de invasión a través de la membrana basal. El CDIS es considerado una lesión precursora que, además, confiere un riesgo relativo de desarrollo de cáncer infiltrante subsiguiente. La incidencia de CDIS se ha incrementado desde menos de un 5 % hasta alrededor del 20 % de los carcinomas de mama con la incorporación de las campañas de cribado mamográfico (Figura 3A).

I.4.1.2. Carcinoma lobulillar *in situ*

El carcinoma lobulillar *in situ* (CLIS) se define como una proliferación de células generalmente pequeñas, poco cohesivas, que se origina en la unidad ducto-lobulillar terminal. Es más frecuente en mujeres de 40-50 años, aproximadamente una década anterior al CDIS, aunque estudios recientes sugieren un aumento en su incidencia en mujeres mayores. Es una enfermedad característicamente multifocal (50 %) y se relaciona con la bilateralidad (Figura 3B).

I.4.1.3. Carcinoma ductal infiltrante NE

El carcinoma ductal infiltrante NE (No Especificado, equivalente al NOS “Not Otherwise Specified”) es el tipo tumoral más frecuente de los carcinomas invasivos de mama, suponiendo entre el 40 % y el 70 % de los mismos. Histológicamente, lo que caracteriza a este tipo tumoral es la variedad tanto arquitectural como citológica de las lesiones (Figura 3C). Hasta en un 80 % de los casos puede encontrarse componente de carcinoma *in situ*, habitualmente de alto grado. Dentro de este tipo tumoral se reconocen algunos subtipos con rasgos morfológicos particulares.

Carcinoma de tipo mixto

Para que un carcinoma invasivo se considere como ductal NE, más del 50 % de la masa tumoral debe tener un patrón de crecimiento no específico. En los casos con entre un 10 a un 49 % de áreas de crecimiento de tipo especial, estos tumores se clasifican en carcinoma mixto ductal y del tipo especial o mixto ductal y lobulillar.

Carcinoma pleomórfico

Es una variante rara caracterizada por la presencia en más del 50 % de la masa tumoral de células tumorales pleomórficas, muy irregulares y de gran tamaño, de aspecto sarcomatoso. Estos tumores son de alto grado, no expresan receptores hormonales, suelen tener expresión de p53 y metástasis ganglionares en el 50 % de los casos en el momento del diagnóstico.

Carcinoma con células gigantes tipo osteoclasto

La característica común de estos tumores es la presencia en el estroma de células gigantes multinucleadas de tipo osteoclasto. El comportamiento biológico de este tumor depende del componente carcinomatoso ya que las células gigantes son de naturaleza reactiva, probablemente relacionadas con la producción de factores quimiotácticos y angiogénicos del tumor.

Carcinoma con rasgos melanocíticos

Son tumores extraordinariamente raros que combinan rasgos de carcinoma ductal NE y melanoma, con zonas de transición entre ambas. El principal problema es el diagnóstico diferencial con el melanoma metastásico en la mama.

I.4.1.4. Carcinoma lobulillar infiltrante

Se define como un tumor compuesto por células que muestran un patrón de crecimiento difuso, formando hileras de una célula de espesor, como consecuencia de la pérdida de expresión de la e-cadherina, molécula de adhesión celular, embebidas en un abundante estroma fibroso. Representa entre el 5 % y el 15 % de los carcinomas invasivos, con un ligero aumento en su incidencia en los últimos años (Figura 3D). La edad media de las pacientes es ligeramente superior a la del carcinoma ductal infiltrante. Tradicionalmente se ha considerado que este tipo tumoral presenta unos mayores índices de multicentricidad y bilateralidad.

En un alto porcentaje de casos hay un componente de carcinoma lobulillar *in situ*, especialmente en el tipo clásico, a veces con fenómenos de extensión ductal. Al igual que en el carcinoma ductal hay subtipos mixtos, de los cuales, el más importante es el que combina un patrón de crecimiento tubular con el patrón clásico dando lugar al carcinoma túbulo-lobulillar.

I.4.1.5. Carcinoma tubular

Es un tipo especial caracterizado por un patrón de crecimiento en estructuras tubulares bien diferenciadas, tapizadas por una única capa de células y con una forma angulosa de los conductos. El principal rasgo diferencial de este tipo es su buen pronóstico, incluso con metástasis ganglionares.

I.4.1.6. Carcinoma cribiforme

Es un carcinoma poco frecuente (0,8-3,5 %). Son tumores de bajo grado citológico, con 100 % de expresión de receptores hormonales. En estas neoplasias es necesario realizar el diagnóstico diferencial con el carcinoma intraductal con patrón cribiforme. Para ello, es muy útil demostrar la existencia de células mioepiteliales mediante el anticuerpo p-63 en ésta última entidad.

I.4.1.7. Carcinoma medular

Este es el tipo histológico que tradicionalmente se ha considerado como de buen pronóstico, a pesar de ser un tumor de alto grado citológico. Se define como un tumor bien delimitado, habitualmente redondo, con una arquitectura sincitial en grandes nidos sólidos, separados por escaso estroma y rodeados de un marcado componente inflamatorio linfoplasmocitario reactivo. Es necesario separar estas neoplasias triple negativas de los tumores también triple negativos de fenotipo basal y peor pronóstico.

I.4.1.8. Carcinomas productores de moco

En esta categoría se engloban tanto el carcinoma mucinoso o coloide como el extraordinariamente raro cistoadenocarcinoma mucinoso. Se caracteriza por la presencia de abundante moco extracelular en el que sobrenadan grupos de células neoplásicas generalmente de bajo grado. Esta presencia de moco les confiere un aspecto radiológico de lesión nodular bien delimitada y un carácter macroscópico gelatinoso (Figura 3E).

I.4.1.9. Carcinoma papilar

Es un tipo tumoral raro caracterizado por el crecimiento en forma de papilas con un eje conectivo-vascular tapizadas por una capa de células, generalmente de grado nuclear intermedio. La mayoría son puros, aunque pueden tener áreas relativamente sólidas, y en ocasiones se acompañan de un componente *in situ* también papilar. Hay relativamente pocos datos sobre su evolución, aunque parece tener un comportamiento menos agresivo que los carcinomas ductales NE.

I.4.1.10. Carcinoma metaplásico

Se trata de un grupo heterogéneo de tumores que combinan áreas de adenocarcinoma convencional con otras de diferenciación fusocelular, escamosa y/o mesenquimal. Suponen menos del 1 % de los tumores invasivos de mama. Este tipo de tumores suponen un serio problema de diagnóstico diferencial con neoplasias mesenquimales de patrón fusiforme cuando el componente epitelial está poco representado. El uso de marcadores epiteliales como las citoqueratinas y mesenquimales como el CD34 ayudan a distinguirlos.

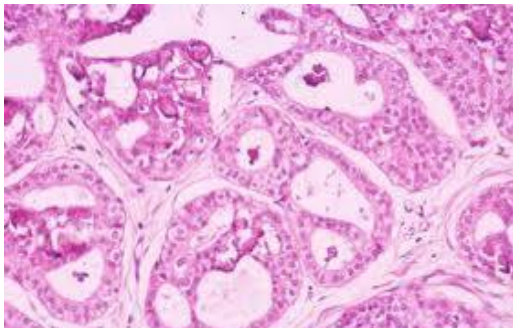
I.4.1.11. Carcinoma adenoide quístico

Representa aproximadamente el 0,1 % de los tumores invasivos y morfológicamente es idéntico al que aparece en las glándulas salivales. Es un tumor de buen pronóstico ya que no suele dar metástasis ganglionares. El principal problema diagnóstico es la diferenciación con el carcinoma cribiforme invasivo, con el que comparte arquitectura.

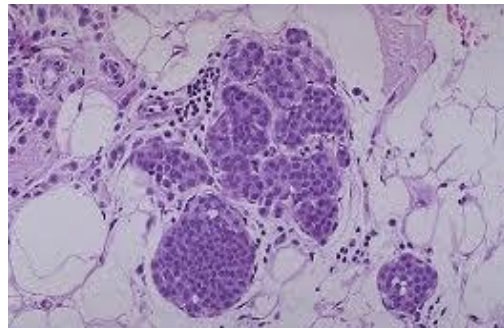
I.4.1.12. Carcinoma inflamatorio

Este tipo se define más por sus rasgos clínicos que por sus características morfológicas, y se encuadra dentro del grupo de carcinomas localmente avanzados. A pesar del nombre y de los rasgos clínicos (eritema, edema, piel de naranja, induración, etc.) no hay infiltrado inflamatorio apreciable. Todos estos síntomas dependen de la permeación masiva de los vasos linfáticos de la dermis por parte de émbolos tumorales, habitualmente con un tumor de tipo ductal NE subyacente. En estos casos suelen ser tumores sin receptores hormonales y con sobreexpresión de HER2. El diagnóstico es predominantemente clínico ya que en biopsias pequeñas de piel puede no encontrarse el dato morfológico característico (Figura 3F).

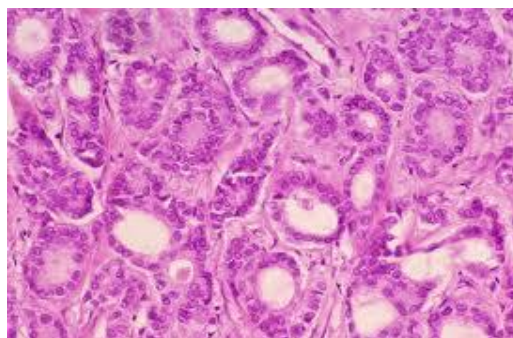
A



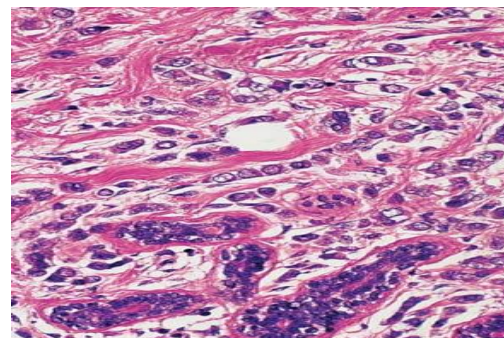
B



C



D



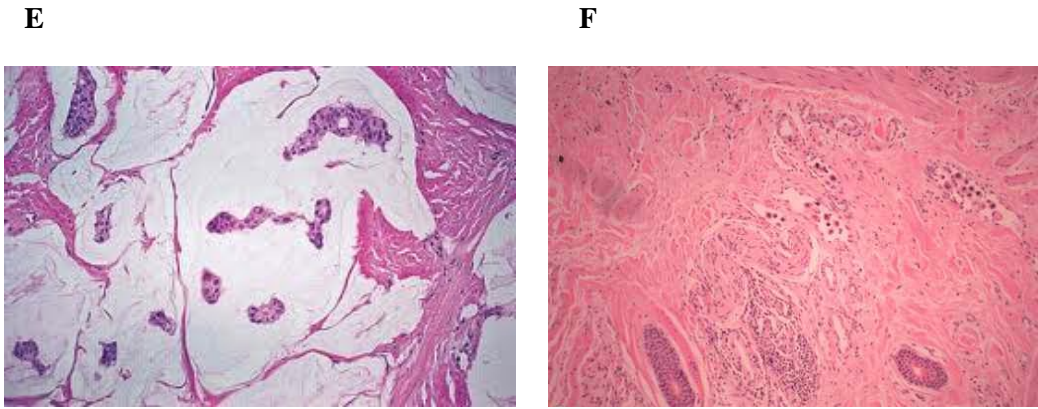


Figura 3. A.- Carcinoma ductal in situ; B.- Carcinoma lobulillar in situ; C.- Carcinoma ductal infiltrante; D.- Carcinoma lobulillar infiltrante; E.- Carcinoma mucinoso; F.- Carcinoma inflamatorio.

I.5. Tratamiento neoadyuvante del cáncer de mama.

I.5.1. Introducción

El tratamiento neoadyuvante, generalmente referido como quimioterapia neoadyuvante (QN) o quimioterapia primaria o de inducción, es aquella administrada antes de cualquier tratamiento local, ya sea cirugía o radioterapia. Se comenzó a utilizar a finales de la década 60, y los primeros resultados fueron publicados en los 70 y su objetivo era aquellos tumores localmente avanzados en los que no era posible la cirugía como primera opción terapéutica. Estos primeros ensayos con QN producían una disminución del tamaño del tumor (respuestas clínicas) entre 70-80 % (Jacquillat y cols., 1990; Bonadonna y cols., 1990).

La QN es considerada actualmente indispensable en el tratamiento de los tumores inoperables al diagnóstico y en los carcinomas inflamatorios de mama, aunque cada vez es más utilizada en el cáncer de mama precoz, en aquellas pacientes que a priori serían candidatas a recibir quimioterapia adyuvante (Kaufmann y cols., 2007).

Con la administración de tratamiento neoadyuvante podemos hacer operable un tumor si se consigue una reducción suficiente de tamaño. Otro objetivo fundamental de la QN es la posibilidad de realizar un tratamiento conservador en un tumor cuya primera indicación quirúrgica es una mastectomía. Sin embargo, el número de mastectomías realizadas en España sigue siendo todavía muy alto (alrededor del 60 %). Es interesante saber que la QN es una opción alternativa e igual de válida a la mastectomía de inicio, con la diferencia de poder ofrecerle a la mujer una posibilidad de conservar la mama (Kuerer y cols., 2001). Además, con la QN tenemos la posibilidad de desarrollar esquemas terapéuticos más eficaces e individualizados sobre la base de marcadores

biológicos y genéticos, al disponer de un modelo *in vivo* de sensibilidad como es la propia enferma.

El cáncer de mama inicial (estadios I, II y III) puede ser tratado de dos maneras:

- 1.- La secuencia convencional de cirugía seguida de un tratamiento complementario (quimioterapia y/o radioterapia y/o hormonoterapia).
- 2.- La secuencia inversa con tratamiento sistémico primero (quimioterapia u hormonoterapia) seguida de cirugía.

Lo más importante es conocer que no existen diferencias en la supervivencia de las pacientes según la pauta terapéutica utilizada (Bonadonna y cols., 1998; van der Hage y cols., 2001; Goldhirsch y cols., 2007). Esto se sabe gracias al resultado de varios estudios aleatorizados (Jones y Smith, 2006) que han comparado las 2 secuencias y, el resultado de un metaanálisis realizado en 4000 mujeres y con 9 ensayos (Mauri y cols., 2005). Este resultado ha confirmado lo que ya se conocía: que las 2 secuencias son similares en cuanto a supervivencia. Otra de las conclusiones de este metaanálisis es la presencia de una mayor tasa de recaídas locales en aquellas mujeres que recibían QN. No obstante, hay que ser cauto con esta conclusión, ya que esta mayor tasa de recaídas locales fue observada en aquellos trabajos en los que, tras QN, las pacientes con una respuesta clínica completa (desaparición clínica del tumor) recibían radioterapia en vez de tratamiento local con cirugía (Mauri y cols., 2005). Por tanto, una de las conclusiones importantes que se puede sacar de estos datos es que la radioterapia no debe sustituir a la cirugía ni siquiera en aquellos casos en los que exista una respuesta clínica completa del tumor.

1.5.2. Selección del tratamiento según el estado de los receptores hormonales y Her2

La división del tumor según su estado de hormonosensibilidad y de expresión del Her2 da cuatro posibles escenarios en el tratamiento neoadyuvante. Así como en el cáncer de mama intervenido y en el metastático esta clasificación permite individualizar el tratamiento en cada situación por la existencia de una clara evidencia científica (EBCTCG, 2005; Viani y col., 2007), en el caso del cáncer de mama inicial las opciones de tratamiento neoadyuvante no están tan claras.

RH+, HER2+

En este caso se podría empezar con un tratamiento combinado de quimioterapia más trastuzumab y tras la cirugía tratamiento hormonal, o bien, con quimioterapia sola o incluso con hormonoterapia dada la hormonosensibilidad del tumor, y tras la cirugía tratamiento con trastuzumab y hormonoterapia. Desafortunadamente, en el caso de un tumor hormonosensible, no tenemos ningún estudio aleatorizado bien diseñado que compare la quimioterapia frente a la hormonoterapia. Desde un punto de vista práctico y hasta que se tengan los resultados de estudios fase III más concluyentes y mejor diseñados, el tratamiento neoadyuvante con hormonoterapia se puede reservar, en

general, a mujeres mayores postmenopáusicas con tumores hormonosensibles, con alguna contraindicación para la quimioterapia (Semiglazov y col., 2004).

RH+, HER2-

En el segundo escenario nos encontramos con un tumor con positividad para los RH y con el Her2-. En esta situación el tratamiento que se indica en la mayoría de los casos es quimioterapia, y tras la cirugía se establece el tratamiento hormonal adecuado (Bear y cols., 2006).

RH-, HER2+

El tercer escenario se trata del caso de un tumor no hormonosensible pero con sobreexpresión o amplificación de Her2. En este caso la duda está entre utilizar sólo quimioterapia desde el inicio y tras la cirugía tratamiento con trastuzumab, o bien quimioterapia asociada a trastuzumab desde el inicio (Buzdar AU y cols., 2005).

RH-, HER2-

Por último, el cuarto escenario con negatividad para los dos receptores (RH y Her2) es el único que no plantea dudas, ya que sólo existe una única opción, que es utilizar QT (Liedtke y col., 2008).

I.5.3. Quimioterapia

Si hay que utilizar la quimioterapia como tratamiento neoadyuvante, la pregunta es: actualmente, cual es el mejor esquema de tratamiento. Antes de la era de los taxanos, es decir, antes del inicio de los años 90, las antraciclinas eran la base del tratamiento tanto precoz como avanzado. Con esquemas clásicos con antraciclinas tipo AC (Adriamicina-Ciclofosfamida) u otras combinaciones como QN, la tasa de RPc estaba alrededor de 9-13 %. Posteriormente, con la incorporación de los taxanos comenzaron a surgir nuevos esquemas de tratamiento que demostraron ser superiores a los clásicos esquemas con antraciclinas.

Los estudios aleatorizados más importantes que han mostrado los regímenes más óptimos son:

Estudio Aberdeen (Smith y cols., 2002)

Después de los exitosos estudios fase I y II de neoadyuvancia, el estudio Aberdeen demostró que la administración secuencial de docetaxel doblaba las tasas de RPc.

Un total de 162 paciente diagnosticadas de cáncer de mama T2-T3, Nx-N2, recibieron 4 ciclos de CVAP (ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina y prednisolona). Aquellas mujeres con respuesta clínica (completa o parcial) fueron aleatorizadas a 4 ciclos más del mismo régimen, o bien 4 ciclos más de docetaxel cada

3 semanas. En este grupo, docetaxel dobló las tasas de RPc. Aquellas pacientes con evidencia de estabilización clínica de la enfermedad o progresión tras los 4 primeros ciclos con antraciclinas, recibieron directamente 4 ciclos de docetaxel, alcanzándose un 55 % de repuestas clínicas parciales y completas.

Estudio NSABP B27 (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project) [Bear y cols., 2003]

Es el estudio de mayor número de pacientes. Se trata de un ensayo fase III aleatorizado que, basándose en un anterior estudio (NSABP B-18), analiza si la incorporación de docetaxel mejora la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y la supervivencia global (SG), objetivos primarios del estudio.

Un total de 2411 mujeres con cáncer de mama inicial (T1-T3, N0-N1, M0) fueron aleatorizadas a tres ramas de tratamiento: 4 ciclos de AC (adriamicina, ciclofosfamida) administrados cada tres semanas seguido de cirugía; 4 ciclos de AC seguido de 4 ciclos de docetaxel cada tres semanas y posteriormente cirugía; y 4 ciclos de AC seguido de cirugía y después 4 ciclos de docetaxel. Todas las pacientes recibieron tamoxifeno desde el primer día de la quimioterapia y durante 5 años independiente del estado de los receptores hormonales. Con respecto al objetivo secundario que fue la tasa de RPc, la rama II produjo un incremento significativo de la RPc en la mama y axila frente a las obtenidas con el esquema AC (21,8 % vs. 11,5 %; $p < .001$).

Estudio ECTO (European Cooperative Trial in operable breast cancer) [Gianni y cols., 2002]

Este estudio es un fase III aleatorizado a tres ramas, con 1355 pacientes. Las dos primeras estudian la administración de unos determinados esquemas como tratamiento adyuvante a la cirugía, mientras que la tercera rama estudia la secuencia de 4 ciclos de doxorubicina y paclitaxel cada 3 semanas, seguidos posteriormente de 4 ciclos de CMF (Ciclofosfamida, Metotrexate y 5-Fluorouracilo) como QN. Esta tercera rama incluyó un total de 448 pacientes; la RPc en la mama fue del 23 % y del 20 % en mama y axila, para este esquema de QN.

Estudio del MD Anderson Cancer Center (Green y cols., 2005)

Se trata de un estudio fase III sobre 258 pacientes con cáncer de mama T1-T3, N0-N1, M0. Este estudio tiene como finalidad comparar la eficacia de la secuencia, paclitaxel seguido de un régimen con antraciclinas como FAC (5-Fluorouracilo, doxorubicina, ciclofosfamida). El objetivo era comparar dos esquemas distintos de paclitaxel, semanal o trisemanal seguido de FAC y evaluar la tasa de RPc en la mama y axila.

El esquema de tratamiento fue el siguiente: para las pacientes en la rama de paclitaxel trisemanal la dosis administrada fue de 225 mg/m^2 . Las pacientes asignadas a la rama de paclitaxel semanal recibieron dos dosis diferentes según la presencia o no de ganglios clínicos palpables al diagnóstico. Aquellas consideradas clínicamente con

ganglios positivos recibieron 150 mg/m^2 durante 3 semanas descansando posteriormente una semana. Esto constituía 1 ciclo recibiendo un total de 4 ciclos. Por el contrario, aquellas mujeres consideradas clínicamente negativas desde el punto de vista ganglionar recibieron 80 mg/m^2 semanal, durante 12 semanas seguidas. Tras el paclitaxel y, de manera secuencial, todas las pacientes recibieron 4 ciclos de FAC cada 3 semanas.

Sobre un total de 258 pacientes incluidas, 110 tuvieron ganglios positivos al diagnóstico confirmado mediante punción. Con respecto a la tasa de RPc, las pacientes con paclitaxel trisemanal presentaron un 15,7 % de RPc frente a un 28,2 % con el paclitaxel semanal ($p=0.02$). No hubo diferencias en la tasa de RPc en la rama de paclitaxel semanal con las dos dosis diferentes.

Estudio GEPARDUO (The second German Preoperative Adriamycin Docetaxel)
[von Minckwitz cols., 2005]

Este estudio fase III fue el primero en comparar dos estrategias diferentes para incorporar doxorrubicina y docetaxel en el tratamiento primario. Investigó en 913 mujeres (1999-2001) con cáncer de mama (T2-3, N0-2, M0) la eficacia del esquema AD (Doxorrubicina, Docetaxel) cada 14 días por 4 ciclos frente a AC (Doxorrubicina, Ciclofosfamida) cada 21 días seguido de docetaxel cada 21 días por cuatro ciclos cada uno. Todas las pacientes recibieron tamoxifeno simultáneamente, con independencia del estatus hormonal.

El objetivo principal del estudio era la incidencia de RPc en la mama y en la axila. Alcanzaron la RPc un total de 94 pacientes (10,6 %), pero la probabilidad era más alta con el esquema secuencial (14,3 %) que con el concurrente (7,0 %), $p < 0,001$.

Estudio GEPARTRIO (The third German Preoperative Adriamycin Docetaxel)
[von Minckwitz cols., 2008]

Ensayo fase III, prospectivo, multicéntrico, prospectivo, randomizado, cuyo objetivo principal era comparar la eficacia de 6 a 8 ciclos de docetaxel, doxorrubicina y ciclofosfamida (TAC) frente a 2 ciclos de TAC seguidos de 4 ciclos de vinorelbina y capecitabina (NX).

Se reclutaron un total de 2090 pacientes entre Julio 2002 y Diciembre 2005. Todas las pacientes comenzaron el tratamiento neoadyuvante con 2 ciclos de TAC, día 1, cada 3 semanas. La respuesta clínica tras los mismos, se evaluó con ultrasonidos. Las pacientes que habían respondido eran randomizadas a continuar con 4 ó 6 ciclos más de TAC. Las pacientes en las que no se objetivó respuesta se randomizaron para continuar con 4 ciclos de TAC o con 4 ciclos de NX, días 1-14, cada 3 semanas. Ninguna de las pacientes Her2+ recibieron trastuzumab durante el tratamiento neoadyuvante. Las pacientes en las que se objetivó progresión al primer exámen, fueron excluidas de la randomización y tratadas según criterio del investigador.

Las tasas de RPc fueron similares en los diferentes brazos del estudio (17 %) . Se demostró que la adición de 2 ciclos más de TAC, a los 6 previos, no aumentaba las tasas de RPc. Entre aquellos pacientes que no respondieron inicialmente al esquema TAC se vió una similar eficacia pero mejor tolerancia para el esquema NX que TAC.

Estudio JBCRG01 (Japan Breast Cancer Research Group) [Toi y cols., 2008]

Este estudio es un fase II multicéntrico que examinó el efecto patológico en la supervivencia después de dar quimioterapia neoadyuvante en 191 mujeres japonesas con cáncer de mama. Todas las pacientes recibieron 4 ciclos de FEC (5Fluorouracilo, Epirubicina, Ciclofosfamida) seguido de 4 ciclos de docetaxel. El objetivo primario era la supervivencia libre de enfermedad (SLE) en función de las tasas de RPc. En este estudio se utilizó el término Quasi-RPc (QRPC), para hacer referencia a la ausencia de tumor invasivo o la presencia de células tumorales focales residuales (Kuroi y cols., 2006); lo que equivaldría al grado 4 y 5 de regresión de Miller & Payne.

Las tasas de QRPC fueron del 25 % (incluyendo un 16 % de RPc). 38 pacientes de las 75 que no respondieron al esquema FEC tenían respuesta al tratamiento con docetaxel. 106 de las 118 que respondieron al FEC mantuvieron o aumentaron la respuesta con el tratamiento de docetaxel.

Con respecto al objetivo primario del estudio, las pacientes que alcanzaban una QRPC tenían una mejoría significativa en la SLE a los 3 años (98 %) comparado con las pacientes que tenían peor respuesta (89 %), $p = 0,033$.

Estudio JBCRG03 (Japan Breast Cancer Research Group) [Iwata y cols., 2011]

El mismo grupo de trabajo, realizó posteriormente otro estudio fase II muy parecido al anterior, pero con la secuencia inversa de tratamiento. Es decir, 132 mujeres japonesas recibieron 4 ciclos de docetaxel, seguidos de 4 ciclos de FEC. En este caso, el objetivo principal era la RPc y QRPC, que fueron del 23 % y 29 % respectivamente, un poco más altas que en el estudio anterior. 27 de las 48 pacientes que no respondieron a docetaxel, consiguieron respuestas con el esquema FEC. Sin embargo, 8 de los 87 respondedores a docetaxel no mejoraron la respuesta tras la administración de FEC.

Parece evidente que la incorporación de los taxanos a la QN proporciona una mejoría significativa en los estudios en la RPc. Estos estudios no son comparables entre sí por la población tan heterogénea de pacientes. Lo que sí está claro es que cualquiera de ellos es válido, y que la incorporación de un taxano es un paso obligado en el tratamiento con QN del cáncer de mama para obtener una mayor tasa de RPc.

I.5.4. Hormonoterapia

La experiencia con hormonoterapia neoadyuvante es mucho menor que con quimioterapia. En general, la tasa de RPC es mucho menor que la obtenida con la QN pero puede ser debido a que se desconoce la duración óptima de la hormonoterapia neoadyuvante. Hasta la fecha, los dos estudios aleatorizados más importantes son:

Estudio de letrozol versus tamoxifeno (Ellis y cols., 2001)

Se trata de un estudio fase III a doble ciego realizado sobre 324 pacientes con cáncer de mama no susceptible de cirugía conservadora de inicio, aleatorizadas entre letrozol o tamoxifeno durante 4 meses. Se trataba de mujeres postmenopáusicas con receptores hormonales positivos. El objetivo primario era determinar la tasa de respuestas clínicas, y el secundario el porcentaje de cirugías conservadoras tras el tratamiento. El letrozol produjo una tasa de respuestas clínicas (respuestas completas y respuestas parciales) del 60 % frente al 41 % con el tamoxifeno ($p = 0.004$). Con relación a la tasa de cirugías conservadoras, con el letrozol fue de 48 %, frente a 36 % con el tamoxifeno ($p = 0.036$). En este estudio no se analizó la RPC.

Estudio IMPACT comparando anastrozol versus tamoxifeno versus combinación de ambos

El estudio IMPACT compara la efectividad del anastrozol frente al tamoxifeno y la combinación de ambas drogas, como tratamiento neoadyuvante hormonal. Los objetivos del estudio fueron similares a los del estudio previo con letrozol, siendo prioritaria de nuevo la tasa de respuestas clínicas (y no patológicas), la tasa de cirugía conservadora y en este estudio se analizó como objetivo secundario los cambios en el marcador molecular Ki 67.

Se trata de un estudio fase III doble ciego 1: 1: 1 aleatorizado entre anastrozol + placebo, tamoxifeno + placebo y tamoxifeno + anastrozol + placebo, realizado sobre 330 pacientes. Para los criterios de inclusión se necesitaban mujeres postmenopáusicas con RE +. Con respecto al objetivo primario, no hubo diferencias en la tasa de respuestas clínicas entre el anastrozol (37 %), tamoxifeno (36 %) y la combinación (39 %), aunque sí se objetivó una mayor tasa de cirugía conservadora a favor del anastrozol (Smith y cols., 2005).

El tratamiento hormonal neoadyuvante es una óptima alternativa a la quimioterapia neoadyuvante en un determinado grupo de pacientes, como son aquellas mujeres postmenopáusicas con RH +. Parece claro que los inhibidores de la aromatasas son superiores o, al menos, tan eficaces como el tamoxifeno en reducir el tamaño clínico del tumor evitando los efectos secundarios del antiestrógeno. La duración del tratamiento es todavía una pregunta a estudio que deberá ser contestada en futuros ensayos clínicos; no obstante, parece recomendable no utilizar el tratamiento menos de 6 meses para poder obtener la máxima respuesta.

I.5.5. Quimioterapia + Trastuzumab

La incorporación de fármacos dirigidos a dianas moleculares es una de las vías para conseguir una mayor tasa de RPc y, por tanto, una mayor eficacia de la quimioterapia primaria. Uno de los agentes más atractivos es el trastuzumab en las pacientes con sobreexpresión de Her2 (Eisenhauer EA., 2001; Nielsen DL y col., 2009), especialmente tras los excelentes resultados obtenidos con el uso de trastuzumab en adyuvancia.

Los resultados más interesantes derivan de tres estudios aleatorizados. El primero es el publicado por Buzdar y cols., 2005, realizado en el MD Anderson Cancer Center. En este estudio, las pacientes con cáncer de mama estadios II-III A y con sobreexpresión de Her2 (3+) y/o positividad por FISH fueron aleatorizadas entre un régimen secuencial con 4 ciclos de paclitaxel seguidos de 4 ciclos de FEC asociado o no a trastuzumab. Tras la quimioterapia, las pacientes eran programadas para realizar cirugía conservadora o bien mastectomía de acuerdo a la respuesta clínica. A las pacientes con ganglios clínicos negativos se les realizaba la técnica del ganglio centinela, y si en éste existía enfermedad microscópica residual se les aconsejaba la realización de vaciamiento axilar. El estudio estaba diseñado para encontrar una diferencia en la tasa de RPc de 21 % a 41 %; para ello se necesitaban 164 pacientes. Entre los años 2001 y 2003 se incluyeron solamente 42 pacientes, ya que el estudio se paró por decisión de Comité por la alta tasa de RPc encontrada en la rama con trastuzumab: 26,3 % frente a 65,2 % ($p=0.016$).

Otro ensayo aleatorizado importante en este escenario es el NOAH (Gianni y cols., 2007), estudio europeo en el que 227 pacientes con cáncer de mama estadios II-III B Her2 positivo se aleatorizaron a recibir un tratamiento primario con un esquema secuencial con antraciclina, paclitaxel y CMF, con o sin trastuzumab concomitante; los resultados iniciales muestran un aumento significativo de la RPc para el grupo que recibió trastuzumab (38 % versus 20 %; $p=0,003$).

El ensayo fase III GEPARQUATTRO, conducido por el grupo alemán, es el estudio de neoadyuvancia con mayor número de pacientes Her2+. 1510 mujeres recibieron 4 ciclos de EC (epirrubicina y ciclofosfamida) y eran randomizadas para recibir 4 ciclos de docetaxel (brazo A), ó 4 ciclos de docetaxel más capecitabina (brazo B), ó 4 ciclos de docetaxel seguido por 4 ciclos de capecitabina (brazo C). Las mujeres Her2+ recibieron trastuzumab cada 3 semanas concomitante con la quimioterapia, antes de la cirugía, y hasta 1 año después de la cirugía. Las tasas de RPc (objetivo primario del estudio) en las pacientes Her2+, estaban significativamente incrementadas por la adición de trastuzumab (45,5 % vs 19,5 %) [Untch, 2008].

Los resultados obtenidos en estos estudios, a pesar del relativamente pequeño número de pacientes y del escaso seguimiento, convierten en sumamente atractiva la introducción en este grupo de pacientes del tratamiento primario con una quimioterapia basada en antraciclina y taxanos, con trastuzumab concomitante. Quedan por resolver diversos aspectos, como el riesgo cardiaco de la concomitancia con antraciclina, la duración del tratamiento con el monoclonal y el papel de esquemas sin antraciclina.

I.6. Valor pronóstico de la RPc tras la quimioterapia neoadyuvante

Además de los objetivos mencionados previamente, otro objetivo primordial de la QN es obtener una RPc que se define como la ausencia de restos tumorales, al menos invasivos, tras el estudio minucioso de la pieza quirúrgica por parte del anatomopatólogo (Guarneri y cols., 2006). Obtener una desaparición clínica del tumor a la palpación es importante para el planteamiento de la cirugía posterior, pero en el 50 % de los casos en los que existe ausencia de tumor clínico (también llamado respuesta clínica completa) queda enfermedad residual desde el punto de vista patológico. El objetivo, por tanto, debe ser obtener una RPc.

Se han descrito diferentes formas de valorar la RPc, lo que conlleva algunas dificultades a la hora de comparar los resultados de los diferentes estudios. Por ejemplo, el NSABP B-18 y B-27 (Wolmark y cols., 2001; Bear y cols., 2006) definieron la RPc como la ausencia de tumor invasivo residual en la mama, tras el tratamiento neoadyuvante, objetivado en la pieza quirúrgica. Otros estudios, sin embargo, engloban también la ausencia de invasión tumoral en la axila para definir la RPc (Bear y cols., 2003; Ring y cols., 2004; Gianni y cols., 2005; von Minckwitz y cols., 2005; von Minckwitz y cols., 2005; Guarneri y cols., 2006). A raíz de todos estos estudios, las reuniones de consenso internacional sugieren definir la RPc como la ausencia de tumor invasivo tanto en la mama como en la axila (Kaufmann y cols., 2006).

Numerosos estudios prospectivos y retrospectivos indican que cuando la paciente obtiene una RPc, el pronóstico a largo plazo es mucho mejor, con un impacto positivo en la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y supervivencia global (SG) [Hage y cols., 2001; Chollet y cols., 2002; Abrial y cols., 2005]. Por tanto, el objetivo primario en cualquier estudio de QN evaluando nuevos fármacos, combinaciones o esquemas de tratamiento debe ser obtener el mayor porcentaje de RPc. Desafortunadamente, la tasa de RPc en la mayoría de los estudios es baja. En la era pretaxanos y con la mayoría de los regímenes basados en antraciclinas, la tasa de RPc oscilaba entre el 9-14 % (Fisher y cols., 1998; Morrell y cols., 1998; Kuerer y cols., 1999). Actualmente, con el uso de las combinaciones de antraciclinas y taxanos las tasas de RPc oscila entre el 16-28 % (Smith y cols., 2002; Bear y cols., 2003; Kaufmann y cols., 2005).

La cuestión es si hay alguna forma de predecir con exactitud la posibilidad de alcanzar una RPc tras un tratamiento específico (Rouzier y cols., 2005; Hess y cols., 2006; Mamounas, 2006). Se han investigado numerosos marcadores predictivos de la respuesta de forma retrospectiva y prospectiva, como los RE, RP, Her2, los diferentes fenotipos, ploidia, p53 y otros oncogenes (Petit y cols., 2004; Rouzier y cols., 2005; Andre y cols., 2008; Colleoni y cols., 2008; von Minckwitz y cols., 2008; Colleoni y cols., 2009; Darb-Esfahani y cols., 2009; Liedtke y cols., 2009). Hay otros estudios que muestran resultados más contradictorios, lo que demuestra lo difícil que resulta identificar marcadores fiables de la respuesta (Faneyte y cols., 2003; Zhang y cols., 2003; Bozzetti y cols., 2006; Tiezzi y cols., 2007; Stuart-Harris y cols., 2008).

Se están investigando técnicas de alta resolución, como los perfiles génicos de microarrays y la proteómica, para desarrollar modelos con múltiples marcadores que puedan usarse para predecir con exactitud la RPc.

Dentro de las firmas de expresión génica, su valor predictivo se ha testado en series de pequeño tamaño, por lo que aún es pronto para establecer conclusiones sólidas. Entre los estudiados con mejores resultados estarían el predictor de 30 genes del MDACC (Ayers y cols., 2004; Hess y cols., 2006; Peintenguer y cols., 2007; Tabchy y cols., 2010), especialmente si se aplican sobre casos con parámetros convencionales bien definidos (Tordai y cols., 2008). Firmas como la basada en 70 genes (Mamaprint^R) [Straver y cols., 2010] y la clasificación en subtipos moleculares que puede aplicarse en material fijado e incluido en parafina, también parecen aportar información en neoadyuvancia (Chang y cols., 2003; Chang y cols., 2008; Parker y cols., 2009).

Aunque la RPc se asocia con un buen pronóstico en la mayoría de los pacientes, algunas mujeres que alcanzan una RPc tras el tratamiento neoadyuvante, presentan una recaída de la enfermedad. Algunos estudios han intentado identificar factores relacionados con la recurrencia en este tipo de pacientes, habiéndose relacionado con la positividad del Her2 y la afectación ganglionar tras la cirugía (González-Angulo y cols., 2005; Guarneri y cols., 2006; Tanioka y cols., 2010). Del mismo modo, se sabe que hay pacientes que no alcanzan una RPc y tienen una excelente supervivencia: dentro de este grupo se ha asociado a los RH positivos y al fenotipo luminal A (Ring y cols., 2004; Guarneri y cols., 2006).

II. El proceso de carcinogénesis

II.1. Concepto

Desde hace ya muchos años se ha asumido como origen del cáncer, la proliferación incontrolada. Sin embargo, este proceso es común en tumores que consideramos benignos y no suponen ningún peligro para la vida. Esta proliferación incontrolada es consecuencia de alteraciones genéticas que determinan la activación de oncogenes o la represión de funciones supresoras de la proliferación celular.

Las características biológicas que definen la célula cancerígena son la invasividad, la capacidad de inducir neoangiogénesis y la metastatización:

1.-La invasividad determina la diseminación local de las células tumorales infiltrando y afectando estructuras y tejidos vecinos.

2.-La angiogénesis hace posible, por un lado, aportar nutrientes necesarios para el crecimiento tumoral, y por otro, permite diseminar el tumor a distancia (Folkman y cols., 1995; Hanahan y col., 1996; Feige y cols., 2000).

3.-La metastatización supone el establecimiento de focos tumorales con crecimiento autónomo y distante del tumor primario (Pantel K y cols., 1999; Hellman S y cols., 1997). Habitualmente es la característica que acaba con la vida del paciente, por lo que la detección precoz de metástasis o micrometástasis es un tema de bastante

interés en la investigación del cáncer (Klein CA y cols., 2002; Schmidt-Kittler O y col., 2003).

El origen de estos eventos proliferativos es conocido como carcinogénesis y se define como un complejo proceso dinámico en el que intervienen un elevado número de variables y se desarrolla a lo largo de múltiples etapas temporales y espaciales (Grizzi y cols., 2006). Es decir, la oncogénesis tiene una base multifactorial desencadenada por una serie de eventos alterantes del material genético irreversibles (genotóxicos) y/o reversibles (epigenéticos), lo que ocasiona un desequilibrio en el balance entre la proliferación y la muerte celular existente en los tejidos, como consecuencia de una expresión exagerada de aquellos genes implicados en la proliferación celular, disminución de los factores pro apoptóticos y antiproliferativos, y aumento de las aberraciones en el material genético como consecuencia del fracaso de los mecanismos reparadores. Estos factores actuando en conjunto promueven la aparición de células con una carga mutacional elevada, capaces de escapar a los mecanismos de regulación fisiológica como la apoptosis, y con una gran habilidad proliferativa, dando lugar a multitud de clones que se expanden, constituyendo una neoplasia, que si se acompaña de destrucción e invasión de tejidos adyacentes se considera maligna y recibe el nombre de cáncer (Figura 4).

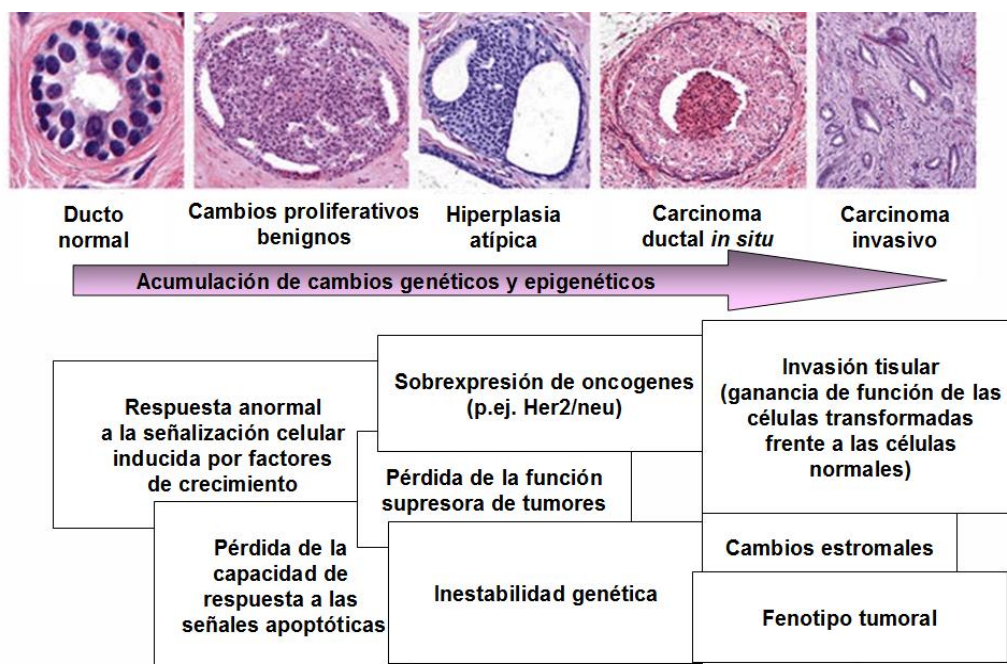


Figura 4. Secuencia de imágenes que ilustran la transformación oncogénica y esquema de los principales eventos que la acompañan, en el tejido mamario.

Ya se conocen más de 350 genes relacionados con el cáncer, que en conjunto representan ya más del 1 % de todo el genoma y cuyo número se verá probablemente incrementado en los próximos años de forma significativa.

Todas las alteraciones moleculares que tienen capacidad de transformar una célula en maligna se denominan oncogénicas. Es importante señalar que una única alteración molecular no implica necesariamente un diagnóstico de malignidad, ya que en la mayoría de tumores se requiere, al menos, la acumulación de 6 alteraciones moleculares en diferentes vías bioquímicas que posteriormente se comentarán (Morin y col., 2006).

En los últimos años ha habido un aumento considerable del conocimiento de las alteraciones moleculares en grandes grupos de tumores con los estudios de arrays de expresión de ARN. Sin embargo, la gran cantidad de información que han aportado todos estos estudios han complicado enormemente la comprensión de los mecanismos del cáncer. No obstante, dicha información es enormemente valiosa y, posiblemente tras estudios de validación por PCR y por detección de proteínas, y utilizando grandes series de casos con seguimiento clínico, se podrá realmente contrastar la importancia de dichos resultados y asentar su aplicación diagnóstica y clínica.

II.2. Vías bioquímicas alteradas en la carcinogénesis

La enorme complejidad y heterogeneidad de alteraciones moleculares pueden entenderse en la actualidad más fácilmente si consideramos las cinco grandes vías bioquímicas que están alteradas en los tumores humanos. Estas cinco grandes vías bioquímicas implican, de forma general, a todos los mecanismos de supervivencias y crecimiento de la propia célula tumoral, y comprenden específicamente las alteraciones en la regulación de la apoptosis, de la progresión del ciclo celular, la inmortalización, adquirir la suficiencia en señales de crecimiento y finalmente adquirir la capacidad de invasividad y la angiogénesis. En cada una de estas vías existen multitud de genes/proteínas implicados, en rutas y cascadas con una marcada interrelación entre ellos. Por tanto, va a ser la alteración de dichas vías bioquímicas y no un gen concreto lo que determine la transformación celular.

II.2.1. Suficiencia en señales de crecimiento

Las células en condiciones normales requieren una estimulación a través de señales o factores de crecimiento que desencadenen diferenciación, migración, angiogénesis, proliferación o regulen la supervivencia según la situación.

En situaciones de malignidad, es frecuente que la célula neoplásica sea capaz de generar de forma autónoma o incontrolada señales de supervivencia o proliferación, por diferentes mecanismos. El primer mecanismo necesita la secreción aumentada de ligandos o factores de estimulación que se unen a los receptores de membrana. Se han descrito alteraciones de este tipo en carcinomas escamosos de cabeza y cuello con gran secreción de TGF- α que estimula el EGFR de las células tumorales (Grandis and Tweardy, 1993; O-Charoenrat and cols., 2000; Zhang y cols., 2004; Du y cols., 2005; Kalyankrshna and Grandis, 2006). El segundo mecanismo es el de la sobreexpresión o aumento de receptores en la superficie de la célula, lo que implica el aumento de señales que se envían al núcleo, frecuentemente debido a una amplificación en el gen que codifica el receptor. El ejemplo clásico de este mecanismo es el de la amplificación/sobreexpresión de Her2 en cáncer de mama (Cuadros y Villegas, 2009;

Ross, 2009; Couturier y cols., 2008; Ross y cols., 2003). El tercer mecanismo se basa en la presencia de formas mutantes de los receptores, constitutivamente activas, que no requieren unión a ligandos, y que además son difícilmente degradadas por la propia célula. Este mecanismo se ha descrito en formas truncadas del EGFR en cáncer de pulmón no microcítico (Shigematsu and Gazdar., 2006; Shigematsu and cols., 2005; Paez y cols., 2004). El cuarto mecanismo implica la disregulación de estas señales por mecanismos de dimerización de un determinado receptor con receptores de su misma familia, apareciendo en la membrana celular formas combinadas de éstos, con gran capacidad de emisión de señales hacia el interior, o bien de señales con mayor potencia proliferativa. Esta alteración se ha descrito también en el cáncer de mama entre el receptor Her2 y los receptores Her1 y Her3 (Witton y cols., 2003; Sassen y cols., 2008). Finalmente, pueden encontrarse alteradas las proteínas que participan en las cascadas de señalización intracelular o que regulan estas cascadas, las mutaciones de genes de familia Ras, del PTEN (Tsutsui y col., 2005), o de la PI3-K, etc (Jiang y col., 2008). De estas rutas, la más conocidas e importantes hoy en día son las rutas de Ras-Raf-MAPK (ERK) y la ruta de PI3K-AKT-mTOR (Manning y cols., 2007).

II.2.2. Insensibilidad a señales antiproliferativas

El control de la proliferación celular está orquestado por varios genes supresores que de una forma fina y redundante paralizan el ciclo celular. De éstos el esencial es la proteína del retinoblastoma (pRb), que cuando se fosforila libera una serie de factores de transcripción como el E2F, que inician la entrada en el ciclo celular. El control del estado de fosforilación de la proteína del retinoblastoma depende de múltiples proteínas, como las CDKs (quinasas dependientes del ciclo celular), las ciclinas, así como algunas proteínas o genes supresores, entre los que se encuentran p16, p15, p21, p53 y p27. Cualquier alteración en estas proteínas reguladoras de la fosforilación de pRb tiene potencial oncogénico y de alteración en el control del ciclo celular, provocando que la célula sea insensible a las señales de stop del ciclo o antiproliferativas que reciba (Burkhardt and Sage, 2008).

II.2.3. Apoptosis

La muerte celular programada o apoptosis es una forma común de muerte celular durante la embriogénesis, carcinogénesis y selección clonal del sistema inmune. Sin embargo, un defecto o un exceso de apoptosis se encuentra implicado en diferentes situaciones fisiopatológicas, como el cáncer (Schwartzman y Cidlowski, 1993; Reed, 1999).

Existen dos vías alternativas para iniciar el proceso de apoptosis: una vía mediada por receptores de muerte situados en la superficie celular, denominada vía extrínseca, y otra mediada a través de la mitocondria o vía intrínseca. Ambas vías confluyen en la activación de las caspasas (una familia de cisteín-aspartato proteasas) que producen la lisis de numerosos sustratos celulares conduciendo a la muerte por apoptosis (Krammer, 1999; Schmitz y cols., 2000). Las caspasas mejor caracterizadas en este mecanismo son las caspasas 3, 9, y 8. Estas caspasas sufren un corte o clivaje que las hace activas e inicia el proceso de la apoptosis, dando como resultado la muerte irreversible de las células en condiciones de salud, lo que permite la regeneración de los tejidos, elimina a

las células envejecidas, conforma la compleja arquitectura de órganos y tejidos, y destruye células que reaccionan contra el propio organismo o que salen de control dividiéndose inadecuadamente. Cualquier alteración en una célula tumoral de estas proteínas inclina la balanza hacia una mayor supervivencia o resistencia a la apoptosis celular o hacia una tasa de apoptosis mayor.

La maquinaria apoptótica se encuentra estrechamente regulada a varios niveles. Los FLIPs interfieren con el inicio de la apoptosis, directamente a nivel de los receptores de muerte, ya que poseen homología con la caspasa 8 (Krueger y cols., 2001).

Los miembros de la familia Bcl-2 son un importante grupo de reguladores de la apoptosis a nivel mitocondrial. Se dividen en miembros proapoptóticos (BAX, BAK, BOK/MTD, Bcl-xs, BID, BAD, BIK/NBK, BLK, HRK/DP5, BIM/BOD, NIP3, NIX, NOXA, PUMA, BMF) y antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, MCL1, A1/BFL1, BOO/DIVA, NR-13) atendiendo a sus funciones. Las proteínas de la familia Bcl-2 regulan la permeabilidad de la membrana mitocondrial.

Un tercer grupo de reguladores lo constituyen los IAP (proteínas inhibidoras de la apoptosis). Los IAPs se unen a las caspasas inhibiéndolas o bien actuando como ubiquitin-ligasas que promueven la degradación de las caspasas que se unen (Tamm y cols., 1998; Deveraux y Reed, 1999). Se han encontrado ocho genes que codifican para estas proteínas, cuyos nombres son: NAIP, c-IAP-1, c-IAP-2, XIAP, Survivina (ver el apartado III.1.3.2.), ML-IAP, Ts-IAP y Apolon. (MehDu y cols., 2000; Verhagen y cols., 2000; Dohi y cols., 2004; Mehrotra y cols., 2010).

II.2.4. Potencial replicativo sin límite o inmortalización celular

Todas las células maduras de los mamíferos tienen un número limitado de divisiones genéticamente programadas y dejan de replicarse tras 30 a 60 divisiones, según el tipo celular y tisular, entrando en el estado conocido como senescencia. La única excepción conocida en condiciones normales es la de las células embrionarias o stem-cells, que son inmortales y son capaces de regenerar los tejidos después de replicarse y diferenciarse. Las células tumorales pierden la capacidad de replicación limitada y de estado de senescencia para garantizar su crecimiento ilimitado. En cada división celular, los finales de los cromosomas se acortan, disminuyendo las generaciones celulares hasta que alcanzan un cierto tamaño limitante no permisivo que dispara la senescencia o apoptosis. Para evitar la senescencia replicativa, la célula puede: a) Adquirir mutaciones que activan el gen de la telomerasa, que actúa manteniendo los telómeros y que está reprimido en células normales, o b) Activar un mecanismo que mantiene los telómeros mediante recombinación (Murnane, 2010; Trentesaux and Riou, 2010).

II.2.5. Angiogénesis

El crecimiento de los tumores depende de la presencia de vasos que aportan nutrientes y factores endocrinos procedentes de la sangre, así como una serie de factores paracrinos segregados por las células endoteliales (Lee y cols., 2000). La formación de nuevos vasos a partir de células progenitoras se denomina vasculogénesis y la formación a partir de vasos preexistentes, angiogénesis; este último proceso es un paso esencial para la formación de metástasis. La densidad de los microvasos formados (MVD, microvessels density) es un marcador cuantitativo, de formación de vasos sanguíneos en los tejidos cancerígenos (Weidner y cols., 1991); varios estudios han demostrado una estrecha relación entre MVD y el pronóstico del cáncer de mama (Tsutsui y cols., 2003; Uzzan y cols., 2004), aunque como se ha comentado anteriormente, este marcador está aún pendiente de validar para su uso en la práctica clínica como factor pronóstico.

Los vasos neoformados en los tumores muestran notables alteraciones morfológicas y funcionales (Jain, 2005). Son tortuosos, de calibre aumentado e irregular, presentando un exceso de ramificaciones y de conexiones intervasculares. El flujo sanguíneo está alterado, lo que da lugar a regiones hipóxicas y zonas de tumor con una marcada disminución del pH. Además, los vasos tumorales son anormalmente permeables (Keck y cols., 1989); el endotelio presenta fenestraciones, numerosas vesículas y agujeros transcelulares, que aumentan la permeabilidad vascular, causando edemas y microhemorragias.

La dependencia existente entre el crecimiento tumoral y los procesos de angiogénesis y vasculogénesis se ha puesto de manifiesto al comprobar los efectos beneficiosos de una terapia antiangiogénica basada en el bloqueo de un factor esencial para la angiogénesis y vasculogénesis: el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y su receptor (Hicklin y cols., 2005). La disminución del flujo sanguíneo, como consecuencia del tratamiento antiangiogénico, compromete el suministro de agentes quimioterápicos al tumor (Ferrara y cols., 1989). Para explicar los beneficios empíricos de la terapia antiangiogénica combinada con la terapia citotóxica, se propuso que el bloqueo del VEGF no sólo reduciría el número de vasos sino que “normalizaría” los vasos residuales, mejorando el flujo sanguíneo del tumor y, en consecuencia, la efectividad de la quimioterapia (Ranieri y cols., 2006; Jain, 2005; Senger y cols., 1993).

II.3. Etapas del proceso de carcinogénesis

Como se ha comentado anteriormente, la oncogénesis es un proceso dinámico cuyo desarrollo en el tiempo se ha dividido conceptualmente en tres etapas:

II.3.1. Iniciación

Es considerada como la primera de las etapas por las que discurre el desarrollo del cáncer. Tiene su inicio en la célula con transformaciones irreversibles en el ADN, por causas hereditarias, o más comúnmente, por causas genéticas o epigenéticas inducidas por agentes carcinógenos. Para que la célula cancerosa adquiera un fenotipo maligno, se requieren mutaciones en varios genes diferentes que afecten a vías importantes, como aquellas del ciclo celular, reparación del daño y muerte celular. De este modo, la célula tumoral escapa a los mecanismos reguladores de la proliferación, diferenciación y apoptosis, asegurando que las mutaciones se conservan en los clones posteriores (Chin y Gray, 2008).

II.3.2. Promoción

Es el proceso por el cual las células transformadas anteriormente, aumentan su daño genético por la acción continuada del agente lesivo, así como por el incremento en la posibilidad de nuevas mutaciones derivadas de las sucesivas divisiones celulares (Forman y col., 2004; Eschrich y col., 2006; Chin y Gray, 2008).

La etapa de promoción requiere la presencia continua de estímulos oncogénicos y por tanto es un proceso reversible. En este punto resulta imprescindible la interacción positiva con toda la red de factores de crecimiento, de transcripción, y, en el caso de la mama, factores hormonales que regulan la biología del tejido en el que se aloja (Anderson, 2002; Song y Santen, 2006)

II.3.3. Progresión

La progresión es la etapa final de la oncogénesis y se caracteriza por la acumulación de alteraciones genéticas adicionales, dando lugar a la transición celular desde el fenotipo benigno al transformado. Este proceso se considera irreversible. Durante esta etapa las células tumorales adquieren un fenotipo invasivo que tiene su origen en la expresión de genes relacionados con la remodelación de la matriz extracelular, la motilidad celular y la inducción de la angiogénesis. La interacción entre el carcinoma y los componentes celulares del estroma peritumoral es una novedosa área de conocimiento en oncología molecular, cuyo estudio ha dado lugar a hipótesis que tienen una gran repercusión en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas (Alvaro and cols., 2009; Klaunig y Kamendulis, 2004).

III. Hipoxia y cáncer

Tanto en la fase de iniciación de la carcinogénesis como en las de promoción y progresión, tanto los carcinomas mamarios como otros tumores sólidos, presentan una tasa de crecimiento celular tan elevada, que la vascularización preexistente resulta insuficiente para satisfacer la demanda de oxígeno y nutrientes; por tanto, una de las características más notables del microambiente tumoral es la hipoxia (Vaupel y cols. 1989; Vaupel y cols., 1991; Kimbro y Simons, 2006). Así, las concentraciones de oxígeno en el interior de la masa tumoral son muy variables, de modo que con frecuencia se detectan zonas pobremente oxigenadas con presiones parciales de oxígeno menores de 5mmHg (que corresponden a concentraciones de oxígeno del 0.7%), mientras que los tejidos normales presentan presiones parciales comprendidas entre 24 y 66 mmHg (lo que corresponde a concentraciones del 3.1% y el 8.7% respectivamente) [Raleigh y cols., 1996; Vaupel y cols., 2003].

Esta disminución en la tensión de oxígeno tisular podría iniciar el proceso apoptótico o necrótico de las células transformadas, sin embargo diversos estudios demuestran que éstas previenen la muerte celular desarrollando respuestas adaptativas consistentes en la activación de la expresión de genes implicados en la activación de la apoptosis, proliferación celular y angiogénesis. (Höckel y cols., 1996; Höckel y cols., 1999; Harris, 2002).

Los tumores pobremente oxigenados manifiestan un comportamiento más agresivo que aquellos bien perfundidos. La presencia de bajas presiones parciales de oxígeno dentro del tumor tiene como consecuencia la selección de células con fenotipos tumorales más agresivos, con tasas de mutación más altas y mayor potencial metastático. En diversos estudios la hipoxia se ha asociado con un peor pronóstico y con un aumento del riesgo de metástasis en pacientes con cáncer de mama (Hockel y Vaupel, 2001; Helczynska y cols., 2003; Dales y cols., 2005), pulmón (Volm y cols., 2000; Giatromanolaki y cols., 2001) riñón (Maranchie y cols., 2002; Jiang y cols., 2003), cérvix (Hockel y cols., 1999; Fyles y cols., 2002), cabeza y cuello (Nordsmark y cols., 1996; Brizel y cols., 1997), ovario (Nakayama y cols., 2002) sarcomas de partes blandas (Brizel y cols., 1996), oligodendrogliomas (Birner y cols., 2001) y neuroblastomas (Jogi y cols., 2004).

III.1. Rutas celulares implicadas en el reconocimiento del ambiente hipóxico y en la respuesta al mismo: HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor 1)

El factor de transcripción HIF-1 (Factor Inducible por Hipoxia 1) parece ser el complejo molecular clave en la respuesta celular a la hipoxia, habiéndose centrado sobre él la mayor parte de la investigación relativa a la misma. Fue descubierto en el año 1992 por Semenza y Wang, como un factor nuclear que se unía al promotor del gen de la eritropoyetina únicamente en condiciones de hipoxia (Semenza y cols. 1992; Semenza, 1999; Semenza, 2000; Semenza, 2000; Semenza, 2001; Semenza, 2002).

La proteína HIF-1 es estabilizada cuando se encuentra en un ambiente con bajas presiones de oxígeno y promueve la supervivencia celular activando la transcripción de proto-oncogenes (p53), genes relacionados con el metabolismo de la glucosa (GLUT1), genes relacionados con la apoptosis (survivina), modulación de la eritropoyesis (EPO), factores de crecimiento (IGF) y factores angiogénicos (VEGF) implicados en la selección de los clones celulares que con mayor éxito formarán el tumor y sus metástasis (TGF- α , c-MET) [Forsythe y cols., 1996; Ghoussoub y cols., 1998; Takagi y cols., 1998; Camp y cols., 1999; Zhong y cols., 1999; Chandel y cols., 2000; Humphreys y cols., 2000; Ravi y cols., 2000; Iwao y cols., 2002; Pennacchiotti y cols., 2003; Scarpino y cols., 2004; Hayashi y cols., 2005; Maxwell y cols., 2005; Kimbro y Simon, 2006; Reis-Filho y cols., 2006].

III.1.1. Estructura y función del HIF-1.

HIF-1 es un heterodímero constituido por dos subunidades: HIF-1 β de 91-94 Kda (Wang y cols., 1995) (también conocida como ARNT “Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator” o componente del receptor de hidrocarburos aromáticos) que se expresa de forma constitutiva, y HIF-1 α , de 120-130 KDa, cuya expresión se encuentra fuertemente regulada (Semenza, 2003). Ambas subunidades comparten cierta homología en sus extremos N-terminales, conteniendo un dominio bHLH (“Basic Helix-Loop-Helix” o dominio básico hélice-lazo-hélice) y un dominio PAS (“Per-Arnt-Sim” o dominio auxiliar de dimerización), que están involucrados en la dimerización y en la unión al ADN (Wang y cols., 1995). La heterodimerización de HIF-1 α con HIF-1 β parece ser necesaria para la estabilización del primero en el compartimento nuclear, adquiriendo una configuración espacial que le hace más resistente a la digestión proteolítica (Li y cols., 2005).

HIF-1 α lleva a cabo su actividad transcripcional a través de dos dominios, denominados dominios de transactivación (TAD's), uno el amino Terminal (TAD-N, aminoácidos 532 a 564), y otro el carboxilo Terminal (TAD-C, aminoácidos 786 a 826). Estos dominios, además de ser fundamentales para la interacción de la proteína con co-activadores de la transcripción como CBP/p300, contienen aminoácidos fundamentales para los procesos de estabilización y regulación de la actividad transcripcional de la proteína bajo condiciones de hipoxia (Bruick y McKnight, 2002). Estos aminoácidos son las prolina en posiciones 402 y 564, la lisina en posición 532, y la asparraginasa en posición 803 (Figura 5). El dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD, aminoácidos 401 a 608), se solapa en parte con el TAD-N y, como su nombre indica, contiene aminoácidos esenciales para la regulación post-transcripcional de HIF-1 α (Chan y cols., 2005).

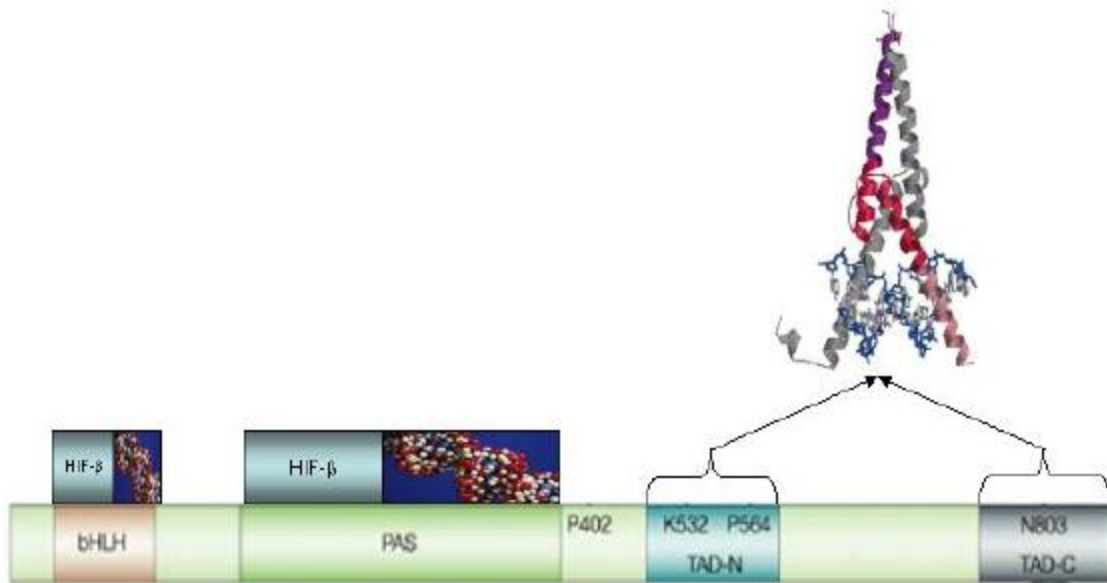


Figura 5 , Dominios proteicos de HIF-1 α . Se representan los dominios de HIF-1 α , así como los aminoácidos fundamentales en la regulación dependiente de oxígeno de la proteína. Se muestran las interacciones con HIF-1 β , las zonas de unión al ADN, y los dominios implicados en la actividad transcripcional. bHLH: dominio básico hélice-lazo-hélice. PAS: dominio auxiliar de dimerización. TAD-N: dominio de transactivación amino terminal. TAD-C: dominio de transactivación carboxilo terminal. P402 y P564: Prolinas en posiciones 402 y 564. K532: Lisina en posición 532. N803: Asparraginasa en posición 803.

Como se ha comentado anteriormente, la heterodimerización de HIF-1 α con HIF-1 β es necesaria para la estabilización del primero en el núcleo celular (Jian y cols., 1996). Una vez allí, HIF-1 reconoce como sustratos a aquellos genes que presentan en su región promotora secuencias denominadas HRE (Hipoxia Response Elements). Los HRE constan de dos o más secuencias de unión a HIF-1, llamadas HBS (HIF Binding Site) [Figura 6].

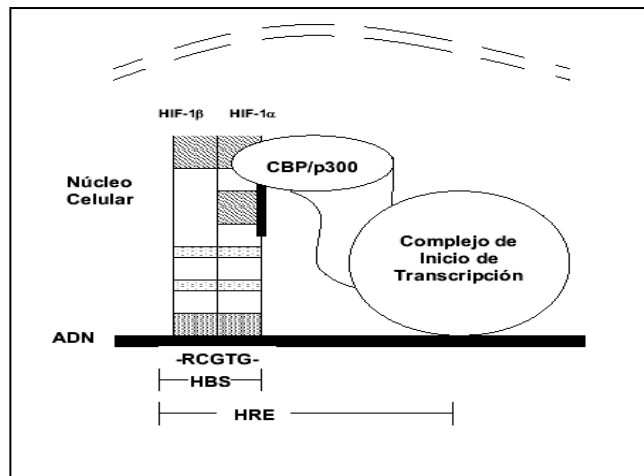


Figura 6. Unión de HIF-1 al núcleo celular.

Se considera que, en condiciones de hipoxia, HIF-1 podría transcribir entre un 1% y un 5% del conjunto de los genes humanos, habiéndose identificado más de 80 genes sustratos directos de HIF-1 (Dachs y cols., 1997; Mc Mahon y cols., 2005) [Figura 7]. Algunos de estos genes resultan especialmente relevantes para la progresión tumoral. En concreto, aquellos que codifican factores promotores de la invasividad celular y angiogénesis como el VEGF (Shweiki y cols., 1992; Katsuta y cols., 2005; Mizukami y cols., 2007) o genes que permitan a la célula sobrevivir independientemente de la presencia de estímulos que desencadenarían la muerte celular programada, como la survivina, o anhidrasa carbónica 9 (CA IX) que acidifica el microambiente tumoral, dando lugar a uno potencialmente agresivo (Maxwell y cols., 1997; Wykoff y col., 2000; Chia y cols., 2001; Lancaster y cols., 2001; Colpaert y cols., 2003; Span y cols., 2003).

Sin embargo, también hay trabajos que hablan del papel del HIF-1 en la regulación de genes que conducen a un fenotipo pro-apoptótico, considerándolo como un factor positivo dentro de los tumores sólidos. Este aparente efecto dual ha hecho incapié en modelos tumorales que han demostrado que el HIF-1 puede aumentar el crecimiento tumoral y la angiogénesis, y también hay datos que muestran que el HIF-1 tiene cierta actividad supresora de tumores (Carmeliet y cols., 1998; Ryan y cols., 1998; Ryen y cols., 2000).

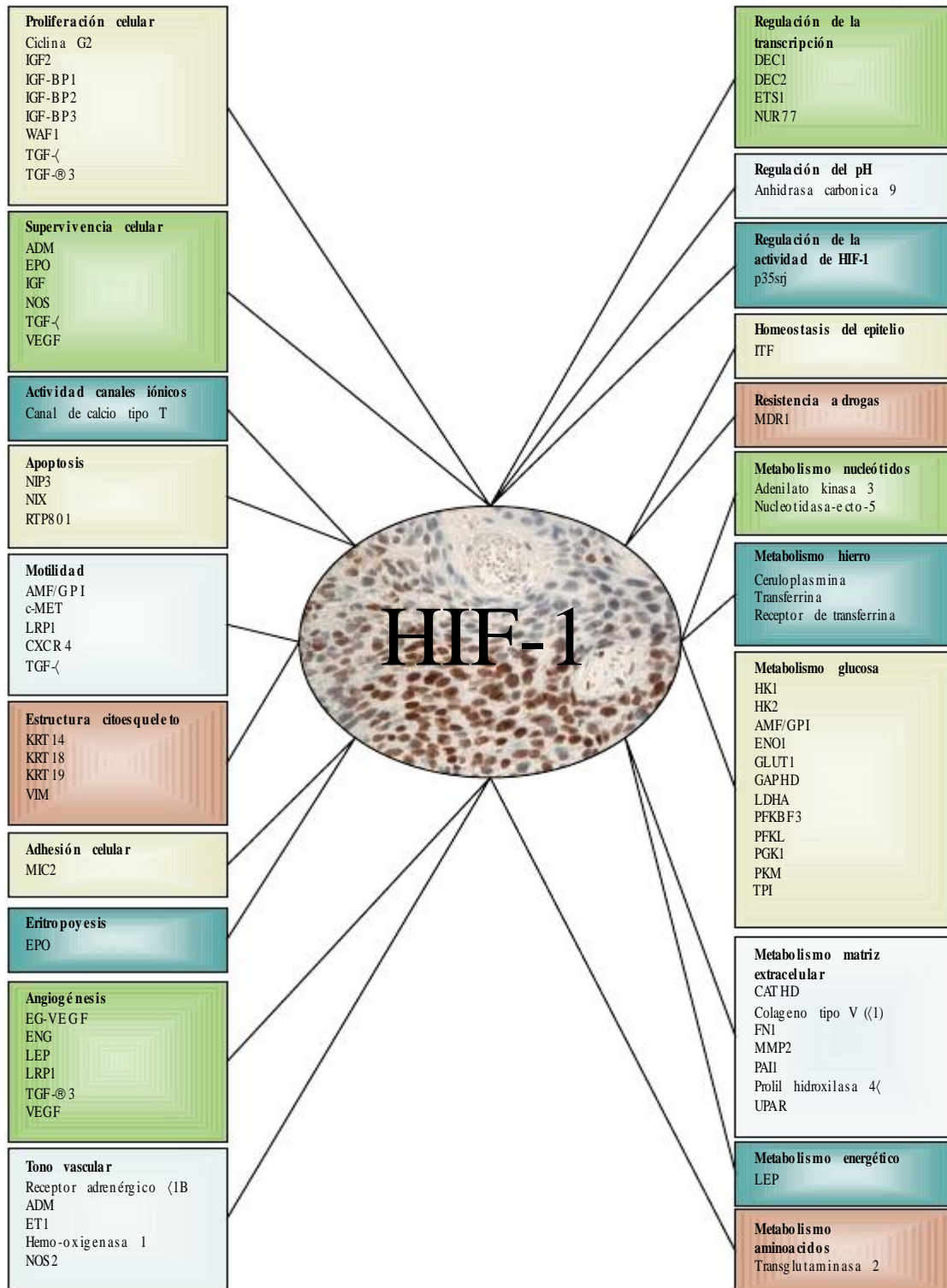


Figura 7. Genes relacionados con la transcripción del HIF-1.

III.1.2. Mecanismos de regulación de HIF-1 α

La transcripción de HIF-1 depende de los mecanismos de regulación de HIF-1 α . Los niveles intracelulares de HIF-1 α están condicionados fundamentalmente por un mecanismo de regulación pos-traduccional dependiente de la concentración intracelular de oxígeno. Sin embargo, otros mecanismos, no relacionados con el grado de oxigenación tisular, contribuyen al control de los niveles de esta proteína en el interior de las células.

III.1.2.1. Regulación independiente de la concentración intracelular de oxígeno

Se sabe que muchas citoquinas y factores de crecimiento activadores de receptores del tipo tirosina quinasa (RTKs), son también capaces de inducir HIF-1 α , repercutiendo sobre un incremento en los niveles de este factor transcripcional. Entre estas moléculas activadoras se encuentran: insulina (Zelzer y cols., 1998), factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF-2) [Feldser y cols., 1999; Fukuda y cols., 2002], interluquina-1 β (IL-1 β) [Hellwig-Burgel y cols., 1999], factor de necrosis tumoral α (TNF- α), factor de crecimiento epidérmico (EGF) [Zhong y cols., 2000], trombina (Gorlach y cols., 2001), endotelina 1 (ET-1) [Spinella y cols., 2002], y heregulina (HER2) [Laughner y cols., 2001]. Esta capacidad activadora también se ha asociado a mutaciones oncogénicas en RAS (Blancher y cols., 2001), p53 (Blagosklonny y cols., 1998) y PTEN (Zundel y cols., 2000) [Figura 8].

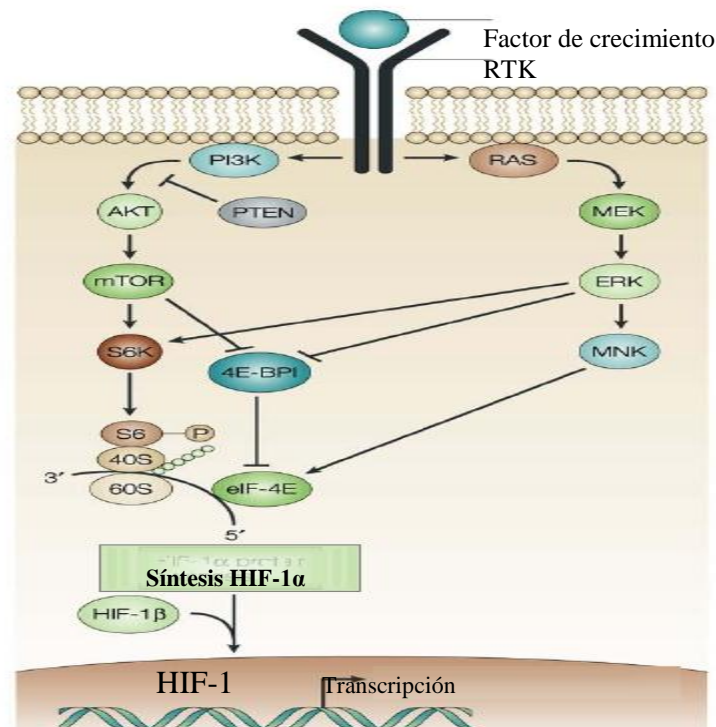


Figura 8. Regulación del HIF-1 α independiente de la concentración de oxígeno.

Uno de los receptores con actividad tirosin-kinasa relacionado con la activación de HIF-1 α es el EGFR (factor de crecimiento epidérmico), que es activado por moléculas como TGF- α y EGF. Esta vía de activación de HIF-1 α ha sido descrita en diferentes tumores (Zhong y cols., 2000; Khatua y cols., 2003; Peng y cols., 2006; Lu y cols., Lu y cols., 2007; Secades y cols., 2009; Park y cols., 2011).

