

Rodrigo Lastra Del Prado

Estudio de nuevos biomarcadores  
diagnósticos mediante técnicas de  
proteómica en pacientes con  
cáncer de mama

Director/es

Mayordomo Cámara, José Ignacio  
Tres Sánchez, Alejandro

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

ESTUDIO DE NUEVOS BIOMARCADORES  
DIAGNÓSTICOS MEDIANTE TÉCNICAS DE  
PROTEÓMICA EN PACIENTES CON CÁNCER DE  
MAMA

Autor

Rodrigo Lastra Del Prado

Director/es

Mayordomo Cámara, José Ignacio  
Tres Sánchez, Alejandro

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
Escuela de Doctorado

2008



## Tesis Doctoral

Título de la tesis : y subtítulo de la tesis

**Estudio de nuevos biomarcadores diagnósticos  
mediante técnicas de proteómica en pacientes  
con cáncer de mama**

Autor

**Rodrigo Lastra del Prado**

Director/es

Alejandro Tres Sánchez  
José Ignacio Mayordomo Cámara

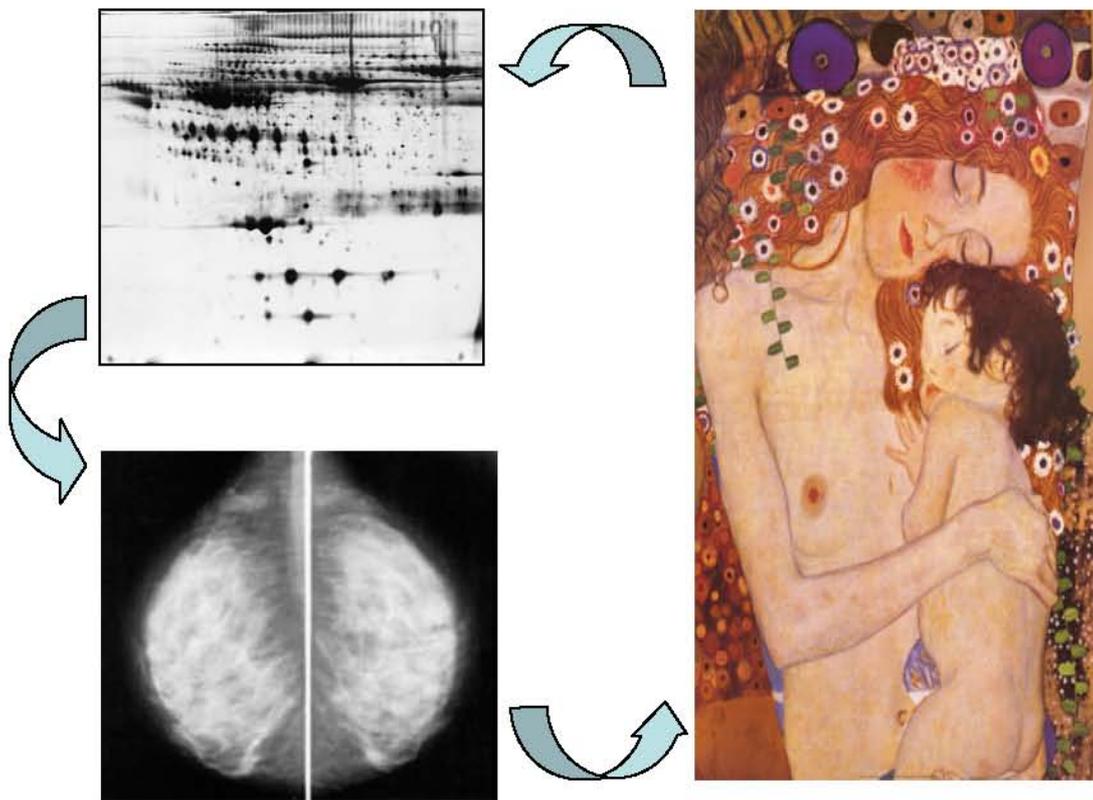
Facultad de Medicina  
2008

# UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

---

## TESIS DOCTORAL

*Estudio clínico de nuevos biomarcadores  
diagnósticos mediante técnicas de  
proteómica en pacientes con cáncer de  
mama*



---

Rodrigo Lastra del Prado



**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina, Psiquiatría y Dermatología

# **TESIS DOCTORAL**

---

**ESTUDIO CLÍNICO DE NUEVOS  
BIOMARCADORES DIAGNÓSTICOS MEDIANTE  
TÉCNICAS DE PROTEÓMICA EN PACIENTES  
CON CÁNCER DE MAMA**

---

Tesis presentada por **Rodrigo Lastra del Prado** para optar  
al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza

**Directores de Tesis:**

Dr. Alejandro Tres Sánchez

Dr. José Ignacio Mayordomo Cámara

Zaragoza, 16 de Abril de 2008



*Una mirada al libro y dos a la vida.*

**Gregorio Marañón, médico**

*Un minuto de sufrimiento de una persona en paro vale más  
que toda la técnica del mundo.*

**Guillermo Rovirosa, investigador**

*Que nadie pueda dormir tranquilo, mientras haya un enfermo  
sin atención, un niño sin escuela, un obrero sin trabajo, una  
familia sin vivienda.*

**Karol Wojtyła, teólogo**



**A la mujer, la madre, la esposa...**

**a Raquel**



**A los que dan la vida...      a mis padres**



## **AGRADECIMIENTOS**

- A todas las mujeres que padecen cáncer de mama, y especialmente a las que de manera solidaria han donado su sangre para la realización de este trabajo sabiendo que no serán ellas las beneficiarias.
- A mis compañeros del Servicio de Oncología Médica del Hospital Clínico de Zaragoza, por su compañerismo y amistad nacida de cientos de horas de trabajo juntos.
- Al Dr. Alejandro Tres y al Dr. José Ignacio Mayordomo, por que a pesar de las trabas y dificultades con la que se topan a diario y de las que soy testigo, creen en la investigación como forma de avanzar en la lucha contra el cáncer, y han creído en este proyecto, incluso cuando yo dudaba.
- A todas las enfermeras y auxiliares del Servicio de Oncología del Hospital Clínico de Zaragoza y del Hospital de día del Hospital S. Jorge de Huesca. Su disponibilidad para sacar sangre a las pacientes ha sido una lección generosidad y profesionalidad que no olvidaré.
- A Javier y a Ivan, por el procesado de las muestras y el interés mostrado.
- A los investigadores de Vitoria, Santander, San Sebastián y Madrid. La suma de todos ha hecho posible contar con estos datos.
- A Iñaki Álvarez y Miguel Burillo, compañeros excepcionales e inmerecidos que se han preocupado por mi y por este proyecto mucho más de lo esperable.
- A Alberto Monasterio y toda la gente que trabaja en Proteomika. Alberto ha sido el verdadero alma, impulsor y ejecutor de este proyecto. Siempre dispuesto. Podría decir que el trabajo es suyo. Gracias.
- A Fina Biotech (antigua Indas Biotech), financiadores del proyecto.
- A mis amigos y compañeros de facultad de Burgos y Valladolid. Junto a ellos empecé esta andadura por el mundo de la salud y la enfermedad, he hicieron que todo fuera más fácil.

- A los amigos del Movimiento Cultural Cristiano por su lucha diaria por un mundo más justo y solidario, donde no haya hambrientos, ni explotados, ni oprimidos.
- A Julián Gómez del Castillo, que también supo lo que era el cáncer. Maestro de la vida como ninguno he tenido.
- A mis ahijados, Pedro y Julian, a Mónica y Julian, a Diego e Isa, a Javi y Ana, a Fernando y Blanca... familias amigas y testimonio.
- A Pablo y a Marta, por *dejarlo todo y venirse con nosotros*.
- A la abuela Tere, por esa sensibilidad tan esquisita y todo el amor que nos muestra.
- A toda la familia chilena, especialmente a Titi e Ignacio. No olvidaremos como se portaron en nuestra aventura americana.
- A Eduardo y Laura porque me quieren como a un hijo. Siempre están para lo que necesitemos.
- A Pablo, Teresa, Francisco, Juan, Luis y Mercedes porque me quieren como a un hermano.
- A mis padres, Alipio y Carmen. Me lo han dado todo, especialmente el quererme sin condiciones. A mis hermanos Elena, Carmen y Javier. Con ellos aprendí el significado de palabras como compartir, fraternidad, amistad...
- A todos los familiares de Burgos y de Valencia, pues son ese soporte que hace humana la vida. Especialmente a mi primo Juan Ángel que padeció un cáncer letal, y a mi tía Charo que sufrió una penosa enfermedad que no pudo superar.
- A Raquel. La de veces que ha cargado con el trabajo mas duro para que yo hiciera esta tesis. Junto a una mujer así sientes *vibrar al unísono*.
- A mis hijos Lucas y Teresa. Cada vez que les veo se olvidan los problemas y me recuerdan que el ser humano merece la pena.

**INDICE**

---



<b>INDICE</b>	<b>1</b>
<b>0.-PREFACIO</b>	<b>9</b>
<b>1.-INTRODUCCIÓN</b>	<b>15</b>
<b>1.1-Cáncer de mama: situación actual</b>	<b>17</b>
1.1.1-Epidemiología del cáncer de mama	17
1.1.2-Biología molecular del cáncer de mama	20
1.1.2.1-Histopatología	20
1.1.2.2-Origen molecular de la enfermedad	21
1.1.2.2.1-BRCA1 y BRCA 2	21
1.1.2.2.2-Receptores hormonales	22
1.1.2.2.3-P53	23
1.1.2.2.4-UPA y PAI-1	24
1.1.2.2.5-Ciclina E	24
1.1.2.2.6-Bcl-2	24
1.1.2.2.7-Her-2/neu (c-erbB2)	25
1.1.2.2.8-VEGF	25
1.1.2.2.9-Cox-2	26
1.1.3-Factores de riesgo	26
1.1.3.1-Antecedentes familiares y factores de riesgo hereditario	26
1.1.3.2-Alimentación y ejercicio físico	28
1.1.3.3-Anticonceptivos orales	28
1.1.3.4-Tratamiento hormonal sustitutivo	29
1.1.3.5-Factores menstruales y reproductores	29
1.1.3.6-Enfermedades benignas de la mama	29

1.1.3.7-Radiación ionizante _____	30
1.1.4-Diagnóstico _____	30
1.1.5-Factores pronósticos y estadiaje _____	30
1.1.5.1-Estadio TNM _____	31
1.1.5.1.1-T: Tumor primario _____	31
1.1.5.1.2-N: Ganglios linfáticos regionales _____	32
1.1.5.1.3-M: Afectación en otros órganos a distancia _____	32
1.1.5.2-Clasificación de riesgo _____	34
1.1.6-Tratamiento _____	35
1.1.6.1-Tratamiento del carcinoma no infiltrante _____	35
1.1.6.2-Tratamiento del carcinoma infiltrante localizado _____	36
1.1.6.2.1-Cirugía conservadora _____	36
1.1.6.2.2-Ganglio centinela _____	37
1.1.6.2.3-Cirugía radical _____	37
1.1.6.2.4-Radioterapia adyuvante _____	38
1.1.6.2.5-Quimioterapia y hormonoterapia adyuvante _____	39
1.1.6.3-Tratamiento del carcinoma localmente avanzado _____	40
1.1.6.4-Tratamiento del carcinoma metastásico _____	42
1.1.7-Seguimiento _____	44
<b>1.2-. Cribado y diagnóstico precoz del cáncer de mama _____</b>	<b>46</b>
1.2.1-Detección Clínica _____	46
1.2.2-Técnicas de imagen en el cáncer de mama _____	49
1.2.2.1-Mamografía _____	49
1.2.2.2-Resonancia magnética nuclear _____	51
1.2.2.3-Ecografía mamaria _____	52
1.2.3-Marcadores tumorales _____	53

