



DEPARTAMENTO DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

**PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA AL
TRATAMIENTO CON PACLITAXEL SEMANAL Y
BEVACIZUMAB EN MUJERES CON CÁNCER DE
MAMA DISEMINADO A TRAVÉS DE UN PERFIL
DE EXPRESIÓN GÉNICA**

Virginia Martínez Marín

Madrid 2015



DEPARTAMENTO DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

**PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA AL
TRATAMIENTO CON PACLITAXEL SEMANAL Y
BEVACIZUMAB EN MUJERES CON CÁNCER DE
MAMA DISEMINADO A TRAVÉS DE UN PERFIL
DE EXPRESIÓN GÉNICA**

Memoria presentada para la obtención del grado de

Doctor en Medicina por

Virginia Martínez Marín

Dirigida por el Dr. Andrés Redondo Sánchez

y la Dra. Marta Mendiola Sabio

Madrid 2015

D. Andrés Redondo Sánchez, Doctor en Medicina, Médico Adjunto del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario La Paz y Profesor Asociado del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, y

Dña. Marta Mendiola Sabio, Doctora en Bioquímica, Directora Científica del Biobanco de IdiPAZ y miembro integrante del laboratorio de Anatomía Patológica y Oncología Traslacional del Hospital Universitario La Paz

Certifican:

Que Dña. Virginia Martínez Marín ha realizado, bajo nuestra dirección, el trabajo titulado “Predicción de la respuesta al tratamiento con paclitaxel semanal y bevacizumab en mujeres con cáncer de mama diseminado a través de un perfil de expresión génica”, para optar al grado de Doctor en Medicina.

Este estudio se ha llevado a cabo en el laboratorio de Oncología Traslacional del Hospital Universitario La Paz en colaboración con el Servicio de Genómica del Parque Científico de Madrid y el IMDEA (Instituto Madrileño de Estudios Avanzados en Alimentación), y ha sido financiado por el Ministerio de Sanidad (proyecto EC 10-342) y el laboratorio Roche-Farma. Los resultados del mismo han sido presentados en los congresos “*ASCO Annual Meeting 2014*” y “*III Simposio SEOM 2014*”. En este último fue premiado como una de las mejores comunicaciones orales.

Estimamos que es un trabajo novedoso y original, además de reunir los requisitos necesarios de interés científico y rigor metodológico para ser aceptado para su presentación.

Madrid, 18 de Septiembre de 2015

Dr. Andrés Redondo Sánchez

Dra. Marta Mendiola Sabio

A Enrique

A mis padres y hermanos

A mis amigos

AGRADECIMIENTOS

Han sido muchas las personas que de una u otra forma han contribuido a la realización de este trabajo y me han ayudado a seguir siempre hacia adelante, para todas ellas son estas líneas de agradecimiento.

En primer lugar al Dr. Andrés Redondo, por la oportunidad de investigar a su lado, por su implicación en este proyecto y siempre, por su constancia y su estímulo, por no dejarme caer, por ser un ejemplo y un maestro en tantos aspectos de mi vida, por obligarme a la perfección, por conocerme tan bien, por su consejo sabio y su puerta abierta. Por su amistad y su lealtad. Es un privilegio crecer a tu lado.

A la Dra. Marta Mendiola, por llevarme de la mano y descubrirme un mundo nuevo, por creer en mí, por guiarme cuando me he perdido y ser mi aliento en tiempos difíciles. Por darme las herramientas que necesitaba para afrontar este y nuevos retos. Por ser tan inspiradora y buena en lo que hace, porque con ella nada parece imposible. Tu amistad es el mejor proyecto en el que trabajar cada día.

Al Departamento de Anatomía Patológica del Hospital la Paz, y en especial al Dr. David Hardisson, por colaborar con su experiencia y profesionalidad en la revisión de las muestras tumorales de este proyecto.

A todos mis compañeros del Servicio de Oncología Médica del Hospital La Paz: médicos adjuntos, residentes, secretarias, auxiliares y enfermeras, por la ayuda y el cariño con que me han tratado todos estos años. En especial a Loli, por sus consejos sabios, por cuidarme y quererme tanto, al Dr. Javier de Castro por su cariño y confianza en mí, por darme la oportunidad de trabajar y aprender a su lado, y a la Dra. Pilar

Zamora, por su amistad inquebrantable, por su generosidad y estímulo, por todas las horas de bibliografía juntas.

A todo el personal del laboratorio de Anatomía y Oncología Traslacional de la Paz, especialmente a María Miguel, Esther Díaz y Victoria Heredia, por su dedicación y laborioso trabajo en el desarrollo de este proyecto.

A los Dres. Ana Ramírez y Jesús Herranz del IMDEA, por su orientación y ayuda inestimable en todos los complejos análisis estadísticos. Sin vosotros habría sido imposible.

Al Ministerio de Sanidad y al laboratorio Roche-Farma, que financiaron este trabajo.

A mis compañeros de residencia del hospital Gregorio Marañón, que fueron mi familia, con los que aprendí tanto y viví tiempos muy felices. En especial a Laura, Marisa, Teresa, Pilar, Ricardo y sobre todo a Andrés, gracias por cuidarme y enseñarme todo, por adoptarme como una hermana y estar siempre a mi lado.

A todos mis amigos que me devuelven la alegría cuando me falta, me reconfortan, me cuidan y me hacen recordar lo que de verdad importa.

A mis pacientes que me dan lecciones vitales tan importantes y por los que vale la pena todo mi esfuerzo diario.

Y por último a mi familia, por su amor y apoyo incondicional. A mis padres, gracias a los cuales he llegado hasta aquí, a los que debo todo y sin los que nada tendría sentido.

A mis hermanos, tíos, y abuelos, porque su cariño y su fe me hacen saltar montañas. Y a Enrique, por su paciencia, por no dejarme tirar la toalla y alentarme en mis momentos de desesperación. Por todo el amor que me regalas cada día. Porque sin ti esta tesis no habría visto la luz. Mil gracias a todos.

ÍNDICES

1. Índice de contenidos

AGRADECIMIENTOS	5
ÍNDICES	7
1. Índice de contenidos.....	7
2. Índice de tablas.....	9
3. Índice de figuras	10
INTRODUCCIÓN.....	11
1. GENERALIDADES DEL CÁNCER DE MAMA	12
1.1. Epidemiología.....	12
1.2. Etiopatogenia	12
2. CLASIFICACIÓN E HISTORIA NATURAL DEL CÁNCER DE MAMA	13
2.1. Subtipos histológicos	13
2.2. Clasificación molecular	16
2.3. Estadificación e historia natural	18
3. TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA DISEMINADO	22
3.1. Factores pronósticos y factores predictivos de respuesta: elección del tratamiento sistémico..	22
3.2. Opciones terapéuticas en el cáncer de mama diseminado Her2 negativo	31
4. ANGIOGÉNESIS EN CÁNCER DE MAMA.....	41
4.1. Mecanismos de angiogénesis tumoral.....	41
4.2. Predictores de respuesta y de resistencia a bevacizumab	43
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	49
1. HIPÓTESIS	50
2. OBJETIVOS.....	51
PACIENTES Y MÉTODOS	52
1. VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS	53
1.1. Criterios anatomopatológicos	53
1.2. Criterios clínicos	53
2. SELECCIÓN DE GENES	56
3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	57
3.1. Aislamiento de ARN total y reacción de qRT-PCR.....	57
3.2. Medición de la expresión génica y controles endógenos	58

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	59
RESULTADOS	62
1. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA ENTRE LA BIOPSIA DEL TUMOR PRIMARIO Y DE LA RECAÍDA	63
2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LAS PACIENTES	63
3. CREACIÓN DE UN MODELO CLÍNICO PREDICTIVO DE SLP	65
4. GENERACIÓN DE UN MODELO GÉNICO PREDICTIVO DE SLP.....	68
5. CREACIÓN DE UN MODELO COMBINADO GÉNICO-CLÍNICO PREDICTIVO DE SLP	69
6. VALIDACIÓN INTERNA DE LOS MODELOS, CURVAS DE SUPERVIVENCIA Y CURVAS ROC	70
DISCUSIÓN.....	75
1. ASPECTOS METODOLÓGICOS.....	76
1.1. Empleo de muestras parafinadas para el análisis de la expresión génica	77
1.2. Elección de la qRT-PCR como técnica de análisis de la expresión génica	77
1.3. Análisis estadístico empleado	79
2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	80
2.1. Muestra del estudio	81
2.2. Variables clínicas estudiadas	84
2.3. Relevancia biológica de los genes incluidos en los modelos <i>génico</i> y <i>combinado génico-clínico</i>	87
2.4. Capacidad predictiva de los modelos generados en nuestro trabajo y comparación con otros estudios de biomarcadores de respuesta a bevacizumab en cáncer de mama	89
CONCLUSIONES	95
RESUMEN	97
CLAVE DE ABREVIATURAS.....	100
ANEXO.....	103
BIBLIOGRAFÍA	109

2. Índice de tablas

Tabla 1. Sistema de estadificación del carcinoma de mama (<i>American Joint Committee On Cancer TNM Staging System, 2010</i>).....	19
Tabla 2. Clasificación por estadios del cáncer de mama (<i>American Joint Committee On Cancer TNM Staging System, 2010</i>).....	20
Tabla 3. Principales factores pronósticos clínicos relacionados con la SG en la enfermedad diseminada	26
Tabla 4. Principales ensayos clínicos de poliquimioterapia versus monoterapia en cáncer de mama diseminado HER2 negativo	36
Tabla 5. Estudios fase III que han evaluado la adición de bevacizumab a la quimioterapia en la 1ª línea del cáncer de mama HER2 negativo metastásico.....	38
Tabla 6. Principales factores moleculares pro y antiangiogénicos.	42
Tabla 7. Genes con expresión génica diferente entre la biopsia del tumor primario y de la recidiva	63
Tabla 8. Características clínico-patológicas de las pacientes	64
Tabla 9. Análisis univariante para SLP de las variables clínico-patológicas analizadas	65
Tabla 10. Análisis univariante para SG de las variables clínico-patológicas analizadas	66
Tabla 11. Análisis multivariante para SLP (<i>modelo clínico</i>).....	67
Tabla 12. Genes incluidos en el <i>modelo génico</i> predictivo de SLP.....	68
Tabla 13. Variables clínicas y genes incluidos en <i>modelo combinado</i> predictivo de SLP	70
Tabla 14. Valores de HR y medianas de SLP en función del grupo de SLP establecido por cada modelo predictivo.	71
Tabla 15. Valores de HR y medianas de SG asociadas a los grupos de pacientes establecidos por cada modelo	72
Tabla 16. Evolución de la capacidad predictiva de los tres modelos en función de la AUC a lo largo del tiempo	74

3. Índice de figuras

Figura 1. Supervivencia global (SG) en meses asociada a diferentes localizaciones metastásicas	24
Figura 2. Mediana de SG en meses estratificada en función del tratamiento con trastuzumab y de acuerdo al <i>status</i> hormonal: (A) RE negativo y (B) RE positivo.....	28
Figura 3. Tarjeta microfluídica Roche para 384 genes.....	56
Figura 4. Curvas KM para SLP en: (A) <i>modelo génico</i> y (B) <i>combinado génico-clínico</i>	71
Figura 5. Curvas KM para SG en: (A) <i>modelo génico</i> y (B) <i>modelo combinado génico-clínico</i>	72
Figura 6. Curvas tiempo-dependientes ROC para SLP a los 6 y 24 meses para los tres modelo	73
Figura 7. Evolución de AUC a través del tiempo para SLP con los tres modelos.....	73

INTRODUCCIÓN

1. GENERALIDADES DEL CÁNCER DE MAMA

1.1. Epidemiología

El cáncer de mama es el tumor más frecuente en las mujeres occidentales, representando entre un 20-30% de las neoplasias femeninas y la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres. En Estados Unidos se diagnostican aproximadamente 230.000 nuevos casos y 40.000 muertes anuales, mientras que en España se producen 27.000 nuevos diagnósticos y aproximadamente 6.000 fallecimientos anuales a consecuencia de este tumor (1-3). Desde la década de los 90 se ha observado un progresivo descenso de la mortalidad por cáncer de mama, gracias a los programas de diagnóstico precoz y a la mayor eficacia de los tratamientos administrados. Así, la supervivencia global (SG) se sitúa actualmente por encima del 80% a los 5 años del diagnóstico (4).

1.2. Etiopatogenia

En la génesis del cáncer de mama existe en muchos casos una influencia hormonal. Algunos de los factores de riesgo conocidos (menarquia precoz, menopausia tardía, nuliparidad, terapia hormonal postmenopáusica, etc.) ocasionan una mayor exposición de la glándula mamaria a los estrógenos circulantes (5). Otros factores estudiados, como el alcohol, el tabaco, el sedentarismo, la obesidad o los anticonceptivos orales, pueden estar también relacionados con el desarrollo de esta neoplasia en ciertos casos (6, 7). Por otro lado, los antecedentes familiares de cáncer de mama suponen un aumento del riesgo de desarrollar la enfermedad, que se incrementa hasta un 60-80% en aquellas mujeres portadoras de una mutación en alguno de los principales genes de susceptibilidad (BRCA-1 y BRCA-2) (5).

Las neoplasias mamarias se originan en el epitelio glandular, inicialmente por una proliferación excesiva de las células que lo forman, dando lugar a una hiperplasia ductal atípica, y posteriormente al carcinoma intraductal o *in situ*. Con el tiempo, el tumor

traspasa la membrana basal e invade el estroma circundante, transformándose en un carcinoma infiltrante (8).

El cáncer de mama es una enfermedad genética muy heterogénea. Las alteraciones genéticas que se producen en la carcinogénesis afectarán fundamentalmente a las células epiteliales malignas, aunque también se han observado en otras células que interaccionan con el tumor, como las células del estroma, las células del sistema inmune o las células vasculares (8).

Hasta los años 80 los estudios basados en expresión génica o proteica del cáncer de mama se limitaban a los receptores de estrógenos (RE) y de progesterona (RP). Más recientemente se inició la investigación sobre otros factores de crecimiento, así como sobre algunos oncogenes y genes supresores de tumores relacionados con el ciclo celular, la apoptosis y la reparación del ADN. Finalmente, las técnicas de análisis de alto rendimiento han posibilitado ampliar los conocimientos de esta enfermedad, mostrando su importante heterogeneidad y la posibilidad de clasificarla en diferentes subtipos desde el punto de vista molecular.

2. CLASIFICACIÓN E HISTORIA NATURAL DEL CÁNCER DE MAMA

2.1. Subtipos histológicos

La mayoría de los carcinomas de mama son tumores infiltrantes. Con menor frecuencia se diagnostica un carcinoma *in situ*, enfermedad que tiene un pronóstico mucho más favorable. Casi el 80% de las neoplasias de mama infiltrantes pertenecen a la variedad ductal. El segundo tipo histológico más frecuente es el carcinoma lobulillar infiltrante, que supone entre el 5 y el 10% (8). Aunque ambos tipos histológicos comparten diversas características clínicas, el carcinoma lobulillar expresa con mayor frecuencia receptores hormonales (RH), tiende a ser más diferenciado, ocurrir en mujeres de mayor

edad, y asociar con mayor frecuencia una afectación bilateral y multicéntrica. Además, el carcinoma lobulillar presenta un patrón de diseminación diferente al carcinoma ductal, con una afectación más frecuente a nivel gastrointestinal, ovárico, peritoneal y suprarrenal (9).

Actualmente continúa existiendo una controversia sobre la influencia de la histología en el pronóstico de la enfermedad. En algunas series se ha observado que la SG del carcinoma lobulillar es ligeramente mejor que la del carcinoma ductal, aunque la tasa de recaídas parece similar (10). Sin embargo, los datos respecto a las diferencias pronósticas son contradictorios (9).

Existen otros subtipos de carcinoma de mama menos frecuentes, como el medular, el coloide, el tubular, el comedocarcinoma y el papilar, los cuales suponen, en conjunto, menos del 10% de todos los tumores invasivos. Estos tumores presentan un mejor pronóstico, con una tasa de supervivencia a largo plazo en torno al 10-20% por encima de la asociada a las formas histológicas habituales (ductal y lobulillar) (11).

Dado que la clasificación mediante el tipo histológico no es suficiente para afrontar la heterogeneidad de esta neoplasia ni para predecir su comportamiento clínico, desde hace años, se analizan rutinariamente otros parámetros anatomopatológicos, como el grado histológico, el índice de proliferación Ki67, y la expresión de los receptores de estrógenos, progesterona y del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (Her2).

El sistema de gradación histológica más utilizado es el propuesto por Elston y Ellis que clasifica los tumores en función de una combinación de criterios arquitecturales y citológicos (pleomorfismo nuclear y contaje mitótico) en tres grados, de mejor a peor diferenciación (grados 1, 2 y 3) (12). Pese a los problemas de reproducibilidad y la

subjetividad de la técnica, este método de subclasificación es una herramienta útil y estandarizada en la práctica clínica habitual.

La actividad proliferativa del tumor se determina actualmente mediante inmunohistoquímica (IHQ), con anticuerpos frente al antígeno nuclear Ki-67. Su importancia reside en su valor pronóstico, estudiado sobre todo en los tumores localizados, pero más controvertido en el cáncer de mama diseminado, como se explicará más adelante.

La sobreexpresión del RE está presente en aproximadamente el 75% de las neoplasias mamarias, mientras que el RP se expresa sólo en el 60% (13, 14). Esta frecuente expresión del RE explica la importancia que tienen los factores de riesgo relacionados con la exposición a estrógenos en la génesis del cáncer de mama.

Her2 es un receptor de membrana con actividad tirosin-quinasa cuya activación estimula la proliferación, la angiogénesis, la motilidad celular, la resistencia a la apoptosis y el desarrollo de metástasis. La sobreexpresión de Her2, producida en un 90% de los casos por una amplificación génica, ocurre aproximadamente un 18-20% de los tumores primarios de mama (8).

Los RH y Her2, son los factores predictivos de respuesta a terapias sistémicas más útiles e importantes en el tratamiento del cáncer de mama, tanto en la adyuvancia como en la enfermedad diseminada. Su determinación está recomendada en todas las guías clínicas (15, 16).

Desde un punto de vista práctico, en función de los resultados del estudio de IHQ el cáncer de mama puede dividirse en:

- *Tumores Her2 negativos*: Dentro de estos, el grupo más numeroso está caracterizado por la positividad para el RE. Los tumores Her2 negativo que no expresan RE ni RP forman un subgrupo especial, llamado Triple Negativo (TN), que suele asociarse a una mayor agresividad clínica.
- *Tumores Her2 positivos*: A su vez, también pueden dividirse en tumores que expresan o no RE.

2.2. Clasificación molecular

En la última década los estudios de expresión génica basados en *microarrays* han permitido entender el cáncer de mama como un conjunto heterogéneo de tumores desde el punto de vista molecular, que se asocian a comportamientos clínicos diferentes (17, 18).

- *Subtipo Luminal A*

Es el más frecuente, representando aproximadamente el 40% de todos los cánceres de mama. Expresa las citoqueratinas (CK) 8 y 18, así como RE, RP y Bcl-2, pero no Her2, y presenta baja proliferación (Ki67 <14%) y bajo grado histológico. Es el subtipo de mejor pronóstico y presenta un patrón de recurrencia con mayor incidencia de metástasis óseas que viscerales.

- *Subtipo Luminal B*

Representa el 20% del total. Al igual que el subtipo luminal A, se caracteriza por la expresión de las CK 8 y 18, pero con baja expresión de genes relacionados con el RE, alta expresión de genes de proliferación como Ki67 o CCNB1, y una expresión variable de Her2 y del receptor del factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor receptor* o EGFR). Este subtipo presenta un fenotipo más agresivo que el anterior, con

mayor grado histológico e índice proliferativo, lo que conlleva un peor pronóstico y una mayor incidencia de metástasis hepáticas.

- *Subtipo Her2 enriquecido*

Este subtipo supone un 10-15% del total. Son tumores con alto grado histológico, elevada expresión de genes relacionados con Her2 y con mayor proliferación, y con frecuencia se asocian a una mutación de TP53. Los tumores Her2 positivo no se corresponden exactamente con este subtipo molecular, ya que sólo un 70% de estos tumores presentan sobreexpresión de la proteína por IHQ, y al contrario, no todos los tumores con Her2 amplificado o sobreexpresado están incluidos en el subtipo molecular Her2 enriquecido. Presenta *a priori* un peor pronóstico que los subtipos luminales A y B, aunque en la última década la terapia antiHer2 ha mejorado sustancialmente la supervivencia tanto en estadios precoces como en enfermedad avanzada.

- *Subtipo Basal-like*

Representa aproximadamente un 15-20% de los cánceres de mama. Denominado así por su similitud con el epitelio basal de las células del tejido mamario normal, se caracteriza por la expresión génica de CK 5, 14 y 17, EGFR, P-cadherina, CD44 y caveolina 1 y 2. Presenta una elevada expresión de genes de proliferación, suele ser de alto grado y se asocia con inestabilidad genómica incluso en los estadios más precoces. Desde el punto de vista IHQ suelen carecer de expresión de RE, RP y Her2 (fenotipo TN). Sin embargo, de la misma manera que ocurría en el apartado anterior, no todos los TN son tumores *basal-like*, ni todos los *basal-like* son TN, existiendo hasta un 30% de discordancia entre ambos métodos de clasificación. El subtipo *basal-like* tiene mal pronóstico y frecuente diseminación a nivel visceral.

- *Subtipo Claudin-Low*

Fue descrito con posterioridad a los anteriores y comprende de un 5 a un 10% del global. Estos tumores, con mal pronóstico, son similares inmunofenotípicamente al TN, aunque hasta un 20% de los casos son positivos para RH. Se caracteriza por una escasa o ausente expresión de genes de adhesión celular y de marcadores de superficie celular, pero presenta una importante expresión de genes de transición epitelio-mesénquima, asociados con respuesta inmune y marcadores de células pluripotentes (*stem cell*).

- *Subtipo Normal-Like*

Supone un 5-10% de los tumores, está pobremente caracterizado y sigue sin aclararse si representa un subtipo separado o podría tratarse de un artefacto técnico. Presenta un patrón de expresión génica similar a la mama normal. Tiene un pronóstico intermedio entre el luminal y el *basal-like*.

2.3. Estadificación e historia natural

El cáncer de mama se caracteriza por una historia natural prolongada y presenta una evolución clínica altamente heterogénea. En la mayor parte de las pacientes, en el momento del diagnóstico la enfermedad se encuentra limitada a la mama, con o sin afectación ganglionar, pero aproximadamente en el 5-10% de los casos existe una diseminación metastásica desde el inicio.

La clasificación del cáncer de mama mediante el sistema TNM divide la enfermedad en varios estadios en función del tamaño del tumor primario (T), la afectación ganglionar (N) y la presencia de metástasis a distancia (M). En el cáncer de mama se ha definido una estadificación clínica, que se lleva a cabo mediante la exploración física y radiológica de la mama y de las cadenas ganglionares, y una estadificación anatomopatológica, que se realiza tras la intervención quirúrgica (**Tablas 1 y 2**). Las categorías T son equivalentes en ambas clasificaciones, pero las categorías N varían de

una a otra (19). La heterogeneidad molecular del cáncer de mama tiene una correlación clínica, de forma que la evolución de la enfermedad podrá ser muy diferente en pacientes que en principio se diagnostiquen en un mismo estadio.

Tabla 1. Sistema de estadificación del carcinoma de mama (*American Joint Committee on Cancer TNM Staging System, 2010*)(19)

Tumor primario (T)

Las categorías de la clasificación clínica y anatomopatológica son iguales

- **T0:** no hay evidencia de tumor primario
- **Tis:** carcinoma *in situ*
- **T1:** hasta 2 cm
- **T2:** > 2 a 5 cm
- **T3:** >5 cm
- **T4:** extensión a pared torácica o piel

Ganglios linfáticos regionales (N)

Clasificación clínica:

- **cN0:** no hay evidencia de metástasis ganglionares regionales
- **cN1:** metástasis móviles en ganglios axilares ipsilaterales
- **cN2:** metástasis en ganglios axilares ipsilaterales fijos, o en ganglios mamaros internos en ausencia de evidencia de metástasis en ganglios axilares
- **cN3:** metástasis en ganglios infraclaviculares ipsilaterales, o en ganglios mamaros internos ipsilaterales en presencia de metástasis en ganglios axilares, o en ganglios supraclaviculares ipsilaterales

Clasificación anatomopatológica:

- **pN0:** ausencia de metástasis ganglionares
- **pN1mi:** micrometástasis (>0.2 mm, y < 2 mm)
- **pN1:** metástasis en 1-3 ganglios axilares, y/o ganglios mamaros internos con metástasis microscópicas
- **pN2:** metástasis en 4-9 ganglios axilares, o en ganglios mamaros internos clínicamente aparentes en ausencia de metástasis axilares
- **pN3:** metástasis en 10 o más ganglios axilares, o en ganglios infraclaviculares, o en ganglios mamaros internos ipsilaterales clínicamente detectables en presencia de metástasis axilares, o en ganglios axilares con afectación mamaria indetectable pero con metástasis microscópicas por biopsia de ganglio centinela, o en ganglios supraclaviculares ipsilaterales

Metástasis a distancia (M)

- **M0:** no hay evidencia de metástasis a distancia
- **M1:** metástasis a distancia

De cualquier modo, hoy en día la clasificación más práctica del cáncer de mama, desde el punto de vista pronóstico y terapéutico, divide a la enfermedad en tres etapas: *enfermedad localizada, enfermedad localmente avanzada y enfermedad diseminada*. La división entre enfermedad localizada y localmente avanzada se realiza habitualmente mediante la exploración física mientras que la enfermedad diseminada se diagnostica con pruebas de imagen.