De manera general, el mecanismo por el cual todos ellos inducen HIF-1 α incluye un incremento en la síntesis de la proteína, a diferencia de lo que ocurre en hipoxia, en la que la estabilidad del factor está asociada a una disminución en la tasa de degradación (Semenza, 2000). Actualmente conocemos las rutas moleculares que modulan la síntesis de HIF-1 α de forma independiente a las concentraciones intracelulares de oxígeno. Se han descrito múltiples vías de señalización intracelular que trabajan de forma paralela y/o a través de interconexiones entre ellas que promueven el crecimiento, desarrollo y supervivencia de las células tumorales. Entre ellas destaca:

1.- **Vía “phosphatidyl-inositol 3-kinase/protein kinase B” (PI3K/AKT).** AKT es una serina-treonina que actúa mediando una señal intracelular que afecta a multitud de funciones: apoptosis celular, metabolismo de la glucosa, progresión del ciclo celular, angiogénesis, invasión celular y metástasis, etc, tras ser estimulada por diferentes receptores de membrana (Cross y cols., 1995; del Peso y cols., 1997; Franke y cols., 1997; Cardone y cols., 1998; Brunet y cols., 1999; Datta y cols., 1999; Sun y cols., 2001; Testa y Bellacosa, 2001; Nicholson y Anderson, 2002; Okumura y cols., 2002; Vivanco y Sawyers, 2002; Liao y Hung, 2003; Brazil y cols., 2004; Katayama y cols., 2005; Lin y cols., 2005; Morgensztern y McLeod, 2005; Song y cols., 2005; Vandermoere y cols., 2005; Bhaskar y Hay, 2007; Prueitt y cols., 2007; Chin y Toker, 2009).

A este nivel actúa el gen y su proteína PTEN, un gen supresor comentado anteriormente, cuya expresión se encuentra reducida, ausente, mutada o delecionada en algunos tipos de tumores (Li y cols., 1997; Stambolic y cols., 1998; Khan y cols., 2004; Chalhoub y Baker, 2009).

Una vez estimulado el receptor de membrana, la PI3K (fosfoinositol 3 kinasa) convierte el segundo mensajero fosfatidil inositol P₂ en fosfatidil inositol P₃, lo que induce la acción de AKT (Arcaro y Guerreiro, 2007). PI3K es un heterodímero de 2 subunidades de 110 KDa y 85 KDa respectivamente; la primera es homóloga a otras protein-kinasas y está compuesta de una serina-treonina y una kinasa con actividad fosforiladora de fosfoinosítidos, de tal forma, que este receptor transmembrana hace que una señal extracelular se transforme en una señal intracelular. AKT tiene especial afinidad por los fosfoinosítidos D3 fosforilados; su activación da lugar a cambios conformacionales de la proteína fosforilándose en 2 residuos: Tre 308 y Serina 473 (Chan y cols., 1999; Di Cristofano y Pandolfi, 2000; Vazquez y Seller, 2000; Weng y cols., 2001; Paez y Sellers, 2003; Woodgett, 2005), lo que pone en marcha las múltiples cascadas mediadas por esta vía:

- Angiogénesis e invasión celular mediante eNOS (Jiang y Liu, 2008; Jiang y Lu, 2009)
- Invasión celular mediante NF-KB.
- Metabolismo de la glucosa mediante regulación de 6-fosfofumarato-2 kinasa.

- Regulación del ciclo celular mediante modulación de Mdm2, p21, p27, ciclina D y vía mTOR (mediante esta vía, como se describe más adelante, se produce también una regulación de los niveles de HIF-1 α) [Minet y cols., 2001; Zhou y cols., 2001; Shin y cols., 2002].

Por tanto, la activación de AKT puede ocurrir a diferentes niveles: en primer lugar, por delección y mutación de PTEN (Chalhoub y Baker, 2009); por otro lado, a través de la amplificación de AKT (Staal, 1987), y en tercer lugar, debido a la amplificación o mutación de PIK3CA (Isakoff y cols., 2005; Stemke-Hale y cols., 2008; Yuan y Cantley, 2008; Vasudevan y cols., 2009).

La sobreexpresión de AKT ha sido demostrada en varios tumores humanos a través de diferentes técnicas (Blanco-Aparicio y cols., 2007; Al-Bazz y cols., 2009) siendo la inmunohistoquímica una de las más utilizadas (Zhong y cols., 2000; Jiang B y cols., 2001; Skinner HD y cols., 2004; Altamore y Testa, 2005; Shtilbans y cols., 2008;). Se ha relacionado con resistencia al tratamiento en el cáncer de pulmón (Brognard y cols., 2001). Sin embargo, en otros estudios se ha relacionado a algunos citostáticos, como los taxanos, con la inactivación de AKT, y la consiguiente disminución de la supervivencia de la célula tumoral (Nakashio y cols., 2000; Mackeigan y cols., 2002; Asakuma y cols., 2003; Swanton y cols., 2007).

En el cáncer de mama, la sobreexpresión de la ruta AKT se ha relacionado con factores de mal pronóstico, como Her2+, resistencia al tratamiento con tratuzumab y menor ILE y SG (Perez-Tenorio G y cols., 2002; Holbro y cols., 2003; Schmitz KJ y cols., 2004; Zhou y cols., 2004; Gort y cols., 2006; Nahta y cols., 2006; Wu y cols., 2008; Yu y cols., 2010). También se ha estudiado la relación de la sobreexpresión de AKT y la respuesta al tratamiento hormonal, encontrándose peor respuesta y mayor resistencia en este grupo de pacientes (Stal y cols., 2003; Schiff y cols., 2004; Kirkegaard y cols., 2005; Likhite y cols., 2006; Tokunaga y cols., 2006; Tokunaga y cols., 2006; Tokunaga y cols., 2006). En estudios in vitro también se ha demostrado una resistencia al tratamiento quimioterápico en relación a la expresión de AKT y se ha postulado con una posible vía de inhibición, para favorecer la sensibilidad a las antraciclinas (Clark y cols., 2002; Knuefermann y cols., 2003; Mondesire y cols., 2004; Lee y cols., 2006; Liang y cols., 2006; Roudier y cols., 2006).

2.- Vía AKT-mTOR (mammalian target of rapamycin). La mTOR es una serina-treonina kinasa clave en la regulación del crecimiento y la proliferación celular (Hidalgo y Rowinsky, 2000; Sarbassov y cols., 2004; Sarbassov y cols., 2005). Además actúa regulando la síntesis de proteínas fundamentales en el ciclo celular como la ciclina D1 y C-myc. Esta vía se relacionó por primera vez con el HIF-1 en el cáncer renal, al demostrarse que la activación de la vía mTOR estimula los niveles y la actividad de HIF-1 α en pacientes con pérdida de función del gen VHL (Von Hippel-Lindau) [Iliopoulos y cols., 1996; Hudson y cols., 2002; Figlin y cols., 2005]. Posteriormente la inhibición de esta vía, como terapia molecular, ha sido testada tanto en cáncer renal, como en otro tipo de tumores, con resultados prometedores (Chan y cols., 2005; Meric-Bernstam y Esteva, 2005; Witzig y cols., 2005; Frost y cols., 2007; Hudes y cols., 2007).

3.- **Vía Ras/Raf/MAPK (mitogen activated protein kinasa).** Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) forman una familia de serina/treonina quinasas con un papel fundamental en la transducción de señales desde la membrana hasta el núcleo celular, a través de cascadas de fosforilación. Son activadas por un gran número de estímulos, y modulan eventos muy relevantes en la célula, como la expresión génica, migración celular, supervivencia, progresión del ciclo celular, diferenciación celular y la apoptosis (Brunet y cols., 1999; English y cols., 1999; Schaeffer y Weber, 1999).

Fundamentalmente mediada por el EGF, esta vía también puede ser activada a través del VEGFR y PDGFR en las células endoteliales, de tal forma que juega un papel importante en la regulación de la supervivencia de las células endoteliales durante el proceso de angiogénesis. Una vez unido ligando y receptor, este último adquiere dimensión dimérica uniéndose a otro similar lo que activa su función iniciando la fosforilación de la proteína Ras (Figura 9). Esto activa una cascada de fosforilaciones hasta activar la MAPK, que internaliza esta señal al núcleo celular activando otras proteínas (como las ciclinas) y quinasas ciclina-dependientes que promueven la división celular (Lundberg y Weinberg, 1999). Es decir, las MAPK constituyen un sistema en cascada de señalización que se va amplificando, donde están implicadas tres proteínas homólogas, una MAPKKK, una MAPKK y una MAPK (Santen y cols., 2002).

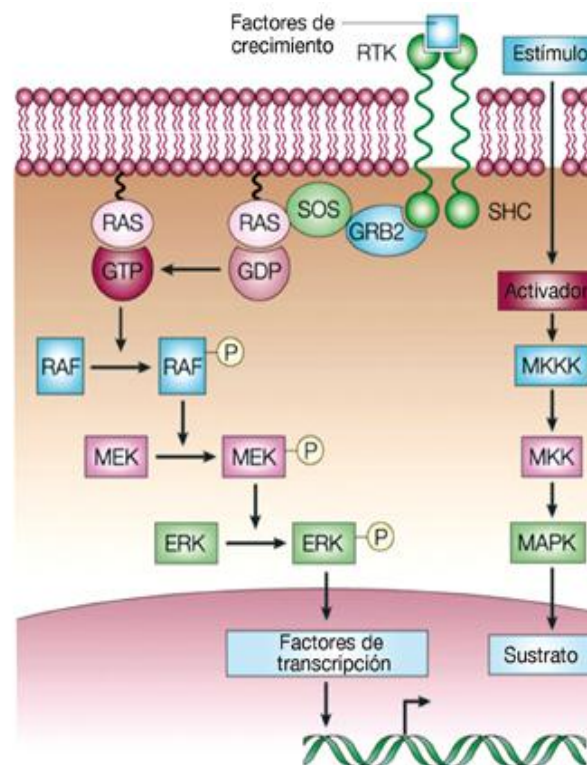


Figura 9. Vía de activación y señalización de MAPK.

Existen tres subfamilias de MAPK: las proteínas ERK (quinasas reguladas por señales extracelulares), las quinasas JNK (c-Jun NH2 quinasa terminal) y las cuatro enzimas p38 (Johnson and Lapadat, 2002). Dentro de la vía ERK, encontramos dos proteínas, ERK1 y ERK2 que están expresadas y se han visto implicadas en un gran número de procesos celulares (Hagemann and Blank, 2001).

Como se ha comentado anteriormente, los factores de crecimiento (EGF, IGF-1, insulina, TGF, etc) u otras interacciones ligando-receptor, como los estrógenos y progestágenos, pueden activar la ruta MAPK tras la unión a sus respectivos receptores. En general, los receptores de estos ligandos actúan a través de la proteína GTP-Ras que interacciona y activa la primera quinasa de la cascada: Raf. En la ruta ERK, la proteína Raf correspondería a la MAPKKK, MEK1 a la MAPKK y ERK1/2 a la MAPK propiamente dicha (Figura 9) [Lee and McCubrey, 2002].

La actividad de la ruta ERK1/2 (p42/44 MAPK) está aumentada en un gran número de tumores (Mandell y cols., 1998; Gioeli y cols., 1999) y parece ser que la hiperexpresión de esta ruta juega un papel importante tanto en la iniciación, como en el potencial metastásico del cáncer de mama (Sivaraman y cols., 1997; Wang y cols., 1998; Maemura y cols., 1999; Salh y cols., 1999; Mueller y cols., 2000; Santen y cols., 2002; Li and Sparano, 2003). También se ha relacionado la alteración de esta vía con la resistencia al tratamiento citostático y hormonal (Kurokawa y cols., 2000; Gee y cols., 2001; Martin y cols., 2003; Yang y cols., 2004; Osborne y cols., 2005; McCubrey y cols., 2006; Eralp y cols., 2008; McGlynn y cols., 2009).

Con respecto al tratamiento hormonal, son varios los autores que han postulado sobre el mecanismo de resistencia al mismo. Muchas pacientes con cáncer de mama que expresan altos niveles de RE son insensibles a la terapia endocrina y todas las pacientes con enfermedad avanzada desarrollan resistencia al tratamiento en algún momento. Parece ser que tanto EGFR como Her2 parecen estar detrás de estas circunstancias, probablemente como consecuencia de las interacciones entre el propio RE y rutas moleculares de los factores de crecimiento, como MAPK y AKT (Nicholson y cols., 1993; Nicholson y cols., 1994; Nichoslson y cols., 1994; Pietras y cols., 1995; Yarden y cols., 1996; Nicholson y cols., 1997; Coutts y Murphy, 1998; Gee y cols., 1999; Houston y cols., 1999; Nicholson y cols., 1999; Kato y cols., 2000; Nicholson y Gee, 2000; Shim y cols., 2000; Lee y cols., 2001; Schiff y cols., 2003; Osborne y Schiff, 2005).

Los datos preclínicos han demostrado que los compuestos dirigidos a bloquear la acción de Her1 o Her2 pueden restaurar en líneas celulares la sensibilidad perdida al tratamiento hormonal y retrasar la aparición de resistencias (Massarweh y cols., 2002; Massarweh y cols., 2002; Knowlden y cols., 2003). También es conocida la capacidad de MAPK para activar al RE de manera independiente al sustrato, a través de la fosforilación del RE en Ser-118 y Ser-167 (en este último caso también puede a través de AKT) [Arnold y cols., 1994; Kato y cols., 1995; Bunone y cols., 1996; Joel y cols., 1998; Jeng y cols., 2000; Campbell y cols., 2001; Clark y cols., 2001; Chen y cols., 2002; Murphy y cols., 2004; Yamashita y cols., 2005; Yamashita y cols., 2008].

El fenotipo del RE generalmente permanece estable durante el tratamiento hormonal, pero algunas pacientes que expresan RE inicialmente, pierden el receptor en el momento en que recaen (Spataro y cols., 1992; Kuukasjärvi y cols., 1997). También se ha sugerido que los tumores de mama RE- se desarrollan a partir de células neoplásicas con RE+ que están sometidas a presiones ejercidas por la retirada de estrógenos, la hipoxia, o la sobreexpresión de EGFR y/o Her2, con la consiguiente hiperactivación de MAPK, relacionándose a esta vía con la pérdida de expresión de RE (Oh y cols., 2001; Creighton y cols., 2006).

Por tanto, la acción de HIF-1 α , puede estar regulada mediante la acción de varias cascadas independientes, de tal forma que tanto factores de crecimiento como otras señales pueden desencadenar la respuesta de HIF-1 α , por medio de la vía PI3K/AKT, mTOR, RAS/RAF/MAPK,... aumentando la síntesis de HIF-1 α (Lim y cols., 2004; Minet y cols., 2000). Actualmente, no existe una evidencia científica que permita discernir qué criterio o circunstancias determina la selección de una vía de transducción concreta, o si en cambio, ambas son equivalentes.

III.1.2.2. Regulación dependiente de la concentración intracelular de oxígeno

En presencia de oxígeno, HIF-1 α sufre modificaciones post-traduccionales por parte de hidroxilasas (PHDs1-3), las cuales hidroxilan residuos de Pro^{402/564} y de Asn⁸⁰⁴ que se localizan en los dominios ODD y TADs, respectivamente. Las hidroxilasas requieren O₂, Fe⁺², 2-oxoglutarato y ascorbato como cofactores para llevar a cabo su actividad enzimática (Epstein y cols., 2001). Mediante el empleo de técnicas de ARN de interferencia para inhibir la actividad de las PHDs ha podido demostrarse que la PHD2 es la principal responsable de la hidroxilación de HIF-1 α . De los dos residuos de prolina, la 564 parece ser fundamental para que HIF-1 α pueda degradarse (Jaakkola y cols., 2001; Lando y cols., 2002; Appelhoff y cols., 2004; Soilleux y cols., 2005).

La forma hidroxilada de la subunidad HIF-1 α es reconocida por la proteína supresora de tumores de von Hippel- Lindau o pVHL, que es un miembro del complejo de ubiquitinización E3, de tal forma que se une a ella y dirige su eliminación a través del proteosoma 26S (Salceda y cols., 1997; Huang y cols., 1998; Kallio y cols., 1999; Maxwell y cols., 1999; Cockman y cols., 2000; Ohh y cols., 2000; Ivan y cols., 2001). En condiciones de hipoxia, la actividad de las hidroxilasas disminuye y HIF-1 α es fosforilado y translocado al núcleo, donde dimeriza con HIF-1 β y se acopla a su co-activador CBP/p300, permitiendo la transactivación e inducción de genes (Jeon y cols., 2002; Lando y cols., 2002; Wykoff y cols., 2004; Melillo, 2006) [Figura 10].

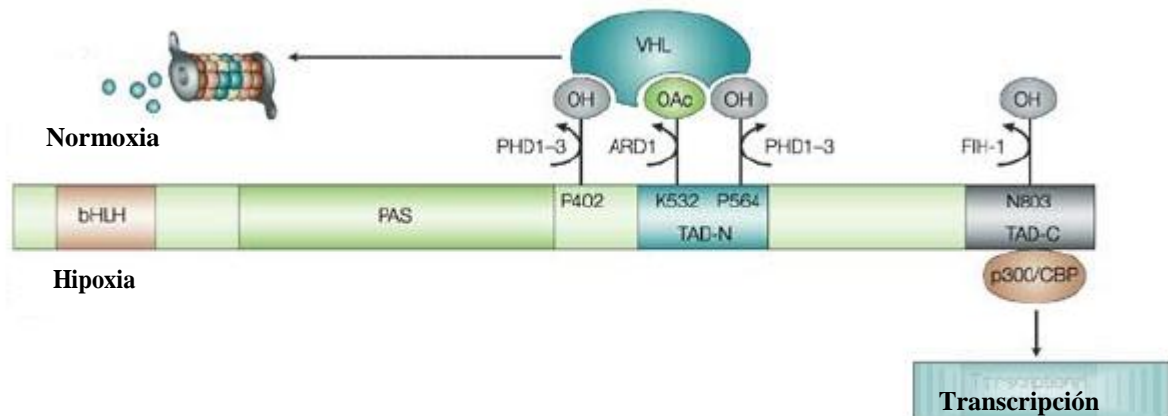


Figura 10. Regulación del HIF-1 α dependiente de la concentración de oxígeno.

Este fue el primer mecanismo molecular de regulación de la actividad de HIF-1 α , dependiente de oxígeno, descrito. Sin embargo, no permitió explicar completamente el modo progresivo mediante el cual la célula adapta su respuesta a la hipoxia en una magnitud inversamente proporcional a la cantidad de oxígeno disponible. Por ello, de forma paralela, se investigó un mecanismo alternativo basado en un sensor de oxígeno diferente capaz de modular la actividad y estabilidad de la subunidad HIF-1 α (Jiang y cols., 1996; Chandel y cols., 1998).

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) generadas por la mitocondria de las células sometidas a condiciones hipóxicas juegan un papel fundamental en el proceso de adaptación celular a la carencia de oxígeno (Mansfield y cols., 2005). La hipoxia inhibe parcialmente el transporte electrónico de la cadena respiratoria mitocondrial, produciendo una serie de cambios en el potencial redox de los transportadores electrónicos que aumentan la producción de ERO con respecto a los producidos en normoxia. Las ERO, tras haber sido transformadas en H₂O₂ por la enzima manganeso-superóxido dismutasa o vía canales iónicos, difunden a través de la membrana mitocondrial hasta el citosol donde actúan como segundos mensajeros en la ruta de señalización intracelular que estabiliza la subunidad HIF-1 α , inhibiendo parcialmente a las PHDs (Huang y cols., 1996). Esta alteración en el transporte electrónico mitocondrial aumenta a medida que la tensión de oxígeno tisular disminuye hasta el umbral que separa la hipoxia de la anoxia, pues en ausencia total de oxígeno las PHDs se encuentran inhibidas (Guzy y cols., 2005).

En relación con los procesos ocurridos en la mitocondria, el óxido nítrico se ha visto también relacionado con la regulación del HIF-1 α . Elevadas concentraciones de óxido nítrico tienen como consecuencia la estabilización de HIF-1 α , independientemente de la concentración de oxígeno molecular a la que una célula se vea expuesta; esta estabilización parece estar mediada por una acumulación de radicales libres (Quintero y cols., 2006). En hipoxia, la presencia de óxido nítrico tiene como consecuencia un aumento en la actividad de las PHD's, pues el óxido nítrico inhibe la cadena de transporte de electrones mitocondrial, lo que conlleva un aumento en la disponibilidad de los sustratos necesarios para la hidroxilación de HIF-1 α (Callapina y cols., 2005).

Así, una célula sometida a condiciones de hipoxia no siempre ha de sobreexpresar HIF-1 α , pues la presencia de moléculas como el óxido nítrico pueden hacer que esta proteína sea digerida en el proteosoma. De igual forma, en condiciones de normoxia, tanto mutaciones del gen VHL que provocan una proteína anómala, como la actividad de oncogenes (v-Src o RasV12) que inhiben la prolil-hidroxilación, hace incapaz la unión de HIF-1 α al complejo pVHL, dando lugar así a un aumento intracelular de HIF-1 α (Blancher y cols., 2001; Chan y cols., 2002; Wykoff y cols., 2004).

III.1.2.3. Otras rutas moleculares reguladoras de la transcripción de HIF-1 α : los factores de transcripción STAT.

Los STATs (Signals Transducers and Activators of Transcription) son una familia de proteínas que se encuentran latentes en el citoplasma hasta su activación. Hasta el momento se han identificado siete genes que codifican para proteínas individuales: STAT1, STAT2, STAT3, STAT5A, STAT5B Y STAT6. Estas proteínas se unen a los residuos de tirosinas fosforilados en los dominios intracelulares de los receptores de factores de crecimiento, donde a su vez van a ser fosforiladas en tirosina por las quinasas citoplasmáticas como las proteínas de la familia JAK y Src (García y cols., 2001; Schindler y Darnell, 1995). Una vez fosforilados los STATs, dimerizan y se traslocan al núcleo donde activan la transcripción al unirse a regiones específicas del DNA en los genes dianas de transcripción (Darnell y cols., 1994; Ihle, 1996; Bromberg y cols., 1999; Bowman y cols., 2000; Bromberg, 2000; Bromberg y Darnell, 2000; Darnell, 2000; Turkson y Jove, 2000; Buettner y cols., 2002; Darnell, 2002; Levy y Darnell, 2002; Levy y Lee, 2002; O'Shea y cols., 2002; Shuai and Liu, 2003; Yu y Jove, 2004).

El papel de los STATs en la oncogénesis ha quedado consolidado debido a que:

a) Se han identificado formas mutadas de STAT3 y STAT5 con actividad constitutiva suficientes, por sí mismas, para inducir transformación celular.

b) Diferentes oncogenes controlan su actividad aberrante.

c) Su actividad constitutiva está asociada con diferentes tumores como en mama, ovario, cabeza y cuello, renal, próstata, colorrectal, páncreas, leucemia (Watson y Miller, 1995; Gouilleux-Gruart y cols., 1996; Huang y cols., 2000; Ni y cols., 2000; Song y Grandis, 2000; Zuyao y cols., 2000; Burke y cols., 2001; Benekli y cols., 2002; Bromberg, 2002; Dhir y cols., 2002; Horiguchi y cols., 2002; Masuda y cols., 2002; Aoki y cols., 2003; Arany y cols., 2003; Hsiao y cols., 2003; Wei y cols., 2003; Hsieh y cols., 2005; Kusaba y cols., 2005; Zhang y cols., 2005; Kusada y cols., 2006).

En el cáncer de mama, la importancia de este factor de transcripción sigue siendo motivo de discusión (Widschwendtere y cols., 2002; Dolled-Filhart y cols., 2003; Shee-Chen y cols., 2008), aunque en el momento actual la opinión que predomina es que STAT3 interviene en el crecimiento y proliferación de esta neoplasia (Berclaz y cols., 2001; Watson, 2001; Reissig y cols., 2001; Dien y cols., 2002; Clevenger, 2004; Hsieh y cols., 2005; Nills Diaz y cols., 2006). En relación a ésto, se ha visto tanto en líneas celulares de cáncer de mama, como en tejidos de cáncer de mama invasivo que

mostraban altos niveles de STAT3 fosforilado una relación significativa con la expresión de receptores de progesterona (RP). Esta interacción estaría implicada en varios procesos celulares como la proliferación y diferenciación, control del ciclo celular, apoptosis y desarrollo (Liu y Ogle, 2002; Hsieh y cols., 2005).

En varios estudios se ha intentado establecer la relación existente entre STAT3 y HIF-1 α en cáncer de mama. En un trabajo publicado recientemente por Wincenwicz y cols., 2007, se vió como existía una correlación positiva estadísticamente significativa entre HIF-1 α y STAT3 en pacientes diagnosticadas de cáncer de mama. Sin embargo, el mecanismo y las rutas moleculares a través de las cuales se establecen esas relaciones no son del todo conocidas, si bien otras publicaciones que han estudiado esta relación se basan en otro tipo de tumores y/o líneas celulares (Jung y cols., 2005; Niu, 2008; Niu, 2007).

Una vez fosforilado, STAT3 dimeriza y se trasloca al núcleo celular donde se une a la subunidad HIF-1 α . Ambos se asocian al coactivador transcripcional CBP/p300 y al factor redox efector 1/endonucleasa apurínica/apirimidínica (Ref-1/APE) formando un complejo que reconoce dominios de respuesta a la hipoxia (HRE) [mencionados anteriormente] en regiones promotoras de los genes cuya expresión es activada como respuesta a la hipoxia y al estrés celular, como son la survivina (Gritsko y cols., 2006) y los factores de crecimiento VEGF (Niu y cols., 2002; Gray y cols., 2006).

III.1.3. Efectos de la actividad transcripcional de HIF-1 α en el desarrollo tumoral: expresión de VEGF y Survivina.

III.1.3.1. Expresión de VEGF

Los tumores permanecen quiescentes, no sobrepasando los límites de crecimiento que permite el transporte por difusión (1-2 mm), hasta que el balance entre factores angiogénicos y factores antiangiogénicos se inclina a favor de los primeros y se inicia la neovascularización, el denominado fenotipo angiogénico. Existen una serie de parámetros del microambiente que rodea a las células tumorales, que contribuyen al desarrollo de este fenotipo angiogénico; uno de los más conocidos es la hipoxia tumoral. Como se ha comentado anteriormente, HIF-1 α , una vez estabilizado y dentro del núcleo celular, reconoce a los genes HRE, que a través de las regiones HBS es capaz de codificar la transcripción de VEGF (Oku y cols., 1998; Büchler y cols., 2003; Yang y cols., 2009).

El VEGF fue descubierto en 1989 por Ferrara y Henzel. Se trata de una glicoproteína homodimérica de 45 Kda que induce la proliferación de las células endoteliales de arterias, venas y linfáticos (Carmeliet y cols., 1999; Eriksson y cols., 1999). Está constituido por una familia de proteínas cuyo miembro más importante es el VEGF-A (también denominado VEGF) y su sobreexpresión, valorada por técnicas de inmunohistoquímica (Callagy G y cols., 2000), se ha relacionado con mayores niveles de MVD, y a la vez, con un peor pronóstico en el cáncer de mama (Uzzan B y cols., 2004; Tsutsui S y cols., 2006). Otros miembros son el factor de crecimiento de la placenta (PIGF), el VEGF-B (Li y cols., 2009), VEGF-C (Valtola y cols., Skobe y cols.,

2001; Schoppmann SF y cols., 2010) y VEGF-D (Joukov y cols., 1996; Stacker y cols., 2001; Currie y cols., 2004; Jin y cols., 2005); cada uno de ellos con una función determinada (Tabla 1).

Tipo	Función
VEGF-A	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Angiogénesis</u> <ul style="list-style-type: none"> ○ ↑ <u>Migración</u> de células endoteliales ○ ↑ <u>mitosis</u> de células endoteliales ○ ↑ actividad de la <u>Metano monooxigenasa</u> ○ ↑ actividad de la <u>integrina $\alpha\beta 3$</u> ○ creación de la luz de los vasos sanguíneos ○ creación de las fenestraciones de los vasos • <u>Quimiotáctico</u> para <u>macrófagos</u> y <u>granulocitos</u> • <u>Vasodilatación</u> (indirectamente, por liberación de <u>NO</u>)
VEGF-B	Angiogénesis embrionaria
VEGF-C	<u>Linfoangiogénesis</u>
VEGF-D	Necesario para el desarrollo de la vasculatura linfática que rodea los bronquiolos
PIGF	<ul style="list-style-type: none"> • Importante para la Vasculogénesis • También necesario durante <u>isquemia</u>, <u>inflamación</u>, <u>cicatrización</u> y <u>cáncer</u>

Tabla 1. Funciones de la familia VEGF

Todas estas moléculas modulan su actividad a través de receptores transmembrana presentes en la superficie celular (VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (kdr) y VEGFR-3), que forman homodímeros y poseen un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa (Ferrara y cols., 2003) [Figura 11]. Se ha propuesto que el principal receptor implicado en la angiogénesis es el VEGFR-2, específico de células endoteliales (Shibuya y cols., 2006). La unión a VEGFR-2 a su ligando desencadena la autofosforilación del receptor en varios residuos de tirosina, lo que da lugar a la activación de diferentes rutas de traducción de señales, con la puesta en marcha del programa génico que media la respuesta celular a VEGF (Rydén L y cols., 2003). Así, se ha descrito la asociación a este receptor de proteínas adaptadoras como Shc, Grb2 y Nck, la cascada RAF-ERKs (Dong G y cols., 2001) y la ruta PI3K/AKT (Jian B y cols., 2000), llevándose a cabo diversas funciones tanto en células sanas como en tumorales (Dias y cols., 2001; Jackson y cols., 2002; Kyzas y cols., 2005). Entre ellas destaca la promoción de la mitogénesis y supervivencia de las células endoteliales, efectos quimiotácticos, aumento de la expresión de enzimas proteolíticas implicadas en la degradación del estroma, aumento de la permeabilidad vascular y vasodilatación (Banerjee S y col., 2007; Kerbel, 2008).

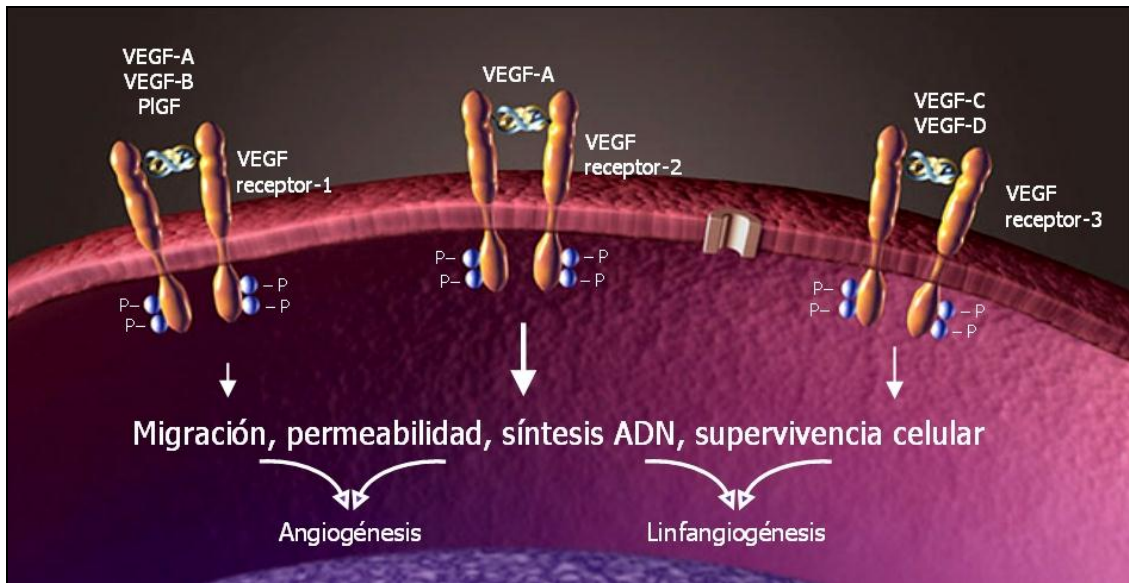


Figura 11. Unión de la familia VEGF a sus receptores.

El receptor Her2, además de activar rutas moleculares relacionadas con la proliferación y supervivencia celular, también ha sido relacionado con incrementos de VEGF (Slamon y cols., 1989; Kumar and Yarmand-Bagheri, 2001; Yang y cols., 2001), a través de la vía mTOR en el cáncer de mama (Klos y cols., 2006).

También han sido descritos ciertos efectos antiapoptóticos del VEGF (Alon y cols., 1995), parece ser que mediados por la vía PI3K/AKT (Gerber HP y cols., 1998), al inducir la expresión en células endoteliales de proteínas antiapoptóticas como la Bcl-2, AI, XIAP y survivina (Gerber y cols., 1998; Tran y cols., 1999; Tran y cols. 2002).

Además de los efectos proliferativos y antiapoptóticos, el VEGF aumenta la permeabilidad capilar (Dvorak y cols., 1995) por incremento de la conductancia hidráulica de los vasos. El aumento de la conductancia es una consecuencia del mayor flujo de calcio hacia el interior de las células endoteliales (Bates y cols., 1997). El aumento de la permeabilidad está también relacionado con la formación de fenestraciones (Roberts y cols., 1995).

El VEGF es necesario para la vasculogénesis y la angiogénesis, pero no es suficiente para la formación de vasos maduros; es decir, la remodelación angiogénica que conduce a la formación de estos vasos para que sean normofuncionantes necesitan la intervención de las llamadas angiopoyetinas, glicoproteínas segregadas de forma autocrina por las células endoteliales y de forma paracrina por otras células (Maisonpierre y cols., 1997).

Mientras que la angiopoyetina-1 (Ang-1) se expresa en todos los tejidos, la angiopoyetina-2 (Ang-2) tiene una expresión más restringida, observándose en aquellos tejidos que experimentan remodelación vascular (ovario, útero, placenta, testículo inmaduro) y en los tumores (Holash y cols., 1999). La secreción de Ang-2 en los tumores provocaría la desestabilización de los vasos, al actuar como un antagonista de la Ang-1. La acción desestabilizante de la Ang-2 devolvería a los vasos a un estado más plástico. Así, los vasos desestabilizados pueden evolucionar de dos formas alternativas: por un lado, en ausencia de VEGF, la Ang-2 provoca la apoptosis de las células disociadas, y por otro, en presencia de VEGF, las células disociadas proliferan y dan lugar a la formación de nuevos vasos (Holash y cols., 1999). La acción de la Ang-1 aumentando el calibre es distinta a la del VEGF, que aumenta, sobre todo, el número de vasos (Thurston y cols., 1999).

También es característica de la angiogénesis la expresión de proteasas (Baker y cols., 2002). Como se ha comentado anteriormente, los factores proangiogénicos como el VEGF aumentan la permeabilidad de los vasos, lo que determina la salida del fibrinógeno del plasma al líquido intersticial. En éste, el fibrinógeno polimeriza y, mediante una serie de entrecruzamientos, forma una red tridimensional densa de fibrina. Las células endoteliales, para invadir el estroma, necesitan enzimas proteolíticas, que al degradar la fibrina y otras proteínas de la matriz, forman túneles delimitados por las células endoteliales, que constituirían los nuevos vasos. La actividad fibrinolítica de las células endoteliales ha sido atribuida a tres serinproteasas: el plasminógeno y dos activadores del mismo, el tPA y el uPA (Schenider J y cols., 2003).

Algunas proteínas del endotelio, como la sintasa de óxido nítrico (NOS) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2), inducen angiogénesis y vasodilatación (Fukumura y cols., 2001). La NOS, a través de la liberación de óxido nítrico (NO), es un mediador de la acción angiogénica del VEGF (Kroll y cols., 1998). La COX-2 se expresa en los vasos del tumor y en las células tumorales y su actividad productora de prostaglandinas contribuye a la linfangiogénesis (Costa y cols., 2002; Zhang y cols., 2008) y al crecimiento y supervivencia de los tumores.

El VEGF no actúa únicamente sobre las células endoteliales. Un efecto importante lo ejerce sobre los monocitos/macrófagos. En estas células induce la quimiotaxis (Clauss y cols., 1990), lo que determinaría la infiltración tumoral de monocitos/macrófagos. Cuando el VEGF actúa sobre los macrófagos y también sobre las células endoteliales del pulmón, induce la secreción de metaloproteína 9 (MMP9), que resulta esencial para la formación de metástasis pulmonares (Hiratsuka y cols., 2002). Otra acción biológica del VEGF, es el bloqueo de la diferenciación de las células dendríticas, permitiendo que los tumores escapen de las defensas del sistema inmunológico (Dikov y cols., 2005).

Estudios realizados en varios tipos de tumores sugieren la existencia de una estrecha relación entre los niveles incrementados de VEGF y un mal pronóstico (Gasparini y cols., 1997), como el carcinoma de células transicionales de vejiga (Quentin y cols., 2004), adenocarcinoma de colon (Cascinu y cols., 2000; Lee y cols., 2000; Celen y cols., 2004), gástrico (Zhou y cols., 2004), pulmón no microcítico (Niki y cols., 2000; Yoo y cols., 2007), renal (Yamakawa y cols., 2004), ovario (Shen y cols., 2000), endometrio (Hirai y cols., 2001) carcinoma epidermoide de la cavidad oral (Mohamed y cols., 2004), gliomas (Gupta y cols., 2004) y neuroblastoma (Beppu y cols., 2004).

En el cáncer de mama, la sobreexpresión de VEGF se ha asociado con la afectación ganglionar y otros parámetros clínico-patológicos (George y Sledge, 2002; Choi y cols., 2005; Schoppmann y cols., 2006; Wang y cols., 2010). Además, en diferentes estudios, la expresión de esta proteína se ha asociado a un peor ILE y una SG menor (Gasparini y cols., 1998; Gasparini, 2000; Foekens y cols., 2001; Linderholm y cols., 2001; Konecny y cols., 2004; Tsui y cols., 2005; Linderholm y cols., 2009), tanto en pacientes con ganglios negativos al diagnóstico de la enfermedad (Gasparini y cols., 1997; Linderholm y cols., 1998; De Paola y cols., 2002), como positivos (Linderholm y cols., 2000). Algunos estudios publicados han hecho referencia al efecto proangiogénico de los estrógenos y al efecto antiangiogénico del tamoxifeno en el cáncer de mama (Garvin S y cols., 2005). El estradiol incrementaba los niveles extracelulares de VEGF, mientras que el tamoxifeno inhibía la secreción de VEGF. Estos datos sugieren que en el cáncer de mama, la expresión de VEGF es en parte regulada por los RE (Garvin S y cols., 2003).

El tratamiento antiangiogénico como diana terapéutica es una realidad ya en muchos tumores. El bevacizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado anti-VEGF, aprobado para uso clínico en el 2004, que neutraliza todas las isoformas de VEGF-A, pero no otros miembros de la familia como VEGF-B y VEGF-C (Presta y cols., 1997). Estudios preclínicos han demostrado que el uso de bevacizumab reduce la angiogénesis e inhibe el crecimiento tumoral, tanto si se administra solo o en combinación con quimioterapia (Kim y cols., 1993; Millauer y cols., 1994; Borstrom y cols., 1999). En el cáncer de mama, este anticuerpo monoclonal ha iniciado su andadura en el escenario de la enfermedad metastásica. Hay cuatro ensayos clínicos fase III randomizados que han demostrado que el añadir bevacizumab a la quimioterapia, tanto en primera línea (estudios E2100, AVADO y RIBBON-1) como en segunda (RIBBON-2) prolonga la SLP e incrementa las tasas de respuesta en pacientes con cáncer de mama metastásico (Miller y cols., 2005; Miller y cols., 2007; Miles y cols., 2010). Sin embargo, ninguno de esos estudios ha demostrado un aumento en la supervivencia global al añadir bevacizumab al tratamiento. Esto ha sido confirmado por un reciente metaanálisis de supervivencia global con los tres estudios en primera línea (O'Shaughnessy y cols., 2010). De ahí la necesidad de buscar marcadores que ayuden a identificar el subgrupo de pacientes que más se puedan beneficiar del tratamiento, sobre todo en términos de supervivencia.

III.1.3.2. Expresión de Survivina

La survivina es un miembro de la familia de inhibidores de las proteínas de apoptosis (IAP) que participa en el control del ciclo celular y promueve la angiogénesis (Ambrosini y cols., 1998; Li y Altieri, 1999; Altieri, 2003; Altieri, 2003; Duffy y cols., 2007; Altieri, 2001; Li y Brattain, 2006; Li y Ling, 2006). Es una proteína fetal de 16.5 Kda, conocida también con el nombre de AP14 (Duckett y cols., 1996; Verdecia y cols., 2002), y codificada por el gen BIRC5, indetectable en tejidos adultos. Sin embargo, altos niveles de survivina han sido encontrados hasta en un 70% de carcinomas mamarios así como en el cáncer de pulmón, colon, esófago, páncreas, gástrico, próstata, nasofaringe, cavidad oral, vejiga, ovario, hepatocarcinoma, neuroblastoma y tumores

malignos hematopoyéticos (Kawasaki y cols., 1998; Lu y cols., 1998; Monzo y cols., 1999; Adida y cols., 2000; Adida y cols., 2000; Islam y cols., 2000; Ito y cols., 2000; Sarela y cols., 2000; Carter y cols., 2001; Miller y cols., 2001; Okada y cols., 2001; Sarela y cols., 2001; Satoh y cols., 2001; Yamamoto y cols., 2001; Mori y cols., 2002; Yu y cols., 2002; Carter y cols., 2003; Grabowski y cols., 2003; Lo Muzio y cols., 2003; Yang y cols., 2003; Gu y Lin, 2004; Li y cols., 2004; Lo Muzio y cols., 2004; Schlette y cols., 2004; Tao y cols., 2004; Yang y cols., 2004; Li y cols., 2008; Xia y cols., 2006; Augello y cols., 2009).

El mecanismo por el cual inhibe la apoptosis no está claro; inicialmente se sugirió una acción directa sobre caspasa 3 pero posteriormente se demostró que survivina era incapaz de unirse a ésta (Banks y cols., 2000). El mecanismo alternativo podría ser la unión de survivina a caspasa 9 (O'Connor y cols., 2000). Por otro lado, su papel en la proliferación celular se debe a que interviene en la estabilización de microtúbulos y la segregación de cromátidas hermanas en la mitosis (Nassar y cols., 2008; Ambrosini y cols., 1997; Li y cols., 1998). El proceso por el cual la survivina promueve la angiogénesis está relacionado con la inhibición de la apoptosis en las células endoteliales que están formando la nueva vasculatura (Chiou y cols., 2003).

Las células que presentan una alta tasa expresión de survivina son muy resistentes a la apoptosis y por tanto, su transcripción permite la supervivencia celular aun en condiciones adversas como la hipoxia, permitiendo la permanencia de células dañadas que pueden acumular subsiguientes alteraciones génicas. Además, se ha sugerido que la survivina puede mediar la resistencia tanto a antraciclinas como a taxanos pues inhibe la apoptosis inducida por estos fármacos a través de la vía apoptótica de las caspasas (La Casse y cols., 1998).

Los niveles incrementados de survivina en los tumores se correlacionan con fenotipos clínicos más agresivos e invasivos, con mal pronóstico (Kawasaki y cols., 1998; Adida y cols., 2000; Ikeara y cols., 2002; Kim y cols., 2002; Wurl y cols., 2002; Piras y cols., 2004). En el cáncer de mama, la sobreexpresión de survivina se ha relacionado con la negatividad de los receptores hormonales, resistencia al tratamiento hormonal, alto grado histológico, metástasis ganglionares, Her2 positivo, expresión de Bcl-2, mutación de p53 y en general con un peor pronóstico (Tanaka y cols., 2000; Izawa y cols., 2002; Mirza y cols., 2002; Chu y cols., 2004; Kayaselcuk y cols., 2004; Span y cols., 2004; ; Mao y cols., 2005; Son y cols., 2005; Barnes y cols., 2006; Ryan y cols., 2006; Sohn y cols., 2006; Span y cols., 2006; Al-Joudi y cols., 2007; Rakha y cols., 2008; Moriai y cols., 2009).

Se ha sugerido que las células cancerígenas mamarias no sólo son capaces de inducir la expresión de survivina en condiciones de hipoxia, sino que también son capaces de hacerlo en normoxia a través de la unión del factor de crecimiento epidermal (EGF) a su receptor (EGFR). Esta unión, a través de la vía PI3K/AKT, aumenta los niveles de la subunidad HIF-1 α que actúa como factor de transcripción necesario para la expresión de survivina (Peng y cols., 2006).

Algunos estudios han sugerido un papel irrelevante, en términos de pronóstico, de esta proteína en el cáncer de mama (O'Driscoll y cols., 2003; Chu y cols., 2004; Kostadima y cols., 2006) e incluso su expresión ha sido relacionada con factores de mejor pronóstico como la positividad de los receptores hormonales y negatividad del

Ki67 (Brennan y cols., 2008) y con un aumento tanto en SLE como en SG, no quedando claro, no obstante, si la tinción nuclear por sí misma tiene valor pronóstico (Kennedy y cols., 2003; Brennan y cols., 2008). La mayoría de los trabajos que estudian la expresión inmunohistoquímica de survivina muestran una tinción principalmente localizada en el citoplasma. En algunos tumores, se ha objetivado un predominio de tinción nuclear e incluso dicha tinción se ha relacionado con un pronóstico más favorable (Altieri y Marchisio, 1999; Kennedy y cols., 2003; Zhang y cols., 2004; Li y cols., 2005).

Se ha intentado buscar una explicación a estos resultados tan contradictorios. Yong-Gang y cols., 2010 en una revisión del papel que tiene la survivina en el cáncer de mama, han explicado la existencia de 5 variantes de “splicing” (término inglés que significa “eliminación y empalme” y cuyo proceso permite que un solo gen pueda codificar para más de una proteína) del gen survivina, conocidas como: survivina tipo amplio, survivina 2B, survivina 2 α , survivina 3B y survivina Ex3, con diferentes estructuras y funciones (Li, 2005; Sampath and Pelus, 2007). Por ejemplo, la survivina 3B es más frecuente en tumores de mama de alto grado y se ha relacionado con la mutación del gen p53. La isoforma survivin 2B podría actuar como un factor proapoptótico y su expresión decrece a medida que aumenta el tamaño tumoral (Vegran y cols., 2005), sugiriéndose que la expresión dominante de esta forma podría justificar el buen pronóstico al que ha sido asociada en algunos trabajos mencionados anteriormente. Otros estudios de splicing han mostrado que la tinción nuclear de survivina es asociado con un pronóstico más favorable y que la expresión citoplasmática se correlaciona con el estadio tumoral y el grado histológico, pero no con el pronóstico de la enfermedad (Barnes y cols., 2006).

III.1.4. HIF-1 α y cáncer de mama

El primer estudio que relacionó HIF-1 α con la carcinogénesis del cáncer de mama fue publicado en el año 2001. Bos y col., estudiaron la sobreexpresión de HIF-1 α en tejido mamario sano y en los diferentes estadios patológicos del cáncer de mama; HIF-1 α no fue detectado en tejido sano ni en lesiones hiperplásicas, pero se vió un aumento progresivo de la expresión de la molécula de forma paralela al incremento del estadio tumoral, relacionándose HIF-1 α con lesiones pobremente diferenciadas (Bos y cols., 2001).

Desde entonces, han sido varios los trabajos que han estudiado el papel de HIF 1- α como factor pronóstico en el cáncer de mama, su relación con factores pronósticos ya establecidos, así como su conexión con otros marcadores moleculares involucrados en el microambiente hipóxico. La mayoría de los estudios han utilizado tejido conservado en parafina, siendo la segunda opción el tejido congelado.

Así, el mismo equipo mencionado anteriormente, dio un paso más en la investigación, dos años más tarde, al demostrar en un estudio con pacientes intervenidas de cáncer de mama con ganglios axilares negativos (81) y que expresaban HIF-1 α en el tumor (37 %, utilizando un punto de corte del 5 %), presentaban una disminución significativa de la SLE y la SG, siendo factor pronóstico independiente en el análisis

multivariante (Bos y cols., 2003). Estos resultados coinciden con los de una publicación donde a 104 pacientes intervenidas de cáncer de mama, sin afectación axilar, se les realizó el estudio inmunohistoquímico de HIF-1 α , considerándose positivos un 45 %, tras un análisis semicuantitativo con el porcentaje y la intensidad de tinción nuclear, utilizando un score o conteo: tras más de 10 años de seguimiento se observó una correlación positiva entre la sobreexpresión de HIF-1 α y la aparición de metástasis, mostrándose como factor pronóstico independiente de menor ILE en el análisis multivariante (Chen y cols., 2007).

En el caso de las pacientes con cáncer de mama intervenido y con ganglios axilares afectos, el papel del HIF-1 α , aunque también parece asociado a un peor pronóstico, los resultados de los estudios han sido algo más contradictorios. La primera publicación al respecto apareció en el año 2002: en este trabajo se valoraron 206 muestras tumorales con afectación axilar, y se observó una correlación significativa entre la expresión de HIF-1 α y una disminución de la SLE y la SG, siendo factor predictivo independiente de ambas (Schindl y cols., 2002). En el trabajo comentado anteriormente de Bos y cols., 2003, también se estudió el valor pronóstico de HIF-1 α en 69 pacientes intervenidas con afectación axilar, no objetivándose relación significativa entre la expresión de HIF-1 α y la ILE o SG (Bos y cols., 2003). Un año más tarde, en otro trabajo con 77 pacientes intervenidas y con afectación axilar, también se encontró relación estadísticamente significativa entre las pacientes que sobreexpresaban HIF-1 α y un menor ILE en el análisis univariante, no desmarcándose como factor pronóstico independiente en el análisis multivariante. La SG no se vió relacionada estadísticamente con la sobreexpresión de HIF-1 α . Curiosamente, en este estudio, al restringir la relación de HIF-1 α con el tamaño tumoral a los tumores T1-2 frente a T3-4 se encontraron resultados significativos en cuanto a la SLE y SG, que estaban disminuídas en aquellas pacientes que expresaban HIF-1 α y tenían un estadio T1/T2, pero no así en las T3/T4 (Gruber y cols., 2004).

En un trabajo posterior que evaluaba la relación de HIF-1 α y CA IX en 132 mujeres con cáncer de mama intervenido no se pudo establecer una relación entre las expresión de estas proteínas y el estado ganglionar de las pacientes. La sobreexpresión de HIF-1 α , se correlacionó con una disminución estadísticamente significativa de ILE y SG en el análisis univariante, mostrándose como factor pronóstico independiente de ILE en el multivariante (Trastour y cols., 2007). En otra publicación más reciente, la expresión de HIF-1 α en 171 tumores de mama, era estrechamente relacionada con un fenotipo agresivo, mostrando una correlación significativa con la afectación metastásica ganglionar de las pacientes y una menor SLE y SG tanto en el análisis univariante como en el multivariante (Yamamoto y cols., 2008).

Uno de los trabajos que mostró el verdadero valor pronóstico del HIF-1 α fue el llevado a cabo por Kronblad y cols., 2006, al estudiar en 377 mujeres intervenidas de cáncer de mama T2N0 y T1-2N1, la expresión de HIF-1 α . Todas las pacientes, tras la cirugía fueron aleatorizadas a recibir dos años de terapia hormonal con tamoxifeno vs observación, por lo que en este segundo grupo se pudo valorar la relación de HIF-1 α con la agresividad del tumor sin la interferencia del efecto de ningún tratamiento. No se encontró relación significativa entre el grupo control (n = 195) y la expresión de HIF-1 α , en cuanto a ILE ni SG. Dentro de este subgrupo también se estudió la relación entre HIF-1 α e ILE, en relación a la afectación ganglionar, encontrándose un relación significativa en las pacientes con ganglios positivos (n = 145) que sobreexpresaban

HIF-1 α y un menor ILE ($p = 0,014$). Curiosamente, también en este brazo control se demostró que las pacientes que tenían un grado de diferenciación 1-2 y expresaban HIF-1 α tenían menor ILE, con respecto a las pacientes que no sobreexpresaban HIF-1 α en los tumores; sin embargo no se encontró relación significativa en el caso de los tumores con un grado 3.

Vleugel y cols., 2005, estudiaron el valor pronóstico de los diferentes patrones de expresión de HIF-1 α en 200 pacientes intervenidas de cáncer de mama. La sobreexpresión de HIF-1 α presentaba dos tipos de patrones de expresión: por un lado una expresión denominada perinecrotica (13,5 %) que se asoció con un peor pronóstico y con la expresión de genes relacionados con la hipoxia (CA IX y GLUT-1). El otro 30,5 % de tumores que sobreexpresaban HIF-1 α presentaban un patrón denominado difuso, relacionándose con unas condiciones de menor hipoxia y con un mejor pronóstico, por lo que se ha sugerido que el predominio de este patrón difuso podría estar relacionado con la activación de HIF-1 α , a través de rutas independientes de las condiciones de hipoxia (Gruber y cols., 2004; Vleugel y cols., 2005). Lógicamente, estos diferentes patrones de expresión son más difíciles de describir cuando se valora en tissues mycoarrys de muestras parafinadas, al tratarse de muestras de menor tamaño.

En la mayoría de los trabajos también se ha estudiado la relación de HIF-1 α con otros factores pronósticos conocidos. En general, la sobreexpresión de HIF-1 α en el cáncer de mama se ha relacionado con la negatividad de los receptores hormonales, la sobreexpresión del Her2, con tumores de alto grado histológico y positividad de Ki 67, apoyando así la hipótesis de la asociación de esta proteína a un fenotipo agresivo del cáncer de mama, con una repercusión directa en la SLE y de forma menos clara, sobre la SG (Schindl y cols., 2002; Bos y cols., 2003; Gruber y cols., 2004; Bos y cols., 2004; Kronblad y cols., 2006; Trastour y cols., 2007; van der Groep y cols., 2008; Yamamoto y cols., 2008).

A pesar del interés creciente que ha ido despertando el HIF-1 α en el cáncer de mama en los últimos años, todavía son varias las incógnitas que quedan por resolver. Todos los trabajos comentados anteriormente hacen referencia a pacientes con cáncer de mama sometidas a cirugía como primer tratamiento. Sabemos muy poco del papel que juega el HIF-1 α como factor predictivo de respuesta al tratamiento neoadyuvante en el carcinoma de mama.

Generali y colaboradores, aleatorizaron a 187 pacientes, dentro de un ensayo clínico, para recibir epirubicina versus epirubicina más tamoxifeno como tratamiento neoadyuvante. A partir de la biopsia diagnóstica, se evaluaron los niveles de HIF-1 α por técnicas de inmunohistoquímica: los autores concluyeron que las peores tasas de respuestas clínicas estaban relacionadas con niveles incrementados de HIF-1 α (Generali y cols., 2006).

En un segundo trabajo, 114 mujeres con cáncer de mama localmente avanzado y con RE+, fueron también aleatorizadas, dentro de un ensayo clínico, a recibir letrozol versus letrozol más ciclofosfamida, como tratamiento primario. En todas las muestras del pretratamiento se evaluaron un total de 24 proteínas relacionadas con la apoptosis, supervivencia celular, hipoxia, angiogénesis, y entre ellas se estudió el HIF-1 α . Al igual que en el trabajo anterior, los resultados mostraron que el aumento del HIF-1 α estaba relacionado con menores tasas de respuesta clínicas (Generali y cols., 2009).

La principal limitación de ambos estudios es que el tratamiento neoadyuvante administrado no se corresponde con el tratamiento estándar propuesto en la actualidad. Hasta la fecha sólo se ha publicado un trabajo que estudie el valor predictivo del HIF-1 α al tratamiento basado en antraciclinas y taxanos en el cáncer de mama localmente avanzado, pero con una muestra muy reducida de pacientes (n= 30) y sin obtenerse resultados significativos (Oliveira y cols., 2011), lo que convierte a esta molécula en un interesante punto de investigación dentro del escenario de la neoadyuvancia en el cáncer de mama.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

- ✓ Matrices tisulares “tissues microarrays” (TMAs)
- ✓ Anticuerpo primario anti-RE de conejo (clona SP1; Master Diagnóstica S.L.)
- ✓ Anticuerpo primario anti-RP de ratón (clona Y85; Master Diagnóstica S.L.)
- ✓ Anticuerpo policlonal de conejo anti Her-2 (Dako Denmark A/S, Dinamarca)
- ✓ Anticuerpo primario anti Ki 67 de conejo (Clona SP6; Master Diagnóstica S.L.)
- ✓ Arrayer manual (Beecher Instruments, Siver Spring, MD, USA)
- ✓ Módulo PT (PT Module, LabVision Corporation)
- ✓ Tampón EDTA 100 x pH 8.0, Ref. LAV-TA-125-PM
- ✓ Agua destilada
- ✓ Autostainer 480-2D, LabVision Corporation
- ✓ Anticuerpo primario.
- ✓ Bloqueante de peroxidasa endógena Ref: MAD-021540Q
- ✓ Kit de inmunotinción MASVISION UNIVERSAL (basado en sistema de Polímeros constituido por combinación de aminoácidos, moléculas de peroxidasa y fracción F(ab')₂ de inmunoglobulina de cabra anti-ratón y anti-conejo) para anticuerpos mono y policlonales, ref: MAD-041880QK-U
- ✓ Kit de revelado para inmunoperoxidasa con Diaminobenzidina (DAB), ref: MAD-001812QK
- ✓ Tampón de lavado TBS-Tween 20 10X, ref: MAD-004077R
- ✓ Microscopio óptico
- ✓ Anticuerpo monoclonal IgG1 anti HIF-1 α (Becton-Dickinson Biosciences, Palo Alto, CA, USA)

- ✓ Anticuerpo monoclonal Ig G de conejo anti AKT fosforilado (pAKT) [Ser 473; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA; clona 736E11]
- ✓ Anticuerpo monoclonal IgG de conejo anti phospho-p44/42 MAPK (pERK 1/2) [Thr202/Tyr204] [Cell Signaling Tecnology, clona 20G11]
- ✓ Anticuerpo monoclonal de conejo anti VEGF-A (Abcam, USA; clona EP1176Y)
- ✓ Anticuerpo policlonal IgG de conejo anti survivina (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA)
- ✓ Anticuerpo monoclonal de conejo anti STAT3 fosforilado al residuo 705 de tirosina (Cell Signaling, Boston, MA; clona D3A7)
- ✓ Kit de DAKO EGFR pharma DXTM Kit for Dako Autostainer (K1494)

MÉTODOS

I. Diseño experimental

Este estudio se diseñó a partir de una cohorte retrospectiva formada por mujeres diagnosticadas de cáncer de mama en el Complejo Hospitalario de Jaén y que recibieron tratamiento neoadyuvante basado en antraciclinas y taxanos, hasta un total de 95 pacientes.

De cada paciente se recopilaron las muestras histológicas, tanto de la biopsia diagnóstica como de la pieza quirúrgica tras el tratamiento primario, ambas conservadas en bloques parafinados, y en cada uno, se señalaron puntos de tejido tumoral y puntos de tejido sano. Una vez marcados los bloques de parafina, se enviaron al Nodo del Banco de Tumores de Andalucía, situado en Granada, para la elaboración de las matrices tisulares “tissues microarrays” (TMAs), cuya técnica hace posible agrupar en una sola laminilla más de 100 tumores y así poder ser utilizados para el análisis de diferentes marcadores (Kononen y cols., 1998; Schraml y cols., 1999; Mohr y cols., 2002).

Para el análisis inmunohistoquímico se utilizaron anticuerpos de las proteínas HIF-1 α , Survivina, VEGF-A, AKT, MAPK, EGFR y STAT3. Los resultados se almacenaron en una base de datos a través del programa informático Excel. De forma paralela se recogieron los datos de las diferentes variables clínicas de las pacientes, de la respuesta

al tratamiento quimioterápico, así como de todas las variables morfológicas e inmunohistoquímicas, que de rutina se incorporan al diagnóstico anatomopatológico, de los casos que incluyen el tipo histológico y su grado.

Si bien en el diagnóstico rutinario se analizan el estatus hormonal, el índice proliferativo (mediante Ki 67), la expresión nuclear de la oncoproteína p-53 y el estatus Her2, para evitar la posible variabilidad en la inmunotinción dependiente del tiempo, los instrumentos, el lote del anticuerpo primario, los sistemas diferentes de revelado y el observador (no todos los casos fueron evaluados por el mismo patólogo), se repitieron los mismos sobre las matrices de tejidos y se cotejaron sus resultados con los reflejados en el informe anatomopatológico. En el caso de discrepancias mayores al 2% en el valor considerado punto de corte y mayores del 10% para el resto de valores, se reevaluaron los casos con un tercer observador. Si la discrepancia se mantenía, se seleccionó el mayor valor.

El cruce estadístico de datos inmunohistoquímicos y clínicos dieron respuesta a las diferentes premisas hipotéticas que se establecieron al inicio del estudio y a la resolución de los objetivos del mismo (Figura 1).

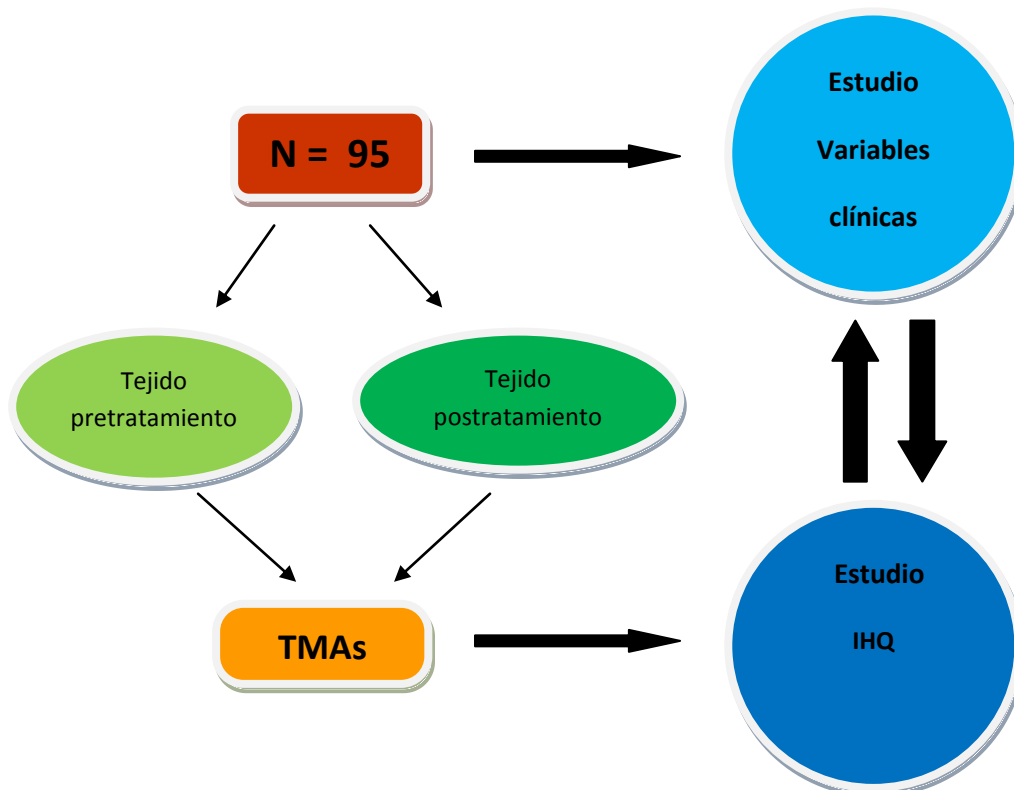


Figura 1. Esquema del diseño experimental del estudio.

II. Población a estudio

Se realizó un análisis retrospectivo de 95 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama en el Complejo Hospitalario de Jaén entre los años 2003-2009. Los criterios de inclusión y exclusión aplicados a la selección de las pacientes fueron los siguientes:

II.1. Criterios de inclusión

- Mujeres diagnosticadas de cáncer de mama invasivo confirmado mediante biopsia incisional o con trucut.
- Pacientes que hubieran recibido un régimen de quimioterapia neoadyuvante basado en antraciclinas y taxanos +/- trastuzumab (en función del estado del Her2).
- Edad mínima de 18 años y máxima de 80.

II.2. Criterios de exclusión

- Pacientes que no hubieran completado el tratamiento quimioterápico y/o quirúrgico en el Complejo Hospitalario de Jaén.
- Muestras histológicas no disponibles o deterioradas en el archivo de Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario de Jaén.
- Muestras que no contuvieran material representativo.

III. Consideraciones éticas

El estudio fue realizado siguiendo el código ético del Hospital Médico-Quirúrgico de Jaén, así como los principios y recomendaciones para la investigación biomédica con sujetos humanos, establecidos en la declaración de Helsinki (Asamblea General de la Asociación Médica Mundial, Helsinki, Finlandia 1964).

IV. Variables clínicas e histopatológicas

A partir de las historias clínicas de las pacientes, se recogieron en una base de datos las siguientes variables analíticas del estudio, tanto clínicas, como histopatológicas:

IV.1. Variables clínicas

- **Edad** al diagnóstico.
- **Tamaño** inicial del tumor: diámetro mayor de la lesión medido a través de la mamografía.
- **Estadaje** clínico (cTNM): 7ª Edición, 2010 (ver el apartado I.3.2. de la Introducción).
- **Afectación ganglionar clínica** al diagnóstico.

IV.2. Variables histopatológicas

Se recogieron datos referentes a la biopsia diagnóstica inicial y los relacionados con la pieza quirúrgica tras el tratamiento neoadyuvante.

IV.2.1. Variables histopatológicas de la biopsia diagnóstica inicial

- **Tipo histológico** (ver el apartado I.4.1. de la Introducción).
- **Grado de diferenciación** (ver el apartado I.2.1.1.4 de la Introducción).
- **Receptores hormonales.**

Receptores de estrógenos (RE): para la inmunodetección de los RE se utilizó un anticuerpo primario anti-RE de conejo (clona SP1; Master Diagnóstica S.L.) en una solución comercial prediluida, con un tiempo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente según protocolo especificado en el punto VII. Se consideró tinción positiva la nuclear propia de los conductos normales (control positivo) [Figura 2]. Para la valoración se llevaron a cabo dos tipos de aproximaciones

1.- Se utilizó un sistema de gradación semicuantitativa; por una lado se valoró la intensidad de tinción dando la siguiente puntuación: 0 = no hay tinción; 1 = intensidad débil; 2 = intensidad moderada; 3 = intensidad fuerte. Al mismo tiempo se valoró el porcentaje de células tumorales teñidas, dando la puntuación de 0 = no hay tinción; 1 = tinción en < 1 %; 2 = tinción entre 1-10 %; 3 = tinción entre 11-33 %; 4 = tinción entre 34-66 %; 5 = tinción

entre 67-100 %. Para el score final se realizó la suma de puntuación de las dos variables (0-8). Se consideraron RE positivas aquellas muestras cuyo contaje final era ≥ 3 (Burcombe RJ y cols, 2005).

2.- Se consideró RE positivos a aquellos tumores que sobreexpresaban la proteína en ≥ 10 % de las células tumorales (Seon-Ah Ha y cols, 2009; Altintas S y cols, 2009).

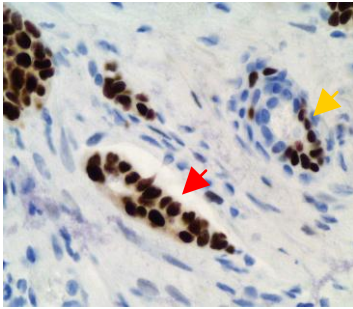


Figura 2. Inmunotinción positiva nuclear intensa para un conducto tumoral (flecha roja). Nótese el control positivo definido por la inmunoexpresión focal de un conducto normal (flecha amarilla). Receptor de Estrógenos (clona SP1). 40x.

Receptores de progesterona (RP): para la inmunodetección de los RP se utilizó un anticuerpo primario anti-RP de ratón (clona Y85; Master Diagnóstica S.L.) en una solución comercial prediluida, con un tiempo de incubación de 20 minutos a temperatura ambiente según protocolo especificado en el punto VII. Se consideró tinción positiva la nuclear propia de los conductos normales (control positivo) [Figura 3].

Para la valoración se utilizó el mismo sistema que para los RE.

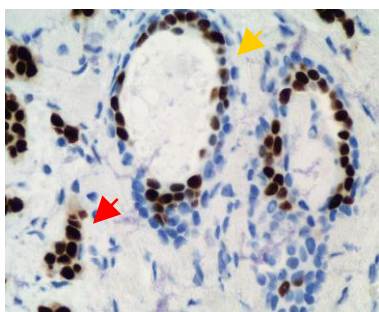


Figura 3. Inmunotinción positiva nuclear intensa para un conducto tumoral (flecha roja). Nótese el control positivo definido por la inmunoexpresión focal de un conducto normal (flecha amarilla). Receptor de Progesterona (clona Y85).

- **Estado de Her2:** para la inmunodetección se utilizó el Herceptest TM DakoCytomation Autostainer (Kits) que incluye anticuerpo policlonal de conejo anti Her2 (Dako Denmark A/S, Dinamarca) en una solución comercial prediluida, con un tiempo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente según protocolo especificado en el punto VII.

Para interpretación inmunohistoquímica se consideró la tinción de membrana de las células tumorales con la siguiente valoración (Wolf y cols., 2007):

Negativo (0): ausencia de tinción de membrana o tinción en menos del 10 % de las células (Figura 4a): negativo.

Negativo (+1): tinción de membrana débil e incompleta en más del 10 % de las células (Figura 4b): negativo.

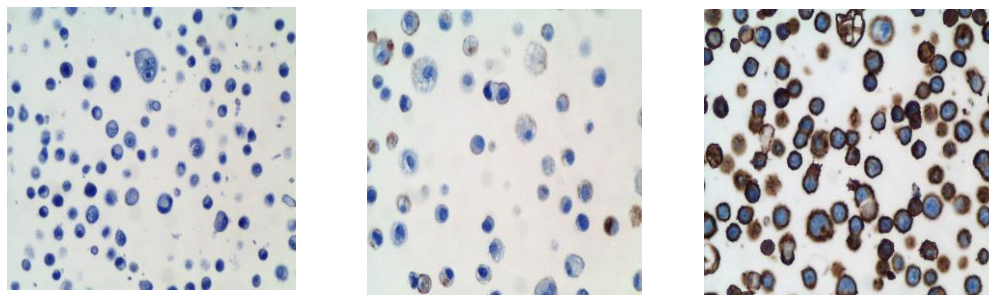
Borderline (+2): tinción completa de membrana, débil o moderada, en más del 10 % de las células o tinción completa e intensa en 10-30 % de las células: borderline.

Para la confirmación de amplificación génica de los casos catalogados como Her2 (+2) se procedió a la realización de la técnica FISH en un centro de referencia externo (Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Virgen de las Nieves de Granada). Para la interpretación se siguieron los siguientes criterios:

Resultado no amplificado: cuando la ratio de FISH (señales del gen Her2 frente a señales del cromosoma 17) era menor de 1,8.

Resultado amplificado: cuando la ratio de FISH (señales del gen Her2 frente a señales del cromosoma 17) era mayor de 2,2. Se consideraron valores Borderline a aquellos incluidos en el rango de 1,8-2,2.

Positivo (+3): tinción de membrana completa e intensa en más del 30 % de las células (Figura 4c): positivo.



a. HER2 0+

b. HER2 1+

c. HER2 3+

Figura 4. Fotos de cultivos celulares utilizados como controles. 40x. A.- Ausencia de expresión protéica a nivel de membrana (HER2 0+). B.- Tinción incompleta y débil/moderada de membrana citoplásmica (HER2 1+). C.- Tinción completa e intensa de membrana (HER2 3+).

- **Ki 67:** para la inmunodetección del marcador Ki 67 se utilizó un anticuerpo primario anti Ki 67 de conejo (Clona SP6; Master Diagnóstica S.L.) en una solución comercial prediluida, con un tiempo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente según protocolo especificado en el punto VII. Como control positivo se consideró la tinción nuclear del centro germinal de los folículos linfoides.

Para la valoración de la tinción se consideraron positivas aquellas muestras que presentaban como mínimo un 10 % de células tumorales con tinción nuclear (Tan PH y cols., 2005). Algunas publicaciones más recientes proponen como punto de corte para este marcador el 20 %, por lo que también utilizamos esta estimación (Ahlin C y cols., 2007; Jacquemier J y cols., 2009).

- **Fenotipo molecular** (ver el apartado I.2.1.3.4. de la Introducción). En relación a las clasificaciones según el perfil molecular se llevaron a cabo dos subclasificaciones atendiendo a los trabajos de Perou y cols., 2000; Penault-Llorca y cols., 2009:
 - Perfil 1: Luminal A (RE y/o RP+, Her2-, Ki 67 < 20%), Luminal B (RE y/o RP+, Her2-, Ki 67 >= 20%), HER2 (Her2+) y triple negativo (RE-, RP- y Her2-).
 - Perfil 2: Luminal A (RE y/o RP+, Her2-), Luminal B (RE y/o RP+, HER2+), HER2 (RE y/o RP-, Her2+) y triple negativo (RE-, RP- y Her2-).

IV.2.2. Variables histopatológicas de la pieza quirúrgica .

- **Respuesta patológica del tumor** a la terapia neoadyuvante; se trata de una de las variables más importantes del estudio al actuar como variable dependiente. Existen diferentes sistemas de valoración de la respuesta patológica; uno de los más reconocidos a nivel mundial (Smith y Miller, 2001; Oston y cols., 2003) y el usado en este estudio es la escala de M&P (Miller & Payne), que estratifica la respuesta en base a la proporción entre tumor viable y cambios postquimioterapia que se define de la siguiente manera:

Grado 1: mínimos cambios celulares, sin reducción significativa de la celularidad tumoral invasiva.

Grado 2: disminución discreta de la celularidad tumoral invasiva inferior al 30 % de la masa tumoral.

Grado 3: disminución significativa de la celularidad tumoral invasiva entre el 30 y 90 % de la masa tumoral.

Grado 4: marcada disminución de la masa tumoral mayor del 90 % con persistencia exclusiva de focos microscópicos.

Grado 5: ausencia de células tumorales invasivas. El carcinoma *in situ* residual se clasifica en el sistema de Miller & Payne, como respuesta completa, en ausencia de componente infiltrante.

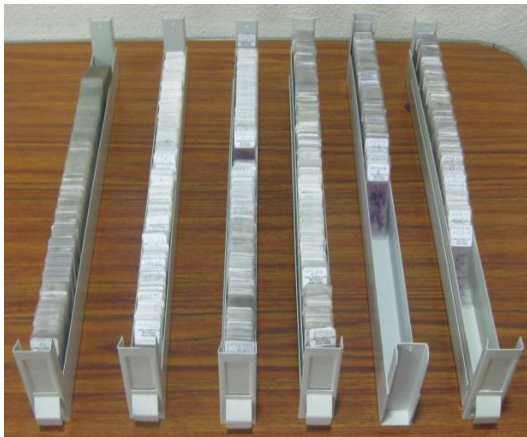
Para el análisis estadístico de las diferentes variables con el grado de respuesta a la quimioterapia estratificado por el sistema de M&P, se establecieron 5 posibles asociaciones de la variable independiente:

- ✓ Asociación 1: Grado 1 vs 2 vs 3 vs 4 vs 5
- ✓ Asociación 2: Grados 1-2 vs 3 vs 4-5
- ✓ Asociación 3: Grados 1-4 vs 5
- ✓ Asociación 4: Grados 1-3 vs 4-5
- ✓ Asociación 5: Grados 1-2 vs 4-5

V. Preparación de muestras biológicas

El primer paso para la preparación de las muestras fue extraer del archivo del servicio de Anatomía Patológica los cristales de hematoxilina-eosina tanto de la biopsia diagnóstica, como de la pieza quirúrgica de todas las pacientes (Figura 5). Dos patólogos expertos del servicio revisaron los diagnósticos y marcaron, en cada uno de los cristales y con la ayuda del microscopio óptico, dos puntos con rotulador negro correspondientes a las áreas de tejido tumoral más adecuadas para el estudio y otros dos puntos, con rotulador verde, que señalaban áreas de tejido sano (en el caso de los cristales de la biopsia diagnóstica, no se pudo marcar tejido sano en todas las muestras, debido a que el tejido predominante era tumoral).

Una vez marcados los cristales de hematoxilina-eosina, se seleccionaron los bloques de parafina correspondientes a cada una de las muestras señaladas. Tras enfrentar los cristales marcados previamente con su correspondiente bloque de parafina, éstos fueron igualmente marcados, de tal forma que quedaron preparados para la siguiente fase del proyecto, la confección de los TMAs (Figura 6).



Figuras 5 y 6. Selección de muestras histológicas en cristales de hematoxilina-eosina y en bloques parafinados.