<b>1.3-Proteómica: La era de la biología molecular</b>	<b>55</b>
1.3.1-Genes, proteínas y cáncer.	55
1.3.2-¿Qué es la proteómica?	58
1.3.3-Instrumentos para el mejor conocimiento de las proteínas	62
1.3.3.1-Separar las proteínas: electroforesis bidimensional	62
1.3.3.2-Identificar las proteínas: espectrometría de masas	64
1.3.3.3-Interpretar los datos: Bioinformática	67
1.3.4-Líneas de investigación de proteómica en oncología	68
1.3.4.1-Proteómica y cáncer de ovario	69
1.3.4.2-Proteómica y cáncer de próstata	70
1.3.4.3-Proteómica y cáncer colorectal	71
1.3.4.4-Proteómica y cáncer de páncreas	72
1.3.4.5-Proteómica y hepatocarcinoma	74
1.3.4.6-Proteómica y cáncer de pulmón	74
1.3.4.7-Proteómica y otros tumores	76
1.3.4.8-Proteómica y cáncer de mama	76
<b>2.-HIPÓTESIS DE TRABAJO</b>	<b>79</b>
<b>3.-OBJETIVOS</b>	<b>83</b>
<b>4.-PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>87</b>
<b>4.1-Pacientes</b>	<b>89</b>
4.1.1-Universo poblacional	89
4.1.2-Criterios de inclusión y exclusión. Universo muestral	90
<b>4.2-Material y métodos</b>	<b>90</b>
4.2.1-Recogida y procesado de muestras de suero	90

4.2.2-Elaboración de mapas proteicos mediante la técnica de electroforesis bidimensional. _____	91
4.2.3-Análisis bioinformático de proteómica _____	92
4.2.4-Identificación de las manchas proteicas diferenciales mediante espectrometría de masas en tándem. _____	93
4.2.5-Análisis estadístico de los datos _____	93
4.2.6- Revisión bibliográfica y comparación de los datos _____	94
<b>5.-RESULTADOS _____</b>	<b>95</b>
<b>5.1-Primera Fase: Identificación de patrones proteicos diferenciales _____</b>	<b>97</b>
5.1.1-Características de las pacientes _____	97
5.1.2-Análisis por agrupamiento _____	99
5.1.3-Identificación de los spots _____	106
<b>5.2-Segunda Fase: Validación de los resultados _____</b>	<b>108</b>
5.2.1-Validación de anticuerpos frente a proteínas diferenciales _____	108
5.2.2-Características de las pacientes _____	108
5.2.3-Proteinchip _____	109
<b>6.-DISCUSIÓN _____</b>	<b>115</b>
<b>6.1- Se confirma la hipótesis _____</b>	<b>117</b>
<b>6.2 Valores y deficiencias del cribado y diagnóstico precoz del cáncer de mama. _____</b>	<b>121</b>
<b>6.3-Sensibilidad y especificidad de nuestra serie. Limitaciones _</b>	<b>126</b>

<b>6.4-Posibles usos: líneas de futuro</b>	<b>129</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>131</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>135</b>



## **0.-PREFACIO**

---



*Una ciencia que no esté al servicio de la persona humano no sirve.*

En el Servicio de Oncología y Cuidados Paliativos del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza, en el que tuve la suerte de formarme y trabajar desde el año 2002 hasta el año 2006, siempre han creído en ésta afirmación. A pesar de las dificultades que muchas veces aporta la propia administración, a pesar del presión creciente del trabajo asistencial, no ha faltado nunca en ese servicio el impulso investigador muy pegado siempre a la práctica clínica, entendido como el mejor servicio que se le podía ofrecer a los pacientes que sufren el cáncer.

En este sentido, había abiertas varias líneas de investigación especialmente en cáncer de mama y melanoma maligno, con un interés creciente de los clínicos en acercarse a la investigación básica.

A tal efecto se había constituido el Grupo de Investigación, del que soy miembro: *Grupo Consolidado de Investigación del Gobierno de Aragón en las siguientes áreas:* Detección de enfermedad mínima residual en pacientes con melanoma; Cultivo de células dendríticas para inmunoterapia en pacientes con melanoma; Consejo Genético en Síndromes de predisposición hereditaria al cáncer; Proteómica y Genómica.

En el año 2003, a través del Dr. José Ignacio Mayordomo se contactó con la empresa Proteomika S.L. que nos presentó un proyecto para el desarrollo y validación clínica de un sistema de diagnóstico de cáncer de

mama utilizando herramientas de proteómica. El proyecto nos entusiasmó y comenzamos a trabajar en él, siendo yo el encargado de ir coordinando el desarrollo del proyecto en nuestra área.

En febrero de 2004 comenzamos la recogida de muestras de sangre de pacientes con cáncer de mama recién diagnosticadas y previa a cualquier maniobra terapéutica. La recogida se extendió hasta julio de 2005, enviando 92 muestras desde nuestro hospital.

Paralelamente, durante esos años fui Médico Interno Residente de Oncología del citado servicio y alumno de doctorado del programa de Medicina Interna del Departamento de Medicina, Psiquiatría y Dermatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza.

Dado que mi formación era principalmente de cuestiones clínicas y de biología molecular básica en lo referente al cáncer de mama, y de cara a adentrarme en el conocimiento de las técnicas proteómicas, en octubre de 2005 realicé un curso intensivo de 40 horas sobre *Electroforesis bidimensional y análisis de proteínas por espectrometría de masas* organizado por la Cátedra de Genómica y Proteómica del Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, que me fue de gran ayuda.

El trabajo más arduo de laboratorio, de obtención de resultados y de desarrollo de un proteinchip fue llevado a cabo por el grupo de trabajo del Dr.

Alberto Monasterio de Proteomika S.L. contando con nuestra colaboración cercana en lo referente a las cuestiones clínicas y epidemiológicas de las pacientes, así como en cuestiones de asesoramiento, discusión e interpretación de los resultados.

Fruto de este estrecho trabajo entre diferentes centros, incluyendo múltiples visitas Zaragoza-Bilbao y viceversa, decenas de llamadas y centenares de correos electrónicos, se han publicado los resultados en el Congreso de la American Association for Cancer Research (AACR) celebrado en Washington en el años 2006, y al Congreso de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) celebrado en el año 2007. Está pendiente su publicación en una revista de impacto internacional.

En esta tesis, que pretende ser una aportación al diagnóstico precoz del cáncer de mama, se presentan dichos resultados, explicando las hipótesis de partida, los objetivos buscados, el material y los métodos empleados, haciendo un recorrido por la situación epidemiológica, preventiva, diagnóstica y terapéutica del cáncer de mama, así como una revisión y actualización de la investigación con tecnología proteómica y las líneas abiertas a nivel mundial.

Finalmente, a la luz del estado actual del arte en el cáncer de mama y en la investigación proteómica se insertan los resultados de nuestro trabajo para discutirlo, compararlo y elaborar conclusiones y líneas de futuro.



## **1.-INTRODUCCIÓN**

---



## **1.1-Cáncer de mama: situación actual**

El carcinoma de mama es el cáncer femenino más frecuente en el mundo, y una de las principales causas de muerte en las mujeres. Pero el efecto del cáncer de mama en la sociedad va más allá de las consideraciones estadísticas debido a sus grandes repercusiones sociales, psicológicas, culturales e incluso político-económicas. Es por eso que abordamos en este trabajo un tema que pretende ser una aportación en el campo del diagnóstico precoz del cáncer de mama.

Para empezar, partiremos describiendo la situación y los conocimientos actuales de esta enfermedad en cuanto a epidemiología, biología, prevención, diagnóstico, tratamiento y pronóstico.

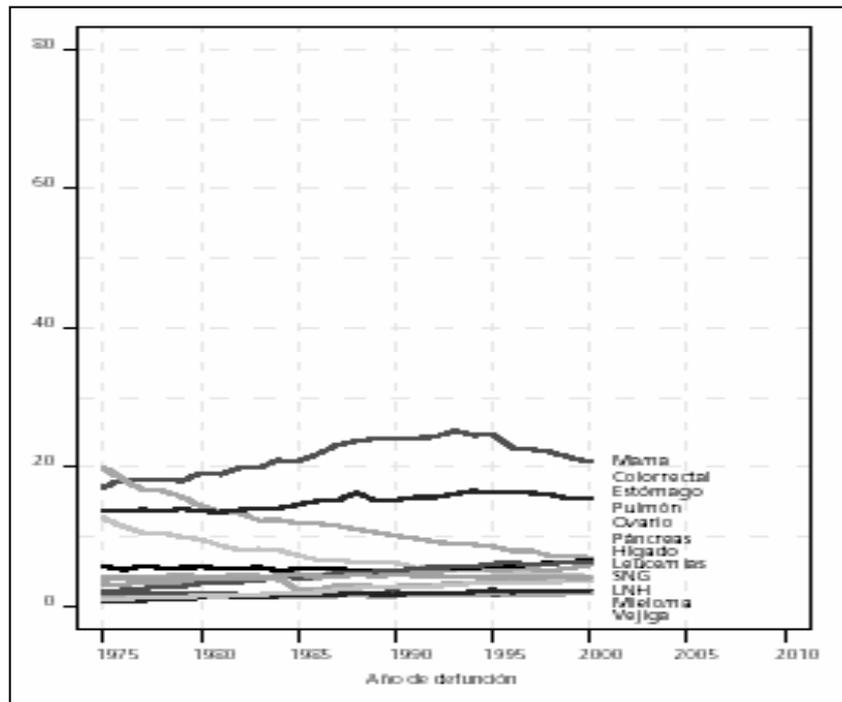
### **1.1.1-Epidemiología del cáncer de mama**

El cáncer de mama es el cáncer más frecuente en las mujeres y constituye el 20% de todos los tipos de cáncer en esta población. En los países occidentales es la primera causa de muerte en mujeres de edades comprendidas entre los 40 y los 59 años, representando el 20% de las muertes en este grupo de edad. La incidencia a escala mundial es de más de 350.000 muertes anuales. Cada año se diagnostican 1 millón de nuevos casos en todo el mundo<sup>1</sup>, aunque la incidencia del cáncer de mama varía considerablemente entre diversas poblaciones, siendo de más de 100 casos

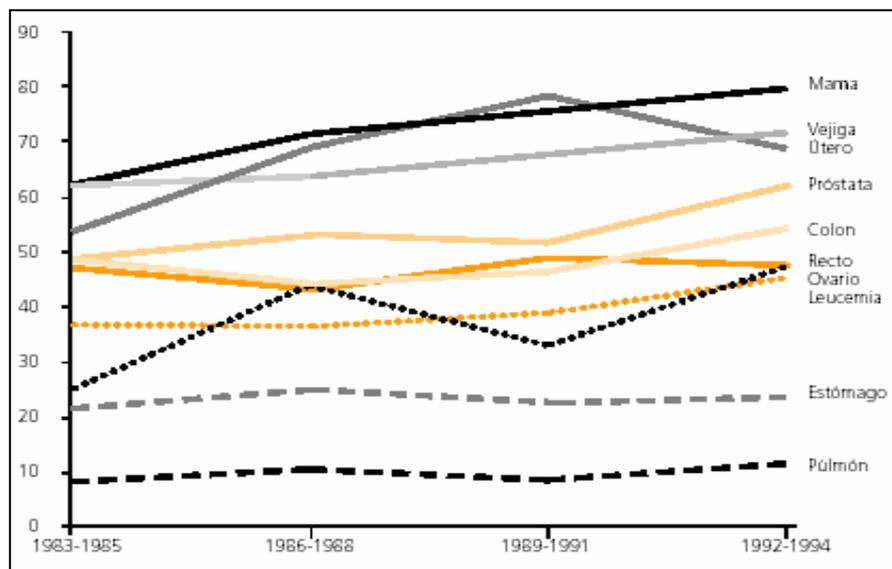
por cada 100.000 habitantes en los países occidentales y de entre 10 y 15 casos por cada 100.000 habitantes en los países asiáticos.<sup>2</sup>

En España, según los datos del Instituto Nacional de Estadística (INE 2004)<sup>3</sup>, fallecieron en el año 2001, 5.914 mujeres como consecuencia de un cáncer de mama, lo que suponía una tasa relativa del 17% de las muertes por cáncer en nuestro país. Según esas mismas fuentes, en la provincia de Zaragoza la incidencia del cáncer de mama es de 58 casos por cada 100.000 mujeres.