Tabla 2. Clasificación por estadios del cáncer de mama (*American Joint Committee on Cancer TNM Staging System, 2010*)

ESTADIO 0	ESTADIO I	ESTADIO II	ESTADIO III	ESTADIO IV
TisN0M0	IA: T1N0M0	IIA: T0N1M1 T1N1M0 T2N0M0	IIIA: T0N2M0 T1N2M0 T2N2M0 T3N1-2M0	T0-4N0-3M1
	IB: T0N1miM0 T1N1miM0	IIB: T2N1M0 T3N0M0	IIIB: T4N0-2M0	
			IIIC: T0-4N3M0	

La *enfermedad localizada* es la presentación más frecuente, diagnosticándose en el 80% de las mujeres con cáncer de mama invasivo. Incluye tumores habitualmente menores de 5 cm sin ganglios axilares palpables o con ganglios axilares móviles (es decir, los estadios I y II por TNM). En estos casos habitualmente el tratamiento consiste en la extirpación quirúrgica inicial, seguida de un tratamiento adyuvante sistémico y, en los casos indicados, radioterapia. Actualmente, en los tumores mayores de 2 cm con cierta frecuencia se administra la quimioterapia antes de la cirugía, sobre todo en los tumores Her2 positivo o TN por su mayor quimiosensibilidad.

La *enfermedad localmente avanzada* se diagnostica en el 10-15% de las enfermas. Suele corresponderse con los estadios III, englobando diferentes presentaciones clínicas: tumor primario mayor de 5 cm, con extensión a piel o pared torácica, afectación ganglionar axilar fija o de gran tamaño, o bien afectación ganglionar supraclavicular o de la cadena mamaria interna. Estos casos suelen tratarse inicialmente con quimioterapia, u ocasionalmente hormonoterapia, seguida del tratamiento quirúrgico, y posteriormente valoración de nuevo tratamiento sistémico (según el subtipo IHQ y lo que se administrase antes de la cirugía) y radioterapia.

Por último, la *enfermedad diseminada* se corresponde con el estadio IV y engloba aquellos tumores con afectación metastásica a distancia, independientemente del tamaño

tumoral o la afectación ganglionar. Se observa tan solo en el 5-10% de las enfermas en el momento del diagnóstico inicial. En estos casos está indicada la administración de un tratamiento sistémico con la intención de prolongar la supervivencia y mejorar la sintomatología, que puede ser quimioterapia, hormonoterapia y/o terapia dirigida, aunque en ocasiones también se pueden plantear tratamientos locales con intención paliativa (radioterapia o cirugía).

Cuando el tumor primario no se trata adecuadamente o cuando existe una resistencia al tratamiento realizado, la proliferación de las células neoplásicas ocasionará la invasión de estructuras adyacentes (planos musculares, parrilla costal, piel, etc). Asimismo, se puede producir una invasión de conductos linfáticos afectándose los ganglios linfáticos situados en las estaciones de drenaje de la mama (axila, hueco supraclavicular y cadena mamaria interna). Las células tumorales también podrán invadir los vasos sanguíneos de la microcirculación de la glándula mamaria, y algunas de ellas se desplazarán por el torrente circulatorio para dar lugar a las metástasis, con una localización preferente en hueso, hígado y pulmón. Con menor frecuencia puede observarse afectación metastásica en piel, tejido subcutáneo, cerebro, coroides, meninges, glándulas suprarrenales y tracto digestivo (8).

Por tanto, cuando se produce una recaída, esta podrá ser: local, si tiene lugar en la mama, en la piel o en la pared torácica adyacente a la cicatriz quirúrgica; loco-regional, si afecta además a los ganglios de drenaje de la mama; o a distancia, si aparece en otros órganos. Cuando la recaída se produce exclusivamente a nivel local es potencialmente curable, aunque se incrementa considerablemente el riesgo de metástasis a distancia (20).

Antes de 1970, la expectativa de vida de una mujer con cáncer de mama metastásico era inferior a un año. En las décadas posteriores se ha producido una mejoría progresiva de

la supervivencia, de manera que actualmente se considera que una paciente con un cáncer de mama diseminado puede tener una expectativa vital de unos 3 años como término medio, si bien los límites son muy amplios, en función de las características IHQ, los factores pronósticos presentes y la sensibilidad del tumor a los tratamientos administrados. A pesar de que se haya comunicado la existencia de un pequeño porcentaje de supervivientes a largo plazo (21), la enfermedad diseminada sigue siendo una situación hoy en día incurable, con una tasa de SG a los 5 años del 18% (22).

3. TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA DISEMINADO

3.1. Factores pronósticos y factores predictivos de respuesta: elección del tratamiento sistémico

La investigación del cáncer de mama en las últimas décadas ha ayudado a identificar una serie de factores pronósticos y predictivos de respuesta que pueden influir en la gran variabilidad clínica existente de unas enfermas a otras. El conocimiento de estos factores permite optimizar en mayor medida los tratamientos, para conseguir una mayor eficacia y evitar toxicidades innecesarias.

Es preciso aclarar la diferencia conceptual entre factor pronóstico y factor predictivo de respuesta. El primero aporta información en un momento concreto de la enfermedad (por ejemplo, en el momento del diagnóstico o en el momento de la diseminación) sobre los resultados clínicos esperados, en cuanto a la probabilidad de recidiva o SG, independientemente del tratamiento administrado. Sin embargo, el factor predictivo otorga información sobre la probabilidad de respuesta o beneficio a un tipo concreto de tratamiento. En ocasiones, un factor puede ser a la vez pronóstico y predictivo de respuesta, como ocurre con los RH y el Her-2.

Desde hace años se conocen diversos factores pronósticos en el cáncer de mama localizado que ayudan a distinguir grupos de enfermas con una probabilidad de recidiva muy diferente. Sin embargo, muchos de estos factores no han demostrado su utilidad en el cáncer de mama diseminado.

Los más importantes son el estado ganglionar y el tamaño tumoral, seguidos de la edad, el grado histológico, el *status* de los RH y la expresión de Her2 (23).

Sin embargo, la información que ofrecen estos factores clínico-patológicos es limitada, ya que muchas enfermas con factores de buen pronóstico recaerán, mientras que otras con aparente mal pronóstico nunca lo harán. En los últimos años se han realizado numerosos estudios que han evaluado el papel pronóstico de otros factores moleculares en la enfermedad localizada, como Ki67, PAI-1 (*Plasminogen activator inhibitor-1*, inhibidor del activador del plasminógeno-1), ciclina E, ciclina D1, catepsina D, p53, c-myc, BRCA 1, COX-2, marcadores de angiogénesis o células tumorales circulantes, pero, a excepción del Ki67, aún no se han realizado estudios robustos que permitan su utilización en la toma de decisiones clínicas (16, 23).

Por otro lado, recientemente se han desarrollado y validado varios perfiles génicos con capacidad predictiva del riesgo de recaída, como Oncotype Dx[®], Mammaprint[®], Prosigna[®] o Endopredict[®]. Estos perfiles se han convertido en herramientas útiles que ofrecen un valor pronóstico añadido a los factores clínico-patológicos habituales y que permiten seleccionar mejor a las pacientes que se beneficiarán o no de una quimioterapia adyuvante (24-26).

A continuación serán revisados con más detalle los factores pronósticos y predictivos de respuesta en la enfermedad diseminada, objetivo fundamental de este trabajo.

3.1.1. Factores pronósticos

- Localización y número de localizaciones metastásicas

La afectación metastásica visceral, especialmente la hepática y la del sistema nervioso central (SNC), así como la presencia de 3 o más localizaciones metastásicas, se ha correlacionado con un detrimento en la SG en diversos estudios. Uno de ellos reveló que la SG era altamente dependiente de la localización de la primera recurrencia metastásica. Así, las pacientes con una recaída local obtuvieron la mejor supervivencia a 3 años (83%), en contraste con las pacientes que presentaron afectación ganglionar (33%), afectación ósea (23%) y afectación visceral (pulmón, hígado, SNC, y/o peritoneo) (13%) (27). Otros estudios han obtenido resultados similares (28-30), considerándose a la localización metastásica como un factor pronóstico independiente (ver **Figura 1**).

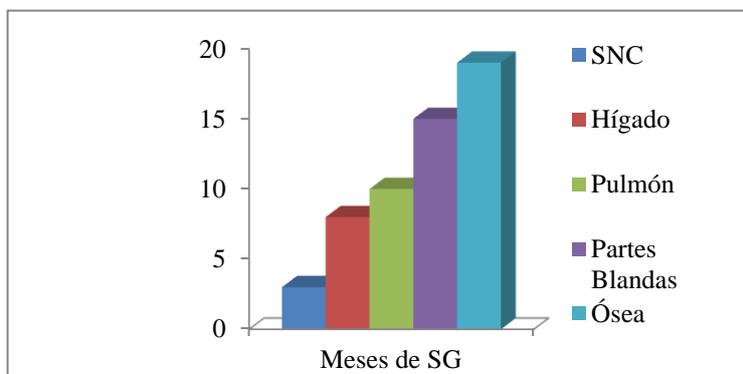


Figura 1. Supervivencia global (SG) en meses asociada a diferentes localizaciones metastásicas (30).

La implicación del número de localizaciones metastásicas en el pronóstico también ha sido demostrada en diferentes estudios, concluyéndose que según aumenta el número de localizaciones disminuye la SG. (28, 31, 32). Eichbaum y cols observaron que no sólo el número de localizaciones sino también el patrón de metastatización influye en la supervivencia, de manera que la afectación hepática única frente a la afectación múltiple es un factor de pronóstico favorable independiente. En ese mismo estudio se objetivó

que la disfunción hepática se asociaba a una reducción de la SG, encontrándose que los niveles séricos de bilirrubina, LDH y GGT eran indicadores independientes de mal pronóstico (33).

Un reciente estudio, realizado por Llombart y cols sobre 2203 pacientes tratadas con quimioterapia y bevacizumab, incide en la importancia pronóstica de la localización y el número de órganos afectos. La SG disminuía ante la presencia de afectación metastásica en hígado frente a otras localizaciones extrahepáticas (20 vs 28.5 meses) y cuando el número de localizaciones metastásicas era mayor o igual a 3 frente a menor de 3 (19.3 vs 26.5 meses) (34).

- *Edad*

Existen datos contradictorios en los diferentes estudios en los que se ha evaluado la edad como factor pronóstico. Por tanto, a diferencia de la enfermedad precoz, no se considera un factor pronóstico relevante en la enfermedad diseminada (34).

- *Estado General*

En uno de los estudios ya comentados se observó que un buen estado general (*Performance status*- PS- de 0-1 según escala ECOG) se asociaba de forma significativa con una disminución del riesgo de progresión y de muerte (32). En el estudio de Llombart y cols, el mal estado general (PS \geq 2) también resultó ser un factor de mal pronóstico aunque dicha asociación no se mantuvo en el análisis multivariante (34).

- *Intervalo libre de enfermedad*

Se entiende por Intervalo Libre de Enfermedad (ILE) el intervalo de tiempo comprendido entre la cirugía y la recidiva local o a distancia. La recaída temprana, considerándose como tal cuando el ILE es inferior o igual a 24 meses, se ha correlacionado con un detrimento en la SG de las pacientes, identificándose como factor

pronóstico negativo independiente en diversas series, incluida la de Llombart y cols (28, 31, 33, 34). En este último estudio no se observaron diferencias en el pronóstico de las recaídas muy tempranas (con ILE inferior a 12 meses) frente a las que se producían entre 12 y 24 meses, mientras que todas ellas tenían una disminución muy significativa de la SG con respecto a las que se producían con un ILE mayor de 24 meses o eran metastásicas de inicio (34).

- *Adyuvancia previa*

Se ha observado en distintos estudios que las pacientes con cáncer de mama diseminado que previamente habían recibido tratamiento adyuvante con quimioterapia presentan una peor SG que las enfermas que no lo habían recibido (27, 28, 31, 32). También se ha demostrado que no sólo haber recibido tratamiento adyuvante, sino el hecho de que se administraran los fármacos más activos, como antraciclinas y taxanos, representa un factor de mal pronóstico para la enfermedad diseminada (31, 34).

En la **Tabla 3** se resumen los principales factores clínicos mencionados, con las medianas de SG asociadas a los mismos según el estudio de Llombart y cols.

Tabla 3. Principales factores pronósticos clínicos relacionados con la SG en la enfermedad diseminada (34)

FACTOR PRONÓSTICO	CARACTERÍSTICAS	MEDIANA DE SG (meses)
Localización metastásica	Hepática	20
	No hepática	28.5
Número de Localizaciones	≥ 3	19.3
	< 3	26.5
Estado general (Performance Status)	≥ 2	14
	< 2	25.8
Intervalo libre de enfermedad	≤ 24 meses	17
	> 24 meses	30
Adyuvancia previa	Si	ND
	No	ND

ND: no disponible

- *Número de líneas de tratamiento previas*

Las pacientes politratadas suelen presentar tumores más resistentes y de una mayor agresividad, lo que se traduce en una disminución de la supervivencia libre de progresión (SLP) con la segunda y posteriores líneas de tratamiento con respecto a la SLP obtenida con la primera línea (32).

- *Subtipos tumorales*

La sobreexpresión de Her2 se ha considerado clásicamente como un factor de mal pronóstico, pero desde la llegada de terapias dirigidas anti-Her2 el valor pronóstico en la práctica clínica es muy cuestionable (16).

En base a la evidencia mostrada en los estudios, las pacientes con tumores RH positivos tienen mejor pronóstico, y las que presentan tumores con doble positividad (RE positivo y RP positivo) tienen una mayor SG que aquellas con tumores con solo el RE positivo (33-35).

En un trabajo realizado retrospectivamente sobre 2091 mujeres con cáncer de mama diseminado, se observó que aquellas pacientes con tumores Her2 positivo/RE positivo presentaban una SG a los 5 años del 14.5%, que se incrementó hasta el 29.7% en las que recibieron trastuzumab, muy similar a la SG del grupo de mejor pronóstico (aquellas con tumores Her2 negativo/RE positivo). Los dos grupos con peor pronóstico fueron las pacientes con tumores Her2 positivo/RE negativo (con una SG a 5 años del 17.7% y del 8.9%, con y sin trastuzumab, respectivamente), y las que tenían tumores TN, en las que sólo el 7.9% estaba viva a los 5 años (36). Las curvas Kaplan-Meier de SG de cada subtipo tumoral se muestran en la **Figura 2**.

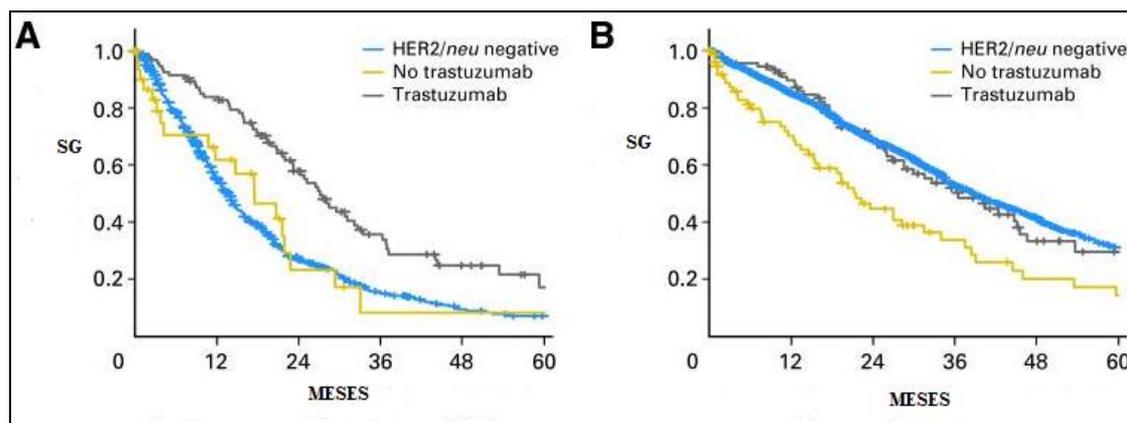


Figura 2. Curvas Kaplan-Meier de SG de pacientes con cáncer de mama diseminado Her2 negativo y Her2 positivo (éstas últimas tratadas con o sin trastuzumab) según *status* del RE: (A) RE negativo y (B) RE positivo. Adaptada de Dawood S y cols (36).

- *Ki-67 y grado histológico*

El papel pronóstico del índice de proliferación Ki-67 y del grado histológico ha sido evaluado en varios estudios, encontrándose en algunos de ellos que un mayor grado histológico y un valor de Ki-67 por encima del 20% se asocian con una disminución de la SG (31-33). Sin embargo, no hay consenso sobre el valor pronóstico de ambas determinaciones en la enfermedad diseminada, a diferencia de la enfermedad localizada.

3.1.2. Factores predictivos de respuesta

Como ya se ha comentado, algunos biomarcadores, como los RH y Her2, además del valor pronóstico, son factores predictivos de respuesta a tratamientos sistémicos, que cobran una gran importancia a la hora de seleccionar el tratamiento más apropiado para cada enferma con cáncer de mama diseminado.

Cuando se produce una recaída, es recomendable volver a biopsiar el tumor para realizar una nueva determinación de los RH y Her2, ya que diversos estudios publicados han mostrado una discordancia entre la expresión de estos receptores en el tumor primario y en la biopsia de la recaída, con las implicaciones terapéuticas que esto

conlleva. Esto podría explicarse por la adquisición de un fenotipo más agresivo en la recaída, lo que justificaría que la mayoría de cambios que se observan están en relación con una pérdida de expresión de los receptores hormonales y una ganancia de expresión de Her2 (37, 38).

El *status* del RH es el factor predictivo más importante de respuesta a la terapia endocrina. Las pacientes con RE y RP positivos presentan aproximadamente un 70% de probabilidad de respuesta a una hormonoterapia, mientras que si sólo el RE es positivo las opciones de respuesta disminuirán a un 40%, y cuando ambos son negativos serán inferiores al 10%. Otros factores que contribuyen a predecir una respuesta favorable al tratamiento hormonal son: ILE prolongado, afectación metastásica no visceral (hueso y partes blandas) y buena respuesta previa a un tratamiento endocrino.

La sobreexpresión o amplificación de Her2 es un factor predictivo de respuesta a terapias cuya diana es el receptor Her2. Por otro lado, las pacientes con tumores RE positivo y Her2 positivo tienen peor respuesta al tratamiento hormonal en monoterapia, por lo que ésta siempre habría que asociarla a una terapia anti-Her2 (16).

3.1.3. Elección del tratamiento sistémico

Teniendo en cuenta tanto los factores pronósticos como predictivos descritos, la elección del tratamiento sistémico en el cáncer de mama avanzado debería realizarse siguiendo una serie de principios:

- Los objetivos del tratamiento habitualmente incluyen la prolongación de la SLP y de la SG, junto a un alivio sintomático y mejoría de la calidad de vida.
- La determinación de los RH y de Her2 es necesaria para estimar el pronóstico y, sobre todo, para valorar adecuadamente las diferentes opciones de tratamiento

- sistémico. La positividad del RE es el principal factor predictivo de respuesta al tratamiento hormonal.
- La sobreexpresión o amplificación de Her2 es el principal factor predictivo de respuesta a la terapia anti-Her2. Las pacientes Her2 positivo deberían recibir dicha terapia como parte integral de su tratamiento, combinada con quimioterapia o con hormonoterapia.
 - Las pacientes con afectación visceral, muy sintomáticas, con enfermedad rápidamente progresiva o ILE corto (menor de 24 meses) suelen tener una evolución más desfavorable, mientras que aquellas con afectación exclusiva a nivel óseo y/o de partes blandas, oligosintomáticas y con ILE prolongado suelen asociarse a una evolución más indolente.
 - La quimioterapia está indicada en pacientes con tumores RH negativos, en pacientes con tumores RE positivo de evolución agresiva o tras progresión a terapias endocrinas, así como en combinación con terapias anti-Her2 en la mayoría de pacientes Her2 positivo.
 - La hormonoterapia será el tratamiento de elección inicial en las pacientes con tumores RE positivo y con evolución indolente.
 - Tras conseguirse una respuesta o estabilización con la quimioterapia, en la enfermedad con RE positivo es frecuente que se sustituya la quimioterapia por una hormonoterapia, con el fin de mantener el máximo tiempo posible el resultado obtenido y reducir efectos secundarios.
 - La poliquimioterapia no ha mostrado claras ventajas frente al uso secuencial de monoterapias, y sí supone un incremento sustancial en la toxicidad y

disminución de la calidad de vida de las pacientes. Por ello, la monoterapia secuencial se considera hoy en día el tratamiento de elección para la mayoría de las enfermas.

- Para aquellas pacientes con enfermedad agresiva o que necesiten un control sintomático rápido, como se explicará con más detalle posteriormente, la poliquimioterapia o la combinación de quimioterapia y bevacizumab, sí serían opciones a considerar dada la mayor probabilidad de obtener respuestas objetivas a corto plazo.

3.2. Opciones terapéuticas en el cáncer de mama diseminado Her2 negativo

Como ya se ha comentado, existen diferentes abordajes terapéuticos en función del subtipo tumoral y las características clínicas de la enfermedad.

En la enfermedad Her2 positivo el enfoque terapéutico siempre requerirá de la adición de una terapia anti-Her2 al tratamiento sistémico pautado (quimioterapia u hormonoterapia). Actualmente, la combinación de trastuzumab, pertuzumab y un taxano constituye la terapia más activa en primera línea (39). En la segunda línea, el tratamiento más utilizado ha sido la combinación de una quimioterapia con trastuzumab o lapatinib, aunque resultados recientes de un ensayo clínico han dado lugar a la aprobación de T-DM1 en esta situación (40).

A continuación se expondrán de manera resumida las bases del tratamiento del cáncer de mama avanzado Her2 negativo, que es el objetivo de este trabajo. En las pacientes con RE positivo el tratamiento sistémico podría ser hormonoterapia o quimioterapia, en función de una serie de factores que ayudan a diferenciar la enfermedad de evolución más indolente de la más agresiva, mientras que las pacientes TN sólo podrán ser tratadas con quimioterapia.

3.2.1. Hormonoterapia

Como ya se ha comentado, una mayoría de pacientes con tumores RE positivo y metástasis en huesos o partes blandas, oligosintomáticas y con intervalo libre de enfermedad prolongado suele tener una enfermedad de evolución indolente, y en estos casos la hormonoterapia debería contemplarse como la primera opción terapéutica dada su baja toxicidad y la posibilidad de conseguir respuestas duraderas (41).

En la actualidad la elección del tipo de hormonoterapia se realiza en base al estado menopáusico de la paciente y a los tratamientos hormonales recibidos previamente.

En las pacientes premenopáusicas el tratamiento hormonal más empleado en primera línea es el tamoxifeno, en monoterapia o unido a un agonista de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH). Según los datos de un meta-análisis, el combinado de un agonista LHRH y tamoxifeno es superior en tasa de respuestas, SLP y SG a la monoterapia con agonistas LHRH (42).

En las pacientes postmenopáusicas que no han recibido terapia endocrina previa o que finalizaron la hormonoterapia adyuvante hace más de 12 meses, el tratamiento hormonal recomendado en primera línea es un inhibidor de la aromatasa (IA) (anastrozol, letrozol o exemestano).

La combinación de exemestano con everolimus, un inhibidor de mTOR, ha mostrado un incremento de la SLP frente a exemestano en monoterapia en pacientes con progresión tumoral tras utilizar otro IA, lo que ha supuesto la reciente aprobación de everolimus para esta indicación (43). La combinación de everolimus con tamoxifeno también ha demostrado incrementar la eficacia en pacientes pretratadas con un IA (44).

Fulvestrant es un antiestrógeno puro que se emplea en segunda línea en pacientes que han progresado a un IA. Los ensayos de fulvestrant en combinación con anastrozol en primera línea han mostrado unos resultados discrepantes en cuanto a su eficacia. Sin embargo, un estudio fase II randomizado en primera línea, comunicado recientemente, muestra un incremento en SG de 5,7 meses para el brazo con fulvestrant (dosis de 500mg) frente al control con anastrozol (45). Estos resultados han llevado al diseño de un ensayo fase III en primera línea, actualmente en desarrollo, que compara fulvestrant frente a anastrozol.

Por último, recientemente se han publicado los resultados de dos ensayos randomizados que muestran un aumento muy significativo de la SLP con la adición de palbociclib, un inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas, a la hormonoterapia, tanto en pacientes sin terapia endocrina previa (con letrozol), como en pacientes con progresión a ésta (con fulvestrant), lo que dará lugar a una próxima aprobación del fármaco (46, 47).

3.2.2. Quimioterapia

Como se ha comentado previamente, la quimioterapia se planteará en todas las pacientes con tumores TN, y en las pacientes con tumores RE positivo/Her2 negativo que hayan fracasado a una hormonoterapia y no se considere indicado otra terapia hormonal, y en aquellas que desde el inicio tengan una enfermedad con características de mayor agresividad (localizaciones viscerales, rápida evolución, ILE corto, etc).

No existe una quimioterapia estándar para todas las pacientes, sino que para cada una de ellas habrá varios tratamientos posibles. La selección del tipo de quimioterapia debe ser individualizada, y se han de tener en cuenta diversos factores relacionados con la enfermedad y con la paciente, buscando un equilibrio entre los posibles beneficios del tratamiento, su toxicidad y la calidad de vida.

Los factores que influyen en la elección de la quimioterapia son:

- Dependientes de la paciente: edad, estado general, comorbilidad, tratamientos antitumorales previos recibidos y posibles toxicidades residuales, y preferencias de la enferma sobre determinadas posologías y toxicidades.
- Dependientes de la enfermedad: intervalo libre de enfermedad, número y localización de órganos afectados, síntomas presentes, velocidad de crecimiento tumoral y repercusión analítica.

Clásicamente los fármacos que han sido más utilizados en primera línea, por su mayor efectividad, han sido las antraciclinas y los taxanos, que se han asociado a una tasa de respuestas entre el 30-60%, una duración de la respuesta de unos 6 meses y una mediana de SG entre 10-20 meses (48-50). Las principales antraciclinas son la adriamicina y la epirubicina, siendo la cardiotoxicidad su efecto secundario más limitante. Para reducir esta cardiotoxicidad se desarrollaron formulaciones con este citotóxico encapsulado en liposomas, y que mostraron una eficacia similar (51).

Desde hace años, los taxanos son los fármacos considerados más activos en el cáncer de mama diseminado. Los más utilizados son el docetaxel en pauta trisemanal y el paclitaxel en pauta semanal, con una eficacia similar pero con un diferente perfil de toxicidad. Recientemente se ha comercializado un nuevo taxano, llamado nab-paclitaxel, que es una formulación de paclitaxel unido a nanopartículas de albúmina (52).

El retratamiento en líneas posteriores con otro taxano diferente al previamente utilizado es una práctica posible, dado que no existe resistencia cruzada completa, principalmente

en las pacientes con buena respuesta previa al taxano y sin toxicidad residual importante (53).