VI. Confección de las Matrices Tisulares “Tissues Microarrays” (TMAs).

Una vez preparadas las muestras biológicas, los bloques de parafinas marcados se trasladaron al Nodo del Banco de Tumores de Granada, donde se montaron los TMAs. El microarray de tejido se construye adquiriendo muestras cilíndricas de cientos de tumores a partir de los bloques de parafina (bloques donantes); así, los cilindros obtenidos se incorporan a un bloque de parafina receptor que, aunque puede contener hasta 600 muestras, en la práctica el número de cilindros de cada TMA varía entre 100 y 400. Finalmente, el bloque es cortado en múltiples secciones para llevar a cabo las técnicas inmunohistoquímicas (Figura 7).

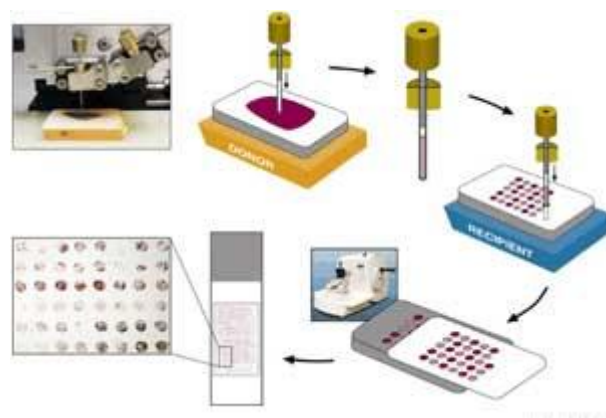


Figura 7. Representación de todo el proceso de creación de una laminilla de TMA.

En nuestro trabajo, la metodología se desarrolló a través de los siguientes pasos:

1.- Preparación de los bloques receptores. Se prepararon varios bloques de parafina en blanco, de 40 X 25 mm, para utilizar como receptores de las muestras tisulares. Se alisaron todos ellos antes de comenzar a insertar cilindros y se revisó que no existieran agujeros, causados por burbujas de aire aparecidas durante la preparación de los bloques.

2.- Se confeccionaron unas plantillas (Tablas 1 y 2), identificando todos los cilindros y su disposición en el array, teniendo en cuenta que el diámetro de cada cilindro sería de 1mm (como se explica más adelante), con un espaciado entre ellos de 0,8-3 mm y que, para evitar la fragmentación de la parafina habría que dejar márgenes de 2,5-3 mm. Así, se determinó que el número de casos de cada TMA sería de 110, distribuidos en 11 filas y 10 columnas.

Referencia en origen	Identificación (Nodo)	nº puntos negros	nº puntos verdes
B08-3812 1	32080428001	2N	
B08-3776 /A6	32080429001	2N	
B08-3776 /A8	32080429002	2N	
B08-2635 2	32080430001	2N	
B08-2202 9	32080431001	2N	
B08-0172 A5	32080432001	2N	
B07-9034 /A4	32080433001	2N	
B07-9034 /A7	32080433002	2N	
B07-9034 /A9	32080433003	2N	
B07-8328 A6	32080434001		1
B07-5531 2	32080435001		1
B07-4334 1	32080436001		1
B07-3812 /A9	32080437001		1
B07-3812 /A3	32080437002		1
B07-1164 /A2	32080438001		1
B07-1164 /A9	32080438002		1
B07-0292 7	32080439001		1
B07-0037 D4	32080440001		1
B06-9792 3	32080441001		1
B05-2327	32080257001	3N	
B05-1014 /2	32080258001	2N	0
B04-8336 /2	32080259001	2N	0
B04-8289 1	32080260001	2N	0
B04-8095 /A	32080261001	2N	1V
B04-7760 1	32080262001	2N	0
B04-7692	32080263001	2N	0
B04-7026 1	32080264001	2N	0
B04-6891	32080265001	2N	0
B04-6851	32080266001	2N	
B04-6759 /2	32080267001	2N	0
B04-6647	32080268001	2N	0
B04-6643	32080269001	2N	0
B04-6601 /2	32080270001	2N	0
B04-6479 2	32080271001	2N	0
B04-6298 /1	32080272001		0 1V
B04-6298 /2	32080272002	2N	1V
B04-4874	32080273001	2N	0
B04-4814	32080274001	2N	2V
B04-4615 2	32080275001	2N	0
B04-4596 1	32080276001	2N	0
B04-4535 /2	32080277001	2N	1V
B04-3225 /2	32080278001	2N	1V
B04-2563 /B	32080279001	2N	0
B04-2229 /2	32080280001		0 1V
B04-2229 /1	32080280002	2N	1V
B04-2132 /2	32080281001	2N	1V
B04-1674 /2	32080282001		0 2V
B04-1674 /3	32080282002	2N	0
B04-1663 /2	32080283001	1N	0

B04-1663 /3	32080283002	1N		0
B04-1435	32080284001	2N	2V	
B04-0705 A	32080285001	2N	2V	
B03-7776	32080286001	2N		0
B03-6007 1	32080287001	2N	1V	
B03-5618 1	32080288001	2N		0
B03-5303 2	32080289001	2N		0
B03-4981	32080290001	2N		0
B03-3269 2	32080291001	2N		0
B03-3102	32080292001	2N		0
B03-1723 1	32080293001	1N		0

Tabla 1. Ejemplo de una de las plantillas para la identificación de los cilindros con su correspondiente número de biopsia. Las casillas en amarillo corresponden a los casos control.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	320804 28001	320802 57001	320804 29001	320802 57001	320804 29002	320802 57001	320804 30001	320802 58001	320804 31001	320802 58001
2	320802 59001	320804 32001	320802 59001	320804 33001	320802 60001	320804 33002	320802 60001	320804 33003	320802 61001	320804 34001
3	320804 35001	320802 61001	320804 36001	320802 61001	320804 37001	320802 62001	320804 37002	320802 62001	320804 38001	320802 63001
4	320802 63001	320804 38002	320802 64001	320804 39001	320802 64001	320804 40001	320802 65001	320804 41001	320802 65001	320802 66001
5	320802 66001	320802 67001	320802 67001	320802 68001	320802 68001	320802 69001	320802 69001	320802 70001	320802 70001	320802 71001
6	320802 71001	320802 72001	320802 72002	320802 72002	320802 72002	320802 73001	320802 73001	320802 74001	320802 74001	320802 74001
7	320802 74001	320802 75001	320802 75001	320802 76001	320802 76001	320802 77001	320802 77001	320802 77001	320802 78001	320802 78001
8	320802 78001	320802 79001	320802 79001	320802 80001	320802 80002	320802 80002	320802 80002	320802 81001	320802 81001	320802 81001
9	320802 82001	320802 82001	320802 82002	320802 82002	320802 83001	320802 83002	320802 84001	320802 84001	320802 84001	320802 84001
10	320802 85001	320802 85001	320802 85001	320802 85001	320802 86001	320802 86001	320802 87001	320802 87001	320802 87001	320802 88001
11	320802 88001	320802 89001	320802 89001	320802 90001	320802 90001	320802 91001	320802 91001	320802 92001	320802 92001	320802 93001

Tabla 2. Ejemplo de disposición de los cilindros en un array con sus correspondientes códigos de identificación. Las casillas amarillas corresponden a los casos control. Las casillas verdes a los puntos de tejido sano, y las casillas blancas a los puntos de tejido tumoral.

3.- Se preparó un arrayer manual (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA) colocando dos agujas de punción, de 1 mm de diámetro y 4 mm de longitud, en la torreta (Figura 8). Se situó el bloque receptor en su receptáculo y se colocaron en cero los dos micrómetros X e Y, como punto de inicio en la construcción del micro-arreglo tisular. Se realizó una perforación en el bloque de parafina receptor introduciendo la aguja receptora y empujando hasta llegar al tope. Se movió el mango de la aguja para facilitar la realización del cilindro de parafina, hasta su extracción, depositándolo en una cestilla. A continuación se colocó una bandeja puente protectora encima del bloque receptor, quedando éste en la posición adecuada para la introducción del nuevo cilindro. Se realizó una perforación en la zona preseleccionada del bloque donante con la aguja donante del Tissue-Arrayer, obteniendo un cilindro del interior de la aguja donante, al presionar sobre el tope de profundidad situado por encima de la aguja de punción. Se retiró la bandeja protectora del bloque receptor, y se introdujo el cilindro de tejido donante en el orificio previo que se había efectuado en el bloque receptor. Se avanzó la torreta del Tissue-Arrayer a una distancia de 3 mm del orificio anterior haciendo una nueva perforación con la aguja de punción receptora y se repitieron los pasos que se han descrito antes, y así sucesivamente, hasta completar la primera fila de orificios y oclusión con cilindros tisulares donantes en el bloque receptor. Con el micrómetro X se efectuó un desplazamiento lateral para separar otros 3 mm del último orificio realizado en la primera fila comenzando a construir el primer orificio de la segunda fila. Se repitieron los pasos descritos para la primera fila, en la segunda y sucesivas filas hasta la finalización del tissue microarray (Figura 9).

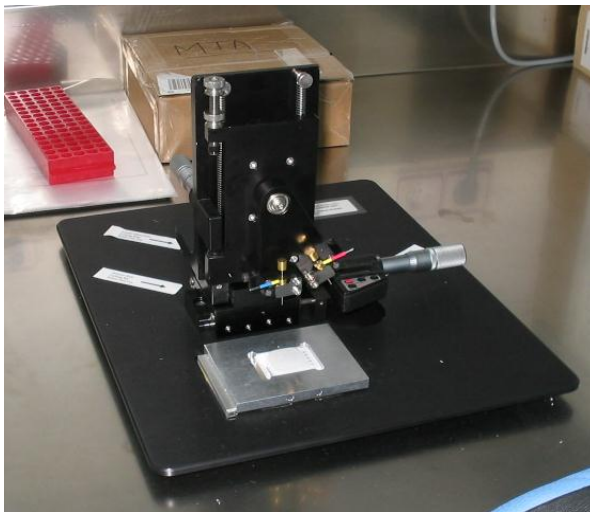


Figura 8. Arrayer manual (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA).

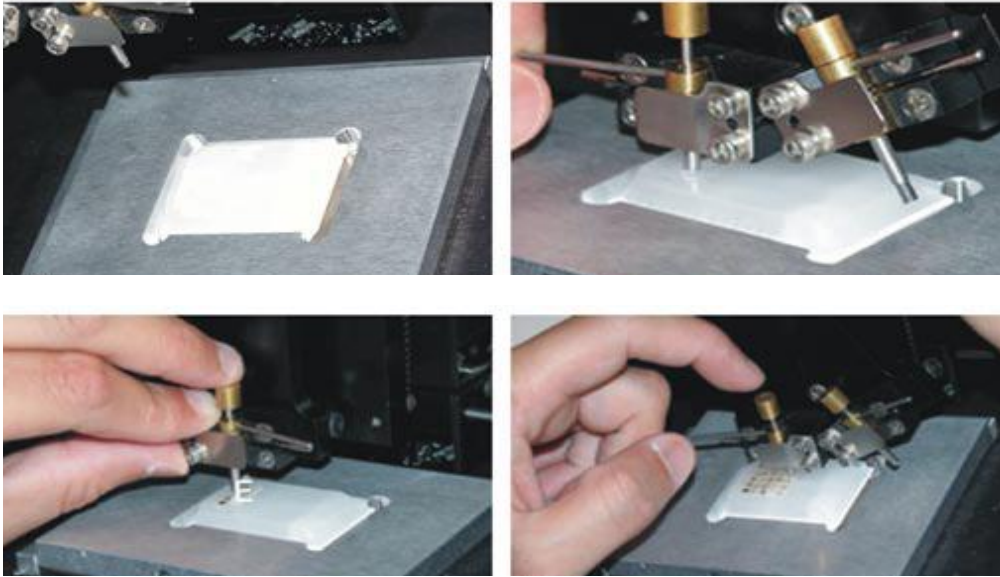


Figura 9. Preparación de un tissue microarray.

4.- Una vez terminado el array se introdujo el bloque en una estufa a 37° C durante 15 minutos aproximadamente; esto permitía que los cilindros del tejido se adhirieran mejor a la parafina en los agujeros del array del bloque receptor. Tras sacar el bloque de la estufa, se presionaba sobre él con un portaobjetos para nivelar la superficie empujando todos los cilindros del TMA a un mismo nivel. Por último, se dejaba enfriar el bloque a temperatura ambiente antes de cortar.

5.- Cuando el TMA estaba construido, se seccionaba una lámina de 4 micras para realizar un control de calidad con tinción de hematoxilina-eosina; si era correcto se procedía a realizar más secciones en láminas del mismo grosor para las tinciones de inmunohistoquímica.

Para este estudio se construyeron un total de 8 TMA (Figura 10). Teniendo en cuenta que en cada uno había 110 puntos, se obtuvieron 880 focos histológicos. Como se explica en el siguiente apartado, en el estudio inmunohistoquímico se utilizaron 7 anticuerpos, por lo que el número de focos potenciales para estudio fue de 6160.

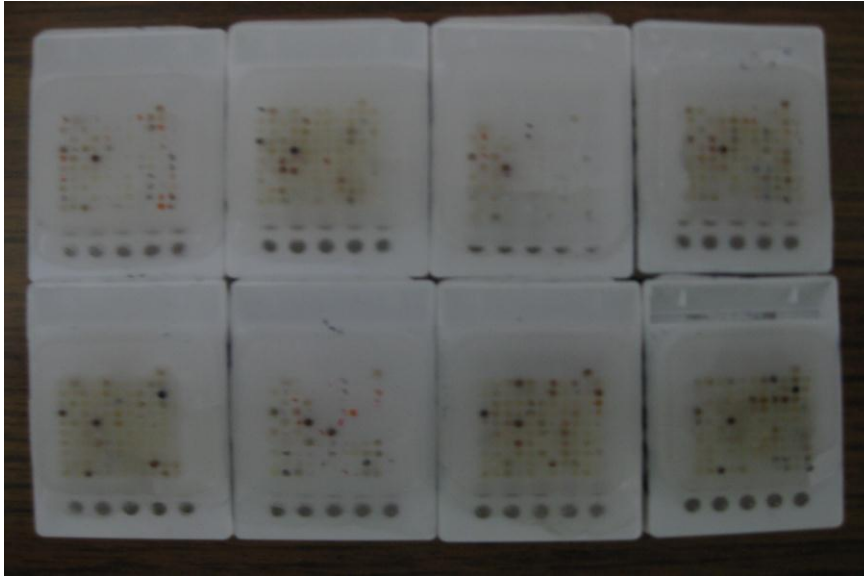


Figura 10. 8 tissues microarrays confeccionados.

VII. Inmunohistoquímica.

La fijación del tejido en formalina y su inclusión en parafina da lugar a la pérdida de inmunorreactividad de la muestra ya que se originan entrecruzamientos proteicos que ocultan los antígenos de interés. Para conseguir una buena reacción antígeno-anticuerpo es necesario realizar previamente un proceso denominado recuperación o desenmascaramiento antigénico. Para ello se utilizó un equipo automático formado por dos tanques con capacidad de 1,5 litros mediante protocolo que se describe más adelante.

Para la inmunotinción se empleó un equipo automático específico. En primer lugar se programó el equipo según el protocolo especificado para cada antígeno. Una vez programado, el mismo equipo establece los reactivos y el orden en el que éstos deben ser cargados en el reservorio. De forma general, la reacción de inmunotinción se basa en la adicción a la muestra de un anticuerpo primario que reconoce un antígeno específico en la superficie del corte histológico. Previamente a la reacción antígeno-anticuerpo, se añade una solución bloqueante con el objetivo de neutralizar las peroxididasas endógenas contenidas en la muestra y minimizar la inmunotinción inespecífica, pues el sistema de inmunodetección se basa en la unión al complejo antígeno-anticuerpo de un polímero compuesto de un esqueleto de dextrano al que se acoplan hasta 100 moléculas de HRP (peroxidasa de rábano) y hasta 20 moléculas de anticuerpo secundario anti-ratón/conejo (solución de detección). Por último se añade el sustrato, consistente en una solución de DAB (3,3'-diaminobencidina tetrahidrocloruro) que debe ser diluida en un tampón orgánico que provee la casa comercial (dilución 1:50), y una solución de hematoxilina

específica para el equipo de inmunotinción. La HRP acoplada a polímero cataliza la peroxidación de la DAB, que vira a un color marrón en el lugar de unión del antígeno con el anticuerpo.

A continuación se describe de forma detallada el protocolo automatizado de desparafinado-desenmascaramiento e inmunotinción de las muestras:

PROTOCOLO AUTOMATIZADO DE DESPARAFINADO-DESENASCARAMIENTO ANTIGÉNICO EN MODULO PT PARA SECCIONES DE TEJIDO INCLUIDAS EN PARAFINA

El módulo PT (PT Module, LabVision Corporation) está diseñado para realizar simultáneamente el desparafinado y desenmascaramiento antigénico sobre secciones de tejido parafinadas, previo a la inmunotinción. El equipo consta de un programador que permite programar ciclos de tiempo y temperatura y dos tanques donde se introducen las preparaciones sobre unos racks (24 preparaciones máximo por tanque).

MATERIAL DE PARTIDA:

- Secciones de tejido parafinado extendidas sobre portaobjetos tratados.
- Tampón EDTA 100 x pH 8.0, Ref. LAV-TA-125-PM
- Agua destilada

PROCEDIMIENTO:

Condiciones: 98° C durante 20 min sin ebullición.

- Inicialmente se hace un precalentamiento del tampón a 65° C. Cuando alcanza esta temperatura el equipo se detiene hasta que el usuario pulsa para continuar el proceso. Durante este precalentamiento se pueden ir cargando los portas en los racks.
- Introducir los racks en el tanque del Módulo PT que contiene 1,5 litros de Tampón EDTA 1X pH: 8.0.
- Continuar el proceso de calentamiento a 98° C durante 20 minutos (cuando se superan los 65° C el equipo dispone de un sistema de cierre de seguridad que impide poder abrirlo a altas temperaturas).
- Cuando finaliza el proceso y la temperatura del tampón ha bajado hasta 65° C, se puede abrir el equipo y sacar los racks con las preparaciones. Estos racks encajan perfectamente en los soportes del inmunoteñidor automático por lo que se pueden transferir directamente para continuar con la técnica de inmunotinción automática.

PROTOCOLO DE INMUNOTINCION AUTOMÁTICA DE UNA MUESTRA PARAFINADA

EQUIPO:

- Autostainer 480-2D, LabVision Corporation (Figura 11).



Figura 11. Autostainer 480-2D, para la inmunotinción de las muestras.

REACTIVOS:

- Anticuerpo primario.
- Bloqueante de peroxidasa endógena Ref: MAD-021540Q.
- Kit de inmunotinción MASVISION UNIVERSAL (basado en sistema de polímeros constituido por combinación de aminoácidos, moléculas de peroxidasa y fracción F(ab')₂ de inmunoglobulina de cabra anti-ratón y anti-conejo) para anticuerpos mono y policlonales, ref: MAD-041880QK-U.
- Kit de revelado para inmunoperoxidasa con Diaminobenzidina (DAB), ref: MAD-001812QK.
- Tampón de lavado TBS-Tween 20 10X, ref: MAD-004077R.
- Agua destilada.

PROCEDIMIENTO:

- Incubación con Bloqueante de peroxidasa endógena durante 10 min a temperatura ambiente.
- Lavado con tampón TBS Tween 20.
- Incubación con Anticuerpo Primario durante el tiempo y temperatura optimizado. Todos los anticuerpos fueron optimizados en concentración de dilución y tiempo de incubación utilizando como referentes las recomendaciones de la casa comercial y las publicaciones científicas sobre los mismos. Se utilizaron para todos controles externos de cánceres humanos que en otras publicaciones se demostraba su expresión seleccionados del archivo del Servicio de Anatomía Patológica del CHJ utilizándose los casos más recientes por ofrecer mayor garantía de condiciones óptimas de fijación, paso fundamental para la buena conservación de los antígenos que se querían estudiar. No se describen todas las pruebas realizadas por no aportar información relevante a esta tesis.
- Lavado con tampón TBS Tween 20 .
- Incubación con Polímero MASVISION (anti-mouse+anti-rabbit) conjugado con PX, durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Lavado con TBS Tween 20.
- Revelado de las muestras con solución de DAB, durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Lavado con Agua destilada.
- Intensificación de la tinción durante 2 minutos con potenciador de DAB.
- Lavado con Agua destilada.
- Retirar las preparaciones del inmunoteñidor.
- Contrastado de las preparaciones con Hematoxilina de Mayer durante 30-60 segundos.
- Lavados con agua del grifo e incubar 5 minutos en la misma.
- Deshidratación con alcoholes crecientes y aclarado con xilol (alcoholes 30°, 70°, 80°, absoluto, absoluto, xilol, xilol) 3 minutos cada uno.
- Montaje de las preparaciones de forma rutinaria (Figura 12 y 13).



Figura 12. Tissues microarrays cortados e inmunoteñidos.

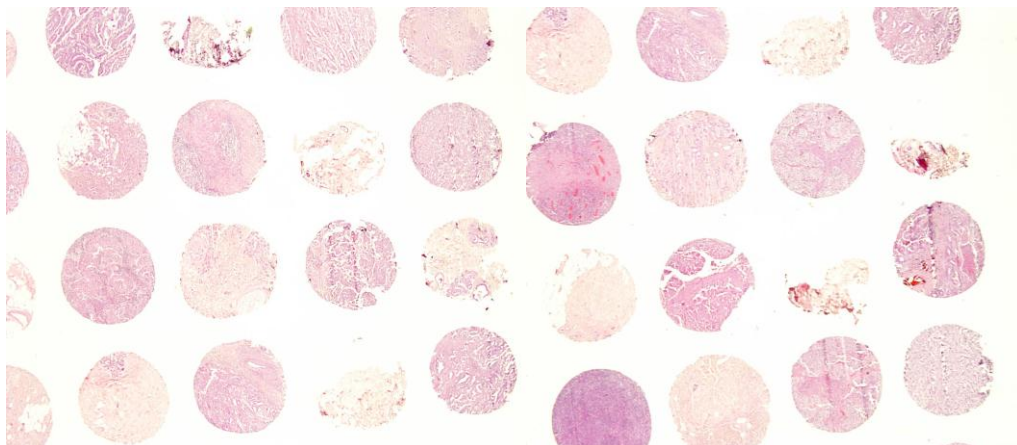


Figura 13. Tissues microarrays teñidos con hematoxilina-eosina.

VII. 1. HIF-1 α .

Para la inmunodetección de HIF-1 α se empleó un anticuerpo monoclonal IgG1 anti HIF-1 α (Becton-Dickinson Biosciences, Palo Alto, CA, USA) a una dilución de 1:50. Las incubaciones con las muestras tumorales se realizaron a 4°C, durante 24 horas. Para el análisis histopatológico de todas las muestras se utilizó un microscopio óptico (Figura 14).

Se consideraron como positivas todas aquellas células tumorales que presentaban inmunorreactividad nuclear. De cada muestra, y en todos los anticuerpos utilizados en el estudio, se hizo una valoración cualitativa (intensidad de tinción) y cuantitativa (porcentaje de células teñidas). Para la intensidad se estableció la siguiente escala: 0: no tinción, 1+: intensidad débil, 2+: intensidad moderada, 3+: intensidad fuerte. El porcentaje de células consideradas positivas se estableció como la relación entre el número de células positivas, con respecto al total de células tumorales. Para simplificar el estudio estadístico, y de acuerdo con los estudios previamente publicados, se consideraron muestras positivas aquellas que sobreexpresaban HIF-1 α en al menos el 5 % de las células tumorales (Bos R. y col., 2005; Yamamoto Y. y cols., 2008). Para la evaluación del tejido sano se utilizó el mismo sistema de valoración que para el tejido tumoral.



Figura 14. Microscopio óptico para el análisis inmunohistoquímico de los tissues.

..

Como casos control se incluyeron en los TMAs muestras de carcinoma endometroide de ovario (Figura 15), que según las distintas series, puede llegar a presentar una expresión por inmunohistoquímica, de hasta el 79 % (Winiewicz y cols., 2008).

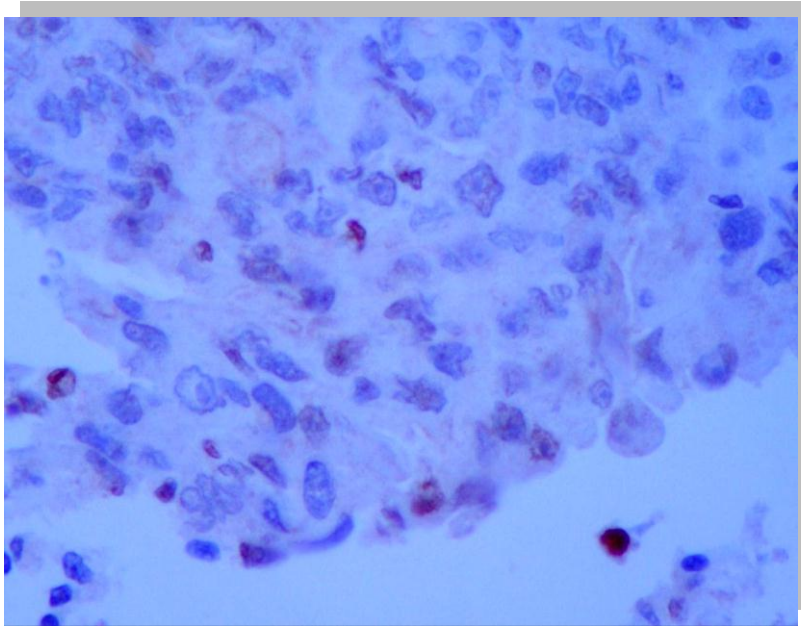


Figura 15. Expresión nuclear de HIF-1 α en carcinoma endometroide de ovario. 40x.

VII.2. Phospho-AKT (pAKT).

Para la inmunodetección de AKT se utilizó un anticuerpo monoclonal Ig G de conejo anti AKT fosforilado (pAKT) [Ser 473; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA; clona 736E11] a una dilución 1:25 durante 120 minutos a temperatura ambiente.

Se consideraron como positivas todas aquellas células tumorales que presentaban tinción nuclear y/o citoplasmática. Para la intensidad se estableció la siguiente escala: 0: no tinción, 1+: intensidad débil, 2+: intensidad moderada, 3+: intensidad fuerte. El porcentaje de células consideradas positivas se estableció como la relación entre el número de células positivas, con respecto al total de células tumorales. Se consideraron muestras positivas aquellas que sobreexpresaban pAKT en al menos el 10% de las células tumorales (Andre F. y cols., 2008; Akcakanat A. y cols., 2008).

Como casos control se incluyeron en los TMAs muestras de adenocarcinoma de próstata (Shimizu y cols., 2007; Ayala y cols., 2004) [Figura 16].

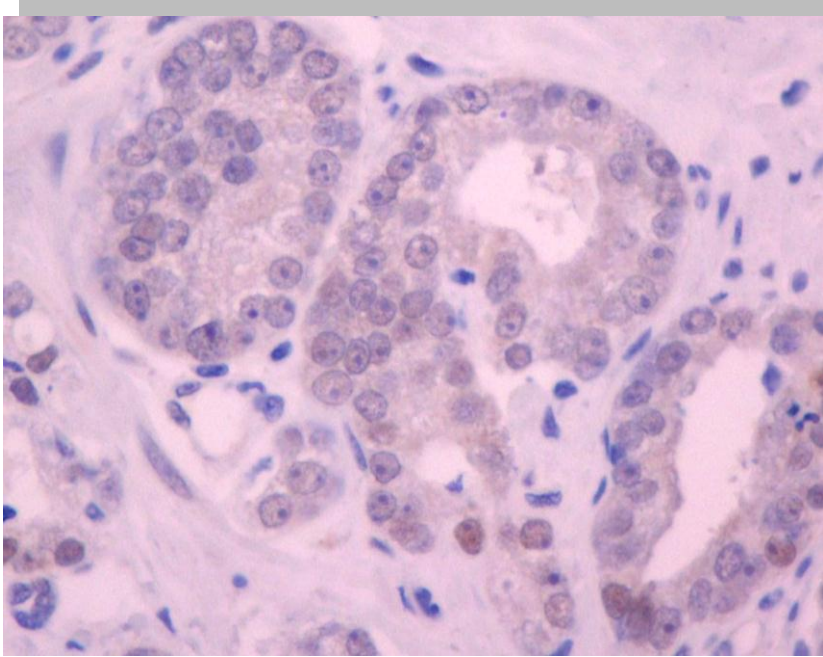


Figura 16. Expresión de pAKT en adenocarcinoma de próstata. 40x. Tinción mixta (nuclear/citoplásmica) de leve/moderada intensidad en las células epiteliales de los acinos prostáticos neoplásicos.

VII.3. Phospho-MAPK (pMAPK).

Para la inmunodetección de MAPK (pMAPK) se utilizó un anticuerpo monoclonal IgG de conejo anti phospho-p44/42 MAPK (pERK 1/2) [Thr202/Tyr204] [Cell Signaling Technology, clona 20G11] a una dilución 1:100 durante 60 minutos a temperatura ambiente.

Se consideraron como positivas todas aquellas células que presentaban tinción nuclear y/o citoplasmática. Para cuantificar la intensidad de tinción se siguió la siguiente gradación: 0: no tinción, 1+: intensidad débil, 2+: intensidad moderada, 3+: intensidad fuerte. El porcentaje de células consideradas positivas se estableció como la relación entre el número de células positivas, con respecto al total de células tumorales. Se consideraron muestras positivas aquellas que sobreexpresaban pMAPK en al menos el 10% de las células tumorales (Gori y cols., 2009).

Se encontró inmunotinción en células endoteliales, que sirvió de control interno. De control externo se incluyeron en los TMA's muestras de carcinoma endometroide de ovario (Zhou JW y cols., 2009) [Figura 17].

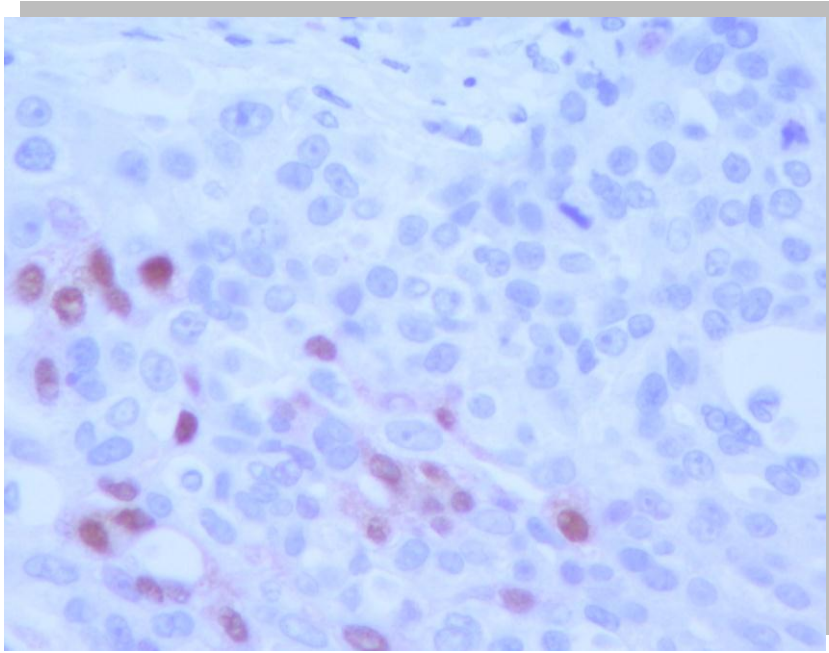


Figura 17. Expresión de pMAPK predominantemente nuclear con débil citoplásmica en carcinoma endometroide de ovario. 40x.

VII.4. VEGF-A.

Para la inmunodetección de VEGF se utilizó un anticuerpo monoclonal de conejo anti VEGF-A (Abcam, USA; clona EP1176Y) prediluido, durante 30 minutos, a temperatura ambiente, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se consideraron como positivas todas aquellas células que presentaban tinción citoplasmática. Para cuantificar la intensidad de tinción se siguió la siguiente gradación: 0: no tinción, 1+: intensidad débil, 2+: intensidad moderada, 3+: intensidad fuerte. El porcentaje de células consideradas positivas se estableció como la relación entre el número de células positivas, con respecto al total de células tumorales. Se consideraron muestras positivas todas aquellas que presentaban algún área de tinción (Wang y cols., 2010; Safwat y cols., 2009).

Se encontró inmunotinción en células endoteliales, que sirvió de control interno. De control externo se incluyeron en los TMAs muestras de adenocarcinoma de pulmón. (Saad RS y cols., 2004) [Figura 18].

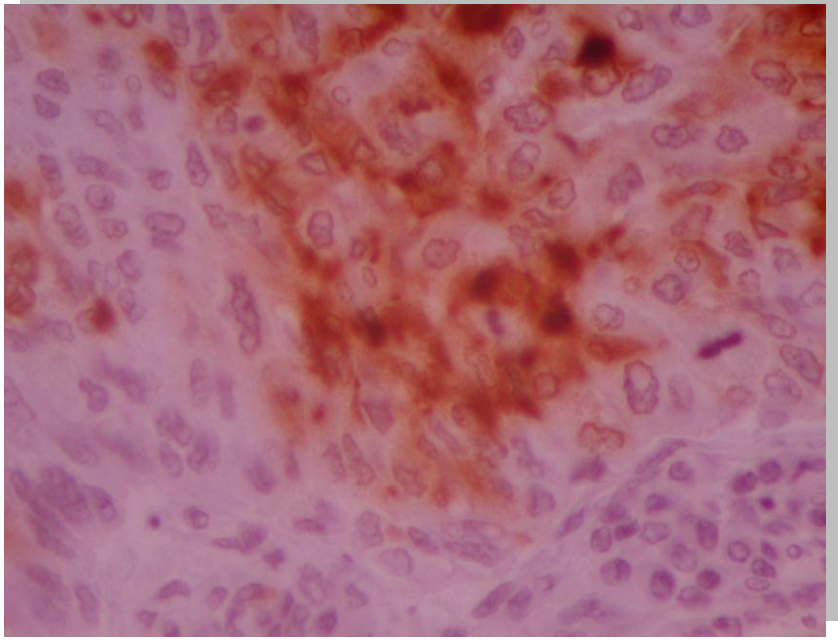


Figura 18. Expresión intensa citoplásmica de VEGF-A en adenocarcinoma de pulmón. 40x.

VII.5. Survivina.

Para la inmunodetección de survivina se utilizó un anticuerpo policlonal IgG de conejo anti survivina (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) a una dilución de 1:400 durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Se consideraron como positivas todas aquellas células que presentaban tinción nuclear y/o citoplasmática. Para cuantificar la intensidad de tinción se siguió la siguiente gradación: 0: no tinción, 1+: intensidad débil, 2+: intensidad moderada, 3+: intensidad fuerte. El porcentaje de células consideradas positivas se estableció como la relación entre el número de células positivas, con respecto al total de células tumorales. Se consideraron muestras positivas aquellas que sobreexpresaban Survivina en al menos el 50% de las células tumorales.

Como casos control se incluyeron en los TMAs muestras de linfoma de Hodgkin (García y cols., 2003) [Figura 19].

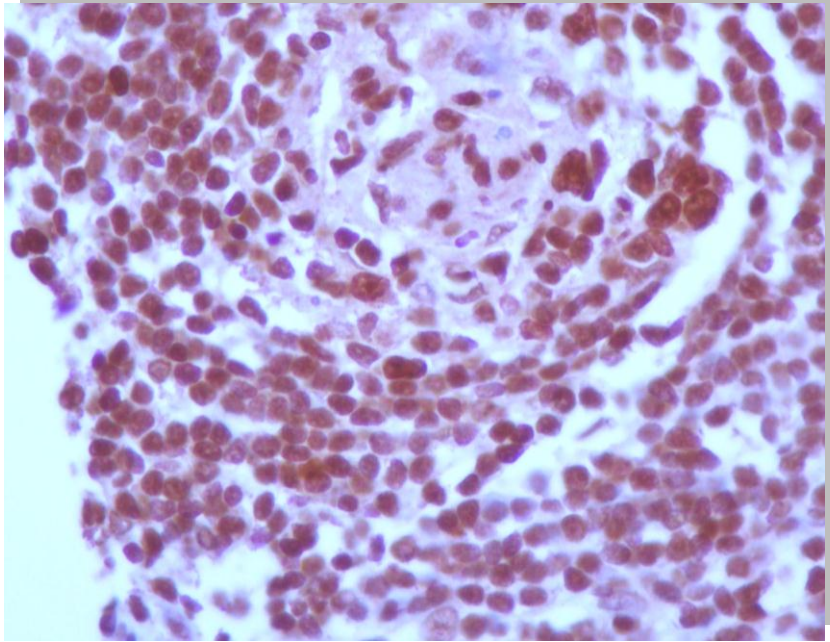


Figura 19. Expresión de Survivina en un linfoma de Hodgkin. 40x.

VII.6. Phospho-STAT3 (pSTAT3).

Para la inmunodetección de pSTAT3 se utilizó un anticuerpo monoclonal de conejo anti STAT3 fosforilado al residuo 705 de tirosina (Cell Signaling, Boston, MA; clona D3A7) a una dilución 1:50 durante 60 minutos a temperatura ambiente.

Se consideraron como positivas todas aquellas células tumorales que presentaban tinción nuclear. Para la intensidad se estableció la siguiente escala: 0: no tinción, 1+: intensidad débil, 2+: intensidad moderada, 3+: intensidad fuerte. El porcentaje de células consideradas positivas se estableció como la relación entre el número de células positivas, con respecto al total de células tumorales. Para simplificar el estudio estadístico, se consideraron muestras positivas aquellas que presentaban algo de intensidad de tinción (Dolled-Filhart y cols., 2003). Para la evaluación del tejido sano se utilizó el mismo sistema de valoración que para el tejido tumoral.

Además del tejido epitelial sano, también se encontró inmunotinción del tejido endotelial, que sirvió como control interno. Para los controles externos se utilizaron muestras de adenocarcinoma de pulmón (Figura 20), tras confirmación de su validez mediante revisión bibliográfica (Haura y cols, 2005; Van Crujisen y cols, 2009; Kim y cols, 2010).

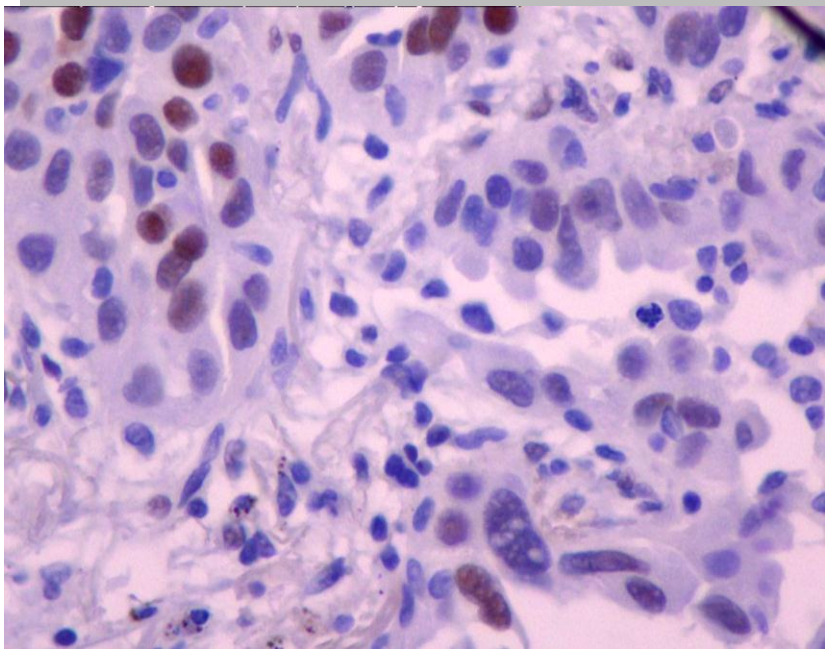


Figura 20. Expresión nuclear moderada/fuerte de pSTAT3 en adenocarcinoma de pulmón. 40x.

VII.7. EGFR.

Para la determinación de EGFR se empleó el kit de DAKO EGFR pharma DX™ Kit for Dako Autostainer (K1494), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se consideraron como positivas todas aquellas células que presentaban tinción de membrana citoplasmática. Para cuantificar la intensidad de tinción se siguió la siguiente gradación: 0: no tinción, 1+: intensidad débil, 2+: intensidad moderada, 3+: intensidad fuerte. El porcentaje de células consideradas positivas se estableció como la relación entre el número de células positivas, con respecto al total de células tumorales. Se consideraron muestras positivas aquellas que presentaban algo de tinción de membrana.

Como control interno se utilizaron muestras histológicas de adenocarcinoma de pulmón (Liang Z y cols., 2010) [Figura 21] y como control externo botones celulares con las líneas CAMA-1 (control negativo, Figura 22) y HT-29 (control positivo, Figura 23).

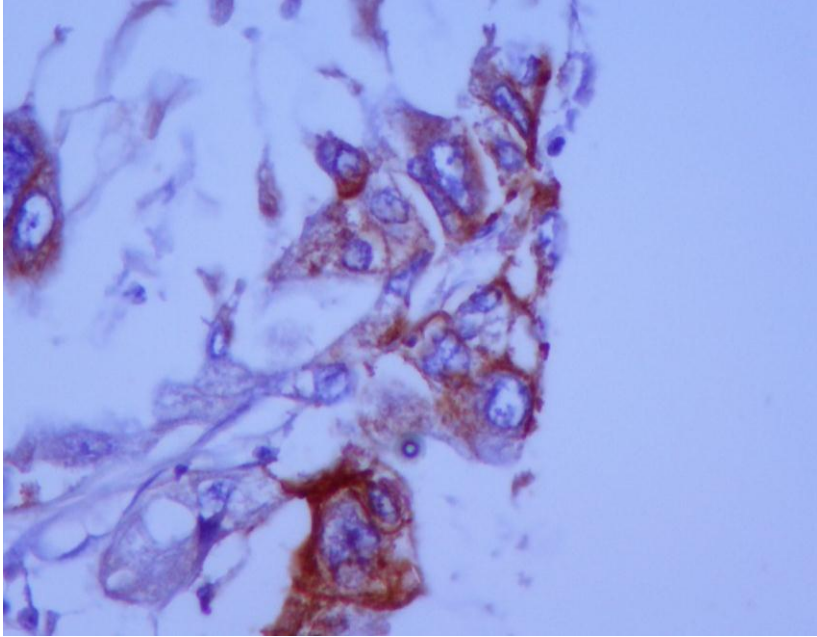


Figura 21. Expresión intensa de membrana citoplásmica de EGFR en adenocarcinoma de pulmón. 40x.

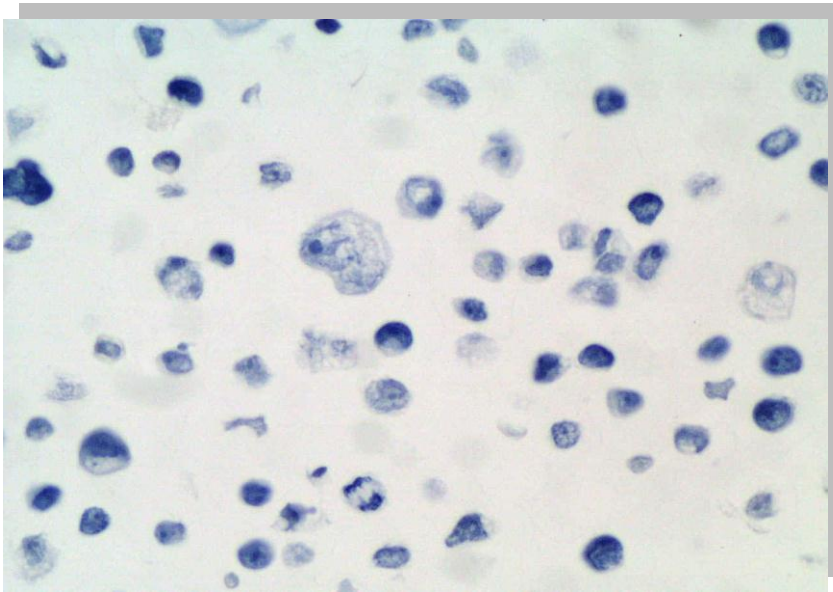


Figura 22. Ausencia de tinción de membrana de EGFR en botones celulares con las líneas CAMA-1. 40x.

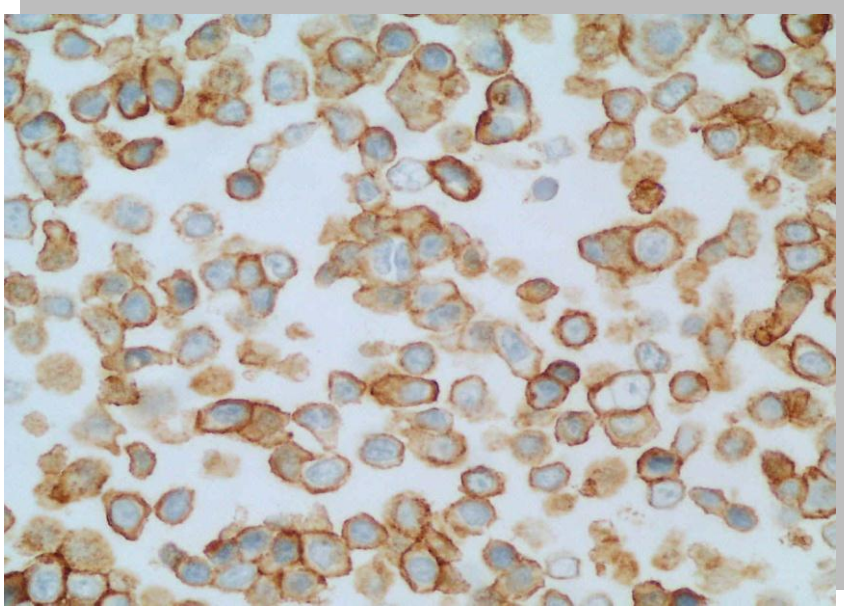


Figura 23. Tinción moderada de membrana citoplásmica de EGFR en botones celulares con las líneas HT-29. 40x.

Anticuerpo	Dilución	Tiempo de incubación	Punto de corte
Anti HIF-1 α	1:50	24 horas	5 %
Anti pAKT	1:25	120 minutos	10%
Anti pMAPK	1:100	60 minutos	10%
Anti VEGF-A	1:100	30 minutos	0%
Anti Survivina	1:400	30 minutos	50%
Anti pSTAT3	1:50	60 minutos	1+
Anti EGFR: EGFR pharma DX TM Kit for Dako Autostainer (K1494)			0%

Tabla 3. Anticuerpos empleados en nuestro estudio con sus condiciones de reacción y los puntos de corte utilizados, en cada uno de ellos para clasificar las muestras como positivas o negativas.

VIII. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó mediante el software SPSS versión 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL.). Para estudiar la asociación entre la respuesta al tratamiento y las diferentes variables clínico-patológicas conocidas (edad, tamaño tumoral, afectación ganglionar, grado histológico, Ki 67, RE, RP, Her2 y fenotipos moleculares) se utilizaron test no paramétricos (Kruskal-Wallis / U de Mann-Whitney, Chi-cuadrado de Pearson/Test exacto de Fisher). Para estudiar la asociación entre la expresión de proteínas (HIF-1 α , pAKT, pMAPK, VEGF-A, Survivina, pSTAT3 y EGFR) y la respuesta al tratamiento neoadyuvante se utilizaron los mismos test. Para estudiar la asociación entre la expresión de proteínas y las variables clínico-patológicas conocidas, antes del tratamiento, se utilizó el Coeficiente de correlación de Spearman, y los test de Kruskal-Wallis / U de Mann-Whitney y Chi-cuadrado de Pearson/Test exacto de Fisher. Por último, para estudiar la relación de la expresión de proteínas entre ellas, antes del tratamiento, se utilizó el Coeficiente de correlación de Spearman y el Test exacto de Fisher.

Valores de P menores de 0,05 se consideraron como estadísticamente significativos.

RESULTADOS

RESULTADOS

I. Características clínico-patológicas de las pacientes.

De las 95 pacientes del estudio se recogieron los datos clínico-patológicos, tal y como se describen en la Tabla 1.

Características	Número de pacientes (%)
Edad al diagnóstico (años)	
< 40	19 (20 %)
40-49	38 (40 %)
50-59	18 (18,9 %)
>= 60	20 (21,1 %)
Media	50
Rango	27-74
Tamaño tumoral pretratamiento (cm)	
1-1,9	4 (4,2 %)
2-2,9	22 (23,2 %)
3-3,9	22 (23,2 %)
4-4,9	17 (17,9 %)
> 4,9	23 (24,2 %)
No medible	7 (7,4 %)
Tipo histológico	
Ductal infiltrante	72 (75,8 %)
Lobulillar infiltrante	9 (9,5 %)
Inflamatorio	6 (6,3 %)
Mucinoso	6 (6,3 %)
Mixto	2 (2,1 %)
Grado histológico	
1	20 (21 %)
2	37 (39 %)
3	34 (35,8 %)
No evaluable	4 (4,2 %)
TNM clínico al diagnóstico	
T	
T1	6 (6,3 %)
T2	62 (65,3 %)
T3	16 (16,8 %)
T4	8 (8,4 %)
Tx	3 (3,2 %)
N	
N0	34 (35,8 %)
N1	46 (48,4 %)

N2	15 (15,8 %)
N3	0 (0 %)
Nx	0 (0 %)
M	
M0	95 (100 %)
M1	0 (0 %)
Afectación ganglionar clínica	
Ganglios negativos	34 (35,8 %)
Ganglios positivos	61 (64,2 %)
Estadio clínico	
I	2 (2,1 %)
IIA	30 (31,6 %)
IIB	31 (32,6 %)
IIIA	21 (21,1 %)
IIIB	8 (8,4 %)
No evaluable	3 (3,2 %)
RE	
≥ 10 %	69 (72,6 %)
< 10 %	25 (26,3 %)
No evaluable	1 (1,1 %)
Contaje ≥ 3	71 (74,7 %)
Contaje < 3	23 (24,2 %)
No evaluable	1 (1,1 %)
RP	
≥ 10%	54 (56,8 %)
< 10 %	40 (42,1 %)
No evaluable	1 (1,1 %)
Contaje ≥ 3	58 (61,1 %)
Contaje < 3	36 (37,1 %)
No evaluable	1 (1,1 %)
HER2	
Positivo	20 (21,1 %)
Negativo	72 (75,8 %)
No evaluable	3 (3,1 %)
Ki67	
≥ 10 %	76 (80 %)
< 10 %	18 (18,9 %)
No evaluable	1 (1,1 %)
≥ 20 %	38 (40 %)
< 20 %	56 (58,9 %)
No evaluable	1 (1,1 %)

Fenotipo	
Fenotipo (Perfil 1)	
Basal	13 (13,7 %)
Her2	20 (21 %)
Luminal A	31 (32,6 %)
Luminal B	28 (29,5 %)
No evaluable	3 (3,2 %)
Fenotipo (Perfil 2)	
Basal	13 (13,7 %)
Her2	7 (7,4 %)
Luminal A	60 (63,1 %)
Luminal B	12 (12,6 %)
No evaluable	3 (3,2 %)
Tipo de cirugía	
Conservadora	70 (73,7 %)
No conservadora	25 (26,3 %)
Respuesta patológica (M&P)	
M&P (Asociación 1)	
1	8 (8,4 %)
2	22 (23,1 %)
3	28 (29,5 %)
4	17 (17,9 %)
5	20 (21,1 %)
M&P (Asociación 2)	
1-2	30 (31,6 %)
3	28 (29,5 %)
4-5	37 (38,9 %)
M&P (Asociación 3)	
1-4	75 (78,9 %)
5	20 (21,1 %)
M&P (Asociación 4)	
1-3	58 (61,1 %)
4-5	37 (38,9 %)
M&P (Asociación 5)	
1-2	30 (31,6 %)
4-5	37 (38,9 %)
No incluidos	28 (29,5 %)

Tabla 1. Características clínico-patológicas de las pacientes.

II. Relación entre las variables clínico-patológicas conocidas y la respuesta al tratamiento quimioterápico neoadyuvante. Análisis univariante.

Para el análisis estadístico de las diferentes variables con el grado de respuesta a la quimioterapia estratificado por el sistema de Miller&Payne (ver el apartado IV.2.2. de Material y Métodos) se establecieron 5 posibles asociaciones de la variable independiente:

- ✓ Asociación 1 (M&P): Grado 1 vs 2 vs 3 vs 4 vs 5
- ✓ Asociación 2 (M&P): Grados 1-2 vs 3 vs 4-5
- ✓ Asociación 3 (M&P): Grados 1-4 vs 5
- ✓ Asociación 4 (M&P): Grados 1-3 vs 4-5
- ✓ Asociación 5 (M&P): Grados 1-2 vs 4-5

Para ver si hay relación entre la respuesta al tratamiento y las diferentes variables se utilizaron test no paramétricos (Kruskal-Wallis / U de Mann-Whitney, Chi-cuadrado de Pearson/Test exacto de Fisher) tras haberse comprobado que las variables no siguen una distribución normal.

II.1. Relación entre la edad de las pacientes y respuesta al tratamiento.

Se encontró relación estadísticamente significativa entre la variable numérica cuantitativa edad y la variable cualitativa M&P (Asociación 4) [Prueba de U-Mann-Whitney, $p=0,046$]. De las 95 mujeres estudiadas, las pacientes más jóvenes respondían mejor al tratamiento quimioterápico neoadyuvante, aunque no se vió relación estadísticamente significativa entre la edad de las pacientes y la R_{Pc} (Prueba U de Mann-Whitney, $p=0,337$) [Tablas 2 y 3].

	Nº CASOS	MEDIA	ERROR ESTÁNDAR
ASOCIACIÓN 1 (grados 1 vs 2 vs 3 vs 4 vs 5)			
Grado 1	8 (8,4 %)	45,88	4,236
Grado 2	22 (23,1 %)	55,86	3,291
Grado 3	28 (29,5 %)	51,00	2,222
Grado 4	17 (17,9 %)	44,53	1,871
Grado 5	20 (21,1 %)	47,9	2,619
ASOCIACIÓN 4 (grados 1-3 vs 4-5)			
Grado 1-3	58 (61,1 %)	52,14	1,773
Grado 4-5	37 (38,9 %)	46,35	1,658

M&P vs EDAD (cualitativa vs cuantitativa)			
Edad	p	Método	Significación
M&P (Asociación 1) vs EDAD	0,143	Kruskal-Wallis	Relación no significativa
M&P (Asociación 2) vs EDAD	0,116	Kruskal-Wallis	Relación no significativa
M&P (Asociación 3) vs EDAD	0,337	U de Mann-Whitney	Relación no significativa
M&P (Asociación 4) vs EDAD	0,046	U de Mann-Whitney	Relación significativa
M&P (Asociación 5) vs EDAD	0,053	U de Mann-Whitney	Relación no significativa

Tablas 2 y 3. Relación entre la edad y la respuesta al tratamiento.

II.2. Relación entre el tamaño tumoral al diagnóstico y la respuesta al tratamiento.

No se encontró relación estadísticamente significativa entre la variable cuantitativa tamaño del tumor antes de iniciar el tratamiento y la respuesta al mismo (prueba U de Mann-Whitney/Kruskal-Wallis) en las 88 pacientes en las que se pudo medir por imagen el tamaño de la neoplasia al diagnóstico (Tablas 4 y 5).

	Nº CASOS	MEDIA	ERROR ESTÁNDAR
ASOCIACIÓN 1 (grados 1 vs 2 vs 3 vs 4 vs 5)			
Grado 1	8 (9,1 %)	3,713	0,5992
Grado 2	19 (21,6 %)	4,005	0,3749
Grado 3	27 (30,7 %)	3,919	0,2705
Grado 4	15 (17 %)	4,220	0,4916
Grado 5	19 (21,6 %)	3,832	0,3756

M&P vs TAMAÑO INICIAL DEL TUMOR (cualitativa vs cuantitativa)			
Tamaño tumoral	p	Método	Significación
M&P (Asociación 1) vs Tamaño	0,951	Kruskal-Wallis	Relación no significativa
M&P (Asociación 2) vs Tamaño	0,963	Kruskal-Wallis	Relación no significativa
M&P (Asociación 3) vs Tamaño	0,768	U de Mann-Whitney	Relación no significativa
M&P (Asociación 4) vs Tamaño	0,935	U de Mann-Whitney	Relación no significativa
M&P (Asociación 5) vs Tamaño	0,856	U de Mann-Whitney	Relación no significativa

Tablas 4 y 5. Relación entre el tamaño tumoral y la respuesta al tratamiento.

II.3. Relación entre la afectación ganglionar al diagnóstico y la respuesta al tratamiento.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la variable cualitativa afectación ganglionar inicial y la respuesta al tratamiento (Chi-cuadrado de Pearson/test exacto de Fisher) en las 95 pacientes del estudio (Tablas 6 y 7).

Nº DE CASOS		
	GANGLIOS (-)	GANGLIOS (+)
ASOCIACIÓN 1 (grados 1 vs 2 vs 3 vs 4 vs 5)		
Grado 1	3 (37,5 %)	5 (62,5 %)
Grado 2	7 (51,8 %)	15 (68,2 %)
Grado 3	10 (35,7 %)	18 (64,3 %)
Grado 4	5 (29,4 %)	12 (70,6 %)
Grado 5	9 (45 %)	11 (55 %)

M&P vs Gánglios pretratamiento (cualitativa vs cualitativa)			
Afectación ganglionar	p	Método	Significación
M&P (Asoc 1) vs Gánglios pre	0,878	Chi-cuadrado de Pearson	Relación no significativa
M&P (Asoc 2) vs Gánglios_pre	0,929	Chi-cuadrado de Pearson	
M&P (Asoc 3) vs Gánglios_pre	0,432	Test exacto de Fisher	
M&P (Asoc 4) vs Gánglios pre	0,827	Test exacto de Fisher	
M&P (Asoc 5) vs Gánglios pre	0,800	Test exacto de Fisher	

Tablas 6 y 7. Relación entre la afectación ganglionar y la respuesta al tratamiento.

II.4. Relación entre el grado histológico y la respuesta al tratamiento

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la variable cuantitativa grado y la respuesta al tratamiento en todas las asociaciones de la variable cualitativa MP (prueba U de Mann-Whitney/Kruskal-Wallis). De las 91 pacientes en las que se valoró el grado histológico, aquellas pacientes con un mayor grado respondieron mejor al tratamiento y tuvieron una tasa más alta de RPc ($p < 0,001$) [Tablas 8 y 9].

	N° CASOS	MEDIA	ERROR ESTÁNDAR
ASOCIACIÓN 1 (grados 1 vs 2 vs 3 vs 4 vs 5)			
Grado 1	7 (7,7 %)	2,000	0,3086
Grado 2	22 (24,2 %)	2,000	0,1612
Grado 3	27 (29,6 %)	1,926	0,1299
Grado 4	17 (18,7 %)	2,176	0,1962
Grado 5	18 (19,8 %)	2,722	0,1354
ASOCIACIÓN 2 (grados 1-2 vs 3 vs 4-5)			
Grado 1-2	29 (31,9 %)	2,000	0,1404
Grado 3	27 (29,7 %)	1,926	0,1299
Grado 4-5	35 (38,4 %)	2,457	0,1253
ASOCIACIÓN 3 (grados 1-4 vs 5)			
Grado 1-4	73 (80,2 %)	2,014	0,0861
Grado 5	18 (19,8 %)	2,722	0,1354
ASOCIACIÓN 4 (Grados 1-3 vs 4-5)			
Grado 1-3	56 (61,5 %)	1,964	0,0952
Grado 4-5	35 (38,5 %)	2,457	0,1253
ASOCIACIÓN 5 (grados 1-2 vs 4-5)			
Grado 1-2	29 (45,3%)	2,000	0,1404
Grado 4-5	35 (54,7 %)	2,457	0,1253

M&P vs GRADO HISTOLÓGICO (cualitativa vs cuantitativa)			
	p	Método	Significación
M&P (Asociación 1) vs Grado	0,005	Kruskal-Wallis	Relación significativa
M&P (Asociación 2) vs Grado	0,007	Kruskal-Wallis	
M&P (Asociación 3) vs Grado	< 0,001	U de Mann-Whitney	
M&P (Asociación 4) vs Grado	0,002	U de Mann-Whitney	
M&P (Asociación 5) vs Grado	0,014	U de Mann-Whitney	

Tablas 8 y 9. Relación entre el grado histológico y la respuesta al tratamiento.

II.5. Relación entre el marcador Ki 67 y la respuesta al tratamiento

Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la variable cuantitativa numérica Ki 67 y la respuesta al tratamiento en todas las asociaciones de la variable cualitativa M&P (prueba U de Mann-Whitney/Kruskal-Wallis). De las 94 pacientes en las que se valoró el marcador Ki 67, aquellas pacientes que expresaban un mayor índice de proliferación en la biopsia diagnóstica respondían mejor al tratamiento y tenían más probabilidad de alcanzar una RPc ($p < 0,001$) [Tablas 10 y 11].

	Nº CASOS	MEDIA	ERROR ESTÁNDAR
ASOCIACIÓN 1 (grados 1 vs 2 vs 3 vs 4 vs 5)			
Grado 1	8 (8,5 %)	13,56	3,746
Grado 2	21 (22,3 %)	27,26	5,999
Grado 3	28 (29,8 %)	23,25	3,684
Grado 4	17 (18,1 %)	25,94	4,067
Grado 5	20 (21,3 %)	58,50	6,221
ASOCIACIÓN 2 (grados 1-2 vs 3 vs 4-5)			
Grado 1-2	29 (30,8 %)	23,48	4,574
Grado 3	28 (29,8 %)	23,25	3,684
Grado 4-5	37 (39,4 %)	43,54	4,662
ASOCIACIÓN 3 (grados 1-4 vs 5)			
Grado 1-4	74 (78,7 %)	23,96	2,427
Grado 5	20 (21,3 %)	58,50	6,221
ASOCIACIÓN 4 (Grados 1-3 vs 4-5)			
Grado 1-3	57 (60,6 %)	23,37	2,922
Grado 4-5	37 (39,4 %)	43,54	4,662
ASOCIACIÓN 5 (grados 1-2 vs 4-5)			
Grado 1-2	29 (43,9 %)	23,48	4,574
Grado 4-5	37 (56,1 %)	43,54	4,662

M&P vs Ki 67% (cualitativa vs cuantitativa)			
Ki 67 %	p	Método	Significación
M&P (Asociación 1) vs ki 67%	< 0,001	Kruskal-Wallis	Relación significativa
M&P (Asociación 2) vs ki 67%	0,001	Kruskal-Wallis	
M&P (Asociación 3) vs ki 67%	< 0,001	U de Mann-Whitney	
M&P (Asociación 4) vs ki 67%	< 0,001	U de Mann-Whitney	
M&P (Asociación 5) vs ki 67%	0,001	U de Mann-Whitney	

Tablas 10 y 11. Relación entre el marcador Ki 67 (como variable cuantitativa) y la respuesta al tratamiento.

En el caso de este marcador, tal y como se describe en el apartado IV.2.1. de Material y Métodos, se clasificaron otras dos variables cualitativas en función de 2 puntos de corte diferentes (10 % y 20 %), y también se analizó su relación con la respuesta al tratamiento quimioterápico. Si consideráramos la variable Ki 67 como cualitativa dicotómica (positivo $\geq 10\%$ vs negativo $< 10\%$) para ver la relación con el grado de respuesta al tratamiento (Test exacto de Fisher/Chi-Cuadrado de Pearson) obteníamos una correlación significativa con las Asociaciones 1, 2, 4 y 5 de M&P. Aquellas pacientes con un Ki 67 positivo respondían mejor al tratamiento quimioterápico; sin embargo, no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre un Ki 67 $\geq 10\%$ y la R_{Pc} ($p=0,107$) [Tablas 12 y 13].

	N° de casos	
	< 10%	≥ 10%
ASOCIACIÓN 1 (Grados 1 vs 2 vs 3 vs 4 vs 5)		
Grado 1	4 (50,0 %)	4 (50,0 %)
Grado 2	5 (23,8 %)	16 (76,2 %)
Grado 3	7 (25,0 %)	21 (75 %)
Grado 4	1 (5,9 %)	16 (94,1 %)
Grado 5	1 (5 %)	19 (95 %)
ASOCIACIÓN 2 (Grados 1-2 vs 3 vs 4-5)		
Grado 1-2	9 (31,0 %)	20 (69,0 %)
Grado 3	7 (25,0 %)	21 (75 %)
Grado 4-5	2 (5,4 %)	35 (94,6 %)
ASOCIACIÓN 4 (Grados 1-3 vs 4-5)		
Grado 1-3	16 (28,1 %)	41 (71,9 %)
Grado 4-5	2 (5,4 %)	35 (94,6 %)
ASOCIACIÓN 5 (Grados 1-2 vs 4-5)		
Grado 1-2	9 (31,0 %)	20 (69,0 %)
Grado 4-5	2 (5,4 %)	35 (94,6 %)

MP vs Ki 67 (pc ≥ 10 %) (cualitativa vs cualitativa)			
Ki 67 (pc ≥ 10 %)	p	Método	Significación
M&P (Asociación 1) vs Ki 67	0,035	Chi-cuadrado de Pearson	Relación significativa
M&P (Asociación 2) vs Ki 67	0,020	Chi-cuadrado de Pearson	Relación significativa
M&P (Asociación 3) vs Ki 67	0,107	Test exacto de Fisher	Relación no significativa
M&P (Asociación 4) vs Ki 67	0,007	Test exacto de Fisher	Relación significativa
M&P (Asociación 5) vs Ki 67	0,008	Test exacto de Fisher	Relación significativa

Tablas 12 y 13. Relación entre el marcador Ki 67 (pc ≥ 10 %) y la respuesta al tratamiento.

En el caso de considerar el punto de corte $\geq 20\%$ también se vió una correlación positiva significativa, en este caso, con todas las asociaciones de M&P (Test exacto de Fisher/Chi- Cuadrado de Pearson). Aquellas pacientes que expresaban un $Ki\ 67 \geq 20\%$ respondían mejor al tratamiento y tenían una mayor probabilidad de alcanzar una RPC ($p < 0,001$) [Tablas 14 y 15].

	Nº de casos	
	< 20%	$\geq 20\%$
ASOCIACIÓN 1 (Grados 1 vs 2 vs 3 vs 4 vs 5)		
Grado 1	5 (62,5 %)	3 (37,5 %)
Grado 2	12 (57,1 %)	9 (42,9 %)
Grado 3	13 (46,4 %)	15 (53,6 %)
Grado 4	7 (41,2 %)	10 (58,8 %)
Grado 5	1 (5,0 %)	19 (95,0 %)
ASOCIACIÓN 2 (grados 1-2 vs 3 vs 4-5)		
Grado 1-2	17 (58,6 %)	12 (41,4 %)
Grado 3	13 (46,4 %)	15 (53,6 %)
Grado 4-5	8 (21,6 %)	29 (78,4 %)
ASOCIACIÓN 3 (grados 1-4 vs 5)		
Grado 1-4	37 (50,0 %)	37 (50,0 %)
Grado 5	1 (5,0 %)	19 (95,0 %)
ASOCIACIÓN 4 (Grados 1-3 vs 4-5)		
Grado 1-3	30 (52,6 %)	27 (47,4 %)
Grado 4-5	8 (21,6 %)	29 (78,4 %)
ASOCIACIÓN 5 (grados 1-2 vs 4-5)		
Grado 1-2	17 (58,6 %)	12 (41,4 %)
Grado 4-5	8 (21,6 %)	29 (78,4 %)

M&P vs Ki 67 ($pc \geq 20\%$) (cualitativa vs cualitativa)			
Ki 67 ($pc \geq 20\%$)	p	Método	Significación
M&P (Asociación 1) vs Ki 67	0,005	Chi-cuadrado de Pearson	Relación significativa
M&P (Asociación 2) vs Ki 67	0,007	Chi-cuadrado de Pearson	
M&P (Asociación 3) vs Ki 67	< 0,001	Test exacto de Fisher	
M&P (Asociación 4) vs Ki 67	0,003	Test exacto de Fisher	
M&P (Asociación 5) vs Ki 67	0,004	Test exacto de Fisher	

Tablas 14 y 15. Relación entre el marcador Ki 67 ($pc \geq 20\%$) y la respuesta al tratamiento.

II.6. Relación entre los RE y la respuesta al tratamiento.

Se encontró una asociación negativa estadísticamente significativa entre la variable numérica cuantitativa RE % y la respuesta al tratamiento, en todas las asociaciones de la variable cualitativa M&P (Prueba U de Mann-Whitney/Kruskal-Wallis). De las 94 pacientes en las que se valoró la expresión de RE, aquellas pacientes que presentaban un menor porcentaje de RE tenían una mejor respuesta al tratamiento y una mayor probabilidad de alcanzar una RPc ($p < 0,001$) [Tablas 16 y 17].

	Nº CASOS	MEDIA	ERROR ESTÁNDAR
ASOCIACIÓN 1 (Grados 1 vs 2 vs 3 vs 4 vs 5)			
Grado 1	8 (8,5 %)	56,2500	12,52676
Grado 2	22 (23,4 %)	63,2500	8,36076
Grado 3	28 (29,8 %)	70,5357	5,61284
Grado 4	17 (18,1 %)	44,1176	8,67335
Grado 5	19 (20,2 %)	22,1053	8,42334
ASOCIACIÓN 2 (grados 1-2 vs 3 vs 4-5)			
Grado 1-2	30 (31,9 %)	61,3833	6,89576
Grado 3	28 (29,8 %)	70,5357	5,61284
Grado 4-5	36 (38,3 %)	32,5000	6,24087
ASOCIACIÓN 3 (grados 1-4 vs 5)			
Grado 1-4	75 (79,8 %)	60,8867	4,09445
Grado 5	19 (20,2 %)	22,1053	8,42334
ASOCIACIÓN 4 (grados 1-3 vs 4-5)			
Grado 1-3	58 (61,7 %)	65,8017	4,48159
Grado 4-5	36 (38,3 %)	32,5000	6,24087
ASOCIACIÓN 5 (grados 1-2 vs 4-5)			
Grado 1-2	30 (45,5 %)	61,3833	6,89576
Grado 4-5	36 (54,5 %)	32,5000	6,24087

M&P vs RE% (cualitativa vs cuantitativa)			
RE %	p	Método	Significación
M&P (Asociación 1) vs RE%	0,001	Kruskal-Wallis	Relación significativa
M&P (Asociación 2) vs RE%	< 0,001	Kruskal-Wallis	
M&P (Asociación 3) vs RE%	< 0,001	U de Mann-Whitney	
M&P (Asociación 4) vs RE%	< 0,001	U de Mann-Whitney	
M&P (Asociación 5) vs RE%	0,003	U de Mann-Whitney	

Tablas 16 y 17. Relación entre los RE (como variable cuantitativa) y la respuesta al tratamiento.

En el caso de los RE, tal y como se describe en el apartado IV.2.1. de Material y Métodos, se clasificaron otras dos variables: por un lado se hizo una valoración semicuantitativa, a través de un contejo (0-8), considerando como positivo un contejo ≥ 3 . Al analizar la relación con el grado de respuesta al tratamiento (Test exacto de Fisher/Chi-Cuadrado de Pearson), se vió una correlación significativa (asociación negativa) con todas las asociaciones de M&P. Aquellas pacientes con un contejo < 3 tenían mejor respuesta al tratamiento y también una mayor probabilidad de alcanzar una RPc ($p < 0,001$) [Tablas 18 y 19].

	Nº de casos	
	Contaje <3	Contaje ≥ 3
ASOCIACIÓN 1 (Grados 1 vs 2 vs 3 vs 4 vs 5)		
Grado 1	1 (12,5 %)	7 (87,5 %)
Grado 2	4 (18,2 %)	18 (81,8 %)
Grado 3	1 (3,6 %)	27 (96,4 %)
Grado 4	4 (23,5 %)	13 (76,5 %)
Grado 5	13 (68,5 %)	6 (31,6 %)
ASOCIACIÓN 2 (grados 1-2 vs 3 vs 4-5)		
Grado 1-2	5 (16,7 %)	25 (83,3 %)
Grado 3	1 (3,6 %)	27 (96,4 %)
Grado 4-5	17 (47,2 %)	19 (52,8 %)
ASOCIACIÓN 3 (grados 1-4 vs 5)		
Grado 1-4	10 (13,3 %)	65 (86,7 %)
Grado 5	13 (68,4 %)	6 (31,6 %)
ASOCIACIÓN 4 (Grados 1-3 vs 4-5)		
Grado 1-3	6 (10,3 %)	52 (89,7 %)
Grado 4-5	17 (47,2 %)	19 (52,8 %)
ASOCIACIÓN 5 (grados 1-2 vs 4-5)		
Grado 1-2	5 (16,7 %)	25 (83,3 %)
Grado 4-5	17 (47,2 %)	19 (52,8 %)

M&P vs RE (contaje ≥ 3) (cualitativa vs cualitativa)			
RE (contaje ≥ 3)	p	Método	Significación
M&P (Asociación 1) vs RE	< 0,001	Chi-cuadrado de Pearson	Relación significativa
M&P (Asociación 2) vs RE	< 0,001	Chi-cuadrado de Pearson	
M&P (Asociación 3) vs RE	< 0,001	Test exacto de Fisher	
M&P (Asociación 4) vs RE	< 0,001	Test exacto de Fisher	
M&P (Asociación 5) vs RE	0,010	Test exacto de Fisher	

Tablas 18 y 19. Relación entre los RE (contaje ≥ 3) y la respuesta al tratamiento.

Por otro lado, se hizo otra variable cualitativa con el porcentaje de RE, estableciendo un punto de corte del 10% para diferenciar RE positivos de RE negativas. Al igual que en los casos anteriores se obtuvo una relación significativa con la respuesta al tratamiento en todas las asociaciones de M&P (Test exacto de Fisher/Chi-cuadrado de Pearson). Aquellas mujeres que expresaban < 10 % de RE respondían mejor al tratamiento primario quimioterápico, y tenían una mayor probabilidad de alcanzar una RPc ($p < 0,001$) [Tablas 20 y 21].

	N° de casos	
	<10 %	≥ 10%
ASOCIACIÓN 1 (grados 1 vs 2 vs 3 vs 4 vs 5)		
Grado 1	1 (12,5 %)	7 (87,5 %)
Grado 2	5 (22,7 %)	17 (77,3 %)
Grado 3	2 (7,1 %)	26 (92,9 %)
Grado 4	4 (23,5 %)	13 (76,5 %)
Grado 5	13 (68,4 %)	6 (31,6 %)
ASOCIACIÓN 2 (grados 1-2 vs 3 vs 4-5)		
Grado 1-2	6 (20,0 %)	24 (80,0 %)
Grado 3	2 (7,1 %)	26 (92,9 %)
Grado 4-5	17 (47,2 %)	19 (52,8 %)
ASOCIACIÓN 3 (grados 1-4 vs 5)		
Grado 1-4	12 (16,0 %)	13 (64,4 %)
Grado 5	63 (84,0 %)	6 (31,6 %)
ASOCIACIÓN 4 (Grados 1-3 vs 4-5)		
Grado 1-3	8 (13,8 %)	17 (47,2 %)
Grado 4-5	50 (86,2 %)	19 (52,8 %)
ASOCIACIÓN 5 (grados 1-2 vs 4-5)		
Grado 1-2	6 (20,0 %)	17 (47,2 %)
Grado 4-5	24 (80,0 %)	19 (52,8 %)

M&P vs RE (pc ≥ 10 %) (cualitativa vs cualitativa)			
RE (pc ≥ 10 %)	p	Método	Significación
M&P (Asociación 1) vs RE	< 0,001	Chi-cuadrado de Pearson	Relación significativa
M&P (Asociación 2) vs RE	0,001	Chi-cuadrado de Pearson	
M&P (Asociación 3) vs RE	<0,001	Test exacto de Fisher	
M&P (Asociación 4) vs RE	0,001	Test exacto de Fisher	
M&P (Asociación 5) vs RE	0,037	Test exacto de Fisher	

Tablas 20 y 21. Relación entre los RE (pc ≥ 10 %) y la respuesta al tratamiento.

II.7. Relación entre los RP y la respuesta al tratamiento.

Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la variable numérica cuantitativa RP % y la respuesta al tratamiento en todas las asociaciones de la variable cualitativa M&P (Prueba U de Mann-Whitney/Kruskal-Wallis, $p < 0,001$). De las 94 pacientes en las que se valoró la expresión, aquellas pacientes que presentaban un menor porcentaje de RP tenían una mejor respuesta al tratamiento y una mayor probabilidad de alcanzar una RPc ($p < 0,001$) [Tablas 22 y 23].