Sin embargo, las estadísticas recientes muestran que la mortalidad por cáncer de mama disminuyó en Estado Unidos y en la Unión Europea en el decenio 1990-2000, a pesar del aumento progresivo de la incidencia en ese periodo. En España, en el periodo 1995-2000 se observa un ligero descenso de las muertes por esta causa a un ritmo de un 2% anual<sup>4</sup>. En la década actual, esa tendencia descendente mantenida se confirma a tenor de los datos presentados en el congreso de la Sociedad Americana de Oncología del año 2007. Los avances en el conocimiento de la biología molecular, que están posibilitando mejoras en diagnóstico y en el tratamiento, así como la mejoría progresiva del cribado y detección precoz, parecen estar detrás de estos datos alentadores<sup>5</sup> (figuras 1 y 2).



**Figura 1.** Tasas ajustadas de mortalidad de mujeres por diferentes localizaciones tumorales en España.  
Fuente: Ministerio de Sanidad 2005



**Figura 2.** Evolución de la supervivencia a los 5 años en Europa tras diagnóstico según localizaciones tumorales.  
Fuente: Ministerio de Sanidad 2005.

## **1.1.2-Biología molecular del cáncer de mama**

### **1.1.2.1-Histopatología**

La mayoría de cánceres de mama (80%) son carcinomas ductales infiltrantes (CDI). Otro 10% lo constituye el carcinoma lobulillar infiltrante (CLI). Este tipo de cánceres comienzan en los ductos o en los lobulillos, atraviesan sus paredes e infiltran el tejido adiposo de la mama. Llegado a este punto, el cáncer se puede extender a otras partes del organismo por el sistema linfático o por la sangre.

De los tipos de cáncer de mama menos frecuentes, el 5% está constituido por el carcinoma medular. En este tipo de cáncer las células neoplásicas están embebidas en un abundante estroma linfoide y se caracteriza por el gran tamaño de las células neoplásicas. El pronóstico para este tipo de carcinoma es mejor que para los otros tipos. De la misma forma el carcinoma tubular (aproximadamente 2% de los cánceres de mama) es una variante bien diferenciada constituida por túbulos dispuestos irregularmente en un estroma fibroblástico. También presenta un mejor pronóstico que los CDI y CLI.

El conocimiento claro de las diferencias genéticas y biológicas de los diferentes epitelios de la mama, junto con un sistema de clasificación del cáncer de mama basado en determinadas diferencias moleculares,

constituyen la base actual para elaborar tratamientos dirigidos y eficaces. A continuación describiremos la función biológica de genes y proteínas conocidas e implicados en el cáncer de mama.

#### **1.1.2.2-Origen molecular de la enfermedad**

La mayoría de las mujeres afectas no tienen historia familiar de cáncer de mama. Su desarrollo parece estar modulado por una compleja interacción entre factores tanto genéticos, moleculares, como ambientales aun por identificar. Únicamente una minoría de casos de cáncer de mama son de origen hereditarios (aproximadamente entre un 5 y un 10%).

##### **1.1.2.2.1-BRCA1 y BRCA 2**

Todavía no se ha podido determinar cuántos genes de predisposición hereditaria para cáncer de mama existen. Hace 9 años se identificaron dos genes, BRCA1 y BRCA2, localizados en los brazos largos de los cromosomas 17 y 13 respectivamente, que se encuentran mutados en familias con riesgo muy elevado de desarrollar cáncer de mama como por ejemplo, aquellas familias con 4 o más casos de personas afectas entre parientes cercanos.

El gen BRCA 1 codifica una proteína multifuncional implicada en el mantenimiento de la estabilidad genómica y en la respuesta de la célula a la lesión del ADN<sup>6</sup>. El BRCA 2 también está vinculado a la respuesta celular frente a la lesión del ADN. Además el BRCA 2 participa en el control de los

reguladores de la mitosis mediante la interacción con una proteína que se activa por la alteración de los microtúbulos.

Ambos genes se heredan de forma autosómica dominante aunque su penetrancia es limitada. Asimismo ambos genes son muy extensos y se han descrito mutaciones en casi cada posición. Este hecho dificulta el cribado molecular para detectar la enfermedad en individuos sin antecedentes familiares. Algunas mutaciones se presentan con una frecuencia elevada en poblaciones determinadas (mutaciones fundadoras), facilitando el cribado genético de estos casos. Por ejemplo, aproximadamente el 2% de las mujeres Ashkenazi presentan la mutación BRCA1 185 $\Delta$ AG (delección de dos pares de bases en la posición 185), BRCA1 5382 ins C (inserción de una par de bases adicional en la posición 5382), BRCA1 6174 $\Delta$ T (delección de un único par de bases en la posición 6174). La mitad de los casos de cáncer de mama familiar de Islandia presentan la mutación BRCA2 999 $\Delta$ 5 (delección de 5 pares de bases en la posición 999). Muchas familias afectas de cáncer de mama presentan a su vez otros tipos de cáncer, como cáncer de ovario, colon, próstata, entre otros, que seguramente sean atribuibles a las mismas mutaciones.

#### **1.1.2.2.2-Receptores hormonales**

Los estrógenos y la progesterona están envueltos en el desarrollo del cáncer de mama. Receptores para estas hormonas (RE y RP) existen en el tejido mamario normal y en cerca del 70% de los cánceres de mama. El RE

presenta dos isoformas, RE alfa y RP beta. Un gran aumento de RE alfa se ha visto involucrado en la rápida proliferación de lesiones mamarias premalignas.<sup>7</sup> Ambos, RE y RP, son factores pronósticos en el cáncer de mama. Los pacientes con receptores hormonales positivos tienen una supervivencia global mayor en los 5 primeros años, pero esta ventaja desaparece con los seguimientos prolongados<sup>8</sup>. Además los cánceres de mama que expresan valores altos de estos receptores son sensibles a tratamiento con fármacos que bloquean de diversas maneras esta cadena relacionada con el crecimiento tumoral: Los agonistas/antagonistas de los RE (como el tamoxifeno), los inhibidores de la aromatasa a nivel suprarrenal (como el letrozol, anastrozol o exemestano), o los antiestrógenos puros (como el fulvestrant)<sup>9</sup>.

#### **1.1.2.2.3-P53**

P53 es un gen oncosupresor que actúa como estabilizador genómico, inhibidor de la progresión celular y facilitador de la apoptosis. Se han visto mutaciones del gen p53 en el 20% de los cánceres de mama. Aún así un metanálisis concluía que son necesarios más estudios para corroborar a p53 como factor pronóstico independiente<sup>10</sup>.

También se han descrito mutaciones de P53 y PTEN, que están asociadas respectivamente con los síndromes de Li-Fraumeni y Cowden que parecen aumentar el riesgo de padecer cáncer de mama aunque ambos síndromes son muy poco frecuentes.

#### **1.1.2.2.4-UPA y PAI-1**

La urokinase-type plasminogen activator (uPA) y su inhibidor plasminogen activator (PAI-1), son dos marcadores de capacidad invasiva, que han mostrado un fuerte poder pronóstico en cánceres de mama con ganglios negativos. Diversos estudios demuestran que pacientes con niveles elevados de uPA o de PAI-1 tiene una supervivencia libre de enfermedad y una supervivencia global menor<sup>11</sup>.

#### **1.1.2.2.5-Ciclina E**

La Ciclina E es un regulador de la fase S del ciclo celular, y está sobreexpresado en el 30 % de los cánceres de mama. Parece que puede ser también un factor pronóstico, aunque este marcador requiere más estudios<sup>12</sup>.

#### **1.1.2.2.6-Bcl-2**

Bcl-2 es un protooncogen que codifica para una proteína que promueve la supervivencia celular bloqueando la apoptosis. La expresión de Bcl-2 está asociada a un pronóstico favorable en los estadios precoces del cáncer de mama<sup>13</sup>.

#### **1.1.2.2.7-Her-2/neu (c-erbB2)**

Este gen codifica un receptor de crecimiento epidérmico, que se sobreexpresa en un 15-30% de los tumores de mama. Se considera que está sobreexpresado si la inmunohistoquímica (herceptest®) es muy positiva (3+) o, en casos de menos positividad (2+), si la hibridación in situ fluorescente (FISH) es positiva. La sobreexpresión de este receptor parece ser un factor pronóstico independiente negativo<sup>14</sup>, aunque no hay un consenso absoluto en la comunidad científica<sup>15</sup>.

Por otra parte, la presencia de c-erbB2, esta asociada actualmente con la respuesta aun tratamiento dirigido con un anticuerpo monoclonal anti-c-erbB2 (trastuzumab), que ha conseguido resultados muy positivos en enfermedad metastásica y en adyuvancia, habiendo sido pionero de los tratamientos dirigidos contra una diana molecular<sup>16</sup>. Otros fármacos como el Lapatinib, que inhibe los dominios tirosinkinasa de erb1 y erb2 y también se ha demostrado eficaz en pacientes con HER2 + y cáncer de mama inflamatorio o con metástasis cerebrales y que no responden a trastuzumab., ya están comenzando a ser usados en la clínica con resultados esperanzadores<sup>17</sup>.

#### **1.1.2.2.8-VEGF**

Este factor de crecimiento endotelial (Vascular Endotelial Grown Factor) desempeña un papel importante en la formación de vasos sanguíneos y, quizá

también de vasos linfáticos. La angiogénesis, gracias a los estudios iniciales de Folkman<sup>18</sup>, ha abierto unos de los campos de investigación y tratamiento de los tumores más importantes en los últimos años. Varios estudios indican una relación entre la expresión del VEGF y un pronóstico desfavorable, así como un a peor respuesta tanto al tamoxifeno como a la quimioterapia tipo CMF o FAC<sup>19</sup>. Recientes ensayos clínicos han demostrado importante eficacia de los agentes antiangiogénicos que actúan inhibiendo VEGF (Bevazizumab) asociados a quimioterapia en mujeres afectas de cáncer de mama metastático<sup>20</sup> y ya se está probando en adyuvancia.

#### **1.1.2.2.9-Cox-2**

La expresión de ciclooxigenasa 2 se relaciona con otros factores desfavorables como un tamaño grande, un índice proliferativo elevado, la negatividad para receptores hormonales o la sobreexpresión de c-erbB2<sup>21</sup>.