Otros fármacos útiles en el tratamiento del cáncer de mama diseminado son: capecitabina, vinorelbina, gemcitabina y ciclofosfamida. Los dos primeros son los más empleados tras progresión a antraciclinas y taxanos, o bien como primera línea en pacientes con enfermedad indolente tras progresión a hormonoterapia. También se utilizan como alternativa a taxanos y antraciclinas en ancianas o pacientes con deterioro del estado general debido a su perfil de toxicidad favorable (54-56). Recientemente ha sido aprobado también otro fármaco citotóxico, llamado eribulina, para mujeres que hayan progresado a antraciclinas y taxanos (57).

La utilización de los fármacos derivados del platino, cisplatino y carboplatino, ha recobrado el interés en los últimos años para el tratamiento de los tumores TN, especialmente en mujeres portadoras de mutaciones en BRCA, en los que ha mostrado una eficacia muy interesante (58). Sin embargo, a día de hoy, no hay datos suficientes que establezcan un papel predominante de los platinos sobre taxanos o antraciclinas en el tratamiento del cáncer de mama diseminado TN.

Diferentes ensayos fase III han evaluado si la poliquimioterapia podría ser más eficaz que la monoterapia en el cáncer de mama diseminado, resumidos en la **Tabla 4**. Los esquemas de combinación con antraciclinas y taxanos mostraron un incremento en las tasas de respuesta pero a expensas de una importante toxicidad hematológica y sin ventajas en SLP ni SG (59, 60). Algunos de los ensayos que evaluaron esquemas de poliquimioterapia con taxanos (docetaxel-capecitabina y paclitaxel-gemcitabina) mostraron un beneficio en tasa de respuestas, en SLP, y el primero de ellos también en SG, frente al taxano en monoterapia, pero de nuevo con una toxicidad relevante (61-64).

Por otro lado, el estudio fase III E1193 comparó la poliquimioterapia frente a la monoterapia secuencial, concretamente la combinación de paclitaxel y adriamicina frente a cada uno de ellos por separado. En los dos brazos de monoterapia, en el momento de la progresión las enfermas fueron tratadas con el fármaco que no habían recibido inicialmente. Se observó que pese al aumento en tasas de respuesta y en SLP, la poliquimioterapia no mostró un aumento SG y sí mayor toxicidad grado 3-4, principalmente hematológica (50).

Por tanto, aunque la poliquimioterapia ha mostrado mayor tasa de respuestas y SLP que la monoterapia, debido a su mayor toxicidad y a que no parece existir beneficio en SG frente a la monoterapia secuencial, estos esquemas no han llegado a implantarse como una opción para la mayoría de las pacientes, quedando reservados para enfermas con crisis viscerales en las que es necesario conseguir una respuesta rápida (65).

Tabla 4. Principales ensayos clínicos de poliquimioterapia versus monoterapia en cáncer de mama diseminado Her2 negativo (50, 61, 63, 64).

PRIMER AUTOR (Año)	RÉGIMEN	LÍNEA	N	RR (%)	SLP mediana (meses)	SG mediana (meses)
Sledge (2003)	Doxorubicina Paclitaxel	1 ^a	230	47	8	22
	Doxorubicina			36	5.8	18.9
	Paclitaxel			34	6	22.2
O'Shaughnessy (2002)	Docetaxel Capecitabina	≥ 1 ^a	255	42	6.1	14.5
	Docetaxel			30	4.2	11.5
Martin (2007)	Gemcitabina Vinorelbina	>1 ^a	125	36	6	15.9
	Vinorelbina			26	4	16.4
Albain (2008)	Gemcitabina Paclitaxel	>1 ^a	266	41.4	6.14	18.6
	Paclitaxel			26.2	3.98	15.8

RR: tasa de respuestas N: número de pacientes

La duración óptima de la quimioterapia no está claramente establecida, pero en general se recomienda mantenerla hasta la progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable, en base a los resultados de un meta-análisis que mostró que una mayor duración del tratamiento se traduciría en un aumento de la SLP y la SG (66).

3.2.3. Bevacizumab en cáncer de mama

Debido al importante papel que juega la angiogénesis en la carcinogénesis y la diseminación del cáncer de mama, como se describirá posteriormente, en la década pasada comenzó el desarrollo de fármacos antiangiogénicos, y bevacizumab fue el primero, y hasta la fecha el único, en aprobarse para este tumor. Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal que se une al factor de crecimiento del endotelio vascular (*Vascular Endothelial Growth factor*, VEGF), impidiendo así su unión al receptor celular (VEGFR) y, por tanto, la activación de una de las cascadas de señalización intracelular responsable de la angiogénesis tumoral.

Los datos iniciales de algunos estudios fase II de bevacizumab mostraron una actividad modesta en monoterapia en cáncer de mama avanzado Her2 negativo. Posteriormente se desarrollaron diversos ensayos fase III, en combinación con quimioterapia de primera y segunda línea.

- Estudios de Primera Línea

Los tres principales ensayos clínicos fase III que han evaluado la adición de bevacizumab a la quimioterapia en la primera línea del tratamiento del cáncer de mama Her2 negativo se resumen en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Estudios Fase III que han evaluado la adición de bevacizumab a la quimioterapia en la 1ª línea del cáncer de mama Her2 negativo metastásico.

ESTUDIO	RAMAS DE TRATAMIENTO	N	RR (%)	SLP (meses)	SG (meses)	BENEFICIO EN SLP (meses)
E2100	Paclitaxel + Bev	673	48.9*	11.3*	26.7	5.5*
	Paclitaxel		22.2	5.8	25.2	
AVADO	Docetaxel+Bev	736	64.1*	10.1*	30.2	1.9*
	Docetaxel+Bev		55.2	9.0	30.8	
	Docetaxel+ Placebo		46.4	8.2	31.9	
RIBBON-1	Tax /Ant +Bev	615	Tax/Ant	Tax/Ant	Tax/Ant	1.2*
	Cap+Bev		51.3*	9.2*	25.2	
	Tax/Ant + Placebo	615	Cap 35.4*	Cap 8.6*	Cap 29.0	2.9*
	Cap+Placebo		Tax/Ant	Tax/Ant	Tax/Ant	
			37.9	8.0	23.8	
			Cap 23.6	Cap 5.7	Cap 21.2	

Bev: Bevacizumab, Cap: Capecitabina, Tax: Taxano, Ant: Antraciclina, RR: Tasa de respuestas, N: número de pacientes, * $p < 0.01$

Dos de estos estudios (E2100 y AVADO) exploraron la eficacia de añadir bevacizumab a un taxano frente al taxano en monoterapia. En ambos, la adición de bevacizumab se tradujo en un incremento en la tasa de respuestas y en la SLP, aunque sin beneficio en SG (67-69). Los resultados fueron especialmente significativos en el estudio E2100, con paclitaxel semanal, en el que prácticamente se duplicó la tasa de respuestas y la mediana de SLP. Un posterior subanálisis del E2100 realizado en las pacientes con tumores TN, mostró un beneficio aún más importante en SLP para la combinación con bevacizumab (10.2 meses *versus* 4.7 meses) (70). En base a estos resultados, la agencia americana del medicamento (FDA: *Food and Drug Administration*) en 2008 y la agencia europea del medicamento (EMA: *European Medicines Agency*) en 2010, aprobaron el uso de bevacizumab en primera línea de cáncer de mama metastásico Her2 negativo. Posteriormente, la FDA retiraría en 2011 la indicación de bevacizumab en cáncer de mama con la justificación de que incrementaba la toxicidad sin haberse demostrado un beneficio claro en SG.

El ensayo RIBBON-1 evaluó nuevamente la adición de bevacizumab a la quimioterapia de primera línea, en este caso elegida por el investigador entre taxanos, antraciclinas o capecitabina. El estudio fue también positivo, mostrando un incremento de la SLP, tanto en la cohorte de taxanos-antraciclinas como en la cohorte de capecitabina. Sin embargo, al igual que los otros dos estudios, no se pudo confirmar beneficio en SG. (71)

Un meta-análisis de estos tres ensayos realizado en el subgrupo de pacientes con tumores TN mostró que la adición de bevacizumab conseguía un aumento de un 20% en la tasa de respuestas, una mejoría de la SLP (mediana de 8.1 *versus* 5.4 meses), así como una tendencia a una mayor SG pero sin alcanzar la significación estadística (18.9 *versus* 17.5 meses) (70). Se realizó también un meta-análisis del subgrupo de las pacientes pretratadas con taxanos en los tres estudios, y en este caso sí se observó una mejoría de 10 meses en la mediana de SG, estadísticamente significativa, al añadir bevacizumab (72).

Por otro lado, se han comunicado resultados de otros ensayos randomizados que han comparado combinaciones de quimioterapia con bevacizumab, y que han consolidado al paclitaxel semanal como el mejor “compañero” del antiangiogénico. El estudio CALGB 40502 comparó el esquema paclitaxel semanal y bevacizumab frente a la combinación de bevacizumab con dos fármacos citotóxicos más modernos (nab-paclitaxel e ixabepilona). La SLP fue superior en el brazo de paclitaxel semanal-bevacizumab (con una mediana de 10.6 meses, similar a la del estudio E2100), aunque no se alcanzó la significación estadística en la comparación frente a nab-paclitaxel (73).

Otro estudio evaluó la combinación paclitaxel semanal-bevacizumab frente a capecitabina-bevacizumab, mostrando también una superioridad del esquema con paclitaxel, y de nuevo con una mediana de SLP de aproximadamente 11 meses (74).

Recientemente han sido comunicados los resultados del estudio fase III Imelda, realizado en mujeres con cáncer de mama diseminado Her2 negativo tratadas en primera línea con docetaxel y bevacizumab y cuyo objetivo era analizar si un tratamiento de mantenimiento hasta la progresión con capecitabina y bevacizumab mejoraba la supervivencia respecto a realizar un mantenimiento sólo con bevacizumab. Los resultados mostraron un incremento significativo tanto en SLP como en SG con la adición de capecitabina, con una magnitud clínicamente relevante y con un perfil de toxicidad manejable (75).

También se ha estudiado en primera línea el valor de añadir bevacizumab a la hormonoterapia. En un ensayo fase III que comparó letrozol o fulvestrant con o sin bevacizumab no se observaron diferencias significativas en SLP o SG y sí un incremento de la toxicidad al añadir bevacizumab (76).

- Estudios de Segunda Línea

El estudio AVF2119g fue el primer ensayo fase III que mostró datos de eficacia de bevacizumab en combinación con quimioterapia, en este caso capecitabina, y se realizó en pacientes previamente tratadas con antraciclinas y taxanos. La adición de bevacizumab supuso un incremento en tasa de respuestas, pero no hubo diferencias en SLP ni SG (77).

El estudio RIBBON-2 fue otro ensayo fase III que evaluó la adición de bevacizumab al régimen de quimioterapia elegido por el investigador (capecitabina, taxano, vinorelbina o gemcitabina), mostrando un aumento de la SLP pero nuevamente sin beneficio en SG (78). En un subanálisis de las pacientes con tumores TN se objetivó un incremento de mayor magnitud en la SLP al añadir bevacizumab (mediana de 6.0 *versus* 2.7 meses),

un aumento en la tasa de respuestas (41% *versus* 18%), y una tendencia a una mejor SG (mediana de 17.9 *versus* 12.6 meses) (79).

A pesar de estos resultados, bevacizumab no ha conseguido indicación en la segunda línea de tratamiento.

4. ANGIOGÉNESIS EN CÁNCER DE MAMA

4.1. Mecanismos de angiogénesis tumoral

La angiogénesis, descrita inicialmente por Judah Folkman en 1971 (80), es el proceso de formación y desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, que puede activarse tanto de forma fisiológica, en situaciones como la cicatrización de heridas o la embriogénesis, pero también en situaciones patológicas, como los tumores (81). Este fenómeno está estrechamente regulado por múltiples factores, que pueden ser sintetizados por las propias células tumorales o por células del microambiente tumoral, como macrófagos, fibroblastos, células endoteliales o pericitos.

La biología del tumor es un proceso dinámico, que implica la adquisición de diferentes capacidades cruciales desde los estadios más iniciales hasta la diseminación de la enfermedad, y donde el microambiente tumoral y la angiogénesis juegan un papel destacado. Así, el crecimiento tumoral es completamente dependiente del suministro de oxígeno y nutrientes por parte de la vasculatura circundante (82) y durante la progresión tumoral se produce una transición de un estado avascular, en el cual existe un equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis, a un estado proangiogénico, caracterizado por la creación de vasos sanguíneos, el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis. Este proceso se denomina *switch* angiogénico, y es regulado por diversos factores pro y anti-angiogénicos (ver **Tabla 6**) (83-85).

Tabla 6. Principales factores moleculares pro y antiangiogénicos.

FACTORES PROANGIOGÉNICOS	Factor de Crecimiento Transformante alfa y beta (TGF- α , TGF- β) Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) Factor de Crecimiento de Fibroblastos-b (FGF-b) Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas (PDGF) Factor de Crecimiento Placentario (PIGF) Factor de Necrosis Tumoral –alfa (TNF- α) Prostaglandina E2 (PG2) Interleuquina 8 (IL8) Proteínas de unión a la membrana celular (integrinas alfa y beta, cadherinas, Eph-4B/ephrina-B2)
FACTORES ANTIANGIOGÉNICOS	Trombospondina 1 (TSP-1) Angiopoietina 2 (ANG 2) Endostatina Angiostatina Interferón alpha, beta y gamma (IFN- α , β , γ)

La nueva vasculatura que se crea en los tumores está compuesta por vasos anormales, caracterizados por una disminución de las células perivasculares, disociación de células endoteliales y una excesiva permeabilidad que provoca la extravasación de fluidos y proteínas al medio extracelular (83, 85). Estos cambios conducen a un aumento de la presión del líquido intersticial y limitan el flujo vascular, con lo que la difusión de oxígeno, nutrientes e incluso la distribución de la quimioterapia es mucho peor que en los tejidos normales. Además, la rápida proliferación de células tumorales induce compresión y colapso vascular limitando aún más la oxigenación y penetración de los fármacos. La hipoxia provoca la sobreexpresión de HIF1 α , (*Hypoxia-inducible factor* HIF)-1 α , un factor de transcripción que regula la expresión de muchos genes pro-angiogénicos. Esta situación, junto con el estrés metabólico, estimula de nuevo la angiogénesis (83, 86).

Un marcador muy utilizado para la cuantificación de la angiogénesis es la densidad microvascular (DMV), habitualmente evaluada mediante tinción IHQ. Para ello se utilizan marcadores endoteliales como CD105, VWF (Factor von Willebrand), CD34 y

de forma más extendida, CD31. Diferentes estudios en cáncer de mama han evaluado la relación de la DMV con el pronóstico. Un estudio realizado en 836 pacientes con cáncer de mama mostró que una alta DMV se correlacionaba con una disminución de la SLP y la SG, así como con factores de mal pronóstico como la afectación ganglionar y el tamaño tumoral (87). También se ha estudiado la diferencia en DMV de los diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama. Parece que los tumores *basal-like* son altamente proliferativos y presentan un marcado incremento de la angiogénesis. Este hecho los ha convertido en buenos candidatos para la terapia antiangiogénica, como muestran los resultados de los principales ensayos con bevacizumab descritos previamente.

4.2. Predictores de respuesta y de resistencia a bevacizumab

Tal y como ya se ha expuesto, el beneficio clínico de bevacizumab en cáncer de mama metastásico es modesto, ya que pese a un aumento en la tasa de respuestas y en la SLP, no se ha logrado demostrar un incremento en la SG. Sin embargo, hay que tener en cuenta que existen diferencias muy marcadas en la respuesta y duración de la misma de unas pacientes a otras, por lo que son necesarias herramientas que nos ayuden a seleccionar aquellas pacientes que más se beneficiarán de una terapia con bevacizumab. Hasta la fecha se han identificado varios biomarcadores o predictores de respuesta/resistencia a bevacizumab, que se describen a continuación, aunque ninguno ha sido validado de manera prospectiva.

4.2.1 Hipertensión arterial (HTA)

De acuerdo a un meta-análisis de pacientes con cáncer tratados con bevacizumab en ensayos fase II/III, la incidencia de HTA fue del 23.6%, siendo grado 3-4 en aproximadamente el 8% (88). La HTA es un efecto de clase de los fármacos

antiangiogénicos. En condiciones normales, VEGF-A produce una liberación de óxido nítrico que disminuye los niveles de PAI-1, lo que ocasiona una vasodilatación y una disminución de la presión arterial. Mediante el bloqueo de VEGF con bevacizumab se favorece por tanto la aparición de HTA (89).

Aunque es un tema controvertido, algunos estudios han encontrado una correlación entre la HTA secundaria al antiangiogénico y un beneficio clínico en diferentes tipos de tumores, en términos de SLP, tasa de respuestas y/o SG (90, 91). En un estudio retrospectivo en 212 mujeres con cáncer de mama metastásico tratadas con quimioterapia y bevacizumab se objetivó una mejoría de la SLP (13.7 vs. 6.6 meses, HR 0.34; IC 0.23-0.49) y la SG (78% vs. 30%, HR 0.20; IC 0.12-0.35) en aquellas que desarrollaban HTA inducida por bevacizumab (92).

Este valor predictivo de eficacia de la HTA se ha observado también con otros antiangiogénicos inhibidores de receptores tirosin-quinasa. Así, en una cohorte de 1120 pacientes con diferente tipos de tumor tratados con distintas terapias anti-VEGF se concluyó que la aparición de HTA durante el tratamiento era un factor predictivo independiente de aumento de SG (25 vs 11 meses) (93).

4.2.2 Biomarcadores plasmáticos circulantes: proteínas

Los niveles plasmáticos de VEGF-A medidos antes del tratamiento han sido uno de los biomarcadores más explorados. Sin embargo, pese a presentar un valor pronóstico establecido, relacionándose los niveles altos basales con una peor supervivencia, los resultados en cuanto a su valor predictivo de respuesta a bevacizumab son controvertidos e inconsistentes (94-96). Esto podría deberse a la existencia de varias isoformas de este ligando. Una de ellas, la VEGF-A¹²¹, con gran poder de difusión, parece ser un biomarcador más específico. Así, se ha visto que niveles elevados de esta

isoforma se correlacionan mejor con la cantidad VEGF-A secretado por diferentes tipos de células tumorales, principalmente en cáncer de mama, páncreas y estómago, y logran predecir una mayor SLP y/o SG en las pacientes tratadas con bevacizumab (95). Los niveles pretratamiento de otros marcadores como la fracción soluble de VEGFR1, VEGFR2, o los niveles de IL-8 y ANG2 también han sido estudiados de forma retrospectiva en diferentes tumores como potenciales biomarcadores predictivos de respuesta, sin resultados claramente concluyentes (95, 97-99). Más recientemente se ha sugerido que los cambios dinámicos de expresión de factores angiogénicos circulantes como VEGF-A, C, y D, FGF o PIGF pueden reflejar la activación de vías de señalización proangiogénicas alternativas, como mecanismo de resistencia a bevacizumab (95, 100).

Dentro de los mecanismos de resistencia a bevacizumab, las células tumorales y el microambiente tumoral parecen jugar un papel clave mediante la secreción paracrina de factores proangiogénicos alternativos a VEGF en respuesta al bloqueo de VEGF-A (101).

Entre estos factores alternativos destaca SDF-1 α (*stromal-derived factor-1 α*), una quimioquina cuya sobreexpresión se ha postulado como mecanismo de evasión a la terapia anti-angiogénica. Los niveles plasmáticos de esta proteína han sido estudiados de forma retrospectiva en distintos estudios fase II en cáncer colorrectal, glioblastoma y hepatocarcinoma, correlacionándose su elevación con una progresión radiológica en pacientes tratados con bevacizumab u otras terapias antiangiogénicas (102-104). Pese a que SDF-1 α ha sido también estudiado en cáncer de mama, su papel como biomarcador de evasión o resistencia a la terapia antiangiogénica no ha sido aun claramente establecido (105).

4.2.3 Marcadores plasmáticos circulantes: células endoteliales

Las concentraciones de células endoteliales circulantes pueden reflejar la actividad angiogénica, por lo que podrían ser potenciales biomarcadores predictivos de la actividad de bevacizumab. Sin embargo, los datos obtenidos en estudios en distintos tipos tumorales son contradictorios y poco sólidos. En el caso concreto del cáncer de mama avanzado, en un estudio realizado en pacientes tratadas en primera línea con bevacizumab y quimioterapia, se encontró que un incremento de células endoteliales circulantes se relacionaba con un beneficio en supervivencia (106).

4.2.4 Marcadores intratumorales

El estudio por IHQ de la DMV se correlaciona con la expresión de VEGF-A y puede servir como un marcador subrogado de angiogénesis en diferentes tumores. El valor predictivo de respuesta de este parámetro se puso de manifiesto en un análisis retrospectivo de los pacientes incluidos en un ensayo clínico de cáncer de colon, que habían sido tratados con quimioterapia basada en oxaliplatino, 5-fluouracilo y bevacizumab. Se identificó una correlación entre una elevada densidad vascular y un incremento en la SLP (107). En la misma línea de estos hallazgos, en un estudio posterior también en cáncer de colon, se midieron los niveles de expresión génica de CD133, que es una proteína de superficie relacionada con las células madre (*stem cells*), y que se relaciona también con angiogénesis y recurrencia tumoral (108).

Por otro lado, el estudio de la expresión de VEGF-A en las células tumorales, tanto por IHQ como por hibridación *in situ* y RT-PCR a tiempo real, no ha mostrado la asociación esperada con la respuesta a bevacizumab (95). Sin embargo, existen estudios donde sí se ha encontrado esta asociación positiva; tal es el caso de un análisis retrospectivo de 45 gliomas de alto grado tratados con bevacizumab e irinotecan, donde

niveles elevados de VEGF por IHQ se correlacionaron con un incremento en la respuesta radiológica aunque sin beneficio en SG (109).

La expresión IHQ de VEGFR1 y del co-receptor *neurophilin-1* NRP1 ha sido objeto de estudio en diferentes tipos tumorales tratados con bevacizumab. En dos estudios retrospectivos realizados en muestras tumorales de pacientes con cáncer gástrico se observó una correlación entre una baja expresión basal de VEGFR1 y un aumento de SG en uno de ellos (110) y un aumento de SLP en el otro (111).

La baja expresión basal de NRP1 se ha asociado con un beneficio en SG en pacientes con cáncer gástrico diseminado y una tendencia a una mejor SLP (no estadísticamente significativa) en cáncer de mama metastásico (112). No obstante, otros trabajos posteriores realizados en cáncer de mama, dentro de los estudios AVADO y E2100, no parecen reproducir estos resultados.

4.2.5 Susceptibilidad genética

Se han llevado a cabo diferentes estudios de polimorfismos de nucleótido único (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs) en genes candidatos a ser considerados predictores de respuesta a bevacizumab. Los datos obtenidos, aunque interesantes, carecen de la consistencia y reproducibilidad necesaria para ser considerados biomarcadores predictivos de respuesta a bevacizumab.

Dentro de los SNPs de VEGF-A estudiados en el ensayo E2100 en cáncer de mama avanzado se identificaron dos variantes, rs699947 y rs1570630, relacionadas con expresión reducida de VEGF-A, que eran predictoras de SG, pero no de SLP, en los pacientes tratados con bevacizumab (113). Estos dos SNPs fueron estudiados también en cáncer de mama dentro del ensayo AVADO, y sólo rs699947 resultó ser predictor de

beneficio con bevacizumab, aunque en este caso en términos de SLP pero no de SG (98).

4.2.6 Radiológicos

Teniendo en cuenta que el tratamiento con bevacizumab mediante el bloqueo de VEGF-A reduce la permeabilidad vascular y la perfusión en el tumor, la monitorización de los cambios de flujo sanguíneo tumoral, podría ser una forma interesante de medir la eficacia del tratamiento. Sin embargo, los estudios con resonancia magnética dinámica con contraste aún no están estandarizados ni han sido lo suficientemente evaluados en pacientes en tratamiento con bevacizumab como para considerar su uso como predictor de beneficio (95, 114).

Por otro lado, se ha postulado que cambios en la restricción de la difusión mediante estudios de resonancia magnética podrían ser un biomarcador de resistencia útil a la terapia con bevacizumab (115).

Todos los biomarcadores predictivos descritos, tanto de respuesta como de resistencia a bevacizumab, no están aún validados de forma prospectiva. Hasta la fecha no se ha publicado ningún estudio en el que se identifique un perfil génico predictivo de beneficio/resistencia a bevacizumab en cáncer de mama, y debido a los múltiples genes involucrados en el proceso angiogénico nos pareció un abordaje interesante, con el que se diseñó el proyecto de esta tesis.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La combinación de bevacizumab y paclitaxel semanal ha demostrado un incremento de SLP frente a paclitaxel en monoterapia en la primera línea de tratamiento del cáncer de mama Her2 negativo diseminado. Sin embargo, la ausencia de beneficio en SG ha hecho que actualmente sea un tratamiento controvertido y no unánimemente aceptado. Por otro lado, a día de hoy, carecemos de biomarcadores predictivos de eficacia para bevacizumab que estén validados de forma prospectiva, y que podrían ayudar a realizar una mejor selección de las pacientes subsidiarias de recibirlo.

El estudio de la expresión de múltiples genes implicados en los mecanismos de angiogénesis en una serie de pacientes con cáncer de mama diseminado tratadas con bevacizumab y paclitaxel semanal proporciona la oportunidad de identificar una huella génica predictiva de SLP en estas pacientes.

1. HIPÓTESIS

Las hipótesis estadísticas se definieron de la siguiente manera:

- Hipótesis nula: Mediante el análisis de expresión tumoral de 178 genes relacionados con la angiogénesis en una serie de pacientes con cáncer de mama diseminado tratadas con bevacizumab y paclitaxel semanal no es posible identificar un perfil génico que diferencie dos grupos de enfermas con distinta SLP.
- Hipótesis alternativa: El análisis de expresión tumoral de 178 genes relacionados con la angiogénesis en una serie de enfermas con cáncer de mama diseminado tratadas con bevacizumab y paclitaxel semanal permite identificar un perfil génico que discrimine dos grupos de enfermas con diferencias significativas en SLP.

2. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo se describen a continuación:

- 1) Analizar la asociación de diversos factores clínicos con la SLP en una serie de pacientes con cáncer de mama Her2 negativo metastásico tratadas con bevacizumab y paclitaxel semanal.
- 2) Analizar posibles diferencias en la expresión génica, mediante qRT-PCR, entre el tumor primario y la metástasis en el subgrupo de pacientes de la serie estudiada del que se disponga de material tumoral de ambos eventos.
- 3) Realizar un análisis univariante de la asociación de la expresión de cada gen con la SLP.
- 4) Identificar un perfil de expresión de genes relacionados con la angiogénesis que permita clasificar a las enfermas en dos grupos con distinta SLP.
- 5) Identificar un modelo predictivo de SLP que combine factores génicos y clínicos.
- 6) Comparar la precisión predictiva de los distintos modelos generados.

PACIENTES Y MÉTODOS

1. VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS

El presente estudio se realizó de manera retrospectiva sobre los datos clínicos y las muestras tumorales de enfermas diagnosticadas de un carcinoma de mama diseminado y tratadas con bevacizumab y paclitaxel semanal en el Hospital Universitario La Paz entre agosto de 2007 y diciembre de 2011. Se aplicaron los siguientes criterios para la inclusión de las pacientes:

1.1. Criterios anatomopatológicos

- Disponibilidad de muestra incluida en parafina del carcinoma de mama, con al menos un 80% de células tumorales y mínimas zonas necróticas.
- Tumores HER2 negativos.

1.2. Criterios clínicos

- Enfermedad metastásica.
- Tratamiento con bevacizumab y paclitaxel semanal en algún momento del curso de la enfermedad metastásica.
- Seguimiento clínico durante al menos 18 meses desde la finalización del tratamiento con bevacizumab y paclitaxel.

Inicialmente fueron identificadas 78 pacientes con carcinoma de mama metastásico Her2 negativo que cumplían todos los criterios clínicos de inclusión. Posteriormente se perdieron 12 casos debido a problemas técnicos y de calidad durante los diferentes procedimientos realizados sobre las muestras, de tal forma que quedaron 66 casos. Con el objetivo de que la serie fuera lo más homogénea posible finalmente se decidió no incluir en la identificación de la huella génica 6 pacientes de las que sólo se disponía de biopsia de la recaída, pero no del tumor primario. De este modo, finalmente se incluyeron 60 pacientes, todas ellas con biopsias del tumor primario.

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación Clínica del Hospital Universitario La Paz, que evaluó que se cumplía la normativa vigente según la ley de investigación biomédica de 2007.

Las variables clínicas y anatomopatológicas que se recogieron fueron las siguientes:

- Edad al inicio del tratamiento con bevacizumab y paclitaxel.
- *Status* de RE y RP.
- Administración o no de quimioterapia adyuvante y fármacos empleados.
- Intervalo libre de enfermedad.
- Número y localizaciones metastásicas previo al tratamiento con bevacizumab y paclitaxel.
- Número de líneas de tratamiento para la enfermedad diseminada previas al tratamiento con bevacizumab y paclitaxel.
- Tratamiento con antraciclinas y/o taxanos en la adyuvancia o en la enfermedad diseminada previo a bevacizumab y paclitaxel.
- Fecha de inicio y de finalización del tratamiento con bevacizumab y paclitaxel.
- Tratamiento de mantenimiento con bevacizumab en monoterapia o en combinación con hormonoterapia.
- Respuesta clínica obtenida según criterios de evaluación de tumores sólidos RECIST (*Response Evaluation Criteria In Solid Tumors*) y beneficio clínico.
- Supervivencia libre de progresión.
- Supervivencia global.

El ILE se definió como el intervalo de tiempo comprendido entre la cirugía del cáncer de mama y la recidiva local y/o diseminación.

Para la evaluación radiológica se emplearon los criterios RECIST 1.1. En ellos se considera “respuesta parcial” a la disminución de al menos un 30% de la suma de los diámetros mayores de las lesiones tumorales, “respuesta completa” a la desaparición de todas las lesiones visibles, “enfermedad progresiva” al incremento de al menos un 20% de la suma de los diámetros mayores de las lesiones tumorales o la aparición de una o más lesiones nuevas, y “enfermedad estable” a la situación donde ni hay suficiente incremento de tamaño como para considerar una progresión ni la suficiente disminución como para ser una respuesta parcial (116).

Se definió beneficio clínico a la consecución de una “respuesta completa o parcial” o “estabilización de la enfermedad” superior a 3 meses.

La SLP se consideró como el tiempo transcurrido desde la fecha de inicio del tratamiento con bevacizumab y paclitaxel hasta la recaída, hasta la última visita o hasta el fallecimiento (si no se hubiera producido antes una recaída).

La SG se definió como el intervalo de tiempo comprendido desde el inicio del tratamiento con bevacizumab y paclitaxel hasta la fecha de la última visita o del fallecimiento. Todas las muertes observadas en la recogida de datos estaban relacionadas con el tumor y, por tanto, la SG fue equivalente a la supervivencia específica por cáncer para la realización del análisis.

El efecto del tratamiento hormonal de mantenimiento se evaluó sólo en el subgrupo de pacientes con RE positivo y que realizaron tratamiento de mantenimiento con bevacizumab (con o sin hormonoterapia).

2. SELECCIÓN DE GENES

Se seleccionaron genes en los que se había descrito previamente algún tipo de implicación en el proceso de carcinogénesis y diseminación de tumores mamarios y, por otro lado, se incluyeron genes que habían sido descritos como moduladores del proceso de angiogénesis u otros procesos relacionados en distintos tipos tumorales (no necesariamente asociados con el cáncer de mama). De esta forma, tras una extensa revisión de la literatura, se seleccionaron 184 genes (especificados en el **Anexo**)

Sobre la secuencia de referencia obtenida de la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) se seleccionaron sondas específicas para cada uno de los genes objeto del estudio y los genes control y mediante el software de *Roche Applied Science* se configuraron las tarjetas microfluídicas (**Figura 3**). Estas tarjetas permiten el análisis simultáneo de hasta 384 genes. En nuestro estudio, decidimos analizar 192 genes por muestra y dos muestras por tarjeta. Cinco sondas son fijas en la tarjeta, e incluyen controles sobre amplificación. De los 187 pocillos restantes, 19 se emplearon para la medida de genes control.

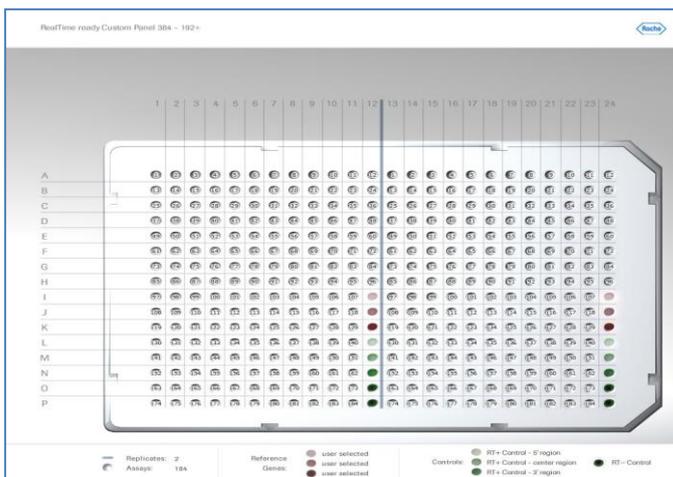


Figura 3. Tarjeta microfluídica Roche para 384 genes.

3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras tisulares que se utilizaron en este estudio habían sido procesadas según los métodos convencionales de los Servicios de Anatomía Patológica, realizándose una fijación en formol al 10% y una posterior inclusión en parafina. Se obtuvieron secciones histológicas de 4 μm de espesor de los bloques, que posteriormente se tiñeron con hematoxilina-eosina. Todos los casos fueron revisados por un patólogo para confirmar el diagnóstico y la presencia de al menos un 80% de células tumorales. Para el estudio molecular se obtuvieron de cuatro a ocho secciones de 4 μm de espesor de los bloques de parafina.

El procesamiento posterior de las muestras se realizó siguiendo una serie de pasos que se describen a continuación: aislamiento del ARN (ácido ribonucleico) total, síntesis del ADNc (ácido desoxirribonucleico complementario), reacción de amplificación mediante qRT-PCR y medida de la expresión génica.

3.1. Aislamiento de ARN total y reacción de qRT-PCR

El ARN total fue aislado mediante la utilización del kit *Masterpure RNA Purification* (EPICENTRE *Biotechnologies*, Madison, WI, USA), específicamente diseñado para muestras parafinadas, siguiendo el protocolo de la casa comercial con mínimas modificaciones. La concentración y pureza del ARN total aislado se determinó mediante espectrofotometría, midiendo la absorbancia a las longitudes 260 y 280 nm. La calidad del ARN fue determinada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. El ARN total aislado se almacenó a -70°C hasta su utilización.

Para la síntesis de ADNc se utilizó el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA), que permite convertir cuantitativamente desde 0,1 μg hasta 10 μg de ARN en ADNc, en un volumen de 50 μL . En nuestro

estudio decidimos abordar la síntesis de ADNc a partir 1 µg de ARN total de cada una de las muestras.

La reacción de transcripción reversa se llevó a cabo en un termociclador modelo *GeneAmp PCR System 2700* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA), siguiendo el protocolo del kit. Los ADNc se almacenaron a -20°C hasta su posterior utilización.

Cada uno de los puertos de la tarjeta microfluídica contenía 20 µL de *LightCycler 480 probe master mix* y del ADNc correspondiente (cantidad equivalente a 1 µg del ARN total).

Las reacciones de qRT-PCR se llevaron a cabo en un termociclador *Light Cycler 480* (Roche). Las amplificaciones se realizaron por duplicado, con los ensayos específicos prediseñados para cada gen.

3.2. Medición de la expresión génica y controles endógenos

La señal de fluorescencia aumenta en cada ciclo de amplificación de la PCR. A medida que se acumula el producto, se genera una señal que aumenta exponencialmente hasta llegar a una fase de saturación (*plateau*). El ciclo de PCR en el que la fluorescencia alcanza un valor umbral de 10 veces la desviación estándar de la fluorescencia basal es el que se toma como referencia para la medida cuantitativa. Este ciclo se denomina ciclo umbral o *threshold cycle* (Ct), que es inversamente proporcional a la cantidad inicial de secuencia a amplificar. Se calculó con el software SDS versión 2.2 (*Applied Biosystems*).

Los valores crudos de Ct fueron sometidos a un proceso de normalización utilizando unos genes de control. La elección del control endógeno es aún más compleja cuando trabajamos con muestras conservadas en parafina, para evitar artefactos por eventos como la degradación del material, por lo que normalmente se suele utilizar una

combinación de varios de estos controles, que se pueden identificar por distintos métodos. En este estudio se empleó el algoritmo geNorm versión 3.4. Este programa, accesible en la red, realiza básicamente dos análisis: uno de evaluación de la estabilidad en la expresión de los genes control y otro que valora el número idóneo de ellos que debemos utilizar (117, 118).

En nuestro estudio analizamos la expresión de 19 genes controles endógenos empleados con frecuencia en los análisis de expresión génica (*ACTB*, *ALAS1*, *B2M*, *G6PD*, *GAPDH*, *GUSB*, *HBB*, *HMBS*, *HPRT1*, *IPO8*, *PGK1*, *PPIA*, *RN18S1*, *RPL13A*, *SDHA*, *RPLP0*, *TBP*, *TFRC*, *YWHAZ*). En todos ellos se observó un adecuado comportamiento con mínimas variaciones de expresión entre las diferentes muestras tumorales. Con el método geNorm se identificaron tres genes (*ACTB*, *ALAS1*, *B2M*) cuya combinación resultaba la más apropiada para normalizar los resultados. Los 16 genes controles endógenos restantes fueron excluidos. A partir de los tres genes seleccionados se calculó un factor de normalización basado en su media geométrica, que se aplicó en los valores crudos de Ct de los genes a estudio.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos cuantitativos se describieron como mediana (rango mínimo-máximo), mientras que las variables cualitativas se recogieron como frecuencias absolutas y porcentajes. Las asociaciones entre variables categóricas fueron calculadas con el test χ^2 y el test exacto de Fischer.

Para realizar el análisis comparativo de expresión génica entre las biopsias del tumor primario y de la recaída, dado que todos los genes seguían una distribución normal, se utilizó el test pareado de la t de Student y se realizó una corrección mediante el test de

Bonferroni para comparaciones múltiples. Al comprobarse que la correlación entre los genes estudiados era elevada, se aplicó también un test basado permutaciones.

El análisis de supervivencia se realizó mediante el método de regresión de Cox, con análisis uni y multivariante de las variables clínicas más relevantes y generando un *modelo clínico* predictor de SLP.

Se realizó un análisis univariante de cada gen mediante regresión de Cox. Se añadió el *Hazard Ratio* (HR) (con su intervalo de confianza (IC) del 95% y su p-valor) de cada gen como variable continua. Se definieron como “genes protectores” aquellos que se asociaban con un HR menor de uno, mientras que se consideraron “genes de riesgo” aquellos que se asociaron con un HR mayor de uno.

En la posterior construcción de los modelos *génico* y *génico-clínico* se utilizó, para realizar el análisis multivariante, el método de regresión penalizada de Lasso (*Least absolute shrinkage and selection operator*) o también llamado regresión con L1-penalización (119-121). Este método añade una penalización Lambda o “factor de disminución” sobre la suma de los coeficientes, acercándolos a cero. Lambda es un parámetro que permite imponer más o menos penalización y que a su vez se optimiza para cada modelo.

Considerando que todas las muestras se emplearon para generar el modelo, la precisión estimada del perfil podría estar sobreestimada. Con la intención de evitar este sesgo, se aplicó el sistema de validación interna con validación cruzada denominado LOOCV (*Leave-One-Out Cross Validation*). Este método de validación interna está basado en la generación de un *cross validated pronostic index* (CVPI) (120). Este sistema deja fuera una observación, es decir a una paciente, y ajusta un modelo de regresión al resto de observaciones o pacientes. De esta forma se evaluó cada modelo en la observación o

paciente que se dejó fuera y que no participó en el ajuste del modelo. Posteriormente se repitió el proceso para todas las pacientes.

El CVPI es una variable continua que se evaluó como variable binaria mediante curvas de Kaplan Meier en cada modelo generado, estableciendo grupos de alto y bajo riesgo con la mediana de SLP y SG. Para valorar la significación estadística de los grupos establecidos con cada modelo se utilizó un *log-rank test* de permutaciones.

La precisión de cada modelo fue determinada mediante las curvas tiempo-dependientes ROC (*Receiver Operating Curves*) para calcular la sensibilidad y la especificidad (122), evaluándose a diferentes tiempos de interés: 6, 12, 18 y 24 meses.

Los cálculos estadísticos se realizaron con los programas SAS 9.1, *Enterprise Guide* 3.0 y SPSS (*versión 9.0 SPSS Inc Chicago, IL, USA*). La validación mediante el LOOCV se realizó empleando *R language* versión 2.2 con el *Design Software* versión 2.

RESULTADOS

1. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA ENTRE LA BIOPSIA DEL TUMOR PRIMARIO Y DE LA RECAÍDA

En 14 pacientes de las que disponíamos de material tanto del tumor primario como de la recaída se llevó a cabo un análisis exploratorio para comprobar si existían diferencias significativas en la expresión génica. Se observaron diferencias en la expresión de cuatro genes (*ACVRL1*, *ITGB2*, *TIMP1*, *RRAGD*), aunque no se alcanzó la significación estadística, como se muestra en la **Tabla 7**. En los cuatro genes hubo una disminución de la expresión en torno a 1,5 unidades, siendo la disminución mayor en *ACVRL1* (-1.7 unidades de expresión) y la menor en *ITGB2* (-1.3 unidades de expresión). Aunque las diferencias de expresión entre el primario y la metástasis no alcanzaron la significación estadística, como ya se ha comentado, para la identificación de la huella génica se decidió descartar las 6 enfermas que sólo tenían biopsia de la recidiva.

Tabla 7. Genes con expresión génica diferente entre la biopsia del tumor primario y de la recidiva

GEN (Símbolo)	P valor (ajustado mediante Test de Permutaciones)
<i>ACVRL1</i>	0.097
<i>ITGB2</i>	0.285
<i>TIMP1</i>	0.364
<i>RRAGD</i>	0.419

2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LAS PACIENTES

En la **Tabla 8** se resumen las características clínicas y anatomopatológicas de las 60 pacientes con cáncer de mama metastásico Her2 negativo incluidas finalmente para la construcción de la huella génica.

La mediana de edad fue de 54 años, con un rango entre 33 y 76 años. El 81.7% de los tumores expresaba RE. El ILE fue ≤ 24 meses en el 28% de los casos, mientras que más

de la mitad de las enfermas presentaba tres o más localizaciones metastásicas o afectación hepática. Un 46.7% había recibido quimioterapia adyuvante con antraciclinas y taxanos, y un 40% había tenido una o más líneas para la enfermedad avanzada previas al tratamiento con bevacizumab y paclitaxel semanal.

La mediana de seguimiento fue de 20.29 meses. Las pacientes mantuvieron el tratamiento con bevacizumab y paclitaxel semanal hasta la progresión; en aquellas en las que se suspendió paclitaxel por toxicidad antes de la progresión se mantuvo bevacizumab. De estas pacientes que recibieron bevacizumab de mantenimiento, en el subgrupo de pacientes con RE positivos un 46.8% recibió hormonoterapia añadida a bevacizumab.

Tabla 8. Características clínico-patológicas de las pacientes

Características Clínico-patológicas	N (%)
<i>Receptor de estrógeno</i>	
Positivo	49 (81.7)
Negativo	11 (18.3)
<i>Receptor de progesterona</i>	
Positivo	41 (68.3)
Negativo	19 (31.7)
<i>Subtipo IHQ</i>	
Triple negativo	11 (18.3)
RE+, RP-	8 (13.3)
RE+, RP+	41 (68.3)
<i>Quimioterapia Adyuvante</i>	
Si	46 (76.7)
No	14 (23.3)
<i>ILE</i>	
≤ 24 meses	17 (28.3)
> 24 meses o enfermedad diseminada al diagnóstico	43 (71.7)
<i>Nº de líneas de quimioterapia para enfermedad metastásica</i>	
0	36 (60)
>1	24 (40)
<i>Tipos de quimioterapia previa</i>	
Ninguna (excepto CMF)	15 (25)
Antraciclinas	17 (28.3)
Antraciclinas y taxanos	28 (46.7)
<i>Nº de localizaciones metastásicas</i>	
1 o 2	27(45)
≥ 3 o metástasis hepáticas	33 (55)

CMF: esquema de quimioterapia que incluye ciclofosfamida, metotrexate y 5-fluorouracilo

Un 45% de las pacientes consiguieron una respuesta parcial, un 13.3% alcanzaron una respuesta completa y un 25% una estabilización. En nuestra serie, el 85% de las enfermas obtuvo un beneficio clínico, es decir, una respuesta o estabilización durante un mínimo de 3 meses.

La mediana de SLP fue de 11.4 meses (IC 95%: 8.7 – 15.4), con un rango comprendido entre 0.5 y 46.1 meses. La mediana de SG fue de 29 meses (IC 95%: 20.90 – NA), con un rango entre 1.41 y 44.8 meses.

3. CREACIÓN DE UN MODELO CLÍNICO PREDICTIVO DE SLP

Se utilizó el modelo de regresión de Cox para evaluar la posible asociación entre las variables clínico-patológicas tanto para SLP como para SG, como se puede ver en las **Tablas 9 y 10**, siendo la SLP la variable que se utilizó para el objetivo principal del estudio.

Tabla 9. Análisis univariante para SLP de las variables clínico-patológicas analizadas

Variable	HR (IC 95%)	P valor
<i>Edad</i>	1.02 (0.99-1.04)	0,1787
<i>ILE</i>	0.49 (0.27-0.89)	0,0246*
<i>RE</i>	0.42 (0.21-0.83)	0,0215*
<i>RP</i>	0.58 (0.32-1.03)	0,072
<i>Subtipos IHQ</i>	0.4 (0.2-0.82)	0,0628
<i>QT adyuvante</i>	0.69 (0.37-1.27)	0,2486
<i>Antraciclina y taxanos previos</i>	1.17 (0.63-2.17)	0,6192
<i>Nº líneas previas</i>	1.64 (0.93-2.87)	0,0891
<i>Localizaciones metastásicas</i>	2.92 (1.61-5.32)	0,0003*
<i>Hormonoterapia</i>	0.48 (0.24-0.97)	0,0322*

* $p < 0,05$

Tabla 10. Análisis univariante para SG de las variables clínico-patológicas analizadas

Variable	HR (IC 95%)	P valor
<i>Edad</i>	1.03 (0.99-1.06)	0,1303
<i>ILE</i>	0.58 (0.28-1.21)	0,1573
<i>RE</i>	0.76 (0.33-1.75)	0,527
<i>RP</i>	0.92 (0.44-1.91)	0,8207
<i>Subtipos IHQ</i>	0.78 (0.33-1.83)	0,7855
<i>QT adyuvante</i>	0.91 (0.39-2.11)	0,8343
<i>Antraciclinas y taxanos previos</i>	2.44 (0.85-6.99)	0,0643
<i>Nº líneas previas</i>	2.7 (1.33-5.48)	0,0055*
<i>Nº de localizaciones</i>	2.76 (1.3-5.86)	0,006*
<i>Hormonoterapia</i>	0.21 (0.06-0.7)	0,0024*

* $p < 0,05$

La variable “tratamientos previos” fue analizada estratificándola en dos categorías: antecedente terapéutico o no con antraciclinas y taxanos. Para valorar la influencia del resto de variables clínicas en la SLP se establecieron los estratos previamente indicados en la **Tabla 8**.

Las variables que resultaron significativas en el análisis univariante para SLP, más aquellas que pese a no ser significativas en nuestro estudio lo habían sido en otros estudios con mayor tamaño muestral, fueron incluidas en el análisis multivariante. Se decidió no incluir el tratamiento hormonal de mantenimiento al ser una variable que afectaba sólo a un subgrupo de la muestra (enfermas con RE positivo y que habían recibido bevacizumab como mantenimiento).

Finalmente, el análisis multivariante, como se puede ver en la **Tabla 11**, evaluó la influencia de las siguientes variables clínicas: ILE (menor o igual a 24 meses vs mayor

de 24 meses), RE (positivo vs negativo), tratamiento previo con antraciclinas y taxanos, localización metastásica (menos de 3 vs más de 3 localizaciones o presencia de afectación hepática), y líneas de quimioterapia en enfermedad diseminada previas al tratamiento con bevacizumab y paclitaxel semanal (0 vs 1 o más).

A pesar de que la única variable que mantuvo la significación estadística en el análisis multivariante fue la “localización metastásica”, se decidió mantener a todas en lo que denominamos *modelo clínico* dada la influencia mostrada por todas ellas en la SLP en diferentes estudios.

Este modelo fue capaz de clasificar a las pacientes incluidas en nuestro estudio en dos grupos con diferentes medianas de SLP, 8.5 meses frente a 14 meses, y con un HR 2.2 (1.23-3.91).

Tabla 11. Análisis multivariante para SLP (*modelo clínico*)

Variable	HR	P valor
ILE	0.74 (0.35-1.59)	0.43
RE	0.41 (0.17-1.03)	0.06
Antraciclinas y taxanos previos	1.02 (0.52-2.01)	0.94
Nº líneas quimio previas	1.55 (0.8-3)	0.19
Localización metastásica	3.07 (1.63-5.8)	0.0005 *

*p<0,05

También se realizó un análisis multivariante para SG, pese a que no era el parámetro sobre el que íbamos a desarrollar posteriormente el *modelo génico*, que mostró como significativas las variables “número de líneas de quimioterapia previas” (HR 2.68; p=0.017) y la “localización metastásica” (HR 3.18; p=0.004).

4. GENERACIÓN DE UN MODELO GÉNICO PREDICTIVO DE SLP

En la creación del *modelo génico*, como se explicó previamente, se consideró a éste como un índice pronóstico basado en un modelo de regresión de Cox. Este índice pronóstico es una variable continua que se transformó en categórica para poder definir grupos de alto y bajo riesgo.

Para la construcción del *modelo génico* se realizó un análisis univariante mediante regresión de Cox sobre los 168 genes estudiados (cuyo resultado se detalla en el **Anexo**) y se aplicó posteriormente el método de regresión penalizada de Lasso (119-121). Tras aplicar dicho método se generó un perfil génico predictivo de SLP compuesto de 11 genes, descritos en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Genes incluidos en el *modelo génico* predictivo de SLP

Variable	Beta (LASSO)	HR (IC95%)	P-valor
<i>SLC39A6</i>	0,289	1,72 (1,28-2,3)	< 0,0001*
<i>REL</i>	-0,282	0,74 (0,56-0,99)	0,0619
<i>IL8</i>	-0,231	0,7 (0,54-0,89)	0,0053*
<i>FN1</i>	0,191	1,51 (1,18-1,93)	0,0026*
<i>PLAU</i>	0,152	1,5 (1,14-1,98)	0,0052*
<i>HES1</i>	0,138	1,15 (0,92-1,44)	0,2635
<i>HMBS</i>	-0,063	0,81 (0,64-1,04)	0,1014
<i>DDIT4</i>	0,049	1,14 (0,87-1,51)	0,3471
<i>FABP5</i>	-0,043	0,72 (0,55-0,96)	0,0245*
<i>ACVRL1</i>	0,031	1,32 (0,99-1,77)	0,0617
<i>PGR</i>	0,021	1,46 (1,09-1,95)	0,0118*

*p<0,05

En dicha tabla los genes están ordenados por el valor absoluto de los coeficientes beta de la regresión penalizada de Lasso (cuanto mayor es este valor más peso tiene el gen en el perfil). La mayoría de los genes del modelo habían sido significativos en el análisis univariante. Los genes con $HR > 1$ (equivalente a un valor positivo del coeficiente beta de Lasso) deben ser considerados de riesgo, mientras que los que presentaron $HR < 1$ (o con valor negativo del coeficiente) serían protectores.

5. CREACIÓN DE UN MODELO COMBINADO GÉNICO-CLÍNICO PREDICTIVO DE SLP

Con el objetivo de analizar cómo podían influir las variables clínicas en la selección de genes del perfil, y si la adición de éstas podía mejorar la capacidad predictiva de SLP del mismo, se elaboró también un *modelo combinado génico-clínico*, eligiendo las cinco variables clínicas utilizadas en el *modelo clínico*. La selección de genes se realizó mediante el mismo procedimiento que en el *modelo génico*. Tras la misma, el *modelo génico-clínico* quedó constituido por 13 genes. En la **Tabla 13** se detallan los genes y variables clínicas del modelo, con sus correspondientes coeficientes beta y HR.