	Nº CASOS	MEDIA	ERROR ESTÁNDAR
ASOCIACIÓN 1 (grado 1 vs 2 vs 3 vs 4 vs 5)			
Grado 1	8 (8,5 %)	61,2500	13,11862
Grado 2	22 (23,4 %)	53,4091	7,81542
Grado 3	28 (29,8 %)	35,5714	6,50055
Grado 4	17 (18,1 %)	26,0294	8,38816
Grado 5	19 (20,2 %)	5,7895	3,99677
ASOCIACIÓN 2 (grado 1-2 vs 3 vs 4-5)			
Grado 1-2	30 (31,9 %)	55,500	6,62783
Grado 3	28 (29,8 %)	35,5714	6,50055
Grado 4-5	36 (38,3 %)	15,3472	4,73730
ASOCIACIÓN 3 (grado 1-4 vs 5)			
Grado 1-4	75 (79,8 %)	41,3800	4,24973
Grado 5			
ASOCIACIÓN 4 (grado 1-3 vs 4-5)			
Grado 1-3	58 (61,7 %)	45,8793	4,79197
Grado 4-5	36 (38,3 %)	15,3472	4,73730
ASOCIACIÓN 5 (grado 1-2 vs 4-5)			
Grado 1-2	30 (45,5 %)	55,5000	6,62783
Grado 4-5	36 (54,5 %)	15,3472	4,73730

M&P vs RP% (cualitativa vs cuantitativa)			
RP %	p_valor	Método	Significación
M&P (Asociación 1) vs RP%	< 0,001	Kruskal-Wallis	Relación significativa
M&P (Asociación 2) vs RP%	< 0,001	Kruskal-Wallis	
M&P (Asociación 3) vs RP%	< 0,001	U de Mann-Whitney	
M&P (Asociación 4) vs RP%	< 0,001	U de Mann-Whitney	
M&P (Asociación 5) vs RP%	< 0,001	U de Mann-Whitney	

Tablas 22 y 23 . Relación entre los RP (como variable cuantitativa) y la respuesta al tratamiento.

Al igual que con los RE, con la variable RP, también se clasificaron otras dos variables: por un lado se hizo una valoración semicuantitativa, a través de un contejo (0-8), considerando como positivo un contejo ≥ 3 . Al analizar la relación con el grado de respuesta al tratamiento (Test exacto de Fisher/Chi-Cuadrado de Pearson) obtuvimos una relación significativa con todas las asociaciones de M&P ($p < 0,001$). Aquellas pacientes con un contejo < 3 tenían mejor respuesta al tratamiento quimioterápico, y también una mayor probabilidad de alcanzar una RPc ($p < 0,001$) [Tablas 24 y 25].

	Nº CASOS	
	Contaje < 3	Contaje ≥ 3
ASOCIACIÓN 1 (grados 1 vs 2 vs 3 vs 4 vs 5)		
Grado 1	1 (12,5 %)	7 (87,5 %)
Grado 2	3 (13,6 %)	19 (86,4 %)
Grado 3	8 (28,6 %)	20 (71,4 %)
Grado 4	7 (41,2 %)	10 (58,8 %)
Grado 5	17 (89,5 %)	2 (10,5 %)
ASOCIACIÓN 2 (grados 1-2 vs 3 vs 4-5)		
Grado 1-2	4 (13,3 %)	26 (86,7 %)
Grado 3	8 (28,6 %)	20 (71,4 %)
Grado 4-5	24 (66,7 %)	12 (33,3 %)
ASOCIACIÓN 3 (grados 1-4 vs 5)		
Grado 1-4	19 (25,3 %)	56 (74,7 %)
Grado 5	17 (89,5 %)	2 (10,5 %)
ASOCIACIÓN 4 (grados 1-3 vs 4-5)		
Grado 1-3	12 (20,7 %)	46 (79,3 %)
Grado 4-5	24 (66,7 %)	12 (33,3 %)
ASOCIACIÓN 5 (grados 1-2 vs 4-5)		
Grado 1-2	4 (13,3 %)	26 (86,7 %)
Grado 4-5	24 (66,7 %)	12 (33,3 %)

MP vs RP (contaje ≥ 3) (cualitativa vs cualitativa)			
RP (contaje ≥ 3)	p	Método	Significación
M&P (Asociación 1) vs RP	< 0,001	Chi-cuadrado de Pearson	Relación significativa
M&P (Asociación 2) vs RP	< 0,001	Chi-cuadrado de Pearson	
M&P (Asociación 3) vs RP	< 0,001	Test exacto de Fisher	
M&P (Asociación 4) vs RP	< 0,001	Test exacto de Fisher	
M&P (Asociación 5) vs RP	< 0,001	Test exacto de Fisher	

Tablas 24 y 25. Relación entre los RP (contaje ≥ 3) y la respuesta al tratamiento.

También se hizo otra variable cualitativa con el porcentaje de RP, estableciendo un punto de corte del 10% para diferenciar RP positivos de RP negativos. Al igual que en los casos anteriores se obtuvo un relación significativa con la respuesta al tratamiento en todas las asociaciones de M&P (Test exacto de Fisher/Chi-cuadrado de Pearson, $p < 0,001$). Aquellas mujeres que expresaban $< 10\%$ de RP respondían mejor al tratamiento primario quimioterápico, y tenían una mayor probabilidad de alcanzar una RPc ($p < 0,001$) [Tablas 26 y 27].

	N° CASOS	
	$< 10\%$	$\geq 10\%$
ASOCIACIÓN 1 (grados 1 vs 2 vs 3 vs 4 vs 5)		
Grado 1	1 (12,5 %)	7 (87,5 %)
Grado 2	3 (13,6 %)	19 (86,4 %)
Grado 3	10 (35,7 %)	18 (64,3 %)
Grado 4	9 (52,9 %)	8 (47,1 %)
Grado 5	17 (89,5 %)	2 (10,5 %)
ASOCIACIÓN 2 (grados 1-2 vs 3 vs 4-5)		
Grado 1-2	4 (13,3 %)	26 (86,7 %)
Grado 3	10 (35,7 %)	18 (64,3 %)
Grado 4-5	26 (72,2 %)	10 (27,8 %)
ASOCIACIÓN 3 (grados 1-4 vs 5)		
Grado 1-4	23 (30,7 %)	52 (69,3 %)
Grado 5	17 (89,5 %)	2 (10,5 %)
ASOCIACIÓN 4 (Grados 1-3 vs 4-5)		
Grado 1-3	14 (24,1 %)	44 (75,9 %)
Grado 4-5	26 (72,2 %)	10 (27,8 %)
ASOCIACIÓN 5 (grados 1-2 vs 4-5)		
Grado 1-2	4 (13,3 %)	26 (86,7 %)
Grado 4-5	26 (72,2 %)	10 (27,8 %)

M&P vs RP ($pc \geq 10\%$) (cualitativa vs cualitativa)			
RP ($pc \geq 10\%$)	p	Método	Significación
M&P (Asociación 1) vs RP	$< 0,001$	Chi-cuadrado de Pearson	Relación significativa
M&P (Asociación 2) vs RP	$< 0,001$	Chi-cuadrado de Pearson	
M&P (Asociación 3) vs RP	$< 0,001$	Test exacto de Fisher	
M&P (Asociación 4 vs RP	$< 0,001$	Test exacto de Fisher	
M&P (Asociación 5 vs RP	$< 0,001$	Test exacto de Fisher	

Tablas 26 y 27. Relación entre los RP ($pc \geq 10\%$) y la respuesta al tratamiento.

II.8. Relación entre el estado de Her2 y la respuesta al tratamiento

Se encontró una relación estadísticamente significativa entre la variable cualitativa Her2 y la variable cualitativa M&P (Asociación 2 y Asociación 4) [Chi-cuadrado de Pearson/Test exacto de Fisher]. De las 92 mujeres estudiadas, las pacientes que sobreexpresaban Her2 respondían mejor al tratamiento quimioterápico neoadyuvante, aunque no se vió una relación estadísticamente significativa entre el estado de Her2 y la RPc ($p=0,348$) [Tablas 28 y 29].

	N° DE CASOS	
	Her2 -	Her2 +
	ASOCIACIÓN 1 (grados 1 vs 2 vs 3 vs 4 vs 5)	
Grado 1	7 (87,5 %)	1 (12,5 %)
Grado 2	17 (85 %)	3 (15 %)
Grado 3	25 (89,3 %)	3 (10,7 %)
Grado 4	10 (58,8 %)	7 (41,2 %)
Grado 5	13 (68,4 %)	6 (31,6 %)
	ASOCIACIÓN 2 (grados 1-2 vs 3 vs 4-5)	
Grado 1-2	24 (85,7 %)	4 (14,3 %)
Grado 3	25 (89,3 %)	3 (10,7 %)
Grado 4-5	23 (63,9 %)	13 (36,1 %)
	ASOCIACIÓN 4 (Grados 1-3 vs 4-5)	
Grado 1-3	49 (87,5 %)	7 (12,5 %)
Grado 4-5	23 (63,9 %)	13 (36,1 %)

M&P vs HER-2 (cualitativa vs cualitativa)			
HER-2	p	Método	Significación
M&P (Asociación 1) vs HER-2	0,099	Chi-cuadrado de Pearson	Relación no significativa
M&P (Asociación 2) vs HER-2	0,026	Chi-cuadrado de Pearson	Relación significativa
M&P (Asociación 3) vs HER-2	0,348	Test exacto de Fisher	Relación no significativa
M&P (Asociación 4) vs HER-2	0,010	Test exacto de Fisher	Relación significativa
M&P (Asociación 5) vs HER-2	0,085	Test exacto de Fisher	Relación no significativa

Tablas 28 y 29. Relación entre Her2 y la respuesta al tratamiento.

II.9. Relación entre el fenotipo tumoral y la respuesta al tratamiento

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la variable cualitativa fenotipo molecular, tanto en el Perfil 1 como en el 2 (ver el apartado IV.2.1. de Material y Métodos) y la respuesta al tratamiento en todas las asociaciones de la variable cualitativa M&P (Chi-cuadrado de Pearson). De las 94 pacientes en las que se valoró el fenotipo tumoral, aquellas pacientes que presentaban un fenotipo basal respondían mejor al tratamiento y tenían una mayor probabilidad de alcanzar una RPC ($p < 0,001$) [Tablas 30, 31, 32 y 33].

➤ Perfil 1

Nº DE CASOS				
	Basal	Her2	Luminal A	Luminal B
ASOCIACIÓN 1 (grados 1 vs 2 vs 3 vs 4 vs 5)				
Grado 1	1 (12,5 %)	1 (12,5 %)	4 (50 %)	2 (25 %)
Grado 2	0 (0 %)	3 (15 %)	11 (55 %)	6 (30 %)
Grado 3	1 (3,6 %)	3 (10,7 %)	10 (35,7 %)	14 (50 %)
Grado 4	1 (5,9 %)	7 (41,2 %)	6 (35,3 %)	3 (17,6 %)
Grado 5	10 (52,6 %)	6 (31,6 %)	0 (0 %)	3 (15,8 %)
ASOCIACIÓN 2 (grados 1-2 vs 3 vs 4-5)				
Grado 1-2	1 (3,6 %)	4 (14,2 %)	15 (53,6 %)	8 (28,6 %)
Grado 3	1 (3,6 %)	3 (10,7 %)	10 (35,7 %)	14 (50 %)
Grado 4-5	11 (30,5 %)	13 (36,1 %)	6 (16,7 %)	6 (16,7 %)
ASOCIACIÓN 3 (grados 1-4 vs 5)				
Grado 1-4	3 (4,1 %)	14 (19,2 %)	31 (42,5 %)	25 (34,2 %)
Grado 5	10 (52,6 %)	6 (31,6 %)	0 (0 %)	3 (15,8 %)
ASOCIACIÓN 4 (Grados 1-3 vs 4-5)				
Grado 1-3	2 (3,6 %)	7 (12,5 %)	25 (44,6 %)	22 (39,3 %)
Grado 4-5	11 (30,5 %)	13 (36,1 %)	6 (16,7 %)	6 (16,7 %)
ASOCIACIÓN 5 (grados 1-2 vs 4-5)				
Grado 1-2	1 (3,6 %)	4 (14,2 %)	15 (53,6 %)	8 (28,6 %)
Grado 4-5	11 (30,5 %)	13 (36,1 %)	6 (16,7 %)	6 (16,7 %)

M&P vs Fenotipo (Perfil 1) (cualitativa vs cualitativa)			
Fenotipo (Perfil 1)	p	Método	Significación
M&P (Asociación 1) vs Fen (Perfil 1)	< 0,001	Chi-cuadrado de Pearson	Relación significativa
M&P (Asociación 2) vs Fen (Perfil 1)	< 0,001	Chi-cuadrado de Pearson	
M&P (Asociación 3) vs Fen (Perfil 1)	< 0,001	Chi-cuadrado de Pearson	
M&P (Asociación 4) vs Fen (Perfil 1)	< 0,001	Chi-cuadrado de Pearson	
M&P (Asociación 5) vs Fen (Perfil 1)	< 0,001	Chi-cuadrado de Pearson	

Tablas 30 y 31. Relación entre el fenotipo tumoral (Perfil 1) y la respuesta al tratamiento.

➤ Perfil 2

	Nº DE CASOS			
	Basal	Her2	Luminal A	Luminal B
ASOCIACIÓN 1 (grados 1 vs 2 vs 3 vs 4 vs 5)				
Grado 1	1 (12,5 %)	0 (0 %)	6 (75 %)	1 (12,5 %)
Grado 2	0 (0%)	2 (10 %)	17 (85 %)	1 (5 %)
Grado 3	1 (3,6 %)	0 (0 %)	24 (85,7 %)	3 (10,7 %)
Grado 4	1 (5,9 %)	2 (11,8 %)	10 (58,8 %)	4 (23,5 %)
Grado 5	10 (52,6 %)	3 (15,8 %)	3 (15,8 %)	3 (15,8 %)
ASOCIACIÓN 2 (grados 1-2 vs 3 vs 4-5)				
Grado 1-2	1 (3,6 %)	2 (7,2 %)	23 (82,2 %)	2 (7,1 %)
Grado 3	1 (3,6 %)	0 (0 %)	24 (85,7 %)	3 (10,7 %)
Grado 4-5	11 (30,6 %)	5 (13,9 %)	13 (36,1 %)	7 (19,4 %)
ASOCIACIÓN 3 (grados 1-4 vs 5)				
Grado 1-4	3 (4,1 %)	4 (5,5 %)	57 (78,1 %)	9 (12,3 %)
Grado 5	10 (52,6 %)	3 (15,8 %)	3 (15,8 %)	3 (15,8 %)
ASOCIACIÓN 4 (Grados 1-3 vs 4-5)				
Grado 1-3	2 (3,6 %)	2 (3,6 %)	47 (83,9 %)	5 (8,9 %)
Grado 4-5	11 (30,6 %)	5 (13,9 %)	13 (31,1 %)	7 (19,4 %)
ASOCIACIÓN 5 (grados 1-2 vs 4-5)				
Grado 1-2	1 (3,6 %)	2 (7,1 %)	23 (82,2 %)	2 (7,1 %)
Grado 4-5	11 (30,6 %)	5 (13,9 %)	13 (36,1 %)	7 (19,4 %)

M&P vs Fenotipo (Perfil 2) (cualitativa vs cualitativa)			
	p	Método	Significación
M&P (Asociación 1) vs Fen (Perfil 2)	< 0,001	Chi-cuadrado de Pearson	Relación significativa
M&P (Asociación 2) vs Fen (Perfil 2)	< 0,001	Chi-cuadrado de Pearson	
M&P (Asociación 3) vs Fen (Perfil 2)	< 0,001	Chi-cuadrado de Pearson	
M&P (Asociación 4) vs Fen (Perfil 2)	< 0,001	Chi-cuadrado de Pearson	
M&P (Asociación 5) vs Fen (Perfil 2)	0,002	Chi-cuadrado de Pearson	

Tablas 32 y 33. Relación entre el fenotipo tumoral (Perfil 2) y la respuesta al tratamiento.

III. Expresión de proteínas en el tejido tumoral antes del tratamiento neoadyuvante.

III.1. HIF-1 α

III.1.1 Análisis descriptivo

De 95 muestras analizadas se pudo determinar la expresión de HIF-1 α en 88 (92,6 %). De éstas, fueron consideradas positivas 35 (36,8 %), al expresar un mínimo de un 5 % de inmunotinción nuclear en las células tumorales (Figura 1). En relación al porcentaje de células positivas, la media fue de 6,14 con una desviación típica de 8,21 (mínimo:0,00 y máximo: 30,00).

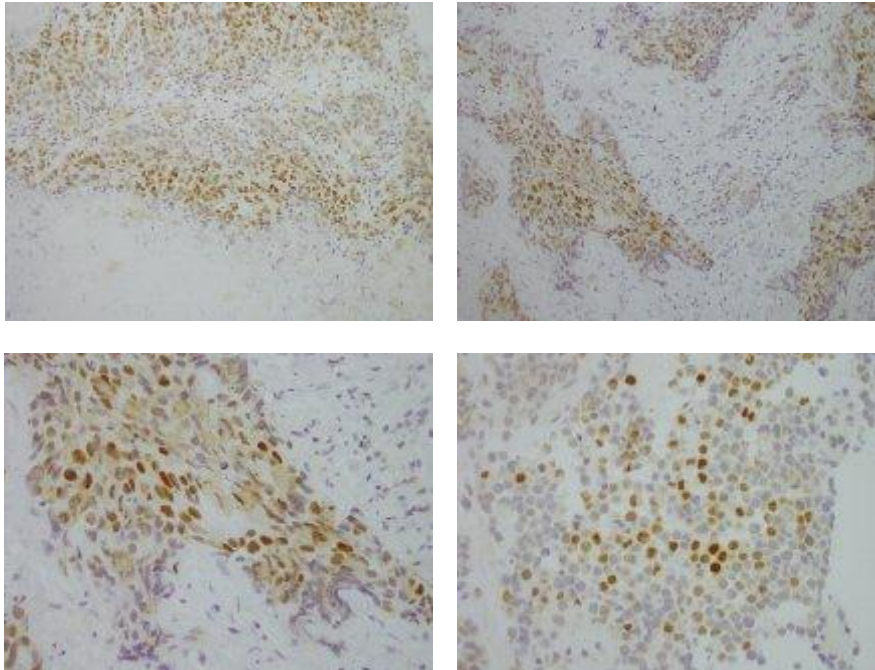


Figura 1. Tinción nuclear moderada y en algunas zonas citoplasmática leve , > 5 % de HIF-1 α , en células tumorales. 20x. 40x.

III.1.2. Relación entre la expresión de HIF-1 α y la respuesta al tratamiento quimioterápico neoadyuvante.

Al igual que con las variables clásicas, para el análisis estadístico de las diferentes proteínas del estudio con el grado de respuesta a la quimioterapia estratificado por el sistema de Miller&Payne se establecieron 5 posibles asociaciones de la variable independiente:

- ✓ Asociación 1: Grado 1 vs 2 vs 3 vs 4 vs 5
- ✓ Asociación 2: Grados 1-2 vs 3 vs 4-5
- ✓ Asociación 3: Grados 1-4 vs 5
- ✓ Asociación 4: Grados 1-3 vs 4-5
- ✓ Asociación 5: Grados 1-2 vs 4-5

En relación al HIF-1 α se encontró relación estadísticamente significativa tanto si se consideraba como variable dicotómica (positivo/negativo)[Estadístico exacto de Fisher: $p=0,014$], como si se trataba a la misma como porcentaje (Prueba de U-Mann-Whitney: $p=0,017$), entre la expresión de las células tumorales antes del tratamiento neoadyuvante y la Asociación 3 de la respuesta al tratamiento (M&P 1-4 vs 5). Es decir, aquellas pacientes cuyos tumores sobreexpresaban HIF-1 α tenían una mayor probabilidad de alcanzar una R_{PC} tras el tratamiento quimioterápico primario. Para el resto de asociaciones no se encontraron relaciones estadísticamente significativas (Tablas 34 y 35).

	Nº de casos		MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
	<5%	≥ 5%		
Grado 1	6 (75%)	2 (25%)	2,1875	2,81498
Grado 2	13 (65%)	7 (35%)	5,5583	8,04548
Grado 3	18 (64,3%)	10 (35,7%)	5,6250	8,13617
Grado 4	10 (71,4 %)	4 (28,6%)	4,7917	7,61442
Grado 5	6 (33,3%)	12 (66,7)	10,4167	9,52937
ASOCIACIÓN 3 (grados 1-4 vs 5)				
Grado 1-4	47 (67,1%)	23 (32,9%)	5,0464	7,52513
Grado 5	6 (33,3%)	12 (66,7%)	10,4167	9,52937

Expresión de HIF-1 α	Tablas de Contingencia	Test No Paramétricos
M&P (Asociación 1)	$p = 0,122^a$	$p = 0,179^c$
M&P (Asociación 2)	$p = 0,321^a$	$p = 0,321^c$
M&P (Asociación 3)	$p = 0,014^b$	$p = 0,017^d$
M&P (Asociación 4)	$p = 0,176^b$	$p = 0,155^d$
M&P (Asociación 5)	$p = 0,196^b$	$p = 0,148^d$

^a Chi cuadrado de Pearson

^b Estadístico exacto de Fisher

^c Test de Kruskal-Wallis

^d Prueba de Mann-Whitney

Tablas 34 y 35. Relación entre la expresión de HIF-1 α y la respuesta al tratamiento.

III.1.3. Relación entre la expresión de HIF-1 α y las variables clínico-patológicas.

Para ver la relación de HIF-1 α y las variables clínico-patológicas, antes del tratamiento, se estudió la variable HIF-1 α tanto de forma cuantitativa (%), como cualitativa dicotómica (+/-).

Relación de la variable cuantitativa HIF-1 α % y las variables clínico-patológicas

Se encontró relación entre la variable HIF-1 α % y las variables cuantitativas grado (asociación positiva), Ki 67 % (asociación positiva) y RE % (asociación negativa) [Coeficiente de correlación de Spearman] [Tabla 36].

Variables	Tipo variables	p	Método	Significación
HIF-1 α % vs Edad		0,861		NS
HIF-1 α % vs Grado		0,027 ¹	Coeficiente	S
HIF-1 α % vs Tamaño	Cuantitativa vs Cuantitativa	0,248	de	NS
HIF-1 α % vs Ki 67%		<0,001 ²	Correlación	S
HIF-1 α % vs RE%		0,037 ³	de	S
HIF-1 α % vs RP%		0,122	Spearman	NS

1 A pesar de que la correlación entre estas variables era significativa, la relación entre ellas fue débil, ya que el coeficiente de correlación de Spearman era de 0,241.

2 A pesar de que la correlación entre estas variables era significativa, la relación entre ellas fue moderada, ya que el coeficiente de correlación de Spearman era de 0,414.

3 A pesar de que la correlación entre estas variables era significativa, la relación entre ellas fue débil, ya que el coeficiente de correlación de Spearman era de -0,224.

Tabla 36. Relación entre HIF-1 α % y las variables cuantitativas del estudio.

También se encontró relación significativa entre HIF-1 α y las variables cualitativas Ki 67 (pc \geq 10 % ; pc \geq 20 %) y Fenotipo (Perfil 1) [Tablas 37 y 38].

Variable cualitativa	Variable cuantitativa	Nº casos (%)	Media	Error estándar	Desviación
Ganglios -	HIF-1 α %	32 (36,4 %)	5,95	1,49	8,45
Ganglios +	HIF-1 α %	56 (63,6 %)	6,25	1,09	8,14
		88 (100 %)			
Ki 67 (< 10 %)	HIF-1 α %	16 (18,4 %)	2,12	1,39	5,55
Ki 67 (\geq 10 %)	HIF-1 α %	71 (81,6 %)	7,14	1,01	8,48
		87 (100 %)			

Ki 67 (< 20 %)		HIF-1 α %	36 (41,4 %)	3,92	1,26	7,54
Ki 67 (\geq 20 %)		HIF-1 α %	51 (58,6 %)	7,83	1,17	8,38
			87 (100 %)			
Her2 -		HIF-1 α %	68 (79,1 %)	5,67	0,99	8,20
Her2 +		HIF-1 α %	18 (20,9 %)	7,22	1,99	8,48
			86 (100 %)			
RE < 10 %		HIF-1 α %	23 (26,4 %)	8,53	1,82	8,71
RE \geq 10 %		HIF-1 α %	64 (73,6 %)	5,26	0,99	7,98
			87 (100 %)			
RE cont< 3		HIF-1 α %	21 (24,1 %)	8,87	1,95	8,92
RE cont\geq 3		HIF-1 α %	66 (75,9 %)	5,26	0,97	7,90
			87 (100 %)			
RP < 10 %		HIF-1 α %	37 (42,5 %)	7,27	1,44	8,74
RP \geq 10 %		HIF-1 α %	50 (57,5 %)	5,13	1,09	7,74
			87 (100 %)			
RP cont< 3		HIF-1 α %	34 (39,1 %)	7,66	1,53	8,94
RP cont\geq 3		HIF-1 α %	53 (60,9 %)	5,01	1,04	7,59
			87 (100 %)			
Fenotipo (Perfil 1)	Basal		12 (14 %)	7,81	2,37	8,22
	Her2		18 (20,9 %)	7,22	1,99	8,48
	Luminal A	HIF-1 α %	30 (34,9 %)	2,62	1,19	6,53
	Luminal B		26 (30,2 %)	8,20	1,77	9,01
			86 (100 %)			
Fenotipo (Perfil 2)	Basal		12 (14 %)	7,81	2,37	8,22
	Her2		7 (8,1 %)	8,57	3,44	9,11
	Luminal A	HIF-1 α %	57 (66,3 %)	5,12	1,08	8,16
	Luminal B		10 (11,6 %)	7	2,71	8,56
			86 (100 %)			

Variables	Tipo variables	p_valor	Método
HIF-1α % vs Ganglios		0,837	
HIF-1α % vs ki67 (pc \geq 10 %)		0,004	
HIF-1α % vs ki67 (pc \geq 20 %)		0,005	
HIF-1α % vs Her2	Cuantitativa vs	0,348	U de Mann-Whitney
HIF-1α % vs RE (pc \geq 10 %)	Cualitativa (dos	0,083	
HIF-1α % vs RE (cont \geq 3)	categorías)	0,070	
HIF-1α % vs RP (pc \geq 10 %)		0,178	
HIF-1α % vs RP (cont \geq 3)		0,109	
HIF-1α % vs Fenot (perfil 1)	Cuantitativa vs	0,003	
HIF-1α % vs Fenot (perfil 2)	Cualitativa (cuatro categorías)	0,227	

Tablas 37 y 38 . Relación entre HIF-1 α % y las variables cualitativas del estudio.

Relación de la variable cualitativa HIF-1 α (+/-) y las variables clínico-patológicas

Sólo se encontró relación significativa entre HIF-1 α (+/-) y la variable cuantitativa Grado (relación positiva), Ki67 % (relación positiva), RE % (relación negativa) y RP % (relación negativa) [Tablas 39 y 40].

Variable cualitativa	Variable cuantitativa	Nº casos (%)	Media	Error estándar	Desviación
HIF-1α <5 %	Edad	53	49,60	1,79	13,06
		(60,2 %)			
HIF-1α \geq 5 %		35	50,23	2,09	12,38
		(39,8 %)			
		88			
		(100 %)			
HIF-1α < 5 %	Grado	50	1,96	0,11	0,75
		(59,5 %)			
HIF-1α \geq 5 %		34	2,44	0,11	0,66
		(40,5%)			
		84			
		(100 %)			

HIF-1α < 5 %		50	4,16	0,25	1,80
	Tamaño	(59,5 %)			
HIF-1α \geq 5 %	tumoral	34	3,76	0,21	1,24
		(40,5 %)			
		84			
		(100 %)			
HIF-1α < 5 %		52	22,56	3,19	23,03
	Ki 67 %	(59,8 %)			
HIF-1α \geq 5 %		35	45,11	4,58	27,09
		(49,2 %)			
		87			
		(100 %)			
HIF-1α < 5 %		53	60,26	5,15	37,49
	RE %	(60,9 %)			
HIF-1α \geq 5 %		34	43,01	6,81	39,73
		(39,1 %)			
		87			
		(100 %)			
HIF-1α < 5 %		53	41,99	5,13	37,37
	RP %	(60,9 %)			
HIF-1α \geq 5 %		34	26,48	6,11	35,63
		(39,1 %)			
		87			
		(100 %)			

Variables	Tipo variables	p	Método	Significación
HIF-1 α (+/-) vs Edad		0,861		NS
HIF-1 α (+/-) vs Grado	Cuantitativa vs	0,004	U de	S
HIF-1 α (+/-) vs Tamaño	Cualitativa (dos	0,619	Mann-	NS
HIF-1 α (+/-) vs Ki 67%	categorías)	<0,001	Whitney	S
HIF-1 α (+/-) vs RE%		0,040		S
HIF-1 α (+/-) vs RP%		0,042		S

Tablas 39 y 40. Relación entre la variable HIF-1 α (+/-) y las variables cuantitativas del estudio.

También se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre HIF-1 α (+/-) y las variables cualitativas Ki67 (pc \geq 10 %), Ki67 (pc \geq 20 %), Her2, RE (pc \geq 10 %), RE (contaje \geq 3), RP (pc \geq 10 %), RP (contaje \geq 3), Fenotipo (Perfil 1) [Tablas 41 y 42].

Variables cualitativas	HIF-1 α < 5 %	HIF-1 α \geq 5 %
Ganglios -	21 (65,6 %)	11 (34,4 %)
Ganglios +	32 (57,1 %)	24 (42,9 %)
Ki 67 < 10 %	14 (87,5 %)	2 (12,5 %)
Ki 67 \geq 10 %	38 (53,5 %)	33 (46,5 %)
Ki 67 < 20 %	29 (80,6 %)	7 (19,4 %)
Ki 67 \geq 20 %	23 (45,1 %)	28 (54,9 %)
Her2 -	43 (63,2 %)	25 (36,8 %)
Her2 +	10 (55,6 %)	8 (44,4 %)
RE < 10 %	10 (43,5 %)	13 (56,5 %)
RE \geq 10 %	43 (67,2 %)	21 (32,8 %)
RE cont < 3	9 (42,9 %)	12 (57,1 %)
RE cont \geq 3	44 (66,7 %)	22 (33,3 %)
RP < 10 %	18 (48,6 %)	19 (51,4 %)
RP \geq 10 %	35 (70 %)	15 (30 %)
RP cont < 3	16 (47,1 %)	18 (52,9 %)
RP cont \geq 3	37 (69,8 %)	16 (30,2 %)
Fenotipo (perfil 1)		
Basal	5 (41,7 %)	7 (58,3 %)
Her2	10 (55,6 %)	8 (44,4 %)
Luminal A	26 (86,7 %)	4 (13,3 %)
Luminal B	12 (46,2 %)	14 (53,8 %)
Fenotipo (perfil 2)		
Basal	5 (41,7 %)	7 (58,3 %)
Her2	3 (42,9 %)	4 (57,1 %)
Luminal A	39 (68,4 %)	18 (31,6 %)
Luminal B	6 (60 %)	4 (40 %)

Variables	Tipo variables	p_valor	Método
HIF-1 α (+/-) vs Ganglios		0,501	
HIF-1 α (+/-) vs ki67 (pc \geq 10)		0,013	
HIF-1 α (+/-) vs ki67 (pc \geq 20)		0,001	
HIF-1 α (+/-) vs HER-2	Cualitativa vs	0,593	Test exacto de Fisher
HIF-1 α (+/-) vs RE (pc \geq 10 %)	Cualitativa (dos	0,080	
HIF-1 α (+/-) vs RE (cont \geq 3)	categorías)	0,072	
HIF-1 α (+/-) vs RP (pc \geq 10 %)		0,049	
HIF-1 α (+/-) vs RP (cont \geq 3)		0,044	
HIF-1 α (+/-) vs Fenot (perfil 1)	Cualitativa vs	0,005	Chi-cuadrado de Pearson
HIF-1 α (+/-) vs Fenot (perfil 2)	Cualitativa	0,242	

Tablas 41 y 42. Relación entre la variable HIF-1 α (+/-) y las variables cualitativas del estudio.

III.1.4. Relación entre la expresión de HIF-1 α y el resto de proteínas.

Para ver la relación de HIF-1 α y las otras proteínas del estudio, antes del tratamiento, se estudió la variable HIF-1 α tanto de forma cuantitativa (%), como cualitativa dicotómica (+/-).

Relación de la variable cuantitativa HIF-1 α y las otras proteínas de forma cuantitativa

No se encontró relación significativa entre la expresión de HIF-1 α y el resto de proteínas (Coeficiente de correlación de Spearman) [Tabla 43].

Variables	Tipo variables	p	Método	Significación
HIF-1 α % vs pAKT %		0,619		NS
HIF-1 α % vs pMAPK %		0,821	Coeficiente de	NS
HIF-1 α % vs pSTAT3 int	Cuantitativa vs Cuantitativa	0,324		Correlación de Spearman
HIF-1 α % vs Surv %		0,268		NS
HIF-1 α % vs VEGF-A %		0,746		NS

Tabla 43. Relación entre HIF-1 α % y el resto de proteínas como variables cuantitativas.

Relación entre la expresión de HIF-1 α (+/-) y el resto de proteínas de forma cualitativa

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre HIF-1 α (+/-) y el resto de proteínas (test exacto de Fisher) [Tablas 44 y 45].

Variables cualitativas	HIF-1α < 5 %	HIF-1α \geq 5 %
pAKT < 10 %	11 (50 %)	11 (50 %)
pAKT \geq 10 %	34 (63 %)	20 (37 %)
pMAPK < 10 %	7 (53,8 %)	6 (46,2 %)
pMAPK \geq 10 %	35 (59,3 %)	24 (40,7 %)
pSTAT3 = 0 int	34 (60,7 %)	22 (39,3 %)
pSTAT3 > 0 int	16 (64 %)	9 (36 %)
Survivina < 50 %	13 (65 %)	7 (35 %)
Survivina \geq 50 %	35 (56,5 %)	27 (43,5 %)
VEGF-A = 0 %	36 (60 %)	24 (40 %)
VEGF-A > 0 %	14 (56 %)	11 (44 %)

Variabes	Tipo variables	p_valor	Método	Significación
HIF-1α (+/-) vs pAKT (+/-)		0,316		
HIF-1α (+/-) vs pMAPK (+/-)	Cualitativa vs	0,763		
HIF-1α (+/-) vs pSTAT3 (+/-)	Cualitativa (dos	0,810	Test exacto de	NS
HIF-1α (+/-) vs Surv (+/-)	categorías)	0,605	Fisher	
HIF-1α (+/-) vs VEGF-A (+/-)		0,811		

Tablas 44 y 45. Relación entre HIF-1 α (+/-) y el resto de proteínas como variables cualitativas.

III.2. pAKT

III.2.1 Análisis descriptivo

De 95 muestras analizadas se han podido determinar la expresión de pAKT en 81 pacientes, (85,3 %). De éstas, fueron consideradas positivas 57 (60 %), al expresar un mínimo de un 10 % de inmunotinción nuclear y/o citoplasmática en las células tumorales. En relación al porcentaje de células positivas la media fue de 29,42, con una desviación típica de 25,48 (mínimo: 0,00 y máximo: 80,00) [Figura 2].

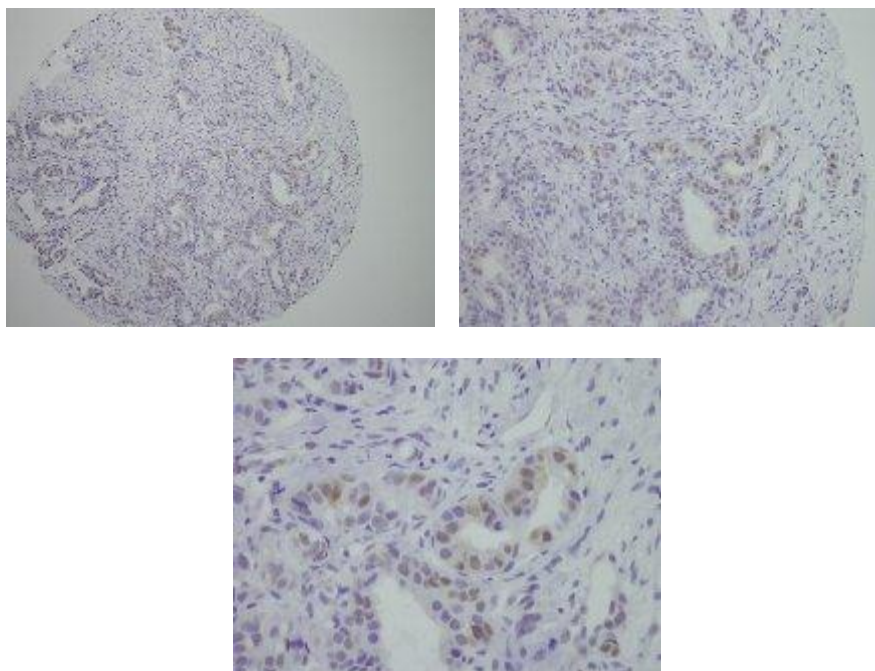


Figura 2. Tinción nuclear y citoplasmática leve - moderada, ≥ 10 % en células tumorales, de pAKT. 10x. 20x. 40x.

III.2.2. Relación entre la expresión de pAKT y respuesta al tratamiento quimioterápico neoadyuvante.

En relación al pAKT no se han encontrado relación estadísticamente significativa tanto si se considera como variable dicotómica (positivo/negativo) [Estadístico exacto de Fisher] como si se trata a la misma como porcentaje (Prueba de U-Mann-Whitney), entre la expresión de las células tumorales antes del tratamiento neoadyuvante y las diferentes asociaciones de M&P de respuesta al tratamiento quimioterápico (Tablas 46 y 47).

	Nº de casos		MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
	<10%	≥ 10%		
Grado 1	1 (14,3%)	6 (85,7%)	30,0000	18,02776
Grado 2	9 (47,4%)	10 (52,6%)	24,8684	29,91276
Grado 3	6 (21,6%)	17 (73,9%)	26,9204	22,8789
Grado 4	3 (20%)	12 (80%)	35,8613	24,13581
Grado 5	5 (29,4%)	12 (70,6%)	31,9853	28,46688

Expresión de p AKT	Tablas de Contingencia	Test No Paramétricos
M&P (Asociación 1)	p = 0,347 ^a	p = 0,573 ^c
M&P (Asociación 2)	p = 0,487 ^a	p = 0,387 ^c
M&P (Asociación 3)	p = 1,000 ^b	p = 0,712 ^d
M&P (Asociación 4)	p = 0,619 ^b	p = 0,170 ^d
M&P (Asociación 5)	p = 0,393 ^b	p = 0,224 ^d

^a Chi cuadrado de Pearson

^b Estadístico exacto de Fisher

^c Test de Kruskal-Wallis

^d Prueba de Mann-Whitney

Tablas 46 y 47. Relación entre la expresión de pAKT y la respuesta al tratamiento.

III.2.3. Relación entre la expresión de pAKT y las variables clínico-patológicas.

Para ver la relación de pAKT y las variables clínico-patológicas, antes del tratamiento, se estudió la variable pAKT tanto de forma cuantitativa (%), como cualitativa dicotómica (+/-).

Relación de la variable cuantitativa pAKT % y las variables clínico-patológicas

No se encontró relación entre la variable cuantitativa pAKT y las variables cuantitativas edad, grado, tamaño, Ki 67 %, RE % y RP % (Coeficiente de correlación de Spearman) [Tabla 48].

Variabes	Tipo variables	p	Método	Significación
pAKT % vs Edad		0,266		
pAKT % vs Grado		0,754	Coeficiente de	
pAKT % vs Tamaño	Cuantitativa vs Cuantitativa	0,610	de	NS
pAKT % vs Ki 67%		0,146	Correlación de Spearman	
pAKT % vs RE%		0,880		
pAKT % vs RP%		0,542		

Tabla 48. Relación entre pAKT % y las variables cuantitativas del estudio.

Tampoco se encontró relación significativa entre la variable cuantitativa pAKT % y las variables cualitativas Ganglios, Ki 67 (pc $\geq 10\%$; pc $\geq 20\%$), Her2, RE (pc $\geq 10\%$; contaje ≥ 3), RP (pc $\geq 10\%$; contaje ≥ 3), Fenotipo (Perfil 1) y Fenotipo (Perfil 2) [Tablas 49 y 50].

Variable cualitativa	Variable cuantitativa	Nº casos (%)	Media	Error estándar	Desviación
Ganglio -	pAKT %	29 (35,8 %)	29,96	5,01	26,99
Ganglios +	pAKT %	52 (64,2 %)	29,13	3,45	24,87
		81 (100 %)			
Ki 67 (< 10 %)	pAKT %	13 (16,3 %)	33,08	7,24	26,10
Ki 67 ($\geq 10\%$)	pAKT %	67 (83,7 %)	28,56	3,13	25,66
		80 (100 %)			
Ki 67 (< 20 %)	pAKT %	28 (35 %)	33,76	4,91	26,00
Ki 67 ($\geq 20\%$)	pAKT %	52 (65 %)	26,88	3,51	25,33
		80 (100 %)			
Her2 -	pAKT %	61 (72,2 %)	27,53	3,22	25,13
Her2 +		17 (21,8 %)	37,01	5,77	23,80
		78 (100 %)			
RE < 10 %	pAKT %	22 (27,5 %)	23,92	5,65	26,49
RE $\geq 10\%$	pAKT %	58 (72,5 %)	30,72	3,22	24,56
		80 (100 %)			
RE cont <3	pAKT %	21 (26,3 %)	25,06	5,80	26,59
RE cont ≥ 3	pAKT %	59 (73,7 %)	30,20	3,21	24,67
		80 (100 %)			
RP < 10 %	pAKT %	36 (45 %)	32,15	4,45	26,71
RP $\geq 10\%$	pAKT %	44 (55 %)	26,15	3,57	23,72
		80 (100 %)			

RP cont < 3		pAKT %	32 (40 %)	32,58	4,79	27,11
RP cont ≥ 3		pAKT %	48 (60 %)	26,37	3,42	23,67
			80 (100 %)			
Fenotipo (perfil 1)	Basal		11 (14,1 %)	27,73	8,38	27,78
	Her2		17 (21,8 %)	37,01	5,77	23,80
	Luminal A	pAKT %	24 (30,8 %)	33,91	4,87	23,88
	Luminal B		26 (33,3 %)	21,55	4,83	24,62
			78 (100 %)			
Fenotipo (perfil 2)	Basal		11 (14,1 %)	27,73	8,38	27,78
	Her2		7 (9 %)	39,28	11,52	30,47
	Luminal A	pAKT %	51 (65,4 %)	27,53	3,44	24,57
	Luminal B		9 (11,5 %)	36,02	6,87	20,61
			78 (100 %)			

Variables	Tipo variables	p_valor	Método	Significación
pAKT % vs Ganglios		0,964		
pAKT % vs ki67 (pc ≥ 10 %)		0,575		
pAKT % vs ki67 (pc ≥ 20 %)		0,208		
pAKT % vs Her2	Cuantitativa vs	0,132	U de Mann-Whitney	NS
pAKT % vs RE (pc ≥ 10 %)	Cualitativa (dos	0,195		
pAKT % vs RE (cont ≥ 3)	categorías)	0,323		
pAKT % vs RP (pc ≥ 10 %)		0,426		
pAKT % vs RP (cont ≥ 3)		0,407		
pAKT % vs Fenot (perfil 1)	Cuantitativa vs	0,113	Kruskal-Wallis	NS
pAKT % vs Fenot (perfil 2)	Cualitativa (cuatro categorías)	0,512		

Tablas 49 y 50. Relación entre pAKT % y las variables cualitativas del estudio.

Relación de la variable cualitativa pAKT (+/-) y las variables clínico-patológicas

Sólo se encontró relación significativa entre pAKT (+/-) y la variable cuantitativa Ki 67 % (p = 0,041) [Tablas 51 y 52].

Variable cualitativa	Variable cuantitativa	Nº casos (%)	Media	Error estándar	Desviación
pAKT < 10 %	Edad	24	54,17	3,10	15,18
		(29,6 %)			
		81			
pAKT ≥ 10 %		57	47,95	1,51	11,38
		(70,4 %)			
		81			
pAKT < 10 %		24	2,29	0,15	0,75
		(30,8 %)			
		78			
pAKT ≥ 10 %	Grado	54	2,15	0,10	0,74
		(69,2 %)			
		78			
pAKT < 10 %	Tamaño tumoral	20	3,87	0,37	1,67
		(27 %)			
		74 (100 %)			
pAKT ≥ 10 %		54	4,10	0,23	1,68
		(73 %)			
		74 (100 %)			
pAKT < 10 %	Ki 67 %	24	43,87	6,20	30,36
		(30 %)			
		80			
pAKT ≥ 10 %		56	28,55	3,00	22,46
		(70 %)			
		80			
		(100 %)			

pAKT < 10 %		24	51,94	9,03	44,23
		(30 %)			
pAKT ≥ 10 %	RE %	56	52,14	4,99	37,37
		(70 %)			
		80			
		(100 %)			
pAKT < 10 %		24	31,69	7,43	36,39
		(30 %)			
pAKT ≥ 10 %	RP %	56	34,78	4,98	37,31
		(70 %)			
		80			
		(100 %)			

Variables	Tipo variables	p	Método	Significación
pAKT (+/-) vs Edad		0,111		NS
pAKT (+/-) vs Grado	Cuantitativa vs	0,411	U de Mann-	NS
pAKT (+/-) vs Tamaño	Cualitativa (dos	0,514	Whitney	NS
pAKT (+/-) vs Ki 67%	categorías)	0,041		S
pAKT (+/-) vs RE%		0,807		NS
pAKT (+/-) vs RP%		0,909		NS

Tablas 51 y 52. Relación entre la variable pAKT (+/-) y las variables cuantitativas del estudio.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre pAKT y las variables cualitativas Ki 67 (pc ≥ 10 %), Ki 67 (pc ≥ 20 %), Her2, RE (pc ≥ 10 %), RE (contaje ≥ 3), RP (pc ≥ 10 %), RP (contaje ≥ 3), Fenotipo (perfil 1) y Fenotipo (perfil 2) [Tablas 53 y 54].

Variables cualitativas	pAKT < 10 %	pAKT ≥ 10 %
Ganglios -	9 (31 %)	20 (69 %)
Ganglios +	15 (28,8 %)	37 (71,2 %)
Ki 67 < 10 %	3 (23,1 %)	10 (76,9 %)
Ki 67 ≥ 10 %	21 (31,3 %)	46 (68,7 %)
Ki 67 < 20 %	6 (21,4 %)	22 (78,6 %)
Ki 67 ≥ 20 %	18 (34,6 %)	34 (65,4 %)
Her2 -	19 (31,1 %)	42 (68,9 %)
Her2 +	3 (17,6 %)	14 (82,4 %)
RE < 10 %	9 (40,9 %)	13 (59,1 %)
RE ≥ 10 %	15 (25,9 %)	43 (74,1 %)
RE cont < 3	8 (38,1 %)	13 (61,9 %)
RE cont ≥ 3	16 (27,1 %)	43 (72,9 %)
RP < 10 %	10 (27,7 %)	26 (72,3 %)
RP ≥ 10 %	14 (31,8 %)	30 (68,2 %)
RP cont < 3	9 (28,1 %)	23 (71,9 %)
RP cont ≥ 3	15 (31,2 %)	33 (68,8 %)
Fenotipo (perfil 1)		
Basal	3 (27,3 %)	8 (72,7 %)
Her2	3 (17,6 %)	14 (82,4 %)
Luminal A	4 (16,7 %)	20 (83,3 %)
Luminal B	12 (46,1 %)	14 (53,9 %)
Fenotipo (perfil 2)		
Basal	3 (27,3 %)	8 (72,7 %)
Her2	2 (28,5 %)	5 (71,5 %)
Luminal A	16 (31,4 %)	35 (68,6 %)
Luminal B	1 (11,1 %)	8 (88,9 %)

Variables	Tipo variables	p_valor	Método	Significación
pAKT (+/-) vs Ganglios		1,000		
pAKT (+/-) vs Ki67 (pc ≥ 10%)		0,745		
pAKT (+/-) vs Ki67 (pc ≥ 20%)		0,307		
pAKT (+/-) vs HER-2	Cualitativa vs	0,368		
pAKT (+/-) vs RE (pc ≥ 10 %)	Cualitativa (dos	0,274	Test exacto de	NS
pAKT (+/-) vs RE (cont ≥ 3)	categorías)	0,409	Fisher	
pAKT (+/-) vs RP (pc ≥ 10 %)		0,808		
pAKT (+/-) vs RP (cont ≥ 3)		0,808		
pAKT (+/-) vs Fenot (perfil 1)	Cualitativa vs	0,084	Chi-cuadrado	
pAKT (+/-) vs Fenot (perfil 2)	Cualitativa	0,669	de Pearson	NS
	(cuatro			
	categorías)			

Tablas 53 y 54. Relación entre la variable pAKT (+/-) y las variables cualitativas del estudio.

III.2.4. Relación entre la expresión de pAKT y el resto de proteínas.

Para ver la relación de pAKT y las otras proteínas del estudio, antes del tratamiento, se estudió la variable pAKT tanto de forma cuantitativa (%), como cualitativa dicotómica (+/-)

Relación de la variable cuantitativa pAKT % y las otras proteínas de forma cuantitativa

Sólo se encontró relación significativa positiva entre la expresión de pAKT y Survivina (relación positiva) [Coeficiente de correlación de Spearman] [Tabla 55].

Variabes	Tipo variables	p	Método	Significación
pAKT % vs pMAPK %		0,396		NS
pAKT % vs pSTAT3 int		0,254	Coeficiente	NS
pAKT % vs Surv %	Cuantitativa vs Cuantitativa	0,001	de	S
pAKT % vs VEGF-A %		0,420	Correlación	NS
pAKT % vs HIF-1 α %		0,619	de Spearman	NS

Tabla 55. Relación entre pAKT % y el resto de proteínas como variables cuantitativas.

Relación entre la expresión de pAKT (+/-) y el resto de proteínas de forma cualitativa

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre pAKT (+/-) y el resto de proteínas (test exacto de Fisher) [Tablas 56 y 57].

Variabes cualitativas	AKT < 10 %	AKT \geq 10 %
pMAPK < 10 %	2 (16,7 %)	10 (83,3 %)
pMAPK \geq 10 %	18 (30,5 %)	41 (69,5 %)
pSTAT3 = 0 int	16 (30,2 %)	37 (69,8 %)
pSTAT3 > 0 int	4 (16,4 %)	19 (82,6 %)
Survivina < 50 %	7 (31,8 %)	15 (68,2 %)
Survivina \geq 50 %	15 (26,8 %)	41 (73,2 %)
VEGF-A = 0 %	16 (30,8 %)	36 (69,2 %)
VEGF-A > 0 %	6 (25 %)	18 (75 %)
HIF-1 α < 5 %	11 (24,4 %)	34 (75,6 %)
HIF-1 α \geq 5 %	11 (35,5 %)	20 (64,5 %)

Variables	Tipo variables	p_valor	Método	Significación
pAKT (+/-) vs pMAPK (+/-)		0,488		
pAKT (+/-) vs pSTAT3 (+/-)	Cualitativa vs	0,395		
pAKT (+/-) vs Surv (+/-)	Cualitativa (dos	0,781	Test exacto de	NS
pAKT (+/-) vs VEGF-A (+/-)	categorías)	0,787	Fisher	
pAKT (+/-) vs HIF-1 α (+/-)		0,316		

Tablas 56 y 57. Relación entre pAKT (+/-) y el resto de proteínas como variables cuantitativas.

III.3. pMAPK

III.3.1. Análisis descriptivo.

De 95 muestras analizadas se han podido determinar la expresión de pMAPK en 74 (77,9 %). De éstas, fueron consideradas positivas 61 (64,2 %), al expresar un mínimo de un 10 % de inmunotinción nuclear y/o citoplasmática en las células tumorales (Figura 3). En relación al porcentaje de células positivas la media fue de 25,41 con una desviación típica de 16,33 (mínimo: 0,00 y máximo: 70,00).

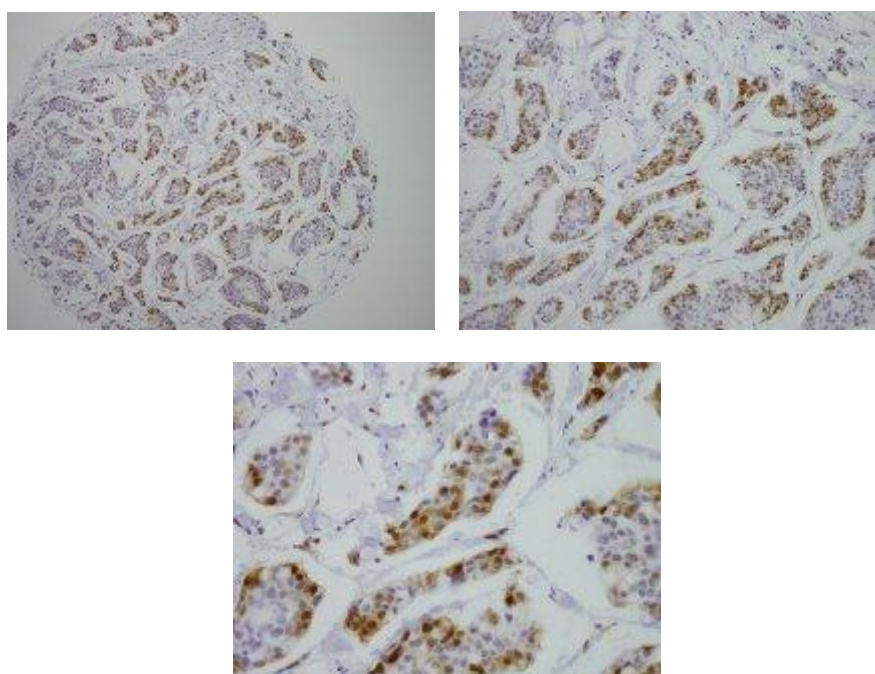


Figura 3. Tinción nuclear fuerte y citoplasmática leve-moderada, en células tumorales > 10 % de pMAPK. 10x. 20x. 40x.

III.3.2. Relación entre la expresión de pMAPK y respuesta al tratamiento quimioterápico neoadyuvante.

En relación a la expresión de pMAPK no se ha encontrado relación estadísticamente significativa tanto si se considera como variable dicotómica (positivo/negativo) [Estadístico exacto de Fisher] como si se trata a la misma como porcentaje (Prueba de U-Mann-Whitney) entre la expresión de las células tumorales antes del tratamiento neoadyuvante y las diferentes asociaciones de M&P de respuesta al tratamiento quimioterápico (Tablas 58 y 59).

	Nº de casos		MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
	<10%	≥ 10%		
Grado 1	1 (16,7%)	5 (83,3%)	23,6117	9,86939
Grado 2	5 (26,3%)	14 (73,7%)	22,7084	17,61358
Grado 3	5 (22,7%)	17 (77,3%)	24,8486	18,15307
Grado 4	1 (7,7%)	12 (92,3%)	30,6408	17,25175
Grado 5	1 (7,1%)	13 (92,9%)	25,8929	13,57718

Expresión de p MAPK	Tablas de Contingencia	Test No Paramétricos
M&P (Asociación 1)	p = 0,503 ^a	p = 0,614 ^c
M&P (Asociación 2)	p = 0,218 ^a	p = 0,345 ^c
M&P (Asociación 3)	p = 0,440 ^b	p = 0,614 ^d
M&P (Asociación 4)	p = 0,115 ^b	p = 0,163 ^d
M&P (Asociación 5)	p = 0,134 ^b	p = 0,119 ^d

^a Chi cuadrado de Pearson

^b Estadístico exacto de Fisher

^c Test de Kruskal-Wallis

^d Prueba de Mann-Whitney

Tablas 58 y 59. Relación entre la expresión de pMAPK y la respuesta al tratamiento.

III.3.3. Relación entre la expresión de pMAPK y las variables clínico-patológicas.

Para ver la relación de pMAPK y las variables clínico-patológicas, antes del tratamiento, se estudió la variable pMAPK tanto de forma cuantitativa (%), como cualitativa dicotómica (+/-).

Relación de la variable cuantitativa pMAPK % y las variables clínico-patológicas

No se encontró relación entre la variable cuantitativa pMAPK % y las variables cuantitativas Edad, Grado, Tamaño tumoral, Ki 67 %, RE % y RP % (Coeficiente de correlación de Spearman) [Tabla 60].

Variables	Tipo variables	p	Método	Significación
pMAPK % vs Edad		0,816		
pMAPK % vs Grado		0,964	Coeficiente	
pMAPK % vs Tamaño	Cuantitativa vs Cuantitativa	0,220	de	
pMAPK % vs Ki 67%		0,828	Correlación	NS
pMAPK % vs RE%		0,141	de Spearman	
pMAPK % vs RP%		0,498		

Tabla 60 . Relación entre pMAPK % y las variables cuantitativas del estudio.

Tampoco se encontró relación significativa entre la variable cuantitativa pMAPK y las variables cualitativas Ganglios, Ki 67 (pc ≥ 10 % ; pc ≥ 20 %), Her2, RE (pc ≥ 10 %; contaje ≥ 3), RP (pc ≥ 10 %; contaje ≥ 3), Fenotipo (perfil 1) y Fenotipo (perfil 2) [Tablas 61 y 62].

Variable cualitativa	Variable cuantitativa	Nº casos (%)	Media	Error estándar	Desviación
Ganglios -	pMAPK %	29 (39,2 %)	24,33	2,55	13,76
Ganglios +	pMAPK %	45 (60,8%)	26,11	2,67	17,92
		74 (100 %)			
Ki 67 (< 10 %)	pMAPK %	11 (15,1 %)	18,84	4,52	14,99
Ki 67 (≥ 10 %)	pMAPK %	62 (84,9 %)	26,66	2,10	16,51
		73 (100 %)			
Ki 67 (< 20 %)	pMAPK %	28 (38,4 %)	23,41	3,35	17,75
Ki 67 (≥ 20 %)	pMAPK %	45 (61,6 %)	26,78	2,33	15,63
		73 (100 %)			
Her2 -	pMAPK %	55 (76,4 %)	26,66	2,30	17,10
Her2 +	pMAPK %	17 (23,6 %)	20,98	2,63	10,83
		72			

			(100 %)			
RE < 10 %		pMAPK %	18 (24,7 %)	23,01	4,29	18,21
RE ≥ 10 %		pMAPK %	55 (75,3 %)	26,15	2,15	15,93
			73 (100 %)			
RE cont < 3		pMAPK %	17 (23,3 %)	24,21	4,37	18,02
RE cont ≥ 3		pMAPK %	56 (76,7 %)	25,72	2,15	16,10
			73 (100 %)			
RP < 10 %		pMAPK %	31 (42,5 %)	27,61	3,30	18,37
RP ≥ 10 %		pMAPK %	42 (57,5 %)	23,09	2,17	14,06
			73 (100 %)			
RP cont < 3		pMAPK %	27 (37 %)	27,78	3,75	19,46
RP cont ≥ 3		pMAPK %	46 (63 %)	23,38	2,02	13,67
			73 (100 %)			
Fenotipo (perfil 1)	Basal		8 (11,1 %)	27,92	8,23	23,28
	Her2		17 (23,6 %)	20,98	2,63	10,83
	Luminal A	pMAPK %	24 (33,3 %)	23,76	3,48	17,07
	Luminal B		23 (32 %)	29,26	3,12	14,96
				72 (100 %)		
Fenotipo (perfil 2)	Basal		8 (11,1 %)	27,92	8,23	23,28
	Her2		7 (9,7 %)	26,07	4,08	10,79
	Luminal A		47 (65,3 %)	26,45	2,35	16,14
	Luminal B		10 (13,9 %)	17,41	3,11	9,83
				72 (100 %)		

VARIABLES	Tipo variables	p_valor	Método	Significación
pMAPK % vs Ganglios		1,000		
pMAPK % vs ki67 (pc ≥ 10 %)		0,103		
pMAPK % vs ki67 (pc ≥ 20 %)		0,182		
pMAPK % vs Her2	Cuantitativa vs	0,425	U de Mann-Whitney	NS
pMAPK % vs RE (pc ≥ 10 %)	Cualitativa (dos	0,330		
pMAPK % vs RE (cont ≥ 3)	categorías)	0,574		
pMAPK % vs RP (pc ≥ 10 %)		0,309		
pMAPK % vs RP (cont ≥ 3)		0,400		
pMAPK % vs Fenot (perfil 1)	Cuantitativa vs	0,314	Kruskal-Wallis	NS
pMAPK % vs Fenot (perfil 2)	Cualitativa (cuatro categorías)	0,476		

Tablas 61 y 62. Relación entre pMAPK % y las variables cualitativas del estudio.

Relación de la variable cualitativa pMAPK (+/-) y las variables clínico-patológicas

No se encontró relación significativa entre pMAPK (+/-) y las variables cuantitativas Edad, Grado, Tamaño tumoral, Ki 67 %, RE % y RP % (Tablas 63 y 64).

Variable cualitativa	Variable cuantitativa	Nº casos (%)	Media	Error estándar	Desviación
pMAPK < 10 %	Edad	13 (17,6 %)	52,08	3,39	12,23
pMAPK ≥ 10 %		61 (82,4 %)	48,82	1,60	12,51
		74 (100 %)			
pMAPK < 10 %	Grado	12 (16,9 %)	2,25	0,22	0,75
pMAPK ≥ 10 %		59 (83,1 %)	2,15	0,09	0,71
		71 (100 %)			
pMAPK < 10 %	Tamaño tumoral	12 (16,9 %)	4,58	0,47	1,62
pMAPK ≥ 10 %		59 (83,1 %)	3,87	0,21	1,61
		71 (100 %)			

pMAPK < 10 %		13 (17,8 %)	35,42	10,08	36,34
pMAPK ≥ 10 %	Ki 67 %	60 (82,2 %)	31,13	2,94	22,80
		73 (100 %)			
pMAPK < 10 %		13 (17,8 %)	47,11	9,87	35,59
pMAPK ≥ 10 %	RE %	60 (82,2 %)	56,73	5,03	38,95
		73 (100 %)			
pMAPK < 10 %		13 (17,8 %)	38,08	9,80	35,33
pMAPK ≥ 10 %	RP %	60 (82,3 %)	35,64	4,94	38,26
		73 (100 %)			

Variables	Tipo variables	p	Método	Significación
pMAPK (+/-) vs Edad		0,386		NS
pMAPK (+/-) vs Grado	Cuantitativa vs	0,653	U de	NS
pMAPK (+/-) vs Tamaño	Cualitativa (dos	0,107	Mann-	NS
pMAPK (+/-) vs Ki 67%	categorías)	0,583	Whitney	NS
pMAPK (+/-) vs RE%		0,266		NS
pMAPK (+/-) vs RP%		0,853		NS

Tablas 63 y 64. Relación entre la variable pMAPK (+/-) y las variables cuantitativas del estudio.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre pMAPK y las variables cualitativas Ki 67 (pc ≥ 10 %), Ki 67 (pc ≥ 20 %), Her2, RE (pc ≥ 10 %), RE (contaje ≥ 3), RP (pc ≥ 10 %), RP (contaje ≥ 3), Fenotipo (perfil 1) y Fenotipo (perfil 2) [Tablas 65 y 66].

Variables cualitativas	pMAPK < 10 %	pMAPK ≥ 10 %	
Ganglios -	4 (13,8 %)	25 (86,2 %)	
Ganglios +	9 (20 %)	36 (80 %)	
Ki 67 < 10 %	4 (36,4 %)	7 (63,6 %)	
Ki 67 ≥ 10 %	9 (14,5%)	53 (85,5 %)	
Ki 67 < 20 %	7 (25 %)	21 (75 %)	
Ki 67 ≥ 20 %	6 (13,3%)	39 (86,7 %)	
Her2 -	10 (18,2 %)	45 (81,8 %)	
Her2 +	2 (11,8 %)	15 (88,2 %)	
RE < 10 %	4 (22,2 %)	14 (77,8 %)	
RE ≥ 10 %	9 (16,4 %)	46 (83,6 %)	
RE Scor < 3	3 (17,7%)	14 (82,3%)	
RE Scor ≥ 3	10 (17,9 %)	46 (82,1 %)	
RP < 10 %	4 (12,9%)	27 (87,1 %)	
RP ≥ 10 %	9 (21,4 %)	33 (78,6 %)	
RP Scor < 3	4 (14,8 %)	23 (85,2 %)	
RP Scor ≥ 3	9 (19,6 %)	37 (80,4 %)	
Fenotipo (perfil 1)	Basal	1 (12,5%)	7 (87,5 %)
	Her2	2 (11,8 %)	15 (88,2 %)
	Luminal A	6 (25 %)	18 (75 %)
	Luminal B	3 (13 %)	20 (87 %)
Fenotipo (perfil 2)	Basal	1 (12,5 %)	7 (87,5 %)
	Her2	0 (0 %)	7 (100 %)
	Luminal A	9 (15,6 %)	38 (84,4 %)
	Luminal B	2 (20 %)	8 (80 %)

Variables	Tipo variables	p_valor	Método	Significación
pMAPK (+/-) vs Ganglios		0,549		
pMAPK (+/-) vs ki67 (pc ≥ 10)		0,099		
pMAPK (+/-) vs ki67 (pc ≥ 20)		0,225		
pMAPK (+/-) vs HER-2	Cualitativa vs	0,719	Test exacto de Fisher	NS
pMAPK (+/-) vs RE (pc ≥ 10 %)	Cualitativa (dos	0,723		
pMAPK (+/-) vs RE (cont ≥ 3)	categorías)	1,000		
pMAPK (+/-) vs RP (pc ≥ 10 %)		0,537		
pMAPK (+/-) vs RP (cont ≥ 3)		0,756		
pMAPK (+/-) vs Fenot (perfil 1)	Cualitativa vs	0,612	Chi-cuadrado de Pearson	NS
pMAPK (+/-) vs Fenot (perfil 2)	Cualitativa (cuatro categorías)	0,617		

Tablas 65 y 66. Relación entre la variable pMAPK (+/-) y las variables cualitativas del estudio.

III.3.4. Relación entre la expresión de pMAPK y el resto de proteínas.

Para ver la relación de pMAPK y las otras proteínas del estudio, antes del tratamiento, se estudió la variable pMAPK tanto de forma cuantitativa (%), como cualitativa dicotómica (+/-).

Relación de la variable cuantitativa pMAPK % y las otras proteínas de forma cuantitativa

Sólo se encontró relación significativa positiva entre la expresión de pMAPK y VEGF-A (relación positiva) [Coeficiente de correlación de Spearman] [Tabla 67].

Variabes	Tipo variables	p	Método	Significación
pMAPK % vs pAKT %		0,396		NS
pMAPK % vs pSTAT3 int		0,378	Coeficiente	NS
pMAPK % vs Surv %	Cuantitativa vs Cuantitativa	0,727	de	NS
pMAPK % vs VEGF-A %		0,029	Correlación	S
pMAPK % vs HIF-1 α %		0,821	de Spearman	NS

Tabla 67. Relación entre pMAPK % y el resto de proteínas como variables cuantitativas.

Relación entre la expresión de pMAPK (+/-) y el resto de proteínas de forma cualitativa

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre pMAPK (+/-) y el resto de proteínas (test exacto de Fisher) [Tablas 68 y 69].

Variabes cualitativas	pMAPK < 10 %	pMAPK \geq 10 %
pAKT < 10 %	2 (10 %)	18 (90 %)
pAKT \geq 10 %	10 (19,6 %)	41 (80,4 %)
pSTAT3 = 0 int	10 (21,3 %)	37 (78,7 %)
pSTAT3 > 0 int	1 (4,3 %)	22 (95,7 %)
Survivina < 50 %	1 (6,7 %)	14 (93,3 %)
Survivina \geq 50 %	12 (20,7 %)	46 (79,3 %)
VEGF-A = 0 %	11 (22 %)	39 (78 %)
VEGF-A > 0 %	1 (4,8 %)	20 (95,2 %)
HIF-1 α < 5 %	7 (16,7%)	35 (83,3 %)
HIF-1 α \geq 5 %	6 (20 %)	24 (80 %)

VARIABLES	Tipo variables	p_valor	Método	Significación
pMAPK (+/-) vs pAKT (+/-)		0,488		
pMAPK (+/-) vs pSTAT3 (+/-)	Cualitativa vs	0,087		
pMAPK (+/-) vs Surv (+/-)	Cualitativa (dos	0,279	Test exacto de	NS
pMAPK (+/-) vs VEGF-A (+/-)	categorías)	0,094	Fisher	
pMAPK (+/-) vs HIF-1 α (+/-)		0,763		

Tablas 68 y 69. Relación entre pMAPK (+/-) y el resto de proteínas como variables cualitativas.

III.4. VEGF-A

III.4.1. Análisis descriptivo.

De 95 muestras analizadas se han podido determinar la expresión de VEGF-A en 89 (93,6 %). De éstas, fueron consideradas positivas 27 (28,4 %), al expresar algo de inmunotinción citoplasmática en las células tumorales (Figura 4). En relación al porcentaje de células positivas la media fue de 5,06 con una desviación típica de 11,51 (mínimo:0,00 y máximo: 50,00).

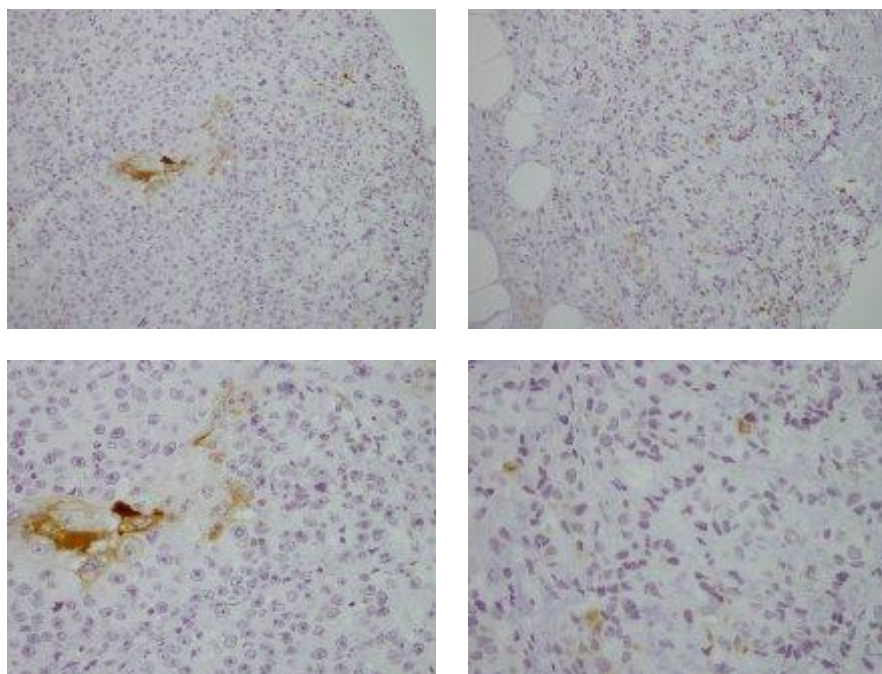


Figura 4. Tinción citoplasmática y nuclear moderada-fuerte en células tumorales, de VEGF-A. 20x. 40x.

III.4.2. Relación entre la expresión de VEGF-A y respuesta al tratamiento quimioterápico neoadyuvante.

En relación al VEGF-A se encontró relación estadísticamente significativa tanto si se consideraba como variable dicotómica (positivo/negativo)[Estadístico exacto de Fisher], como si se trataba a la misma como porcentaje (Prueba de U-Mann-Whitney), entre la expresión de las células tumorales antes del tratamiento neoadyuvante y las distintas asociaciones de la respuesta al tratamiento M&P (asociación 4 y 5 para el primer caso y 2, 3, 4 y 5 en el segundo). Es decir, aquellas pacientes cuyos tumores sobreexpresaban VEGF-A, respondían mejor al tratamiento quimioterápico y tenían una mayor probabilidad de alcanzar una RPC (Tablas 70 y 71).

M&P	Nº de casos		MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
	0%	≥ 0%		
Grado 1	7 (100%)	0 (0%)	,0000	,0000
Grado 2	15 (75%)	5 (25%)	2,1040	6,28790
Grado 3	20 (76,9%)	6 (23,1%)	1,8992	5,24548
Grado 4	10 (58,8%)	7 (41,2%)	8,8971	15,92145
Grado 5	10 (52,6%)	9 (47,4%)	10,9211	16,08270
ASOCIACIÓN 2 (grados 1-2 vs 3 vs 4-5)				
Grado 1-2	22 (81,5%)	5 (18,5)	1,5585	5,45671
Grado 3	20 (76,9%)	6 (23,1%)	1,8992	5,24548
Grado 4-5	20 (55,6%)	16 (44,4%)	9,9653	15,80994
ASOCIACIÓN 3 (grados 1-4 vs 5)				
Grado 1-4	52 (74,3%)	18 (25,7%)	3,4673	9,46498
Grado 5	10 (52,6%)	9 (47,4%)	10,9211	16,08270
ASOCIACIÓN 4 (Grados 1-3 vs 4-5)				
Grado 1-3	42 (79,2%)	11 (20,8%)	1,7257	5,30526
Grado 4-5	20 (55,6%)	16 (44,4%)	9,9653	15,80994
ASOCIACIÓN 5 (grados 1-2 vs 4-5)				
Grado 1-2	22 (81,5%)	5 (18,5%)	1,5585	5,45671
Grado 4-5	20 (55,6%)	16 (44,4%)	9,9653	15,80994

Expresión de VEGF-A	Tablas de Contingencia	Test No Paramétricos
M&P (Asociación 1)	p = 0,111 ^a	p = 0,055 ^c
M&P (Asociación 2)	p = 0,054 ^a	p = 0,020 ^c
M&P (Asociación 3)	p = 0,092 ^b	p = 0,036 ^d
M&P (Asociación 4)	p = 0,021 ^b	p = 0,005 ^d
M&P (Asociación 5)	p = 0,035 ^b	p = 0,017 ^d

^a Chi cuadrado de Pearson

^b Estadístico exacto de Fisher

^c Test de Kruskal-Wallis

^d Prueba de Mann-Whitney

Tablas 70 y 71. Relación entre la expresión de VEGF-A y la respuesta al tratamiento.

III.4.3. Relación entre la expresión de VEGF-A y las variables clínico-patológicas.

Para ver la relación de VEGF-A y las variables clínico-patológicas, antes del tratamiento, se estudió la variable VEGF-A tanto de forma cuantitativa (%), como cualitativa dicotómica (+/-).

Relación de la variable cuantitativa VEGF-A % y las variables clínico-patológicas

Sólo se encontró relación estadísticamente significativa positiva entre la VEGF-A y la variable cuantitativa Grado (relación positiva) [Coeficiente de correlación de Spearman] [Tabla 72].

Variabes	Tipo variables	p	Método	Significación
VEGF-A % vs Edad		0,526		NS
VEGF-A % vs Grado		0,049¹	Coefficiente	S
VEGF-A % vs Tamaño	Cuantitativa vs Cuantitativa	0,515	de	NS
VEGF-A % vs Ki 67%		0,145	Correlación	NS
VEGF-A % vs RE%		0,223	de Spearman	NS
VEGF-A % vs RP%		0,256		NS

¹ A pesar de que la correlación entre estas variables es significativa, la relación entre ellas es débil, ya que el coeficiente de correlación de Spearman es de: 0,215.

Tabla 72 . Relación entre VEGF-A % y las variables cuantitativas del estudio.

No se encontró relación significativa entre la variable VEGF-A y las variables cualitativas Ganglios, Ki 67 (pc ≥ 10 %; pc ≥ 20 %), Her2, RE (pc ≥ 10 %; contejo ≥ 3), RP (pc ≥ 10 %; contejo ≥ 3), Fenotipo (perfil 1) y Fenotipo (perfil 2) [Tablas 73 y 74].