#### **1.1.3-Factores de riesgo**

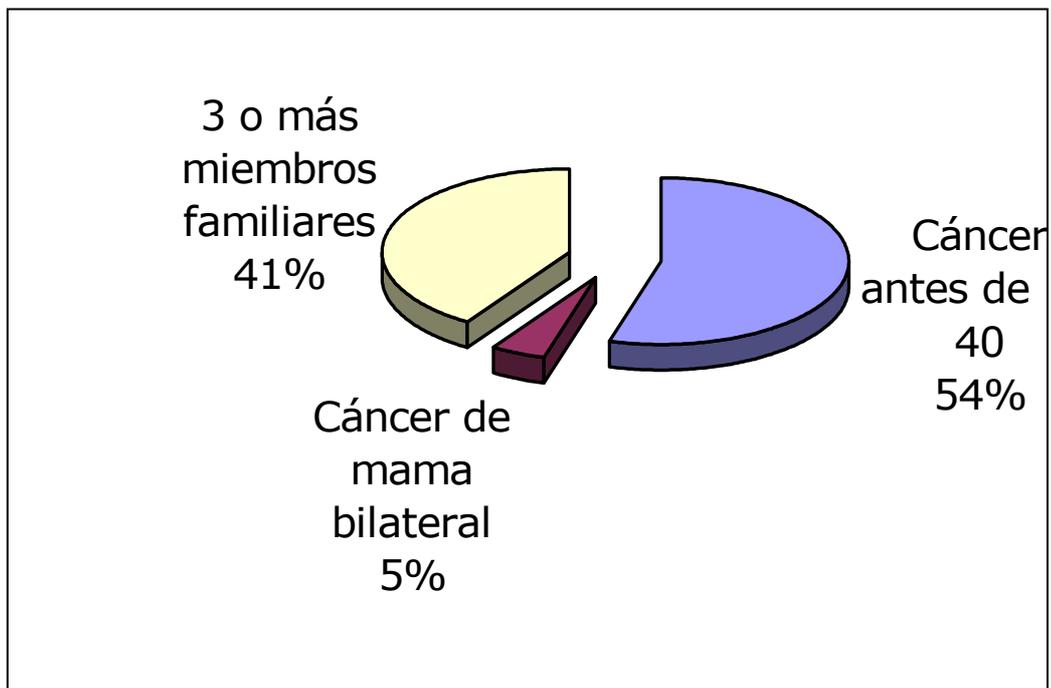
Los factores de riesgo conocidos de desarrollar un cáncer de mama, que completan este complejo mosaico genético-molecular ambiental son:

##### **1.1.3.1-Antecedentes familiares y factores de riesgo hereditario**

En un estudio que realizamos en una cohorte de 100 mujeres no seleccionadas, recién diagnosticadas de cáncer de mama, vistas como primera

visita por el servicio de Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa durante el año 2004, vimos que la frecuencia de cáncer de mama con componente familiar en esta cohorte de la comunidad de Aragón fue del 20%<sup>22</sup>. Los criterios que usamos fueron los que se emplean para comenzar un estudio molecular de susceptibilidad genética (figura 3):

- a) Diagnóstico de cáncer de mama antes de los 40 años de edad (12%)
- b) Cáncer de mama bilateral (1%)
- c) Tres o más familiares con cáncer de mama u ovario (9%)



**Figura 3.** Criterios de susceptibilidad para cáncer

Estos datos van en la línea de otros muchos estudios que demuestran que el riesgo de que una mujer padezca cáncer de mama aumenta con el número de parientes afectadas. Entre el 10% y el 20 % de las mujeres con

cáncer de mama tiene un pariente en primer o segundo grado afectado por este cáncer y el 50% manifiesta tener al menos una pariente en cualquier grado con cáncer de mama. A pesar de que se han aislado dos genes de susceptibilidad, BRCA1 y BRCA2, sus mutaciones sólo explican entre un 30% y un 40 % de los cánceres de mama familiares. A pesar de eso, ha supuesto un gran impulso al consejo genético en la oncología. En los últimos años se han creado en los servicios de Oncología Médica unidades de consejo genético, siendo ya un punto fuerte de la asistencia sanitaria.

#### **1.1.3.2-Alimentación y ejercicio físico**

La ingestión de grasas en la dieta se asocia a una mayor concentración de estrógenos. Un reciente estudio demuestra que el ejercicio físico (3-5 horas de caminar a la semana) y una dieta baja en grasas disminuye entre un 24 y un 50% el riesgo de recaída de cáncer de mama. El consumo de alcohol se ha asociado al riesgo de cáncer de mama. La explicación parece estar nuevamente en el aumento de la concentración de hormonas esteroides asociado a la ingesta de etanol<sup>23</sup>.

#### **1.1.3.3-Anticonceptivos orales**

El consumo de anticonceptivos orales se asocia a un aumento leve del riesgo de cáncer de mama (riesgo relativo=1,2) en las consumidoras habituales frente a las mujeres que nunca los han tomado<sup>24</sup>.

#### **1.1.3.4-Tratamiento hormonal sustitutivo**

Los resultados de numerosos estudios sobre el tratamiento hormonal sustitutivo (THS) y el riesgo de cáncer de mama han sido heterogéneos, de modo que en algunos no se ha detectado un riesgo cuantificable, mientras que en otros se ha calculado en riesgo relativo de entre 1,1 y 1,4. Así pues, el THS debe no debe generalizarse a todas las mujeres posmenopáusicas, pero si puede individualizarse en aquellas pacientes con especial riesgo de coronariopatías, o con alto riesgo de descalcificación.

#### **1.1.3.5-Factores menstruales y reproductores**

El riesgo de cáncer de mama se ha relacionado de forma constante con la edad de la menarquia y la edad de la menopausia (a más ciclos ováricos mayor riesgo)<sup>25</sup>. Otros factores de riesgo bien establecidos son la edad del primer parto (menor cuanto más temprano), el número de embarazos completos (menor cuantos más embarazos) y la lactancia materna (factor protector)<sup>26</sup>.

#### **1.1.3.6-Enfermedades benignas de la mama**

Las lesiones benignas de la mama, como los papilomas, los fibroadenomas, y las comúnmente llamadas alteraciones fibroquísticas, no son lesiones premalignas y no se asocian a un mayor riesgo de cáncer de mama.

### **1.1.3.7-Radiación ionizante**

La exposición de la mama a una dosis radioactiva baja es claramente cancerígena, con un aumento del cáncer de mama según la dosis de exposición. El periodo de latencia desde la exposición al desarrollo del cáncer puede ser de 10 a 15 años, incluso mayor. Hoy en día el riesgo más alto corresponde a las mujeres jóvenes que reciben radioterapia por una enfermedad de Hodgkin.

### **1.1.4-Diagnóstico**

Dado que es uno de los temas objeto de esta tesis, hablaremos mas profundamente del diagnóstico en el cáncer de mama en el apartado 2 de la introducción.

### **1.1.5-Factores pronósticos y estadiaje**

El cáncer de mama se clasifica según sus principales factores pronósticos, que son el tamaño (T), la afectación ganglionar regional (N) y la afectación a distancia (M). La afectación ganglionar sigue siendo el principal factor pronóstico. La clasificación de la *Union Internacional Against Cancer* (UICC) atendiendo al TNM es universalmente la más usada, siendo la última actualización del año 2002<sup>27</sup> (Tablas 1 y 2).

### 1.1.5.1-Estadio TNM

#### 1.1.5.1.1-T: Tumor primario

**TX:** No se puede evaluar el tumor primario.

**T0:** No existen signos de tumor primario.

**Tis:** Carcinoma *in situ*: carcinoma intraductal o carcinoma lobular *in situ*, o enfermedad de Paget del pezón sin tumor.

**T1:** Tumor de diámetro máximo o menor o igual a 2 cm: T1mic: Microinvasión de 0,1 cm de diámetro máximo.

T1a: Diámetro máximo mayor de 0,1 cm, pero menor o igual a 0,5 cm.

T1b: Diámetro máximo mayor de 0,5 cm, pero menor o igual a 1 cm.

T1c: Diámetro máximo mayor de 1 cm, pero menor o igual a 2 cm.

**T2:** Tumor de diámetro máximo mayor de 2 cm, pero menor o igual a 5 cm.

**T3:** Tumor de diámetro máximo mayor de 5 cm.

**T4:** Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a pared del tórax o a la piel:

T4a: Extensión a la pared torácica.

T4b: Edema (incluida la piel de naranja), o ulceración de la piel de la mama, o presencia de nódulos cutáneos satélites confinados a la misma mama.

T4c: 4a y 4b conjuntamente.

T4d: Carcinoma inflamatorio.

#### **1.1.5.1.2-N: Ganglios linfáticos regionales**

**NX:** No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales.

**NO:** No se demuestran metástasis ganglionares regionales.

**N1:** Metástasis en ganglios axilares homolaterales móviles.

**N2:** Metástasis en ganglios axilares ipsilaterales fijos o adheridos entre si o en ganglios de la mamaria interna ipsilateral clínicamente aparentes (en ausencia de metástasis axilares clínicamente evidentes).

N2a: Metástasis en ganglios axilares ipsilaterales fijos entre si o a otras estructuras.

N2b: Metástasis clínicamente en ganglios de la cadena mamaria interna ipsilateral clínicamente aparentes (en ausencia de metástasis axilares clínicamente evidentes).

**N3:** Metástasis en ganglios linfáticos infraclaviculares ipsilaterales, o en ganglios de la cadena mamaria interna clínicamente aparentes asociadas a metástasis en ganglios axilares clínicamente aparentes, o metástasis en ganglios supraclaviculares ipsilaterales con o sin simultánea afectación de ganglios axilares y/o de cadena mamaria interna.

N3a: Metástasis en ganglios infraclaviculares ipsilaterales y ganglios axilares.

#### **1.1.5.1.3-M: Afectación en otros órganos a distancia**

**MO:** no afectación

**M1:** afectación

En función de la clasificación TNM, los cánceres de mama se agrupan en estadios con valor pronóstico, que van desde el 0 hasta el IV.

<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>I</b>	T1	N0	M0
<b>IIA</b>	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
<b>IIB</b>	T2	N1	M0
<b>IIIA</b>	T3	N0	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
<b>IIIB</b>	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
<b>IIIC</b>	Cualquier T	N3	M0
<b>IV</b>	Cualquier T	Cualquier N	M1

**Tabla 1.** Estadios del cáncer de mama.

Estadio 0	95%
Estadio I	88%
Estadio II	66%
Estadio III	36%
Estadio IV	7%

**Tabla 2.** Valor pronóstico de la clasificación TNM: tasas de supervivencia a los 5 años.

### 1.1.5.2-Clasificación de riesgo

Cada vez más, otros elementos anatomopatológicos y moleculares se están teniendo en cuenta a la hora de establecer un pronóstico y evaluar las diversas opciones terapéuticas. Influye el grado histológico, el grado nuclear y los marcadores inmunohistoquímicos como los receptores estrogénicos y progestagénicos, el receptor del factor de crecimiento epidérmico erb2, la expresión de la proteína mutada p53, o el índice proliferativo ki67.

En este sentido, la reunión de consenso de cáncer de mama de St Gallen actualizó en el 2005 los criterios para clasificar a las pacientes operadas de cáncer de mama en función del riesgo en tres grupos<sup>28</sup>:

**Bajo Riesgo:** Ganglios negativos y todas las siguientes características: pT  $\leq$  2 cm, grado I, ausencia de invasión vascular peritumoral, ausencia de sobreexpresión o amplificación del oncogen HER2/neu y edad  $\geq$  35 años.

**Moderado Riesgo:** Ganglios negativos y al menos una de las siguientes características: pT > 2 cm, grado 2-3, invasión vascular peritumoral, sobreexpresión o amplificación del oncogen HER2/neu, edad < 35 años. Ganglios positivos (1-3) y ausencia de sobreexpresión o amplificación del oncogen HER2/neu.