Como se puede observar, los *modelos génico* y *génico-clínico* no están formados por los mismos genes, aunque ocho de ellos sí son compartidos (*SLC39A6, REL, IL8, FNI, PLAU, HMBS, DDIT4, FAB5P*).

Tabla 13. Variables clínicas y genes incluidos en *modelo combinado* predictivo de SLP

Variable	Beta (LASSO)	HR
ILE	-0.223	0.8
RE	-0.907	0.4
Antraciclina y taxanos previos	0.008	1.014
Nº de líneas de quimio previas	0.45	1.57
Localización metastásica	1.509	4.52
REL	-0.349	0.71
FN1	0.322	1.38
NOTCH3	0.287	1.33
DDIT4	0.281	1.32
IL8	-0.223	0.8
ADRBK1	-0.21	0.81
FABP5	-0.176	0.84
PLAU	0.159	1.17
HMBS	-0.155	0.86
PTK2B	0.136	1.15
THBS1	0.114	1.12
SLC39A6	0.05	1.05
TCF3	-0.028	0.97

6. VALIDACIÓN INTERNA DE LOS MODELOS, CURVAS DE SUPERVIVENCIA Y CURVAS ROC

Como se comentó previamente, en este estudio se aplicó el sistema de validación interna LOOCV (120). Este método de validación está basado en la generación de un CVPI, que es una variable continua pero que se puede evaluar como variable binaria (y así realizar las curvas de supervivencia KM y el Log-rank test). Además, se analizó la capacidad predictiva de cada modelo mediante Curvas ROC.

Los tres modelos se correlacionaron de forma significativa con la SLP, y fueron capaces de identificar dos grupos pacientes con medianas de SLP con diferencias estadísticamente significativas. En la **Figuras 4** se pueden ver las curvas de KM para SLP de los *modelos génico* y *génico-clínico*.

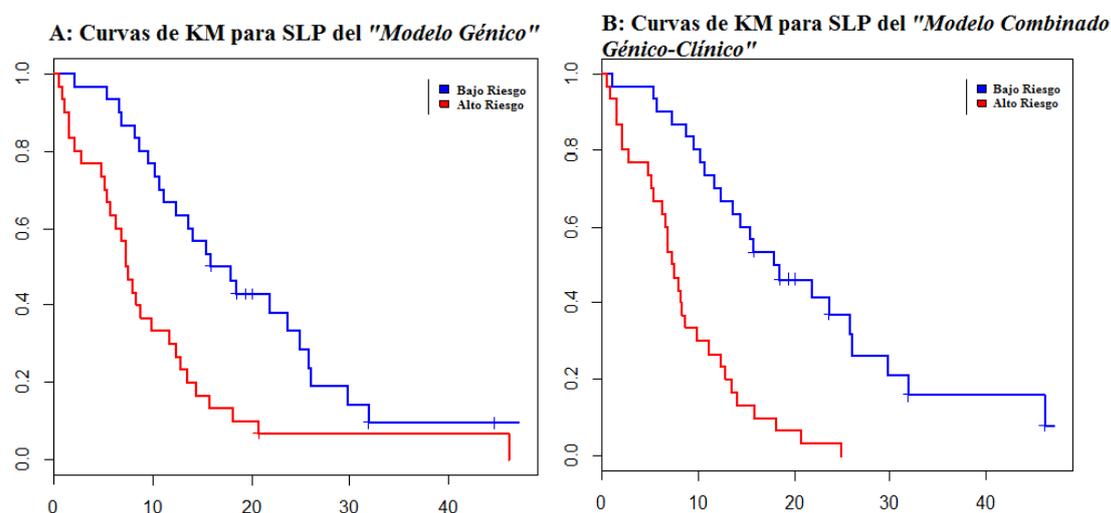


Figura 4. Curvas KM para SLP en: (A) *Modelo Génico* y (B) *Modelo Génico-Clínico*

Las medianas de SLP de ambos grupos y los HR se muestran en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Valores de HR y medianas de SLP en función del grupo de SLP establecido por cada modelo predictivo.

Modelo	Grupo de SLP	HR (CI 95%)	P-valor	Mediana SLP(meses)
<i>Génico</i>	Bueno	1	0,048	16,9 (12,3-25,8)
	Malo	2.57 (1.47-4.48)		7,4 (5,7-12,4)
<i>Combinado Génico-Clínico</i>	Bueno	1	<0,001	17,9 (13,7-29,8)
	Malo	4.04 (2.2-7.44)		7,4 (6,2-11,1)
<i>Clínico</i>	Bueno	1	0,011	14,04 (10,28-29,77)
	Malo	2.2 (1.23-3.91)		8,49 (6,9-14,13)

Las pacientes establecidas en base a la SLP por los tres modelos también presentaron diferencias estadísticamente significativas en SG. En la **Figura 5** se muestran las curvas KM de los *modelos génico* y *génico-clínico* y en la **Tabla 15** los HR y p-valor.

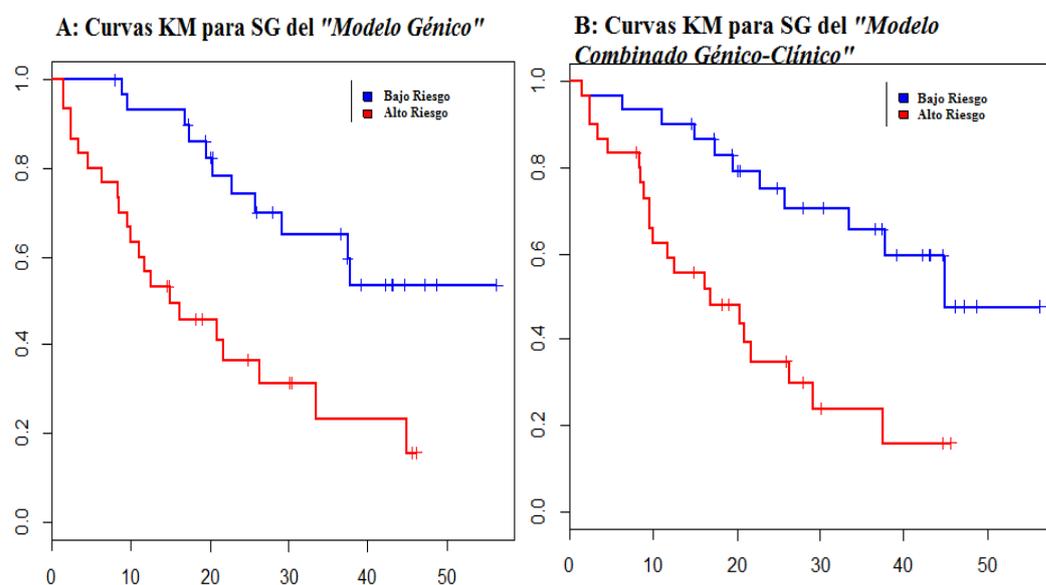


Figura 5. Curvas KM para SG en: (A) *Modelo Génico* y (B) *Modelo Combinado Génico-Clínico*

Tabla 15. Valores de HR y medianas de SG asociadas a los grupos de pacientes establecidos por cada modelo

Modelo	Grupo de SG	HR (CI 95%)	P-valor	Mediana SG (meses)
<i>Génico</i>	Bueno	1	0,001	NA (29-NA)
	Malo	3.29 (1.57-6.91)		14.95 (9.9-44.8)
<i>Combinado Génico-Clínico</i>	Bueno	1	0,0008	44.85 (33.3-NA)
	Malo	3.43 (1.62-7.26)		16.85 (9,9-37,3)
<i>Clínico</i>	Bueno	1	0,047	44,85 (33.3-NA)
	Malo	2.04 (0.99-4.2)		21.65 (16.1-NA)

NA: no alcanzada

La precisión y capacidad discriminante de cada modelo fue determinada mediante las curvas tiempo-dependientes ROC (122). Este análisis se realizó en diferentes tiempos de evolución desde el inicio del tratamiento (6, 12, 18 y 24 meses), con el objetivo de analizar cómo era la predicción de cada modelo a lo largo del tiempo (ver **Figura 6 y 7**).

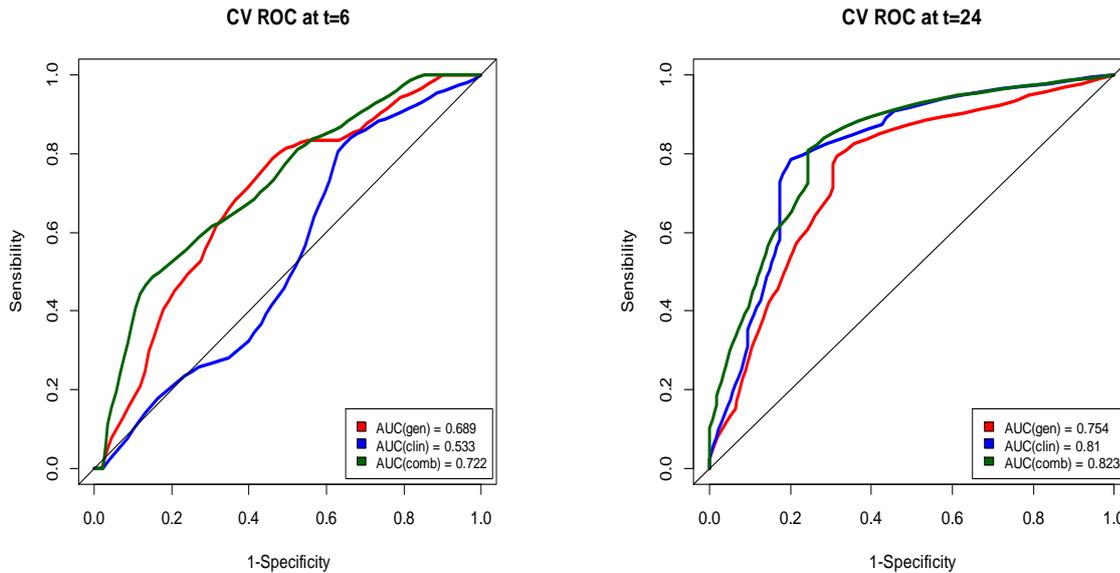


Figura 6. Curvas tiempo-dependientes ROC para SLP a los 6 y 24 meses para los tres modelos

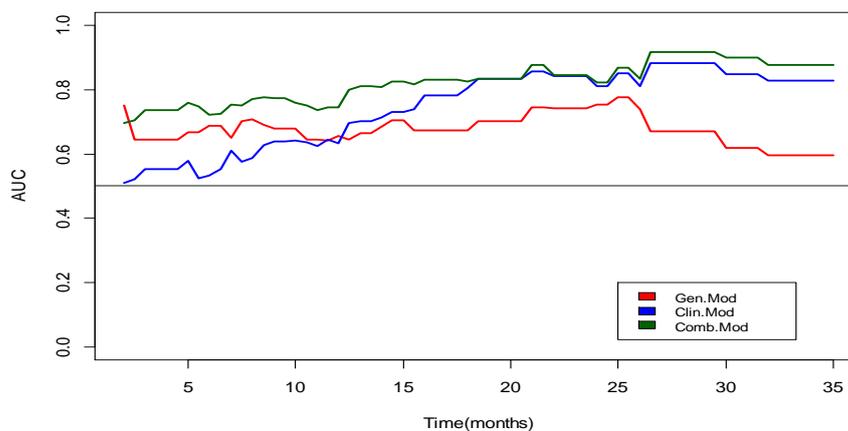


Figura 7. Evolución de AUC a través del tiempo para SLP con los tres modelos

Los modelos con valores de área bajo la curva o AUC más próximos a 1 presentan mayor capacidad predictiva. Según los valores disminuyen, lo hace también su capacidad predictiva, hasta un AUC igual o menor de 0.5, que indicaría una nula capacidad predictiva.

En la **Tabla 16** se detallan las AUC de los tres modelos en cada uno de los tiempos analizados (6, 12, 18 y 24 meses).

Tabla 16. Evolución de la capacidad predictiva de los tres modelos predictivos (valores de AUC en los diferentes tiempos estudiados)

	6 Meses	12 Meses	18 Meses	24 Meses
Modelo Génico-Clínico	0.72	0.74	0.83	0.82
Modelo Génico	0.69	0.66	0.67	0.75
Modelo Clínico	0.53	0.63	0.8	0.81

De esta forma, el *modelo clínico* a corto plazo (a los 6 meses) tiene escasa capacidad predictiva, con un AUC de 0.53. Sin embargo, la AUC se incrementa con el tiempo hasta alcanzar su valor máximo a los 24 meses, con un AUC de 0.81.

Con el *modelo génico* ocurre prácticamente lo contrario; tiene buena capacidad predictiva a corto plazo, mejor que la del *modelo clínico*, pero empeora entre los 12 y 18 meses.

El *modelo combinado génico-clínico* es el que se asocia a una mejor capacidad predictiva en todo el rango de tiempo estudiado, tanto a corto como a largo plazo. A los 6 meses, la precisión de este modelo es similar a la del *génico*.

DISCUSIÓN

Este trabajo analiza la capacidad predictiva de SLP de un *modelo génico* y de un *modelo combinado génico-clínico* en una serie de 60 enfermas con cáncer de mama diseminado Her2 negativo tratadas con paclitaxel semanal y bevacizumab. Ambos modelos son capaces de establecer dos grupos de pacientes con medianas de SLP muy diferentes. Estos resultados podrían suponer el punto de partida en la identificación de un biomarcador predictivo de respuesta que ayude a seleccionar las pacientes que obtienen un mayor beneficio con bevacizumab en el cáncer de mama diseminado, si bien todavía no es posible trasladar su aplicación a la práctica clínica.

A lo largo de esta discusión se comentarán los aspectos fundamentales de los métodos empleados en el estudio y se analizarán las limitaciones que presentan los análisis de múltiples genes en la actualidad, para después interpretar los resultados obtenidos. Por último, se discutirá sobre el futuro de la predicción de respuesta o de beneficio clínico con el uso de bevacizumab en el cáncer de mama diseminado, analizando los requerimientos necesarios para que los modelos descritos pudieran aplicarse en la clínica.

1. ASPECTOS METODOLÓGICOS

Los estudios de perfiles génicos precisan de un diseño riguroso y un análisis bioestadístico complejo dada la gran cantidad de datos que generan. La selección de la población a estudiar, el procesamiento de las muestras y la metodología empleada influyen significativamente en los resultados y en su validez. Por ello, en este tipo de estudios resulta imprescindible que exista una estrecha colaboración multidisciplinar entre clínicos, patólogos, biólogos moleculares y bioestadísticos.

1.1. Empleo de muestras parafinadas para el análisis de la expresión génica

Inicialmente los estudios de expresión génica únicamente podían realizarse a partir de tejido tumoral obtenido en fresco. Sin embargo, la disponibilidad de este tipo de tejido es limitada en los hospitales, sobre todo por el laborioso procesamiento que precisa y el alto coste económico asociado a su conservación.

Las muestras fijadas en formol e incluidas en parafina son fáciles de almacenar y permanecen estables a temperatura ambiente. Constituyen el estándar de conservación de tejido en los centros hospitalarios, de modo que cualquier test molecular orientado a la práctica clínica debería basarse en este tipo de material. A pesar de todas estas ventajas, el ARN aislado de este tipo de muestras tradicionalmente se ha considerado como un material limitado para los estudios de expresión génica, debido a la degradación del mismo. La fijación en formol predispone a que los residuos de adenosina sufran modificaciones químicas como la dimerización de metileno y la monometilación que generan fragmentos de ARN degradados (123). La optimización de los métodos de extracción del material génico durante la última década ha disminuido en parte estos inconvenientes, con un aumento en el rendimiento del material obtenido.

1.2. Elección de la qRT-PCR como técnica de análisis de la expresión génica

La mayoría de los estudios de análisis de expresión génica en patología tumoral se han realizado con *microarrays* (124). Estas plataformas representan una excelente herramienta para el estudio simultáneo de la expresión de un gran número de genes. Sin embargo, esta técnica no está exenta de inconvenientes, principalmente derivados de la variabilidad en los resultados que se pueden obtener (125).

Mientras que los *microarrays* han tenido un papel fundamental en el análisis inicial para la selección de perfiles con implicación pronóstica o en la respuesta a fármacos, la qRT-PCR es considerada como la técnica más adecuada para los estudios posteriores de

validación de un número limitado de genes (126). Éste suele ser el diseño de los estudios en series grandes de pacientes. Cuando las series son más pequeñas, es necesario disminuir el número de variables a estudiar, y, por tanto, las plataformas de qRT-PCR resultan un método más apropiado.

Además, la qRT-PCR aporta importantes ventajas en comparación con los *microarrays*. Por un lado, precisa menor cantidad de tejido tumoral para realizar el análisis, disminuyendo así la limitación del material biológico disponible (126). Pero, sobre todo, la qRT-PCR es la técnica de elección para el análisis de muestras fijadas en formol y embebidas en parafina, ya que este material, como se ha comentado previamente, está degradado por el proceso intrínseco de fijación de la técnica. La amplificación a partir de este material es complicada, pero la RT-PCR permite un diseño de amplificación de fragmentos más pequeños y, por tanto, aumenta la posibilidad de amplificación a partir de material más degradado.

Esto, sumado a la complejidad metodológica de la técnica de *microarrays*, ha supuesto una limitación importante en la implementación del uso de los mismos en la práctica rutinaria. La qRT-PCR es una técnica más asequible en el ámbito hospitalario, donde suele haber equipos y personal formado para su utilización, haciendo más factible una obtención rápida de resultados.

En el año 2004 se publicaron los primeros trabajos de expresión génica mediante qRT-PCR a partir de muestras parafinadas (127, 128). Nuestro grupo demostró en el año 2005 que el análisis de expresión génica mediante qRT-PCR en muestras parafinadas de cáncer de mama reproducía los resultados obtenidos mediante *microarrays* en muestras en fresco con el perfil de 70 genes que configura el test MammaPrint[®], plataforma aprobada por la FDA con demostrado valor pronóstico independiente sobre el riesgo de recidiva en pacientes con cáncer de mama en estadio precoz (129).

1.3. Análisis estadístico empleado

Una de las dificultades metodológicas más importantes a la que se enfrentan los estudios de expresión génica múltiple es la derivada de la desproporción entre el tamaño muestral y las variables analizadas, que aumenta la probabilidad de generar perfiles de expresión diferenciales por azar.

Nuestro estudio no es una excepción al problema de la alta dimensionalidad, dado el pequeño tamaño de nuestra muestra, 60 pacientes, y el elevado número de variables en estudio, 168 genes, muchos de ellos, además, relacionados entre sí. Se realizó una selección de variables tanto para el análisis multivariante como para la construcción de modelos, utilizándose el método de regresión penalizada de Lasso (120, 121, 130). Con este método se añade una penalización o factor de disminución sobre la suma de los coeficientes, haciéndolos más estables, y consiguiendo así realizar una selección de las variables génicas que evita su colinealidad y aumenta el poder de predicción del modelo.

Existen otros métodos más antiguos de regresión lineal múltiple alternativos a Lasso para variables correlacionadas y alta dimensionalidad. Entre estos se incluye el Análisis de Componentes Principales (131), *Partial Least Squares* o PLS (132) y *Ridge Regression* (133). Estos métodos fueron descartados porque aunque hubieran sido válidos para este tipo de análisis, no permiten la selección de variables que realiza Lasso. También se descartó el método *Stepwise* por su baja capacidad predictiva (120, 130).

Cuando existe un alto número de variables génicas en estudio, es frecuente encontrar predictores que funcionan bien sobre la serie analizada, pero que fallan cuando se aplican a otras series independientes. Esto se debe a que se produce un sesgo importante en el error de clasificación del modelo. Una forma de evitar esto es dividir la serie en

dos, una parte para construir el modelo (llamada *training-set*), y otra para su validación (*validation-set*). Sin embargo, en algunos casos, como el nuestro, el pequeño tamaño muestral impide la utilización de este abordaje. De forma alternativa, existen técnicas de remuestreo de los casos, para estimar mejor el error de clasificación y la capacidad predictiva del modelo, como la Validación Cruzada o LOOCV. En nuestro estudio, de forma adicional a esta metodología se aplicó un test de permutaciones múltiple para poder analizar el p-valor y las diferencias en la SLP entre cada uno de los grupos de riesgo establecidos.

Aun así, para que un perfil génico pueda ser utilizado en la clínica debería realizarse una validación externa en una serie independiente, que confirmase la capacidad predictiva del mismo en una muestra diferente a la empleada para generarlo y con un número de enfermas lo suficientemente amplio para que los resultados se consideren fiables y aplicables a la población. La validez sería aún mayor si se realizara en una serie prospectiva o dentro de un ensayo clínico.

Otro método alternativo de validación, pero con más limitaciones que la validación externa, sería la confirmación de los resultados mediante otras técnicas de biología molecular (como estudios funcionales o IHQ, entre otras).

Por tanto, aunque en nuestro estudio se ha utilizado una sólida metodología para conseguir una validación interna robusta, los modelos generados no podrían utilizarse en la clínica hasta que no se realizara una validación externa.

2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

La terapia antiangiogénica con bevacizumab asociada a taxanos fue aprobada como primera línea de tratamiento del cáncer de mama diseminado en 2008 tras la comunicación de los resultados iniciales de los ensayos E2100 y AVADO. Sin

embargo, en 2011, las agencias del medicamento estadounidense y canadiense suspendieron la indicación por el incremento de toxicidad que suponía la adición de bevacizumab con una eficacia cuestionable (al no demostrarse beneficio en SG). Por el contrario, la EMA también realizó una reevaluación de los datos actualizados de bevacizumab en cáncer de mama, y decidió mantener la indicación, aunque sólo en combinación con paclitaxel (fármaco con el que se obtenía el beneficio más importante en SLP). Estas dudas generadas por las agencias reguladoras, unidas al alto impacto económico del fármaco y la ausencia de un biomarcador predictivo de respuesta, provocaron una disminución de su utilización en el cáncer de mama a nivel mundial, incluidos los países europeos. La identificación de un perfil génico o biomarcador que ayudara en la selección de las pacientes que se beneficiarían de este tratamiento, evitaría una toxicidad innecesaria en las enfermas resistentes al mismo, reduciría el gasto sanitario, y lograría, por tanto, que mejorase su coste-efectividad.

2.1. Muestra del estudio

Tras descartar las pacientes en las que hubo problemas técnicos con el procesamiento de las muestras y aquellas en las que sólo disponíamos de muestra tumoral de la recaída (y no del primario), nuestra serie quedó constituida por 60 pacientes con cáncer de mama diseminado Her2 negativo tratadas en diferentes momentos de la enfermedad con paclitaxel semanal y bevacizumab. Aunque el hecho de no existir diferencias estadísticamente significativas entre la expresión génica del tumor primario y la recaída en las 14 pacientes que tenían muestra tumoral de ambos podía haber justificado la inclusión de los 6 casos de los que sólo disponíamos del bloque tumoral de la recaída, finalmente decidimos no hacerlo por dos motivos: por un lado, porque la ausencia de significación estadística pudo ser debida al pequeño tamaño muestral de este análisis, y, por otro lado, porque existen datos en la literatura que indican que la expresión génica sí

se modifica a lo largo de la evolución de la enfermedad tumoral (134, 135). De hecho, lo ideal hubiera sido realizar el estudio sobre biopsias de la recaída, pero la ausencia de este tipo de muestras en la mayoría de las pacientes lo hizo imposible.

Nuestra serie de pacientes presenta las características habituales del cáncer de mama diseminado Her2 negativo. La mediana de edad, 54 años, al igual que las principales características anatomopatológicas, incluido el *status* del RE (positivo en el 82%), son similares a los hallazgos de otras series de pacientes (8, 23). No obstante, algunas variables consideradas de mal pronóstico estaban presentes en mayor proporción de lo habitual, como la presencia de pacientes con tres o más localizaciones metastásicas o con afectación hepática, y las recaídas precoces (con un ILE menor de 24 meses).

El estudio tiene algunas debilidades, que se detallan a continuación. Si bien se trata de una población muy homogénea en cuanto al tratamiento, es cierto que el número de pacientes analizado es pequeño. Esto responde en primer lugar a que el estudio ha sido llevado en un único centro, y en segundo lugar, influye que este esquema terapéutico fue aprobado en 2008, por lo que es de uso relativamente reciente.

Otra posible crítica es que aunque todas las pacientes habían recibido bevacizumab-paclitaxel, el momento en que se usó este esquema fue diferente en cada una de ellas. Cuando se comunicaron los primeros resultados del posible beneficio bevacizumab, se solicitó autorización para poderlo utilizar en pacientes que ya habían sido tratadas con otras líneas de quimioterapia previamente. Con el tiempo, el tratamiento quedó restringido a la primera línea de tratamiento de la enfermedad diseminada, que fue la aprobación que obtuvo el fármaco. De esta forma, en nuestra serie hay pacientes que lo recibieron como primera línea de la enfermedad diseminada y otras que lo hicieron tras una o más líneas de quimioterapia previa, pudiendo este hecho afectar a la eficacia del

tratamiento. Por otro lado, el uso de bevacizumab está permitido tanto en RH positivos como negativos, y, por tanto, se incluyeron ambos subtipos de pacientes. Aunque la mayoría de las pacientes fueron RE positivo, la presencia de otros subtipos, como el TN, implica que puede haber variaciones en la expresión génica entre ellos, con impacto en el pronóstico de las pacientes y en la sensibilidad o resistencia a bevacizumab. La justificación de incluir tanto pacientes con tumores RE positivo/Her2 negativo como pacientes con tumores TN fue que ambos subtipos habían sido incluidos en los ensayos clínicos con bevacizumab, y así conseguíamos reproducir y analizar toda la población de enfermas que podría obtener un potencial beneficio con el esquema terapéutico descrito (68, 69).

Otra limitación radica en el hecho de que en nuestra serie no se administró un esquema de quimioterapia adyuvante homogéneo, debido a que este tratamiento lo habían recibido en diferentes épocas, y los esquemas se han ido modificando en los últimos 20 años (primero con la introducción de las antraciclinas, y después, con los taxanos).