Variable cualitativa	Variable cuantitativa	Nº casos (%)	Media	Error estándar	Desviación
Ganglios -	VEGF-A %	34 (38,2 %)	5,37	1,90	11,08
Ganglios +	VEGF-A %	55 (61,8 %)	4,87	1,60	11,87
		89 (100 %)			
Ki 67 (< 10 %)	VEGF-A %	14 (15,9 %)	3,84	2,86	10,70
Ki 67 (≥ 10 %)	VEGF-A %	74 (84,1 %)	5,36	1,37	11,78
		88 (100 %)			

Ki 67 (< 20 %)		VEGF-A %	34 (38,6 %)	2,60	1,37	8,02
Ki 67 (≥ 20 %)		VEGF-A %	54 (61,4%)	6,70	1,79	13,15
			88 (100 %)			
Her2 -		VEGF-A %	67 (77 %)	5,11	1,44	11,77
Her2 +		VEGF-A %	20 (23 %)	3,375	1,79	8,01
			87 (100 %)			
RE < 10 %		VEGF-A %	23 (26,1 %)	8,97	3,13	15,02
RE ≥ 10 %		VEGF-A %	65 (73,9 %)	3,21	1,12	9,05
			88 (100 %)			
RE cont < 3		VEGF-A %	21 (23,9 %)	9,52	3,40	15,60
RE cont ≥ 3		VEGF-A %	67 (76,1 %)	3,21	1,09	8,92
			88 (100 %)			
RP < 10 %		VEGF-A %	38 (43,2 %)	7,75	2,30	14,17
RP ≥ 10 %		VEGF-A %	50 (56,8 %)	2,31	0,98	6,95
			88 (100 %)			
RP cont < 3		VEGF-A %	34 (38,6 %)	7,96	2,50	14,61
RP cont ≥ 3		VEGF-A %	54 (61,4 %)	2,58	0,99	7,25
			88 (100 %)			
Fenotipo (perfil 1)	Basal		12 (13,8 %)	14,69	5,50	19,04
	Her2		20 (23 %)	3,37	1,79	8,01
	Luminal A	VEGF-A %	28 (32,2 %)	3,15	1,66	8,77
	Luminal B		27 (31 %)	2,89	1,57	8,18
			87 (100 %)			
Fenotipo (perfil 2)	Basal		12 (13,8 %)	14,69	5,50	19,04
	Her2		7 (8%)	7,50	4,85	12,83
	Luminal A	VEGF-A %	56 (64,4 %)	2,97	1,11	8,34
	Luminal B		12 (13,8 %)	1,25	0,59	2,06
			87 (100 %)			

Variables	Tipo variables	p_valor	Método	Significación
VEGF-A % vs Ganglios		0,268		
VEGF-A % vs ki67 (pc ≥ 10 %)		0,507		
VEGF-A % vs ki67 (pc ≥ 20 %)		0,184		
VEGF-A % vs Her2	Cuantitativa vs	0,970	U de Mann-Whitney	NS
VEGF-A % vs RE (pc ≥ 10 %)	Cualitativa (dos	0,126		
VEGF-A % vs RE (cont ≥ 3)	categorías)	0,170		
VEGF-A % vs RP (pc ≥ 10 %)		0,125		
VEGF-A % vs RP (cont ≥ 3)		0,206		
VEGF-A % vs Fenot (perfil 1)	Cuantitativa vs	0,387		
VEGF-A % vs Fenot (perfil 2)	Cualitativa (cuatro categorías)	0,196		

Tablas 73 y 74. Relación entre VEGF-A % y las variables cualitativas del estudio.

Relación de la variable cualitativa VEGF-A (+/-) y las variables clínico-patológicas

No se encontró relación significativa entre VEGF-A (+/-) y las variables cuantitativas Edad, Grado, Tamaño tumoral, Ki67 %, RE % y RP % (Tablas 75 y 76).

Variable cualitativa	Variable cuantitativa	Nº casos (%)	Media	Error estándar	Desviación
VEGF-A = 0 %	Edad	62 (69,7 %)	50,16	1,66	13,10
VEGF-A > 0 %		27 (30,3%)	48,37	2,24	11,64
		89 (100 %)			
VEGF-A = 0 %	Grado	58 (68,2 %)	2,09	0,10	0,73
VEGF-A > 0 %		27 (31,8 %)	2,41	0,14	0,75
		85 (100 %)			
VEGF-A = 0 %	Tamaño tumoral	60 (71,4 %)	4,00	0,21	1,62
VEGF-A > 0 %		24 (28,6 %)	3,69	0,28	1,37
		84 (100 %)			
VEGF-A = 0 %	Ki 67 %	61 (69,3 %)	30,28	3,41	26,61
VEGF-A > 0 %		27 (30,7 %)	37,83	5,15	26,78
		88 (100 %)			

VEGF-A = 0 %		62 (70,5 %)	55,91	4,78	37,64
VEGF-A > 0 %	RE %	26 (29,5%)	44,81	7,86	40,09
		88 (100 %)			
VEGF-A = 0 %		62 (70,5 %)	35,85	4,54	35,77
VEGF-A > 0 %	RP %	26 (29,5 %)	30,23	7,50	38,24
		88 (100 %)			

Variables	Tipo variables	p	Método	Significación
VEGF-A (+/-) vs Edad		0,394		NS
VEGF-A (+/-) vs Grado	Cuantitativa vs	0,054	U de	NS
VEGF-A (+/-) vs Tamaño	Cualitativa (dos	0,677	Mann-	NS
VEGF-A (+/-) vs Ki 67%	categorías)	0,196	Whitney	NS
VEGF-A (+/-) vs RE%		0,308		NS
VEGF-A (+/-) vs RP%		0,448		NS

Tablas 75 y 76. Relación entre la variable VEGF-A (+/-) y las variables cuantitativas del estudio.

Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre VEGF-A (+/-) y las variables cualitativas Ki 67 (pc \geq 10 %), Ki 67 (pc \geq 20 %), Her2, RE (pc \geq 10 %), RE (contaje \geq 3), RP (pc \geq 10 %), RP (contaje \geq 3), Fenotipo (perfil 1) y Fenotipo (perfil 2) [Tablas 77 y 78].

Variabes cualitativas	VEGF-A = 0 %	VEGF-A > 0 %
Ganglios -	25 (73,5 %)	9 (26,5 %)
Ganglios +	37 (67,3%)	18 (32,7 %)
Ki 67 < 10 %	11 (78,6 %)	3 (21,4 %)
Ki 67 \geq 10 %	50 (67,6 %)	24 (32,4 %)
Ki 67 < 20 %	26 (76,5 %)	8 (23,5 %)
Ki 67 \geq 20 %	35 (64,8 %)	19 (35,2 %)
Her2 -	47 (77 %)	14 (23 %)
Her2 +	14 (70 %)	6 (30%)
RE < 10 %	14 (60,9 %)	9 (39,1 %)
RE \geq 10 %	48 (73,8 %)	17 (26,2 %)

RE cont < 3		13 (61,9 %)	8 (38,1 %)
RE cont ≥ 3		49 (73,1 %)	18 (26,9 %)
RP < 10 %		24 (63,2 %)	14 (36,8 %)
RP ≥ 10 %		38 (76%)	12 (24 %)
RP cont < 3		22 (64,7 %)	12 (35,3 %)
RP cont ≥ 3		40 (74,1 %)	14 (25,9 %)
Fenotipo (perfil 1)	Basal	6 (50 %)	6 (50 %)
	Her2	14 (70 %)	6 (30 %)
	Luminal A	20 (71,4 %)	8 (28,6 %)
	Luminal B	21 (77,8 %)	6 (22,2 %)
Fenotipo (perfil 2)	Basal	6 (50 %)	6 (50 %)
	Her2	5 (71,4 %)	2 (28,6 %)
	Luminal A	42 (75 %)	14 (25 %)
	Luminal B	8 (66,7 %)	4 (33,3 %)

Variables	Tipo variables	p_valor	Método	Significación
VEGF-A (+/-) vs Ganglios		0,638		
VEGF-A (+/-) vs ki67 (pc ≥ 10)		0,536		
VEGF-A (+/-) vs ki67 (pc ≥ 20)		0,343		
VEGF-A (+/-) vs HER-2	Cualitativa vs	1,000		
VEGF-A (+/-) vs RE (pc ≥ 10)	Cualitativa (dos	0,291	Test exacto de	NS
VEGF-A (+/-) vs RE (cont ≥ 3)	categorías)	0,412	Fisher	
VEGF-A (+/-) vs RP (pc ≥ 10)		0,240		
VEGF-A (+/-) vs RP (cont ≥ 3)		0,472		
VEGF-A (+/-) vs Fenot (perf 1)	Cualitativa vs	0,377	Chi-cuadrado	
VEGF-A (+/-) vs Fenot (perf 2)	Cualitativa (cuatro	0,387	de Pearson	NS
	categorías)			

Tablas 77 y 78. Relación entre la variable VEGF-A (+/-) y las variables cualitativas del estudio.

III.4.4. Relación entre la expresión de VEGF-A y el resto de proteínas.

Para ver la relación de VEGF-A y las otras proteínas del estudio, antes del tratamiento, se estudió la variable VEGF-A tanto de forma cuantitativa (%), como cualitativa dicotómica (+/-).

Relación de la variable VEGF-A y las otras proteínas de forma cuantitativa

Se encontró relación significativa positiva entre la expresión VEGF-A y de pMAPK (Coeficiente de correlación de Spearman) [Tabla 79].

VARIABLES	Tipo variables	p	Método	Significación
VEGF-A % vs pAKT %		0,420		NS
VEGF-A % vs pMAPK %		0,029	Coeficiente de	S
VEGF-A % vs pSTAT3 int	Cuantitativa vs Cuantitativa	0,503	Correlación de Spearman	NS
VEGF-A % vs pSurv %		0,064		NS
VEGF-A % vs pHIF-1 α %		0,746		NS

Tabla 79 . Relación entre VEGF-A % y el resto de proteínas como variables cuantitativas.

Relación entre la expresión de VEGF-A y el resto de proteínas de forma cualitativa

Sólo se encontró relación negativa estadísticamente significativa entre la expresión de VEGF-A y Survivina (test exacto de Fisher) [Tablas 80 y 81].

VARIABLES CUALITATIVAS	VEGF-A = 0 %	VEGF-A > 0 %
pAKT < 10 %	16 (72,7 %)	6 (27,3 %)
pAKT \geq 10 %	36 (66,7 %)	18 (33,3 %)
pMAPK < 10 %	11 (91,7 %)	1 (8,3 %)
pMAPK \geq 10 %	39 (66,1 %)	20 (33,9 %)
pSTAT3 = 0 int	37 (66,1 %)	19 (33,9 %)
pSTAT3 > 0 int	19 (73,1 %)	7 (26,9 %)
Survivina < 50 %	11 (50 %)	11 (50 %)
Survivina \geq 50 %	48 (77,4 %)	14 (22,6 %)
HIF-1 α < 5 %	36 (72 %)	14 (28 %)
HIF1 α \geq 5 %	24 (68,6 %)	11 (31,4 %)

VARIABLES	Tipo variables	p_valor	Método
VEGF-A (+/-) vs pAKT (+/-)		0,787	
VEGF-A (+/-) vs pMAPK (+/-)	Cualitativa vs	0,094	
VEGF-A (+/-) vs pSTAT3 (+/-)	Cualitativa (dos categorías)	0,615	Test exacto de Fisher
VEGF-A (+/-) vs Surv (+/-)		0,028	
VEGF-A (+/-) vs HIF-1 α (+/-)		0,811	

Tablas 80 y 81. Relación entre VEGF-A (+/-) y el resto de proteínas como variables cualitativas.

III.5. Survivina

III.5.1. Análisis descriptivo.

De 95 muestras analizadas se han podido determinar la expresión de Survivina en 89 (93,7 %). De éstas, fueron consideradas positivas 65 (68,4 %), al expresar un mínimo de 50 % de inmunotinción nuclear y/o citoplasmática en las células tumorales (Figura 5). En relación al porcentaje de células positivas la media fue de 57,82 con una desviación típica de 17,81 (mínimo:0,00 y máximo: 85,00).

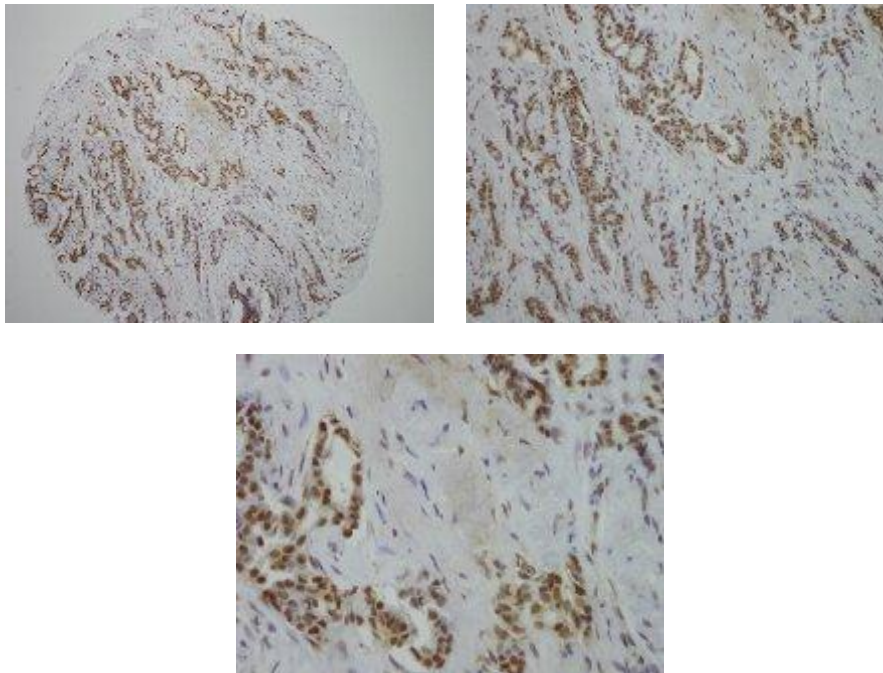


Figura 5. Tinción nuclear fuerte y citoplasmática leve de células tumorales, > 50 % de Survivina. 10x. 20x. 40x.

III.5.2. Relación entre la expresión de Survivina y respuesta al tratamiento quimioterápico neoadyuvante.

En relación a la Survivina se encontró relación estadísticamente significativa, tanto si se consideraba como variable dicotómica (positivo/negativo) [Estadístico exacto de Fisher], como si se trataba a la misma como porcentaje (Prueba de U-Mann-Whitney), entre la expresión de las células tumorales antes del tratamiento neoadyuvante y las distintas asociaciones de la respuesta al tratamiento M&P (en las asociaciones 1, 2, 4 y 5 para el primer caso y las asociaciones 2 y 4 en el segundo). Es decir, aquellas pacientes cuyos tumores sobreexpresaban Survivina tenían menos probabilidades de responder al tratamiento quimioterápico primario, aunque no encontramos una relación significativa con la RPc (Tablas 82 y 83).

	Nº de casos		MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
	<50%	≥ 50%		
Grado 1	2 (28,6%)	5 (71,4)	55,7143	18,74802
Grado 2	2 (9,5%)	19 (90,5%)	60,2976	17,79179
Grado 3	3 (11,5%)	23 (88,5%)	64,2308	14,94606
Grado 4	9 (52,9%)	8 (47,1%)	52,5982	14,94794
Grado 5	8 (44,4%)	10 (55,6%)	51,4350	21,56996
ASOCIACIÓN 2 (grados 1-2 vs 3 vs 4-5)				
Grado 1-2	4 (14,3%)	24 (85,7%)	59,1518	17,79530
Grado 3	3 (11,5%)	23 (88,5%)	64,2308	14,94606
Grado 4-5	17 (48,6%)	18 (51,4%)	52,0000	18,38826
ASOCIACIÓN 4 (Grados 1-3 vs 4-5)				
Grado 1-3	7 (13,0%)	47 (87,0%)	61,5972	16,53045
Grado 4-5	17 (48,6%)	18 (51,4%)	52,0000	18,38826
ASOCIACIÓN 5 (grados 1-2 vs 4-5)				
Grado 1-2	4 (14,3%)	24 (85,7%)	59,1518	17,79530
Grado 4-5	17 (48,6%)	18 (51,4%)	52,000	18,38826

Expresión de Survivina	Tablas de Contingencia	Test No Paramétricos
M&P (Asociación 1)	p = 0,005 ^a	p = 0,083 ^c
M&P (Asociación 2)	p = 0,001 ^a	p = 0,021 ^c
M&P (Asociación 3)	p = 0,078 ^b	p = 0,180 ^d
M&P (Asociación 4)	p < 0,001 ^b	p = 0,010 ^d
M&P (Asociación 5)	p = 0,007 ^b	p = 0,078 ^d

^a Chi cuadrado de Pearson

^b Estadístico exacto de Fisher

^c Test de Kruskal-Wallis

^d Prueba de Mann-Whitney

Tablas 82 y 83. Relación entre la expresión de Survivina y la respuesta al tratamiento.

III.5.3. Relación entre la expresión de Survivina y las variables clínico-patológicas.

Para ver la relación de Survivina y las variables clínico-patológicas, antes del tratamiento, se estudió la variable Survivna tanto de forma cuantitativa (%), como cualitativa dicotómica (+/-).

Relación de la variable cuantitativa Survivina % y las variables clínico-patológicas

Sólo se encontró relación significativa positiva entre la variable Survivina % y la variable cuantitativa RE % (Coeficiente de correlación de Spearman) [Tabla 84].

Variabes	Tipo variables	p	Método	Significación
Surv % vs Edad		0,431		NS
Surv % vs Grado		0,280	Coeficiente	NS
Surv % vs Tamaño	Cuantitativa vs Cuantitativa	0,295	de	NS
Surv % vs Ki 67%		0,559	Correlación	NS
Surv % vs RE%		0,021¹	de Spearman	S
Surv % vs RP%		0,938		NS

¹ A pesar de que la correlación entre estas variables es significativa, la relación entre ellas es débil, ya que el coeficiente de correlación de Spearman es de: 0,245.

Tabla 84 . Relación entre Survivina % y las variables cuantitativas del estudio.

También se encontró relación significativa positiva entre Survivina y la variable cualitativa RE (contaje ≥ 3) [Tablas 85 y 86].

Variable cualitativa	Variable cuantitativa	Nº casos (%)	Media	Error estándar	Desviación
Ganglios -	Surv %	33 (37,1 %)	55,88	2,87	16,52
Ganglios +	Surv %	56 (62,9 %)	58,96	2,48	18,59
		89 (100 %)			
Ki 67 (< 10 %)	Surv %	14 (15,9 %)	55,89	5,59	20,93
Ki 67 (≥ 10 %)	Surv %	74 (84,1 %)	57,89	2,00	17,24
		88 (100 %)			
Ki 67 (< 20 %)	Surv %	34 (38,6 %)	61,19	2,87	16,71
Ki 67 (≥ 20 %)	Surv %	54 (61,4 %)	55,29	2,47	18,17
		88 (100 %)			
Her2 -	Surv %	67 (77,9 %)	58,15	2,07	16,95
Her2 +	Surv %	19 (22,1 %)	58,16	3,89	16,94
		86 (100 %)			

RE < 10 %		Surv %	23 (26,1 %)	50,43	4,70	22,54
RE ≥ 10 %		Surv %	65 (73,9 %)	60,60	1,89	15,25
			88 (100 %)			
RE cont < 3		Surv %	22 (25 %)	49,54	4,83	22,66
RE cont ≥ 3		Surv %	66 (75 %)	60,74	1,87	15,18
			88 (100 %)			
RP < 10 %		Surv %	38 (43,2 %)	57,15	3,10	19,13
RP ≥ 10 %		Surv %	50 (56,8 %)	57,99	2,40	16,95
			88 (100 %)			
RP cont < 3		Surv %	34 (38,6%)	55,59	3,35	19,56
RP cont ≥ 3		Surv %	54 (61,4%)	58,91	2,27	16,70
			88 (100 %)			
Fenotipo (perfil 1)	Basal		12 (14%)	47,92	6,93	24,00
	Her2		19 (22 %)	58,16	3,89	16,94
	Luminal A	Surv %	28 (32,6 %)	61,56	2,53	13,40
	Luminal B		27 (31,4 %)	59,17	2,96	15,41
				86 (100 %)		
Fenotipo (perfil 2)	Basal		12 (14 %)	47,92	6,93	24,00
	Her2		7 (8,1 %)	59,64	5,04	13,34
	Luminal A	Surv %	56 (65,1 %)	59,93	1,95	14,61
	Luminal B		11 (12,8 %)	59,32	5,67	18,79
				86 (100 %)		

Variables	Tipo variables	p_valor	Método
Surv % vs Ganglios		0,268	
Surv % vs ki67 (pc ≥ 10 %)		0,941	
Surv % vs ki67 (pc ≥ 20 %)		0,097	
Surv % vs Her2	Cuantitativa vs	0,917	U de Mann-Whitney
Surv % vs RE (pc ≥ 10 %)	Cualitativa (dos	0,066	
Surv % vs RE (contaje ≥ 3)	categorías)	0,040	
Surv % vs RP (pc ≥ 10 %)		0,963	
Surv % vs RP (contaje ≥ 3)		0,545	
Surv % vs Fenot (perfil 1)	Cuantitativa vs	0,387	Kruskal-Wallis
Surv % vs Fenot (perfil 2)	Cualitativa (cuatro categorías)	0,455	

Tablas 85 y 86 . Relación entre Survivina % y las variables cualitativas del estudio.

Relación de la variable cualitativa Survivina (+/-) y las variables clínico-patológicas

Sólo se encontró relación significativa entre Survivina (+/-) y la variable cuantitativa RE % (Tablas 87 y 88).

Variable cualitativa	Variable cuantitativa	Nº casos (%)	Media	Error estándar	Desviación
Surv < 50 %	Edad	24 (27 %)	48,00	2,46	12,07
Surv ≥ 50 %		65 (73 %)	50,14	1,57	12,67
Surv < 50 %	Grado	89 (100 %)	2,25	0,16	0,79
Surv ≥ 50 %		24 (28,2 %)	2,15	0,09	0,73
Surv < 50 %	Tamaño tumoral	61 (71,8 %)	3,90	0,40	1,73
Surv ≥ 50 %		85 (100 %)	4,00	0,20	1,58
Surv < 50 %	Ki 67 %	19 (23,2 %)	34,21	5,09	24,94
Surv ≥ 50 %		63 (76,8%)	31,64	3,40	27,23
		82 (100 %)			
		24 (27,3 %)			
		64 (72,7 %)			
		88			

		(100 %)			
Surv < 50 %	RE %	23	35,00	7,88	37,81
		(26,1 %)			
Surv ≥ 50 %		65	58,41	4,57	36,88
		(73,9 %)			
		88			
		(100 %)			
Surv < 50 %	RP %	24	33,75	8,03	39,32
		(27,3 %)			
Surv ≥ 50 %		64	32,87	4,41	35,30
		(72,7 %)			
		88			
		(100 %)			

Variables	Tipo variables	p	Método	Significación
Surv (+/-) vs Edad		0,585		NS
Surv (+/-) vs Grado	Cuantitativa vs	0,518	U de	NS
Surv (+/-) vs Tamaño	Cualitativa (dos	0,628	Mann-	NS
Surv (+/-) vs Ki 67%	categorías)	0,447	Whitney	NS
Surv (+/-) vs RE%		0,017		S
Surv (+/-) vs RP%		0,681		NS

Tablas 87 y 88. Relación entre la variable Supervivencia (+/-) y las variables cuantitativas del estudio.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre Supervivencia y las variables cualitativas Ki 67 (pc ≥ 10 %), Ki 67 (pc ≥ 20 %), Her2, RE (pc ≥ 10 %), RE (contaje ≥ 3), RP (pc ≥ 10 %), RP (contaje ≥ 3), Fenotipo (perfil 1) y Fenotipo (perfil 2) [Tablas 89 y 90].

Variables cualitativas	Surv < 50 %	Surv ≥ 50 %
Ganglios -	12 (36,4 %)	21 (63,6 %)
Ganglios +	12 (21,4 %)	44 (78,6 %)
Ki 67 < 10 %	3 (21,4 %)	11 (78,6 %)
Ki 67 ≥ 10 %	21 (28,4 %)	53 (71,6 %)
Ki 67 < 20 %	6 (25 %)	18 (75 %)
Ki 67 ≥ 20 %	18 (33,3 %)	36 (66,7 %)
Her2 -	16 (69,6 %)	7 (30,4 %)
Her2 +	7 (36,8 %)	12 (63,2 %)

RE < 10 %		9 (40,9 %)	13 (59,1 %)
RE ≥ 10 %		14 (21,5 %)	51 (78,5 %)
RE cont < 3		9 (40,9 %)	13 (59,1%)
RE cont ≥ 3		14 (21,2 %)	52 (78,8 %)
RP < 10 %		12 (31,6 %)	26 (68,4 %)
RP ≥ 10 %		12 (24 %)	38 (76%)
RP cont < 3		12 (35,3 %)	22 (64,7 %)
RP cont ≥ 3		12 (22,2 %)	42 (77,8 %)
	Basal	6 (50 %)	6 (50 %)
Fenotipo (perfil 1)	Her2	7 (36,8 %)	12 (63,2 %)
	Luminal A	5 (17,9%)	23 (82,1 %)
	Luminal B	5 (18,5 %)	22 (81,5 %)
	Basal	6 (50 %)	6 (50 %)
Fenotipo (perfil 2)	Her2	2 (28,6 %)	5 (71,4 %)
	Luminal A	11 (19,6 %)	45 (80,4 %)
	Luminal B	4 (22,2 %)	7 (77,8 %)

Variab	Tipo variables	p_valor	Método	Significación
Surv (+/-) vs Ganglios		0,144		
Surv (+/-) vs ki67 (pc ≥ 10 %)		0,750		
Surv (+/-) vs ki67 (pc ≥ 20 %)		0,142		
Surv (+/-) vs HER-2	Cualitativa vs	0,378		
Surv (+/-) vs RE (pc ≥ 10 %)	Cualitativa (dos	0,108	Test exacto de	NS
Surv (+/-) vs RE (cont ≥ 3)	categorías)	0,093	Fisher	
Surv (+/-) vs RP (pc ≥ 10 %)		0,475		
Surv (+/-) vs RP (cont ≥ 3)		0,222		
Surv (+/-) vs Fenot (perfil 1)	Cualitativa vs	0,095	Chi-cuadrado	
Surv (+/-) vs Fenot (perfil 2)	Cualitativa (cuatro categorías)	0,152	de Pearson	NS

Tablas 89 y 90. Relación entre la variable Survivina (+/-) y las variables cualitativas del estudio.

III.5.4. Relación entre la expresión de Survivina y el resto de proteínas.

Para ver la relación de Survivina y las otras proteínas del estudio, antes del tratamiento, se estudió la variable Survivina tanto de forma cuantitativa (%), como cualitativa dicotómica (+/-)

Relación de la variable *Survivina* y las otras proteínas de forma cuantitativa

Se encontró relación significativa positiva entre *Survivina* y la expresión de pAKT y pSTAT3 (Coeficiente de correlación de Spearman) [Tabla 91].

Variables	Tipo variables	p	Método	Significación
Surv % vs pAKT %		0,001		S
Surv % vs pMAPK %	Cuantitativa vs Cuantitativa	0,727	Coeficiente de	NS
Surv % vs pSTAT3 int		0,025		Correlación
Surv % vs VEG-AF %		0,064	de Spearman	NS
Surv % vs HIF1 α %		0,268		NS

Tabla 91. Relación entre *Survivina* % y el resto de proteínas como variables cuantitativas.

Relación entre la expresión de *Survivina* y el resto de proteínas de forma cualitativa

Sólo se encontró relación negativa estadísticamente significativas entre la expresión de *Survivina* y VEGF-A (test exacto de Fisher) [Tablas 92 y 93].

Variables cualitativas	<i>Survivina</i> < 50 %	<i>Survivina</i> \geq 50 %
pAKT < 10 %	7 (31,8 %)	15 (68,2%)
pAKT \geq 10 %	15 (26,8 %)	41 (73,2 %)
pMAPK < 10 %	1 (7,7 %)	12 (92,3 %)
pMAPK \geq 10 %	14 (22,6 %)	48 (77,4 %)
pSTAT3 = 0 int	15 (26,8 %)	41 (73,2 %)
pSTAT3 > 0 int	5 (20 %)	20 (80 %)
VEGF-A = 0 %	11 (18,6 %)	48 (81,4 %)
VEGF-A > 0 %	11 (44 %)	14 (56 %)
HIF-1 α < 5 %	13 (27,1 %)	35 (72,9 %)
HIF-1 α \geq 5 %	7 (20,6 %)	27 (79,4 %)

Variables	Tipo variables	p_valor	Método
Surv (+/-) vs pAKT (+/-)		0,781	
Surv (+/-) vs pMAPK (+/-)	Cualitativa vs	0,279	Test exacto de Fisher
Surv (+/-) vs pSTAT3 (+/-)	Cualitativa (dos	0,587	
Surv (+/-) vs VEGF-A (+/-)	categorías)	0,028	
Surv (+/-) vs HIF-1 α (+/-)		0,605	

Tablas 92 y 93. Relación entre *Survivina* (+/-) y el resto de proteínas como variables cualitativas.

III.6. pSTAT3

III.6.1. Análisis descriptivo.

De 95 muestras analizadas se han podido determinar la expresión de pSTAT3 en 86 (90,5 %). De éstas, fueron consideradas positivas 26 (27,4 %), al expresar algo de tinción nuclear en las células tumorales (Figura 6). En relación al grado de intensidad de las células que presentaban inmunotinción (células positivas) la media fue de 0,39 con una desviación típica de 0,547 (mínimo: 0,00 y máximo: 2,00).

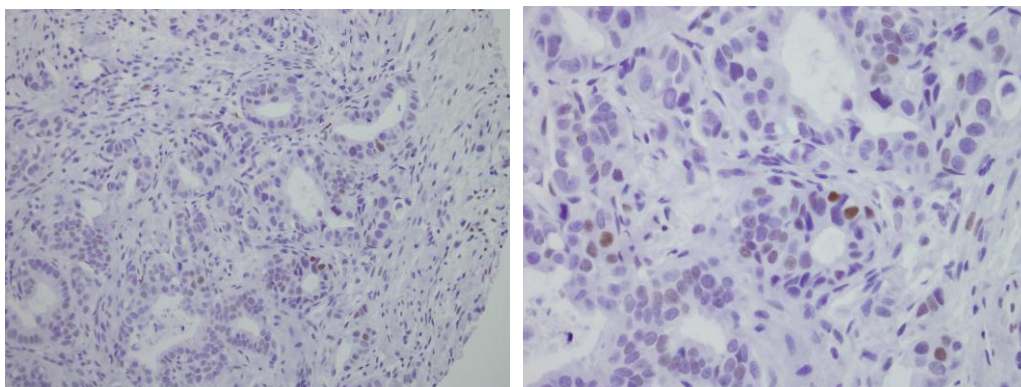


Figura 6. Tinción nuclear fuerte-moderada de pSTAT3 en células tumorales, > 0 intensidad. 20x y 40x.

III.6.2. Relación entre la expresión de pSTAT3 y respuesta al tratamiento quimioterápico neoadyuvante.

Se encontró relación estadísticamente significativa si se consideraba como variable cualitativa dicotómica (positivo/negativo) [Estadístico exacto de Fisher: $p=0,027$] entre la expresión de las células tumorales, antes del tratamiento neoadyuvante, y la Asociación 3 de la respuesta al tratamiento (M&P 1-4 vs 5). Es decir, aquellas pacientes cuyos tumores sobreexpresaban pSTAT3 tenían una menor probabilidad de alcanzar una R_{Pc} tras el tratamiento quimioterápico primario, siendo más resistentes al mismo. Para el resto de asociaciones no se encontraron relaciones estadísticamente significativas (Tablas 94 y 95).

	Nº de casos		MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
	0 intensidad	> 0 intensidad		
Grado 1	4 (50%)	4 (50%)	0,50	0,535
Grado 2	12 (66,7%)	6 (33,3%)	0,33	0,485
Grado 3	15 (62,5%)	9 (37,5%)	0,38	0,495
Grado 4	11 (68,8 %)	5 (31,3%)	0,31	0,479
Grado 5	18 (90,0%)	2 (10,0%)	0,10	0,308
ASOCIACIÓN 3 (grados 1-4 vs 5)				
Grado 1-4	42 (63,6%)	24 (36,4%)	0,36	0,485
Grado 5	18 (90,0%)	2 (10,0%)	0,10	0,308

Expresión de p STAT3	Tablas de Contingencia
M&P (Asociación 1)	p = 0,195 ^a
M&P (Asociación 2)	p = 0,181 ^a
M&P (Asociación 3)	p = 0,027^b
M&P (Asociación 4)	p = 0,095 ^b
M&P (Asociación 5)	p = 0,149 ^b

^a Chi cuadrado de Pearson

^b Estadístico exacto de Fisher

Tablas 94 y 95. Relación entre la expresión de pSTAT3 y la respuesta al tratamiento.

III.6.3. Relación entre la expresión de pSTAT3 y las variables clínico-patológicas.

Para ver la relación de pSTAT3 y las variables clínico-patológicas, antes del tratamiento, se estudió la variable pSTAT3 tanto de forma cuantitativa (intensidad: 0,1,2), como cualitativa dicotómica (+/-).

Relación de la variable cuantitativa pSTAT3 intensidad y las variables clínico-patológicas

Se encontró relación estadísticamente significativa entre la variable cuantitativa pSTAT3 intensidad y las variables cuantitativas Tamaño tumoral (asociación negativa) y RP % (asociación positiva) [Coeficiente de correlación de Spearman] [Tabla 96].

Variables	Tipo variables	p	Método	Significación
pSTAT3 int vs Edad		0,785		NS
pSTAT3 int vs Grado		0,236	Coficiente	NS
pSTAT3 int vs Tamaño	Cuantitativa vs Cuantitativa	0,001¹	de	S
pSTAT3 int vs Ki 67%		0,155	Correlación	NS
pSTAT3 int vs RE%		0,286	de Spearman	NS
pSTAT3 int vs RP%		0,009²		S

¹A pesar de que la correlación entre estas variables es significativa, la relación entre ellas es débil, ya que el coeficiente de correlación de Spearman es de : -0,372.

²A pesar de que la correlación entre estas variables es significativa, la relación entre ellas es débil, ya que el coeficiente de correlación de Spearman es de : 0,282.

Tabla 96. Relación entre pSTAT3 int y las variables cuantitativas del estudio.

También se encontró relación significativa entre la variable cuantitativa pSTAT3 y las variables cualitativas RE (contaje ≥ 3), RP (punto de corte ≥ 10 %; contaje ≥ 3) y Fenotipo (perfil 2) [Tablas 97 y 98].

Variable cualitativa	Variable cuantitativa	Nº casos (%)	Media	Error estándar	Desviación
Ganglios -	pSTAT3 int	30 (34,9 %)	0,40	0,08	0,47
Ganglios +	pSTAT3 int	56 (65,1 %)	0,38	0,08	0,59
		86 (100 %)			
Ki 67 (< 10 %)	pSTAT3 int	16 (18,8 %)	0,44	0,15	0,60
Ki 67 (≥ 10 %)	pSTAT3 int	69 (81,2 %)	0,38	0,06	0,54
		85 (100 %)			
Ki 67 (< 20 %)	pSTAT3 int	35 (41,2 %)	0,45	0,09	0,53
Ki 67 (≥ 20 %)	pSTAT3 int	50 (58,8 %)	0,35	0,08	0,56
		85 (100 %)			
Her2 -	pSTAT3 int	67 (78,8%)	0,38	0,07	0,55
Her2 +	pSTAT3 int	18 (21,2 %)	0,44	0,13	0,56
		85 (100 %)			
RE < 10 %	pSTAT3 int	23 (27,1 %)	0,24	0,10	0,47
RE ≥ 10 %	pSTAT3 int	62 (72,9 %)	0,45	0,07	0,57
		85 (100 %)			

RE cont < 3		pSTAT3 int	22 (18,8 %)	0,20	0,10	0,45
RE cont ≥ 3		pSTAT3 int	63 (81,2 %)	0,46	0,07	0,57
			85 (100 %)			
RP < 10 %		pSTAT3 int	37 (43,5 %)	0,25	0,07	0,45
RP ≥ 10 %		pSTAT3 int	48 (56,5 %)	0,50	0,08	0,59
			85 (100 %)			
RP cont < 3		pSTAT3 int	33 (38,8 %)	0,23	0,08	0,45
RP cont ≥ 3		pSTAT3 int	52 (61,2 %)	0,50	0,08	0,58
			85 (100 %)			
Fenotipo (perfil 1)	Basal		13 (15,3 %)	0,27	0,14	0,52
	Her2		18 (21,2 %)	0,44	0,13	0,56
	Luminal A	pSTAT3 int	30 (35,3 %)	0,41	0,10	0,54
	Luminal B		24 (28,2 %)	0,40	0,12	0,58
			85 (100 %)			
Fenotipo (perfil 2)	Basal		13 (15,3 %)	0,27	0,14	0,52
	Her2		7 (8,2 %)	0,00	0,00	0,00
	Luminal A	pSTAT3 int	54 (63,5 %)	0,40	0,07	0,55
	Luminal B		11 (13,0 %)	0,73	0,17	0,56
			85 (100 %)			

VARIABLES	Tipo variables	p_valor	Método
pSTAT3 % vs Ganglios		0,537	
pSTAT3 % vs ki67 (pc ≥ 10)		0,765	
pSTAT3 % vs ki67 (pc ≥ 20)		0,288	
pSTAT3 % vs Her2	Cuantitativa vs	0,609	
pSTAT3 % vs RE (pc ≥ 10 %)	Cualitativa (dos	0,077	U de Mann-Whitney
pSTAT3 % vs RE (cont ≥ 3)	categorías)	0,035	
pSTAT3 % vs RP (pc ≥ 10 %)		0,030	
pSTAT3 % vs RP (cont ≥ 3)		0,020	
pSTAT3 % vs Fenot (perfil 1)	Cuantitativa vs	0,750	Kruskal-Wallis
pSTAT3 % vs Fenot (perfil 2)	Cualitativa (cuatro categorías)	0,017	

Tablas 97 y 98 . Relación entre pSTAT3 % y las variables cualitativas del estudio.

Relación de la variable cualitativa pSTAT3 (+/-) y las variables clínico-patológicas

Sólo se encontró relación significativa entre pSTAT3 (+/-) y la variable cuantitativa tamaño tumoral (relación negativa) y RP % (relación positiva) [Tablas 99 y 100].

Variable cualitativa	Variable cuantitativa	Nº casos (%)	Media	Error estándar	Desviación
pSTAT3 0 int	Edad	60 (69,8%)	50,85	1,64	12,70
pSTAT3 > 0 int		26 (30,2 %)	48,23	2,28	11,62
		86 (100 %)			
pSTAT3 0 int	Grado	56 (68,3%)	2,21	0,11	0,80
pSTAT3 > 0 int		26 (31,7 %)	2,04	0,12	0,60
		82 (100 %)			
pSTAT3 0 int	Tamaño tumoral	55 (67,9 %)	4,26	0,23	1,71
pSTAT3 > 0 int		26 (32,1%)	3,30	0,20	1,02
		81 (100 %)			
pSTAT3 0 int	Ki 67 %	59 (69,4 %)	34,45	3,60	27,69
pSTAT3 > 0 int		26 (30,6 %)	25,83	4,71	24,00
		85 (100 %)			
pSTAT3 0 int	RE %	59 (69,4 %)	52,78	5,24	40,28
pSTAT3 >0 int		26 (30,6 %)	56,73	7,24	36,90
		85 (100 %)			
pSTAT3 0 int	RP %	59 (69,4 %)	27,98	4,69	36,05
pSTAT3 >0 int		26 (30,6 %)	49,33	6,74	34,38
		85 (100 %)			

Variables	Tipo variables	p	Método	Significación
pSTAT3 (+/-) vs Edad		0,538		NS
pSTAT3 (+/-) vs Grado	Cuantitativa vs	0,236	U de	NS
pSTAT3 (+/-) vs Tamaño	Cualitativa (dos	0,010	Mann-	S
pSTAT3 (+/-) vs Ki 67%	categorías)	0,205	Whitney	NS
pSTAT3 (+/-) vs RE%		0,629		NS
pSTAT3 (+/-) vs RP%		0,011		S

Tablas 99 y 100. Relación entre la variable pSTAT3 (+/-) y las variables cuantitativas del estudio.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre pSTAT3 y la variable cualitativa RP (contaje ≥ 3) [Tablas 101 y 102].

Variables cualitativas		pSTAT3 0 int	pSTAT3 > 0 int
Ganglios -		20 (66,7 %)	10 (33,3 %)
Ganglios +		10 (38,5 %)	16 (61,5 %)
Ki 67 < 10 %		11 (68,7 %)	5 (31,3 %)
Ki 67 \geq 10 %		48 (69,6%)	21 (30,4 %)
Ki 67 < 20 %		22 (62,9 %)	13 (37,1 %)
Ki 67 \geq 20 %		37 (74 %)	13 (26 %)
Her2 -		47 (70,1 %)	20 (29,9 %)
Her2 +		12 (66,7 %)	6 (33,3%)
RE < 10 %		18 (78,3 %)	5 (21,7 %)
RE \geq 10 %		41 (66,1 %)	21 (33,9 %)
RE cont < 3		18 (81,8 %)	4 (18,2 %)
RE cont \geq 3		41 (65,1%)	22 (34,9 %)
RP < 10 %		30 (81,1 %)	7 (18,9 %)
RP \geq 10 %		29 (60,4 %)	19 (39,6 %)
RP cont < 3		28 (84,8 %)	5 (15,2%)
RP cont \geq 3		31 (59,6%)	21 (40,4 %)
Fenotipo (perfil 1)	Basal	10 (76,9 %)	3 (23,1 %)
	Her2	12 (66,7 %)	6 (33,3 %)
	Luminal A	20 (66,7 %)	10 (33,3 %)
	Luminal B	17 (70,8 %)	7 (29,2 %)
Fenotipo (perfil 2)	Basal	10 (76,9 %)	3 (23,1 %)
	Her2	7 (100 %)	0 (0 %)
	Luminal A	37 (68,5 %)	17 (31,5 %)
	Luminal B	5 (45,5 %)	6 (54,5 %)

Variables	Tipo variables	p_valor	Método
pSTAT3 (+/-) vs Ganglios		0,806	
pSTAT3 (+/-) vs ki67 (pc ≥ 10		1,000	
pSTAT3 (+/-) vs ki67 (pc ≥ 20		0,341	
pSTAT3 (+/-) vs HER-2	Cualitativa vs	0,779	
pSTAT3 (+/-) vs RE (pc ≥ 10 %)	Cualitativa (dos	0,427	Test exacto de
pSTAT3 (+/-) vs RE (cont ≥ 3)	categorías)	0,184	Fisher
pSTAT3 (+/-) vs RP (pc ≥ 10 %)		0,057	
pSTAT3 (+/-) vs RP (cont ≥ 3)		0,016	
pSTAT3 (+/-) vs Fenot (perfil 1)	Cualitativa vs	0,910	Chi-cuadrado
pSTAT3 (+/-) vs Fenot (perfil 2)	Cualitativa (cuatro	0,093	de Pearson
	categorías)		

Tablas 101 y 102. Relación entre la variable pSTAT3 (+/-) y las variables cualitativas del estudio.

III.6.4. Relación entre la expresión de pSTAT3 y el resto de proteínas.

Para ver la relación de pSTAT3 y las otras proteínas del estudio, antes del tratamiento, se estudió la variable pSTAT3 tanto de forma cuantitativa (0,1,2, 3 intensidad), como cualitativa dicotómica (+/-).

Relación de la variable pSTAT3 y las otras proteínas de forma cuantitativa

Sólo se encontró relación significativa positiva entre la expresión de pSTAT3 y Survivina (Coeficiente de correlación de Spearman) [Tabla 103].

Variables	Tipo variables	p	Método	Significación
pSTAT3 int vs pAKT %		0,254		NS
pSTAT3 int vs pMAPK %		0,378	Coefficiente	NS
pSTAT3 int vs Surv %	Cuantitativa vs Cuantitativa	0,025	de	S
pSTAT3 int vs VEGF-A %		0,503	Correlación	NS
pSTAT3 int vs HIF-1 α %		0,324	de Spearman	NS

Tabla 103. Relación entre pSTAT3 int y el resto de proteínas como variables cuantitativas.

Relación entre la expresión de pSTAT3 y el resto de proteínas de forma cualitativa

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre pSTAT3 y el resto de proteínas (test exacto de Fisher) [Tablas 104 y 105].

VARIABLES CUALITATIVAS	pSTAT3 = 0 int	pSTAT3 > 0 int
pAKT < 10 %	2 (%)	18 (%)
pAKT ≥ 10 %	10 (%)	41 (%)
pMAPK < 10 %	10 (%)	37 (%)
pMAPK ≥ 10 %	1 (%)	22 (%)
Survivina < 50 %	1 (%)	14 (%)
Survivina ≥ 50 %	12 (%)	46 (%)
VEGF-A = 0 %	11 (%)	39 (%)
VEGF-A > 0 %	1 (%)	20 (%)
HIF-1α < 5 %	7 (%)	35 (%)
HIF-1α ≥ 5 %	6 (%)	24 (%)

VARIABLES	Tipo variables	p_valor	Método	Significación
pSTAT3 (+/-) vs pAKT (+/-)		0,395		
pSTAT3 (+/-) vs pMAPK (+/-)	Cualitativa vs	0,087		
pSTAT3 (+/-) vs Surv (+/-)	Cualitativa (dos	0,584	Test exacto de	NS
pSTAT3 (+/-) vs VEGF-A (+/-)	categorías)	0,615	Fisher	
pSTAT3 (+/-) vs HIF-1α (+/-)		0,810		

Tablas 104 y 105. Relación entre pSTAT3 (+/-) y el resto de proteínas como variables cualitativas.

III.7. EGFR

III.7.1. Análisis descriptivo.

De 95 muestras analizadas se pudo determinar la expresión de EGFR en 88 (92,6 %). De éstas, fueron consideradas positivas 0 (0 %), al no encontrarse tinción de membrana en ninguna de las células tumorales (Figura 7).

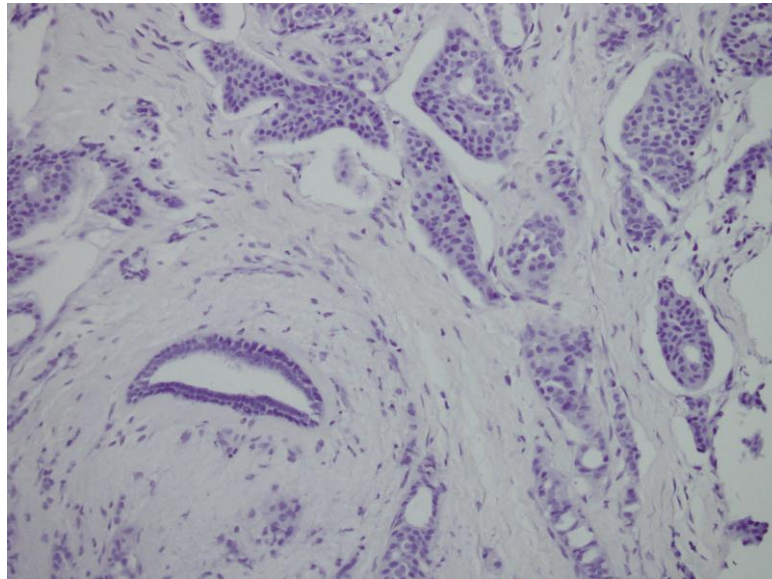


Figura 7. Tinción de membrana negativa de EGFR. 20x.

IV. Factores predictivos de respuesta al tratamiento. Análisis multivariante.

El análisis multivariante se realizó a partir de los valores obtenidos en el análisis univariante. En el modelo se incluyeron seis factores predictivos de respuesta: Fenotipo (perfil 1), RE (contaje ≥ 3), Ki 67 ($pc \geq 20\%$), HIF-1 α ($pc \geq 5\%$), pSTAT3 ($pc > 0$ int) y VEGF-A ($pc \geq 0\%$). Como variable dependiente utilizamos la Asociación 3 de respuesta al tratamiento (M&P 1-4 vs 5).

El estudio se llevó a cabo a partir de una regresión logística, con el fin de saber si la probabilidad de alcanzar la RPc, dependía de una o varias variables independientes. Para intentar obtener el mejor modelo predictivo, se realizaron dos tipos de regresiones logísticas: automática y manual.

Modelo de regresión automática.

En este caso, el modelo resultante estaba formado por las variables Ki 67 y RE, y era capaz de pronosticar correctamente la RPc en el 85,3 % de los casos (índice de validez), teniendo una sensibilidad (S) del 75 %, especificidad (E) del 88,14 %, valor predictivo positivo (VPP) del 63,16 % y valor predictivo negativo (VPN) del 92,86 %.

En este modelo de regresión la variable RE presentaba una Odds Ratio (OR) significativa de 10,138, con un intervalo de confianza al 95 % (2,511- 40,925) [Tabla 106]. La fracción de individuos que alcanzan la RPc era 10,138 veces mayor en las

pacientes con RE negativos. Es decir, el 91,02 % de las pacientes con RE negativos alcanzaban la RPc.

	p	OR	IC 95 %	
			Inferior	Superior
Ki67 (pc ≥ 20 %)	0,084	6,993	0,773	63,300
RE (cont < 3)	0,001	10,138	2,511	40,925

Tabla 106. Modelo de regresión automática, como factor predictivo de respuesta al tratamiento.

Modelo de regresión manual

En este caso, el modelo resultante estaba formado por las variables Ki 67 (pc ≥ 20 %), HIF-1α (pc ≥ 5 %), Fenotipo (perfil 1) y pSTAT3 (pc > 0 int). Era capaz de pronosticar correctamente la RPc en el 89,9 % de los casos (índice de validez), teniendo una S del 70,59 %, E del 95,16 %, VPP del 80 % y VPN del 92,19 %.

En este modelo de regresión la variable Fenotipo (perfil 1) presentaba una OR significativa de 32,226, con un intervalo de confianza al 95 % (4,077-254,699) [Tabla 107]. La fracción de individuos que respondían correctamente al tratamiento era 32,226 veces mayor en las mujeres con Fenotipo basal, con respecto al resto de fenotipos. Es decir, el 96,99 de las pacientes con Fenotipo basal tenían una RPc tras el tratamiento quimioterápico.

	p	OR	IC 95 %	
			Inferior	Superior
Fenotipo (perfil 1)	0,001	32,226	4,077	254,699
Ki67 (pc ≥ 20 %)	0,464	2,586	0,204	32,801
HIF-1α (pc ≥ 5 %)	0,211	2,725	0,567	13,094
pSTAT3 (pc > 0 int)	0,071	6,834	0,847	55,130

Tabla 107. Modelo de regresión manual, como factor predictivo de respuesta al tratamiento.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Alcanzar la RPc tras el tratamiento neoadyuvante es uno de los objetivos más buscados en el planteamiento terapéutico del cáncer de mama, ya que se ha demostrado que la RPc es el factor pronóstico más importante en términos de SLE y SG, probablemente, por la erradicación de la enfermedad micrometastásica (Jones y Smith, 2006).

Aunque el 60-90 % de las pacientes que reciben quimioterapia neoadyuvante obtienen respuesta clínica, en la mayoría de los ensayos clínicos las tasas de RPc son mucho más bajas, en torno al 3-30 % (Bear y cols., 2006). En nuestro estudio, la tasa de RPc (tumor y ganglios) fue del 21,1 %.

Por otro lado, también se sabe que hasta un 20 % de las pacientes no se benefician de los fármacos que se utilizan en este escenario de la neoadyuvancia, siendo además susceptibles de toxicidades farmacológicas y quedando expuestas a la progresión de enfermedad durante los meses que dura el tratamiento primario (Tewari y cols., 2008).

La identificación de marcadores predictivos de respuesta y sobre todo, marcadores relacionados con la obtención de una RPc, han sido objeto de estudio desde hace mucho tiempo, no sólo para distinguir pacientes respondedores de no respondedores, sino también para investigar, en estos últimos, nuevas estrategias y dianas terapéuticas. Por eso, y debido al tamaño muestral de nuestro estudio ($n = 95$), decidimos no sólo estudiar el valor predictivo de RPc, sino también intentar distinguir pacientes respondedoras de no respondedoras, en base a diferentes agrupaciones del grado de regresión M&P (ver el apartado III.1.2. de Resultados). Además, estudios recientes apuntan a que algunas pacientes con enfermedad mínima residual tras quimioterapia neoadyuvante (grado 4 de M&P) tienen una pronóstico similar a las que alcanzan la RPc (Mazouni y cols., 2007; Symmans y cols., 2007).

FACTORES PREDICTIVOS CONOCIDOS DE RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE.

Los receptores hormonales y el HER2 son los marcadores predictivos de respuesta más potentes conocidos hasta el momento (von Minckwitz y cols., 2005), tal y como se comenta en el apartado I.2.2. de la Introducción. No obstante, son muchos los estudiados como posibles factores predictivos, tales como la edad, tamaño tumoral al diagnóstico, grado histológico, el marcador de proliferación Ki 67, fenotipos moleculares y más recientemente las firmas de expresión génica. Sin embargo, en términos de predicción de respuesta los resultados arrojados son aún muy limitados (Tewari y cols., 2008).

Receptores hormonales

El estatus de los receptores hormonales (RE y RP) es considerado la variable predictiva de respuesta independiente con más valor hasta el momento, habiéndose asociado su negatividad, en todos los grandes estudios prospectivos, con mayores tasas de RPc. De forma paradójica, como factor pronóstico, los tumores sin sobreexpresión de receptores hormonales están asociados a una menor supervivencia (ver el apartado I.2.1.1.5 de la Introducción).

El ensayo de neoadyuvancia con mayor número de pacientes llevado a cabo, el NSABP B27 (ver apartado de Introducción I.5.3), mostró un incremento significativo de RPc en las pacientes RE- tanto en el brazo de antraciclinas sólo (13,6 % vs 5,7 % , como en el brazo que añadía el docetaxel (22,8 % vs 14,1 %) [Bear y cols., 2003].

El estudio ECTO (ver apartado de introducción I.5.3.), que incluyó un total de 1355 mujeres, el 42 % de las pacientes con RE- alcanzaron una RPc vs 12 % en el grupo de las RE+ (en el brazo de las pacientes tratadas con antraciclinas y taxanos). En el análisis multivariante, el estatus de los RE destacó como el único factor predictivo de respuesta independiente, significativamente asociado con una mayor probabilidad de alcanzar una RPc (Gianni y cols., 2005).

Green y cols., 2005 que demostraron una mayor tasa de RPc con el esquema semanal vs trisemanal de paclitaxel seguido de antraciclinas (ver apartado de introducción I.5.3.), objetivaron también en el subgrupo de receptores hormonales negativos un incremento de RPc (48 % vs 23 %) con el esquema semanal vs trisemanal.

Dentro de los estudios alemanes, en el GEPARDUO (ver apartado de introducción I.5.3.), el estatus de los receptores hormonales fue factor predictivo independiente de RPc (negativos: 22,8 % vs positivos: 6,2 %, $p = 0,0001$) [von Minckwitz, 2005]. De igual forma, en el ensayo GEPARTRIO (ver apartado de Introducción I.5.3.), la negatividad de los RE y RP demostró estar asociado a tasas más altas de RPc, tanto en el análisis univariante (35,6 % vs 11,2 %, $p < 0,0001$), como en el multivariante (34,2 % vs 11,5 %, $p < 0,001$) [Huober y cols., 2010].

Estos datos coinciden con nuestros resultados, ya que de las 94 pacientes en las que se valoró el estatus hormonal, las tasas de RPc fueron de 56,2 % / 84 % (en función del sistema de evaluación inmunohistoquímica, ver el apartado IV.2.1. de Material y Métodos) en las pacientes RE- y de 8,4 % / 31,5 % en las RE+ ($p < 0,001$). En el análisis multivariante, la variable RE destacó como factor predictivo independiente de respuesta ($p = 0,001$).

Otros estudios retrospectivos también avalan estos resultados. Ring y cols., 2004, analizaron 435 pacientes con cáncer de mama operable y que recibieron tratamiento quimioterápico neoadyuvante. Aquellas pacientes cuyos tumores eran RE- tenían una mayor probabilidad de alcanzar una RPc que aquellas pacientes RE+ (21,6 % vs 8,1 % ,

$p < 0,001$). Sin embargo, ni el estatus de los RE ni el grado histológico parecieron ser factores predictivos independientes de RPc.

En otro análisis retrospectivo de 1731 pacientes tratados con diferentes regímenes de quimioterapia neoadyuvante, las tasas de RPc eran del 24 % en pacientes RE- y del 8 % en RE+ ($p < 0,001$), sin tener en cuenta el esquema de tratamiento utilizado, ya que hasta un 44 % de las pacientes del estudio sólo recibieron antraciclinas, sin la adición de taxanos al tratamiento (Guarneri y cols., 2006).

El caso de los RP los resultados no han sido tan contundentes. MacGrogan y cols., 2004, describieron una alta correlación entre RE- y la quimiosensibilidad, pero no así con los RP-. Sin embargo, Daidone y cols., 1999, apuntaron una mayor tasa de respuestas en las pacientes RP- (86 % vs 68 %). De igual forma, en otro estudio, 32 de 44 tumores con baja expresión de RP respondían mejor a la quimioterapia neoadyuvante comparado con 11 de 29 tumores con alta expresión de RP ($p = 0,005$) [Colleoni y cols., 1999]. Nuestros resultados coinciden con la asociación de RP- y mejor respuesta al tratamiento. De las 94 pacientes del estudio, las tasas de RPc fueron de 47,2 % / 42,5 % (en función del sistema de evaluación inmunohistoquímica) en las pacientes RP- y de 3,4 % / 3,7 % en las RP+ ($p = 0 < 001$).

De lo que no parece haber duda, en base a todos los estudios publicados, es que aquellas pacientes con RE- responden mejor a la quimioterapia neoadyuvante y tienen una mayor probabilidad de alcanzar una RPc. Además, parece ser que las pacientes con RE- que alcanzan una RPc, su supervivencia global es comparable a la de las pacientes RE+ (Colleoni y cols., 2009).

Grado de diferenciación

El grado de diferenciación histológica es considerado como factor pronóstico establecido (ver el apartado I.2.1.1.4. de la Introducción), afirmándose que aquellos tumores con un grado 3 tienen un peor pronóstico. El valor predictivo de este marcador también ha sido estudiado, habiéndose relacionado a los tumores más indiferenciados (grado 3) con una mayor quimiosensibilidad (Hanrahan y cols., 2005; Prisack y cols., 2005).

Dentro de los grandes ensayos clínicos de neoadyuvancia, no todos hacen referencia al valor predictivo del grado histológico. En el estudio ECTO las tasas de RPc en las pacientes con grado histológico 3 fueron del 30 % frente a un 19 % en las paciente con grado histológico 1-2 ($p = 0,006$) [Gianni y cols., 2005]. En el análisis multivariante del GEPARDUO, el grado 3 destacó como factor predictivo independiente para alcanzar la RPc (21,4 % vs 5,5 %, $p = 0,0001$) [von Minckwitz y cols., 2005]. De igual forma, el estudio GEPARTRIO destacaba el valor predictivo del grado 3 frente al 1-2, tanto en

análisis univariante (28,1 % vs 13 %, $p < 0,0001$), como en el multivariante (29,6 % vs 13,4%, $p < 0,0001$) [Huober y cols., 2010].

Nuestros resultados coinciden con lo descrito en la literatura. De las 91 pacientes en las que se evaluó el grado de diferenciación histológica, las pacientes con mayor grado histológico respondieron mejor al tratamiento y tuvieron unas tasas más altas de RPc ($p < 0,001$).

Marcador de proliferación Ki 67

El marcador de proliferación Ki 67 cada vez cuenta con más peso como valor pronóstico en el cáncer de mama (ver el apartado I.2.1.2.1. de la Introducción). Dos recientes metaanálisis han reportado una asociación entre la alta expresión de Ki 67 y un aumento de riesgo de recaída y muerte en el cáncer de mama (De Azambuja y cols., 2007; Stuart-Harris y cols., 2008).

Con respecto al valor predictivo, el Ki 67 no ha sido estudiado en los grandes ensayos clínicos prospectivos basados en antraciclinas y taxanos, posiblemente porque se trata de un marcador más reciente y su valor pronóstico, aunque reconocido, está pendiente de una completa implantación (Weigel y Dowsett, 2010).

En un estudio fase II publicado recientemente, 46 mujeres recibieron un régimen de quimioterapia basado en antraciclinas y taxanos. La alta expresión de Ki 67 (punto de corte 15 %) se relacionó de forma significativa con una mayor tasa de RPc (Sánchez Rovira y cols., 2012).

Los resultados de los diferentes estudios retrospectivos que hablan del valor predictivo de este marcador, describen mayores tasas de respuestas en aquellas pacientes con índices de proliferación altos. Petit y cols., 2004, además, describieron en el análisis multivariante que la ausencia de receptores hormonales y $Ki\ 67 \geq 20\%$ eran predictivos de respuesta clínica completa. De igual forma, Burcombe y cols., 2005, encontraron en su estudio de 118 pacientes tratadas con 6 ciclos de quimioterapia neoadyuvante basada en un esquema con antraciclinas, que los tumores que mostraban una reducción $> 75\%$ en el índice de proliferación tras el tratamiento, tenían más probabilidades de alcanzar una RPc (77,8 % versus 26,7 %, $p = 0,004$), que fueron del 8 %.

Nuestros resultados coinciden con estas premisas; de las 94 pacientes en las que se evaluó el marcador, la tasa de RPc en las pacientes con $Ki\ 67 \geq 20\%$ fue de 33,9 % vs 3,6 % en pacientes $Ki\ 67 < 20\%$ ($p < 0,001$). Del grupo de pacientes que alcanzaron en nuestro estudio la RPc, el 95 % expresaban un $Ki67 \geq 20\%$.

Sin embargo, en otros estudios más antiguos los resultados al respecto han sido más contradictorios, sin un claro consenso y dejando dudas a cerca del punto de corte

correcto o la influencia que habría tenido la adición de taxanos al tratamiento (Colleoni y cols., 1999; Sjostrom, 2002; Faneyte y cols., 2003).

Estatus Her2

El receptor de membrana Her2 está sobreexpresado en un 15-25 % de las pacientes con cáncer de mama, y esta sobreexpresión está asociada a un peor pronóstico y una menor supervivencia (Portera y cols., 2007) [ver el apartado 1.2.1.1.6. de la Introducción].

Para discutir el valor predictivo de respuesta del Her2 hay que diferenciar dos etapas conceptuales: antes y después del uso de trastuzumab, asociado a la quimioterapia neoadyuvante.

En la era pre-trastuzumab, no son muchos los ensayos prospectivos que han hablado a cerca del valor predictivo del Her2. Esto puede ser explicado por el pequeño tamaño de la muestra al diagnóstico, heterogeneidad de su valoración y métodos empleados, y sobre todo, los distintos puntos de corte usados en los diferentes estudios.

En el ensayo GEPARTRIO, aunque las tasas de RPc eran más altas en las pacientes Her2+, no se vió una relación significativa (Huober y cols., 2010). Sin embargo, de este mismo estudio, von Minckwitz y cols., 2011, estudiaron en 688 pacientes el valor predictivo de la enzima poliadenosin difosfato-ribosa polimerasa (PARP), además de las variables conocidas. En el análisis multivariante los subgrupos que demostraron una asociación significativa con mayores tasas de RPc fueron los de edad menor de 50 años, receptores hormonales negativos, Her2+ y la sobreexpresión de PARP.

El estudio fase II japonés JBCRG01 (ver el apartado I.5.3. de la Introducción) de neoadyuvancia basada en el esquema FEC seguido de docetaxel, demostró tras el análisis multivariante, la sobreexpresión de Her2 como el único factor independiente predictivo de respuesta (Toy y cols., 2008). En el posterior fase II que publicaron con el mismo tratamiento pero cambiando la secuencia del mismo, es decir, docetaxel seguido de FEC (estudio JBCRG03), las tasas de QRPc eran más bajas en pacientes Her2+ (37 %) que en las Her2- (52,8 %), por lo que los autores han sugerido el posible beneficio de iniciar el tratamiento con antraciclinas en el subgrupo Her2+ (Iwata y cols., 2010).

Con respecto a los estudios retrospectivos sin trastuzumab, en la mayoría de ellos, no se ha objetivado relación entre el estatus Her2 y la respuesta a la quimioterapia (Barret-Lee, 2005; Colleoni y cols., 2008).

Uno de los que indicaba la existencia de una correlación entre la respuesta tumoral y el estatus Her2 en quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclinas, fue publicado por Petit y cols., en 2001. Este estudio evaluó 64 pacientes que recibieron quimioterapia basada en el esquema FEC, utilizando dos dosis diferentes de antraciclina: 50 mg/m² o

100 mg/m². Los autores concluyeron que bajas dosis de antraciclinas y la sobreexpresión de Her2, predecía una menor tasa de respuestas, mientras que las altas dosis de tratamiento y la sobreexpresión de Her2 producía una mayor tasa de respuestas. Sin embargo, en un estudio posterior del mismo grupo, no se encontró relación entre el estatus Her2 y la respuesta al tratamiento, utilizando también el esquema FEC con antraciclinas a 100 mg/m² (Petit y cols., 2004).

Un año más tarde, Burcombe y cols., 2005, publicaron un trabajo retrospectivo con 118 pacientes que recibieron quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclinas, en el que analizaron posibles marcadores predictivos de respuesta. En el caso del Her2 no encontraron ninguna relación entre el estatus basal del gen y la respuesta al tratamiento. Los autores apuntaron cierta tendencia de mayor respuesta en las pacientes que sobreexpresaban Her2, justificando la no significación por las bajas dosis de antraciclinas administradas (60 mg/m²), si bien tampoco se objetivó una relación entre las Her2 – y una menor respuesta.

En otro estudio retrospectivo, publicado posteriormente por Guarneri y cols., 2006, de 1731 pacientes, de las cuales el 91 % recibió un esquema de quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclinas y en el 66 % además, se añadió un taxano. Los resultados mostraron una relación estadísticamente significativa positiva entre Her2+ (definido como 3+ por inmunohistoquímica), receptores hormonales negativos y la tasa de RPc.

El beneficio de trastuzumab asociado a la quimioterapia en el tratamiento neoadyuvante de las pacientes Her2+ ha quedado patente en dos ensayos prospectivos aleatorizados (ver el apartado I.5.5. la de Introducción), que junto a otros trabajos, ha dado tasas de RPc que van desde el 18 % al 65 %, lo que hizo que su uso se incluyese dentro de las recomendaciones de las guías de consenso internacionales (Kaufmann y cols., 2006).

Curiosamente, en un estudio retrospectivo, 199`pacientes con receptores hormonales positivos y con la expresión de Her2 amplificada obtuvieron un beneficio significativo con la adición de trastuzumab a los taxanos en términos de RPc. Sin embargo, aquellas pacientes con receptores hormonales negativos y Her2+ tenían tasas similares de RPc con o sin trastuzumab (Peitenger y col., 2008; Peitenger y cols., 2008).

De las 95 pacientes de nuestro estudio, se valoró la expresión del Her2 en 92. De éstas, 20 (21%) fueron Her2 +. Al estudiar la posible relación con el grado de respuesta al tratamiento, vimos que las pacientes que sobreexpresaban el receptor en sus tumores tenían una tendencia significativa a responder mejor al tratamiento (grado de MP 1-3 vs 4-5, p = 0,010). Sin embargo no encontramos una relación significativa con la RPc (p= 0,348). Con respecto a nuestro trabajo, habría que señalar que sólo 13 de las 20 pacientes Her2 + recibieron trastuzumab, asociado al tratamiento quimioterápico, por lo

que la interpretación de nuestros resultados respecto al valor predictivo del Her2 tiene que ser cautelosa.

Fenotipos moleculares

La clasificación molecular de los tumores de mama ha servido para establecer varios subtipos que cuentan con diferente pronóstico. Los principales grupos moleculares y de mejor a peor pronóstico son: Luminal A (RE+/RP+, Her2-), Luminal B (RE+, RP+/-, Her2 +), Basal (RE-/RP-/Her2-, con perfil génico de célula basal / mioepitelial: CK 5/6+, CK 14+, p63+ y EGFR+) HER2 (RE-/RP-/Her2+), y todo negativo (RE-/RP-/Her2-, CK 5/6-, CK 14-, p63-) [Perou y cols., 2000; Cheang y cols., 2008] (ver el apartado I.2.1.3.4. de la Introducción).

Aunque el método original para definir estos subtipos moleculares fue el uso de microarrays de ADN para valorar la expresión génica, trabajos posteriores han demostrado que un panel de 3-5 marcadores y técnicas de inmunohistoquímica podrían ser suficientes para tipificar el cáncer de mama (Nielsen y cols., 2004; Kim y cols., 2010).

Parece ser que estos subtipos moleculares, además de un valor pronóstico, cuentan con un importante papel como factor predictivo de respuesta a la quimioterapia, asociándose los subtipos triple negativo y Her2+/RE- con una mayor probabilidad de alcanzar una RPc comparado con los subtipos luminal (Desmedt y cols., 2008).

El ensayo prospectivo GEPARTRIO (Huober y cols., 2010), arrojó unas tasas de RPc del 38,9 % en el fenotipo triple negativo. El ensayo japonés fase II JBCRG01 habla de tasas de QRPc del 67 % en fenotipo Her2+/RE- y del 35 % en Her2-/RE-, frente al 33 % en el fenotipo luminal B y del 13 % en luminal A (Toi y cols., 2008). En el otro fase II japonés JBCRG03 las pacientes con fenotipo triple negativo, en las que no se observó ningún grado 4 de regresión, por lo que no se podía hablar de tasas de QRPc, sino de RPc, que fueron las más altas (48 %), seguidas del fenotipo Her2 (Her2+/ RE-/RP-, 29 % de RPc y 36 % de QRPc), luminal B (Her2+/RE+ y/o RP+, 19 % de RPc y 38 % de QRPc) y luminal A (Her2-, RE+ y/o RP+, 13 % de RPc y 19 % de QRPc) [Iwata y cols., 2011].

Nuestros resultados coinciden con estas afirmaciones en los dos tipos de perfiles que utilizamos para catalogar el fenotipo molecular (ver el apartado IV.2.1. de Material y Métodos). Las tasas de RPc variaban de forma significativa en función del fenotipo molecular de los tumores. Así, en el perfil 1 se objetivaron tasas de RPc del 52,6 % (triple negativo), 31,6 % (HER2), 15,8 % (luminal B) y 0 % (luminal A), $p < 0,001$. En el caso del perfil 2 también se objetivaron mayores tasas de RPc en el subgrupo triple negativo (52,6 %), con respecto a los otros que presentaron las mismas tasas de RPc (15,8 %) para los subtipos luminal A, luminal B y HER2, $p < 0,001$. En el análisis

multivariante, la variable fenotipo del perfil 1 destacó como factor predictivo independiente de respuesta ($p = 0,001$).

En otros grandes estudios retrospectivos se han obtenido resultados similares a los nuestros. Liedke y cols., en 2008, publicaron un trabajo que incluyó un total de 1118 pacientes que recibieron un esquema de quimioterapia neoadyuvante basado en antraciclinas, antraciclinas y taxanos, y taxanos en monoterapia. Las tasas R_{Pc} fueron del 31% (HER2, RE-/Her2+), 22 % (triple negativo, Her2-/RE-), 21 % (luminal B, RE+/Her+) y 5 % (luminal A, RE+/Her2-).

Actualmente, contamos con un nivel de evidencia suficiente para decir que los tumores RE+ tienen dos subtipos biológicos diferentes, que cuenta con valores predictivos de respuesta distintos, en los casos considerados RH+/Her2- (luminal A) y RH+/Her2+ (luminal B), que corresponde con el perfil 2 de fenotipo de nuestro estudio. Houber y cols., 2010, publicaron que dentro de las 2072 pacientes del estudio prospectivo GEPARTRIO, los tumores luminal B tenían tasas de R_{Pc} más altas que el luminal A. Estos resultados coinciden con una serie de 116 pacientes del estudio prospectivo GEPARDUO publicada por Darb-Esfahani y cols., 2009, donde se objetivaron unas tasas de R_{Pc} de 1,8 % en el fenotipo luminal A frente 23,1 % en el luminal B.

Resultados similares se habían publicado anteriormente en un estudio retrospectivo de 1731 pacientes de los cuales el 66 % habían recibido un esquema de quimioterapia neoadyuvante basado en antraciclinas y taxanos y el resto, sólo antraciclinas; las tasas de R_{Pc} fueron del 15 % en el subtipo luminal B frente a 6 % del luminal A (Guarneri y cols., 2006). En otro estudio similar, pero más pequeño, de 107 pacientes que recibieron un esquema de quimioterapia basado en antraciclinas, Carey y cols., 2007, mostraron que los fenotipos luminal B (RH+/Her2+) tenían tasas de R_{Pc} más altas que los fenotipos luminal A (RH+/Her2-), y sin embargo, la SLE era peor que en el luminal A, pero mejor que la de los fenotipos HER2 y triple negativo.

Nuestros resultados no coinciden en este sentido ya que tanto el fenotipo luminal A como el B del perfil 2 tenían las mismas tasas de R_{Pc} (15,8 %), si bien es verdad que, como se ha comentado anteriormente, 13 de las 20 pacientes Her2+ de nuestro estudio recibieron trastuzumab, lo que podría haber influido lógicamente en los resultados relacionados con esta variable.

Hay otros estudios que consideran que el índice de proliferación es el parámetro más indicado para distinguir los fenotipos luminal B de los luminal A (Cheang y cols., 2009; Hugh y cols., 2009). Se ha sugerido que el marcador de proliferación Ki 67 podría distinguir los fenotipos B (mayor expresión de Ki 67) de luminal A (Penault-Llorca y cols., 2009). Por ello, en nuestro estudio se clasificaron dos perfiles de fenotipo; en el perfil 1 establecimos los subtipos en relación al marcador de proliferación, separándose el luminal A (Ki 67 < 20 %) del luminal B (Ki 67 ≥ 20 %), encontrándose mayor tasa de

RPc en este último, lo que tiene sentido, ya que como se ha comentado antes, los tumores con índices de proliferación más altos son más quimiosensibles.

Edad

La mayoría de los trabajos publicados no confirman la edad de las pacientes como factor predictivo de respuesta. Dentro de los ensayos prospectivos de neoadyuvancia el único que ha mostrado una relación entre la edad de las pacientes y la respuesta patológica ha sido el estudio alemán GEPARTRIO. Las pacientes < 40 años tuvieron unas tasas de RPc del 31 %, frente a un 18, 2 % en las ≥ 40 años, $p < 0,0001$; en el análisis multivariante, la edad destacó como factor independiente predictivo de respuesta ($p = 0,0043$) [Huober y cols., 2010].

Aunque en nuestro estudio no hemos encontrado una relación significativa entre la edad y la RPc, sí hemos visto una tendencia hacia una mejor respuesta al tratamiento en las pacientes más jóvenes (grado de regresión de M&P 1-3 vs 4-5, $p = 0,046$). Sin embargo, en otros estudios retrospectivos no se ha encontrado ninguna relación. Uno de los más recientes es el publicado por Alvarado-Cabrero y cols., 2009, donde no encontró relación significativa entre las mujeres < 50 años y la respuesta al tratamiento.

Tamaño tumoral

El tamaño del tumor al diagnóstico es uno de los factores pronósticos clásicos más importante, habiéndose correlacionado con una mayor incidencia de metástasis ganglionares y una menor supervivencia (ver el apartado I.2.1.2. de la Introducción).

El valor predictivo del tamaño tumoral no está tan claro. Dentro de los ensayos prospectivos, al igual que en caso anterior, el GEPARTRIO fue el único que encontró una relación significativa, arrojando unas tasas de RPc de 21,7 % en los tumores cT1-cT3 frente a un 12 % en los cT4, $p = 0,0002$; del mismo modo, en el análisis multivariante, el tamaño tumoral destacó como factor independiente de respuesta ($p = 0,0139$) [Huober y cols., 2010].

En nuestro estudio no hemos encontrado ninguna relación entre el tamaño tumoral al diagnóstico de la enfermedad y la respuesta al tratamiento. Son pocos los estudios retrospectivos que hablan del valor predictivo del tamaño tumoral. Colleoni y cols., 2008, estudiaron el valor predictivo de varios marcadores en 485 pacientes; no encontraron relación entre el tamaño tumoral y la respuesta al tratamiento. En otra publicación más reciente, en 205 pacientes que habían recibido un esquema de quimioterapia neoadyuvante basado en antraciclinas, se vió que aquellas pacientes cuyo tumor al diagnóstico medía < 4 cm tenían más probabilidad de alcanzar una RPc ($p = 0,004$) [Alvarado-Cabrero y cols., 2009]. Sin embargo, Jones y cols., 2010, no

encontraron ninguna relación entre tamaño tumoral y respuesta en 175 pacientes tratadas con quimioterapia neoadyuvante.