**Alto riesgo:** Ganglios positivos (1-3) y sobreexpresión o amplificación del oncogen HER2/neu. Ganglios positivos ( $\geq$  4).

### 1.1.6-Tratamiento

Aunque no es objeto de este trabajo abordar la terapéutica del cáncer de mama, que presenta una complejidad cada vez mayor, de cara a comprender mejor la globalidad del cáncer de mama, resumiré los principales puntos teniendo en cuenta sobre todo que el tratamiento del cáncer de mama requiere un abordaje multidisciplinar, en el que especialmente intervienen cirujanos, oncólogos médicos, radioterapeutas y radiólogos.

#### 1.1.6.1-Tratamiento del carcinoma no infiltrante

Existe acuerdo generalizado en que el fin del tratamiento del carcinoma in situ es la cirugía con conservación de la mama con un resultado estético óptimo y con el menor riesgo posible de futuras recurrencias. Para estos tumores se ha establecido una clasificación pronóstica que puntúa en función de los márgenes de resección, el tamaño, la edad y el grado de diferenciación. La radioterapia adyuvante e incluso la mastectomía radical con linfadenectomía queda reservada para las puntuaciones 10-12 de la clasificación sobre el índice pronóstico de Van Nuys (tabla 3).

#### INDICE PRONÓSTICO VAN NUYS PARA CARCINOMA DUCTAL IN SITU

Puntuación	1	2	3
Tamaño	≤ 15 mm	16-40 mm	>41 mm
Márgenes	≥ 15 mm	1-9 mm	<1 mm
Histología	Bajo grado. Sin Necrosis	Bajo grado. Con Necrosis	Alto grado. Con/Sin Necrosis
Edad	≥ 60	40-60	≤40

Tabla 3. Índice pronóstico Van Nuys.

### **1.1.6.2-Tratamiento del carcinoma infiltrante localizado**

El tratamiento clásico es la cirugía. Los objetivos del tratamiento quirúrgico son tanto el control locorregional de la enfermedad como obtener información pronóstica que permita seleccionar el tratamiento complementario apropiado con la menor mutilación y secuelas estéticas posibles.

#### **1.1.6.2.1-Cirugía conservadora**

El tratamiento quirúrgico conservador consiste en la extirpación del tumor con un margen de tejido mamario sano, preservando el aspecto anatómico de la mama<sup>29 30</sup>. Las principales indicaciones de cirugía conservadora son los estadios I y II salvo que la mujer no los desee, exista multicentricidad o no se pueda garantizar un adecuado resultado estético, o que existan contraindicaciones para la radioterapia posterior. La extirpación quirúrgica de un tumor mamario maligno infiltrante de modo conservador debe acompañarse de linfadenectomía axilar (habitualmente niveles I y II de Berg). El valor de la linfadenectomía es fundamentalmente pronóstico y ayuda a la planificación del tratamiento adyuvante. La linfadenectomía axilar esta siendo sustituida por la biopsia del ganglio centinela, un paso más en la reducción de la agresividad e del tratamiento del cáncer de mama.

#### **1.1.6.2.2-Ganglio centinela**

El ganglio centinela es el primer ganglio que recibe drenaje del área donde asienta el tumor primario y, por tanto, teóricamente sería el primer afectado si existieran metástasis linfáticas. Aunque suele tratarse de un ganglio axilar y habitualmente se encuentra en el grupo central del nivel I, el ganglio centinela puede estar en el nivel II o en el nivel III, o incluso puede ser un ganglio intramamario, un ganglio interpectoral o un ganglio de la cadena mamaria interna. El objetivo es detectar, extirpar y estudiar el ganglio que tiene mayor probabilidad de estar afectado, evitando, en el caso de ausencia de infiltración las secuelas asociadas a la linfadenectomía axilar. Las recomendaciones y contraindicaciones para la realización de biopsia del ganglio centinela han sido publicadas recientemente por la Sociedad Americana de Oncología Médica<sup>31</sup>.

#### **1.1.6.2.3-Cirugía radical**

La cirugía radical se propone a aquellas pacientes que no cumplan los criterios para tratamiento conservador. Las pacientes con tumores localmente avanzados (T3-4, N2-3) no son candidatas a tratamiento quirúrgico inicial. Tras una quimioterapia inicial el tratamiento habitual en este grupo de pacientes es la mastectomía radical. No obstante, aquellas que consiguen buena respuesta a la quimioterapia se podrían beneficiar de una cirugía conservadora<sup>32</sup>.

**Mastectomía radical:** Las intervenciones más frecuentemente realizadas en la actualidad son las propuestas por Patey y Madden, con desinserción de pectorales para permitir acceso al nivel axilar III de Berg y eliminación de todo el tejido mamario.

**Mastectomía simple:** Consiste en la escisión de la glándula mamaria con la piel que la recubre y el complejo areola-pezones. Está indicada en pacientes con carcinoma ductal in situ extenso, carcinomas infiltrantes en los que debido a la edad o al estado general no se benefician de linfadenectomía axilar, en mastectomías profilácticas en pacientes de alto riesgo, en recidivas locales de carcinomas de mama tratados previamente con cirugía conservadora y en tumores localmente avanzados con finalidad higiénica.

**Mastectomía subcutánea:** Es una modificación de la mastectomía simple en la que se extirpa la glándula mamaria, respetando la piel y en algunos casos el complejo areola-pezones. Su principal indicación son las mastectomías profilácticas en mujeres de alto riesgo y en aquellas pacientes con carcinomas in situ o infiltrantes con el fin de realizar reconstrucción inmediata.

#### **1.1.6.2.4-Radioterapia adyuvante**

La radioterapia complementaria reduce el porcentaje de recidivas locoregionales y mejora la supervivencia. El momento óptimo de

administración dependerá de la administración o no de quimioterapia y del esquema utilizado.

Básicamente las indicaciones de la radioterapia son<sup>33</sup>:

- Cirugía conservadora (**volumen mamario** 40-50 Gy)
- Márgenes inferiores a 1 cm (**sobreimpresión del lecho quirúrgico** 10-20 Gy)
- Tumores localmente avanzados (T3-T4, N2-N3) (**pared torácica** 45-50 Gy + **región supraclavicular** 45-50 Gy)
- Afectación de más de 4 ganglios axilares, afectación extracapsular ganglionar o de la grasa axilar (**pared torácica** 45-50 Gy + **región supraclavicular** 45-50 Gy + **región axilar** 45-50 Gy)
- Afectación de ganglios supraclaviculares y/o afectación de ganglios de la cadena mamaria interna (**sobreimpresión** con 10-20 Gy sobre esas regiones)

#### 1.1.6.2.5-Quimioterapia y hormonoterapia adyuvante

El tratamiento médico complementario con quimioterapia, hormonoterapia, o agentes biológicos tiende a individualizarse cada vez más, teniendo en cuenta los criterios pronósticos expuestos con anterioridad.

En las pacientes con criterios de bajo riesgo se ofrece un tratamiento hormonal en función de la presencia o no de menopausia (inhibidores de la aromatasa<sup>34 35 36</sup> o tamoxifeno<sup>37</sup> respectivamente). En las pacientes de

moderado riesgo, en ausencia de contraindicación médica, existe indicación suficiente para recibir tanto tratamiento hormonal y quimioterapia. De manera similar las pacientes con criterios de alto riesgo, casi todas reciben tratamiento con quimioterapia.

Se administra tratamiento hormonal en todas las pacientes con criterios de respuesta al tratamiento endocrino (positividad de expresión de receptores hormonales en el tumor) en función de la presencia o no de menopausia.

La administración de quimioterapia adyuvante sistémica ha demostrado una mejoría en la supervivencia global independientemente de la edad, afectación ganglionar y sensibilidad hormonal. De los estudios publicados con quimioterapia en el tratamiento adyuvante del cáncer de mama se sabe que la asociación de varios fármacos es superior a la monoterapia, que los regímenes con antraciclinas son superiores, que 6 ciclos son superiores a tres, que la adición de taxanos a mujeres con afectación ganglionar positiva aumenta la supervivencia global, que la utilización de trastuzumab en mujeres con cáncer de mama y sobreexpresión de c-erb-B2 de manera concurrente o secuencial con la quimioterapia ofrece un incremento significativo de la supervivencia global y que no existe evidencia de beneficio de las altas dosis de quimioterapia en el cáncer de mama <sup>38 39 40</sup>.

#### **1.1.6.3-Tratamiento del carcinoma localmente avanzado**

Este subgrupo de pacientes incluye enfermas de características muy diversas, algunas de las cuales presentan tumores grandes pero técnicamente operables (T3 N1) y otras con tumores inoperables (T4 o N2-3). En estas pacientes, tras la administración del tratamiento sistémico primario hasta alcanzar la máxima respuesta (neoadyuvante), se realiza una valoración clínica y radiológica. En función de la respuesta, tamaño y localización del tumor, edad de la paciente y comorbilidad asociada se decide el tipo de tratamiento quirúrgico.

Dado que el cáncer de mama es una enfermedad sistémica, en los últimos años esta aumentando la tendencia a administrar tratamiento sistémico previo al tratamiento locorregional (cirugía y/o radioterapia). De los estudios publicados basados en tratamiento sistémico primario en estadios II, IIIA y IIIB y recogidos en el metanálisis que se publicó en el año 2005<sup>41</sup>, sabemos que este tratamiento no es inferior en cuanto a supervivencia al tratamiento adyuvante, permite incrementar el porcentaje de cirugía conservadora posterior y la respuesta al tratamiento de inducción es un factor pronóstico, presentando mejor supervivencia aquellas que alcanzan respuesta completa patológica.

El tratamiento habitualmente utilizado ha sido el uso de poliquimioterapia inicial con combinaciones de antraciclinas hasta alcanzar la máxima respuesta, seguido de un tratamiento local (cirugía y radioterapia). En los últimos años se han publicado estudios utilizando taxanos en combinación con antraciclinas o de manera secuencial que han demostrado un

incremento en el porcentaje de respuestas patológicas, pero con resultados contradictorios en cuanto a incremento de supervivencia libre de recidiva<sup>42 43</sup>. En tumores con sobreexpresión de c-erb-B2, la administración de trastuzumab en combinación con epirrubicina y paclitaxel consigue un porcentaje de respuestas completas patológicas del 66.7%, resultado significativamente superior al obtenido por la misma combinación de fármacos sin trastuzumab (25%)<sup>44</sup>.

#### **1.1.6.4-Tratamiento del carcinoma metastásico**

El tratamiento del cáncer de mama diseminado o recurrente tiene una finalidad paliativa, siendo sus objetivos la eliminación de los síntomas con la menor toxicidad posible y el incremento de la supervivencia. Se trata nuevamente de un tratamiento multidisciplinar, basado fundamentalmente en la quimioterapia, hormonoterapia y en los nuevos agentes biológicos, que con la ayuda de la cirugía y la radioterapia contribuyen a conseguir los objetivos marcados.

Las mujeres con menos criterios de riesgo (por escaso volumen tumoral metastático, enfermedad no visceral, no afectación de órganos vitales, factores tumorales moleculares y más de dos años de intervalo libre de enfermedad en el caso de las recidivas) son candidatas a un tratamiento hormonal, dada la elevada probabilidad de respuesta, a menudo de larga duración. La respuesta a una primera manipulación hormonal tiene un importante valor predictivo de respuesta a sucesivas líneas hormonales. Al

igual que en la adyuvancia, se distingue entre mujeres premenopáusicas y menopáusicas<sup>45</sup>. En estos estadios, disponemos también de un nuevo antiestrógeno puro, el Fulvestrant<sup>46</sup>.