Por último, un 46,8% de las pacientes con tumores RE positivo recibieron una hormonoterapia durante el periodo de mantenimiento con bevacizumab, una vez suspendido paclitaxel. La adición de una hormonoterapia como tratamiento de mantenimiento tras una quimioterapia es una práctica bastante extendida en el cáncer de mama con RE positivo, con el objetivo de intentar prolongar la SLP y no disminuir la calidad de vida (136). A pesar de que esta opción no se realizó en los ensayos clínicos de bevacizumab, en la práctica asistencial hay clínicos que sí lo realizan. En una reciente publicación de nuestro grupo observamos que las pacientes que recibieron una hormonoterapia durante el mantenimiento con bevacizumab tuvieron una tendencia a una mejor SLP que las que no lo hicieron (HR 0,5, $p=0,06$) (137). Por otro lado, en el ensayo Imelda se observó que la adición de capecitabina, una quimioterapia poco

tóxica, durante el mantenimiento con bevacizumab, una vez suspendido el taxano, se asociaba a una mejor SLP y SG (75). Los resultados de estos estudios parecen indicar que la continuación de algún tratamiento sistémico poco tóxico (hormonoterapia, capecitabina), añadido a bevacizumab, podría tener un impacto en la SLP y SG de las pacientes.

Por tanto, el hecho de que en nuestra serie algunas pacientes recibieran hormonoterapia durante el periodo de mantenimiento mientras que otras no, es un factor de confusión a la hora de analizar la SLP. En el estudio multivariante no pudimos incluirlo porque era una variable que únicamente afectaba al subgrupo de pacientes con RE positivo y que recibieron tratamiento de mantenimiento con bevacizumab tras concluir la quimioterapia.

2.2. Variables clínicas estudiadas

Aunque en la literatura médica con frecuencia se utiliza la terminología de biomarcador predictivo de respuesta, con las nuevas terapias dirigidas la mejor manera de evaluar la actividad de un fármaco no parece que sea la medición de respuesta según los criterios radiológicos tradicionales (RECIST). Estos fármacos suelen actuar como citostáticos y no como citotóxicos, por lo que pueden conseguirse estabilizaciones muy prolongadas aunque no se disminuya el tamaño de las metástasis. Además, en el cáncer de mama es frecuente que existan lesiones no fácilmente medibles (como las metástasis óseas o el derrame pleural), por lo que la SLP puede indicar mejor que la tasa de respuestas el posible beneficio de un fármaco.

La SG no es parámetro adecuado para medir la eficacia de un fármaco por diversos motivos. Es frecuente que en los ensayos clínicos que se realizan en la primera línea de tratamiento de diversas patologías veamos un beneficio en SLP pero no en SG, tal y

como pasa con los estudios de bevacizumab en cáncer de mama. Esta ausencia de beneficio en SG se ha intentado justificar por diferentes motivos. Por un lado, por la existencia de un sobrecruzamiento, es decir, pacientes del brazo control que reciben el fármaco experimental en el momento de la progresión tumoral. Y, por otro, porque ciertos tumores como el cáncer de mama metastásico, que actualmente son enfermedades con una prolongada supervivencia tras la progresión, precisarían de ensayos con un elevado número de pacientes para encontrar diferencias en SG (138). Lo cierto es que en la SG influyen los diversos tratamientos utilizados tras la progresión, por lo que los posibles biomarcadores o perfiles génicos relacionados con la misma estarían más implicados en el pronóstico que en la predicción de beneficio de un tratamiento concreto.

Por ello, la SLP suele elegirse como objetivo principal en la mayoría de ensayos clínicos sistémico realizados en la primera línea de tratamiento del cáncer de mama diseminado (al igual que en otros tumores), y, por todo lo expuesto, fue también el parámetro elegido para la generación de los modelos predictivos en nuestro estudio.

Las variables que se incluyeron en nuestro análisis univariante para SLP se seleccionaron por su relevancia en función de lo publicado por otros autores en diversos trabajos donde se analizaba su papel pronóstico (27-34). Para la variable “tratamientos previos”, dado que en nuestra muestra el número de pacientes con “sólo antraciclinas previas” era escaso y no había grandes diferencias significativas en las curvas Kaplan-Meier entre “ningún tratamiento previo” y “sólo antraciclinas”, se decidió realizar el análisis univariante agrupando estas dos situaciones. Por este motivo tanto en el análisis univariante como en el posterior multivariante, la variable analizada fue “antraciclinas y taxanos previos”.

En el trabajo de Llombart y cols (34) realizado sobre pacientes que también fueron tratadas con bevacizumab y un taxano, en este caso todas en primera línea de tratamiento, el análisis multivariante mostró que el ILE, la presencia de afectación hepática y/o más de 3 localizaciones metastásicas, el subtipo TN y el haber recibido tratamiento previo con antraciclinas y taxanos se asociaron de manera independiente con la SG.

A diferencia del estudio de Llombart y cols, en el análisis multivariante de nuestra serie únicamente la variable localización metastásica (\geq de 3 localizaciones o afectación hepática) mantuvo la significación estadística, mientras que el *status* del RE se aproximó a ella ($p=0.06$). Dado que todas las variables que incluimos en este análisis habían demostrado su influencia en la SLP en otros estudios, y que podían no haber sido significativas en nuestra serie por el pequeño tamaño muestral, se decidió generar el *modelo clínico* a partir de todas ellas, independientemente de su significación estadística, para evitar que variables relevantes se quedaran fuera.

Sin embargo, no hay evidencia de que estas variables clínicas puedan tener un papel como predictoras de beneficio a bevacizumab. Por tanto, es probable que las diferencias en SLP encontradas con nuestro *modelo clínico* sean debidas al valor pronóstico de dichas variables, y así lo sugiere el hecho de que el *modelo clínico* sea más significativo a tiempos prolongados (24 meses) que a tiempos cortos (6 meses). Sin embargo, cuando se combinan estas variables con un perfil génico (*modelo combinado génico-clínico*) se aumenta la precisión predictiva a tiempos cortos (con respecto al *modelo génico*), por lo que también podrían jugar en cierto papel en la predicción de beneficio a bevacizumab.

2.3. Relevancia biológica de los genes incluidos en los modelos *génico* y *combinado génico-clínico*

Los 13 genes que componen el *modelo combinado génico-clínico* son: *REL*, *FNI*, *NOTCH3*, *DDIT4*, *IL8*, *ADRBK1*, *FABP5*, *PLAU*, *HMBS*, *PTK2B*, *THBS1*, *SLC39A6* y *TCF3*. De estos, 8 son comunes con los 11 que a su vez forman el *modelo génico* y que son: *SLC39A6*, *REL*, *IL8*, *FNI*, *PLAU*, *HES1*, *HMBS*, *DDIT4*, *FABP5*, *ACVRL1* y *PGR*.

A continuación se expondrán brevemente algunos detalles sobre estos ocho genes comunes, y su posible papel como biomarcadores en otros trabajos previos, si bien, es preciso señalar que el análisis unigénico no es exactamente extrapolable a un estudio de expresión múltiple.

REL es un gen que codifica un factor de transcripción, RELB, proteína integrante de la vía de señalización NF-κB. En el cáncer de mama, se ha visto relacionado con el subtipo *basal-like* donde hay una activación aberrante de esta vía, especialmente en aquellos tumores con pérdida de moléculas de adhesión como la E-cadherina (139).

FNI es un gen que codifica para las diferentes isoformas de fibronectina (140). Estas proteínas están implicadas en los procesos de adhesión y migración celular, incluyendo embriogénesis, cicatrización de heridas, coagulación e incluso en el desarrollo de metástasis (140, 141). Los depósitos de fibronectina en las células del estroma asociadas al cáncer de mama no sólo están incrementados sino que su conformación es distinta y suponen una alteración en la adhesión y en su comportamiento proangiogénico, promoviendo la vascularización y el crecimiento tumoral (142).

DDIT4 es un gen que se induce en respuesta a daños al DNA y actúa como supresor tumoral. En las células normales este gen se induce en una situación de hipoxia, siendo capaz de inhibir la vía de mTOR y, por tanto, provocar una inhibición del crecimiento y

una promoción de la supervivencia celular. En un estudio realizado en más de 200 muestras parafinadas de tumores primarios de mama se ha descrito que en los subtipos TN y Her2 positivo habría una disminución en la expresión de DDTI4 en condiciones de hipoxia, una estabilización de HIF-1 α y, finalmente, un crecimiento y una supervivencia celular mediada por la reactivación de la vía de mTOR (143).

IL8 es una citoquina de naturaleza proinflamatoria. Su síntesis se realiza en fibroblastos, células endoteliales, células inflamatorias y también células tumorales. Es un potente factor quimiotáctico de neutrófilos, regula la producción de proteínas de adhesión, amplifica la respuesta inflamatoria local y es un potente proangiogénico. Esta citoquina, tras unirse a sus receptores, activa múltiples cascadas de señalización promoviendo la supervivencia celular, migración e invasión en distintos tipos de tumores, incluido el cáncer de mama (144). Además, se ha demostrado que incrementa la transición epitelio mesénquima y la invasión en los tumores de mama subtipo TN (145).

Los cuatro genes descritos previamente son, dentro de los ocho comunes en ambos modelos, los que presentan mayor magnitud dentro del modelo combinado y, por tanto, los más importantes en su capacidad predictora. A continuación describiremos brevemente el resto de genes comunes.

FABP5 codifica una proteína citoplasmática de unión de ácidos grasos en las células epidérmicas participando de forma crucial en el metabolismo lipídico. Recientemente se ha publicado su relación en el cáncer de mama con el subtipo TN, asociándose con factores de mal pronóstico, con una disminución de la SLP, así como con la capacidad de metastatizar a través de su interacción con la vía de EGFR (146).

PLAU es un gen que tiene como producto una serie de proteasas encargadas de la degradación de la matriz extracelular, promoviendo así la migración celular y el

desarrollo de metástasis. Los mecanismos transcripcionales por los que se ve sobreexpresado no son bien conocidos, si bien hay algunos trabajos que relacionan su expresión aumentada en el cáncer de mama metastásico con un incremento de la agresividad (147).

La porfobilinógeno deaminasa (o hidroximetilbilano sintasa) es una enzima, codificada por el gen *HMBS*, que está involucrada en el tercer paso del metabolismo de la porfirina. Una actividad deficitaria de esta enzima está relacionada con la diseminación metastásica. Sin embargo no se han publicado la relación de dicha enzima con el cáncer de mama ni su inclusión en perfiles génicos relacionados con tumores sólidos (148).

SLC39A6 codifica una proteína transportadora de zinc de la membrana plasmática, ZIP6. El zinc es un cofactor esencial para cientos de enzimas, estando implicado en procesos como la transcripción génica, el crecimiento, desarrollo y diferenciación celular. Se ha descrito que la expresión de este gen presenta una asociación significativa con la expresión IHQ del RE en el cáncer de mama, y que su proteína producto tiene una potencial actividad metaloproteasa que hace que diversos trabajos lo relacionen con la diseminación ganglionar y progresión tumoral (149).

2.4. Capacidad predictiva de los modelos generados en nuestro trabajo y comparación con otros estudios de biomarcadores de respuesta a bevacizumab en cáncer de mama

En la investigación de perfiles génicos y biomarcadores, como ya se ha comentado, hay que tener en cuenta que para su aplicación clínica es esencial la validación externa de los mismos por el riesgo de que se produzcan hallazgos debidos al azar. La complejidad y el coste de la validación externa en grandes series de pacientes hacen que sólo una pequeña parte de los posibles biomarcadores que se encuentran lleguen a ser utilizados en la toma de decisiones clínicas. Por otro lado, la falta de estandarización y

sensibilidad de los métodos utilizados (técnicas de biología molecular y procedimientos estadísticos) reduce la reproducibilidad y puede generar resultados discordantes entre distintos laboratorios.

En este escenario complejo es donde hemos desarrollado nuestro trabajo con la finalidad de encontrar una o varias herramientas que sean capaces de seleccionar aquellas pacientes con cáncer de mama diseminado Her2 negativo que obtendrán un mayor beneficio con la combinación de bevacizumab y paclitaxel semanal.

Una cuestión importante a tener en cuenta es que la mayoría de los estudios génicos no aporta ningún valor adicional frente a las variables clínicas clásicas. En nuestro estudio, al no existir variables clínicas que hayan sido asociadas de forma sólida con la respuesta o beneficio a bevacizumab, se seleccionaron los factores pronósticos clínicos más importantes, que pueden influir en la SLP. Otras variables que podrían jugar un papel en la predicción de beneficio del tratamiento, como la HTA o el estado general, no se incluyeron al no poder ser recogidas adecuadamente en un estudio retrospectivo. Además de analizar el impacto de un perfil génico sobre la SLP, se elaboró un modelo combinando las variables génicas y clínicas para evaluar si se mejoraba la predicción.

Tal y como se ha detallado previamente, el *modelo génico* se compone de 11 genes que parecen ser de especial relevancia en las primeras fases del tratamiento con bevacizumab y paclitaxel semanal, por lo que podrían jugar un papel importante en la resistencia primaria a dicho tratamiento. Por tanto, sugiere que el perfil génico tendría un rol primordial en la predicción de respuesta o beneficio al tratamiento y no sobre el pronóstico. Sin embargo, es posible que en la evolución natural de la enfermedad y tras posteriores tratamientos ocurran cambios en la expresión de diferentes genes que modulen la capacidad predictiva de nuestro perfil. Es en ese momento, más a largo

plazo, cuando adquieren una mayor relevancia las características clínicas incluidas en el modelo clínico, debido a su papel pronóstico importante.

La fusión de ambos tipos de variables, clínicas y génicas, en un *modelo combinado* consiguió proporcionarnos una herramienta que se asoció a una mejor capacidad predictiva que la que conseguía el *modelo clínico* y el *génico* por separado en los diferentes tiempos estudiados. Sin embargo, aunque la buena predicción en los primeros meses sugiere que también pudiera tener un efecto predictivo de respuesta/beneficio al tratamiento, el marcado impacto a largo plazo indica que probablemente sea un modelo en el que se combinen factores pronósticos con factores predictivos de respuesta.

Es de destacar que los genes incluidos en el *modelo combinado* difieren parcialmente de los del *modelo génico*, manteniéndose comunes sólo 8 de ellos. Esta variación puede deberse a que algunos de los genes que inicialmente conformaban el modelo génico estén relacionados con las variables clínicas incluidas, de forma que unos puedan perder relevancia y otros ganarla a la hora de predecir en conjunto dentro del mismo modelo. Es importante el hecho de que pese a ser genes relacionados con la angiogénesis, también están implicados en la carcinogénesis del cáncer de mama, la transición epitelio mesénquima y diversas vías moleculares que pueden ir modificando el comportamiento biológico del tumor a lo largo del tiempo.

Los estudios publicados sobre biomarcadores de bevacizumab en cáncer de mama derivan en su mayor parte de análisis exploratorios realizados dentro de los principales ensayos clínicos fase III, pero ninguno utiliza perfiles génicos o modelos génico-clínicos comparables ni en metodología ni en resultados con nuestro trabajo.

El subestudio de biomarcadores realizado dentro del estudio E2100 analizó la expresión proteica por IHQ de VEGFA y VEGFR2 sin encontrar una correlación con beneficio del

uso de bevacizumab (113). Sin embargo, Miles y cols publicaron el análisis de biomarcadores del estudio AVADO en el que la presencia de niveles plasmáticos basales elevados de VEGFA y VEGFR2 sí se correlacionó con un beneficio en SLP para las pacientes tratadas con bevacizumab (98). Los resultados del estudio de biomarcadores del ensayo AVEREL (fase III de bevacizumab en combinación con docetaxel y trastuzumab en primera línea de cáncer de mama diseminado Her2 positivo) son consistentes con estos hallazgos, en cuanto al papel de niveles plasmáticos elevados de VEGFA y el beneficio en SLP de bevacizumab (150). Por su parte, los resultados del estudio BEATRICE (fase III en cáncer de mama localizado TN donde se evalúa la adición de bevacizumab a la quimioterapia adyuvante) también refrendan los hallazgos del estudio AVADO, encontrando una asociación entre altos niveles plasmáticos de VEGFR2 y un incremento de SLP en las pacientes tratadas con bevacizumab (151). Un meta-análisis publicado recientemente, que analiza los valores de muestras plasmáticas de pacientes incluidas en los estudios BEATRICE, E2100 y GeparQuinto (fase III de bevacizumab en neoadyuvancia en cáncer de mama Her2 negativo), confirma el valor predictivo de SLP de los niveles plasmáticos basales elevados de VEGFA en pacientes tratadas con bevacizumab (152). Parece que los niveles plasmáticos elevados de VEGFA también podrían tener un papel en la predicción de respuesta a bevacizumab en otros tumores como el cáncer de páncreas o el cáncer gástrico (95).

Estos estudios, sin embargo, presentan limitaciones metodológicas por el diseño retrospectivo de los mismos y la ausencia de validación. Es por este motivo que se hace necesario un estudio prospectivo que aclare el valor como biomarcador de los niveles plasmáticos basales de VEGFA, que según lo comentado previamente es el parámetro con datos más consistentes y uniformes. Con esta finalidad se ha desarrollado el estudio fase III MERiDiAN en primera línea de cáncer de mama diseminado Her2 negativo,

donde se investiga el valor predictivo de los niveles plasmáticos de VEGFA en pacientes tratadas con bevacizumab y paclitaxel, y que aportará la información adicional necesaria para introducir o no su utilización como biomarcador en la clínica (72, 95).

Respecto al posible papel de SNPs de VEGF en la predicción de eficacia a bevacizumab existen diversas publicaciones sin que se hayan obtenido datos concluyentes. Un extenso trabajo publicado por Haas y cols sobre 1400 pacientes incluidos en seis estudios fase III randomizados en distintos tipos de tumor, incluyendo el estudio AVADO, para establecer las potenciales relaciones entre casi 200 variantes genéticas de la vía del VEGF y un beneficio del tratamiento con bevacizumab, concluyó que sólo tres variantes de VEGFC, EPAS1 y del receptor alfa de la IL8 se correlacionaban significativamente con un efecto sobre SLP en pacientes tratados con bevacizumab (153). En esta línea, los resultados del análisis realizado por Allegrini y cols concluyen que una variante de VEGFR2 y otra de IL8 predicen un beneficio en SLP en pacientes con cáncer de mama tratadas con paclitaxel y bevacizumab (154).

Como ya se ha comentado, estos estudios no son comparables con nuestro trabajo por la metodología utilizada. Sin embargo, parece importante el papel de VEGF como biomarcador predictivo de beneficio con bevacizumab en pacientes con cáncer de mama metastásico Her2 negativo, que es la población de nuestro estudio, por lo que el racional para la identificación de un modelo génico relacionado con la angiogenesis como predictor de beneficio a bevacizumab y paclitaxel es sólido. No obstante, llama la atención que no forme parte de nuestro modelo los genes VEGFA ni VEGFR2, cuando si lo hacen otros genes mencionados en estos estudios, como IL8, pese a haber sido incluidos entre los 168 genes que hemos analizado. Esto puede ser debido a que en nuestro estudio no hemos medido la relevancia clínica de las diferencias de expresión de ciertos genes o sus proteínas en las muestras tumorales o en sangre periférica, sino que

hemos elaborado unos modelos con variables que pueden estar interrelacionados entre sí y cuya combinación es la que tiene el poder predictivo, no así el valor individual de cada uno de ellos por separado.

CONCLUSIONES

Tras analizar la expresión de 168 genes relacionados con la angiogénesis, se ha identificado un *modelo génico* (compuesto por 11 genes) y un *modelo combinado génico-clínico* (formado por 13 genes y 5 variables clínicas) con capacidad predictiva de SLP en una serie de pacientes con cáncer de mama Her2 negativo diseminado tratadas con bevacizumab y paclitaxel semanal.

Ambos modelos discriminan dos grupos de pacientes con diferencias clínicamente muy relevantes en la supervivencia libre de progresión y en la supervivencia global.

Los *modelos génico* y *génico-clínico* tienen una mejor capacidad predictiva de SLP a corto plazo que el *modelo clínico*, por lo que podrían considerarse predictores de beneficio al tratamiento bevacizumab y paclitaxel semanal. El *modelo combinado génico-clínico* es el que se asocia a una mayor precisión en la predicción de supervivencia libre de progresión en todos los puntos de tiempo estudiados, tanto a corto como a largo plazo.

Para que los modelos identificados pudieran ser incorporados en la práctica clínica deberían ser validados en estudios prospectivos con un gran tamaño muestral.

No existen en la literatura estudios similares de perfiles génicos o modelos génico-clínicos predictores de supervivencia libre de progresión en pacientes de características similares a las nuestras tratadas con la combinación bevacizumab-paclitaxel.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La combinación bevacizumab y paclitaxel semanal ha logrado un incremento de SLP frente a paclitaxel en monoterapia en primera línea de tratamiento del cáncer de mama diseminado. Sin embargo, carecemos de biomarcadores predictivos de eficacia para bevacizumab que estén validados de forma prospectiva.

El objetivo de este estudio fue identificar, en pacientes tratadas con bevacizumab y paclitaxel semanal, un perfil de expresión de genes relacionados con la angiogénesis que permitiera clasificar a las enfermas en dos grupos con distinta SLP, así como un modelo predictivo de SLP que combinara factores génicos y clínicos.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se incluyeron 60 pacientes con cáncer de mama avanzado Her2 negativo tratadas con bevacizumab y paclitaxel semanal. Los RNAs se obtuvieron de muestras parafinadas de los tumores primarios de mama. Se midió la expresión de 168 genes relacionados con la angiogénesis mediante PCR cuantitativa a tiempo real. El análisis multivariante de las variables clínicas se realizó mediante regresión de COX. Los modelos predictivos *génico* y *combinado génico-clínico* fueron ajustados mediante la regresión penalizada de Lasso y validados mediante LOOCV. Se generaron curvas de KM y curvas ROC tiempo-dependientes para estimar la capacidad predictiva de SLP de todos los modelos, y se utilizó el test log-rank de permutaciones múltiple para evaluar la significación estadística.

RESULTADOS

De las pacientes incluidas, un 81.7% tenían RE positivos, el ILE fue ≤ 24 meses en el 28% de los casos y más de la mitad de las enfermas presentaba tres o más localizaciones metastásicas o afectación hepática. Un 46.7% de las pacientes había recibido quimioterapia adyuvante con antraciclinas y taxanos; un 40% había tenido una o más

líneas para la enfermedad avanzada previas al tratamiento con bevacizumab y paclitaxel semanal. La mediana de SLP fue 11.4 meses y la mediana de seguimiento de 20.29 meses. El *modelo clínico* incluyó 5 variables (ILE, *status* del RE, antraciclinas y taxanos previos, número de líneas de quimioterapia previas y localización metastásica). El análisis multivariante mostró que sólo la localización metastásica (<3 vs \geq 3 localizaciones o metástasis hepáticas) se correlaciona significativamente con SLP. El *modelo génico* se generó con 11 genes que en el análisis multivariante mostraron ser predictores de SLP. El *modelo combinado génico-clínico* se elaboró con las 5 variables descritas y 13 genes.

Los *modelos génico* y *génico-clínico* se correlacionaron de forma significativa con la SLP y la SG. Identificaron dos grupos de pacientes con diferencias en las medianas de SLP estadísticamente significativas ($p=0.048$ para el *modelo génico*, $p<0.001$ para el *modelo combinado génico-clínico*). El *modelo génico* presentó buena capacidad predictiva a corto plazo, a los 6 meses, con un AUC de 0.69, mientras que el *modelo combinado* es el que se asoció a una mejor capacidad predictiva en todo el rango de tiempo estudiado.

CONCLUSIONES

Tras analizar la expresión de 168 genes relacionados con la angiogénesis, se ha identificado un *modelo génico* y un *modelo combinado génico-clínico* con capacidad predictiva de SLP en una serie de pacientes con cáncer de mama Her2 negativo diseminado tratadas con bevacizumab y paclitaxel semanal. Ambos modelos discriminan dos grupos de pacientes con diferencias clínicamente muy relevantes en la SLP y SG. El *modelo génico-clínico* fue el que mostró la mayor capacidad de predicción en cualquier punto del tiempo. Estos resultados deben ser validados de forma prospectiva en series independientes antes de su incorporación a la práctica clínica.