Estatus ganglionar

La afectación ganglionar al diagnóstico es el factor pronóstico independiente más importante conocido hasta el momento (ver el apartado I.2.1.1.1. de la Introducción). Sin embargo, el valor predictivo de esta variable es más cuestionable.

Tanto en los ensayos prospectivos de quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclinas y taxanos, como en estudios retrospectivos, no se han publicado resultados que relacionen el estado ganglionar inicial y la respuesta al tratamiento. En nuestro estudio no hemos encontrado una relación significativa entre estas variables.

Podemos decir que nuestros resultados coinciden con los datos descritos en la literatura. Parece ser que los factores pronósticos para pacientes que reciben quimioterapia adyuvante son distintos en relación a aquellas que reciben quimioterapia neoadyuvante. Es decir, las pacientes con un alto valor de recurrencia determinados por el Oncotype Dx o MammaPrint TM tienden a tener una mayor probabilidad de obtener una RPc (Gianni y cols., 2005; Straver y cols., 2010). En general, la negatividad de los receptores hormonales es uno de los marcadores predictivos de respuesta más potentes, especialmente si se asocia a la negatividad del gen Her2 (Carey y cols., 2007; Fernández-Morales y col., 2007). Los tumores bien diferenciados no suelen alcanzar una RPc, mientras que casi todas las RPc ocurren en pacientes con tumores poco diferenciados. Las pacientes cuyo tumor tiene una tasa de proliferación elevada, determinada por el índice mitótico o por Ki 67, presentan una alta tasa de RPc (Ravaioli y cols., 1998; Parton y cols., 2002; Untch y cols., 2002; Wang y cols., 2002; Archer y cols., 2003).

Se ha intentado explicar esta paradoja que cumplen algunas variables: factor pronóstico malo y a la vez factor predictivo de buena respuesta. Se sabe que los fenotipos triple negativo y Her2+/RH- se caracterizan por tener un cluster (grupo) de genes relacionados con la proliferación (Sorlie y cols., 2001). Se ha demostrado que aquellos genes relacionados con altos índices de proliferación son predictivos de mayores tasas de RPc tras quimioterapia basada en antraciclinas y taxanos (Gianni y cols., 2005).

Por otro lado, algunos autores relacionan este concepto contradictorio con alcanzar o no la RPc. Es decir, parece claro que las pacientes triple negativo que reciben quimioterapia neoadyuvante y no alcanzan una RPc, aunque tengan buena respuesta clínica, tienen un mal pronóstico. Sin embargo, aquellas que alcanzan la RPc parece ser

que lleva consigo un pronóstico excelente, en términos de supervivencia (Carey y cols., 2007; Liedtke y cols., 2008; Rakha y Ellis, 2009).

El caso contrario ocurre con el fenotipo luminal A. Se sabe que a pesar de su relativa quimioresistencia, es un grupo que tiene un buen pronóstico, independientemente de la respuesta que hagan con la quimioterapia neoadyuvante; probablemente por el rescate hormonal postoperatorio de un mínimo de 5 años.. Lo que no está claro, debido a la tasa tan baja de RPc en estas pacientes, es si aumentaría el beneficio de la hormonoterapia adyuvante en los fenotipos luminal A que alcancen una RPc, en términos de supervivencia (von Minckwitz y cols., 2005; Guarneri y cols., 2006; Darb-Esfahani y cols., 2009).

En cualquier caso, alcanzar la RPc parece ser el factor pronóstico de supervivencia más importante en las pacientes que reciben tratamiento neoadyuvante, por lo que la búsqueda de marcadores predictivos de respuesta sigue siendo uno de los retos más ambiciosos para este tipo de pacientes.

HIF-1 α COMO FACTOR PREDICTIVO DE RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE.

El objetivo principal de este estudio fue determinar la expresión de HIF-1 α en las pacientes que recibieron quimioterapia neoadyuvante, para valorar el papel de esta proteína como factor predictivo de respuesta. Además, también investigamos la sobreexpresión de rutas moleculares y otras proteínas, con el fin de intentar elucidar los mecanismos relacionados con la activación y transcripción de HIF-1 α .

En nuestro trabajo, fueron consideradas HIF-1 α positivas un 36,8 % de las pacientes. Estos resultados coinciden con otros descritos en la literatura; así Bos y cols., 2004 consideraron un 34 %, Gort y cols., 2006, un 28 %, Yamamoto y cols., 36,8 %, habiendo utilizado todos ellos, al igual que nosotros, un punto de corte del 5 %. No obstante, la tasa de positividad en los trabajos que han estudiado el HIF-1 α en el cáncer de mama varía desde un 24 % a un 87 %, probablemente debido a los diferentes puntos de cortes y a los distintos tipos de anticuerpos utilizados en los estudios (Lundgren y cols., 2007).

Son muy pocos los trabajos que hablen del valor predictivo de HIF-1 α en el cáncer de mama. De hecho, sólo hay un estudio publicado de quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclina y taxanos que haya estudiado la relación entre la expresión de HIF-1 α y la respuesta al tratamiento (Oliveira y cols., 2011). Se trata de un estudio prospectivo con 30 pacientes que recibieron epirrubicina y docetaxel como tratamiento neoadyuvante. De todas las pacientes que alcanzaron la RPc (6 pacientes), el 100 % eran HIF-1 α positivas frente a un 66,7 % en el resto de las pacientes, sin alcanzar significación estadística, probablemente por la muestra tan reducida del estudio. En

nuestro trabajo, sí que encontramos una relación significativa entre la expresión de HIF-1 α y la respuesta al tratamiento quimioterápico. Pudimos valorar la expresión de HIF-1 α en 88 pacientes; de éstas, 18 alcanzaron la RPc, sobreexpresando HIF-1 α un 66,7 % frente a un 32,9 % en las pacientes que no alcanzaron la RPc ($p = 0,014$). Es decir, aquellas pacientes que sobreexpresaban HIF-1 α eran más quimiosensibles y tenían una mayor probabilidad de alcanzar una RPc. Nuestro trabajo, aunque se trata de una serie retrospectiva, es el primer estudio que ha demostrado una relación significativa entre la expresión de HIF-1 α y la respuesta al tratamiento neoadyuvante, basado en el tratamiento estándar establecido en la actualidad.

Hay otros dos estudios que han evaluado el valor predictivo de HIF-1 α . El primero se trata de un ensayo clínico fase II con 211 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama estadio T2-4 N0-1, que fueron aleatorizadas para recibir tratamiento neoadyuvante basado en antraciclinas vs antraciclinas más tamoxifeno (Generali y cols., 2006; Fox y cols., 2011). Se encontró una relación significativa entre la tasa de respuestas clínicas y la respuesta al tratamiento, pero sólo en el brazo de epirrubicina, asociándose la sobreexpresión de HIF-1 α con una menor respuesta clínica ($p < 0,004$). Sin embargo, no se encontró relación estadísticamente significativa entre la tasa de RPc y la respuesta al tratamiento ($p = 0,45$), lo que hace más cuestionables los resultados anteriores. En el estudio se objetivaron sólo 5 RPc (2,9 %) y los autores destacan que estas pacientes no expresaban HIF-1 α en el tumor o la tinción era débil. En este estudio se utilizó la intensidad de tinción para establecer el punto de corte del HIF-1 α (negativo: 0, +1 vs positivo: +2); de las 5 pacientes que alcanzaron la RPc, sólo 1 no tenía nada de tinción, las otras 4 fueron catalogadas como +1. En otros muchos estudios, incluido el nuestro, el punto de corte se estableció utilizando el porcentaje de células teñidas (1%, 5% ó 10 %, dependiendo del estudio); por lo tanto, una tinción débil (considerado HIF-1 α negativo) de este estudio podría ser considerado como positivo en función del porcentaje de células teñidas para otros autores.

Por otro lado, tal y como se comenta en el apartado I.6 de la Introducción, hasta en un 50 % de los casos con respuesta clínica completa queda enfermedad residual al analizar la pieza quirúrgica (Guarneri y cols., 2006), por lo que no tiene mucho sentido utilizar este parámetro como marcador de respuesta completa. Además, es la RPc la que ha demostrado correlacionarse con mejores tasas de ILE y SG (Abrial y cols., 2005).

Existen datos que sugieren que la hipoxia podría reducir los efectos de algunos citotóxicos, como las antraciclinas (Doublie y cols., 2012), lo que explicaría la menor tasa de respuestas clínicas del estudio anterior. Los autores también apuntaron un incremento en la expresión de HIF-1 α tras el tratamiento en las pacientes que recibieron sólo epirrubicina, sugiriendo que este agente puede ser responsable, en parte, de la inducción de HIF-1 α . Además, debido a la disminución de flujo sanguíneo que produce el tratamiento con antraciclinas, se ha postulado que este efecto, además de estimular la expresión de HIF-1 α , podría tener relación con la inducción de VEGF (Minko y cols.,

2000; Mollica y cols., 2003). También se ha propuesto que la oxigenación tumoral puede verse aumentada con la adición de los taxanos a las antraciclinas en el tratamiento neoadyuvante del cáncer de mama, al aumentar la presión de oxígeno y disminuir la hipertensión intersticial de las zonas hipóxicas, lo que podría estar relacionado con una mayor quimiosensibilidad, al favorecer el flujo del agente citostático hasta la célula tumoral (Taghian y cols., 2005). En análisis futuros de nuestra serie podremos ver como afecta a la expresión de HIF-1 α el tratamiento con los dos fármacos.

El otro trabajo que estudió el valor predictivo de HIF-1 α estaba basado en hormonoterapia. Se trata también de un ensayo fase II, donde 114 mujeres diagnosticadas de cáncer de mama T2-4 N0-1, RE+ y mayores de 70 años fueron aleatorizadas a recibir durante 6 meses letrozol vs letrozol más ciclofosfamida oral (Generali y cols., 2009). La sobreexpresión de HIF-1 α fue relacionada con menores tasas de respuesta clínica, sin hacerse referencia a la relación con las tasas de RPc.

En nuestro estudio, la sobreexpresión de HIF-1 α , además de ser predictivo de buena respuesta, se asoció a otras variables clásicas cuyo valor predictivo está mucho más establecido. Encontramos una relación estadísticamente significativa entre la expresión de HIF-1 α y la negatividad de los receptores hormonales, tanto de estrógenos ($p = 0,037$) como de progesterona ($p = 0,04$). En los primeros trabajos de HIF-1 α , Bos y cols., 2001 encontraron una relación positiva entre la expresión de RE y HIF-1 α . En un estudio con mayor número de casos realizado por el mismo equipo, se vió una correlación negativa entre ambas variables, aunque no estadísticamente significativa (Bos y cols., 2003).

Si bien en algún trabajo no se ha encontrado relación entre la expresión del RE y la sobreexpresión de HIF-1 α (Schindl y cols., 2002; Gruber y cols., 2004) la mayor parte de las publicaciones, al igual que nosotros, han relacionado la sobreexpresión de HIF-1 α con la negatividad de receptores hormonales. Se ha demostrado que la hipoxia disminuye los niveles de RE y RP en el cáncer de mama, probablemente a través de un incremento de la degradación proteosomal de los receptores y una disminución en la activación de la transcripción de los receptores (Kurebayashi y cols., 2001; Kronblad y cols., 2006; Yamamoto y cols., 2008), lo que sugiere una relación entre la expresión de HIF-1 α y la resistencia al tratamiento hormonal, como ocurre en el trabajo de neoadyuvancia basado en terapia hormonal, comentado anteriormente (Generali y cols., 2009). La pérdida de receptores hormonales, que se relaciona con tumores más agresivos, puede ser consecuencia de la sobreexpresión de HIF-1 α , ya que la negatividad de los receptores hormonales está asociada al crecimiento tumoral, lo que podría favorecer la aparición de áreas hipóxicas, y en consecuencia, la expresión de HIF-1 α (Trastour y cols., 2007). Por otro lado, se sabe que algunos tumores que sobreexpresan HIF-1 α , son receptores hormonales positivos, por lo que se ha señalado a factores de crecimientos responsables de la activación de HIF-1 α , como vía alternativa de activación, en condiciones de normoxia (Kronblad y cols., 2006).

También hemos encontrado relación positiva, estadísticamente significativa entre la expresión de HIF-1 α y el marcador de proliferación Ki 67 ($p < 0,001$). Estos resultados coinciden con los resultados descritos en la literatura (Kronblad y cols., 2006; Yamamoto y cols., 2008; Bos y cols., 2003). Una de las principales cuestiones al respecto que aún no está claro es si la activación de HIF-1 α es causa o consecuencia de la proliferación tumoral. La explicación a esta segunda hipótesis asume que la velocidad de crecimiento de las células tumorales es mayor que la del desarrollo de los vasos sanguíneos, lo que conlleva una disminución en el suministro de oxígeno, y ésta, a su vez, a cambios adaptativos relacionados con la necrosis, que promueve la formación de nuevos vasos. Debido al papel que juega el HIF-1 α en la angiogénesis, se ha sugerido que el mayor índice proliferativo de las células tumorales provocaría la activación de HIF-1 α . Por otro lado, se sabe que HIF-1 α , no sólo se expresa en áreas de necrosis, y que su activación podría estar influenciada por la activación de oncogenes (como HER2), genes supresores de tumores (como PTEN) o factores de crecimiento (como IGF); todos estos mecanismos, a su vez, han sido relacionados con la estimulación de la proliferación (Bos y cols., 2004).

Aunque el grado de diferenciación del tumor tiene que ver con el índice de proliferación, su relación con el HIF1- α parece ser que es algo más controvertida. En general, en la mayoría de los trabajos publicados, se ha relacionado la expresión de HIF1- α en el cáncer de mama con un mayor grado histológico, es decir, con tumores poco diferenciados (Bos y cols., 2001; Bos y cols., 2003; Vleugel y cols., 2005; Kronblad y cols.; Trastour y cols., 2007). Nuestros resultados coinciden también con estas afirmaciones; los tumores que sobreexpresaban HIF-1 α , tenían significativamente una menor diferenciación, es decir, una mayor puntuación en la clasificación de Scarff-Blonn-Richarson (ver el apartado de la Introducción I.2.1.1.4.) [$p = 0,004$]. Se considera que la hipoxia induce alteraciones genéticas, permitiendo a las células tumorales adaptarse a dichas condiciones. Tales alteraciones genéticas promueven cambios morfológicos tanto en la célula en sí, como en su núcleo, dando lugar a células tumorales más indiferenciadas (Yamamoto y cols., 2008). Por otro lado, también se ha relacionado los tumores poco diferenciados con la presencia de zonas necróticas en el cáncer de mama (Tomes y cols., 2003). Curiosamente, en dos trabajos donde se estudió la relación entre HIF1- α y cáncer de mama, en los cuales todas las pacientes se sometieron a cirugía como primer tratamiento y todas tenían ganglios afectados, no se encontró relación entre el grado de diferenciación de los tumores y la expresión de HIF-1 α (Schind y cols., 2002; Gruber y cols., 2004). En el estudio de Kronblad y cols., 2006, en el grupo de los tumores con grado de diferenciación 1-2, la expresión de HIF-1 α se correlacionó con un menor ILE, cosa que no ocurría en los tumores que expresaban HIF-1 α y tenían un grado de diferenciación 3; de hecho, cuando se analizó el subgrupo de pacientes con tumores grado 1-2, la sobreexpresión de HIF-1 α fue el único marcador pronóstico independiente, reconociendo el valor pronóstico de HIF-1 α en un grupo de pacientes que en principio tendría mejor pronóstico.

Otro de los factores con valor pronóstico y predictivo en el que se ha estudiado su relación con el HIF-1 α ha sido Her2. La asociación entre ambas variables parece ser algo controvertida; nosotros no hemos encontrado relación entre ambas variables, al igual que en otros trabajos que lo han estudiado (Schindl y cols., 2002; Chen y cols., 2006; Generali y cols., 2006; Oliveira y cols., 2011). En algunas publicaciones se ha encontrado una relación positiva entre la expresión de Her2 y HIF-1 α (Bos y cols., 2001; Bos y cols., 2003; Kronblad y cols., 2006; Yamamoto y cols., 2012), habiéndose relacionado la mayor agresividad de Her2+ con su capacidad de activar a HIF-1 α , a través de la ruta PI3K, sugiriéndose que la interacción entre HIF-1 α y Her2 juega un papel importante en la progresión del cáncer de mama, independiente de los niveles de hipoxia (Zhong y cols., 2000; Laughner y cols., 2001; Giatromanolaki y cols., 2004). Con respecto a esto último, Bos y cols., 2003, señalaron que aunque había una relación positiva entre Her2 y HIF-1 α , encontraron un porcentaje más alto de tumores que sobreexpresaban HIF que tumores Her2 +, lo que sugería la existencia de otra vía, probablemente hipóxica, de activación de HIF-1 α . Por último, van der Groep y cols., 2008, observaron una relación negativa entre la expresión de HIF-1 α y Her2 en 30 tumores de mama hereditarios; el 96 % de los tumores que sobreexpresaban HIF-1 α eran Her2-.

Por último dentro de los marcadores conocidos, el tamaño tumoral, también se ha intentado relacionar con la expresión de HIF-1 α . En algunos trabajos la expresión de HIF-1 α se ha asociado de forma significativa con tumores de mayor tamaño (Kronblad y cols., 2006; Yamamoto y cols., 2008). Parece ser que las células cancerosas de los tumores de mayor tamaño están mejor adaptadas para sobrevivir al daño hipóxico, sobreexpresando proteínas citoprotectoras como el HIF-1 α (Wincewicz y cols., 2009). Nosotros no hemos encontrado relación significativa entre el tamaño del tumor al diagnóstico y la expresión de HIF-1 α , al igual que la mayoría de los que han estudiado la relación entre ambas variables (Chia y cols., 2001; Schindl y cols., 2002; Bos y cols., 2003; Giatromanolaki y cols., 2004; Gruber y cols., 2004; Vleugel y cols., 2005; Chen y cols., 2006; van der Groep y cols., 2008; Oliveira y cols., 2011).

A pesar de lo pocos trabajos publicados sobre el valor predictivo de HIF-1 α y los resultados contradictorios que hay al respecto, consideramos que nuestros resultados son coherentes, en base a varias premisas. Por un lado, el valor pronóstico negativo de HIF-1 α sí que está más establecido y como se ha dicho anteriormente, algunas variables cumplen la paradoja de factor pronóstico malo y a la vez valor predictivo de buena respuesta. Por otro lado, hemos encontrado relación con otras variables cuyo valor predictivo está más definido, como la negatividad de los receptores hormonales, positividad de Ki67, tumores más indiferenciados, que, además de predecir mayores tasas de R_{Pc}, están relacionadas todas ellas con un ambiente hipóxico, que favorece la estabilización de HIF-1 α (Figura 1).

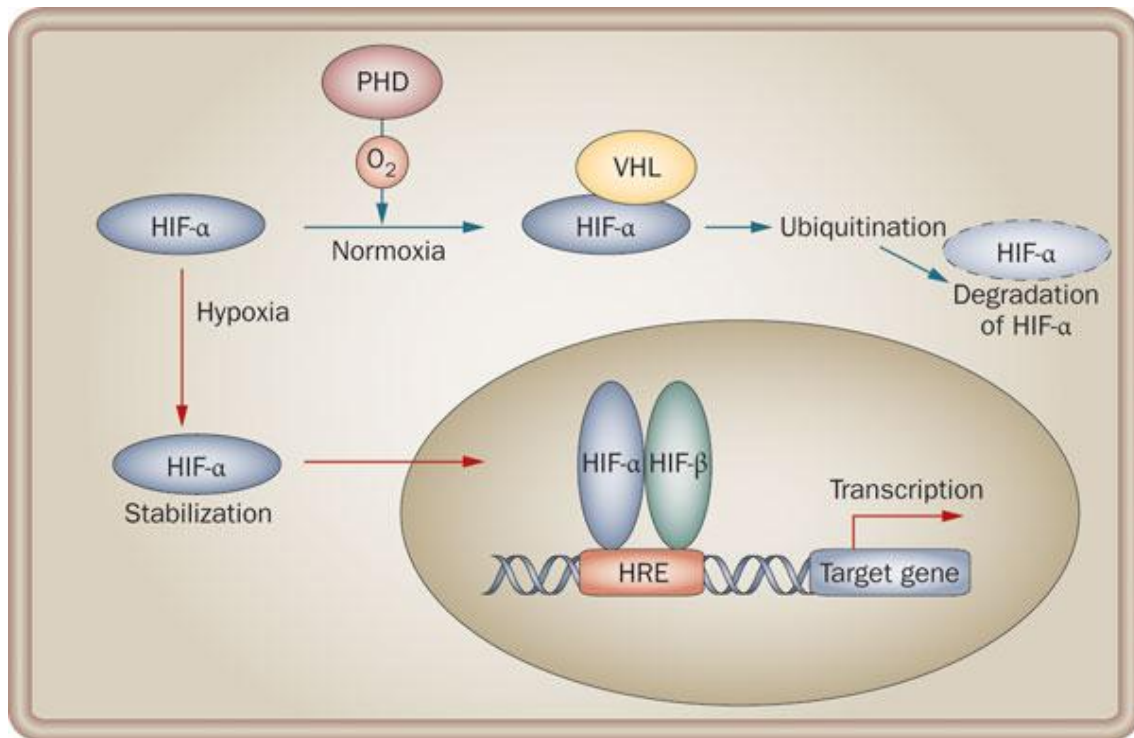


Figura 1. Regulación de HIF-1 α dependiente de las concentraciones intracelulares de oxígeno.

En nuestro trabajo, intentamos averiguar si la activación de HIF-1 α era independiente de las concentraciones tisulares de oxígeno, por lo que estudiamos las rutas moleculares que han sido relacionadas con esta situación (ver el apartado de la Introducción III.1.2.1.).

Uno de los receptores de membrana relacionado con la activación de HIF-1 α es el EGFR (ver el apartado de la Introducción III.1.2.1.). En el cáncer de mama el porcentaje de expresión de EGFR varía de unas series a otras, entre un 11,3 % y 91 % (Tsutsui y cols., 2002; Suo y cols., 2002; Witton y cols., 2003; DiGiovanna y cols., 2005; Gee y cols., 2005; Park y cols., 2007; Tzaida y cols., 2008; Gori y cols., 2009). Bos y cols., 2005 encontraron una relación significativa entre la expresión de EGFR y HIF-1 α , relacionando la activación de EGFR con la molécula TGF- α . No hay otros trabajos que hayan demostrado la asociación entre EGFR y HIF-1 α en el cáncer de mama, por lo que parece una línea interesante de investigación. Nosotros no encontramos sobreexpresión de EGFR en ninguna de las pacientes del estudio (siendo los controles externos positivos), por lo que consideramos que debe haber otros receptores tirosina-kinasa con capacidad de inducir la actividad transcripcional de HIF-1 α en condiciones de normoxia.

Una vez estimulado el receptor de membrana, son múltiples las vías de señalización intracelular que trabajan de forma paralela y/o a través de interconexiones entre ellas, que promueven la síntesis de HIF-1 α en condiciones de normoxia. Entre ellas destaca la vía PI3K/AKT/mTOR y la vía RAS/RAF/MAPK.

Con respecto a la primera vía, nosotros hemos encontrado pAKT sobreexpresado en un 60 % de los casos, lo que coincide con los resultados de otros trabajos publicados que han estudiado la expresión de pAKT por inmunohistoquímica en el cáncer de mama (Gort y cols., 2006; Gori y cols., 2009); no obstante, el porcentaje de sobreexpresión varía mucho de unos trabajos a otros, desde un 15 % (Andre y cols., 2008) a un 91 % (Generalì y cols., 2008), probablemente debido a los diferentes puntos de corte establecidos en las diferentes publicaciones.

Sólo hay un trabajo que haya estudiado la relación entre la expresión de HIF-1 α y pAKT por inmunohistoquímica en el cáncer de mama. Gort y cols., 2006, a través de la técnica TMA e inmunohistoquímica, estudiaron en 95 pacientes la sobreexpresión de estas dos proteínas, concluyendo que la baja expresión de pAKT se correlacionaba de forma significativa con la baja expresión de HIF-1 α . En nuestro trabajo no hemos encontrado relación entre ambas moléculas, si bien el punto de corte utilizado para el HIF-1 α coincide con el de la publicación mencionada, pero no así en el caso de pAKT, que utilizaron un método de valoración semicuantitativo a partir del porcentaje de células teñidas y la intensidad de tinción; nosotros utilizamos un punto de corte del 10 % de células teñidas, basándonos en artículos publicados anteriormente (Tokunaga y cols., 2006; Andre y cols., 2008; Gori y cols., 2009; Yu y cols., 2010).

El valor predictivo de pAKT a la quimioterapia estándar del cáncer de mama es poco conocido; sólo en un trabajo con 44 pacientes que recibieron un esquema de quimioterapia neoadyuvante basado en antraciclinas y taxanos más trastuzumab (todas las pacientes eran Her2+) se ha estudiado la relación de la expresión de pAKT y las tasas de RPc, sin encontrarse relación entre ambas variables (Yonemori y cols., 2008). Estos resultados coinciden con los que hemos encontrado en nuestro trabajo, donde tampoco hemos encontrado relación entre la sobreexpresión de pAKT y la respuesta al tratamiento primario.

La otra vía relacionada con la activación del HIF-1 α es la RAS/RAF/MAPK. En nuestro estudio hemos visto un porcentaje de sobreexpresión similar a la otra vía, detectando un 64,2 % de positividad para pMAPK. Estos resultados coinciden con los de otros estudios publicados anteriormente (Gee y cols., 2001; Kronblad y cols., 2005). Sin embargo, al igual que ocurría con la expresión de pAKT, el porcentaje de sobreexpresión de pMAPK, varía desde un 26,8 % (Song y cols., 2010) a un 90 % (Adeyinka y cols., 2002).

No hemos encontrado relación significativa entre la sobreexpresión de HIF-1 α y pMAPK. Son pocos los trabajos que hayan estudiado la relación entre ambas proteínas utilizando técnicas de inmunohistoquímica. Kronblad y cols., 2005., estudiaron con esta técnica la expresión de pMAPK y HIF-1 α en 21 muestras de carcinoma ductal de mama *in situ*, encontrando una relación positiva entre la expresión de ambas moléculas; los autores destacaron la sobreexpresión de pMAPK en zonas menos hipóxicas. En otro trabajo, utilizando otras técnicas diferentes a la inmunohistoquímica, los autores

sugirieron que HIF-1 α , al ser una proteína citosólica degradada rápidamente por el proteosoma, y las MAPKs al ser kinasas de actividad nuclear, no estarían implicadas en la estabilización de HIF-1 α en condiciones de hipoxia (Minet y cols., 2000). Por otro lado, también se ha señalado que la hipoxia tumoral, además de estabilizar a HIF-1 α , también podría favorecer la activación de la ruta MAPKs, que a su vez produciría la fosforilación de HIF-1 α , produciéndose así un efecto sinérgico de la respuesta mediada por la activación de HIF-1 α (Richard y cols., 1999; Generali y cols., 2009).

En nuestro trabajo, tampoco hemos encontrado relación entre la expresión de pMAPK y la respuesta al tratamiento quimioterápico neoadyuvante. Sánchez Rovira y cols., 2012, no encontraron relación entre la expresión de pERK y la tasa de RPc en 46 pacientes que recibieron quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclinas y taxanos, en un ensayo prospectivo fase II. Massida y cols., 2010 estudiaron el valor predictivo de varias moléculas en 53 pacientes con cáncer de mama, que recibieron quimioterapia neoadyuvante con antraciclinas, encontrándose una relación significativa entre la sobreexpresión de pERK1-2 y menor tasa de RPc. Generali y cols., 2009, demostraron que la sobreexpresión de pMAPK estaba relacionada con la resistencia al tratamiento hormonal en 114 pacientes con cáncer de mama localmente avanzado que recibieron letrozol durante seis meses como tratamiento neoadyuvante. Anteriormente ya se había demostrado que, aunque inicialmente el tratamiento hormonal con inhibidores de la aromatasas era capaz de frenar el crecimiento tumoral, después de un tiempo de exposición se producían resistencias al fármaco, que podrían estar relacionadas con la activación de la ruta MAPK (Gee y cols., 2001; Jelovac y cols., 2005).

A raíz de nuestros resultados, dada la ausencia de relación entre la sobreexpresión de HIF-1 α y las rutas moleculares estudiadas (vía AKT y MAPK), podríamos pensar que la activación o estabilización de HIF-1 α está más relacionada con un ambiente hipóxico de la célula tumoral, si bien también cabría la posibilidad de pensar en la existencia de alguna otra ruta diferente a AKT y MAPK, capaz de poner en marcha la actividad transcripcional de HIF-1 α .

Ya sea a través de estabilización en condiciones de hipoxia, o de activación, en normoxia, la transcripción de HIF-1 α da lugar a una gran variedad de genes relacionados con la proliferación y supervivencia de la célula tumoral (ver el apartado III.1.3. de la Introducción).

Uno de los genes relacionados con la actividad transcripcional de HIF-1 α y que hemos estudiado, es el VEGF-A o VEGF (ver el apartado de la Introducción III.1.3.1.). En nuestro trabajo encontramos que esta proteína se encontraba sobreexpresada en un 28,4 % de los casos, porcentaje más bajo que en la mayoría de los estudios publicados (Fuckar y cols., 2006; Bluff y cols., 2009; Wang y cols., 2010). El anticuerpo utilizado en nuestro estudio era de tipo monoclonal, a diferencia de la mayor parte de los trabajos publicados, los cuales han utilizado un anticuerpo policlonal. Esto podría explicar estas diferencias en la tasa de expresión de VEGF entre nuestro trabajo y las publicaciones al respecto, ya que los anticuerpos monoclonales se caracterizan por una mayor especificidad, respecto al policlonal (Granville y cols., 2005).

No hemos encontrado relación entre la expresión de HIF-1 α y VEGF-A. Son pocos los trabajos publicados que hayan estudiado la relación entre ambas proteínas, por técnicas de inmunohistoquímica, en el cáncer de mama. Recientemente, Wang y cols., 2011 estudiaron en 117 pacientes la expresión de HIF-1 α (27,4 %) y VEGF (82,9 %), encontrándose una relación positiva significativa entre ambas proteínas. En un estudio prospectivo de neoadyuvancia, comentado anteriormente, basado en antraciclinas con la adición o no de tamoxifeno, en 191 mujeres diagnosticadas de cáncer de mama localmente avanzado, los niveles basales de VEGF se correlacionaban significativamente y de forma positiva, con los niveles basales de HIF-1 α (Mele y cols., 2010). Bluff y cols., 2009, estudiaron la expresión de VEGF-A y HIF-1 α en 31 pacientes intervenidas de carcinoma ductal infiltrante. HIF-1 α fue considerado positivo en el 90 % de los tumores, encontrándose una correlación moderada con la expresión de VEGF, que era del 100 % (coeficiente de correlación de Spearman = 0,317, $p = 0,001$).

Aunque HIF-1 α es uno de los más potentes estimuladores de VEGF, se ha visto en diferentes estudios que algunos tumores de mama que no expresan HIF-1 α , sí sobreexpresan VEGF (Bluff y cols., 2009; Wang y cols., 2011). Cada vez hay mayor evidencia que indica que otras rutas moleculares, independientes de HIF-1 α pero en el contexto de la hipoxia tumoral, están relacionadas con el control de la angiogénesis en otro tipo de tumores, como el cáncer de colon (Mizukami y cols., 2004), y aunque no son muchos los trabajos publicados al respecto, parece ser que la ruta RAS/RAF/MAPK juega un papel importante en todo este proceso (Ryan y cols., 2000; Mizukami y cols., 2007). En trabajos *in vitro* de cultivos celulares de cáncer de mama se ha demostrado que VEGF puede inducir la proliferación a través de la vía MAPK (Liang y cols., 2006). *In vivo*, no hay ningún trabajo publicado que haya estudiado la relación entre la ruta MAPK y VEGF-A, siendo nuestro estudio el primero en demostrar una relación entre ambas proteínas, lo que podría ayudar a elucidar la ruta que sigue la unión de VEGF-A a su receptor, en el proceso del desarrollo de la angiogénesis. Por otro lado, también podemos decir, que es el primer estudio que investiga la relación entre HIF-1 α , VEGF-A y la ruta MAPK, y al no encontrar relación entre las dos primeras, se podría hipotetizar con una posible relación entre la transcripción de VEGF-A y la ruta MAPK, como parece ser que ocurre en otros tumores.

Se conoce poco sobre el valor predictivo de VEGF-A en el cáncer de mama. Yang y cols., 2008, presentaron los resultados de un estudio con 20 pacientes diagnosticadas de cáncer inflamatorio de mama localmente avanzado, que recibieron tratamiento neoadyuvante basado en bevacizumab más quimioterapia con antraciclinas y taxanos. Las pacientes que sobreexpresaban VEGF-A tenían mayores tasas de respuestas clínicas, aunque no se aportan datos de la RPC. En una actualización de datos de este estudio, publicada recientemente, con una mediana de seguimiento de 65,9 meses, no se encontró relación estadísticamente significativa entre la expresión al diagnóstico de VEGF-A, SLE y SG (Yang y cols., 2011).

En el estudio prospectivo de neoadyuvancia fase III, comentado anteriormente, los niveles basales de VEGF no se correlacionaron con la respuesta al tratamiento, ni en el brazo de epirubicina, ni en el de epirubicina más tamoxifeno; sin embargo, la sobreexpresión basal de VEGF se relacionó de forma significativa con un menor ILE ($p = 0,047$) [Mele y cols., 2010]. En otro estudio, fase II, también comentado anteriormente, 114 mujeres mayores de 70 años fueron aleatorizadas para recibir

tratamiento neoadyuvante con letrozol vs letrozol más ciclofosfamida oral metronómica. La expresión basal de VEGF-A no se relacionó con la respuesta al tratamiento en ninguno de los dos brazos (Bottini y cols., 2006).

En nuestro trabajo sí hemos encontrado una relación significativa entre la expresión de VEGF-A y la tasa de RPc. Las pacientes que alcanzaron una RPc tenían una media de sobreexpresión de VEGF-A de 10,9 frente a 3,4 en el resto de las pacientes ($p = 0,036$). Es decir, las pacientes con mayor sobreexpresión de VEGF-A en los tumores tenían más probabilidad de alcanzar una RPc. Este es el primer trabajo que ha demostrado la existencia de una relación significativa entre la expresión de VEGF-A y la respuesta al tratamiento neoadyuvante, basado en un régimen de quimioterapia considerado estándar en la actualidad. Además, como ya se ha comentado, aquellos tumores con un mayor grado de diferenciación, están relacionados con una mayor quimiosensibilidad y una mayor tasa de RPc. En nuestro trabajo encontramos una relación positiva estadísticamente significativa entre la sobreexpresión de VEGF y los tumores que expresaban un mayor grado de diferenciación. La asociación entre estas dos variables ya había sido descrita previamente en algunos trabajos (Al-Harris y cols., 2008; Safwat y cols., 2009).

La otra proteína relacionada con la actividad transcripcional de HIF-1 α que hemos investigado es la survivina (ver el apartado de la Introducción III.1.3.2.). De las 95 pacientes de nuestro estudio, se pudo evaluar la expresión de survivina en 89, habiéndose considerado como positivas un 68,4 %. Nuestros resultados coinciden con los descritos en la literatura, ya que utilizando la técnica de inmunohistoquímica, la media de sobreexpresión de todos los trabajos publicados es del 65,3 %, con un rango que oscila entre el 52,2 % y el 90 % (Jha y cols., 2012).

No hemos encontrado relación significativa entre la expresión de survivina y HIF-1 α , lo que nos hace pensar en la existencia de otras posibles vías alternativas de activación de esta proteína. Son pocos los trabajos publicados de cáncer de mama que hayan estudiado la relación entre ambas proteínas. Peng y cols., 2006 demostraron que la sobreexpresión de HIF-1 α estaba relacionada con mayores niveles de survivina en cultivo de líneas celulares de cáncer de mama. Otros estudios *in vitro* con células endoteliales han demostrado que las condiciones de hipoxia son capaces de inducir la expresión de survivina de forma tanto dependiente como independiente de la expresión de HIF-1 α (Conway y 2003). Hasta la fecha, no hay ningún trabajo publicado que haya estudiado la relación *in vivo* de HIF-1 α y survivina en el cáncer de mama. La relación entre ambas proteínas sólo ha sido estudiada, por inmunohistoquímica, en algunos tumores, como en el cáncer de colon. Fan y cols., 2008, demostraron una correlación positiva entre la sobreexpresión de HIF-1 α y survivina en 69 muestras de adenocarcinoma de colon. Otro trabajo publicado con una muestra de 44 pacientes diagnosticadas de cáncer de cérvix, no muestra relación significativa entre ambas proteínas, tras ser medida su expresión por técnicas de inmunohistoquímica; de hecho, un 30 % de los tumores que sobreexpresaban survivina, eran negativos para HIF-1 α (Bache y cols., 2007). El mismo equipo, un año más tarde, publicó un trabajo con 34 muestras de cáncer de cabeza y cuello, no encontrándose tampoco relación entre ambas moléculas (Kappler y cols., 2008).

En cuanto al valor predictivo de survivina, al igual que ocurre con su valor pronóstico, es bastante controvertido. En nuestro trabajo no hemos encontrado una relación significativa entre la survivina y la RPc, pero sí con el resto de asociaciones que hicimos de M&P (asociaciones 1, 2, 4 y 5). Según nuestros resultados, aquellas pacientes que eran consideradas positivas en la expresión de survivina, eran más resistentes al tratamiento, respondiendo peor a la quimioterapia neoadyuvante. En una publicación reciente, en un trabajo prospectivo donde 46 mujeres recibieron quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclinas y taxanos, no se encontró relación entre la expresión de survivina y la RPc (Sánchez Rovira y cols., 2012). Sin embargo, en otro trabajo publicado también recientemente, los resultados indicaron lo contrario con una muestra de tamaño pequeño. Petrarca y cols., 2011, estudiaron la expresión de survivina en 45 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama que recibieron un tratamiento neoadyuvante basado en antraciclinas y taxanos. La expresión de survivina se relacionó de forma significativa con las tasas de RPc; aquellas mujeres que tenían mayor expresión de survivina tenían más probabilidad de alcanzar la RPc.

Otro estudio, comentado anteriormente, que evaluó el valor predictivo de survivina fue el publicado por Massida y cols., 2010. Un total de 53 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama localmente avanzado (cT4), recibieron un régimen de quimioterapia neoadyuvante basado sólo en antraciclinas. No se encontró relación significativa entre la sobreexpresión de survivina y las tasas de RPc, ni tampoco con las tasas de respuestas clínicas. Sin embargo, en el análisis multivariante, tanto la sobreexpresión de survivina, como las tasas de RPc fueron factores pronósticos independientes, de menor supervivencia global en el caso de la survivina.

En un estudio japonés con 76 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama, que recibieron quimioterapia neoadyuvante con un esquema de antraciclinas y taxanos, se evaluó la sobreexpresión de survivina y su valor predictivo. La baja expresión de esta proteína se correlacionó con mayores tasas de RPc (Fuzhong y cols., 2008).

En un ensayo clínico fase II de neoadyuvancia en cáncer de mama, llevado a cabo por el GEICAM, 63 mujeres recibieron un tratamiento primario de quimioterapia con antraciclinas y taxanos. De las 63 pacientes del estudio, sólo se pudo estudiar la expresión de survivina por inmunohistoquímica en 44, no encontrándose relación entre las tasas de RPc y la sobreexpresión de survivina (Estevez y cols., 2009). En otro ensayo fase II de neoadyuvancia con antraciclinas y taxanos en 45 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama estadio III, se estudió el valor predictivo de survivina, observándose mayor resistencia al tratamiento en los tumores que sobreexpresaban survivina (Gritsko y cols., 2006).

A raíz de nuestros resultados y de la bibliografía publicada podemos decir que el valor predictivo de la survivina no está demostrado y los resultados de los que se dispone hasta ahora son controvertidos. Una de las causas podría ser el pequeño tamaño muestral con el que cuentan los diferentes trabajos. Otra hipótesis sería la existencia de distintos splicing de survivina (ver el apartado de la Introducción III.1.3.2.) que han demostrado tener diferentes valores pronósticos. Es posible que estos diferentes splicing también tengan distintos valores predictivos, aunque las técnicas de inmunohistoquímica son incapaces de distinguir las distintas variantes de survivina (Ryan y cols., 2005). Sólo hay un estudio publicado hasta la fecha que haya evaluado el

valor predictivo de las 5 variantes de esta proteína utilizando la técnica PCR a tiempo real, sin encontrarse relación significativa entre algunas de las variantes y la respuesta al tratamiento. Al analizar la razón de expresión entre las distintas variantes objetivaron que la razón de survivina 2- α era significativamente más alta en tumores resistentes al tratamiento, mientras que la razón de expresión de survivina Ex3 era más alta en los tumores quimiosensibles. De todas formas, las 60 pacientes del estudio no recibieron el mismo tratamiento neoadyuvante: 32 recibieron sólo antraciclinas y 28 antraciclinas y taxanos, lo que podría haber influido en los resultados de búsqueda de marcadores predictivos (Boidot y cols., 2009).

También hemos encontrado una relación positiva entre la expresión de survivina y pAKT, pero no con pMAPK lo que nos induce a pensar en la vía PI3/AKT, como una ruta de activación y/o transcripción de survivina en el cáncer de mama. Son pocos los estudios que hayan estudiado la relación entre estas dos moléculas. De hecho, con técnicas de inmunohistoquímica, no hay ningún trabajo publicado al respecto. Zhang y Jin, 2010, utilizando la técnica de Western blot, encontraron también una relación positiva entre la expresión de survivina y pAKT, en 86 pacientes intervenidas de cáncer de mama. Además, también se destaca la relación positiva entre Her2 y survivina, apuntando la vía PI3/AKT, como la ruta intermediaria entre ambas moléculas. Este estudio apoyaba los resultados de trabajos llevados a cabo en cultivos celulares de cáncer de mama, donde se señala que el mal pronóstico de las pacientes Her2+ podría estar justificado, al menos en parte, por su relación con la survivina (Asanuma y cols., 2005; Xia y cols., 2006). Nosotros no hemos encontrado relación entre la sobreexpresión de Her2 y survivina, por lo que consideramos que podrían existir otros receptores, relacionados o no con la familia Her, que estuvieran implicados en la activación de survivina a través de la vía PI3/AKT.

Curiosamente, en nuestro trabajo hemos encontrado una correlación negativa estadísticamente significativa entre la expresión de survivina y VEGF-A. Es decir, a medida que aumentan los niveles de survivina, disminuyen los de VEGF-A. Es conocida la relación de survivina con factores conocidos de mal pronóstico, como la negatividad de los receptores hormonales, alto grado histológico, valores altos del marcador Ki 67, etc (ver el apartado de la Introducción III.1.3.2.). No hay trabajos que hayan estudiado la relación de survivina y VEGF-A, mediante el uso de la inmunohistoquímica. Sin embargo, el estudio con mayor número de pacientes, un total de 420, intervenidas de cáncer de mama donde se analizó la relación de survivina con VEGF, utilizando la técnica ELISA, encontró una relación positiva estadísticamente significativa con la expresión de VEGF, relacionándose el efecto antiapoptótico de la survivina con la angiogénesis tumoral (Ryan y cols., 2006). Además, en nuestro trabajo la expresión de survivina se ha relacionado positivamente de forma significativa con los RE, cosa que contradice otros estudios (Span y cols., 2004; Youssef y cols., 2008). Sin embargo en el trabajo de Brennan y cols., 2008, donde la expresión de survivina por inmunohistoquímica se asoció con un mejor pronóstico, también se encontró una asociación positiva con los receptores hormonales. Hubiera sido interesante que en ese trabajo también se hubiera estudiado la expresión de VEGF para ver si coincidía con nuestros resultados.

A la espera de datos más maduros de nuestra serie que nos permitan evaluar el valor pronóstico de las distintas proteínas, podemos decir que en el caso de que la sobreexpresión de survivina se relacionara con un mejor pronóstico, como se ha demostrado en otros trabajos hechos con técnicas de inmunohistoquímica (Kennedy y cols., 2003; Brennan y cols., 2008) tendría sentido la relación positiva que hemos encontrado con los RE (buen pronóstico, pero tumores más quimiorresistentes) y la relación negativa con VEGF-A (mayor quimiosensibilidad, pero peor pronóstico).

Además de las relaciones mencionadas, hemos encontrado una asociación positiva estadísticamente significativa entre la expresión de survivina y pSTAT3. Hsieh y cols., 2005, también encontraron una relación significativa entre la expresión de ambas moléculas en un estudio con 136 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama. Nuestros resultados también coinciden con los publicados por Díaz y cols., 2006, donde 45 mujeres diagnosticadas de cáncer de mama recibieron un esquema de quimioterapia basado en antraciclinas y taxanos, en un ensayo phase II (Gritsko y cols., 2006). Al estudiar la sobreexpresión de survivina y de pSTAT3 encontraron una relación positiva entre ambas proteínas, y una mayor resistencia de ambas moléculas al tratamiento quimioterápico. Los autores sugieren que la fosforilación de STAT3 induce la expresión de survivina, y que ésta, al inhibir la apoptosis, produciría la resistencia al tratamiento quimioterápico. Estos resultados también coinciden con los nuestros; al estudiar el valor predictivo de pSTAT3 encontramos una relación significativa entre la sobreexpresión de pSTAT3 y la RPc. Es decir, aquellas pacientes que sobreexpresaban esta proteína tenían menos probabilidades de alcanzar la RPc, siendo más resistentes al tratamiento quimioterápico. No hay otros trabajos que hayan estudiado la relación de estas moléculas, por técnicas de inmunohistoquímica en cáncer de mama, ni tampoco otros trabajos que hayan estudiado el valor predictivo de STAT3 en estas pacientes. Curiosamente, hemos encontrado una relación positiva entre la sobreexpresión de pSTAT3 y el fenotipo luminal A, lo que podría estar asociado al fenómeno de quimiorresistencia. De todas formas, en base a estos resultados consideramos que el desarrollo de moléculas que inhiban la actividad de STAT3 podrían ayudar a mejorar la quimiosensibilidad de los tratamientos, en aquellas pacientes que sobreexpresen survivina en los tumores.

En nuestro estudio hemos visto cómo algunos genes relacionados con la actividad transcripcional de HIF-1 α , pueden ser activados a través de otras rutas moleculares, independientes de HIF-1 α , como la vía PI3K/AKT/mTOR, en el caso de la survivina y la vía Ras/Raf/MAPK en el caso de VEGF-A. En el primero, el uso de fármacos que inhibiesen esa vía podrían ayudar a favorecer la quimiosensibilidad con el fin de obtener mayores tasas de RPc.

En general, podemos decir que en nuestra serie la sobreexpresión de HIF-1 α se ha relacionado más con las condiciones de hipoxia que de normoxia, y que a su vez, su estabilización, ha demostrado tener valor predictivo de buena respuesta al tratamiento con antraciclinas y taxanos, siendo el primer trabajo en demostrar, de forma significativa, esta asociación, por técnicas de inmunohistoquímica.

Por otro lado, las dos grandes plataformas de expresión génica (Mammaprint y Oncotype) no han incluido este gen dentro de sus paneles de estudio. Además, también hay que tener en cuenta que los niveles de ARNm, utilizado en estas matrices de genes,

no siempre se correlacionan con los cambios en la expresión protéica. Es decir, la cantidad celular de proteínas depende no sólo de la cantidad y la frecuencia de la transcripción y traducción, sino también de la degradación protéica y de la velocidad de transporte fuera de la célula. Otro problema es que el tejido utilizado para obtener el ARNm puede incluir células tumorales y células normales, epiteliales y del estroma. Las técnicas de inmunohistoquímica, al utilizar anticuerpos para detectar proteínas en cortes tisulares, tiene la ventaja de permitir identificar el tipo celular que expresa la proteína y la localización celular específica de la misma.

Por todo ello, consideramos que sería interesante confirmar nuestros hallazgos mediante estudios prospectivos, teniendo en cuenta la necesidad que hay de encontrar marcadores predictivos de respuesta en el cáncer de mama. El conocimiento de estos marcadores podría ayudar a seleccionar pacientes subsidiarias de recibir tratamiento neoadyuvante con el objeto de someterse posteriormente a una cirugía más conservadora, y a la vez erradicar la enfermedad micrometastásica. Al mismo tiempo se podrían identificar pacientes que se beneficiarían de un tratamiento quirúrgico inicial, evitando el riesgo a un progreso de la enfermedad durante los meses de un tratamiento neoadyuvante, con pocas probabilidades de éxito.

Capacidad predictiva del modelo de regresión en base al modelo y variables utilizadas.

Aunque el modelo de regresión automática es el más utilizado en la práctica clínica, en nuestro trabajo hemos visto como el modelo manual mejora la capacidad predictiva de la prueba (Tabla 1).

	Modelo automático	Modelo manual
Índice de validez	85,33 %	89,87 %
Sensibilidad	75,00 %	70,59 %
Especificidad	88,14 %	95,16 %
Valor predictivo positivo	63,16 %	80,00 %
Valor predictivo negativo	92,86 %	92,19 %

Tabla 1. Capacidad predictiva de respuesta del modelo automático y manual de regresión utilizado en nuestro estudio.

Además de estos datos, que son los más utilizados, la identificación del mejor modelo de regresión logística se realiza mediante la comparación de modelos utilizando el cociente de verosimilitud, que en nuestro trabajo indicaba cuántas veces era más

probable que el modelo pronosticase una RPc en las pacientes con un grado 5 de M&P con respecto a las pacientes con grado 1-4. En nuestro modelo, este cociente era superior en el modelo manual (14,59 vs 6,32), por lo que consideramos que el modelo de regresión manual es de mayor utilidad que el automático.

Aunque en el modelo de regresión que hemos utilizado algunas variables no han demostrado tener valor predictivo significativo independiente, hemos visto como su inclusión en el modelo manual mejoraba la especificidad y el valor predictivo positivo de la prueba. Entre estas variables se encuentra el HIF-1 α y STAT3, ambas con valor predictivo significativo en el modelo univariante.

Si comparamos nuestro modelo predictivo de respuesta con otros publicados en la literatura, habría que distinguir entre los estudios hechos con las variables clínicas conocidas, y los modelos predictivos basados en las novedosas plataformas de expresión génica.

Se sabe que el RE sigue siendo el factor predictivo independiente de respuesta más importante, demostrado tanto en ensayos prospectivos como trabajos retrospectivo. Sin embargo, en las distintas publicaciones, solo hacen referencia a la OR, sin explicar las variables que han entrado dentro del modelo, ni los parámetro de S, E, VPP, ni VPN (Bear y cols., 2003). Lo mismo sucede con la variable fenotipo: aunque cada vez son más los estudios que lo incluyen para estudiar el valor predictivo, no se clarifica la potencia real del test al introducir esta variable en el modelo (Houber y cols., 2010).

La variable OR es un parámetro muy importante en cualquier modelo predictivo de respuesta, ya que en nuestro caso nos indicaba la probabilidad de alcanzar la RPc en función de que se expresara o no una variable determinada. Sin embargo, es imprescindible conocer otros parámetros del modelo para poder valorar su utilidad clínica.

Por un lado, es necesario conocer la validez interna de la prueba, es decir, la capacidad de pronosticar la probabilidad de tener una RPc, que viene dada por lo metodología del diseño y es representada por la S y la E. En nuestro modelo manual conseguimos una E del 95,16 %, lo que indicaba la alta probabilidad de que el modelo pronosticara una no RPc en aquellas pacientes que realmente no alcanzasen la RPc.

Por otro lado, también es muy importante conocer si el modelo es aplicable a otras poblaciones; esto es lo que se conoce como validez externa y está relacionada con el VPP y el VPN. En el modelo manual de nuestro estudio hemos obtenido un VPN del 92,19 %, que es la probabilidad de que las pacientes en las que se hubiera pronosticado que no alcanzaban la RPc, realmente no lo hicieran.

Los trabajos con modelos predictivos basados en perfiles de expresión génica son pocos explícitos a la hora de definir la capacidad predictiva. Como ya se ha comentado, las dos plataformas más utilizadas en la actualidad como factor pronóstico son

Mammaprint y Oncotype y su valor predictivo también ha sido estudiado en ambas firmas. Con respecto a la firma basada en 70 genes (Mammaprint), en la única publicación hasta la fecha que evaluaba el papel predictivo de la firma genética, tampoco se hace referencia a la potencia del test, S, E, VPP, ni VPN (Straver y cols., 2010) al igual que en trabajo publicado por Gianni y cols., 2005, en referencia a la plataforma Oncotype de 21 genes.

Un equipo del MDACC estudió el valor predictivo de una plataforma basada en 30 genes en pacientes tratadas con antraciclinas y taxanos. En un primer trabajo retrospectivo estudiaron el potencial predictivo de la plataforma genética frente a variables clínicas (edad, RE y grado) en 51 pacientes (Hess y cols., 2006) [Tabla 2].

	Variables clínicas	Plataforma genética
Índice de validez	78 %	76 %
Sensibilidad	61 %	92 %
Especificidad	84 %	71 %
Valor predictivo positivo	57 %	52 %
Valor predictivo negativo	86 %	96 %

Tabla 2. Capacidad predictiva de respuesta de variables clínicas conocidas frente a perfiles de expresión génica (Hess y cols., 2006).

A pesar de la alta sensibilidad de la firma genética de este trabajo (92 %), el VPP era bajo, lo que indicaba que bastantes pacientes a los que se les predecía una RPC, realmente no la alcanzaba. Comparado con nuestro modelo manual, podemos decir que nuestro test tenía una mayor potencia para predecir la tasa de RPC, probablemente debido a la inclusión en el mismo de variables clínicas clásicas junto con determinados genes.

El mismo grupo de trabajo, posteriormente realizó un estudio prospectivo en 109 pacientes que recibieron tratamiento neoadyuvante basado en antraciclinas y taxanos (Tabchy y cols., 2010). La validez del test arrojó los siguientes resultados: S y E del 63 %, VPP del 38 % y VPN del 88 %.

Sería interesante conocer, dados los resultados y la posible relevancia en la práctica clínica, la potencia del test de nuestro modelo en un estudio prospectivo. Además de la inclusión de las variables clásicas, puede que el incluir un grupo reducido de genes o incluso genes aislados ayudaría a obtener un test predictivo de respuesta de mayor rentabilidad clínica y terapéutica.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1.- La sobreexpresión de HIF-1 α es factor predictivo de buena respuesta y de RPc, en aquellas pacientes que hayan recibido un régimen de quimioterapia neoadyuvante, basado en antraciclinas y taxanos. Además, HIF-1 α se relaciona con otras variables cuyo valor predictivo está más establecido, como la negatividad de los receptores hormonales, menor diferenciación tumoral, mayor índice proliferativo y el fenotipo basal. A su vez, todas estas variables están asociadas a un microambiente tumoral más agresivo e hipóxico, por lo que consideramos que la estabilización de HIF-1 α está directamente relacionado con las condiciones tisulares de oxígeno.

2.- El proceso de activación y/o transcripción de VEGF-A está relacionado con la ruta molecular Ras/Raf/MAPK, en condiciones de hipoxia, de manera independiente a la estabilización o síntesis de HIF-1 α . La sobreexpresión de VEGF-A se relaciona con tumores más indiferenciados, además de mostrarse también como factor predictivo de buena respuesta y de RPc al tratamiento quimioterápico neoadyuvante.

3.- El proceso de activación y/o transcripción de Survivina está asociado a la ruta molecular PI3K/AKT, en condiciones de hipoxia, de manera independiente a la estabilización o síntesis de HIF-1 α . Aquellos tumores que sobreexpresan Survivina son más resistentes al tratamiento con antraciclinas y taxanos. Dada la asociación con la vía PIK/AKT, sería interesante estudiar la unión de fármacos que inhibieran esta vía, al tratamiento quimioterápico neoadyuvante, con el fin de mejorar la quimiosensibilidad. La sobreexpresión de survivina se relaciona con la positividad de los RE y con la sobreexpresión de STAT3; ésta, a su vez, con el fenotipo luminal A y con una mayor resistencia al tratamiento quimioterápico neoadyuvante.

4.- Para estudiar la biología molecular de estos tumores con técnicas de inmunohistoquímica, sería interesante establecer puntos de corte y métodos de valoración universales para las distintas proteínas, con el fin de poder comparar de manera más objetiva los resultados de los diferentes estudios.

ANEXO

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

INTRODUCCIÓN

FIGURAS

	Página
Figura 1. Mamografía.	53
Figura 2. Proceso de estudio del ganglio centinela.	54
Figura 3. A) Carcinoma ductal in situ; B) Carcinoma lobulillar in situ; C) Carcinoma ductal infiltrante; D) Carcinoma lobulillar infiltrante; E) Carcinoma mucinoso; F) carcinoma inflamatorio.	59
Figura 4. Secuencia de imágenes que ilustran la transformación oncogénica y esquema de los principales eventos que la acompañan, en el tejido mamario.	69
Figura 5. Dominios proteicos de HIF-1 α . Se representan los dominios de HIF-1 α , así como los aminoácidos fundamentales en la regulación dependiente de oxígeno de la proteína. Se muestran las interacciones con HIF-1 β , las zonas de unión al ADN, y los dominios implicados en la actividad transcripcional. bHLH: dominio básico hélice-lazo-hélice. PAS: dominio auxiliar de dimerización. TAD-N: dominio de transactivación amino terminal. TAD-C: dominio de transactivación carboxilo terminal. P402 y P564: Prolinas en posiciones 402 y 564. K532: Lisina en posición 532. N803: Asparraginasa en posición 803.	77
Figura 6. Unión de HIF-1 al núcleo celular.	78
Figura 7. Genes relacionados con la transcripción del HIF-1.	79
Figura 8. Regulación del HIF-1 α independiente de la concentración de oxígeno.	80
Figura 9. Vía de activación y señalización de MAPK.	83
Figura 10. Regulación del HIF-1 α dependiente de la concentración de oxígeno.	86
Figura 11. Unión de la familia VEGF a sus receptores.	90

TABLAS

Tabla 1. Funciones de la familia VEGF.	89
--	----

MATERIAL Y MÉTODOS

FIGURAS

Figura 1. Esquema del diseño experimental del estudio.	103
--	-----

Figura 2. Inmunotinción positiva nuclear intensa para un conducto tumoral (flecha roja). Nótese el control positivo definido por la inmunoexpresión focal de un conducto normal (flecha amarilla). Receptor de Estrógenos (clona SP1). 40x.	106
Figura 3. Inmunotinción positiva nuclear intensa para un conducto tumoral (flecha roja). Nótese el control positivo definido por la inmunoexpresión focal de un conducto normal (flecha amarilla). Receptor de Progesterona (clona Y85). 40x	106
Figura 4. Fotos de cultivos celulares utilizados como controles. 40x. A.- Ausencia de expresión protéica a nivel de membrana (HER2 0+). B.- Tinción incompleta y débil moderada de membrana citoplásmica (HER2 1+). C.- Tinción completa e intensa de membrana (HER2 3+).	108
Figuras 5 y 6. Selección de muestras histológicas en cristales de hematoxilina-eosina y en bloques parafinados.	110
Figura 7. Representación de todo el proceso de creación de una laminilla de TMA.	111
Figura 8. Arrayer manual (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA).	114
Figura 9. Preparación de un tissue microarray.	115
Figura 10. 8 tissues microarrays confeccionados.	116
Figura 11. Autostainer 480-2D, para la inmunotinción de las muestras.	118
Figura 12. Tissues microarrays cortados e inmunoteñidos.	120
Figura 13. Tissues microarrays teñidos con hematoxilina-eosina.	120
Figura 14. Microscopio óptico para el análisis inmunohistoquímico de los tissues.	121
Figura 15. Expresión nuclear de HIF-1 α en carcinoma endometroide de ovario. 40x.	122
Figura 16. Expresión de pAKT en adenocarcinoma de próstata. 40x. Tinción mixta (nuclear/citoplásmica) de leve/moderada intensidad en las células epiteliales de los acinos prostáticos neoplásicos.	123
Figura 17. Expresión de pMAPK predominantemente nuclear con débil citoplásmica en carcinoma endometroide de ovario. 40x.	124
Figura 18. Expresión intensa citoplásmica de VEGF-A en adenocarcinoma de pulmón. 40x.	125
Figura 19. Expresión de Survivina en un linfoma de Hodgkin. 40x.	126
Figura 20. Expresión nuclear moderada/fuerte de pSTAT3 en adenocarcinoma de pulmón. 40x.	127
Figura 21. Expresión intensa de membrana citoplásmica de EGFR en adenocarcinoma de pulmón. 40x.	128
Figura 22. Ausencia de tinción de membrana de EGFR en botones celulares con las líneas CAMA-1. 40x.	128

Figura 23. Tinción moderada de membrana citoplásmica de EGFR en botones celulares con las líneas HT-29. 40x.	129
--	-----

TABLAS

Tabla 1. Ejemplo de una de las plantillas para la identificación de los cilindros con su correspondiente número de biopsia. Las casillas en amarillo corresponden a los casos control.	113
Tabla 2. Ejemplo de disposición de los cilindros en un array con sus correspondientes códigos de identificación. Las casillas amarillas corresponden a los casos control. Las casillas verdes a los puntos de tejido sano, y las casillas blancas a los puntos de tejido tumoral.	113
Tabla 3. Anticuerpos empleados en nuestro estudio con sus condiciones de reacción y los puntos de corte utilizados, en cada uno de ellos para clasificar las muestras como positivas o negativas.	129

RESULTADOS

FIGURAS

Figura 1. Tinción nuclear moderada y en algunas zonas citoplasmática leve, > 5 % de HIF-1 α , en células tumorales. 20x. 40x.	152
Figura 2. Tinción nuclear y citoplasmática leve - moderada, \geq 10 % en células tumorales, de pAKT. 10x. 20x. 40x.	161
Figura 3. Tinción nuclear fuerte y citoplasmática leve-moderada, en células tumorales > 10 % de pMAPK. 10x. 20x. 40x.	169
Figura 4. Tinción citoplasmática y nuclear moderada-fuerte en células tumorales, de VEGF-A. 20x. 40x.	177
Figura 5. Tinción nuclear fuerte y citoplasmática leve de células tumorales, > 50 % de Survivina. 10x. 20x. 40x.	185
Figura 6. Tinción nuclear fuerte-moderada de pSTAT3 en células tumorales, > 0 intensidad. 20x. 40x.	193
Figura 7. Tinción de membrana negativa de EGFR. 20x.	201

TABLAS

Tabla 1. Características clínico-patológicas de las pacientes.	135
Tablas 2 y 3. Relación entre la edad y la respuesta al tratamiento.	137
Tablas 4 y 5. Relación entre el tamaño tumoral y la respuesta al tratamiento.	137

Tablas 6 y 7. Relación entre la afectación ganglionar y la respuesta al tratamiento.	138
Tablas 8 y 9. Relación entre el grado histológico y la respuesta al tratamiento.	139
Tablas 10 y 11. Relación entre el marcador Ki 67 (como variable cuantitativa) y la Respuesta al tratamiento.	140
Tablas 12 y 13. Relación entre el marcador Ki 67 ($pc \geq 10\%$) y la respuesta al tratamiento.	141
Tablas 14 y 15. Relación entre el marcador Ki 67 ($pc \geq 20\%$) y la respuesta al tratamiento.	142
Tablas 16 y 17. Relación entre los RE (como variable cuantitativa) y la respuesta al tratamiento.	143
Tablas 18 y 19. Relación entre los RE (contaje ≥ 3) y la respuesta al tratamiento.	144
Tablas 20 y 21. Relación entre los RE ($pc \geq 10\%$) y la respuesta al tratamiento.	145
Tablas 22 y 23. Relación entre los RP (como variable cuantitativa) y la respuesta al tratamiento.	146
Tablas 24 y 25. Relación entre los RP (contaje ≥ 3) y la respuesta al tratamiento.	147
Tablas 26 y 27. Relación entre los RP ($pc \geq 10\%$) y la respuesta al tratamiento.	148
Tablas 28 y 29. Relación entre Her2 y la respuesta al tratamiento.	149
Tablas 30 y 31. Relación entre el fenotipo tumoral (Perfil 1) y la respuesta al tratamiento.	150
Tablas 32 y 33. Relación entre el fenotipo tumoral (Perfil 2) y la respuesta al tratamiento.	151
Tablas 34 y 35. Relación entre la expresión de HIF-1 α y la respuesta al tratamiento.	153
Tabla 36. Relación entre HIF-1 α % y las variables cuantitativas del estudio.	154
Tablas 37 y 38. Relación entre HIF-1 α % y las variables cualitativas del estudio.	156
Tablas 39 y 40. Relación entre la variable HIF-1 α (+/-) y las variables cuantitativas del estudio.	158
Tablas 41 y 42. Relación entre la variable HIF-1 α (+/-) y las variables cualitativas del estudio.	159
Tabla 43. Relación entre HIF-1 α % y el resto de proteínas como variables cuantitativas.	159
Tablas 44 y 45. Relación entre HIF-1 α (+/-) y el resto de proteínas como variables cualitativas.	160
Tablas 46 y 47. Relación entre la expresión de pAKT y la respuesta al tratamiento.	162
Tabla 48. Relación entre pAKT % y las variables cuantitativas del estudio.	162
Tablas 49 y 50. Relación entre pAKT % y las variables cualitativas del estudio.	164

Tablas 51 y 52. Relación entre la variable pAKT (+/-) y las variables cuantitativas del estudio.	166
Tablas 53 y 54. Relación entre la variable pAKT (+/-) y las variables cualitativas del estudio.	167
Tabla 55. Relación entre pAKT % y el resto de proteínas como variables cuantitativas.	168
Tablas 56 y 57. Relación entre pAKT (+/-) y el resto de proteínas como variables cuantitativas.	169
Tablas 58 y 59. Relación entre la expresión de pMAPK y la respuesta al tratamiento.	170
Tabla 60 . Relación entre pMAPK % y las variables cuantitativas del estudio.	171
Tablas 61 y 62. Relación entre pMAPK % y las variables cualitativas del estudio.	173
Tablas 63 y 64. Relación entre la variable pMAPK (+/-) y las variables cuantitativas del estudio.	174
Tablas 65 y 66. Relación entre la variable pMAPK (+/-) y las variables cualitativas del estudio.	175
Tabla 67. Relación entre pMAPK % y el resto de proteínas como variables cuantitativas.	176
Tablas 68 y 69. Relación entre pMAPK (+/-) y el resto de proteínas como variables cualitativas.	177
Tablas 70 y71. Relación entre la expresión de VEGF-A y la respuesta al tratamiento.	178
Tabla 72 . Relación entre VEGF-A % y las variables cuantitativas del estudio.	179
Tablas 73 y74. Relación entre VEGF-A % y las variables cualitativas del estudio.	181
Tablas 75 y76. Relación entre la variable VEGF-A (+/-) y las variables cuantitativas del estudio.	182
Tablas 77 y 78. Relación entre la variable VEGF-A (+/-) y las variables cualitativas del estudio.	183
Tabla 79 . Relación entre VEGF-A % y el resto de proteínas como variables cuantitativas.	184
Tablas 80 y 81. Relación entre VEGF-A (+/-) y el resto de proteínas como variables cualitativas.	184
Tablas 82 y 83. Relación entre la expresión de Survivina y la respuesta al tratamiento.	186
Tabla 84 . Relación entre Survivina % y las variables cuantitativas del estudio.	187
Tablas 85 y 86. Relación entre Survivina % y las variables cualitativas del estudio.	189
Tablas 87 y 88. Relación entre la variable Survivina (+/-) y las variables cuantitativas del estudio.	190

Tablas 89 y 90. Relación entre la variable Survivina (+/-) y las variables cualitativas del estudio.	191
Tabla 91. Relación entre Survivina % y el resto de proteínas como variables cuantitativas.	192
Tablas 92 y 93. Relación entre Survivina (+/-) y el resto de proteínas como variables cualitativas.	192
Tablas 94 y 95. Relación entre la expresión de pSTAT3 y la respuesta al tratamiento.	194
Tabla 96. Relación entre pSTAT3 int y las variables cuantitativas del estudio.	195
Tablas 97 y 98. Relación entre pSTAT3 % y las variables cualitativas del estudio.	196
Tablas 99 y 100. Relación entre la variable pSTAT3 (+/-) y las variables cuantitativas del estudio.	198
Tablas 101 y 102. Relación entre la variable pSTAT3 (+/-) y las variables cualitativas del estudio.	199
Tabla 103. Relación entre pSTAT3 int y el resto de proteínas como variables cuantitativas.	199
Tablas 104 y 105. Relación entre pSTAT3 (+/-) y el resto de proteínas como variables cualitativas.	200
Tabla 106. Modelo de regresión automática, como factor predictivo de respuesta al tratamiento.	202
Tabla 107. Modelo de regresión manual, como factor predictivo de respuesta al tratamiento.	202

DISCUSIÓN

FIGURAS

Figura 1. Regulación de HIF-1 α dependiente de las concentraciones intracelulares de oxígeno.	220
--	-----

TABLAS

Tabla 1. Capacidad predictiva de respuesta del modelo automático y manual de regresión utilizado en nuestro estudio.	228
Tabla 2. Capacidad predictiva de respuesta de variables clínicas conocidas frente a perfiles de expresión génica (Hess y cols., 2006).	230

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografia

A

Abrial SC, Penault-Llorca F, Delva R. High prognostic significance of residual disease after neoadjuvant chemotherapy: a retrospective study in 710 patients with operable breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2005; 94: 255-63.

Acs G, Acs P, Beckwith SM. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer. *Cancer Res.* 2001; 61: 3561-5.

Adeyinka A, Nui Y, Cherlet T, Snell L, Watson PH, Murphy LC. Activated mitogen activated protein kinase expression during human breast tumorigenesis and breast cancer progression.

Adida C, Haioun C, Gaulard. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood.* 2000; 96: 1921-5.

Adida C, Recher C, Raffoux E, Daniel MT, Taksin AL, Rousselot P, Sigaux F, Degos L, Altieri DC, Dombret H. Expression and prognostic significance of survivin in de novo acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2000; 111: 196-203.

Aebersold DM, et al. Expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res.* 2001; 61 (7): 2911-2916.

Ahlin C, Aaltonen K, Amini RM, Nevanlinna H, Fjällskog and Blomqvist. Ki 67 and cyclin A as prognostic factors in early breast cancer. What are the optimal cut-off values. *Histopathology* 2007; 51: 491-498.

Akcakanat A, Sahin A, Shaye A N, Velasco MA, and Meric-Bernstam F. Comparison of Akt/mTOR signaling in primary breast tumors and matched distant metastases. *Cancer* 2008; 112 (11): 2352-2358.

Al-Bazz YO, Brown BL, Underwood JC, StEWART rl, Dobson PR. Immunanalysis of phospho-Akt in primary human breast cancer. *Int J Oncol.* 2009; 35: 1159-1167.

Al-Harris ES, Al-Janabi AA, Al-Toriahi KM, Yassen AA. Over expression of vascular endothelial growth factor in correlation to Ki-67, grade, and stage of breast cancer. *Saudi Med J.* 2008; 29: 1099-1104.

Al-Joidi F, Iskandar Z, Hasnan J, Rusli J, Kamal Y, Imran A, Ahmed M, Zakaria J. Expression of survivin and its clinicopathological correlations in invasive ductal carcinoma of the breast. *Singapore Med J.* 2007; 48 (7): 607-14.

Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth acts as survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* 1995; 1 (10): 1024-8.

Altamore DA, Testa JR. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene.* 2005; 24: 7455-7464.

Altieri DC. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. *Trends Mol Med.* 2001; 7: 542-7.

Altieri DC. Survivin and apoptosis control. *Adv Cancer Res.* 2003; 88: 31-52.

Altieri DC. Validating Survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3: 46-54.

Altieri DC, Marchisio PC. Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer. *Lab Invest.* 1999; 79: 1327-33.

Altintas S, Lambein K, Huizing MT, Braems G, Asjoe FT, Hellemans H, Van Marck EV, Weyler J, Praet M, Van den Broecke R, Vermorken JB and Tjalma WA.

Prognostic significance of oncogenic markers in ductal carcinoma in situ of the breast: a clinicopathologic study. *The Breast Journal*. 2009; 15 (2): 120-132.

Alvarado-Cabrero I, Alderete-Vázquez G, Quintal-Ramírez M, Patiño M, Ruíz E. Incidence of pathologic complete response in women treated with preoperative chemotherapy for locally advanced breast cancer: correlation of histology, hormone receptor status, Her2/Neu, and gross pathologic findings. *Annals of Diagnostic Pathology*. 2009; 13: 151-157.

Alvaro T, Noguera-Salva R, Fariñas F. Extracellular matrix: morphology, function and biotensegrity. *Ver Esp Patol*. 2009; 42 (4): 249-261.

Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*. 1997; 3: 917-21.

Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, Altieri DC. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J Biol Chem*. 1998; 273: 11177-11182. American College of Radiology. *Breast Imaging Reporting and Data System (BIRADS)*. Reston. 4^a Ed. En: American College of Radiology 2003.

Anderson E. The role of estrogens and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Research* 4: 197-201 (2002).

Andre F, Mazouni C, Liedtke C, et al. HER2 expression and efficacy of preoperative paclitaxel/FAC chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2008; 108: 183-90.

Andre F, Nahta R, Conforti R, Boulet T, Aziz M, Yuan L.X.H, Meslin F, Spielmann M, Tomasic G, Pusztai L, Hostobagyi G.N, Michiels S, Delaloge S, and Esteva F.J. Expression patterns and predictive value of phosphorylated AKT in early-stage breast cancer. *Annals of Oncology* 2008; 19: 315-320.

Annecke K, Schmitt M, Euler U, Zerm M, Paepke S, von Minckwitz G, Thomssen C, Harbeck N. uPA and PAI-1 in breast cancer: review of their clinical utility and current validation in the prospective NNBC-3 trial. *Adv Clin Chem*. 2008; 45: 31-45.

Aoki Y, Feldman GM, Tosato G. Inhibition of STAT3 signaling induces apoptosis and decreases surviving expression in primary effusion lymphoma. *Blood*. 2003; 101: 1535-1542.

Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem*. 2004; 279: 38458-38465.

Arany I, Chen SH, Megyesi J. Differentiation-dependent expression of signal transducers and activators of transcription (STATs) might modify responses to growth factors in the cancer of the head and neck. *Cancer Lett*. 2003; 199: 83-89.

Arcaro A, Guerreiro AS. The phosphoinositide 3-kinase pathway in human cancer: genetic alterations and therapeutic implications. 2007; 8: 271-306.

Archer CD, Parton M, Smith I. Early changes in apoptosis and proliferation following primary chemotherapy for breast cancer. *Br J Cancer*. 2003; 89: 1035-1041.

Arnold SF, Obourn JD, Jaffe H, Notides AC. Serine 167 is the major estradiol-induced phosphorylation site on the human estrogen receptor. *Molecular Endocrinology*. 1994; 8: 1208-1214.

Asakuma J, Sumitomo M, Asano T. Selective Akt inactivation and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitization of renal cancer cells by low concentrations of paclitaxel. *Cancer Res*. 2003; 63: 1365-1370.

Asanuma H, Torigoe T, Kamiguchi, et al. Survivin expression is regulated by coexpression of human epidermal growth factor receptor 2 and epidermal growth factor receptor via phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer cells. *Cancer Res*. 2005; 65: 11018-11025.

Augello C, Caruso L, Maggioni M, Donadon M, Montorsi M, Santambrogio R, Torzilli G, Vaira V, Pellegrini C, Roncalli M, Coggi G, Bosari. Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) expression and their prognostic significance in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*. 2009; 9: 125.

Ayala G, Thompson T, Yang G, Frolov A, Li R, Scardino P, Ohori M, Wheeler T, Harper W. High levels of phosphorylated form of Akt-1 in prostate cancer and non neoplastic prostate tissues are strong predictors of biochemical recurrence. *Clinical Cancer Research*. 2004; 10: 6572-6578.

Ayers M, Symmans WF, Stec J. Gene expression profiles predict complete pathologic response to neoadjuvant paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2004; 22: 2284-93.

B

Bache M, Holzapfel D, Kappler M, Holzhausen HJ, Taubert H, Dunst J, Hänsgen G. Survivin protein expression and hypoxia in advanced cervical carcinoma of patients treated by radiotherapy. *Gynecologic Oncology*. 2007; 104: 139-144.