Las mujeres con enfermedad de alto riesgo reciben tratamiento con quimioterapia. No existe una evidencia firme para recomendar una poliquimioterapia de inicio frente a un tratamiento secuencial con diferentes agentes en monoterapia. La elección de los fármacos dependerá de su perfil de toxicidad, de la situación de la paciente y del esquema utilizado en adyuvancia. En pacientes que hayan recibido antraciclinas en adyuvancia, se recomienda la utilización de taxanos<sup>47</sup>, sólo o en combinación. En caso de no haberlas recibido, tanto los taxanos como las antraciclinas, en monoterapia o en combinación son opciones válidas<sup>48</sup>. La capecitabina<sup>49</sup>, gemcitabina<sup>50</sup>, la vinorelbina<sup>51</sup>, incluso el carboplatino<sup>52</sup> son opciones adecuadas en segunda y sucesivas líneas en monoterapia, asociadas a antraciclinas y taxanos o asociadas entre ellas. La adición de un antiangiogénico a un taxano ha demostrado su eficacia en el tratamiento de primera línea de cáncer de mama metastásico<sup>53</sup>. Las pacientes con cáncer de mama metastásico y sobreexpresión de HER2/neu se benefician de un tratamiento con trastuzumab, bien en monoterapia o en combinación<sup>54</sup>.

Los tratamientos locales con intención paliativa, como la radioterapia tienen su papel, especialmente importante en las metástasis cerebrales, la compresión medular, plexopatías por infiltración tumoral, metástasis líticas dolorosas o con riesgo de fractura. En casos seleccionados se puede valorar la

cirugía (pleurodesis en derrames pleurales recidivantes, toracotomía en resección de metástasis pulmonar única, mastectomía de limpieza en tumores ulcerados y cirugía ortopédica en casos de fracturas patológica). Los bisfosfonatos (ácido pamidrónico, ácido zoledrónico, ácido ibandrónico...), además de su papel en el tratamiento de la hipercalcemia tumoral, han demostrado reducir el dolor óseo, la incidencia de complicaciones óseas y mejora la supervivencia libre de progresión ósea<sup>55</sup>.

### **1.1.7-Seguimiento**

Las recomendaciones de la mayoría de las guías de práctica clínica, como la de la European Society Medical Oncology<sup>56</sup> (ESMO) American Society Medical Oncology (ASCO) y la National Comprehensive Cancer Network<sup>57</sup> (NCCN) aconsejan (tabla 4):

1. Anamnesis y exploración física cada 3-6 meses durante 3 años, y luego cada 6-12 meses durante 2 años más y luego anualmente.
2. Mamografía anual, y adicionalmente, a los 6 meses tras la radioterapia en mujeres que reciben tratamiento conservador.
3. Exploración ginecológica anual en mujeres con útero intacto, el intervalo puede ser más largo en mujeres sometidas a histerectomía total.

## ESQUEMA DE SEGUIMIENTO EN CANCER DE MAMA

<b>Año</b>	<b>Anamnesis, exploración física, hemograma, bioquímica, marcadores</b>	<b>Exploración ginecológica</b>	<b>Mamografía</b>
Primero	Cada 3 - 6 meses	Anual	Anual
Segundo	Cada 3 - 6 meses	Anual	Anual
Tercero	Cada 3 - 6 meses	Anual	Anual
Cuarto	Cada 6 - 12 meses	Anual	Anual
Quinto	Cada 6 - 12 meses	Anual	Anual
<b>Posteriores</b>	<b>Cada 12 meses</b>	Anual	Anual

**Tabla 4.** Recomendaciones para el seguimiento del cáncer de mama.

## **1.2-. Cribado y diagnóstico precoz del cáncer de mama**

### **1.2.1-Detección Clínica**

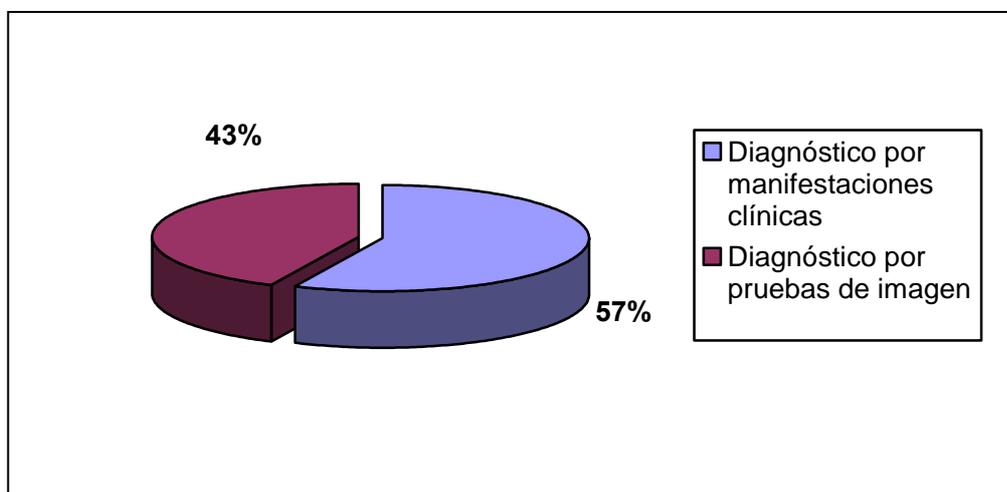
La alteración clínica que con mayor frecuencia lleva al diagnóstico del cáncer de mama es la aparición de un nódulo en la mama. A pesar de las campañas de cribado para el diagnóstico precoz, de las que hablaré más adelante, los pacientes detectan en muchas ocasiones mediante autoexploración de forma casual, por ejemplo durante el baño.

La presentación en estos casos, suele ser en forma de una masa solitaria, dominante y asintomática, que se caracterizan por la infiltración del tejido mamario circundante, por lo que suelen estar adheridos y no son móviles como los quistes y los fibroadenomas. La exploración clínica mamaria realizada por un profesional sanitario contribuye a detectar el carcinoma mamario precoz en las pruebas de detección sistemática<sup>58</sup>.

Otras formas de presentación clínica pueden ser la retracción cutánea por la infiltración tisular que tira de la piel, la piel de naranja, que consiste en un edema de la piel provocado por la infiltración de los linfáticos dérmicos. Esta forma de presentación suele denominarse carcinoma inflamatorio. Más rara es la presentación inicial con secreciones por el pezón, o la enfermedad de Paget del pezón, que es una erupción eczematosa que se inicia en el

pezón, y que se debe a la diseminación intraepitelial epidérmica de un carcinoma intraductal.

En una serie de 100 mujeres no seleccionadas, vistas en nuestras consultas de oncología del hospital San Jorge de Huesca durante el año 2007, el 57% de las mujeres se diagnosticó por manifestaciones clínicas (40% nódulo, 7% retracción de pezón, 7% dolor y 3% telorrea o inflamación), de las cuales el 37% (16 mujeres) estaban en programa de cribado con mamografía anual o bianual (figuras 4 y 5). El 43% restante se diagnosticó por pruebas de imagen, no notándose ellas nada (42% mamografías, 1% RMN). El total de las mujeres que estaban dentro de un programa de cribado era del 66 %.

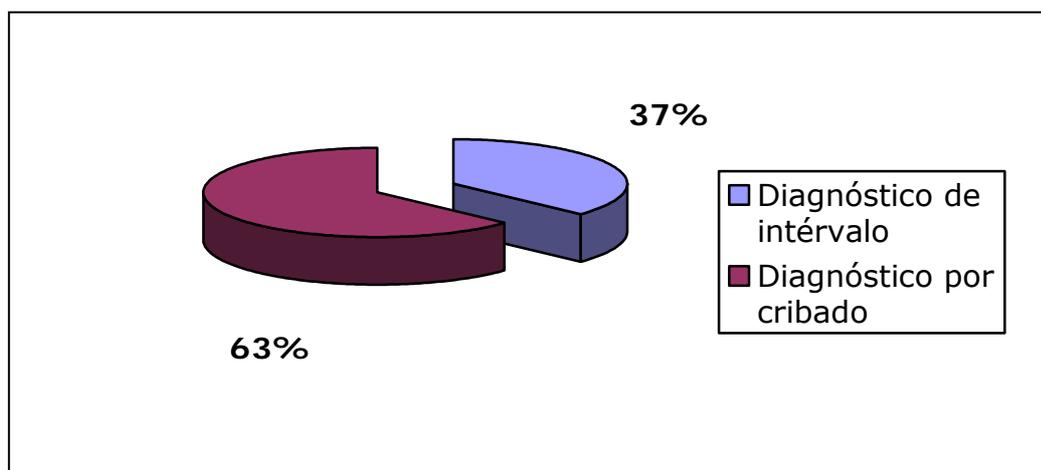


**Figura 4.** Causa del diagnóstico en nuestra población.

El alto porcentaje de mujeres que se diagnostican por autoexploración en comparación con otras series<sup>59</sup>, es en parte debido a que las mujeres recogidas en este estudio pertenecen mayoritariamente a un área rural con

tasas mayores de envejecimiento que la media nacional, y por tanto el porcentaje de población que entra en las campañas de cribado es menor<sup>60</sup>.

Es cierto que al igual que hay un porcentaje de pacientes que se benefician de las campañas de cribado (35% del total de mujeres, 63% si nos ceñimos sólo al grupo de mujeres en programa de cribado) con un porcentaje mayor de diagnósticos en estadio 0 o I, que las mujeres fuera de los programas, existe un nada desdeñable porcentaje de mujeres que a pesar de ser sometidas a pruebas de imagen anuales o bianuales (37%), éstas no resultan eficaces y se da un *diagnóstico de intervalo*. Esto puede ser debido bien, a fugas debido a la conocida sensibilidad de la mamografía, o bien a que en el momento del cribado, existiendo ya lesiones malignas o pre-malignas, éstas sean de carácter microscópico o de un volumen tan pequeño que las haga indetectables a las pruebas de imagen.



**Figura 5.** Causa del diagnóstico en las mujeres sometidas a programa de cribado en nuestra población.

## **1.2.2-Técnicas de imagen en el cáncer de mama**

### **1.2.2.1-Mamografía**

Actualmente, la mamografía, junto con la exploración clínica sigue siendo el estándar de oro en el diagnóstico precoz del cáncer de mama. Hoy en día, la mamografía, junto con el Antígeno Prostático Específico (PSA) para el cáncer de próstata, y la citología para el cáncer de cervix, son las únicas pruebas que se han mostrado eficientes, y están extendidas en la clínica para el cribado y diagnóstico precoz de estas patologías<sup>61</sup>. A pesar de los avances en el conocimiento genético molecular y en el tratamiento del cáncer de mama, la mamografía convencional, unida a la exploración física, siguen siendo la mejor herramienta de detección precoz selectiva disponible para el cáncer de mama.