CLAVE DE ABREVIATURAS

ANG2: Angiopietina 2

AUC: Área bajo la curva

CK: Citoqueratinas

CVPI: Índice pronóstico

DMV: Densidad microvascular

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

EMA: Agencia europea del medicamento (*European Medicines Agency*)

FDA: Agencia americana del medicamento (*Food and Drug Administration*)

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

Her2: Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano

HR: Hazard ratio o razón de tasas

HTA: Hipertensión arterial

IA: Inhibidor de la enzima aromataasa

IC: Intervalo de confianza

IHQ: Inmunohistoquímica

IL8: Interleuquina 8

ILE: Intervalo libre de enfermedad

KM: Curvas de supervivencia Kaplan-Meier

LHRH: Hormona liberadora de la hormona luteinizante

LOOCV: Método de validación cruzada (*Leave-One-Out Cross Validation*)

PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno-1

PIGF: Factor de crecimiento placentario

PS: Performance status

qRT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa tras Transcriptasa en Reverso

RE: Receptor de estrógenos

RECIST: Criterios de respuesta radiológica

RH: Receptores hormonales

ROC: Curvas tiempo-dependientes (*Receiver Operating Curves*)

RP: Receptor de progesterona

SG: Supervivencia global

SLP: Supervivencia libre de progresión

SNC: Sistema nervioso central

SNPs: polimorfismos de nucleótido único

TN: Triple negativo

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular

VEGFR: Receptor de unión del factor de crecimiento del endotelio vascular

ANEXO

Tabla con análisis univariante para SLP de los genes incluidos en el estudio

<i>Símbolo</i>	<i>Alias</i>	<i>HR</i>	<i>P.Valor</i>
ACVRL1	ACVRLK1, ALK-1, ALK1, HHT, HHT2, ORW2, SKR3, TSR-I	1.21 (0.99-1.48)	0.0617
ADM	AM	0.96 (0.87-1.07)	0.4878
ADRBK1	BARK1, BETA-ARK1, FLJ16718, GRK2	0.95 (0.77-1.17)	0.6332
ALDH4A1	ALDH4, DKFZp779M035, P5CD, P5CDh	1.1 (0.92-1.31)	0.2705
ANGPT1	AGP1, AGPT, Ang1, KIAA0003	1.01 (0.87-1.18)	0.8485
ANGPT2	AGPT2, Ang2	1 (0.89-1.13)	0.9869
ANGPT4	AGP4, ANG-3, ANG4, MGC138181, MGC138183	1.01 (0.9-1.13)	0.903
ANGPTL4	ANGPTL2, ARP4, FIAF, HFARP, NL2, PGAR, pp1158	0.98 (0.87-1.09)	0.6662
AURKA	AIK, ARK1, AurA, AURORA2, BTAK, MGC34538, STK15, STK6, STK7	0.95 (0.85-1.06)	0.3653
AURKB	Aik2, AIM-1, AIM1, ARK2, AurB, aurkb-sv1, aurkb-sv2, IPL1, STK12, STK5	0.99 (0.89-1.11)	0.8723
AURKC	AIE2, AIK3, ARK3, AurC, aurora-C, STK13	1 (0.9-1.12)	0.9534
BAG1	HAP, RAP46	1.09 (0.93-1.27)	0.2837
BCL2	Bcl-2	0.96 (0.85-1.08)	0.4954
BIRC5	API4, EPR-1	1.06 (0.89-1.25)	0.5197
BMI1	MGC12685, PCGF4, RNF51	1.04 (0.87-1.24)	0.6737
BMP1	FLJ44432, PCOLC, PCP, PCP2, TLD	0.99 (0.87-1.14)	0.9077
BMP2	BMP2A	1.01 (0.9-1.13)	0.9134
BMP4	BMP2B, BMP2B1, MCOPS6, OFC11, ZYME	1.01 (0.9-1.14)	0.8367
BMP7	Bcl-2	0.97 (0.87-1.09)	0.6641
BSG	5F7, CD147, EMMPRIN, M6, OK, TCSF	1.05 (0.85-1.3)	0.6637
BST1	CD157	1.02 (0.9-1.16)	0.7441
CA9	CAIX, MN	0.98 (0.87-1.09)	0.6669
CAV1	BSCL3, CAV, CGL3, MSTP085, VIP21	1 (0.84-1.18)	0.9846
CAV2	CAV, MGC12294	0.96 (0.82-1.13)	0.6377
CCL2	GDCF-2, HC11, HSMCR30, MCAF, MCP-1, MCP1, MGC9434, SCYA2, SMC-CF	0.99 (0.82-1.2)	0.9319
CD24	CD24A, FLJ22950, FLJ43543, MGC75043	0.95 (0.81-1.1)	0.4884
CD36	CHDS7, FAT, GP3B, GP4, GPIV, PASIV, SCARB3	1 (0.88-1.12)	0.9346
CD44	CD44R, CDW44, CSPG8, ECMR-III, HCELL, HUTCH-I, IN, LHR, MC56, MDU2, MDU3, MGC10468, MIC4, Pgp1	1.09 (0.96-1.25)	0.1967
CD47	IAP, MER6, OA3	0.95 (0.81-1.11)	0.5501
CD68	DKFZp686M18236, GP110, macrosialin, SCARD1	0.96 (0.79-1.16)	0.6854
CDH11	CAD11, CDHOB, OB, OSF-4	1.28 (1.05-1.57)	0.0153*
CDH13	CDHH	1.03 (0.9-1.19)	0.6395
CDH5	7B4, CD144, FLJ17376	1.07 (0.89-1.28)	0.4662
CLDN4	CPE-R, CPER, CPETR, CPETR1, hCPE-R, WBSR8	1.05 (0.87-1.26)	0.6036
CSF2	GM-CSF, GMCSF, MGC131935, MGC138897	1.01 (0.9-1.13)	0.903

CSK	MGC117393	1.04 (0.86-1.25)	0.7178
CTNNB1	beta-catenin, CTNNB, DKFZp686D02253, FLJ25606, FLJ37923	1.09 (0.92-1.29)	0.2934
CTSL2	CATL2, CTSU, CTSV, MGC125957	1 (0.88-1.13)	0.989
CXCL1	FSP, GRO1, GROa, MGSA, MGSA-a, NAP-3, SCYB1	0.95 (0.85-1.06)	0.3417
CXCL12	IRH, PBSF, SCYB12, SDF-1a, SDF-1b, SDF1, SDF1A, SDF1B, TLSF, TLSF-a, TLSF-b, TPAR1	1.27 (0.95-1.7)	0.1008
CXCL2	CINC-2a, GRO2, GROb, MGSA-b, MIP-2a, MIP2, MIP2A, SCYB2	1.01 (0.9-1.13)	0.9044
DDIT4	Dig2, FLJ20500, REDD-1, REDD1, RP11-442H21, RTP801	1.07 (0.93-1.22)	0.3471
DLG1	dj1061C18.1, DKFZp761P0818, DKFZp781B0426, DLGH1, hdlg, SAP-97, SAP97	1.23 (0.96-1.58)	0.1168
DLL4	hdelta2, MGC126344	1.03 (0.89-1.18)	0.7043
EDN1	ET1, HDLCQ7, PPET1	0.99 (0.87-1.13)	0.8645
EGFR	ERBB, ERBB1, HER1, mENA, PIG61	0.98 (0.85-1.12)	0.7286
EGLN1	C1orf12, DKFZp761F179, ECTY3, HIFPH2, HPH2, PHD2, SM-20, SM20, ZMYND6	0.99 (0.89-1.11)	0.8845
EPAS1	bHLHe73, ECTY4, HIF2A, HLF, MOP2, PASD2	1 (0.89-1.13)	0.9936
EPCAM	17-1A, 323/A3, CD326, CO-17A, DIAR5, EGP-2, EGP314, EGP34, EGP40, Ep-CAM, ESA, GA733-2, HEA125, HNPCC8, KS1/4, KSA, Ly74, M4S1, MH99, MIC18, MK-1, MOC31, TACST-1, TACSTD1, TROP1	1.13 (0.95-1.34)	0.2028
EPHA2	ARCC2, ECK	0.93 (0.82-1.05)	0.2606
ERBB2	CD340, HER-2, HER-2/neu, HER2, MLN19, NEU, NGL, TKR1	1.06 (0.9-1.26)	0.4515
ESR1	DKFZp686N23123, ER, Era, ESR, ESRA, NR3A1	1.12 (1.02-1.24)	0.0202*
F11R	CD321, JAM, JAM-1, JAM-A, JAM1, JAMA, JCAM, KAT, PAM-1	1.17 (0.95-1.44)	0.1302*
FABP5	E-FABP, EFABP, PA-FABP, PAFABP	0.86 (0.75-0.98)	0.0245*
FGF1	AFGF, ECGF, ECGF-beta, ECGFA, ECGFB, FGF-alpha, FGFA, GLIO703, HBGF1	1.07 (0.93-1.23)	0.3455
FGF2	BFGF, FGFB, HBGF-2	0.92 (0.84-1.02)	0.1259
FGFR1	BFGFR, CD331, CEK, FGFBR, FLG, FLJ99988, FLT2, H2, H3, H4, H5, HBGFR, KAL2, N-SAM, OGD	0.98 (0.83-1.17)	0.8368
FGFR4	CD334, JTK2, MGC20292, TKF	0.97 (0.86-1.09)	0.5846
FIGF	VEGF-D, VEGFD	1.01 (0.91-1.13)	0.8144
FLT1	FLT, VEGFR1	1 (0.86-1.17)	0.9826
FLT4	FLT41, LMPH1A, PCL, VEGFR3	1.03 (0.9-1.19)	0.6351
FLVCR2	C14orf58, CCT, EPV, FLJ20371, FLVCRL14q, MFSD7C, PVHH	1 (0.89-1.11)	0.9546
FN1	CIG, DKFZp686F10164, DKFZp686H0342, DKFZp686I1370, DKFZp686O13149, ED-B, FINC, FN, FNZ, GFND, GFND2, LETS, MSF	1.27 (1.1-1.47)	0.0026*
FOXC2	FKHL14, LD, MFH-1, MFH1	0.98 (0.9-1.07)	0.6776
FYN	MGC45350, SLK, SYN	0.97 (0.83-1.14)	0.7353
GABPA	E4TF1-60, E4TF1A, NFT2, NRF2, NRF2A	0.96 (0.8-1.15)	0.6729

GAL	GALN, GLNN, GMAP, MGC40167	0.94 (0.84-1.05)	0.2743
GRB7		1.02 (0.91-1.16)	0.6933
GSTM1	GST1, GSTM1-1, GSTM1a-1a, GSTM1b-1b, GTH4, GTM1, H-B, MGC26563, MU, MU-1	0.98 (0.89-1.08)	0.6916
HBB	beta-globin, CD113t-C	1.03 (0.9-1.17)	0.7073
HELT	bHLHb44, HCM1228, HESL, Mgn	0.98 (0.9-1.06)	0.5646
HES1	bHLHb39, FLJ20408, HES-1, HHL, HRY	1.07 (0.96-1.21)	0.2635
HIF1A	bHLHe78, HIF-1alpha, HIF1, HIF1-ALPHA, MOP1, PASD8	1 (0.89-1.13)	0.9873
HMBS	PBG-D, PBGD, PORC, UPS	0.9 (0.8-1.02)	0.1014
HOXB13	PSGD	1.03 (0.92-1.16)	0.5867
ID1	bHLHb24, dJ857M17.1, ID	0.94 (0.79-1.1)	0.4344
ID2	bHLHb26, GIG8, ID2A, ID2H, MGC26389	1.18 (0.9-1.54)	0.2211
ID3	bHLHb25, HEIR-1	1.03 (0.89-1.18)	0.727
ID4	bHLHb27, IDB4	1 (0.9-1.12)	0.9523
IGF1R	CD221, IGFIR, IGFR, JTK13, MGC142170, MGC142172, MGC18216	1.11 (0.95-1.31)	0.1824
IGFBP2	IBP2, IGF-BP53	1.09 (0.96-1.23)	0.1999
IGFBP3	BP-53, IBP3	0.99 (0.88-1.11)	0.8571
IHH	BDA1, HHG2	0.95 (0.87-1.04)	0.2676
IL13	ALRH, BHR1, IL-13, MGC116786, MGC116788, MGC116789, P600	1.01 (0.9-1.13)	0.903
IL17RB	CRL4, EVI27, IL17BR, IL17RH1, MGC5245	1.04 (0.96-1.14)	0.3337
IL23A	IL-23, IL-23A, IL23P19, MGC79388, P19, SGRF	1 (0.89-1.13)	0.9867
IL6	BSF2, HGF, HSF, IFNB2, IL-6	0.98 (0.88-1.09)	0.7271
IL8	3-10C, AMCF-I, b-ENAP, CXCL8, GCP-1, GCP1, IL-8, K60, LECT, LUCT, LYNAP, MDNCF, MONAP,	0.92 (0.86-0.97)	0.0053*
ITGB2	CD18, LAD, LCAMB, LFA-1, MAC-1, MF17, MFI7	0.92 (0.76-1.13)	0.4335
JAG1	AGS, AHD, AWS, CD339, HJ1, JAGL1, MGC104644	1 (0.87-1.14)	0.9471
JAG2	HJ2, SER2	1.03 (0.91-1.16)	0.683
JAM2	C21orf43, CD322, JAM-B, JAMB, PRO245, VE-JAM, VEJAM	1.04 (0.89-1.22)	0.6098
JAM3	FLJ14529, JAM-C, JAMC	1.06 (0.88-1.27)	0.5503
KDR	CD309, FLK1, VEGFR, VEGFR2	0.99 (0.84-1.15)	0.8554
KIT	C-Kit, CD117, PBT, SCFR	1 (0.88-1.13)	0.9616
KLF4	EZF, GKLf	1.01 (0.9-1.13)	0.8911
LOX	MGC105112	1.03 (0.88-1.21)	0.7105
LOXL2	LOR2, WS9-14	1.03 (0.89-1.19)	0.7061
MAML1	FLJ53540, KIAA0200, Mam-1, Mam1	1.14 (0.93-1.4)	0.2281
MAML2	DKFZp686N0150, hsa-mir-1260b, KIAA1819, MAM-3, MAM2, MAM3, MGC176701, MIR1260B, MLL-MAML2	0.92 (0.79-1.06)	0.2408
MAML3	CAGH3, ERDA3, GDN, KIAA1816, MAM-2, MAM2, TNRC3	1.05 (0.91-1.23)	0.4866
MBTPS1	KIAA0091, MGC138711, MGC138712, PCSK8, S1P, SKI-1	1.01 (0.86-1.18)	0.9343

MET	AUTS9, c-Met, HGFR, RCCP2	1.01 (0.89-1.15)	0.8956
MKI67	KIA	1.06 (0.91-1.23)	0.4517
MMP11	SL-3, ST3, STMY3	1.1 (0.99-1.23)	0.0653
MUC1	CD227, EMA, H23AG, KL-6, MAM6, PEM, PEMT, PUM	1.11 (0.97-1.26)	0.132
MYBL2	B-MYB, BMYB, MGC15600	1.01 (0.9-1.13)	0.8986
NCAM1	CD56, MSK39, NCAM	1 (0.89-1.12)	0.9654
NDRG1	CAP43, CMT4D, DRG1, GC4, HMSNL, NDR1, NMSL, PROXY1, RIT42, RTP, TARG1, TDD5	0.84 (0.67-1.05)	0.1231
NODAL	MGC138230	1.01 (0.9-1.13)	0.903
NOTCH1	hN1, TAN1	1.02 (0.88-1.18)	0.81
NOTCH2	AGS2, hN2	1.01 (0.82-1.24)	0.9325
NOTCH3	CADASIL, CASIL	1.4 (1.03-1.89)	0.0293*
NOTCH4	FLJ16302, INT3, MGC74442, NOTCH3	0.98 (0.87-1.11)	0.7451
NRP1	BDCA4, CD304, DKFZp686A03134, DKFZp781F1414, NP1, NRP, VEGF165R	0.89 (0.64-1.22)	0.4678
NRP2	MGC126574, NP2, NPN2, PRO2714, VEGF165R2	0.97 (0.85-1.11)	0.6846
OCN		1.09 (0.97-1.24)	0.1622
PARK7	DJ-1, DJ1, FLJ27376, FLJ34360, FLJ92274	1.04 (0.75-1.45)	0.8115
PAX8		1.01 (0.9-1.13)	0.903
PDGFRA	CD140a, MGC74795, PDGFR2, RHEPDGFRA	0.95 (0.84-1.09)	0.505
PDGFRB	CD140b, JTK12, PDGFR, PDGFR1	1.19 (0.97-1.46)	0.0948
PDK1		0.96 (0.85-1.08)	0.4904
PGR	NR3C3, PR	1.13 (1.03-1.25)	0.0118*
PLAU	ATF, u-PA, UPA, URK	1.24 (1.07-1.44)	0.0052*
PLOD1	FLJ42041, LH, LH1, LLH, PLOD	0.94 (0.71-1.25)	0.6791
PPBP	b-TG1, Beta-TG, CTAP-III, CTAP3, CTAPIII, CXCL7, LA-PF4, LDGF, MDGF, NAP-2, NAP-2-L1, PBP, SCYB7, TC1, TC2, TGB, TGB1, THBGB, THBGB1	1.03 (0.92-1.15)	0.6461
PTGS2	COX-2, COX2, GRIPGHS, hCox-2, PGG/HS, PGHS-2, PHS-2	0.95 (0.84-1.08)	0.4505
PTK2B	CADTK, CAKB, FADK2, FAK2, PKB, PTK, PYK2, RAFTK	1.12 (0.96-1.3)	0.1341
PTK6	BRK, FLJ42088	0.98 (0.86-1.11)	0.7709
PTPRC	B220, CD45, CD45R, GP180, LCA, LY5, T200	1 (0.91-1.1)	0.9745
REL	c-Rel, I-Rel	0.88 (0.77-1)	0.0619
ROBO1	DUTT1, FLJ21882, MGC131599, MGC133277, SAX3	0.99 (0.88-1.11)	0.8945
ROBO4	ECSM4, FLJ20798, MGC133352, MGC133353, MRB	1.02 (0.9-1.15)	0.7727
RRAGD	bA11D8.2, DKFZP761H171, FLJ44176, RAGD	0.97 (0.84-1.12)	0.6378
RUNX1	AML1, AML1-EVI-1, AMLCR1, CBFA2, EVI-1, PEBP2A2, PEBP2aB	0.95 (0.82-1.1)	0.4997
S1PR1	CHEHG1, D1S3362, ECGF1, edg-1, EDG1, FLJ58121, S1P1	0.96 (0.87-1.06)	0.4322
SERPINB2	HsT1201, PAI, PAI-2, PAI2, PLANH2	1 (0.89-1.12)	0.9814

SERPINE1	PAI, PAI-1, PAI1, PLANH1	1.02 (0.86-1.21)	0.8334
SHH	HHG1, HLP3, HPE3, MCOPCB5, SMMCI, TPT, TPTPS	1.01 (0.9-1.13)	0.903
SLC16A1	FLJ36745, HHF7, MCT, MCT1, MGC44475	0.92 (0.77-1.11)	0.3945
SLC16A3	MCT3, MCT4, MGC138472, MGC138474	1 (0.86-1.16)	0.9933
SLC16A4	MCT4, MCT5	1.06 (0.92-1.23)	0.3903
SLC2A1	DYT17, DYT18, GLUT, GLUT1, GLUT1DS, MGC141895, MGC141896, PED	1 (0.83-1.19)	0.9732
SLC39A6	LIV-1	1.31 (1.13-1.52)	4.00E-04*
SPARC	ON	1.16 (0.88-1.53)	0.3021
SPP1	BNSP, BSPI, ETA-1, MGC110940, OPN	1.01 (0.89-1.15)	0.8859
STAT3	APRF, FLJ20882, HIES, MGC16063	1.06 (0.87-1.28)	0.5594
TCF3	bHLHb21, E2A, ITF1, MGC129647, MGC129648, VDIR	0.94 (0.77-1.14)	0.5341
TEK	CD202b, TIE-2, TIE2, VMCM, VMCM1	1 (0.88-1.14)	0.9731
TGFB1	CED, DPD1, LAP, TGFB, TGFBeta	1.21 (0.99-1.49)	0.0861
TGFB2	MGC116892, TGF-beta2	1.07 (0.93-1.22)	0.3488
TGFB3	ARVD, FLJ16571, TGF-beta3	1.17 (0.99-1.37)	0.0652
TGFBR1	AAT5, ACVRLK4, ALK-5, ALK5, LDS1A, LDS2A, SKR4, TGFR-1	0.97 (0.77-1.23)	0.8179
TGFBR2	AAT3, FAA3, LDS1B, LDS2B, MFS2, RIIC, TAAD2, TGFBeta-RII, TGFR-2	0.98 (0.81-1.17)	0.7959
THBS1	THBS, THBS-1, TSP, TSP-1, TSP1	1.09 (0.91-1.31)	0.3683
TIE1	JTK14, TIE	1.04 (0.91-1.18)	0.5923
TIMP1	CLGI, EPA, EPO, FLJ90373, HCI, TIMP	1.15 (0.92-1.45)	0.2398
TJP1	DKFZp686M05161, MGC133289, ZO-1	1.24 (0.93-1.64)	0.1326
TNFRSF11A	CD265, FEO, LOH18CR1, ODFR, OFE, OPTB7, OSTs, PDB2, RANK, TRANCER	0.96 (0.84-1.09)	0.5328
TNFSF11	CD254, hRANKL2, ODF, OPGL, OPTB2, RANKL, sOdf, TRANCE	0.98 (0.88-1.08)	0.6631
TP63	AIS, B(p51A), B(p51B), EEC3, KET, LMS, NBP, OFC8, p40, p51, p53CP, p63, p73H, p73L, RHS, SHFM4, TP53CP, TP53L, TP73L	1 (0.89-1.12)	0.969
TWIST1	ACS3, bHLHa38, BPES2, BPES3, CRS1, H-twist, SCS, TWIST	0.96 (0.87-1.04)	0.3157
TWIST2	bHLHa39, Dermo-1, DERMO1	0.95 (0.84-1.08)	0.4581
UCHL1	PARK5, PGP 9.5, PGP9, PGP95, Uch-L1	1.01 (0.9-1.13)	0.903
VEGFA	MGC70609, MVCD1, VEGF, VEGF-A, VPF	0.91 (0.75-1.12)	0.3619
VEGFC	Flt4-L, VRP	1.09 (0.94-1.27)	0.2352
VHL	HRCA1, RCA1, VHL1	1.04 (0.8-1.36)	0.77
VIM	FLJ36605	1.06 (0.78-1.44)	0.7067
ZEB1	AREB6, BZP, DELTAEF1, FECD6, MGC133261, NIL-2-A, NIL2A, TCF8, ZEB, Zfhcp, Zfhx1a	0.96 (0.83-1.11)	0.6036
ZEB2	FLJ42816, HSPC082, KIAA0569, SIP-1, SIP1, SMADIP1, ZFHX1B	0.93 (0.79-1.1)	0.3926

BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. 2013 [cited 2015].
2. Sanchez MJ, Payer T, De Angelis R, Larranaga N, Capocaccia R, Martinez C, et al. Cancer incidence and mortality in Spain: estimates and projections for the period 1981-2012. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2010;21 Suppl 3:iii30-6.
3. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2013;63(1):11-30.
4. Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2013. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2013;24(3):792-800.
5. Armstrong K, Eisen A, Weber B. Assessing the risk of breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2000;342(8):564-71.
6. Bagnardi V, Rota M, Botteri E, Tramacere I, Islami F, Fedirko V, et al. Light alcohol drinking and cancer: a meta-analysis. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2013;24(2):301-8.
7. Chaturvedi P. Does smoking increase the risk of breast cancer? *The Lancet Oncology*. 2003;4(11):657-8; discussion 8.
8. DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. *Devita, Hellman, and Rosenberg's cancer : principles & practice of oncology*. 10th edition. ed 2014.
9. Orvieto E, Maiorano E, Bottiglieri L, Maisonneuve P, Rotmensz N, Galimberti V, et al. Clinicopathologic characteristics of invasive lobular carcinoma of the breast: results of an analysis of 530 cases from a single institution. *Cancer*. 2008;113(7):1511-20.

10. Toikkanen S, Pylkkanen L, Joensuu H. Invasive lobular carcinoma of the breast has better short- and long-term survival than invasive ductal carcinoma. *British journal of cancer*. 1997;76(9):1234-40.
11. Díaz-Rubio E, Jiménez MM. *Tratado de cáncer de mama: You & Us*; 2008.
12. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991;19(5):403-10.
13. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Paish EC, Powe DG, Gee J, et al. Biologic and clinical characteristics of breast cancer with single hormone receptor positive phenotype. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(30):4772-8.
14. Rivenbark AG, O'Connor SM, Coleman WB. Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine. *The American journal of pathology*. 2013;183(4):1113-24.
15. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(16):2784-95.
16. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(33):5287-312.

17. Eroles P, Bosch A, Perez-Fidalgo JA, Lluch A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer treatment reviews*. 2012;38(6):698-707.
18. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(14):8418-23.
19. Edge SB, American Joint Committee on Cancer. *AJCC cancer staging manual*. 7th ed. New York: Springer; 2010. xiv, 648 p. p.
20. Vicini FA, Kestin L, Huang R, Martinez A. Does local recurrence affect the rate of distant metastases and survival in patients with early-stage breast carcinoma treated with breast-conserving therapy? *Cancer*. 2003;97(4):910-9.
21. Singletary SE, Walsh G, Vauthey JN, Curley S, Sawaya R, Weber KL, et al. A role for curative surgery in the treatment of selected patients with metastatic breast cancer. *The oncologist*. 2003;8(3):241-51.
22. Newman LA. Epidemiology of locally advanced breast cancer. *Seminars in radiation oncology*. 2009;19(4):195-203.
23. Antón A. *Guía GEICAM de Práctica Clínica para el Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer de Mama Metastásico*: Comuniland S.L.; 2015.
24. Chia SK, Bramwell VH, Tu D, Shepherd LE, Jiang S, Vickery T, et al. A 50-gene intrinsic subtype classifier for prognosis and prediction of benefit from adjuvant tamoxifen. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(16):4465-72.
25. Mook S, Schmidt MK, Weigelt B, Kreike B, Eekhout I, van de Vijver MJ, et al. The 70-gene prognosis signature predicts early metastasis in breast cancer patients

between 55 and 70 years of age. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2010;21(4):717-22.

26. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2002;347(25):1999-2009.

27. Imkampe A, Bendall S, Bates T. The significance of the site of recurrence to subsequent breast cancer survival. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2007;33(4):420-3.

28. Insa A, Lluch A, Prosper F, Marugan I, Martinez-Agullo A, Garcia-Conde J. Prognostic factors predicting survival from first recurrence in patients with metastatic breast cancer: analysis of 439 patients. *Breast cancer research and treatment*. 1999;56(1):67-78.

29. Koenders PG, Beex LV, Kloppenborg PW, Smals AG, Benraad TJ. Human breast cancer: survival from first metastasis. *Breast Cancer Study Group. Breast cancer research and treatment*. 1992;21(3):173-80.

30. Yardley DA. Visceral disease in patients with metastatic breast cancer: efficacy and safety of treatment with ixabepilone and other chemotherapeutic agents. *Clinical breast cancer*. 2010;10(1):64-73.

31. Alba E, Ribelles N, Sevilla I, Rueda A, Alonso L, Marquez A, et al. Adjuvant anthracycline therapy as a prognostic factor in metastatic breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2001;66(1):33-9.

32. Pentheroudakis G, Fountzilas G, Bafaloukos D, Koutsoukou V, Pectasides D, Skarlos D, et al. Metastatic breast cancer with liver metastases: a registry analysis of

clinicopathologic, management and outcome characteristics of 500 women. *Breast cancer research and treatment*. 2006;97(3):237-44.

33. Eichbaum MH, Kaltwasser M, Bruckner T, de Rossi TM, Schneeweiss A, Sohn C. Prognostic factors for patients with liver metastases from breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2006;96(1):53-62.

34. Llombart-Cussac A, Pivot X, Biganzoli L, Cortes-Funes H, Pritchard KI, Pierga JY, et al. A prognostic factor index for overall survival in patients receiving first-line chemotherapy for HER2-negative advanced breast cancer: an analysis of the ATHENA trial. *Breast*. 2014;23(5):656-62.