Bachtiary B. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha indicates diminished response to radiotherapy and unfavorable prognosis in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer. *Clin Cancer Res*. 2003; 9 (6): 2234-2240.

Baker EA, Stephenson TJ, Reed MW. Expression of proteinases and inhibitors in human breast cancer progression and survival. *Mol Pathol*. 2002; 55: 300-304.

Banerjee S, Dowsett M, Ashworth A, Martin LA. Mechanism of disease: angiogenesis and management of breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol*. 2007; 4(9): 536-550.

Banks DP. Survivin does not inhibit caspase-3 activity. *Blood*. 2000. 96; 4002-03.

Barnes N, Haywood P, Flint P, Knox WF, Bundred NJ. Survivin expression in situ and invasive breast cancer relates to COX-2 expression and DCIS recurrence. *Br J Cancer*. 2006; 94 (2): 253-58.

Barrett RE, Cho YI, Weaver KE, Ryu K, Campbell RT, Dolecek TA, Warnecke RB. Neighborhood Change and Distant Metastasis at Diagnosis of Breast Cancer *Annals of Epidemiology*, Volume 18, Issue 1, January 2008; 43-47.

Barret-Lee PJ. Growth factor signalling in clinical breast cancer and its impact on response to conventional therapies: a review of chemotherapy. *Endocr Relat Cancer*. 2005; 12: 125-133.

Barros A, Cardoso MA, Sheng PY, Costa PA, Pelizon C. Radioguided localization of non-palpable breast lesions and simultaneous sentinel lymph node mapping. *Eur J Nucl Med*. 2002; 29: 1561-5.

Bates DO, Curry FE. Vascular endothelial growth factor increases microvascular via Ca (2+)-dependent pathway. *Am J Physiol* 1997; 273 (2 Pt 2): H687-94.

Bear HD, Anderson S, Smith RE. Sequential preoperative or postoperative docetaxel added to preoperative doxorubicin plus cyclophosphamide for operable breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol* 2006; 24: 2019-27.

Bear HD, Anderson S, Brown A. The effect on tumor response of adding sequential preoperative docetaxel to preoperative doxorubicin and cyclophosphamide: preliminary

results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol* 21: 4165-74, 2003.

Benekli M, Xia Z, Donohue KA, et al. Constitutive activity of signal transducer and activator of transcription 3 protein in acute myeloid leukemia blast is associated with short disease-free survival. *Blood*. 2002; 99: 252-257.

Benezra R, de Candia P, Li H, Romero E, Lyden D, Rafii S. A genetic approach to understanding tumor angiogenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2002; 67: 249-54.

Benson JR. Overview of the TNM system. *The Lancet Oncology*. Vol 4. January 2003.

Beppu K, Jaboine J, Merchant MS, Mackall CL, Thiele CJ. Effect of imatinib mesylate on neuroblastoma tumorigenesis and vascular endothelial growth factor expression. *J Natl Cancer Inst*. 2004; 96: 46-55.

Berclaz G, Altermatt HJ, Rohrbach V, Siragusa A, Dreher E, and Smith PD. EGFR dependent expression of Stat3 (but not STAT1) in breast cancer. *Int J Oncol*. 2001; 19: 1155-1160.

Bhaskar PT, Hay N. The two TORCs and Akt. *Dev Cell*. 2007; 12: 487-502.

Bhattacharya A, Toth K, Mazurchuk R, Spornyak JA, Slocum HK, Pendyala L. Lack of microvessels in well-differentiated regions of human head and neck squamous cell carcinoma A253 associated with functional magnetic resonance imaging detectable hypoxia, limited drug delivery, and resistance to irinotecan therapy. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8005-17.

Birner P, Gatterbauer B, Oberhuber G. Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in oligodendrogliomas: its impact on prognosis and on neoangiogenesis. *Cancer*. 2001; 92: 165-171.

Blagosklonny MV, An WG, Romanova LY, Trepel J, Fojo T, Neckers L. P53 inhibits hypoxia-inducible factor-stimulated transcription. *J Biol Chem*. 1998; 273: 11995-8.

Blancher C, Moore JW, Robertson N, Harris AL. Effects of ras and von Hippel-Lindau (VHL) gene mutations on hypoxia-inducible factor (HIF)-1 alpha, HIF-2alpha, and vascular endothelial growth factor expression and their regulation by the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling pathway. *Cancer Res*. 2001; 61: 7349-55.

Blanco-Aparicio C, Renner O, Leal JFM, Carnero A. PTEN, more than the AKT pathway. *Carcinogenesis*. 2007; 28: 1379-1386.

Bluff JE, Menakuru SR, Cross SS, Higham SE, Balasubramanian SP, Brown NJ, Reed MW, Staton CA. Angiogenesis is associated with the onset of hyperplasia in human ductal breast disease. *British Journal of Cancer*. 2009; 101: 666-672.

Boidot R, Vegran F, Lizard-Nacol S. Predictive value of surviving alternative transcript expression in locally advanced breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *International Journal of Molecular Medicine*. 2009; 23: 285-291.

Bonadonna G, Valagussa P, Brambilla C, Ferrari L, Moliterni A, Terenziani M, Zambetti M. Primary chemotherapy in operable breast cancer: eight year experience at the Milan Cancer Institute. *J Clin Oncol*. 1998; 16: 93-100.

Bonadonna G, Veronesi U, Brambilla C, et al: Primary chemotherapy to avoid mastectomy in tumors with diameters of three centimeters or more. *J Natl Cancer Inst* 82: 1539-45, 1990.

Bong JG, Choi JW, Ha YG, Lee YS, Park JH, Jeong MH, Lee HO, Oh HG. Prognostic significance of peritumoral vascular invasion in patients with invasive breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Volume 59, Supplement 2, October 2005, Page S396.

Borgstrom P, Gold DP, Hillan KJ, et al. Importance of VEGF for breast cancer angiogenesis in vivo: Implications from intravital microscopy of combination treatments with an anti-VEGF neutralizing monoclonal antibody and doxorubicin. *Anticancer Res.* 1999; 19: 4203-4214.

Bos R, van der Groep P, Greijer AE. Levels of hypoxia-inducible factor-1alpha independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer.* 2003; 97: 1573-1581.

Bos R, van Diest P, van der Groep P. Expresión of hypoxia-inducible factor-1alpha and cell cycle proteins in invasive breast cancer are estrogen receptor related. *Breast Cancer Res.* 2004; 6(4): R450-R459.

Bos R, Zhong H, Hanrahan CF. Levels of hypoxia-inducible factor-1 alfa during breast carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93(4): 309-314.

Bosari S, Lee AK, DeLellis RA, Wiley BD, Heatley GJ, Siverman ML. Microvessel quantitation and prognosis in invasive ductal carcinoma. *Hum Pathol.* 1992; 23: 755-61.

Botha JL, Bray F, Sankila R, Parkin DM. Breast cancer incidence and mortality trends in 16 European countries. *Eur J Cancer* 2003; 39 (12): 1718-29.

Bottini A, Generali D, Brizzi MP, Fox SB, Bersiga A, Bonardi S, Allevi G, Aguggini S, Bodini G, Milani M, Dionisio R, Bernardi C, Montruccoli A, Bruzzi P, Harris AL, Dogliotti L, Berruti A. Randomized phase II trial of letrozole and letrozol plus low-dose metronomic oral cyclophosphamide as primary systemic treatment in elderly breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 2006; 24 (22): 3623-3628.

Boucher Y, Leunig M, Jain RK. Tumor angiogenesis and interstitial hypertension. *Cancer Res.* 1996; 56: 4264-4266.

Bowman T, García R, Turkson J. STATs in oncogenesis. *Oncogene.* 2000; 19: 2474-2488.

Boyd NF, Rommens JM, Vogt K, Lee V, Hopper JL, Yaffe MJ et al. Mammographic breast density as an intermediate phenotype for breast cancer. *Lancet Oncol* 2005; 6 (10): 798-808.

Bozzetti C, Musolino A, Camisa R. Evaluation of HER2/Neu amplification and other biological markers as predictors of response to neoadjuvant chemotherapy in primary breast cancer. *Am J Clin Oncol.* 2006; 29: 171-7.

Bratslavsky G, Sudarshan S, Neckers L. Pseudohypoxic pathways in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 4667-71.

Brazil DP, Yang Z, Hemmings BA. Advances in protein kinase B signalling: AKT on multiple fronts. *Trends Biochem Sci.* 2004; 29: 233-42.

Brennan DJ, Rexhepaj E, O'Brien SL, McSherry E, O'Connor DP, Fagan A. Altered cytoplasmic-to-nuclear ratio of survivin is a prognostic indicator in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 2681-9.

Brenton JD, Carey LA, Ahmed A. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application ? *J Clin Oncol* 2005 Oct 10; 23 (29): 7350-60.

Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Bean JM, Pronitz LR. Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res* 1996; 56: 941-3.

Brizel DM, Sibley GS, Prosnitz LR, Scher RL, Dwhirst MW. Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; 38: 285-9.

Brognaard J, Clark AS, Ni Y. Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res.* 2001; 61: 3986-3997.

Bromberg J. Signal transducer and activators of transcription as regulators of growth, apoptosis and breast development. *Breast Cancer Res.* 2002; 2: 86-90.

Bromberg J. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest.* 2002; 109: 1139-42.

Bromberg J, Darnell JE. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene.* 2000; 19: 2468-73.

Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G. Stat3 as an oncogene. *Cell.* 1999; 98: 295-303.

Brown JM, Giaccia AJ. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res.* 1998; 58: 1408-1416.

Brugarolas J. Renal-cell carcinoma-molecular pathways and therapies. *N Engl J Med.* 2007; 356: 185-7.

Bruick RK, McKnight SL. Transcription. Oxygen sensing gets a second wind. *Science* 2002; 295: 807-8.

Brunett A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greengard ME. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999; 96: 857-868.

Brunet A, Roux D, Lenormand P, Dowd S, Keyse S, Pouyssegur J. Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *EMBO J.* 1999; 18: 664-74.

Büchler P, Reber HA, Büchler M, Shrinkante S, Büchler MW, Friess H. Hypoxia-inducible factor 1 regulates vascular endothelial growth factor expression in human pancreatic cancer. *Pancreas.* 2003; 26: 56-64.

Buettner R, Mora LB, Jove R. Activated STAT signalling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res.* 2002; 8: 945-54.

Bunone G, Briand PA, Miksicek R, Picard D. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J.* 1996; 15: 2174-2183.

Burcombe RJ, Makris A, Richman PI, Daley FM, Noble S, Pittam M, Wright D, Allen SA, Dove J and Wilson GD. Evaluation of ER, PgR, HER-2 and Ki 67 as predictors of response to neoadjuvant anthracycline chemotherapy for operable breast cancer. *British Journal of Cancer.* 2005; 92: 147-155.

Burke WM, Jin X, Lin HJ, Huang M, Liu R, Reynolds RK, Lin J. Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses growth of human ovarian and breast cancer cells. *Oncogene.* 2001; 20: 7925-7934.

Burkhardt DL, Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8 (9): 671-82.

Buzdar AU, Ibrahim NK, Francis D. Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomised trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. *J Clin Oncol* 23: 3676-85, 2005.

C

Calza S, Hall P, Auer G, Bjöhle J, Klaar S, Kronenwett U, Liu ET, Miller L, Ploner A, Smeds J, Bergh J, Pawitan Y. Intrinsic molecular signature of breast cancer in a population-based cohort of 412 patients. *Breast Cancer Res.* 2006; 8: R34.

Callagy G, Dimitriadis E, Harmey J, Bouchier-Hayes D, Leader M and Kay E. Immunohistochemical measurement of tumor vascular endothelial growth factor in breast cancer. A more reliable predictor of tumor stage than microvessel density or serum vascular endothelial growth factor. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2000; 8: 104-109.

Callapina M, Zhou J, Schnitzer S, Metzen E, Lohr C, Deitmer JW. Nitric oxide reverses desferriaxamine- and hypoxia-evoked HIF-1 α accumulation implications for prolyl hydroxylase activity and iron. *Exp Cell Res* 2005; 306: 274-84.

Camp RL, Rimm EB, Rimm DL. Met expression is associated with poor outcome in patients with axillary lymph node negative breast carcinoma. *Cancer*. 1999; 86: 2259-2265.

Campbell CL, Jiang Z, Savarese DM, and Savarese TM. Increased expression of the interleukin-11 receptor and evidence of Stat3 activation in prostate carcinoma. *Am J Pathol*. 2001; 158: 25-32.

Campbell RA, Bhat-Nakshatri P, Patel NM, Constantinides D, Ali S, Nakshatri H. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor α : a new model for anti-estrogen resistance. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276: 9817-9824.

Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*. 1998; 282: 1318-1321.

Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, Ollila DW, Sartor GI, Graham ML, Peou CM. The triple negative paradox: primary tumour chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res*. 2007; 13: 2329-2334.

Carlomagno C, Perrone F, Gallo C. C-erb B2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases. *J Clin Oncol*. 1996; 14: 2702-2708.

Carmeliet P, Collen D. Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 1999; 237: 133-158.

Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*. 1998; 394: 485-490.

Carter BZ, Millela M, Altieri DC, Andreeff M. Cytokine-regulated expression of survivin in myeloid leukemia. *Blood*. 2001; 97: 2784-90.

Carter BZ, Wang RY, Schober WD. Targeting survivin expression induces cell proliferation defect and subsequent cell death involving mitochondrial pathway in myeloid leukemic cells. *Cell Cycle*. 2003; 2: 488-93.

Cascinu S, Staccioli MP, Gasparini G. Expression of vascular endothelial growth factor can predict event-free survival in stage II colon cancer. *Clin Cancer Res*. 2000; 6: 2803-2807.

Celen O, Kahraman I, Yildirim E, Berberoglu U. Correlation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and CEA with clinicopathological variables in colorectal cancer patients. *Neoplasma*. 2004; 51: 293-299.

Chadweik DR, Shorthouse AJ. Wire-directed localization biopsy of the breast: an audit of results and analysis of factors influencing therapeutic value in the treatment of the breast cancer. *Eur J Surg Oncol*. 1997; 23 (2): 128-33.

Chalhoub N, Barker SJ. PTEN and the PI3-Kinase pathway in Cancer. *Annu Rev Pathol.* 2009; 4: 127-150.

Chan DA, Sutphin PD, Denko NC, Giaccia AJ. Role of prolyl hydroxylation in oncogenically stabilized hypoxia-inducible factor-1 alpha. *J Biol Chem.* 2002; 277: 40112-7.

Chan DA, Sutphin PD, Yen SE, Giaccia AJ. Coordinate regulation of the oxygen dependent degradation domains of hypoxia-inducible factor 1 (alpha). *Mol Cell Biol* 2005; 25: 6415-26.

Chan S, Scheulen ME, Johnston S. Phase II study of temsirolimus (CCI-779), a novel inhibitor of mTOR, in heavily pretreated patients with locally advanced or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 5347-5356.

Chan TO, Rittenhouse SE, Tsichlis PN. AKT/PKB and other D3 phosphoinositide regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu Rev Biochem.* 1999; 68: 965-1014.

Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM & Schumacker PT. Reactive Oxygen Species generated at mitochondrial Complex III stabilize Hypoxia-inducible Factor-1 α during hypoxia. *The Journal of Biological Chemistry.* 275(33):25130-28130 (2000).

Chang JC, Hilsenbeck SG. Diseases of the breast. In: Harris JR, Lippmann ME, Morrow M. 3^a ed. Philadelphia: LWW, 2004; 675-697.

Chang JC, Makris A, Gutierrez MC, Hilsenbeck SG, Hackett JR, Jeong J, Liu ML, Baker J, Clark-Langone K, Baehner FL, Sexton K, Mohsin S, Gray T, Alvarez L, Chamness GC, Kent Osborne C, Shak S. Gene expression patterns in formalin-fixed, paraffin-embedded core biopsies predict docetaxel chemosensitivity in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2008; 108: 233-240.

Chang JC, Wooten EC, Tsmelzon A. Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer. *Lancet.* 2003; 362: 362-9.

Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO. Ki 67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009; 101: 736-750.

Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, Perou CM, Nielsen TO: Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 1368-1376.

Chen D, Washbrook E, Sarwar N, Bates GJ, Pace PE, Thirunuvakkarasu V, Taylor J, Epstein RJ, Fuller-Pace FV, Egly JM, Coombes RC, Ali S. Phosphorylation of human estrogen receptor alpha at serine 118 by two distinct signal transduction pathways revealed by phosphorylation-specific antisera. *Oncogene.* 2002; 21 (32): 4921-31.

Chen HH, Su WC, Lin PW. Hypoxia-inducible factor-1alpha correlates with MET and metastasis in node-negative breast cancer. (2007). *Breast Cancer Res Treat;* 103 (2): 167-75.

Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J Clin Oncol* 2007 Apr 10; 25 (11): 1329-33.

Chia SK, Wykoff CC, Watson PH, Han C, Leek RD, Pastorek J, Gatter KC, Ratcliffe P, Harris AL. Prognostic significance of a novel hypoxia-regulated marker, carbonic anhydrase IX, in invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol.* 2001; 19: 3660-3668.

Chin L, Gray JW. Translating insights from the cancer genome into clinical practice. *Nature*. 2008; 452 (7187): 553-563.

Chin YR, Toker A. Function of Akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer.

Chiou SK, Jones MK, Tarnawski AS. Survivin-an anti-apoptosis protein: Its biological roles and implications for cancer and beyond. *Med Sci Monit*. 2003; 9: 143-147.

Choi WW, Lewis MM, Lawson D. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinical pathologic parameters and VEGF-family gene expression. *Mod Pathol*. 2005; 18: 143-152.

Cholet P, Amat S, Cure H, de Latour M, Le Boudec G, Mouret-Reynier MA, Ferriere JP, Achard JL, Dauplat J, Penault-Llorca F. Prognostic significance of a complete pathological response after induction chemotherapy in operable breast cancer. *Br J Cancer*. 2002; 86: 1041-1046.

Choueiri TK, Vaziri SA, Jaeger E. Von Hippel-Lindau gene status and response to vascular endothelial growth factor targeted therapy for metastatic clear cell renal carcinoma. *J Urol*. 2008; 180: 860-5.

Chu JS, Shew JY, Huang CS. Immunohistochemical analysis of survivin expression in primary breast cancers. *J Formos Med Assoc*. 2004; 103 (12): 925-31.

Clark AS, West K, Streicher S and Dennis PA. Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells. *Mol cancer Ther*. 2002; 1: 707-717.

Clark DE, Poteet-Smith CE, Smith JA, Lannigan DA. Rsk2 allosterically activates estrogen receptor alpha by docking to the hormone-binding domain. *EMBO Journal*. 2001; 20: 3484-3494.

Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med*. 1990; 172 (6): 1535-45.

Clevenger CV. Roles and regulation of stat family transcription factors in human breast cancer. *Am J Pathol*. 2004; 165: 1449-1460.

Cockman ME. Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem*. 2000; 275 (33): 25733-25741.

Cocquyt VF, Blondeel PN, Depypere HT, Praet MM, Schelfhout VR, Silva OE. Different responses to preoperative chemotherapy for invasive lobular and invasive ductal breast carcinoma. *European Journal of Surgical Oncology*. 2003; 29: 361-7.

Cody HS, Hill ADK, Tran NK. Credentiaing for breast lymphatic mapping: hoe many cases are enough? *Ann Surg*. 1999; 229: 723-8.

Colditz GA, Baer HJ, Tamini RM. Breast Cancer. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF, editors. *Cancer Epidemiology and Prevention*. 3^o ed. New York: Oxford University Press 2006; 995-1013.

Colleoni M, Bagnardi V, Rotmensz N. Increasing steroid hormone receptors expression defines breast cancer subtypes non responsive to preoperative chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2009; 116: 359-369.

Colleoni M, Orvieto E, Nole F, Orlando L, Minchella I, Viale J. Prediction of response to primary chemotherapy for operable breast cancer. *European Journal of Cancer*. 1999; 35: 574-9.

Colleoni M, Viale G, Zahrieh D. Chemotherapy is more effective in patients with breast cancer not expressing steroid hormone receptors: a study of preoperative treatment. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 6622-6628.

Colleoni M, Viale G, Zahrieh D. Expression of ER, PgR, HER1, HER2 and response: a study of preoperative chemotherapy. *Ann Oncol.* 2008; 19: 465-472.

Colpaert CG, Vermeulen PB, Fox SB, Harris AL, Dirix LY, Van Marck EA. The presence of a fibrotic focus in invasive breast carcinoma correlates with the expression of carbonic anhydrase IX and is a marker of hypoxia and poor prognosis. *Breast Cancer Res Treat.* 2003; 81: 137-47.

Conway EM, Zwerts F, Van Eygen V, De Vriese A, Nagai N, Luo W. Survivin dependent angiogenesis in ischemic brain: molecular mechanisms of hypoxia-induced up-regulation. *Am J Pathol.* 2003; 163 (3): 935-46.

Costa C, Soares R, Reis-Filho JS, Leitao D, Amendoeira I and Schmitt FC. Cyclooxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *J Clin Pathol.* 2002; 55: 429-434.

Couturier J, Vincent-Salomon A, Mathieu MC, Valent A, Bernheim A. Diagnosis of HER2 gene amplification in breast carcinoma. *Pathol Biol.* 2008; 56 (6): 375-379.

Coutts AS, Murphy LC. Elevated mitogen-activated protein kinase activity in estrogen nonresponsive human breast cancer cells. *Cancer Res.* 1998; 58 (18): 4071-4.

Cox CE, Bass SS, McCann CR. Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in patients with breast cancer. *Ann Rev Med.* 2000; 51: 525-42.

Creighton CJ, Hilger AM, Murthy S, Rae JM, Chinnaiyan AM, El-Ashry D. Activation of mitogen-activated protein kinase in estrogen receptor alpha-positive breast cancer cells in vitro induces an in vivo molecular phenotype of estrogen receptor alpha-negative human breast tumors. *Cancer Res.* 2006; 66: 3903-3911.

Cristofanilli M, Gonzalez-Angulo A, Sneige N. Invasive lobular carcinoma classic type: response to primary chemotherapy and survival outcomes. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 41-48.

Cross DA, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature.* 1995; 378: 785-789.

Cuadros M and Villegas R. Systematic review of HER2 breast cancer testing. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2009; 17 (1): 1-7.

Currie MJ, Hanrahan V, Gunningham SP, Morrin HR, Frampton C, Han C, Robinson BA, Fox SB. Expression of vascular endothelial growth factor D is associated with hypoxia inducible factor (HIF-1alpha) and the HIF-1 alpha target gene DEC1, but not lymph node metastasis in primary human breast carcinomas. *J Clin Pathol.* 2004; 57: 829-834.

D

Dachs GU, Patterson AV, Firth JD, Ratcliffe PJ, Townsend KM, Stratford IJ, Harris AL. Targeting gene expression to hypoxic tumor cells. *Nat Med.* 1997; 3: 515-20.

Daidone MG, Veneroni S, Benini E, Tomasic G, Coradini D, Mastore M. Biological markers as indicators of response to primary and adjuvant chemotherapy in breast cancer. *International Journal of Cancer.* 1999; 84: 580-6.

Dales JP, García S, Meunier-Carpentier S, Andrac-Meyer L, Haddad O, Lavaut MN, Allasia C, Bonnier P, Charpin C. Overexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha

predicts early relapse in breast cancer: retrospective study in a series of 745 patients. *Int J Cancer*. 2005; 116: 734-739.

Darb-Esfahani S, Loibl S, Müller BM, Kroller M, Denkert C, Komor M, Schlüns, Blohmer JU, Budczies J, Gerber B, Noske A, du Bois A, Weichert W, Jackisch C, Dietel M, Richter K, Kaufmann, von Minckwitz. Identification of biology-based breast cancer types with distinct predictive and prognostic features: role of steroid hormone and HER2 receptor expression in patient treated with neoadjuvant anthracycline/taxane-based chemotherapy. *Breast Cancer Res*. 2009; 11: R69.

Darnell JE. STATs and gene regulation. *Science*. 2000; 277: 1630-5.

Darnell JE. Transcription factors as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2: 740-9.

Darnell JE, Kerr IM, and Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signalling proteins. *Science (Wash. DC)*: 1994; 264: 1415-1421.

Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev*. 1999; 13: 2905-27.

De Azambuja E, Cardoso F, de Castro G Jr, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart-Gebhart MJ, Paesmans M. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12155 patients. *Br J Cancer*. 2007; 96: 1504-1513.

De Cicco C, Trifiró G, Intra M, Marotta G, Ciprian A, Frasson A, et al. Optimised nuclear medicine method for tumour marking and sentinel node detection in occult primary breast lesions. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2004; 31: 349-54.

De Paola F, Granato AM, Scarpi E, et al. Vascular endothelial growth factor and prognosis in patients with node-negative breast cancer. *Int J Cancer*. 2002; 98: 228-233.

De Soto JA, Deng CX. PARP-1 inhibitors: are they the long-sought genetically specific drugs for BRCA1/2 associated breast cancers? *In J Med Sci* 2006; 3: 117-123.

De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer. Principles & Practice of Oncology*. 7th Edition. Lippincott Williams & Wilkins Publisher (2005).

Del Peso L, González-García M, Page C, Herrera R, Nuñez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science*. 1997; 278: 687-689.

Desmedt C, Haibe-Kains B, Wirapati P, Buyse M, Piccart M, Sotiriou C. Biological processes associated with breast cancer clinical outcome depend on the molecular subtypes. *Clin Cancer Res*. 2008; 14: 5158-5165.

Deveraux QL and Reed JC. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev*. 1999; 13: 239-52.

Dhir R, Ni Z, Lou W. Stat3 activation in prostatic carcinomas. *Prostate*. 2002; 51: 241-246.

Di Cristofano A, Pandolfi PP. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell*. 2000; 100: 387-90.

Dias S, Hattori K, Heissig B. Inhibition of both paracrine and autocrine VEGF/VEGFR-2 signalling pathways is essential to induce long-term remission of xenotransplanted human leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 10857-10862.

Diaz N, Minton S, Cox C, Bowman T, Gritsko T, García R, Eweis I, Wloch M, Livingston S, Seijo E, Cantor A, Lee JH, Beam CA, Sullivan D, Jove R, Muro-Cacho CA. Activation of Stat 3 in primary tumors from high-risk breast cancer patients is associated with elevated levels of activated Src and surviving expression. *Clin Cancer Res*. 2006; 12 (1).

Dien J, Amin HM, Chiu N. Signal transducers and activators of transcription-3 up regulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression and decreases invasiveness of breast cancer. *Am J Pathol.* 2002; 169: 633-642.

DiGiovanna MP, Stern DF, Edgerton SM, Whalen SG, Moore D II, Thor ADL. Relationship of epidermal growth factor receptor expression to ErbB-2 signaling activity and prognosis in breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 1152-1160.

Dikov MM, Ohm JE, Ray N, Tchekneva EE, Burlison J, Moghanaki D, et al. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in dendritic cell differentiation. *J Immunol* 2005; 174 (1): 215-22.

Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Piescia J, Altieri DC. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *J Clin Invest.* 2004; 114: 1117-27.

Dolled-Filhart M, Robert L, Camp RL, Diane P, Kowalski DP, Smith BL, Rimm DL. Tissue microarray analysis of signal transducers and activators of transcription 3 (Stat3) and phospho-Stat3 (Tyr705) in node negative breast cancer shows nuclear localization is associated with a better prognosis. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 594-600.

Dong G, Chen Z, Li Z, Yeh NT, Bancroft CC and van Waes C. Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced activation of MEK and PI3K signal pathways contributes to expression of proangiogenic cytokines interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2001; 61: 5911-5918.

D'Orsi CJ, Newell MS. BI-RADS Decoded: Detailed Guidance on Potentially Confusing Issues. *Radiol Clin N AM* 2007; 45: 751-763.

Doublier S, Belisario DC, Polimeni M, Annaratone L, Riganti C, Allia E, Ghigo D, Bosia A, Sapino A. HIF-1 activation induces doxorubicin resistance in MCF7 3-D spheroids via P-glycoprotein expression: a potential model of the chemoresistance of invasive micropapillary carcinoma of the breast. *BMC Cancer.* 2012; 12: 4.

Du B, Altorki NK, Kopelovich L. Tobacco smoke stimulates the transcription of amphiregulin in human oral epithelial cells: Evidence of a cyclic AMP-responsive element binding protein-dependent mechanism. *Cancer Res.* 2005; 65: 5982-5988.

Du C, Fang M, Li Y, Li L and Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 2000; 102; 33-42.

Duckett CS, Nava VE, Gedrich RW, et al. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J.* 1996; 14: 2685-94.

Duffy MJ, O'Donovan N, Brennan DJ, Gallagher WM, Ryan BM. Survivin: a promising tumor biomarker. *Cancer Lett.* 2007; 249: 49-60.

Dumitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk-where do we stand in 2005. *J Cell Mol Med* 2005; 9 (1): 208-21.

Dupuy E, Habib A, Lebret M, Yang R, Levy-Toledano S, Tobelem G. Thrombin induces angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in human endothelial cells: possible relevance to HIF-alpha. *J Thromb Haemost* 2003; 1 (5): 1096-102.

Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146 (5): 1029-39.

E

EBCTCG. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15 years survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; 365; 1687-1717.

Edge SB, Byrd DR, Carducci MA. American Joint Committee on Cancer (AJCC). AJCC Cancer Staging Manual, 7 th ed. New York: Springer; 2009.

Eisenhauer EA. From the molecule to the clinic-inhibiting HER2 to treat breast cancer. *N Engl J Med.* 2001; 344 (11): 841-842.

Ellis MJ, Coup A, Sing B. Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for ErbB-1 and/or ErbB-2 positive, estrogen receptor positive primary breast cancer: evidence from a phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 19: 3808-16, 2001.

English J, Pearson G, Wilsbacher J, Swantek J, Karandikar M, Shuichan X. New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp Cell Res.* 1999; 253: 255-70.

Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. C. Elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hidroxilation. *Cell.* 2001; 107: 43-54.

Eralp Y, Derin D, Ozluk Y, Yavuz E, Guney N, Saip P, Muslumanoglu M, Igci A, Kücücük S, Dincer M, Aydinler A, Topuz E: MAPK overexpression is associated with anthracycline resistance and increased risk for recurrence in patients with triple-negative breast cancer. *Ann Oncol.* 2008; 19: 669-74.

Eriksson U, Alitalo K. Structure, expresión and receptor-binding properties of novel vascular endotelial growth factor. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1999; 237: 41-57.

Erler JT, CawthorneCJ, Williams KJ. Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1 dependent and independent mechanisms and contributes to drug resistance. *Mol Cell Biol.* 2004; 24: 2875-89.

Escrich E, Solanas M, Moral R. Olive oil, and other dietary lipids, in cancer: experimental approaches. En: *Olive oil and Health* (JL Quiles, MC Ramirez-Tortosa & P Yaqoob) CABI Publising, 317-374 pp, Oxford, U.K, 2006.

Esteva FJ, Hortobagyi GN. Topoisomerase II alpha amplification and anthracycline based chemotherapy: the jury is still out. *J Clin Oncol.* 2009; 27: 3416-17.

Estevez LG, Fortes JL, Adrover E, Peiró G, Margelí, Castellá E, Cuevas JM, Bernet L, Segui MA, Andreu X. Doxorubicin and cyclophosphamide followed by weekly docetaxel as neoadjuvant treatment of early breast cancer: analysis of biological markers in a GEICAM phase II study. *Clin Trans Oncol.* 2009; 11: 54-59.

F

Fan LF, Dong WG, Jiang CQ, Qian Q, Yu QF. Role of Hypoxia-inducible factor-1 α and Survivin in colorectal carcinoma progression. *Int J CColorectal Dis.* 2008 ; 23: 1057-1064.

Faneyte IF, Schrama JG, Peterse JL, Remijnse PL, Rodenhuis S, van de Vijver MJ. Breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy : predictive markers and relation with outcome. *British Journal of Cancer*. 2003 ; 88: 406-412.

Feige JJ, Bailly S. Molecular bases of angiogenesis. *Bull Acad Natl Med*. 2000; 184: 537-544.

Feldser D, Agani F, Iyer NV. Reciprocal positive regulation of hypoxia inducible factor 1alpha and insulinlike growth factor 2. *Cancer Res*. 1999; 59: 3915-8.

Ferlay J, Autier P, Boniol M. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe 2006. *Ann Oncol*. 2007 Mar; 18 (3): 581-92.

Fernández-Morales LA, Segui MA, Andreu X. Análisis of the pathologic response to primary chemotherapy in patients with locally advanced breast cancer grouped according to estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 status. *Clin Breast Cancer* 2007; 7(7): 559-64.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003; 9 (6): 669-676.

Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161 (2): 851-8.

Fiabre B, Slack N, Katrich D. Ten years follow-up results of patients with carcinoma of the breast cancer in a cooperative clinical trial evaluating surgical adjuvant chemotherapy. *Surg Gynecol Obstet* 2002; 240: 528-534.

Figlin RA, Seligson D, Wu H. Characterization of the mTOR pathway in renal cell carcinoma and its use in predicting patient selection for agents targeting this pathway. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 2005; abstrac 4539.

Fisher B, Brown A, Mamounas E, Wieand S, Robidoux A, Margolese RG, Cruz AB Jr, Fisher ER, Wickerham DL, Wolmark N, DeCillis A, Hoehn JL, Lees AW, Dimitrov NV. Effect of preoperative chemotherapy on local-regional disease in women with operable breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J Clin Oncol*. 1997; 15: 2483-93.

Fisher B, Bryant J, Wolmark N, Mamounas E, Brown A, Fisher ER, Wickerham DL, Begovic M, DeCillis A, Robidoux A, Margolese RG, Cruz AB Jr, Hoehn JL, Lees AW, Dimitrov NV, Bear HD. Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *J Clin Oncol*. 1998; 16: 2672-85.

Fisher B, Dignam J, Tan-Chiu E. Prognosis and treatment of patients with breast tumors of one centimeter or less and negative axillary lymph nodes. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 112-120.

Foekens JA, Atkins D, Zhang Y. Multicenter validation of a gene expression based prognostic signature in lymph node-negative primary breast cancer. *J Clin Oncol* 2006 Apr 10; 24 (11): 1665-71.

Foekens JA, Peters HA, Grebenchtchikov, et al. High tumor levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to systemic therapy in advanced breast cancer. *Cancer Res*. 2001; 61: 5407-5414.

Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*. 1995; 1: 27-31.

Forman MR, Hursting SD, Umar A, Barrett JC. Nutrition and cancer prevention: a multidisciplinary perspective on human trials. *Annu Rev Nutr*. 2004; 24: 223-254. Review.

Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia inducible factor 1. *Mol Cell Biol*. 1996; 16: 4604-4613.

Fox SB, Generali D, Berruti A, Brizzi MP, Campo L, Bonardi S, Bersiga A, Allevi G, Milani M, Aguggini S, Mele T, Dogliotti L, Bottini A, Harris AL. The prolyl hydroxylase enzymes are positively associated with hypoxia-inducible factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor in human breast cancer and alter in response to primary systemic treatment with epirubicin and tamoxifen. *Breast Cancer Res*. 2011; 13: R16.

Fox SB, Harris AL. The biology of the breast. Tumor angiogenesis. En: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne K (Eds): *Diseases of the Breast*. Lippincott Williams and Wilkins Philadelphia 2004: 441-458.

Fraile M, Rull M, Julian FJ. Sentinel node biopsy as a practical alternative to axillary lymph node dissection in breast cancer patients: an approach to its validity. *Ann Oncol*. 2000; 11: 701-705.

Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*. 1997; 88 (4): 435-437.

Frost P, Shi Y, Hoang B. AKT activity regulates the ability of mTOR inhibitors to prevent angiogenesis and VEGF expression in multiple myeloma cells. *Oncogene*. 2007; 26: 2255-2262.

Fry MJ. Phosphoinositide 3-kinase signalling in breast cancer: how big a role might it play? *Breast Cancer Research* 3: 304-312 (2001).

Fuckar D, Dekanic A, Stifter S, Mustac E, Krstulja M, Dobrila F, Jonjic N. VEGF expression is associated with negative estrogen receptor status in patients with breast cancer. *International Journal of Surgical Pathology*. 2006; 14 (1): 49-55.

Fukuda R. Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1 mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on map kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem*. 2002; 277 (41): 38205-38211.

Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO, et al. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98 (5): 2604-9.

Fuzhong T, Nan L, Jiajia G, Miao L, Degi Y. Clinical significance of the relationship between expression of surviving and effects of neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2008; 35 (8): 1319-23.

Fyles A, Milosevic M, Hedley D, Pintilie M, Levin W, Manchul L. Tumor hypoxia has independent predictor impact only in patients with node-negative cervix cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20: 680-687.

G

Gao W, Nawaz Z. Role of steroid receptor coactivators and corepressors of progesterone receptors in breast cancer. *Breast Cancer Research* 4(5): 182-186 (2002).

García J, Camacho F, Morente M, Fraga M, Montalbán C, Álvaro T, Bellas, Castaño A, Díez A, Flores T, Martín C, Martínez MA, Mazorra F, Menárguez J, Mestre MJ, Mollejo M, Sáez AI, Sánchez L and Piris MA, for the Spanish Hodgkin Lymphoma Study Group. *Blood*. 2003; 101 (2): 681-9.

García R, Bowman TL, Niu G, Yu H, Minton S, Muro-Cacho CA, Cox CE, Falcone R, Fairclough R, Parsons S, Laudano A, Gazit A, Levitzki A, Kraker A, Jove R. Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene*. 2001; 20: 2499-513.

Garvin S, Dabrosin C. Tamoxifen inhibits secretion of vascular endothelial growth factor in breast cancer in vivo. *Cancer Res*. 2003; 63: 8742-8748.

Garvin S, Nilsson UW, Dabrosin C. Effects of oestradiol and tamoxifen on VEGF, soluble VEGFR-1, and VEGFR-2 in breast cancer and endothelial cells. *Br J Cancer*. 2005; 93 (9): 1005-1010.

Gasparini G. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist*. 2000; 5 (Suppl 1): 37-44.

Gasparini G, Dal Fior S, Pozza F. Correlation of growth fraction by Ki-67 immunohistochemistry with histologic factors and hormone receptors in operable breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat*. 1989; 14: 329-336.

Gasparini G, Toi M, Gion M. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1997; 89: 139-147.

Gasparini GP, Toi M, Verderio P. Prognostic significance of p53, angiogenesis, and other conventional features in operable breast carcinoma: subanalysis in node-positive and node negative patients. *Int J Oncol*. 1998; 12: 1117-1125.

Gee JM, Robertson JF, Ellis IO, Nicholson RI. Phosphorylation of ERK 1/2 mitogen activated protein kinase is associated with poor response to anti-hormonal therapy and decreased patient survival in clinical breast cancer. *Int J Cancer*. 2001; 95 (4): 247-54.

Gee JM, Robertson JF, Gutteridge E. Epidermal growth factor/HER2/insulin-like growth factor receptor signalling and oestrogen receptor activity in clinical breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2005; 12: S99-S111 (suppl1).

Gee JM, Willsher PC, Kenny FS, Robertson JF, Pinder SE, Ellis IO, et al. Endocrine response and resistance in breast cancer: a role for the transcription factor Fos. *Int J Cancer*. 1999; 84: 54-61.

Generali D, Berruti A, Brizzi MP. Hypoxia-inducible factor-1alpha expression predicts a poor response to primary chemoendocrine therapy and disease-free survival in primary human breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2006; 12 (15): 4562-4568.

Generali D, Buffa FM, Berruti A, et al. Phosphorylated ER alpha, and MAPK signalling as predictors of primary endocrine treatment response and resistance in patients with breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009; 27 (2): 227-234.

Generali D, Fox SB, Brizzi MP, Allevi G, Bonardi S, Aguggini S, Milani M, Bersiga A, Campo L, Dionisio R, Vergoni F, Giardani R, Dogliotti L, Bottini A, Harris AL, Berruti A. Down-regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT/Molecular target of rapamycin metabolic pathway by primary letrozole-based therapy in human breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2008; 14 (9): 2673-2680.

George W, Sledge, Jr. Vascular Endothelial Growth in Breast Cancer: Biologic and Therapeutic Aspects. *Seminars in Oncology*. 2002; 29 (3): 104-110.

Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-XL in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998; 273 (21): 13313-6.

Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998; 273 (46): 30336-43.

Gianni L, Baselga J, Eiermann W. First report of the European Cooperative Trial in operable breast cancer (ECTO): effects of primary systemic therapy (PST) on local-regional disease. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 2002; 21: 34a (abstract 132).

Gianni L, Baselga J, Eiermann W, Guillen Porta V, Semiglazov V, Lluch A, et al. Feasibility and tolerability of sequential doxorubicin/paclitaxel followed by cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil and its effects on tumor response as preoperative therapy. *Clinical Cancer Research*. 2005; 11: 8715-21.

Gianni L, Baselga J, Guillen Porta V, Semiglazov V, García-Conde J. First reporter for the European Cooperative Trial in operable breast cancer (ECTO): affects of primary systemic therapy (PST) on loco-regional disease. *Proc Am Soc Clin Oncol*: pp 34 a (abs), 2002.

Gianni L, Semiglazov V, Manikhas GM. Neoadjuvant trastuzumab in locally advanced breast cancer (NOHAH): Antitumor and safety analysis. *J Clin Oncol*, 2007 ASCO Annual Meeting Proceeding Part I. Vol 25, 18 S, 2007: 532.

Gianni L, Zambetti M, Clark K, Baker J, Cronin M, Wu J, Mariani G, Rodriguez R, Symmans WF, Ross JS, Hortobagyi GN, Pusztai L, Shak S. Gene expression profiles in paraffin embedded core biopsy tissue predict response to chemotherapy in women with locally advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 7265-77.

Giatromanolaki A. C-erbB-2 related aggressiveness in breast cancer is hypoxia inducible factor-1 alpha dependent. *Clin Cancer Res*. 2004; 10 (23): 7972-7977.

Giatromanolaki A, Koukorakis MI, Sivridis E. Relation of hypoxia inducible factor 1 alpha and 2 alpha in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival.. *Br J Cancer*. 2001; 85:881-890.

Gioeli D, Mandell JW, Petroni GR, Frierson HF Jr, Weber MJ. Activation of mitogen activated protein kinase associated with prostate cancer progression. *Cancer Res*. 1999; 59: 279-84.

Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Senn H. Meeting highlights: International Consensus Panel on the treatment of primary breast cancer. Seventh international conference on adjuvant therapy of primary breast cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19:3817-27.

Gonzalez-Angulo AM, McGuire SE, Buchholz TA, Tucker SL, Kuerer HM, Rouzier R, Kau SW, Huang EH, Morandi P, Ocana A, Cristofanilli M, Valero V, Buzdar AU, Hortobagyi GN. Factors predictive of distant metastases in patients with breast cancer who have a pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 7098-7104.

Gopfert T, Gess B, Eckardt KU, Kurtz A. Hypoxia signalling in the control of erythropoietin gene expression in rat hepatocytes. *J Cell Physiol*. 1996. 168: 354-361.

Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *Ann Oncol*. 2007; 18: 1133-44.

Gori S, Sidoni A, Colozza M, Ferri I, Marnett M, Fenocchio D, Stocchi L, Foglietta J, Ludovini V, Minessa E, De Angelis V, Crinó L. EGFR, Pmapk, pAKT and PTEN status by immunohistochemistry: correlation with clinical outcome in HER2-positive metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab. *Annals of Oncology*. 2009; 20: 648-654.

Gorlach A, Diebold I, Schini-Kerth VB. Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox) containing NADPH oxidase. *Circ Res* 2001; 89: 47-54.

Gort EH, Groot AJ, Derks van de Ven TLP, Van der Group P, Verlaan I, Van Laar T, Van Diest PJ, Van der Wall, Shvarts A. Hypoxia-inducible factor-1 alpha expression requires PI 3-kinase activity and correlates with Akt1 phosphorylation in invasive breast carcinomas. *Oncogene*. 2006; 25: 6123-6127.

Gouilleux-Gruart V, Goilleux F, Desaint C, Claisse JF. Stat-related transcription factors are constitutively activated in peripheral blood cells from acute leukemia patients. *Blood*; 1996; 87; 1692-7.

Grabowski P, Kuhnel T, Muhr-Wilkenhoff F. Prognostic value of nuclear surviving expression in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2003; 88: 115-9.

Grandis JR, Tweardy DJ. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res*. 1993; 53: 3579-3584.

Granville LA, Younes M, Churg A, Roggli VL, Henderson DW, Cagle PT. Comparison of monoclonal versus polyclonal calretinin antibodies for immunohistochemical diagnosis of malignant mesothelioma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2005; 13(1): 75-9.

Gray MJ, Zhang J, Ellis M, Semenza G, Evans D, Watowich S and Gallick G. HIF-1alpha, STAT 3, CBP/p300 and Ref-1/APE are components of a transcriptional complex that regulates Src-dependenthypoxia-induced expression of VEGF in pancreatic and prostate carcinomas. *Oncogene* (2006); 24: 3110-3120.

Gray RJ, Salud C, Nguyen K, Dauway E, Friedland J, Berman C. Randomized prospective evaluation of a novel technique for biopsy or lumpectomy of nonpalpable breast lesions: radioactive seed versus wire localization. *Ann Surg Oncol*. 2001; 8 (9): 711-5.

Green MC, Buzdar AU, Smith T. Weekly paclitaxel improves pathologic complete remission in operable breast cancer when compared with paclitaxel once every 3 weeks. *J Clin Oncol* 23: 5983-92, 2005.

Griffon-Etienne G, Boucher Y, Brekken C. Taxane-induced apoptosis descompresses blood vessels and lowers interstitial fluid pressure in solid tumors: Clinical implications. *Cancer Res*. 1999; 59: 3776-3782.

Gritsko T, Williams A, Turkson J Kaneko S, Bowman T, Huang M., Nam S, Eweis I, Diaz N, Sullivan D, Yodes S, Enkemann S, Eschrich S, Lee JH, Beam CA, Cheng J, Minton S, Muro-Cancho CA, Jove R. Persistent activation of stat3 signaling induces surviving gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2006; 12: 11-9.

Grizzi F, Di leva A, Russo C, Frezza EE, Cobos E, Muzzio PC, Chiriva-Internati M. Cancer initiation and progresión: an unsimplificable complexity. *Theoretical Biology and Medical Modelling* 3: 37-42 (2006).

Gruber G, Greiner RH, Hlushchuck R. Hypoxia-inducible factor 1-alpha in high-risk breast cancer: an independent prognostic parameter? *Breast Cancer Res* 2004; 6: R191-R198.

Gu X, Lin HL. Analysis of survivin expression in subtypes of lymphoma. *Ai Zheng*. 2004; 23: 655-61.

Guarneri V, Broglio K, Kau SW, Cristofanilli M, Buzdar AU, Valero V, Buchholz T, Meric F, Middleton L, Hortobagyi GN, Gonzalez-Angulo AM. Prognostic value of pathologic complete response after primary chemotherapy in relation to hormone receptor status and other factors. *J Clin Oncol* 24: 1037-44, 2006.

Guiliano AE, Kirgan DM, Guenter JM. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann Surg*. 1994; 220: 391-401.

Gupta K, Radotra BD, Banerjee AK, Nijhawan R. Quantitation of angiogenesis and its correlation with vascular endothelial growth factor expression in astrocytic tumors. *Anal Quant Cytol Histol.* 2004; 26: 223-229.

Guzy RD, Hoyos B, Robin E, Chen H, Liu L, Mansfield KD, Simon MC, Hammerling U & Schumacker PT. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab.* 1: 401-408 (2005).

H

Ha S, Lee YS, Shin SM, Kim HK, Kim S, Namkoong H, Kim HJ, Jung SM, Lee YS, Chung YJ, Jung SS and Kim JW. Oncoprotein HCCR-I expression in breast cancer is well correlated with known breast cancer prognostic factors including the HER2 overexpression, p53 mutation, and ER/PR status. *BMC Cancer* 2009, 9: 51.

Hage JA van der, Velde CJ van de, Julien JP, Tubiana-Hulín M, Vandervelden C, Duchateau L. Preoperative chemotherapy in primary operable breast cancer: results from the European Organization for Research and Treatment of Cancer trial 10902. *J Clin Oncol.* 2001; 19: 4224-37.

Hagemann C and J.L. Blank. The ups and downs of MEK kinase interactions. *Cell Signal.* 2001; 13(12): 863-75.

Hamelers IHL, Steenbergh PH. Interactions between estrogens and insulin-like growth factor signalling pathways in human breast tumor cells. *Endocrine-Related Cancer* 10: 331-345 (2003).

Hanahan D and Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996; 86: 353-364.

Hanrahan EO, Hennessy BT, Valero V. Neoadjuvant systemic therapy for breast cancer: an overview and review of recent clinical trials. *Expert Opinion in Pharmacotherapy.* 2005; 6: 1477-91.

Haq R, Halupa A, Beattie BK. Regulation of erythropoietin-induced STAT serine phosphorylation by distinct mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 2002; 277: 17359-66.

Harris AL. Hypoxia: a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2: 38-47.

Harris L, Fritsche H, Mennel R. American Society of Clinical Oncology 2007 of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Breast Cancer. *J Clin Oncol* (33) Oct 22; [Epub ahead of print].

Harrison L, Blackwell K. Hypoxia and anemia: factors in decreased sensitivity to radiation therapy and chemotherapy?. *Oncologist* 2004; 9: 31-40.

Haura E, Zheng Z, Song L, Cantor A and Bepler G. Activated Epidermal Growth Factor Receptor – Stat-3 Signaling promotes Tumor Survival In vivo in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin cancer Res* 2005; 11 (23): 8288-8294.

Hayahi M, Sakata M, Takeda T, Tahara M, Yamamoto T, Okamoto Y, Minekawa R, Isobe A, Ohmichi M, Tasaka K, Murata Y. Up-regulation of c-met protooncogene product expression through hypoxia-inducible factor-1 alpha is involved in trophoblast invasion under low-oxygen tension. *Endocrinology.* 2005; 146: 4682-4689.

Helczynska K, Kronblad A, Jogi A, Nilsson E, Beckman S, Landberg G. Hypoxia promotes a dedifferentiated phenotype in ductal breast carcinoma in situ. *Cancer Res* 2003; 63: 1441-4.

- Hellman S. Stopping metastases at their source. *N Engl J Med.* 1997; 337: 996-7.
- Hellwig-Burgel T, Rutkowski K, Metzen E, et al. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood.* 1999;94: 1561-7.
- Hendon DE, Ries L, Freedman LS. Relationship among outcome, stage of disease, and histologic grade for 22616 cases of breast cancer. The basis for a prognostic index. *Cancer* 1991 Nov 15; 68 (10): 2142-9.
- Hess KR, Anderson K, Symmans WF, Valero V, Ibrahim N, Mejia JA, Booser D, Theriault RL, Buzdar AU, Dempsey PJ, Rouzier R, Sneige N, Ross JS, Vidaurre T, Gómez HL, Hortobagyi GN, Puztai L. Pharmacogenomic predictor of sensibility to preoperative chemotherapy with paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2006; 24: 4236-44.
- Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005; 23 (5): 1011-27.
- Hicks DG, Kulkarni S. HER2+ breast cancer: review of biologic relevance and optimal use of diagnostic tools. *Am J Clin Pathol.* 2008; 129 (2): 263-273.
- Hidalgo M, Rowinsky EK. The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy. *Oncogene.* 2000; 19: 6680-6686.
- Hilsenbeck SG, Ravdin PM, de Moor CA. Time-dependent of hazard ratios for prognostic factors in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1998; 52: 227-237.
- Hinnis AR, Lockett JC, Walker RA. Survivin is an independent predictor of short-term survival in poor prognostic breast cancer patients. *Br J Cancer.* 2007; 96: 639-45.
- Hirai M, Nakagawara A, Oosaki T, Hayashi Y, Hirono M, Yoshihara T. Expression of vascular endothelial growth factors (VEGF-A/VEGF-1 and VEGF-C) in postmenopausal uterine endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2001; 80: 181-188.
- Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung specific metastasis. *Cancer cell* 2002; 2 (4): 289-300.
- Hsieh FC, Cheng G, and Lin J. Evaluation of potential Stat3-regulated genes in human breast cancer. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 2005; 335: 292-299.
- Höckel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res.* 1996; 56: 4509-4515.
- Höckel M, Schlenger K, Hockel S, Vaupel P. Hypoxic cervical cancers with low apoptotic index are highly aggressive. *Cancer Res* 1999; 59: 4525-8.
- Höckel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 266-76.
- Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 1999; 18 (38): 5356-62.
- Holbro T, Beerli RR, Maurer P. The ErbB2-ErbB3 heterodimer functions as a oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 8933-8938.
- Horiguchi A, Oya M, Shimada T. Activation of signal transducer and activators of transcription 3 in renal cell carcinoma: a study of incidence and its association with pathological features and clinical outcome. *J Urol.* 2002; 168: 762-765.
- Houber J, von Minckwitz G, Denkert C, Tesch H, Weiss E, Zahm DM, Belau A, Khandan F, Hauschild M, Thomssen C, Högel B, Darb-Esfahani S, Mehta K, Loibl S. Effect of neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy in different biological

breast cancer phenotypes: overall results from the GeparTrio study. *Breast Cancer Res Treat.* 2010; 124: 133-140.

Houston SJ, Plunkett TA, Barnes DM, Smith P, Rubens RD, Miles DW. Overexpression of c-erbB2 is an independent marker of resistance to endocrine therapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer.* 1999; 79: 1220-6.

Hsiao JR, Jin YT, Tsai ST, Shiau AL, WuCL, Su WC. Constitutive activation of STAT3 and STAT5 is present in the majority of nasopharyngeal carcinoma and correlates with better prognosis. *Br J Cancer.* 2003; 89: 344-349.

Hsieh FC, Cheng G and Lin J. Evaluation of potential Stat3-regulated genes in human breast cancer. *Biochem. Biophys Res Commun.* 2005; 335: 292-9.

Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem.* 1996; 27 (50): 32253-32259.

Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂- dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7987-92.

Huang M, Page C, Reynolds RK, Lin J. Constitutive activation of stat 3 oncogene product in human ovarian carcinoma cells. *Gynecol Oncol.* 2000; 79: 67-73.

Hudes G, Carducci M, Tomczak P. Global ARCC Trial. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2007; 356: 2271-2281.

Hudson CC, Liu M, Chiang GG. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol.* 2002; 22: 7004-7014.

Hugh J, Hanson J, Cheang MC, Nielsen TO, Perou CM, Dumontet C, Reed J, Krajewska M, Treilleux I, Rupin M, Magherini E, Mackey J, Martin M, Vogel C. Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *J Clin Oncol.* 2009; 27: 1168-1176.

Humphreys RC, Hennighausen L. Transforming growth factor alpha and mouse models of human breast cancer. *Oncogene.* 2000; 19: 1085-1091.

Hynes NE and Stern DF. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1994; 1198: 165-184.

I

Ihemelandu CU, Leffall LD Jr., Dewitty RL, Naab TJ, Mezghebe HM, Makambi KH, Adams-Campbell L, Frederick WA. Molecular Breast Cancer Subtypes in Premenopausal African-American Women: Age-Specific Prevalence and Survival. *Journal of Surgical Research*, Volume 143, Issue 1, November 2007; 109-118. Ihle JN. STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell.* 1996; 84: 331-334.

Ikehara M, Oshita F, Kameda Y. Expression of surviving correlated with vessel invasion is a marker of poor prognosis in small adenocarcinoma of the lung. *Oncol Rep.* 2002; 9 (4): 835-38.

Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 10595-9.

Irvin WJ Jr, Carey LA. What is triple-negative breast cancer? *Eur J Cancer.* 2008; 44: 2799-805.

Isakoff SJ, Engelman JA, Irie HY. Breast cancer-associated PIK3CA mutations are oncogenic in mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 2005; 65: 10992-11000.

Islam A, Kageyama H, Takada N. High expression of survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene.* 2000; 19: 617-23.

Ismael MS. Detection of micrometastatic disease and monitoring of perioperative tumour cell dissemination in primary operable breast cancer patients using real-time quantitative reverse transcription-PCR. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 196-201.

Ito T, Shiraki K, Sugimoto K, Yamanaka T, Fujikawa K, Ito M, Takase K, Moriyama M, Kawano H, Hayashida M, Nakano T, Suzuki A. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2000; 31: 1080-1085.

Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG, Jr. HIF alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science.* 2001; 292: 464-8.

Iwao K., Matoba R., et al. Molecular classification of primary breast tumors possessing distinct prognostic properties. *Hum Mol Genet* 11(2): 199-206 (2002).

Iwata H, Sato N, Masuda N, Nakamura S, Yamamoto N, Kuroi K, Kurosimi M, Tsuda H, Akiyama F, Ohashi Y, Toi M. Docetaxel followed by fluorouracil/epirubicin/cyclophosphamide as neoadjuvant chemotherapy for patients with primary breast cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2011; 41 (7): 867-875.

Izawa A, Kobayashi D, Nasu S. Relevance of c-erbB2, PLU-1, and survivin mRNA expression to diagnostic assessment of breast cancer. *Anticancer Res.* 2002; 22: 2965-9.

J

Jaakkola P, Mole DR, Tian YM. Targeting of HIFalpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001; 292: 468-72.

Jackson MW, Roberts JS, Heckford SE. A potential autocrine role for vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Cancer Res.* 2002; 62: 854-859.

Jacquemier J, Charafe-Jauffret E, Monville F, Esterni B, Extra JM, Houvenaeghel G, Xerri L, Bertucci F and Birnbaum D. Association of GATA3, P53, Ki67 status and vascular peritumoral invasion are strongly prognostic in luminal breast cancer. *Breast Cancer Research* 2009, 11: R23 (doi: 10.1186/bcr2249).

Jacquillat C, Weil M, Baillet F. Results of neoadjuvant chemotherapy and radiation therapy in the breast-conserving treatment of 250 patients with all stages of infiltrative breast cancer. *Cancer* 66: 119-29, 1990.

Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005; 307 (5706): 58-62.

Jain R, Baxter L. Mechanisms of heterogeneous distribution of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumor: Significance of elevated interstitial pressure. *Cancer Res.* 1988; 48: 7022-7032.

Janssen HL, Hausermans KM, Balm AJ, Begg AC. Hypoxia in head and neck cancer: How much, How important?. *Head Neck* 2005; 27: 622-38.

Jelovac D, Sabnis G, Long BJ. Activation of mitogen-activated protein kinase in xenografts and cells during prolonged treatment with aromatase inhibitor letrozole. *Cancer Res.* 2005; 65: 5380-5389.

Jeng M, Yue W, Eischeid A, Wang J, Santen R. Role of MAPK in the enhanced cell proliferation of long-term estrogen deprived human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2000; 62: 167-175.

Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, et al. Regulation and destabilization of HIF-1 alpha by ARD1 mediated acetylation. *Cell.* 2002; 111: 709-20.

Jha K; Shukla M, Pandey M. Survivin expression and targeting in breast cancer. *Surgical Oncology.* 2012; 21: 125-131.

Jiang BH, Jiang G, Zheng JZ, Lu Z, Hunter T and Vogt PK. Phosphatidylinositol 3 kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell Growth Differ.* 2001; 12: 363-369.

Jiang BH and Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis. *Adv Cancer Res.* 2009; 102: 19-65.

Jiang BH and Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis. *Biochim Biophys.* 2008; Acta 1784: 150-158.

Jiang BH, Zheng JZ, Aoki M and Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase signalling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 1749-1753.

Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 1996; 271: 17771-17778.

Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol.* 1996; 271: C1172-C1180.

Jiang Y, Zhang W, Kondo K,. Gene expression profiling in a renal cell carcinoma cell line: Dissecting VHL and hypoxia-dependent pathways. *Mol Cancer Res.* 2003; 1: 453-462.

Jiang YA, Fan LF, Jiang CQ, Zhang YY, Luo HS, Tang ZJ, et al. Expression and significance of PTEN, hypoxia-inducible factor-1 alpha in colorectal adenoma and adenocarcinoma. *World J Gastroenterol.* 2003; 9: 491-4.

Jin Q, Hemminki K, Enquist K. Vascular endothelial growth factor polymorphisms in relation to breast cancer development and prognosis. *Clin Cancer Res.* 2005; 11: 3647-3653.

Joel PB, Smith J, Sturgill TW, Fisher TL, Blenis J, Lannigan DA. Pp90rsk1 regulates estrogen receptor-mediated transcription through phosphorylation of Ser-167. *Molecular and Cellular Biology.* 1998; 18: 1978-1984.

Jogi A, Vallon-Christersson J, Holmquist L, Axelson H, Borg A, Pahlman S. Human neuroblastoma cells exposed to hypoxia: induction of genes associated with growth, survival, and aggressive behavior. *Exp Cells Res* 2004; 295: 469-87.

Johnson, G.L. and R. Lapadat. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science.* 2002; 298 (5600): 1911-2.

Johnstone PAS, Norton MS, Riffenburg RH. Survival of patients with untreated breast cancer. *J Surg Oncol* 2000; 73: 273-277.

Jones RL, Salter J, A'Hern R, Nerurkar A, Parton M, Reis-Filho J, Smith IE, Dowsett M. Relationship between oestrogen receptor status and proliferation in predicting response and long-term outcome to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010; 119: 315-323.

Jones RL, Smith IE. Neoadjuvant treatment for early-stage breast cancer: opportunities to assess tumour response. *Lancet Oncol.* 2006; 7: 869-874.

Joseph R. Nevins New Breast Cancer Genes-Discovery at the Intersection of Complex Data Sets. *Cancer Cell*, Volume 12, Issue 6, 2007: 497-499.

Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Fit4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J*. 1996; 15: 290-298.

Jung J, Kim H, Lee C, et al. STAT 3 inhibits the degradation of HIF-1 α by pVHL-mediated ubiquitination. *Experimental and Molecular Medicine*. 2008; 40 (5): 479-485.

Jung JE, Lee HG, Cho IH, Chung DH, Yoon SH, Yang YM, Lee JW, Choi S, Park JW, Ye SK, Chung MH. STAT3 is a potential modulator of HIF-1 mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells. *FASEB J*. 2005; 19: 1296-8.

K

Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L. Regulation of the hypoxia inducible transcription factor 1 alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem*. 1999; 274: 6519-25.

Kalyankrishna S and Grandis JR. Epidermal Growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol*. 2006; 24 (17): 2666-2672.

Kappler M, Taubert H, Holzhausen HJ, Reddemann R, Rot S, Becker A, Kuhnt T, Dellas K, Dunst J, Vordermark D, Hänsgen G, Bache M. Immunohistochemical detection of HIF-1 α and CAIX in advanced head and neck cancer. *Strahlentherapie un Onkologie*. 2008; 184: 393-9.

Katayama K, Fujita N, Tsuruo T. Akt/protein kinase B-dependent phosphorylation and inactivation of WEE1Hu promote cell cycle progression at G2/M transition. *Mol Cell Biol*. 2005; 25: 5725-5737.

Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, et al. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science*. 1995; 270: 1491-1494.

Kato S, Masuhiro Y, Watanabe M. Molecular mechanism of a crosstalk between oestrogen and growth factor signalling pathways. *Genes Cells*. 2000; 5: 593-601.

Katsuta M, Miyashita M, Makino H, Nomura T, Shinji S, Yamashita K, Tajiri T, Kudo M, Ishiwata T, Naito Z. Correlation of hypoxia inducible factor-1 alpha with lymphatic metastasis via vascular endothelial growth factor-C in human esophageal cancer. *Exp Mol Pathol*. 2005; 78: 123-130.

Kaufmann M, Hortobagyi GN, Goldhirsch A, Scholl S, Markis A, Valaoussa P. Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: an update. *Journal of Clinical Oncology*. 2006; 24: 1940-9.

Kaufmann M, von Minckwitz G, Bear HD, Buzdar A, McGale P, Bonnefoi H, Colleoni M, Denkert C, Eiermann W, Jackesz R, Makris A, Miller W, Pierga JY, Semiglazov V, Schneeweiss A, Souchon R, Stearns V, Untch M, Loibl S. Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: new perspectives 2006. *Ann Oncol*. 2007; 18: 1927-1930.

Kaufmann M, von Minckwitz G, Rody A. Preoperative (neoadjuvant) systemic treatment of breast cancer. *Breast*. 2005; 14: 576-81.

Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998; 58: 5071-4.

Kayaselcuk F, Nursal TZ, Polat A, Noyan T, Yildirim S, Tarim A. Expression of survivin, bcl-2, p53 and bax in breast carcinoma and ductal intraepithelial neoplasia. *J Exp Clin Cancer Res.* 2004; 23 (1): 105-12.

Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science.* 1989; 246: 1309-12.

Kelly AM, Dwamena B, Cronin P. Breast cancer sentinel node identification and classification after neoadjuvant chemotherapy-systematic review and meta analysis. *Acad Radiol.* 2009 May; 16(5): 551-63.

Kennedy SM, O'Driscoll L, Purcell R, Fitz-Simons N, McDermott EW, Hill AD, O'Higgins NJ, Parkinson M, Linehan R, Clynes M. Prognostic importance of survivin in breast cancer. *Br J Cancer.* 2003; 88: 1077-83.

Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med.* 2008; 358: 2039-2049.

Khan S, Kumagai T, Vora J. PTEN promoter is methylated in a proportion of invasive breast cancers. *Int J Cancer.* 2004; 112: 407-10.

Khatua S, Peterson KM, Brown KM, Lawlor C, Santi MR, LaFleur B, Dressman D, Stephan DA, MacDonald TJ. Overexpression of the EGFR/FKBP12/HIF-2alpha pathway identified in childhood astrocytomas by angiogenesis gene profiling. *Cancer Res.* 2003; 63: 1865-1870.

Kim KJ, Li B, Winer J, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature.* 1993; 362: 841-844.

Kim HS, Park YH; Lee J, Ahn JS, Kim J, Shim YM, Kim JH, Park K, Han J and Ahn MJ. Clinical impact of phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3, epidermal growth factor receptor, p53, and vascular endothelial growth factor receptor 1 expression in resected adenocarcinoma of lung by using tissue microarray. *Cancer* 2010; 116 (3): 676-85.

Kim HS, Shiraki K, Park SH. Expression of surviving in CNI and invasive squamous cell carcinoma of uterine cervix. *Anticancer Res.* 2002; 22 (2A): 805-08.

Kim S, Sohn J, Koo JS, Park SH, Park HS, Park BW. Molecular subtypes and tumor response to neoadjuvant chemotherapy in patients with locally advanced breast cancer. *Oncology.* 2010; 79: 324-330.

Kimbrow KS., Simons JW. Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer* 13: 739-749 (2006).

Kimura H, Weisz A, Ogura T, Hitomi Y, Kurashima y, Hashimoto K. Identification of hypoxia-inducible factor 1 ancillary sequence and its function in vascular endothelial growth factor gene induction by hypoxia and nitric oxide. *J Biol Chem* 2001; 276: 2292-8.

Kirito K, Nakajima K, Watanabe T. Identification of the human erythropoietin receptor region required for Stat1 and Stat3 activation. *Blood.* 2002; 99: 102-110.

Kirkegaard T, Witton CJ, McGlynn LM, Tovey SM, Dunne B, Lyon A, Bartlett JM. AKT activation predicts outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *J Pathol.* 2005; 207: 139-146.

Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004; 44: 239-267. Review.

Klein CA, Blankenstein TJ, Schmidt-Kittler O, Petronio M, Polzer B, Stoecklein NH, Genetic heterogeneity of single disseminated tumor cells in minimal residual cancer. *Lancet.* 2002; 360: 683-9.

Klos KS, Wyszomierski SL, Sun M. ErbB2 increases vascular endothelial growth factor protein synthesis via activation of mammalian target of rapamycin/p70S6K leading to increased angiogenesis and spontaneous metastasis of human breast cancer cells. *Cancer Res.* 2006; 66: 2028-2037.

Knoop AS, Knudsen H, Balslev E. Retrospective analysis of topoisomerase IIa amplification and deletions as predictive markers in primary breast cancer patients randomly assigned to cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil or cyclophosphamide, epirubicin or fluorouracil; Danish Breast Cancer cooperative Group. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 7483-90.

Knowlden JM, Hutcheson IR, Jones HE. Elevated levels of epidermal growth factor receptor/c-erbB2 heterodimers mediate an autocrine growth regulatory pathway in tamoxifen-resistant MCF-7 cells. *Endocrinology.* 2003; 144: 1032-1044.

Knuefermann C, Lu Y, Liu B. HER2/PI-3K/Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells. *Oncogene.* 2003; 22: 3205-3212.

Konecny GE, Meng YG, Untch M. Association between HER-2/neu and vascular endothelial growth factor expression predicts clinical outcome in primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 1706-1716.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue micro-arrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* 1998; 4: 844-847.

Kostadima L, Pentheroudakis G, Fountzilas G, Dimopoulos M, Pectasides D, Gogas H, et al. Survivin and glycodefin transcriptional activity in node-positive early breast cancer: mRNA expression of two key regulators of cell survival. *Breast Cancer Res Treat.* 2006; 100: 161-7.

Krammer PH. CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv. Immunol.* 1999; 71: 163-210.

Kroll J, Waltenberger J. VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 252 (3): 743-6.

Kronblad A, Hedenfalk I, Nilsson E, Pahlman S and Landberg. ERK1/2 inhibition increases antiestrogen treatment efficacy by interfering with hypoxia-induced downregulation of RE alpha: a combination therapy potentially targeting hypoxic and dormant tumor cells. *Oncogene.* 2005; 24: 6835-6841.

Kronblad A, Helczynska K, Nielsen NH, Pahlman E, Emdin S, Pahlman S, Landberg G. Regional cyclin D1 overexpression or hypoxia correlate inversely with heterogeneous oestrogen receptor-alpha expression in human breast cancer. *In vivo.* 2003; 17: 311-8.

Kronblad A, Jirström K, Rydén L. Hypoxia inducible factor-1alpha is a prognostic marker in premenopausal patients with intermediate to highly differentiated breast cancer but not a predictive marker for tamoxifen response. *Int. J. Cancer.* 2006; 118: 2609-2616.

Krueger A, Baumann S, Krammer PH and Kirchhoff S. FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 2001; 21: 8247-54.

Kuerer HM, Newman LA, Smith TL, Ames PC, Hunt KK, Dhingra K, Theriault RL, Singh G, Binkley SM, Sneige N, Buchholz TA, Ross MI, McNeese MD, Buzdar AU, Hortobagyi GN, Singletary SE. Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol.* 1999; 17: 460-469.

Kuerer HM, Singletari SE, Buzdar AU, Ames FC, Valero V, Buchholz TA, Ross MI, Pusztai L, Hortobagyi GN, Hunt KK. Surgical conservation planning after neoadjuvant chemotherapy for stage II and operable stage III breast carcinoma. *Am J Surg*. 2001; 182: 601-608.

Kumar R and Yarmand-Bagheri R. The role of HER2 in angiogenesis. *Semin Oncol*. 2001; 28: 27-32.

Kurebayashi J, Otsuki T, Moriya T, Sonoo H. Hypoxia reduces hormone responsiveness of human breast cancer cells. *Jpn J Cancer Res*. 2001; 92: 1093-101.

Kuroi K, Toi M, Tsuda H, Kurosomi M, Akiyama F. Issues in the assessment of the pathologic effect of primary systemic therapy for breast cancer. *Breast Cancer*. 2006; 13: 38-48.

Kurokawa H, Lenferink AE, Simpson JF. Inhibition of HER2/neu (erbB-2) and mitogen activated protein kinases enhances tamoxifen action against HER2-overexpressing, tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Cancer Res*. 2000; 60: 5887-5894.

Kusaba T, Nakayama T, Yamazumi K. Activation of STAT3 is a marker of poor prognosis in human colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2006; 15: 1445-1451.

Kusaba T, Nakayama T, Yamazumi K. Expresión of pSTAT3 in human colorectal adenocarcinoma and adenoma; correlation with clinicopathological factors. *J Clin Pathol*. 2005; 58: 833-838.

Kuukasjärvi T, Kononen J, Helin H, Holli K, Isola J. Loss of estrogen receptor in recurrent breast cancer associated with poor response to endocrine therapy. *J Clin Oncol*. 1996; 14 (9): 2584-9.

Kyzas PA, Stefanou D, Batistatou A. Potential autocrine function of vascular endothelial growth factor in head and neck cancer via vascular endothelial growth factor receptor-2. *Mod Pathol*. 2005; 18: 485-494.

L

La Casse EC, Baird S, Korneluk RG, Mackesie AE. The inhibition of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene*. 1998; 17: 3247-59.

Lamy PJ, Romieu G, Jacot W. UPA/PAI-1: a tool for breast cancer treatment individualization. Biology, clinical implications and quantification assays. *Bull Cancer*. 2010 ; 97 (3): 341-8.

Lancaster JA, Harris AL, Davidson SE. Carbonic anhydrase (CA IX) expression, a potential new intrinsic marker of hypoxia: correlations with tumor oxygen measurements and prognosis in locally advanced carcinoma of the cervix. *Cancer Res*. 2001; 61: 6394-9.

Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 2002; 295: 858-61.

Laughner E, Taghavi P, Chiles K. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 3995-4004.

Linderholm B, Grankvist K, Wilking N. Correlation of vascular endothelial growth factor content with recurrences, survival, and first relapse site in primary node-positive breast carcinoma after adjuvant treatment. *J Clin Oncol.* 2000; 18: 1423-1431.

Linderholm B, Tavelin B, Grankvist K. Vascular endothelial growth factors is of high prognostic value in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol.* 1998; 16: 3121-3128.

Lundgren K, Holm C and Landberg G. Hypoxia and breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2007; 64: 3233-3247.

Lee AV, Cui X, Oesterreich S. Cross-talk among estrogen receptor, epidermal growth factor signalling pathways. *Genes Cells.* 2000; 5: 593-601.

Lee CN, Cheng WF, Chen CA. Angiogenesis of endometrial carcinoma assessed by measurement of intratumoral blood flow, microvessel density and vascular endothelial growth factor levels. *Obstet Gynecol.* 2000; 96: 615-621.

Lee ER, Kim JY, Kang YJ, et al. Interplay between PI3K/Akt and MAPK signalling pathways in DNA-damaging drug-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1763: 958-968.

Lee JC, Chow NH, Wang ST, Huang SM. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in colorectal cancer patients. *Eur J Cancer.* 2000; 36: 748-753.

Lee JT and McCubrey JA. The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. *Leukemia* 2002; 16 (4): 486-507.

Levesque AA, Eastman A: p53-based cancer therapies: is defective p53 the Achilles heel of the tumor? *Carcinogenesis.* 2007; 28: 13-20.

Levy DE, Darnell JE. STATs: transcriptional control and biologic impact. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3: 651-62.

Levy DE, Lee CK. What does Stat3 do? *J Clin Invest.* 2002; 109: 1143-1148.

Li F. Role of surviving and its splice variants in tumorigenesis. *Br J Cancer.* 2005; 92: 212-6.

Li F, Altieri DC. Transcriptional analysis of human Survivin gene expression. *Biochem J.* 1999; 344: 305-11.

Li F, Ambrosini G, Chu EY, Piescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature.* 1998; 396: 580-84.

Li F, Brattain MG. Role of the Survivin gene in pathophysiology. *Am J Pathol.* 2006; 169 (1): 1-11.

Li F, Ling X. Survivin study: an update of “what is the next wave”? *J Cell Physiol.* 2006; 208 (3): 476-86.

Li F, Yang J, Ramnath N, Javie MM, Tan D. Nuclear or cytoplasmic expression of survivin: what is the significance? *Int J cancer.* 2005; 114 (4): 509-12.

Li J, Yen C, Liaw D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast and prostate cancer. *Science.* 1997; 275: 1943-7.

Li T and Sparano JA. Inhibiting Ras signaling in the therapy of breast cancer. *Clin Breast Cancer.* 2003; 3 (6): 405-420.

Li X, Lee C, Tang Z, Zhang F, Arjunan P, Li Y, Hou X, Kumar A, Dong L. VEGF-B: a survival, or a n angiogenic factor? *Cell Adh Migr.* 2009; 3: 322-327.

Li YH, Hu CF, Shao Q, Huang MY, Hou JH, Xie D, Zeng YX, Shao JY. Elevated expressions of survivin and VEGF protein are strong independent predictors of survival in advanced nasopharyngeal carcinoma. *J Transl Med.* 2008; 6: 1.

Li YH, Wang C, Meng K, Chen LB, Zhou XJ. Influence of survivin and caspase-3 on cell apoptosis and prognosis in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2004; 10: 1984-8.