La mamografía consiste en una radiografía simple de las mamas, en diferentes proyecciones (lateral, craneocaudal, y oblicua) intentando abarcar toda la extensión del tejido mamario incluida la cola, cercana a la región axilar. Las alteraciones radiológicas (en forma, tamaño, asimetría, microcalcificaciones, regularidad o irregularidad de bordes, densidad...) son descritas por el radiólogo y clasificadas según la clasificación BI-RADS<sup>62</sup> (Breast Imaging Reporting and Data System) en:

**BI-RADS 1:** Negativo.

**BI-RADS 2:** Hallazgo benigno.

**BI-RADS 3:** Probablemente hallazgo benigno. Se sugiere seguimiento en intervalo corto.

**BI-RADS 4:** Anormalidad sospechosa. Considerar biopsia.

**BI-RADS 5:** Altamente sugestivo de malignidad. Empezar acciones apropiadas.

La sociedad española de diagnóstico por imagen de la mama (SEDIM) recomienda las siguientes indicaciones de mamografía para el cribado:

1. Mujeres desde los 40 a los 70 años de edad.
2. Mujeres desde los 35 años de edad, con antecedentes familiares directos (madre, padre, hijos, hermana) de cáncer de mama de riesgo.
3. Mujeres con antecedentes personales de cáncer de mama, cualquiera que fuere su edad.
4. Mujeres con antecedentes personales de riesgo, diferentes al antecedente personal de cáncer de mama (determinadas lesiones mamarias benignas y neoplasias ginecológicas pélvicas, por ejemplo).

En cuanto a las limitaciones de la mamografía para el cribado, hablaremos con mayor profusión en el capítulo de la discusión, en el que las confrontaremos con los resultados de este trabajo.

### **1.2.2.2-Resonancia magnética nuclear**

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una prueba que está acaparando cada vez más protagonismo en el cribado, diagnóstico y planificación terapéutica del cáncer de mama. El realce tras la administración de gadolinio permite detectar áreas de aumento de vascularización en la mama, confiriendo a la RMN una sensibilidad mayor del 90 %. Sin embargo presenta una baja especificidad (63%) y un alto porcentaje de falsos negativos (5-15%)<sup>63</sup>. Esto hace que sus indicaciones estén todavía limitadas.

En abril de 2007 la sociedad americana de oncología publicó una guía sobre el uso de la RMN como complemento de la mamografía en el cribado del cáncer de mama, limitándole mucho a las pacientes de alto riesgo de padecer cáncer de mama hereditario. Recomiendan RMN anual en mujeres con la mutación BRCA conocida, en pacientes con un familiar de primer grado con la mutación positiva pero que no se ha realizado el test genético, o en pacientes con una estimación de riesgo de padecer cáncer de mama de un 20-25 % (o mayor) definidos por modelos informáticos como por ejemplo el programa BRCAPRO<sup>64</sup>.

En cuanto a la planificación del tratamiento, la RMN está indicada en pacientes candidatas a cirugía conservadora tras disponer de un diagnóstico cito-histológico de cáncer en casos en los que la extensión de la tumoración sea imprecisa mediante mamografía o ecografía. También tiene

un papel la RMN en la valoración de respuesta a tratamiento sistémico primario<sup>65</sup>, y en el seguimiento en pacientes portadoras de prótesis de silicona, en las que la mamografía resulta insuficiente.

En marzo de 2007 se presentó un importante trabajo en el que mostraba que a un 3% de las mujeres recién diagnosticadas de cáncer de mama se las detectaba tumoración bilateral mediante RMN sin que la mamografía hubiera observado alteraciones en al mama contralateral<sup>66</sup>. Está por ver si este tipo de trabajos obligaran a incluir una RMN basal como estudio de extensión en todas aquellas mujeres con diagnóstico de cáncer de mama.

### **1.2.2.3-Ecografía mamaria**

La ecografía mamaria, basada en la ultrasonografía, es una prueba sencilla, no invasiva y muy económica que tiene un papel destacado como complemento de la mamografía en el cribado y en el diagnóstico en determinadas situaciones, como en mujeres menores de 35 años (la mamografía pierde sensibilidad por la densidad mamaria de esas edades), mujeres embarazadas y en lactancia.

También tiene su papel en la evaluación de hallazgos patológicos en la exploración física con mamografía normal<sup>67</sup>. Además, la ecografía permite obtener muestras citológicas o histológicas mediante punción aspiración con

aguja fina (PAAF) o biopsia con aguja gruesa (BAG) en lesiones no palpables, evitando de este modo la realización de una biopsia quirúrgica<sup>68</sup>.

### **1.2.3-Marcadores tumorales**

Los marcadores tumorales o biomarcadores son sustancias que se encuentran en el tumor, son producidas por él o por el huésped en respuesta al cáncer y que pueden usarse para diferenciar entre tumores y tejidos normales. Se miden de forma cuantitativa o cualitativa con métodos químicos, inmunológicos o de biología molecular, y aunque se han descrito numerosos marcadores, son relativamente pocos los que se utilizan en la práctica clínica habitual<sup>69</sup>. Además en el diagnóstico precoz no han demostrado ninguna validez, a excepción del antígeno prostático específico (PSA) para el cáncer de próstata.

Los marcadores tumorales más empleados en el seguimiento y en la valoración de respuesta al tratamiento del mama son el antígeno carcinoembrionario (CEA) y el antígeno carbohidratado 15.3 (Ca15.3), aunque su uso clínico rutinario ha sido cuestionado en los últimos tiempos<sup>70</sup>. Sin embargo, no son específicos de esta patología y no han demostrado tener ningún valor en el diagnóstico precoz del cáncer de mama<sup>71</sup>. Alteraciones de tipo hepático, renal, menstrual, o hábitos tóxicos como el tabaco alteran sus concentraciones en la sangre.

En este sentido, no disponemos de armas bioquímicas o moleculares validas para el cribado, por lo que es necesario desarrollar nuevas estrategias para la detección precoz del cáncer de mama<sup>72</sup>.

## **1.3-Proteómica: La era de la biología molecular**

### **1.3.1-Genes, proteínas y cáncer.**

En febrero de 2001 la mayor parte de la secuencia del proyecto genoma humano (93%) fue publicada en la comunidad científica simultáneamente en dos de las revistas científicas más importantes<sup>73 74</sup>. En 2003 se consiguió la secuencia completa. Entre las primeras conclusiones se destacaba que la secuencia del genoma humano la componen 3 billones de pares de bases, que codifican así mismo entre unos 26.000 y unos 30.000 genes, (cifra bastante menor que 100.000 que se anticiparon al principio) y que los humanos tenemos el 99% de nuestro genoma en común. Pero esa diferencia del 1% es crucial, ya que alberga los cambios básicos que se asocian al riesgo de enfermedad o a la predisposición a estados patológicos<sup>75</sup>. Gran parte de los esfuerzos actuales se centran en la identificación de las múltiples variantes genéticas polimórficas que se dan de manera natural y que determinan la susceptibilidad de un individuo frente a diversas enfermedades frecuentes, incluyendo el cáncer. En esta línea se enmarca el gran desarrollo de las técnicas en genómica<sup>76</sup>, como la de los microarrays.

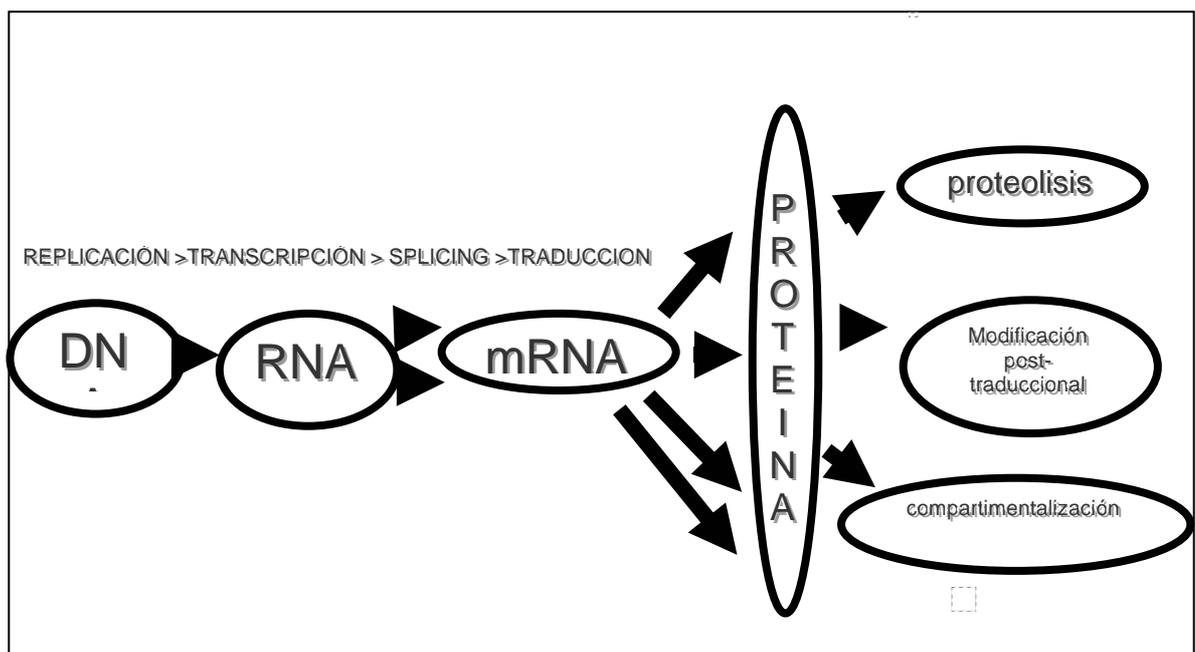
El cáncer es una enfermedad genética que está causada por la mutación, amplificación, delección o expresión anómala de genes llave que representan factores clave en la regulación celular. Las células que escapan a

esa regulación, son las que originarán el cáncer y presentan las siguientes características de las que nace su potencial maligno:

- 1) Ser autosuficientes en señalizaciones de crecimiento celular, por ejemplo activando la vía Ras.
- 2) Desarrollar insensibilidad a los mecanismos inhibidores de crecimiento, por ejemplo eliminando los controles del ciclo celular.
- 3) Hacerse resistentes a las señales de apoptosis, por ejemplo mediante la activación de la vía phosphoinositide 3'-kinasa (PI3 kinasa).
- 4) Adquirir potencial replicativo ilimitado, por ejemplo mediante la activación de telomerasa.
- 5) Inducir una fuerte respuesta angiogénica, por ejemplo en respuesta a la hipoxia via HIF-1.
- 6) Activar el proceso de invasión y metástasis, por ejemplo a través de cambios en metaloproteasas y moléculas de adhesión.

Actualmente se conocen con detalle 100 oncogenes dominantes (ej. ras y myc) y unos 30 genes supresores de tumores (ej p53 y PTEN). Además se conocen otra serie de genes que están envueltos en la regulación de la estabilidad del genoma. Parece claro que en muchos cánceres los genes actúan conjuntamente desencadenando el proceso de la progresión y malignización tumoral. Posiblemente entre 4 y 7 pasos genéticos críticos se requieren para el desarrollo de un cáncer común como el escamoso<sup>77</sup>.

Pero, como bien se sabe, el ejecutor final de la acción biológica, contenida y ordenada por los genes, son las proteínas: el producto final de los genes. La información está presente en el DNA. Mediante la transcripción y los mecanismos de splicing se transfiere a RNA, y se traduce finalmente en las proteínas. Éstas, a su vez, pueden sufrir proteólisis, modificaciones postraduccionales o compartimentalizaciones (figura 6). De tal manera que mientras se estima que hay entre unos 26.000 y 30.000 genes, el número de proteínas existentes en el cuerpo humano se calcula entre 100.000 y 1.800.000 proteínas diferentes<sup>78</sup>.



**Figura 6.** Del DNA a las proteínas modificadas.

Aunque las técnicas de genes-microarrays aportan importante información sobre la biología molecular del cáncer (en cuanto a expresión genética y transcripción), no pueden ofrecer información de lo que ocurre en el

nivel proteico (post-transcripcional: modificaciones, actividad enzimática...). La proteómica ofrece la posibilidad de multiplicar, cuantificar, acelerar ese tipo de análisis. Así por ejemplo, el complejo kinasa activado y su cascada desencadenada tiene una gran importancia en lo relativo a la patogénesis del cáncer y las terapias diana. La tecnología proteómica puede cuantificar en estado de los patrones kinasas, y aportar datos de la fosforilación que no se pueden obtener por arrays genéticos<sup>79</sup>.