35. Stuart-Harris R, Shadbolt B, Palmqvist C, Chaudri Ross HA. The prognostic significance of single hormone receptor positive metastatic breast cancer: an analysis of three randomised phase III trials of aromatase inhibitors. *Breast*. 2009;18(6):351-5.

36. Dawood S, Broglio K, Buzdar AU, Hortobagyi GN, Giordano SH. Prognosis of women with metastatic breast cancer by HER2 status and trastuzumab treatment: an institutional-based review. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(1):92-8.

37. Fabi A, Di Benedetto A, Metro G, Perracchio L, Nistico C, Di Filippo F, et al. HER2 protein and gene variation between primary and metastatic breast cancer: significance and impact on patient care. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(7):2055-64.

38. Guarneri V, Giovannelli S, Ficarra G, Bettelli S, Maiorana A, Piacentini F, et al. Comparison of HER-2 and hormone receptor expression in primary breast cancers and asynchronous paired metastases: impact on patient management. *The oncologist*. 2008;13(8):838-44.

-
39. Baselga J, Cortes J, Kim SB, Im SA, Hegg R, Im YH, et al. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2012;366(2):109-19.
40. Verma S, Miles D, Gianni L, Krop IE, Welslau M, Baselga J, et al. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2012;367(19):1783-91.
41. Wilcken N, Hornbuckle J, Gherzi D. Chemotherapy alone versus endocrine therapy alone for metastatic breast cancer. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2003(2):CD002747.
42. Klijn JG, Blamey RW, Boccardo F, Tominaga T, Duchateau L, Sylvester R, et al. Combined tamoxifen and luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist versus LHRH agonist alone in premenopausal advanced breast cancer: a meta-analysis of four randomized trials. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2001;19(2):343-53.
43. Baselga J, Campone M, Piccart M, Burris HA, 3rd, Rugo HS, Sahmoud T, et al. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2012;366(6):520-9.
44. Bachelot T, Bourcier C, Cropet C, Ray-Coquard I, Ferrero JM, Freyer G, et al. Randomized phase II trial of everolimus in combination with tamoxifen in patients with hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer with prior exposure to aromatase inhibitors: a GINECO study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(22):2718-24.
45. Robertson JF L-CA, Feltl D, Dewar J, Jasiówka M, Hewson N, et al. . Fulvestrant 500 mg versus anastrozole as first-line treatment for advanced breast cancer:

Overall survival from the Phase II 'FIRST' study. San Antonio Breast Cancer Symposium (SABCS), San Antonio, Texas. 2014;S6-04.

46. Finn RS, Crown JP, Lang I, Boer K, Bondarenko IM, Kulyk SO, et al. The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study. *The Lancet Oncology*. 2015;16(1):25-35.

47. Turner NC, Ro J, Andre F, Loi S, Verma S, Iwata H, et al. Palbociclib in Hormone-Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *The New England journal of medicine*. 2015;373(3):209-19.

48. Norris B, Pritchard KI, James K, Myles J, Bennett K, Marlin S, et al. Phase III comparative study of vinorelbine combined with doxorubicin versus doxorubicin alone in disseminated metastatic/recurrent breast cancer: National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study MA8. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2000;18(12):2385-94.

49. Paridaens R, Biganzoli L, Bruning P, Klijn JG, Gamucci T, Houston S, et al. Paclitaxel versus doxorubicin as first-line single-agent chemotherapy for metastatic breast cancer: a European Organization for Research and Treatment of Cancer Randomized Study with cross-over. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2000;18(4):724-33.

50. Sledge GW, Neuberg D, Bernardo P, Ingle JN, Martino S, Rowinsky EK, et al. Phase III trial of doxorubicin, paclitaxel, and the combination of doxorubicin and paclitaxel as front-line chemotherapy for metastatic breast cancer: an intergroup trial (E1193). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2003;21(4):588-92.

51. O'Brien ME, Wigler N, Inbar M, Rosso R, Grischke E, Santoro A, et al. Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2004;15(3):440-9.
52. Gradishar WJ, Krasnojon D, Cheporov S, Makhson AN, Manikhas GM, Clawson A, et al. Significantly longer progression-free survival with nab-paclitaxel compared with docetaxel as first-line therapy for metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(22):3611-9.
53. Andretta C, Minisini AM, Miscoria M, Puglisi F. First-line chemotherapy with or without biologic agents for metastatic breast cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2010;76(2):99-111.
54. Cobleigh MA. Other options in the treatment of advanced breast cancer. *Seminars in oncology*. 2011;38 Suppl 2:S11-6.
55. Isakoff SJ. Triple-negative breast cancer: role of specific chemotherapy agents. *Cancer journal*. 2010;16(1):53-61.
56. Senkus E, Cardoso F, Pagani O. Time for more optimism in metastatic breast cancer? *Cancer treatment reviews*. 2014;40(2):220-8.
57. Cortes J, O'Shaughnessy J, Loesch D, Blum JL, Vahdat LT, Petrakova K, et al. Eribulin monotherapy versus treatment of physician's choice in patients with metastatic breast cancer (EMBRACE): a phase 3 open-label randomised study. *Lancet*. 2011;377(9769):914-23.
58. Maisano R, Zavettieri M, Azzarello D, Raffaele M, Maisano M, Bottari M, et al. Carboplatin and gemcitabine combination in metastatic triple-negative anthracycline-

and taxane-pretreated breast cancer patients: a phase II study. *Journal of chemotherapy*. 2011;23(1):40-3.

59. Bria E, Giannarelli D, Felici A, Peters WP, Nistico C, Vanni B, et al. Taxanes with anthracyclines as first-line chemotherapy for metastatic breast carcinoma. *Cancer*. 2005;103(4):672-9.

60. Piccart-Gebhart MJ, Burzykowski T, Buyse M, Sledge G, Carmichael J, Luck HJ, et al. Taxanes alone or in combination with anthracyclines as first-line therapy of patients with metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(12):1980-6.

61. Albain KS, Nag SM, Calderillo-Ruiz G, Jordaan JP, Llombart AC, Pluzanska A, et al. Gemcitabine plus Paclitaxel versus Paclitaxel monotherapy in patients with metastatic breast cancer and prior anthracycline treatment. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(24):3950-7.

62. Chan S, Romieu G, Huober J, Delozier T, Tubiana-Hulin M, Schneeweiss A, et al. Phase III study of gemcitabine plus docetaxel compared with capecitabine plus docetaxel for anthracycline-pretreated patients with metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(11):1753-60.

63. Martin M, Ruiz A, Munoz M, Balil A, Garcia-Mata J, Calvo L, et al. Gemcitabine plus vinorelbine versus vinorelbine monotherapy in patients with metastatic breast cancer previously treated with anthracyclines and taxanes: final results of the phase III Spanish Breast Cancer Research Group (GEICAM) trial. *The Lancet Oncology*. 2007;8(3):219-25.

64. O'Shaughnessy J, Miles D, Vukelja S, Moiseyenko V, Ayoub JP, Cervantes G, et al. Superior survival with capecitabine plus docetaxel combination therapy in

anthracycline-pretreated patients with advanced breast cancer: phase III trial results. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2002;20(12):2812-23.

65. Dear RF, McGeechan K, Jenkins MC, Barratt A, Tattersall MH, Wilcken N. Combination versus sequential single agent chemotherapy for metastatic breast cancer. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2013;12:CD008792.

66. Gennari A, Stockler M, Puntoni M, Sormani M, Nanni O, Amadori D, et al. Duration of chemotherapy for metastatic breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(16):2144-9.

67. Gray R, Bhattacharya S, Bowden C, Miller K, Comis RL. Independent review of E2100: a phase III trial of bevacizumab plus paclitaxel versus paclitaxel in women with metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(30):4966-72.

68. Miles DW, Chan A, Dirix LY, Cortes J, Pivot X, Tomczak P, et al. 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(20):3239-47.

69. Miller K, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA, et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2007;357(26):2666-76.

70. O'Shaughnessy J. DV, Glaspy J., Brufsky A., Miller K., Miles D., Koralewski P., Phan S., and Bhattacharya S. Comparison of Subgroup Analyses of PFS from Three Phase III Studies of Bevacizumab in Combination with Chemotherapy in Patients with

HER2-Negative Metastatic Breast Cancer (MBC). *Cancer research*. 2009;69(24 Suppl):Abstract nr 207.

71. Robert NJ, Dieras V, Glaspy J, Brufsky AM, Bondarenko I, Lipatov ON, et al. RIBBON-1: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab for first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative, locally recurrent or metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(10):1252-60.

72. Miles DW, Dieras V, Cortes J, Duenne AA, Yi J, O'Shaughnessy J. First-line bevacizumab in combination with chemotherapy for HER2-negative metastatic breast cancer: pooled and subgroup analyses of data from 2447 patients. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2013;24(11):2773-80.

73. Rugo HS, Barry WT, Moreno-Aspitia A, Lyss AP, Cirrincione C, Leung E, et al. Randomized Phase III Trial of Paclitaxel Once Per Week Compared With Nanoparticle Albumin-Bound Nab-Paclitaxel Once Per Week or Ixabepilone With Bevacizumab As First-Line Chemotherapy for Locally Recurrent or Metastatic Breast Cancer: CALGB 40502/NCCTG N063H (Alliance). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(21):2361-9.

74. Lang I, Brodowicz T, Ryvo L, Kahan Z, Greil R, Beslija S, et al. Bevacizumab plus paclitaxel versus bevacizumab plus capecitabine as first-line treatment for HER2-negative metastatic breast cancer: interim efficacy results of the randomised, open-label, non-inferiority, phase 3 TURANDOT trial. *The Lancet Oncology*. 2013;14(2):125-33.

75. Gligorov J, Doval D, Bines J, Alba E, Cortes P, Pierga JY, et al. Maintenance capecitabine and bevacizumab versus bevacizumab alone after initial first-line

bevacizumab and docetaxel for patients with HER2-negative metastatic breast cancer (IMELDA): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2014;15(12):1351-60.

76. Martin M, Loibl S, von Minckwitz G, Morales S, Martinez N, Guerrero A, et al. Phase III trial evaluating the addition of bevacizumab to endocrine therapy as first-line treatment for advanced breast cancer: the letrozole/fulvestrant and avastin (LEA) study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(9):1045-52.

77. Miller KD, Chap LI, Holmes FA, Cobleigh MA, Marcom PK, Fehrenbacher L, et al. Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(4):792-9.

78. Brufsky AM, Hurvitz S, Perez E, Swamy R, Valero V, O'Neill V, et al. RIBBON-2: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating the efficacy and safety of bevacizumab in combination with chemotherapy for second-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(32):4286-93.

79. Brufsky A, VV, Tiangco B. et al. . Impact of bevacizumab (BEV) on efficacy of second-line chemotherapy (CT) for triple-negative breast cancer (TNBC): analysis of RIBBON-2. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(Suppl).

80. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England journal of medicine*. 1971;285(21):1182-6.

81. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *The New England journal of medicine*. 2008;358(19):2039-49.
82. Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature*. 1989;339(6219):58-61.
83. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011;473(7347):298-307.
84. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996;86(3):353-64.
85. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*. 2011;146(6):873-87.
86. Chung AS, Ferrara N. Developmental and pathological angiogenesis. *Annual review of cell and developmental biology*. 2011;27:563-84.
87. Hansen S, Grabau DA, Sorensen FB, Bak M, Vach W, Rose C. The prognostic value of angiogenesis by Chalkley counting in a confirmatory study design on 836 breast cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000;6(1):139-46.
88. Ranpura V, Pulipati B, Chu D, Zhu X, Wu S. Increased risk of high-grade hypertension with bevacizumab in cancer patients: a meta-analysis. *American journal of hypertension*. 2010;23(5):460-8.
89. Sunshine SB, Dallabrida SM, Durand E, Ismail NS, Bazinet L, Birsner AE, et al. Endostatin lowers blood pressure via nitric oxide and prevents hypertension associated with VEGF inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(28):11306-11.
90. Pant S, Martin LK, Geyer S, Wei L, Van Loon K, Sommovilla N, et al. Treatment-related Hypertension as a Pharmacodynamic Biomarker for the Efficacy of

Bevacizumab in Advanced Pancreas Cancer: A Pooled Analysis of 4 Prospective Trials of Gemcitabine-based Therapy With Bevacizumab. *American journal of clinical oncology*. 2014.

91. Wagner CC, Held U, Kofmehl R, Battegay E, Zimmerli L, Hofer S. Role of arterial hypertension as a predictive marker for bevacizumab efficacy in recurrent glioblastoma - a prospective analysis. *Acta oncologica*. 2014;53(4):572-5.

92. Gampenrieder SP, Romeder F, Muss C, Pircher M, Ressler S, Rinnerthaler G, et al. Hypertension as a predictive marker for bevacizumab in metastatic breast cancer: results from a retrospective matched-pair analysis. *Anticancer research*. 2014;34(1):227-33.

93. Hamnvik OP, Choueiri TK, Turchin A, McKay RR, Goyal L, Davis M, et al. Clinical risk factors for the development of hypertension in patients treated with inhibitors of the VEGF signaling pathway. *Cancer*. 2015;121(2):311-9.

94. Hegde PS, Jubb AM, Chen D, Li NF, Meng YG, Bernaards C, et al. Predictive impact of circulating vascular endothelial growth factor in four phase III trials evaluating bevacizumab. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013;19(4):929-37.

95. Lambrechts D, Lenz HJ, de Haas S, Carmeliet P, Scherer SJ. Markers of response for the antiangiogenic agent bevacizumab. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(9):1219-30.

96. Schneider BP, Gray RJ, Radovich M, Shen F, Vance G, Li L, et al. Prognostic and predictive value of tumor vascular endothelial growth factor gene amplification in metastatic breast cancer treated with paclitaxel with and without bevacizumab; results from ECOG 2100 trial. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013;19(5):1281-9.

97. Goede V, Coutelle O, Neuneier J, Reinacher-Schick A, Schnell R, Koslowsky TC, et al. Identification of serum angiopoietin-2 as a biomarker for clinical outcome of colorectal cancer patients treated with bevacizumab-containing therapy. *British journal of cancer*. 2010;103(9):1407-14.
98. Miles DW, de Haas SL, Dirix LY, Romieu G, Chan A, Pivot X, et al. Biomarker results from the AVADO phase 3 trial of first-line bevacizumab plus docetaxel for HER2-negative metastatic breast cancer. *British journal of cancer*. 2013;108(5):1052-60.
99. Tolaney SM DD, Boucher Y, Goel S, Martin J, Ancukiewicz M, et al. A phase II study of preoperative (preop) bevacizumab (bev) followed by dose-dense (dd) doxorubicin (A)/cyclophosphamide (C)/paclitaxel (T) in combination with bev in HER2-negative operable breast cancer (BC) *J Clin Oncol*. 2012;30(suppl):abstr 1026.
100. Baar J, Silverman P, Lyons J, Fu P, Abdul-Karim F, Ziats N, et al. A vasculature-targeting regimen of preoperative docetaxel with or without bevacizumab for locally advanced breast cancer: impact on angiogenic biomarkers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(10):3583-90.
101. Abdollahi A, Folkman J. Evading tumor evasion: current concepts and perspectives of anti-angiogenic cancer therapy. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 2010;13(1-2):16-28.
102. Batchelor TT, Duda DG, di Tomaso E, Ancukiewicz M, Plotkin SR, Gerstner E, et al. Phase II study of cediranib, an oral pan-vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent glioblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(17):2817-23.

103. Kopetz S, Hoff PM, Morris JS, Wolff RA, Eng C, Glover KY, et al. Phase II trial of infusional fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab for metastatic colorectal cancer: efficacy and circulating angiogenic biomarkers associated with therapeutic resistance. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(3):453-9.
104. Zhu AX, Sahani DV, Duda DG, di Tomaso E, Ancukiewicz M, Catalano OA, et al. Efficacy, safety, and potential biomarkers of sunitinib monotherapy in advanced hepatocellular carcinoma: a phase II study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(18):3027-35.
105. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 2005;121(3):335-48.
106. Bidard FC, Mathiot C, Degeorges A, Etienne-Grimaldi MC, Delva R, Pivot X, et al. Clinical value of circulating endothelial cells and circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients treated first line with bevacizumab and chemotherapy. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2010;21(9):1765-71.
107. Foerzler D, Delmar, P., Kockx, M., Cassidy, J., Saltz, L., Scherer, S. Tumor tissue based biomarker analysis in NO16966: a randomized phase III study of first-line bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy in patients with mCRC. *ASCO gastrointestinal cancers symposium 2010:Abstract 374*.
108. Pohl A, El-Khoueiry A, Yang D, Zhang W, Lurje G, Ning Y, et al. Pharmacogenetic profiling of CD133 is associated with response rate (RR) and progression-free survival (PFS) in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC),

treated with bevacizumab-based chemotherapy. *The pharmacogenomics journal*. 2013;13(2):173-80.

109. Sathornsumetee S, Cao Y, Marcello JE, Herndon JE, 2nd, McLendon RE, Desjardins A, et al. Tumor angiogenic and hypoxic profiles predict radiographic response and survival in malignant astrocytoma patients treated with bevacizumab and irinotecan. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(2):271-8.

110. Weickhardt AJ, WD, Lee C., Simes J., Murone C., Wilson K., Cummins M., Asadi K., Price T.J., Mariadason J., Tebbutt N.C. Vascular endothelial growth factors (VEGF) and VEGF receptor expression as predictive biomarkers for benefit with bevacizumab in metastatic colorectal cancer (mCRC): Analysis of the phase III MAX study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29:suppl; abstr 3531.

111. Van Cutsem E, de Haas S, Kang YK, Ohtsu A, Tebbutt NC, Ming Xu J, et al. Bevacizumab in combination with chemotherapy as first-line therapy in advanced gastric cancer: a biomarker evaluation from the AVAGAST randomized phase III trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(17):2119-27.

112. Jubb AM, Miller KD, Rugo HS, Harris AL, Chen D, Reimann JD, et al. Impact of exploratory biomarkers on the treatment effect of bevacizumab in metastatic breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(2):372-81.

113. Schneider BP, Wang M, Radovich M, Sledge GW, Badve S, Thor A, et al. Association of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 genetic polymorphisms with outcome in a trial of paclitaxel compared with

paclitaxel plus bevacizumab in advanced breast cancer: ECOG 2100. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(28):4672-8.

114. Jain R, Scarpace LM, Ellika S, Torcuator R, Schultz LR, Hearshen D, et al. Imaging response criteria for recurrent gliomas treated with bevacizumab: role of diffusion weighted imaging as an imaging biomarker. *Journal of neuro-oncology*. 2010;96(3):423-31.

115. Gerstner ER, Frosch MP, Batchelor TT. Diffusion magnetic resonance imaging detects pathologically confirmed, nonenhancing tumor progression in a patient with recurrent glioblastoma receiving bevacizumab. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(6):e91-3.

116. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *European journal of cancer*. 2009;45(2):228-47.

117. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*. 2002;3(7):RESEARCH0034.

118. <http://medgen.ugent.be/genorm>.

119. Bovelstad HM, Nygard S, Borgan O. Survival prediction from clinico-genomic models--a comparative study. *BMC bioinformatics*. 2009;10:413.

120. Simon RM, Subramanian J, Li MC, Menezes S. Using cross-validation to evaluate predictive accuracy of survival risk classifiers based on high-dimensional data. *Briefings in bioinformatics*. 2011;12(3):203-14.

121. Tibshirani R. Regression Shrinkage and Selection via the Lasso. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)*. 1996;58(1):267-88.

122. Heagerty PJ, Lumley T, Pepe MS. Time-dependent ROC curves for censored survival data and a diagnostic marker. *Biometrics*. 2000;56(2):337-44.
123. April C, Klotzle B, Royce T, Wickham-Garcia E, Boyaniwsky T, Izzo J, et al. Whole-genome gene expression profiling of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples. *PloS one*. 2009;4(12):e8162.
124. Peintinger F. Using molecular profiles to tailor treatment in breast cancer: are they ready for prime time? *Current opinion in obstetrics & gynecology*. 2014;26(1):21-6.
125. Miller LD, Long PM, Wong L, Mukherjee S, McShane LM, Liu ET. Optimal gene expression analysis by microarrays. *Cancer cell*. 2002;2(5):353-61.
126. Espinosa E, Redondo A, Vara JA, Zamora P, Casado E, Cejas P, et al. High-throughput techniques in breast cancer: a clinical perspective. *European journal of cancer*. 2006;42(5):598-607.
127. Ma XJ, Wang Z, Ryan PD, Isakoff SJ, Barmettler A, Fuller A, et al. A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer cell*. 2004;5(6):607-16.
128. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2004;351(27):2817-26.
129. Espinosa E, Vara JA, Redondo A, Sanchez JJ, Hardisson D, Zamora P, et al. Breast cancer prognosis determined by gene expression profiling: a quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(29):7278-85.

130. Bovelstad HM, Nygard S, Storvold HL, Aldrin M, Borgan O, Frigessi A, et al. Predicting survival from microarray data--a comparative study. *Bioinformatics*. 2007;23(16):2080-7.
131. Hotelling H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *Journal of Educational Psychology*. 1933;Vol 24(6):417-41.
132. Lindgren F, Geladi, P., Wold, S . . «The kernel algorithm for PLS». *J Chemometrics*. 1993;7:45–59.
133. Hoerl AE, Kennard RW. Ridge Regression: Biased Estimation for Nonorthogonal Problems. *Technometrics*. 1970;12(1):55-67.
134. Singhi AD, Cimino-Mathews A, Jenkins RB, Lan F, Fink SR, Nassar H, et al. MYC gene amplification is often acquired in lethal distant breast cancer metastases of unamplified primary tumors. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2012;25(3):378-87.
135. Urrutia G, Laurito S, Marzese DM, Gago F, Orozco J, Tello O, et al. Epigenetic variations in breast cancer progression to lymph node metastasis. *Clinical & experimental metastasis*. 2015;32(2):99-110.
136. Dufresne A, Pivot X, Tournigand C, Facchini T, Alweeg T, Chaigneau L, et al. Maintenance hormonal treatment improves progression free survival after a first line chemotherapy in patients with metastatic breast cancer. *International journal of medical sciences*. 2008;5(2):100-5.
137. Redondo A, Martinez V, Zamora P, Castelo B, Pinto A, Cruz P, et al. Continuation of bevacizumab and addition of hormone therapy following weekly paclitaxel therapy in HER2-negative metastatic breast cancer. *OncoTargets and therapy*. 2014;7:2175-81.

138. Broglio KR, Berry DA. Detecting an overall survival benefit that is derived from progression-free survival. *Journal of the National Cancer Institute*. 2009;101(23):1642-9.
139. Piao HL, Yuan Y, Wang M, Sun Y, Liang H, Ma L. alpha-catenin acts as a tumour suppressor in E-cadherin-negative basal-like breast cancer by inhibiting NF-kappaB signalling. *Nature cell biology*. 2014;16(3):245-54.
140. Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *Journal of cell science*. 2002;115(Pt 20):3861-3.
141. Williams CM, Engler AJ, Slone RD, Galante LL, Schwarzbauer JE. Fibronectin expression modulates mammary epithelial cell proliferation during acinar differentiation. *Cancer research*. 2008;68(9):3185-92.
142. Wang K, Andresen Eguiluz RC, Wu F, Seo BR, Fischbach C, Gourdon D. Stiffening and unfolding of early deposited-fibronectin increase proangiogenic factor secretion by breast cancer-associated stromal cells. *Biomaterials*. 2015;54:63-71.
143. Koo JS, Jung W. Alteration of REDD1-mediated mammalian target of rapamycin pathway and hypoxia-inducible factor-1alpha regulation in human breast cancer. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*. 2010;77(6):289-300.
144. Yuan A, Chen JJ, Yao PL, Yang PC. The role of interleukin-8 in cancer cells and microenvironment interaction. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2005;10:853-65.
145. Selitrennik M, Lev S. PYK2 integrates growth factor and cytokine receptors signaling and potentiates breast cancer invasion via a positive feedback loop. *Oncotarget*. 2015.

146. Powell CA, Nasser MW, Zhao H, Wochna JC, Zhang X, Shapiro C, et al. Fatty acid binding protein 5 promotes metastatic potential of triple negative breast cancer cells through enhancing epidermal growth factor receptor stability. *Oncotarget*. 2015;6(8):6373-85.
147. Moquet-Torcy G, Tolza C, Piechaczyk M, Jariel-Encontre I. Transcriptional complexity and roles of Fra-1/AP-1 at the uPA/Plau locus in aggressive breast cancer. *Nucleic acids research*. 2014;42(17):11011-24.
148. Leibovici L, Schoenfeld N, Yehoshua HA, Mamet R, Rakowsky E, Shindel A, et al. Activity of porphobilinogen deaminase in peripheral blood mononuclear cells of patients with metastatic cancer. *Cancer*. 1988;62(11):2297-300.
149. Taylor KM, Morgan HE, Johnson A, Hadley LJ, Nicholson RI. Structure-function analysis of LIV-1, the breast cancer-associated protein that belongs to a new subfamily of zinc transporters. *The Biochemical journal*. 2003;375(Pt 1):51-9.
150. Gianni L, Romieu GH, Lichinitser M, Serrano SV, Mansutti M, Pivot X, et al. AVEREL: a randomized phase III Trial evaluating bevacizumab in combination with docetaxel and trastuzumab as first-line therapy for HER2-positive locally recurrent/metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(14):1719-25.
151. Cameron D, Brown J, Dent R, Jackisch C, Mackey J, Pivot X, et al. Adjuvant bevacizumab-containing therapy in triple-negative breast cancer (BEATRICE): primary results of a randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2013;14(10):933-42.
152. dos Santos L, Cruz M, Lima Lopes Gd, Lima Jd. VEGF-A levels in bevacizumab-treated breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Breast cancer research and treatment*. 2015;151(3):481-9.

153. de Haas S, Delmar P, Bansal A, Moisse M, Miles D, Leighl N, et al. Genetic variability of VEGF pathway genes in six randomized phase III trials assessing the addition of bevacizumab to standard therapy. *Angiogenesis*. 2014;17(4):909-20.
154. Allegrini G, Coltelli L, Orlandi P, Fontana A, Camerini A, Ferro A, et al. Pharmacogenetic interaction analysis of VEGFR-2 and IL-8 polymorphisms in advanced breast cancer patients treated with paclitaxel and bevacizumab. *Pharmacogenomics*. 2014;15(16):1985-99.