Li YM, Zhon BP, Deng J, Pay Y, Hay N, Hung MC. A hypoxia –independent hypoxia-inducible factor-1 activation pathway induced by phosphatidylinositol-3 kinase/AKT in HER2 overexpressing cells. *Cancer Res* 2005; 65: 3257-63.

Liang K, Lu Y, Li X, et al. Differential roles of phosphoinositide –dependent protein kinase-1 and akt1 expression and phosphorylation in breast cancer cell resistance to paclitaxel, doxorubicin, and gemcitabine. *Mol Pharmacol*. 2006; 70: 1045-1052.

Liang Z, Zhang J, Zeng Xuan, Gao J, Wu S and Liu T. Relationship between EGFR expression, copy number and mutation in lung adenocarcinomas. *BMC Cancer*. 2010; 10: 376.

Liao Y, Hung MC. Regulation of the activity of p38 mitogen-activated protein kinase by Akt in cancer and adenoviral protein E1A-mediated sensitization to apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2003; 23: 6836-6848.

Liedtke C, Hatzis C, Symmans WF. Genomic grade index is associated with response to chemotherapy in patients with breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 3185-91.

Liedtke C, Mazouni C, Hess KR. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26 (8): 1275-81.

Likhite VS, Stossi F, Kim K. Kinase-specific phosphorylation of the estrogen receptor changes receptor interactions with ligand, deoxyribonucleic acid, and coregulators associated with alterations in estrogen and tamoxifen activity. *Mol Endocrinol*. 2006; 20: 3120-3132.

Lim JH, Lee ES, You HJ, Lee JW, Park JW and Chun YS. Ras dependent induction of HIF-1 alpha 785 via the Raf/MEK/ERK pathway: a novel mechanism of Ras mediated tumor promotion. *Oncogene* 23: 9427-9431 (2004).

Lin HJ, Hsieh FC, Song H, Lin J. Elevated phosphorylation and activation of PDK 1/AKT pathway in human breast cancer. *Br J Cancer*. 2005; 93: 1372-1381.

Lin TS, Mahajan S, Franf DA. STAT signalling in the pathogenesis and treatment of leukemias. *Oncogene*. 2000; 19: 2496-504.

Linderholm B, Tavelin B, Grankvist K. Vascular endothelial growth factors is of high prognostic value in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol*. 1998; 16: 3121-3128.

Linderholm B, Grankvist K, Wilking N, Johansson M, Tavelin G, Henriksson R. Correlation of vascular endothelial growth factor content with recurrences, survival, and first relapse site in primary node-positive breast carcinoma after adjuvant treatment. *J Clin Oncol*. 2000; 18: 1423-1431.

Linderholm BK, Hellborg H, Johansson U. Significantly higher levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and shorter survival times for patients with operable triple-negative breast cancer. *Ann Oncol*. 2009; 20: 1639-1646.

Linderholm BK, Lindahl T, Holmberg L, Klar S, Lennerstrand J, Henriksson R. The expression of vascular endothelial growth factor correlates with mutant p53 and poor prognosis in human breast cancer. *Cancer Res* 2001; 61 (5): 2256-60.

Liu T, and Ogle TF. Signal transducer and activator of transcription 3 is expressed in the decidualized mesometrium of pregnancy and associates with the progesterone receptor through protein interactions. *Biol. Reprod*. 2002; 67: 114-118.

Lo Muzio L, Campisi G, Giovannelli L. HPV DNA and survivin expression in epithelial oral carcinogenesis: a relationship? *Oral Oncol*. 2004; 40: 736-41.

Lo Muzio L, Pannone G, Staibano S, et al. Survivin expression in oral squamous cell carcinoma. *Br Cancer*. 2003; 33: 524-7.

Look MP, van Putten WL, Duffy MJ. Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-in 8377 breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 116-128.

López-Abente G, Pollán M, Aragonés N. La situación del cáncer en España. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo; 2005.

Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. *Cancer Res.* 1998; 58: 1808-12.

Lu Y, Liang K, Li X, Fan Z. Responses of cancer cells with wild-type or tyrosine kinase domain-mutated epidermal growth factor receptor (EGFR) to EGFR-targeted therapy are linked to downregulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Mol Cancer.* 2007; 6:63.

Luini A, Zurrada S, Galimberti V, Paganelli G. Radioguided surgery of occult breast lesions. *Eur J Cancer.* 1998; 34: 204-5.

Lundberg AS, Weinberg RA. Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer.* 1999; 35: 1886-94.

Liang Y, Brekken RA, Hyder SM. Vascular endothelial growth factor induces proliferation of breast cancer cells and inhibits the anti-proliferative activity of anti hormones. *Endocrine-Related Cancer.* 2006; 13: 905-919.

Lyman GH, Giuliano AE, Somerfield MR. American Society of Clinical Oncology Guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 7703-7720.

M

MacGrogan G, Mauriac L, Duran M, Bonichon F, Trojani M, de Mascarel I. Primary chemotherapy in breast invasive carcinoma: predictive value of the immunohistochemical detection of hormonal receptors, p53, c-erbB2, MiB1, pS2 and GST pi. *British Journal of Cancer.* 1996; 74: 1458-65.

Mackay HJ, Twelves CJ. Protein kinase C: a target for anticancer drugs? *Endocrine Related Cancer* 10: 389-396 (2003).

Mackeigan JP, Taxman DJ, Hunter D. Inactivation of the antiapoptotic phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway by the combined treatment of taxol and mitogen-activated protein kinase inhibition. *Clin Cancer Res.* 2002; 8: 2091-2099.

Maemura M, Lino Y, Koibuchi Y, Yokoe T, Morishita Y. Mitogen-activated protein kinase cascade in breast cancer. *Oncology.* 1999; 57: 37-44.

Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997; 277 (5322): 55-60.

Mamounas EP. Neoadjuvant chemotherapy in operable breast cancer. *Breast Care.* 2006; 1: 348-351.

Mandell JW, Hussaini IM, Zecevic M, Weber MJ, VandenBerg SR. In situ visualization of intratumor growth factor signalling: immunohistochemical localization of activated ERK/MAP kinase in glial neoplasms. *Am J Pathol.* 1998; 153: 1411-23.

Manning BD and Cantley LC: AKT/PKB signalling: navigating downstream. *Cell.* 2007; 129: 1261-1274.

Mansfield KD, Guzy RD, Pan Y, Young RM, Cash TP, Schumacker PT & Simon MC. Mitochondrial dysfunction resulting from loss cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF- α activation. *Cell Metab.* 1: 393-399 (2005).

Mao J, Hai J, Shu HP. Expression of survivin and nm23 and the relationship among the expressions and the axillary lymph node metastasis in breast cancer. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2005; 30: 312-4, 334. Chinese.

Maranchie JK, Vasselli JR, Riss J. The contribution of VHL substrate binding and HIF1- α to the phenotype of VHL loss in renal cell carcinoma. *Cancer Cell.* 2002; 1: 247-255.

Martin LA, Farmer I, Johnston SR, et al. Enhances estrógeno receptor (ER) α , ERBB2, and MAPK signal transduction pathways operate Turing the adaptation of MCF-7 cells to long term estrogen deprivation. *J Biol Chem.* 2003; 278: 30458-30468.

Martinou JC and Green DR. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat. Rev. Mol Cell Biol.* 2001; 2: 63-67.

Massarweh S, Mohsin SK, Shou J. Inhibition of epidermal growth factor Her-2 receptor signalling using ZD1839 (Iressa) restores tamoxifen sensitivity and delays resistance to estrogen deprivation in Her-2 overexpressing breast tumors. *Proc Am Soc Clin Oncol.* 2002; 21: 33.

Massarweh S, Shou J, DiPietro M. Targeting the epidermal growth factor receptor pathway improves the anti-tumor effect of tamoxifen and delays acquired resistance in a xenograft model of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2002; 76: 33.

Massida B, Sini MC, Budroni M, Atzori F, Deidda MC, Pusceddu V, Perra MT, Sirigu P, Cossu A, Palomba G, Lonta MT, Palmieri G. Molecular alterations in key-regulator genes among patients with T4 breast carcinoma. *BMC Cancer.* 2010; 10: 458.

Masuda M, Suzui M, Yasumatu R. Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription 3 correlates with cyclin D1 overexpression and may provide a novel prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2002; 62: 3351-3355.

Mathieu MC, Rouzier R, Llombart-Cussac A, Sideris L, Koscielnny S, Travaqli JP. The poor responsiveness of infiltrating lobular breast carcinomas to neoadjuvant chemotherapy can be explained by their biological profile. *European Journal of Cancer.* 2004; 40: 342-51.

Maur M, Guarneri V, Frassoldati A, Conte PF. Primary systemic therapy in operable breast cancer: clinical data and biological fall-out. *Ann Oncol.* 2006; 17: 158-164.

Mauri D, Pavlidis N, Loannidis JP: Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a metaanalysis. *J Natl Cancer Inst* 97: 188-94, 2005.

Maxwell PH. The HIF pathway in cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2005; 16: 523-530.

Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94: 8104-8109.

Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature.* 1999; 399: 271-275.

Mazouni C, Peintinger F, Wan-Kau S. Residual ductal carcinoma in situ patients with complete eradication of invasive breast cancer after neoadjuvant chemotherapy does not adversely affect patient outcome. *J Clin Oncol.* 2007; 25: 2650-2655.

McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL. Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Adv Enzyme Regul.* 2006; 46: 249-279.

McGlynn LM, Kirkegaard T, Edwards J, Tovey S, Cameron D, Twelves C, Bartlett JM, Cooke TG. Ras/Raf/MAPK pathway mediates response to tamoxifen but not chemotherapy in breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2009; 15: 1487-95.

McMahon S, Grondin F, Mc Donnal PP, Richard DE, Dubris CM. Hypoxia enhanced expression of the proprotein convertase furin is mediated by hypoxia inducible factor-1: impact on the bioactivation of proproteins. *J. Biol Chem* 2005; 280: 6561-9.

Mehrotra S, Languino LR, Raskett CM, Mercurio AM, Dohi T, Altieri DC. IAP regulation of metastasis. *Cancer Cell.* 2010.

Mele T, Generali D, Fox S, Brizzi MP, Bersiga A, Milani M, Allevi G, Bonardi S, Aguggini S, Volante M, Dogliotti L, Bottini A, Harris A, Berruti A. Antiangiogenic effect of tamoxifen combined with epirubicin in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2010; 123: 795-804.

Melillo G. Inhibiting hypoxia inducible factor 1 for cancer therapy. *Mol Cancer Res.* 2006; 4: 601-5.

Meric-Bernstam F, Esteva FJ. Potential role of mammalian target of rapamycin inhibitors in breast cancer therapy. *Clin breast Cancer.* 2005; 6: 357-360.

Mersin H, Yildirim E, Gulben K. Is invasive lobular carcinoma different from invasive ductal carcinoma? *Eur J Surg Oncol* 2003 May; 29 (4): 390-5.

Mezquita P, Parghi SS, Brandvold KA, Rudell A. Myc regulates VEGF production in B cells by stimulating initiation of VEGF mRNA translation. *Oncogene* 2005; 24; 24 (5): 889-901.

Miles DW, Chan A, Dirix LY. Phase III study of bevacizumab plus docetaxel compared with placebo plus docetaxel for the first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010; 28: 3239-3247.

Millauer B, Shawver LK, Plate KH. Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature.* 1994; 367: 576-579.

Miller KD, Wang M, Gralow J. A randomized phase III trial of paclitaxel vs paclitaxel plus bevacizumab as first-line therapy for locally recurrent or metastatic breast cancer: a trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group (E2100). *Breast Cancer Res Treat* 2005; 94 (Suppl 1)[Abstract 3].

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

Miller M, Smith D, Windsor A, Kessler A. Survivin gene expression and prognosis in recurrent colorectal cancer. *Gut.* 2001; 48: 137-8.

Minet E, Arnould T, Michel G, Roland I, Mottet D, Raes M, Remacle J, Michiels C. ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS Lett.* 2000; 18: 468 (1): 53-8.

Minet E, Michel G, Mottet D. Transduction pathways involved in Hypoxia-Inducible Factor-1 phosphorylation and activation. *Free Radic Biol Med.* 2001; 31: 847-855.

Minko T, Kopeckova P, Pozharov V, Jensen KD, Kopecek J. The influence of cytotoxicity of macromolecules and of VEGF gene modulated vascular permeability on the enhanced permeability and retention effect in resistant solid tumors. *Pharm Res.* 2000; 17: 505-14.

Mirza A, McGuirk M, Hockenberry TN, Wu Q, Ashar H, Black S, et al. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene.* 2002; 21: 2613-22.

Mizukami Y, Kohgo Y and Chung. Hypoxia inducible factor-1 independent pathways in tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 5670-5674.

Mizukami Y, Li J, Zhang X, Zimmer MA, Iliopoulos O, Chung DC. Hypoxia-inducible factor-1-independent regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia in colon cancer. *Cancer Res.* 2004; 64: 1765-1772.

Mohamed KM, Le A, Duong H, Wu Y, Zhang Q, Messadi DV. Correlation between VEGF and HIF-1 alpha expression in human oral squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol.* 2004; 76: 143-152.

Mohr S, Leikauf GD, Keith G, Rihn BH. MicroARRAYs as cancer keys: an array of possibilities. *J Clin Oncol.* 2002; 20: 3165-3175.

Mollica F, Jain RK, Netti PA. A model for temporal heterogeneities of tumor blood flow. *Microvasc Res.* 2003; 65: 56-60.

Mondesire WH, Jian W, Zhang H. Targeting mammalian target of rapamycin synergistically enhances chemotherapy-induced cytotoxicity in breast cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 7031-7042.

Monzo M, Rosell R, Felip E. A novel antiapoptosis gene: re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J Clin Oncol.* 1999; 17: 2100-4.

Morgensztern D, McLeod HL. PI3K/Akt/mTOR pathway as a target for cancer therapy. *Anticancer Drugs.* 2005; 16: 797-803.

Mori A, Wada H, Nishimura Y. Expression of the antiapoptosis gene survivin in human leukemia. *Int J Hematol.* 2002; 75: 161-5.

Moriai R, Tsuji N, Moriai M, Kobayashi D, Watanabe N. Survivin plays as a resistant factor against tamoxifen-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2009; 117: 261-271.

Morrell LE, Lee YJ, Huerley J, Arias M, Mies C, Richmann SP, Fernandez H, Donofrio KA, Raub Jr WA, Cassileth PA. A phase II trial of neoadjuvant methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in the treatment of patients with locally advanced breast carcinoma. *Cancer.* 1998; 82: 503-511.

Morrow M. Physical examination of the breast. In: Harris J, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, editors. *Diseases of the breast.* 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2004; 29-32.

Mueller H, Flury N, Eppenberger-Castori S, Kueng W, David F, Eppenberger U. Potential prognostic value of mitogen-activated protein kinase activity for disease-free survival of primary breast cancer patients. *Int J Cancer (Pred Oncol).* 2000; 89: 384-8.

Murnane JP. Telomere loss as a mechanism for chromosome instability in human cancer. *Cancer Res.* 2010; 70 (11): 4255-4259.

Murphy L, Cherlet T, Adeyinka A, Niu Y, Snell L, Watson P. Phospho-serine-118 estrogen receptor-alpha detection in human breast tumors in vivo. *Clinical Cancer Research.* 2004; 10: 1354-1359.

N

Nahta R, Yu D, Hung MC. Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2 targeted therapy in human breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 2006; 3: 269-280.

Nakashio A, Fujita N, Rokudai S. Prevention of phosphatidylinositol 3'-kinase-Akt survival signaling pathway during topotecan-induced apoptosis. *Cancer Res.* 2000; 60: 5303-5309.

Nakayama K, Kanzaki A, Hata K. Hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 alpha) gene expression in human ovarian carcinoma. *Cancer Lett.* 2002; 176:215-223.

Nassar A, Lawson D, Cotsonis G, Cohen C. Survivin and Caspase-3 expression in breast cancer: correlation with prognostic parameters, proliferation, angiogenesis and outcome. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2008; 16: 113-120.

Ni Z, Lou W, Leman ES, Gao AC. Inhibition of constitutively activated Stat3 signaling pathway suppresses growth of prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2000; 60: 1225-1228.

Nicholson KM, Anderson NG: The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal.* 2002; 14: 381-95.

Nicholson RI, Gee JM. Oestrogen and growth factor cross-talk and endocrine insensitivity and acquired resistance in breast cancer. *Br J Cancer.* 2000; 82: 501-13.

Nicholson RI, Gee JM, Harper ME, Ellis Io, Willsher P, Robertson JFR. erbB signalling in clinical breast cancer: relationship to endocrine sensitivity. *Endoc Rel Cancer.* 1997; 4: 1-9.

Nicholson RI, McClelland RA, Finlay P, Eaton CL, Gullick WJ, Dixon AR. Relationship between EGF-R, c-erbB2 protein expression and Ki-67 immunostaining in breast cancer and hormone sensitivity. *Eur J Cancer.* 1993; 29: 1018-23.

Nicholson RI, McClelland RA, Gee JM. Epidermal growth factor receptor expression in breast cancer: association with response to endocrine therapy. *Breast Cancer Res Treat.* 1994; 29: 117-125.

Nicholson RI, McClelland RA, Gee JM, Manning DL, Cannon P, Robertson JF. Transforming growth factor-alpha and endocrine sensitivity in breast cancer. *Cancer Res.* 1994; 54: 1684-9.

Nicholson RI, McClelland RA, Robertson JF. Involvement of steroid hormone and growth factor cross-talk in endocrine response in breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 1999; 6: 373-387.

Nielsen DL, Andersson M, Kamby C. HER2-targeted therapy in breast cancer. Monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Treat Rev.* 2009; 35 (2): 121-136.

Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, Hernandez-Boussard T, Livasy C, Cowan D, Dressler L, Akslen LA, Ragaz J, Gown AM, Gilks CB, van de Rijn M, Perou CM. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 5367-5374.

Niki T, Iba S, Tokunou M, Yamada T, Matsuno Y, Hirohashi S. Expression of vascular endothelial growth factor A, B, C, and their relationships to lymph node status in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2000; 6: 2431-2439.

Nills Díaz, Susan Minton, Charles Cox et al. Activation of STAT 3 in Primary Tumors from High-Risk Breast Cancer Patients Is Associated with Elevated Levels of Activated Src and Survivin Expression. *Clin Cancer Res* 2006; 12 (1): 20-28.

Niu G, Briggs J, Deng J, Ma Y, Lee H, Kortylewski M, Kujawski M, Kay H, Cress WD, Jove R, Yu H. Signal transducer and activator of transcription 3 is required for hypoxia-inducible factor-1 alpha RNA expression in both tumor cells and tumor associated myeloid cells. *Mol Cancer Res.* 2008; 6 (7): 1099-105.

Niu G, Wright KL, Huang M. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene.* 2002; 21: 2000-2008.

Niu ZB, Wang CL, Hou Y, Yang Y, Gao H. Expression of STAT 3, HIF-1 alpha and VEGF in Wilms'tumor. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2007; 9 (5): 461-4.

Nordsmark M, Overgaard M, Overgaard J. Pretreatment oxygenation predicts radiation response in advance squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother Oncol* 1996; 41: 31-9.

O

O-Charoenrat P, Rhys-Evans P, Eccles S. Expression and regulation of c-ERBB ligands in human head and neck squamous carcinoma cells. *Int J Cancer*. 2000; 88: 759-765.

O'Connor DS, Schechner JS, Adida C, et al. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells. *Am J Pathol*. 2000; 156: 393-398.

O'Driscoll L, Linehan R, Kennedy SM, Cronin D, Purcell R, Glynn S, et al. Lack of prognostic significance of survivin, survivin-delta Ex3, survivin-2B, galectin-3, bag, bax- and MRP-1 mRNAs in breast cancer. *Cancer Lett*. 2003; 201: 225-36.

Ogston KN, Miller ID, Payne S, Hutcheon AW, Sarkar TK, Smith I, Schofield A & Heys SD. A new histological grading system to assess reponse of breast cancers to primary chemotherapy: prognostic significance and survival. *The breast*. 12: 320-327 (2003).

Oh AS, Lorant LA, Holloway JN, Miller DL, Kern FG, El-Ashry D. Hyperactivation of MAPK induces loss of ERalpha expression in breast cancer cells. *Mol Endocrinol*. 2001; 15 (8): 1344-59.

Ohh M. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol*. 2000; 2 (7): 423-427.

Okada E, Murai Y, Matsui K, Isizawa S, Cheng C, Masuda M, Takano Y. Survivin expression in tumor cell nuclei is predictive of a favorable prognosis in gastric cancer patients. *Cancer Lett*. 2001; 163: 109-116.

Oku T, Tjuvajev JG, Miyagawa T, Sasajima T, Joshi A, Joshi R. Tumor growth modulation by sense and antisense vascular endothelial growth factor gene expression: effects on angiogenesis, vascular permeability, blood volume, blood flow, fluorodeoxyglucose uptake, and proliferation of human melanoma intracerebral xenografts. *Cancer Res*. 1998; 58: 4185-4192.

Okumura E, Fukuhara T, Yoshida H, et al. Akt inhibits Myt1 in the signaling pathway that leads to meiotic G2/M-phase transition. *Nat Cell Biol*. 2002; 4: 111-116.

O'Shaughnessy J, Miles D, Gray RJ. A meta-analysis of overall survival data from three randomized trials of bevacizumab (BV) and first-line chemotherapy as treatment for patients with metastatic breast cancer (MBC). *J Clin. Oncol*. 2010; 28 (Suppl.7): S7: abs.1005.

O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD. 2002. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the JAK/STAT pathway. *Cell* 109 Suppl: S121-31.

Osborne CK & Schiff R. Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *Journal of Clinical Oncology*. 2005; 23: 1616-1622.

Osborne CK, Shou J, Massarweh S. Crosstalk between estrogen receptor and growth factor receptor pathways as a cause for endocrine therapy resistance in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2005; 11: 865s-870s.

P

Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefinitib therapy. *Science*. 2004; 304: 1497-1500.

Paez J, Sellers WR. PI3K/PTEN/AKT pathway. A critical mediator of oncogenic signaling. *Cancer Treat Res*. 2003; 115: 145-167.

Page DL. Prognosis and breast cancer. Recognition of lethal and favourable prognostic types. *Am J Surg Pathol*. 1991; 15: 345-349.

Paik S, Shak S, Tang G. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004; 351: 2817-26.

Pantel K, Cote RJ, Fodstad O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst*. 1999; 91: 1113-24.

Park K, Han S, Shin E. EGFR gene and protein expression in breast cancers. *Eur J Surg Oncol*. 2007; 33: 956-960.

Park S, Ha SY, Cho HY, Chung DH, Kim NR, Hong JJ and Cho EK. Prognostic implications of hypoxia-inducible factor-1 alpha in epidermal growth factor receptor-negative non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2011 (72): 100-107.

Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, Quackkenbush JF, Stijleman IJ, Palazzo J, Marron JS, Nobel AB, Mardis E, Nielsen TO, Ellis Mj, Perou CM, Bernard PS. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009; 27 (8): 1160-1167.

Parton M, Krajewski S, Smith I. Coordinate expression of apoptosis-associated proteins in human breast cancer before and during chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2002; 8: 2100.

Peintinger F, Anderson K, Mazouni C, Kuerer HM, Hatzis C, Lin F. Thirty-gene pharmacogenomics test correlates with residual cancer burden after preoperative chemotherapy for breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2007; 13: 4078-82.

Peintinger F, Buzdar AU, Kuerer HM. Hormone receptor status and pathologic response of HER2-positive breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy and trastuzumab. *Ann Oncol*. 2008; 19: 2020-5.

Peintinger F, Kuerer HM, Mcguire SE. Residual specimen cellularity after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Br J Surg*. 2008; 95: 433-7.

Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S, Comoglio PM. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell*. 2003; 3: 347-361.

Peng X-H, Karna P, Cao Z, Jiang B-H, Zhou M & Yang L. Cross-talk between Epidermal Growth Factor Receptor and Hypoxia-inducible Factor-1 α signal pathways increases resistance to apoptosis by up-regulating Survivin gene expression. *Journal of Biological Chemistry* 281(36):25903-25914 (2006).

Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189 (2): 824-31.

Pérez E. Combining adjuvant chemotherapy with biologicals. *St. Gallen* 2007. *Breast* 2007; 16 (Suppl 1): S10 Abstract S34.

Perez-Tenorio G and Stal O. Activacion of AKT/PKB in breast cancer predicts a worse outcome among endocrine treated patients. *Br J Cancer*. 2002; 86: 540-545.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dake AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406: 747-52.

Petit T, Borel C, Ghannassia J-P, Rodier JF, Escande A, Mors R, Haegele P. Chemotherapy response of breast cancer depends on HER-2 status and anthracycline dose intensity in the neoadjuvant setting. *Clinical Cancer Research*. 2001; 7: 1577-81.

Petit T, Wilt M, Velten M. Comparative value of tumour grade, hormonal receptors, Ki-67, HER-2 and topoisomerase II alpha status as predictive markers in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy. *Eur J Cancer*. 2004; 40: 205-11.

Petita T, Wilt M, Velten M, Millon R, Rodier JF, Borel C, Mors R, Haegele P, Eber M, Ghnassia JP. Comparative value of tumour grade, hormonal receptors, Ki-67, HER2 and topoisomerase II alpha status as predictive markers in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy. *Eur J Cancer*. 2004; 40: 205-211.

Petrarca CR, Brunetto, AT, Duval V, Brondani A, Carvalho GP, Garicochea B. Survivin as a predictive biomarker of complete pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in patients with stage II and stage III breast cancer. *Clinical Breast Cancer*. 2011; 11 (2): 129-134.

Pietras RJ, Arboleda J, Reese DM, et al. HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene*. 1995; 10: 2435-2446.

Piras F, Murtas D, Minerba L, Ugalde J, Floris C. Nuclear survivin is associated with disease recurrence and poor survival in patients with cutaneous malignant melanoma. *Histopathology*. 2007; 50: 835-842.

Pitti RM, Marstera SA, Lawrence DA, Roy M, Kischkel FC, Dowd P, Huang A, Donahue CJ, Sherwood SW, Baldwin DT, Godowski PJ, Wood WI, Gurney AL, Hillan KJ, Cohen RL, Goddard AD, Botstein D, and Ashkenazi A. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature*. 1998; 396: 699-703.

Pohl G, Rudas M, Taucher S. Expression of cell cycle regulatory proteins in breast carcinomas before and after preoperative chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2003; 78: 97-103.

Portera CC, Swain SM. Neoadjuvant chemotherapy: a step closer to individualized therapy. In Govindan R, editor. *ASCO educational book*. Alexandria, VA: ASCO; 2007. P.51-5.

Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* 1997; 57 (20); 4593-9.

Prisack HB, Karreman C, Modlich O, Audretsh W, Danae M, Rezai M. Predictive biological markers for response of invasive breast cancer to anthracycline/cyclophosphamide-based primary (radio-chemotherapy). *Anticancer Research*. 2005; 25: 4615-21.

Prueitt RL, Boersma BJ, Howe TM, Goodman JE, Thomas DD, Ying L, Pfiester CM, Yfantis HG, Cottrell JR, Lee DH, Remaley AT, Hoseth LJ, Wink DA, Ambs S. Inflammation and IGF-1 activate the Akt pathway in breast cancer. *Int J Cancer*. 2007; 120: 796-805.

Pusztai L, Jeong JH, Gong Y. Evaluation of microtubule-associated protein-T expression as a prognostic and predictive marker in NSABP-B28 randomized clinical trial. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 4287-92.

Q

Quentin T, Schlott T, Korabiowska M, Kathei N, Zoller G, Glaser F, Kunze E. Alteration of the vascular endothelial growth factor and angiopoietins-1 and 2 pathways in transitional cell carcinomas of the urinary bladder associated with tumor progression. *Anticancer Res* 2004; 24 (5 A): 2745-2756.

Quintero M, Brenna PA, Thomas GJ, Moncada S. Nitric oxide is a factor in the stabilization of hypoxia-inducible factor-1-alpha in cancer: role of free radical formation. *Cancer Res*. 2006; 66: 770-4.

R

Rakha EA, Ellis IO. Triple negative/basal-like breast cancer: review. *Pathology*. 2009; 41: 40-47.

Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Basal-like breast cancer: a critical review. *J Clin Oncol*. 2008; 26: 2568-81.

Rakha EA, Tan DS, Foulkes WD, Ellis IO, Tutt A, Nielsen TO, Reis-Filho JS. Are triple-negative tumours and basal-like breast cancer synonymous? *Breast Cancer Res*. 2007; 9: 404.

Raleigh JA, Dewhirst MW, Thrall DE. Measuring tumor hypoxia. *Semin Radiat Oncol*. 1996; 6: 37-45.

Ranieri G, Patruno R, Ruggieri E. Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a target of bevacizumab in cancer: From the biology to the clinic. *Curr Med Chem*. 2006; 13: 1845-57.

Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD, Geyer CE, Kahlenberg MS, Robidoux A, Margolese RG, Hoehn JL, Pajon ER, Wright MJ, Robert J, Paik S, Mamounas EP, Wolmark N. Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. *J Clin Oncol*. 2008; 26: 778-785.

Rathmell JC and Thompson CB. The central effectors of cell death in the immune system. *Annu. Rev: Immunol*. 1999; 17: 781-828.

Ravaioli A, Bagli L, Zucchini A, Monti F. Prognosis and prediction of response in breast cancer: the current role of the main biological markers. *Cell Prolif*. 1998; 31: 113-126.

Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL, Bedi A. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev*. 2000; 14: 34-44.

Reed JC. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol*. 1999; 17: 2941-53.

Reis-Filho JS., Westbury C. The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. *J Clin Pathol*. 2006; 59: 225-231.

Richard DE, Berra E, Gothie E. P42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem*. 1999; 274: 32631-32637.

Ring AE, Smith IE, Ashley S, Fulford LG, Lakhani SR. Oestrogen receptor status, pathological complete response and prognosis in patients receiving neoadjuvant chemotherapy for early breast cancer. *Br J Cancer*. 2004; 91: 2012-2017.

Roberts WG, Palade GE. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci* 1995; 108 (Pt 6): 2369-79.

Rody A, Karn T, Gätje R. Gene expression profiling of breast cancer patients treated with docetaxel, doxorubicin, and cyclophosphamide within the GEPARTRIO trial: HER-2, but not topoisomerase II alpha and microtubule-associated protein tau, is highly predictive of tumor response. *Breast*. 2007; 16: 86-93.

Rosai J. *Surgical Pathology*. In: Rosai J. 9.^a ed. Philadelphia: Mosby 2004; 1826.

Ross JS. Breast cancer biomarkers and HER2 testing after 10 years of anti-HER2 therapy. *Drug News Perspect*. 2009; 22 (2): 93-106.

Ross JS. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *The oncologist* 2003; 8: 307-325.

Roudier E, Mistafa O, Stenius U. Statins induce mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated inhibition of Akt signaling and sensitize p53-deficient cells to cytostatic drugs. *Mol Cancer Ther*. 2006; 5: 2706-2715.

Rouzier R, Perou CM, Symmans WF. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2005; 11: 5678-85.

Rouzier R, Pusztai L, Delaloge S, et al. Normograma to predict pathologic complete response and metastases-free survival after preoperative chemotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 8331-9.

Rouzier R, Rajan R, Hess KR. Microtubule associated protein T is a predictive marker and modulator of response to paclitaxel containing preoperative chemotherapy in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 8315-20.

Ruddell A, Mezquita P, Brandvold KA, Farr A, Iritani BM. B lymphocyte-specific c Myc expression stimulates early and functional expansion of the vasculature and lymphatics during lymphomagenesis. *Am J Pathol* 2003; 163 (6): 2233-45.

Russo J, Hu YF, Russo IH. Chapter 1: Developmental, cellular, and molecular basis of human breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute Monographs* 27: 17-37 (2000).

Ryan BM, Konecny GE, Kahlert SI. Survivin expression in breast cancer predicts clinical outcome and is associated with HER2, VEGF, urokinase plasminogen activator and PAI-1. *Ann Oncol*. 2006; 17: 597-604.

Ryan B, O'Donovan N, Browne B. Expression of survivin and its splice variants survivin-2B and survivin-DeltaEx3 in breast cancer. *Br J Cancer*. 2005; 92: 120-4.

Ryan HE, Lo J, Johnson RS. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J*. 1998; 17: 3005-3015.

Ryan HE, Poloni M, McNulty W, Elson D, Gassmann M, Arbeit JM, Johnson RS. Hypoxia-inducible factor-1 alpha is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res*. 2000; 60: 4010-4015.

Rydén L, Linderholm B, Nielsen NH, Emdin S, Jonsson PE, Landberg G. Tumor specific VEGF-A and VEGFR2/KDR protein are co-expressed in breast cancer. *Breast cancer Res Treat*. 2003; 82: 147-154.

S

Saad RS, Liu Y, Han H, Landreneau RJ, Silverman JF. Prognostic significance of HER2/neu, p53, and vascular endothelial growth factor expression in early stage

conventional adenocarcinoma and bronchioloalveolar carcinoma of the lung. *Mod Pathol.* 2004; 17 (10): 1235-42.

Safwat MD, Habib F, Elayat A, Oweiss N, Reffat S and Algaidi S. Morphometric and immunohistochemical study of angiogenic marker expressions in invasive ductal carcinomas of the human breast. *Folia Morphol* 2009; 68 (3): 144-155.

Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem.* 1997; 272: 22642-7.

Salh B, Marotta A, Matthewson C, Ahluwalia M, Flint J, Owen D, et al. Investigation of the Mek-MAP kinase-Rsk pathway in human breast cancer. *Anticancer Res.* 1999; 19: 731-40.

Sampath J, Pelus LM, Alternative splice variants of surviving as potential targets in cancer. *Curr Drug Discov Technol.* 2007; 4: 174-91.

Sánchez-Rovira P, Antón A, Barnadas A, Velasco A, Lomas M, Rodriguez-Pinilla M, Ramírez JL, Ramírez, C, Ríos MJ, Castellá E, García-Andrade C, San Antonio B, Carrasco E, Palacios JL. Classical markers like ER and Ki-67, but also surviving and pERK, could be involved in the pathological response to gemcitabine, Adriamycin and paclitaxel (GAT) in locally advanced breast cancer patients: results from the GEICAM/2002-01 phase II study. *Clin Transl Oncol.* 2012; 14: 430-436.

Santen RJ, Song RX, McPherson. The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol Biol.* 2002; 80 (2): 239-56.

Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol.* 2004; 14: 1296-1302.

Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, et al. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 2005; 307 (5712): 1098-1101.

Sarela AI, Macadam RC, Farmery SM, Markham AF, Guillou. Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut.* 2000; 46: 645-650.

Sarela AI, Scott N, Ramsdale J, Markham AF, Guillou PJ. Immunohistochemical detection of the anti-apoptosis protein, survivin, predicts survival after curative resection of stage II colorectal carcinomas. *Ann Surg Oncol.* 2001; 8: 305-10.

Sartor CI, Dziubinski ML, Yu CL, Jove R, Ethier SP. Role of epidermal growth factor receptor and STAT-3 activation in autonomic proliferation of SUM-102PT human breast cancer cells. *Cancer Res.* 1997; 57: 978-87.

Sassen A, Rochon J, Wild P, Hartmann A, Hofstaedter F, Schwarz S, Brockhoff G. Cytogenetic analysis of HER1/EGFR, HER2, HER3 and HER4 in 278 breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2008; 10: R2.

Satoh K, Kaneko, Hirota M, Masamune A, Satoh A, Shimosegawa T. Expression of survivin is correlated with cancer cell apoptosis and is involved in the development of human pancreatic duct cell tumors. *Cancer.* 2001; 92: 271-278.

Sauer G, Deissler H. Angiogenesis: prognostic and therapeutic implications in gynecology and breast malignancies. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2003; 15: 45-49.

Scaffifi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, and Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 1998; 17: 1675-1687.

Scarpino S, Cancellario d'Alena F, Di Napoli A, Pasquini A, Marzullo A. Increased expression of Met protein is associated with up-regulation of hypoxia inducible factor-1

(HIF-1) in tumor cells in papillary carcinoma of the thyroid. *J Pathol.* 2004; 202: 352-358.

Schaeffer HJ, Weber MJ. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol.* 1999; 19: 2435-2444.

Schiff R, Massarweh SA, Shou J, Bharwani L, Mohsin SK, Osborne CK. Cross-talk between estrogen receptor and growth factor pathways as a molecular target for overcoming endocrine resistance. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 331S-336S.

Schiff R, Massarweh SA, Shou J, Osborne CK. Breast cancer endocrine resistance : how growth factor signaling and estrogen receptor coregulators modulate response. *Clinical Cancer Research.* 2003; 9: 447S-454S.

Schindl M, Schoppmann SF, Samonigg H, Hausmaninger H, Kwasny W, Gnant M, Jakesz R, Kubista E, Birner P, Oberhuber G, for Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha is associated with an unfavourable prognosis in lymph node-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002, 8: 1831-1837.

Schindler C, Darnell JE, Jr. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK STAT pathway. *Annu Rev Biochem.* 1995; 64: 621-51.

Schirrmeister H. Detection of Bone Metastases in Breast Cancer by Positron Emission Tomography Radiologic. *Clinics of North America*, Volume 45, Issue 4, July 2007; 669-676.

Schlette EJ, Medeiros LJ, Goy A, Lai R, Rassidakis GZ. Survivin expression predicts poorer prognosis in anaplastic large-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2004; 22: 1682-8.

Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, Ahr A, Blankenstein TJ. From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 7737-42.

Schmitz I, Kirchhoff S, and Krammer PH. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int. J. Biochem Cell Biol.* 2000; 32: 1123-36.

Schmitz KJ, Otterbach F, Gallies R. Prognostic relevance of activated Akt kinase in node-negative breast cancer: a clinicopathological study of 99 cases. *Mod Pathol.* 2004; 17: 15-21.

Schneider J, Pollan M, Tejerina A. Accumulation of uPA-PAI-1 complexes inside the tumour cells is associated with axillary nodal invasion in progesterone-receptor-positive early breast cancer. *Br J Cancer.* 2003; 88: 96-101.

Scholl SM, Pierga JY, Asselain B, Beuzebec P, Dorval T, García-Giralt E, Jouve M, Palagié T, Remvikos Y, Durand JC. Breast tumour response to primary chemotherapy predicts local and distant control as well as survival. *Eur J Cancer.* 1995; 31A: 1969-75.

Schoppmann SF, Bayer G, Aumar K. Prognostic value of lymphangiogenesis and lymphovascular invasion in invasive breast cancer. *Ann Surg.* 2004; 240 (2): 306-312.

Schoppmann SF, Fenzl A, Nagy K. VEGF-C expressing tumor-associated macrophages in lymph node positive breast cancer: impact on lymphangiogenesis and survival. *Surgery.* 2006; 139: 839-846.

Schoppmann SF, Tamandl D, Roberts L, Jomrich G, Schoppmann A, Zwrtek R, Dubsy P, Gnant M, Jakesz R and Birner P. HER2/neu expression correlates with vascular endothelial growth factor-C and lymphangiogenesis in lymph node-positive breast cancer. *Annals of Oncology.* 2010; 21: 955-960.

Schraml P, Kononen S, Bubendorf L, Moch H, Bissig H, Nocito A, Mihatsch MJ, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microARRAYs for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin Cancer Res.* 1999; 5: 1966-1975.

Schwartzman, RA and Cidlowski, JA. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr. Rev.* 1993; 14: 133-51.

Secades P, Rodrigo JP, Hermsen M, Alvarez C, Suarez C, Chiara MD. Increase in gene dosage is a mechanism of HIF-1 α constitutive expression in head and neck squamous cell carcinomas. *Genes, chromosomes & cancer.* 2009; 48: 441-454.

Seidman JD, Schnaper LA, Aisner SC. Relationship of the size of the invasive component of the primary breast carcinoma to axillary lymph node metastasis. *Cancer* 1995 Jan; 75 (1): 65-71.

Semenza GL. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol.* 2001; 13: 167-71.

Semenza GL. HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev.* 2000; 14: 1983-1991.

Semenza GL. HIF-1 mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol.* 2000; 88: 1474-1480.

Semenza GL. Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2000; 35: 71-103.

Semenza GL. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999; 15: 551-78.

Semenza GL. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol.* 2002; 64: 993-998.

Semenza GL. Targeting HIF 1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 721-32.

Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992;12:5447-5454.

Semiglazov VF SV, Inavov V. The relative efficacy of neoadjuvant endocrine therapy vs chemotherapy in postmenopausal women with ER positive breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol*: pp 519 (abs), 2004.

Senger DR, Van De Water L, Brown LF, Nagy JA, Yeo T-K, Berse B, Jackman RW, Dvorkin AM, Dvorak HF. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev.* 1993; 12: 303-324.

Shen GH, Ghazizadeh M, Kawanami O. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in human ovarian carcinoma. *Br J Cancer.* 2000; 83: 196-203.

Sheen-Chen SM, Huang CC, Tang RP, Chou FF, Eng HL. Prognostic value of signal transducers and activators of transcription 3 in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008 Sep; 17 (9): 2286-90.

Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol.* 2006; 39 (5): 469-478.

Shigematsu H and Gazdar AF. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signalling pathway in lung cancer. *Int J Cancer.* 2006; 118: 257-262.

Shigematsu H, Lin L, Takahashi T. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97: 339-46.

Shim WS, Conaway M, Masamura S, Yue W, Wang JP, Kmar R, Santen RJ. Estradiol hypersensitivity and mitogen-activated protein kinase expression in long-term estrogen deprived human breast cancer cells in vivo. *Endocrinology.* 2000; 141 (1): 396-405.

Shimizu Y, Segawa T, Inoue T, Shiraishi T, Yoshida T, Toda Y, Yamada T, Kinukawa N, Terada N, Kobayashi T, Kinoshita H, Kamoto T, Nakamura E, Ogawa O. Increased Akt and phosphorylated Akt expression are associated with malignant

biological features of prostate cancer in japanese men. *BJU International*. 2007; 100: 685-690.

Shin I, Yakes FM, Rojo F. PKB/Akt mediates cell cycle progression by phosphorylation of p27 (Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med*. 2002; 8: 1145-1152.

Shokuhi S, Clarke D. *Surgical techniques in breast cancer Surgery (Oxford)*, Volume 25, Issue 6, June 2007; 268-271.

Shtilbans V, Wu M, Burstein DE. Current overview of the role of Akt in cancer studies via applied immunohistochemistry. *Ann Diagn Pathol*. 2008; 12: 153-160.

Shuai K and Liu B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3: 900-911.

Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 1992; 359: 843-845.

Singh M, Bleile MJ, Shoyer AL, Heinz D, Jarboe EA, Shroyer KR. Analysis of surviving expression in a spectrum of benign to malignant lesions of the breast. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2004; 12 (4): 296-304.

Singletary KW, Gapstur SM. Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental mechanisms. *JAMA* 2001 Nov 7; 286 (17): 2143-51.

Sivaraman VS, Wang H, Nuovo GJ, Malbon CC. Hyperexpression of mitogen-activated protein kinase in human breast cancer. *J Clin Invest*. 1997; 99 (7): 1478-83.

Sjostrom J. Predictive factors for response to chemotherapy in advanced breast cancer *Acta Oncologica*. 2002; 41: 334-45.

Skinner HD, Zheng JZ, Fang J, Agani F and Jiang B. Vascular endothelial growth factor transcriptional activation is mediated by hypoxia-inducible factor 1 α , HDM2 and p70S6K1 in response to phosphatidylinositol 3 kinase/Akt signaling. *J Biol Chem*. 2004; 279: 45643-45651.

Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastases. *Nat Med*. 2001; 7: 192-198.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987; 235 (4785): 177-182.

Slamon DDJ, Godolphin W, Jones LA. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989; 244: 707-712.

Smith IC, Heys SD, Hutcheon AW, Miller ID, Payne S, Gilbert FJ, Ah-See AK, Eremin O, Walker LG, Sarkar TK, Eggleton SP, Ogston KN. Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: significantly enhanced response with docetaxel. *J Clin Oncol*. 2002; 20: 1456-1466.

Smith IE, Dowsett M, Ebbs SR. Neoadjuvant treatment of postmenopausal breast cancer with anastrozole, tamoxifen, or both in combination: the Immediate Preoperative Anastrozole, Tamoxifen, or Combined with Tamoxifen (IMPACT) multicenter double-blind randomized trial. *J Clin Oncol* 23: 5108-16, 2005.

Smith IA, Miller ID. Issues involved in research into the neoadjuvant treatment of breast cancer. *Anticancer Drugs*. 2001; 12 Suppl 1: S25-9.

Smith RA, Salow D, Sauyer KA. American Cancer Society guidelines for breast cancer screening: Update 2003. *CA. Cancer J Clin* 2003; 53: 141-169.

Sohn DM, Kim SY, Baek MJ, Lim CW, Lee MH, Cho MS. Expression of surviving and clinical correlation in patients with breast cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2006; 60: 289-292.

Soilleux EJ, Turley H, Tian YM, Pugh CW, Gatter KC, Harris AL. Use of novel monoclonal antibodies to determine the expression and distribution of the hypoxia regulatory factors PHD-1, PHD-2, PHD-3 and FIH in normal and neoplastic human tissues. *Histopathology*. 2005; 47: 602-610.

Son BH, Choi JS, Lee JH. Prognostic values of KAI1 and survivin expression in an infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Pathology*. 2005; 37 (2): 131-6.

Song CH, Park SY, Eom KY, Kim JH, Kim SW, Kim JS, Kim A. Potential prognostic value of heat-shock protein 90 in the presence of phosphatidylinositol-3-kinase overexpression or loss of PTEN, in invasive breast cancers. *Breast Cancer Research*. 2010; 12: R20.

Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med*. 2005; 9: 59-71.

Song JI, Grandis JR. STAT signalling in head and neck cancer. *Oncogene*. 2000; 19: 2489-95.

Song RX, Santen RJ. Cancer. Membrane initiated estrogen signalling breast cancer. *Biology of Reproduction* 75: 9-16 (2006). Spinella F, Rosano L, Di C. Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia-inducible factor-1 alpha in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 27850-5.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lonning P, Borresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 10869-10874.

Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lonning PE, Brown PO, Borresen-Dale AL, Botstein D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 8418-8423.

Span PN, Bussink J, Manders P, Beex LV, Sweep CG. Carbonic anhydrase-9 expression levels and prognosis in human breast cancer: association with treatment outcome. *Br J Cancer*. 2003; 89: 271-6.

Span PN, Sweep FC, Wiegerinck ET. Survivin is an independent prognostic marker for risk stratification of breast cancer patients. *Clin Chem*. 2004; 50: 1986-93.

Span PN, Tjan-Heijnen VC, Manders P, van Tienoven D, Lehr J, Sweep FC. High survivin predicts a poor response to endocrine therapy, but a good response to chemotherapy in advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2006; 98: 223-230.

Spataro V, Price K, Goldhirsch A, Cavalli F, Simoncini E, Castiglione M, Rudenstam CM, Collins J, Lindtner J, Gelber RD. Sequential estrogen receptor determinations from primary breast cancer at relapse: prognostic and therapeutic relevance. The International Breast Cancer Study Group (formerly Ludwig Group). *Ann Oncol*. 1992; 3 (9): 733-40.

Spinella F, Rosano L, Di C. Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia inducible factor-1 alpha in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem*. 2002; 277: 27850-5.

Staal SP. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84: 5034-5037.

Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, Jackson DG, Nishikawa S, Kubo H and Achen MG. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumour cells via the lymphatics. *Nat Med*. 2001; 7: 186-191.

Stal O, Pérez-Tenorio G, Akerberg L, Olsson B, Nordenskjöld B, Skoog L, Rutqvist LE. Akt kinases in breast cancer and the results of adjuvant therapy. *Breast Cancer Res.* 2003; 5: R37-R44.

Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cel.* 1998; 95: 29-39.

Stemke-Hale K, González-Angulo AM, Lluch A, Neve RM, Kuo WL, Davies M, Carey M, HU Z, Guan Y, Sahin A, Symmans WF, Pusztai L, Nolden LK, Horlings H, Brns K, Hung MC, van de Vijver MJ, Valero V, Gray JW, Bernards R, Mills GB, Hennessy BT. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res.* 2008; 68: 6084-6091.

Straver ME, Glas AM, Hannemann J, Wesseling J, van de Vijver MJ, Rutgers EJ, Vrancken Peeters TFD, van Tinteren H, van't Veer LJ, Rodenhuis S. The 70-gene signature as a response predictor for neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010; 119: 551-558.

Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharaoh P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32825 patients. *Breast.* 2008; 17: 323-334.

Sun M, Wang G, Paciga JE, Feldman RI, Yuan ZQ, Ma XL, Shelley SA, Jove R, Tschlis PN, Nicosia SV, Cheng JQ. Akt/PKB α kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. *Am J Pathol.* 2001; 159: 431-437.

Suo Z, Risberg B, Kalsson M, Willmann K, Tierens A, Skovlund E, Nesland J. EGFR family expression in breast carcinomas. C-erbB-2 and c-erbB-4 receptors have different effects on survival. *J Pathol.* 2002; 196: 17-25.

Swana HS, Grossman D, Anthony JN, Weiss RM, Altieri DC. Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer. *N Engl J Med.* 1999; 341: 452-453.

Swanton C, Marani M, Pardeo O. Regulators of mitotic arrest and ceramide metabolism are determinants of sensitivity to paclitaxel and other chemotherapeutic drugs. *Cancer Cell.* 2007; 11: 498-512.

Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C, Rajan R, Kuerer HM, Valero V, Assad L, Poniecka A, Hennessy TJ, Green MC, Buzdar AU, Singletary SE, Hortobagyi GN, Pusztai L. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol.* 25: 4414-4422.

T

Tabar L, Yen MF, Vitak B. Mammography service screening and mortality in breast cancer patients: 20 year follow-up before and after introduction of screening. *Lancet* 2003; 361: 1405-1410.

Tabchy A, Valero, Vidaurre T, Lluch A, Gomez H, Martin M, Qi Y, Barajas-Figueroa LJ, Souchon E, Coutant C, Doimi FD, Ibrahim NK, Gong Y, Hortobagyi GN, Hess KR, Fraser Symmans WF, Pusztai L. Evaluation of a 30-gene paclitaxel, fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide chemotherapy response predictor in a multicentre randomized trial in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2010; 16 (21): 5351-5361.

Taghian AG, Abi-Raad R, Assaad SI. Paclitaxel decreases the interstitial fluid pressure and improves oxygenation in breast cancers in patients treated with neoadjuvant chemotherapy: clinical implications. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 1951-61.

Takagi H, King GL, Aiello LP. Hypoxia upregulates glucose transport activity through an adenosine-mediated increase of GLUT1 expression in retinal capillary endothelial cells. *Diabetes.* 1998; 47: 1480-1488.

Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, Reed JC. IAP family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res.* 1998; 58 (23): 5315-20.

Tan PH, Bay BH, Yip G, Selvarajan S, Tan P, Wu J, Lee CH and Li KB. Immunohistochemical detection of Ki 67 in breast cancer correlates with transcriptional regulation of genes related to apoptosis and cell death. *Modern Pathology,* 2005; 18: 374-381.

Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2000; 6: 127-34.

Tanioka M, Shimizu C, Yonemori K, Yoshimura K, Tamura K, Kouno T, Ando M, Katsumata N, Tsuda H, Kinoshita T, Fujiwara Y. Predictors of recurrence in breast cancer patients with a pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy. *British Journal of Cancer.* 2010; 103: 297-302.

Tao J, Shulan Z, Bei L, Changqing Z. The role of survivin gene in the chemoresistance of ovarian cancer cell. *Singapore J Obst Gynaecol.* 2004; 35: 40-7.

Testa JR, Bellacosa A. Akt plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 10983-5.

Tewari M, Krishnamurthy A, Shukla HS. Predictive markers of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Surgical Oncology.* 2008; 17: 301-311.

Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-I. *Science* 1999; 286 (5449): 2511-4.

Tiezzi DG, Andrade JM, Ribeiro-Silva A. HER2, p53, p21 and hormonal receptors proteins expression as predictive factors of response and prognosis in locally advanced breast cancer treated with neoadjuvant docetaxel plus epirubicin combination. *BMC Cancer.* 2007; 7: 36.

Toi M, Nakamura S, Kuroi K, Iwata H, Ohno S, Masuda N, Kusama M, Yamazaki K, Hisamatsu K, Sato Y, Kashiwaba M, Kaise H, Kurosumi M, Tsuda H, Akiyama F, Ohashi Y, Takatsuka Y. Phase II study of preoperative sequential FEC and docetaxel predicts of pathological response and disease free survival. *Breast Cancer Res Treat.* 2008. 110; 531-539.

Tokunaga E, Kataoka A, Kimura Y, Oki E, Mashino K, Nishida K, Koga T, Morita M, Kakeji Y, Baba H, Ohno S, Maehara Y. The association between Akt activation and resistance to hormone therapy in metastatic breast cancer. *Eur J Cancer.* 2006; 42: 629-635.

Tokunaga E, Kimura Y, Mashino K, Oki E, Kataoka A, Ohno S, Morita M, Kakeji Y, Baba H, Maehara Y. Activation of PI3K/Akt signaling and hormone resistance in breast cancer. *Breast Cancer.* 2006; 13: 137-144.

Tokunaga E, Kimura Y, Oki E, Ueda N, Futatsugi M, Mashino K, Yamamoto M, Ikebe M, Kakeji Y, Baba H, Maehara Y. Akt is frequently activated in HER2/neu-positive breast cancers and associated with poor prognosis among hormone-treated patients. *Int J Cancer.* 2006; 118: 284-289.

Tomes L, Emberley E, Niu Y, Troup S, Pastorek J, Strange K, Harris A, Watson PH. Necrosis and hypoxia in invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* 2003; 81: 61-69.

Tordai A, Wang J, Andre F, Liedtke C, Yan K, Sotiriou C. Evaluation of biological pathways involved in chemotherapy response in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2008; 10: R37.

Tran J, Master Z, Yu JL, Rak J, Dumont DJ, Kerbel RS. A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99 (7): 4349-54.

Tran J, Rak J, Sheehan C, Saibil SD, LaCasse E, Korneluk RG. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 264 (3): 781-8.

Trastour C, Benizri E, Ettore F. HIF-1alpha and CA IX staining in invasive breast carcinomas: prognosis and treatment outcome. *Int J Cancer.* 2007; 120: 1451-1458.

Trentesaux C, Riou JF. Senescence and cellular immortality. *Bull Cancer.* 2010; 97 (11): 1275-1283.

Tsutsui S, Inoue H, Yasuda K. Angiopoietin 2 expression in invasive ductal carcinoma of the breast: its relationship to the VEGF expression and microvessel density. *Breast Cancer Res Treat.* 2006; 98: 261-266.

Tsutsui S, Inoue H, Yasuda K. Inactivation of PTEN is associated with a low p27^{kip1} protein expression in breast carcinoma. *Cancer.* 2005; 104: 2048-2053.

Tsutsui S, Kume M and Era S. Prognostic value of microvessel density in invasive ductal carcinoma of the breast. *Breast Cancer.* 2003; 10: 312-319.

Tsutsui S, Yasuda K, Suzuki K, Tahara K, Higashi H, Era S. Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: the relationship with VEGF expression and microvessel density. *Oncol Rep.* 2005; 14: 425-431.

Tsutsui S, Ohno S, Murakami S, Hachitanda Y, Oda S. Prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGFR) and its relationship to the estrogen receptor status in 1029 patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2002; 71: 67-75.

Turkson J, Jobe R. STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene.* 2000; 19: 6613-26.

Tzaida O, Gogas H, Dafni U. Evaluation of the prognostic and predictive value of HER-1 of HER-1/EGFR in breast cancer patients participating in a randomized study with dose-dense sequential adjuvant chemotherapy. *Oncology.* 2008; 72: 388-396.

U

Untch M. Neoadjuvant treatment of HER2 overexpressing primary breast cancer with trastuzumab given concomitantly to epirubicin/cyclophosphamide followed by docetaxel +/- capecitabine. First analysis of efficacy and safety of the GBG/AGO multicentre intergroup-study "GeparQuattro". Paper presented at: 6th European Breast Cancer Conference; 15-19 April 2008; Berlin, Germany. Abstract 0450.

Untch M, Konency G, Ditsch N, Sorokina Y, Moebus V, Muck B, Kuhn W, Bastert G, Werner Ch, Thomssen Ch, Wallwiener D, Albert U, Bothmann G, Kreienberg R, Lück HJ. Dose-dense sequential epirubicin-paclitaxel as preoperative treatment of breast cancer: Results of a randomized AGO study [abstract]. *Proc Am Soc Clin Oncol.* 2002; 21: 34 a.

Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M. Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer Res.* 2004; 64: 2941-2955.

V

Valtola R, Salven P, Heikkila P. VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *Am J Pathol.* 1999; 154: 1381-1390.

Van Crujisen H, Gallegos Ruiz M, Van der Valk P, D de Gruijl T, and Giaccone G. Tissue micro array analysis of ganglioside N-glycolyl GM3 expression and signal transducer and activator of transcription (STAT)-3 activation in relation to dendritic cell infiltration and microvessel density in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 2009, 9: 180.

Van Rijk MC, Tanis PJ, Nieweg OE, Loo CE, Valdés-Olmos RA, Olenburg HS.A. Sentinel node biopsy and concomitant probe-guided tumor excision of nonpalpable breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 2006; 14: 627-32.

Van der Hage JA, van de Velde CJ, Julien JP, Tubiana-Hulin M, Vandervelden C, Duchateau L. Preoperative chemotherapy in primary operable breast cancer: results from the European Organization for Research and Treatment of Cancer Trial 10902. *J Clin Oncol.* 2001; 19: 4224-4237.

Vandermoere F, El Yazidi-Belkoura I, Adriaenssens E, Lemoine J, Hondermarck H. The antiapoptotic effect of fibroblast growth factor-2 is mediated through nuclear factor-kappa B activation induced via interaction between Akt and Kappa B kinase-beta in breast cancer cells.

Van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002 Jan 31; 415 (6871): 530-6.

Vasudevan KM, Barbie DA, Rabinovsky R, McNear CJ, Kim JJ, Hennessy BT, Tseng H, Pochanard P, Kim SY, Dunn IF, Schinzel AC, Dandy P, Hoersch S, Sheng Q, Gupta PB, Boehm JS, Reiling JH, Siver S, Lu Y, Stemke-Hale K, Dutta B, Joy C, Sahin AA, González-Angulo AM, Lluch A, Rameh LE, Jacks T, Root DE, Lander ES, Mills GB, Hahn WC, Sellers WR, Garraway LA. AKT-independent signalling downstream of oncogenic PIK3CA mutations in human cancer. *Cancer Cell.* 2009; 16: 21-32.

Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res.* 1989; 49 (23): 6449-6465.

Vaupel P, Mayer A, Briest S, Hockel M. Oxygenation gain factor: a novel parameter characterizing the association between hemoglobin level and the oxygenation status of breast cancers. *Cancer Res* 2003; 63: 7634-7.

Vaupel P, Schlenger K, Knoop C. Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancer by computerized O₂ tension measurements. *Cancer Res.* 1991; 51: 3316-22.

Vaupel P, Thews O, Hoeckel M. Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Med Oncol.* 2001; 18: 243-259.

Vazquez F, Sellers WR. The PTEN tumor suppressor protein: an antagonist of phosphoinositide 3-kinase signalling. *Biochem Biophys Acta.* 2000; 1470: M21-M35.

Vegran F, Boidot R, Oudin C, Riedinger JM, Lizard-Nacol S. Distinct expression of Survivin splice variants in breast carcinomas. *Int J Oncol.* 2005; 4: 11.

Verdecia MA, Huang H, Dutil E, Kaiser DA, Hunter T, Noel JP. Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nat Struct Biol.* 2002; 7: 620-3.

Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, and Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP protein. *Cell.* 2000; 102: 43-53.

Viani GA, Afonso SL, Stefano EJ, de Fendi LI, Soares FV. Adjuvant trastuzumab after in the treatment of HER-2 positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomised trials. *BMC Cancer* 2007; 7: 153.

Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2: 489-501.

Vleugel MM, Greijer AE, Shvarts A, van der Groep P, van Berkel M, Aarbodem Y, van Tinteren H, Harris AL, van Diest PJ, van der Wall E. Differential prognostic impact of hypoxia induced and diffuse HIF-1 alpha expression in invasive breast cancer. *J Clin Pathol.* 2005; 58: 172-177.

Vleugel MM, Shvarts D, van der Wall E, van Diest PJ. p300 and p53 levels determine activation of HIF-1 downstream targets in invasive breast cancer. *Hum Pathol.* 2006; 37 (8): 1085-1092.

Volm M, Koomagi R. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer. *Anticancer Res.* 2000; 20: 1527-1533.

Von Minckwitz G, Blohmer JU, Raab G, Lohr A, Gerber B, Heinrich G. In vivo chemosensitivity adapted preoperative chemotherapy in patients with early-stage breast cancer: The GEPARTRIO pilot study. *Annals of Oncology.* 2005; 16: 56-63.

Von Minckwitz G, Kummel S, Vogel. Intensified neoadjuvant chemotherapy in early-responding breast cancer: phase III randomized GeparTrio study. *J Natl Cancer Inst.* 2008; 100: 552-562.

Von Minckwitz G, Kummel S, Vogel. Neoadjuvant vinorelbine-capecitabine versus docetaxel-doxorubicin-cyclophosphamide in early nonresponsive breast cancer: a phase III randomized GeparTrio trial. *J Natl Cancer Inst.* 2008; 100: 542-551.

Von Minckwitz G, Müller BM, Loibl S, Budczies J, Hanusch C, Darb-Esfahani S, Jörn H, Weiss E, Huober J, Uwe Blohmer J, du Bois A, Zahm DM, Khandan F, Hoffmann G, Gerber B, Eidtmann H, Fend Falko, Dietel M, Mehta K, Denkert C. Cytoplasmic poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase expression is predictive and prognostic in patients with breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2011; 29 (16): 2150-2157.

Von Minckwitz G, Raab G, Caputo A. Doxorubicin with cyclophosphamide followed by docetaxel every 14 days as preoperative treatment in operable breast cancer: the Geparduo study of the German Breast Group. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 2676-2685.

Von Minckwitz G, Sinn HP, Raab G. Clinical response after two cycles compared to HER2, Ki-67, p53, and bcl-2 in independently predicting a pathological complete response after preoperative chemotherapy in patients with operable carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res.* 2008; 10 (2): R30.

W

Wang C, Thor AD, Moore DH II, Zhao Y, Kerschmann R, Stern R. The overexpression of RHAMM, a hyaluronan-binding protein that regulates Ras signalling,

correlates with overexpression of mitogen-activated protein kinase and is a significant parameter in breast cancer progression. *Cancer Res.* 1998; 4: 567-76.

Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL: Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92: 5510-5514.

Wang GL and Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 4304-8.

Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1995; 270:1230-7.

Wang J, Buchholz TA, Middleton LP. Assessment of histologic features and expression of biomarkers in predicting pathologic response to anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in patients with breast carcinoma. *Cancer* 94: 3107-14, 2002.

Wang Y, Dan H-J, Fan J-H and Wen S-B. Evaluation of the correlation between colour power doppler flow imaging and vascular endothelial growth factor in breast cancer. *The Journal of International Medical Research* 2010; 38: 1077-1083.

Wang Z, Shi Q, Wang Z, Gu Y, Shen Y, Sun M, Deng M, Zhang H, Fang J, Zhang S, Xie F. Clinicopathologic correlation of cancer stem cell markers CD44, CD24, VEGF and HIF-1 alpha in ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of breast: An immunohistochemistry-based pilot study. *Pathology-Research and Practice.* 2011; 207: 505-513.

Watnick RS, Cheng YN, Rangarajan A, Ince TA, Weinberg RA. Ras modulates Myc to repress thrombospondin-I expression and increase tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 2003; 3(3): 219-31.

Watson CJ. Stat transcription factors in mammary gland development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2001; 6: 115-127.

Watson CJ and Miller WR. Elevated levels of members of the STAT family of transcription factors in breast carcinoma nuclear extracts. *Br J Cancer.* 1995; 71: 840-844.

Wei D, Le X, Zheng L. Stat3 activation regulates the expression of vascular endothelial growth factor and human pancreatic cancer angiogenesis and metastasis. *Oncogene.* 2003; 22: 319-329.

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991; 324: 1-8.

Weigel MT, Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocrine-Related Cancer.* 2010; 17: 245-262.

Weigelt B, Meterse JL, van't Veer LJ. Breast cancer metastasis: marker and models. *Nat Rev Cancer* 2005; 20: 3404-3412.

Weng LP, Brown JL, Eng C. PTEN coordinates G (1) arrest by downregulating cyclin D1 via its protein phosphatase activity and up-regulating p27 via its lipid phosphatase activity in a breast cancer model. *Human Mol Genet.* 2001; 10: 599-604.

Wenger CR, Beardslee S, Owens MA. DNA ploidy, S-phase, and steroid receptors in more than 127000 breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 1993; 28: 9-20.

Widmann C, Gibson S, et al. Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. *J Biol Chem.* 1998; 273 (12): 7141-7.

Widschwendter A, Tonko-Geymayer S, et al. Prognostic significance of signal transducer and activator of transcription 1 activation in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2002; 8: 3065-74.

Wiedswang G, Borgen E, Karesen G, et al. Detection of isolated tumour cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3469-3478.

Wincewicz A, Koda M, Sulkowska M, Kanczuga-Koda L, Sulkowski S. Comparison of STAT3 with HIF-1 alpha, Ob and ObR expressions in human endometrioid adenocarcinomas. *Tissue and Cell* 2008; 40 (6): 405-410.

Wincewicz A, Koda M, Sulkowska M, Kanczuga-Koda L, Wincewicz D, Sulkowski S. STAT3 and hypoxia induced proteins-HIF-1 alpha, EPO and EPOR in relation with Bax and Bcl-xL in nodal metastases of ductal breast cancers. *Folia histochemica et cytobiologica*. 2009; 47 (3): 425-430.

Wincewicz A, Sulkowska M, Koda M, Lesniewicz T, Kanczuga-Koda L and Sulkowski S. STAT 3, HIF-1alfa, EPO and EPOR- signaling proteins in human primary ductal breast cancers. *Folia histochemica et cytobiologica*. 2007. 45 (2): 81-86.

Witton CJ, Reeves JR, Going JJ, Cooke TG, Bartlett JM. Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. *J Pathol*. 2003;200: 290-297.

Witzig TE, Geyer SM, Ghobrial I. Phase II trial of single-agent temsirolimus (CCI-779) for relapse mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 5347-5356.

Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, Vijver M van de, Wheeler TM, Hayes DF, American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 118-145.

Wolmark N, Wang J, Mamounas E, Bryant J, Fisher B. Preoperative chemotherapy in patients with operable breast cancer: nine-year results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J Natl Cancer Inst Monog*. 2001; 30: 96-102.

Woodgett JR. Recent advances in the protein kinase B signaling pathway. *Curr Opin Cell Biol*. 2005; 17: 150-157.

World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Washington D.C.: AICR; 2007.

Wu Y, Mohamed H, Chillar R, Ali I, Clayton S, Slamon D, Vadgama JV. Clinical significance of Akt and HER2/neu overexpression in African-American and Latina women with breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2008; 10: R3.

Wurl P, Kappler M, Meye A. Co-expression of surviving and TERT and risk of tumor-related death in patients with soft-tissue sarcoma. *Lancet*. 2002; 360 (9336): 877.

Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH. Hypoxia-inducible expression of tumor associated carbonic anhydrases. *Cancer Res*. 2000; 60: 7075-83.

Wykoff CC, Sotiriou C, Cockman ME, Ratcliffe PJ, Maxwell P, Liu E. Gene array of VHL mutation and hypoxia shows novel hipoxia induced genes and that cyclin D1 is a VHL target gene. *Br J Cancer*. 2004; 90: 1325-43.

X

Xia W, Bisi J, Strum J. Regulation of surviving by ErbB2 signaling: therapeutic implications for ErbB2-overexpressing breast cancers. *Cancer Res*. 2006; 66 (3): 1640-1647.

Xia XY, Li LH, Li XC, Jang T. Expression and significance of survivin protein, PTEN in prostatic cancer. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2006; 12: 346-8, 351. Chinese.

Xu Q, Briggs J, Park S, Niu G, Kortylewski M. Targeting STAT 3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signalin pathways. *Oncogene* (2005); 24: Factor in 5552-5560.

Y

Yamakawa M, Liu LX, Belanger AJ, Date T, Kuriyama T, Goldberg MA, Cheng SH, Gregory RJ, Jiang C. Expression of angiopoetins in renal apithelial and clear cell carcinoma cells: Regulation by hipoxia and participation in angiogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004; 287: F649-F657.

Yamamoto T, Tanigawa N. The role of survivin as a new target of diagnosis and tratment in human cancer. *Med Electron Microsc*. 2001; 34: 207-212.

Yamamoto Y, Ibusuki M, Okumura Y, et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha is closely linked to an aggressive phenotype in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* (2008); 110: 465-475.

Yamashita H, Nishio M, Kobayashi S, Ando Y, Sugiura H, Zhang Z, Hamaguchi M, Mita K, Fujii Y, Iwase H. Phosphorylation of estrogen receptor alpha serine 167 is predictive of response to endocrine therapy and increases postrelapse survival in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2005; 7: 753-64.

Yamashita H, Nishio M, Toyama T. Low phosphorylation of estrogen receptor alpha (Eralpha) serine 118 and high phosphorylation of Eralpha serine 167 improve survival in ER-positive breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2008; 15: 755-63.

Yamashita H, Toyama T, Nishio M, Ando Y, Hamaguchi M, Zhang Z, Kobayashi, Fujii Y. and Iwase H. P53 protein accumulation predicts resistance to endocrine therapy and decreased post-relapse susvival in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research* 2006, 8: R48 (doi: 10.1186/bcr 1536).

Yamauchi H, O'Neill A, Gelman R, Carney W, Tenney DY, Hosh S and Hayes DF. Prediction of response to antiestrogen therapy in advanced breast patients by pretreatment circulating levels of extrecellular domain of the HER-2/c-neu protein. *J Clin Oncol*. 1997; 15: 2518-2525.

Yang D, Zhu YQ, Qi J. Expression and clinical significance of survivin gene and PTEN protein in colorectal adenocarcinoma.. *Ai Zheng*. 2004; 23: 306-9.

Yang J, Tang T, Li F, Liu J, Tan Z, Zheng W. Experimental study of the effects of marrow mesenchymal stem cells transfected with hypoxia-inducible factor-1 alpha gene. *J Biomed. Biotechnol*. 2009: 128627-128637.

Yang L, Cao Z, Yan H & Wood WC. Coexistence of high levels of apoptotic signaling and inhibitor of apoptosis proteins in human tumor cells: implication for cancer specific therapy. *Cancer Res*. 63:6815-6824 (2003).

Yang SX, Steinberg SM, Nguyen D, Swain SM. p53, HER2 and tumor cell apoptosis correlate with clinical outcome after neoadjuvant bevacizumab plus chemotherapy in breast cancer. *International Journal of Oncology*. 2011; 38: 1445-1452.

Yang SX, Steinberg SM, Nguyen D, Wu TD, Modrusan Z, Swain SM. Gene expression profile and angiogenic marker correlates of response to neoadjuvant

bevacizumab (BV) followed by BV plus chemotherapy in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2008; 14 (18): 5893-5899.

Yang W, Klos K, Yang Y, Smith TL, Shi D, Yu D. Erb2 overexpression correlates with increased expression of vascular endothelial growth factors A, C, and D in human breast carcinoma.

Yang Z, Barnes CJ, Kumar R. Human epidermal growth factor receptor 2 status modulates subcellular localization of and with estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2004; 10 (11): 3621-8.

Yarden RI, Lauber AH, El-Ashry D. Bimodal regulation of epidermal growth factor receptor by estrogen in breast cancer cells. *Endocrinology.* 1996; 137: 2739-2747.

Yoo J, Jung J, Lee M, Seo K, Shim B, Kim S, Cho D, Ahn M, Kim C, Cho K, Kang Sand Kim H. Immunohistochemical analysis of non-small cell lung cancer: correlation with clinical parameters and prognosis. *J Korean Med Sci.* 2007; 22: 318-25.

Yonemori K, Tsuta K, Shimizu C, Hatanaka Y, Hashizume K, Ono M, Kouno T, Ando Masashi, Tamura K, Katsumata N, Hasegawa T, Kinoshita T, Fujiwara Y. Immunohistochemical expression of PTEN and phosphorylated Akt are not correlated with clinical outcome in breast cancer patients treated with trastuzumab containing neoadjuvant chemotherapy. *Med Oncol.* 2008; DOI 10.1007/s12032-008-9127-2.

Youssef NS, Hewedi IH, ABD Raboh NM. Immunohistochemical expression of surviving in breast carcinoma: relationship with clinicopathological parameters, proliferation and molecular classification. *Journal of the Egyptian Nat. Cancer Inst.* 2008; 20 (4): 348-357.

Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene.* 2008; 27: 5497-5510.

Yu H, Jove R. The STATs of cancer-new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4: 97-105.

Yu J, Leung WK, Ebert MP. Increased expression of survivin in gastric cancer patients and in first degree relatives. *Br J Cancer.* 2002; 87: 91-7.

Yu P, Zhou L, Ke W, Li k. Clinical significance of pAKT and CD44v6 overexpression with breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010; 136: 1283-1292.

Z

Zamzami N and Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's opens. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001; 2: 67-71.

Zelzer E, Levy Y, Kahana C. Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha/ARNT. *EMBO J* 1998; 17:5085-94.

Zhang F, Yang Y, Smith T. Correlation between HER-2 expression and response to neoadjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide in patients with breast carcinoma. *Cancer.* 2003; 97: 1758-65.

Zhang SQ, Qiang SY, Yang WB, Jiang JT, Ji ZZ. Expression of survivin in different stages of carcinogenesis and progression of breast cancer. *Ai Zheng.* 2004; 23: 697-700.

Zhang H, Jin F. Her-2 expression correlates with survivin in primary invasive ductal breast cancers. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 2010; 11: 1201-1204.

Zhang H, Wang S, Zhang YC. Correlation between Stat3 signal transduction pathway and expression of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer cells. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2005; 85: 2899-2904.

Zhang Q, Thomas SM, Xi S. SRC family kinases mediate epidermal growth factor receptor ligand cleavage, proliferation, and invasion of head and neck cancer cells. *Cancer Res.* 2004; 64: 6166-6173.

Zhang XH, Huang DP, Guo GL, Chen GR, Zhang HX, Wan L and Chen SY. Coexpression of VEGF-C and COX-2 and its association with lymphangiogenesis in human breast cancer. *BMC Cancer.* 2008; 8: 4.

Zhong H, Chiles K, Feldser D. Modulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 2000; 60: 1541-5.

Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL and Simons JW. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.* 1999; 59: 5830-5835.

Zhou BP, Liao Y, Xia W. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol.* 2001; 3: 245-252.

Zhou JW, Gan NY, Zhang WJ. The expression of MAP-1 and p-ERK(1/2) in primary ovarian epithelial tumor tissues. *Fen Zi Xi Bao Sheng Wu Xue Bao.* 2009 Jun; 42 (3-4): 224-30.

Zhou X, Tan M, Stone Hawthorne V, Klos KS, Lan KH, Yang Y, Yang W, Smith TL, Shi D and Yu D. Activation of the Akt/mammalian target of rapamycin/4E-BP1 pathway by ErbB2 overexpression predicts tumor progression in breast cancers. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 6779-6788.

Zhou YJ, Xiong YX, Wu XT Shi D, Fan W, Zhou T, Li YC, Huang X. Inactivation of PTEN is associated with increased angiogenesis and VEGF overexpression in gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2004; 10: 3225-3229.

Zhu L, Loo WTY, Chow Louis WC. PTEN and VEGF: Possible predictors for sentinel lymph node micro-metastasis in breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2007; 61: 558-561.

Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, Gottschalk AR, Ryan HE, Johnson RS, Jefferson AB, Stokoe D, Giaccia AJ. Loss of PTEN facilitates HIF-1 mediated gene expression. *Genes Deve.* 2000; 14: 391-6.

Zuyao N, Wei L, Eddy SL. Inhibition of constitutively activated Stat 3 signaling pathway suppresses growth of prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2000; 60: 1225-8.



Universidad de Granada

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II

Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos

Complejo Hospitalario de Jaén