### 1.3.2-¿Qué es la proteómica?

Se denomina **proteoma** al conjunto de proteínas expresadas por un genoma en un momento determinado y bajo determinadas condiciones ambientales. Pero va más allá que la simple suma de proteínas. El proteoma representa el estatus funcional de un compartimiento biológico. Por tanto el proteoma es una imagen dinámica de todas las proteínas expresadas por un organismo, célula o compartimiento subcelular concreto en un momento dado y bajo determinadas condiciones<sup>80</sup>. Y la **proteómica**, es el estudio de todo o parte del conjunto de proteínas de un organismo. La enorme información generada por los programas de secuenciación de genomas, suponen el sustento sobre el que empieza a definirse el nuevo reto de la etapa post-genómica: la proteómica, la identificación y catalogación de los productos que expresan estos genes.

La función de la inmensa mayoría de esas proteínas es desconocida. Las proteínas tradicionalmente han sido estudiadas y medidas por técnicas de baja capacidad de procesamiento, como la inmunodetección por western blotting, la hibridación in situ y la inmunohistoquímica. A diferencia del DNA, las proteínas son muy inestables, se desnaturalizan muy fácilmente, y cuando lo hacen pierden su función, no se pueden amplificar y, hasta hace no mucho, las técnicas para su estudio a mayor escala resultaban costosísimas.

Las nuevas tecnologías de proteómica disponibles actualmente, adaptadas a una alta capacidad de procesamiento, superan las limitaciones tanto cuantitativas, cualitativas y de reproducibilidad de los resultados.

El desarrollo de nuevas técnicas para la separación de proteínas, como la **electroforesis bidimensional**, el desarrollo y nuevo enfoque dado a la **espectrometría de masas** y especialmente la **bioinformática**, están permitiendo que en la actualidad la atención se haya ido desplazando desde el estudio de las secuencias de genes, al análisis y caracterización de los productos de éstos, o lo que es lo mismo, hacia el estudio de los cambios en la expresión proteica de un determinado genoma.

La proteómica supone abrir las puertas al conocimiento de las proteínas a gran escala, la posibilidad de analizar de una forma exhaustiva y simultánea, cambios en un gran número de proteínas en el contexto de una enfermedad o de distintas condiciones fisiológicas. Es por tanto, una prometedora herramienta para abrir soluciones a cuestiones difíciles de la

investigación clínica. Los métodos proteómicos, generan patrones globales de expresión de proteínas (pueden describir *perfiles proteicos*) de manera similar a como los microarrays de DNA pueden definir patrones exhaustivos de expresión de RNA mensajero.

Estos avances han permitido la adquisición de patrones de expresión de mezclas complejas de proteínas, principalmente de fluidos biológicos como plasma o suero que se asocian a muchas patologías humanas.

La construcción de estos patrones se está usando para estudiar, por ejemplo, los cambios en los niveles de proteínas asociados a determinadas enfermedades cardiológicas<sup>81 82</sup>, o neurológicas como la de Alzheimer<sup>83</sup> o la de Parkinson<sup>84</sup>. Se está utilizando para estudios de toxicidad como el de las ciclosporinas en trasplante renal, o en enfermedades infecciosas para la búsqueda de antígenos candidatos para el desarrollo de vacunas, o para describir proteínas responsables de la resistencia a antibióticos<sup>85</sup>.

Pero sin duda donde mayor aplicación parece tener es en el cáncer. En oncología, el campo que se abre es inmenso. La estrategia proteómica de identificación masiva de proteínas se está aplicando para la detección de proteínas asociadas a tumores: cáncer de colon, hepatocarcinomas, fibrosarcoma, cáncer de vejiga, pulmón, riñón, ovario, próstata... y también para el cáncer de mama<sup>86</sup>.

Existen ya marcadores tumorales descritos, sin embargo sólo unos pocos se han revelado útiles en el diagnóstico y en el pronóstico clínico de supervivencia y recurrencia. Por ello, continúa siendo de relevancia la descripción y caracterización de nuevos marcadores, de nuevos perfiles proteicos. Además antes de su uso clínico el método debe ser ampliamente validado.

En farmacología se está usando para la identificación de moléculas diana<sup>87</sup>. Los nuevos agentes terapéuticos ya comercializados en oncología actúan a nivel del proteoma, (no del genoma) como son los receptores sobre los que actúan los anticuerpos monoclonales recombinantes humanos. Ejemplos de esto son el imatinib (Gleevec), gefitinib (Iressa), sumetinib (Sutent), sorafenib (Nexavar), erlotinib (Tarceva), bevacizumab (Avastin), trastuzumab (Herceptin), rituximab (Mabthera) y el cetuximab (Erbix). Todos ellos actúan sobre receptores (complejos proteicos) intracelulares o de la membrana celular.

Los rápidos avances y la colaboración estrecha entre la investigación básica y la investigación clínica nos posibilitarán personalizar los tratamientos contra el cáncer, dirigidos contra la estructura genómica y proteómica específica, gracias a la combinación de biomarcadores basados en técnicas genómicas y proteómicas<sup>88</sup>.

### **1.3.3-Instrumentos para el mejor conocimiento de las proteínas**

La tecnología proteómica que está permitiendo estos avances se basa fundamentalmente en tres pilares: la electroforesis bidimensional, la espectrometría de masas y la bioinformática. Veamos:

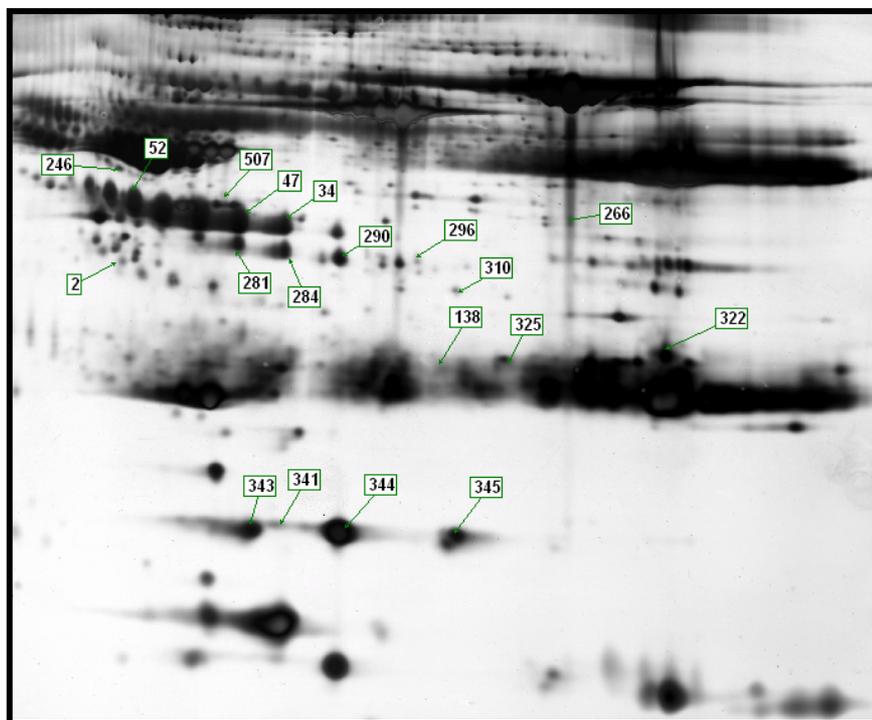
#### **1.3.3.1-Separar las proteínas: electroforesis bidimensional**

La electroforesis bidimensional no es una técnica nueva, ya que se viene desarrollando desde el último tercio del siglo pasado, pero es en los últimos años cuando más se están explotando sus posibilidades. Consiste en la separación de las proteínas que componen una mezcla proteica (suero, tejido, orina...) en base a dos características que, unidas, confieren mucha especificidad a una determinada proteína: el punto isoeléctrico (pI) y el peso molecular (pM). O lo que es lo mismo, su carga y su masa (z/m)

**1) Punto isoeléctrico:** la carga neta de cada proteína viene determinada por la suma de las cargas de los aminoácidos (aa) que la componen. Estas cargas de los aa proceden del grupo carboxilo (ácido), del grupo amino (básico) y algunos casos de las cadenas laterales, y varían en función del pH del medio. Así por ejemplo los grupos carboxilo tienen carga (+) en pH ácido, y carga (-) en pH básico. Aprovechando estas propiedades de la proteína, se puede construir en un gel (generalmente una matriz de poliacrilamida unida covalentemente a grupos ácidos y básicos) un gradiente de pH en que se pongan a *correr* las proteínas en presencia de un campo

eléctrico. Cada proteína se detendrá en aquel punto del gel en el que su carga neta es cero, es decir donde se neutralicen (+) y (-). Ese es el punto isoeléctrico específico de cada proteína.

**2) Peso molecular:** Una vez separadas las proteínas en función de su punto isoeléctrico, se pueden separar a su vez en base a su pM con una electroforesis clásica aplicando un campo eléctrico. Una vez hecho esto se detectan las proteínas mediante diferentes técnicas de tinción (cromóforos, colorantes fluorescentes, isótopos radioactivos...) y revelado. Se obtiene la imagen típica de un mapa proteico en un gel bidimensional, en el que cada punto (spot) corresponde a una proteína determinada (figura 7).



**Figura 7.** Mapa proteico característico de un suero tras electroforesis bidimensional. En horizontal la separación de los spots (que aparecen numerados) mediante el punto isoeléctrico. En vertical se separan las proteínas mediante su peso molecular.

### 1.3.3.2-Identificar las proteínas: espectrometría de masas

Cuando ya hemos separado cada proteína, hay que identificarlas. Aquellos spots que interesen se obtienen a partir de geles preparativos y se someten a un proceso de reducción-alquilación, deshidratación-rehidratación y digestión (mediante tripsina y otras enzimas específicas) hasta conseguir una mezcla peptídica que podremos introducir en un espectrómetro de masas.

La espectrometría de masas es una técnica clásica y muy exacta para determinar la masa de una molécula<sup>89</sup>. Es una técnica analítica que consiste en la formación de iones en fase gaseosa a partir de moléculas biológicas (grandes, polares y no volátiles). En esa forma gaseosa las moléculas ionizadas *vuelan* a través de un analizador por aplicación de un campo eléctrico hasta un detector de iones, y se separan y seleccionan los iones según su masa. En función del tamaño de los iones el *tiempo de vuelo* (TOF: time of flight) variará: los iones de menor masa llegan al detector antes mientras que los de mayor masa llegan más tarde.

El TOF es lo que mide el detector, que mediante un sistema informático adquiere las señales/tiempo, procesa los datos y los traduce en masa. En función del sistema que se use para ionizar las moléculas y para analizar y detectar la masa, dispondremos de unos espectrómetro u otros. Uno de los más usados, y el utilizado en este trabajo, es el MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)<sup>90</sup>. MALDI es el sistema de ionización para sólidos mediante flashes de laser, y TOF es el sistema de análisis mediante el *Time Of*

*Flight*. Otros sistemas de ionización son el ESI (Electrospray Ionization), ICAT (Isotope Coded Affinity Tag), SELDI (Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization) ... De analizadores existe el cuadrupolo, LC-MS/MS (Cromatografía líquida y espectrometría en tándem), la trampa de iones, el sector magnético, etc.<sup>91</sup>

Con esta técnica se consigue determinar de manera muy precisa la masa molecular con picomoles e incluso femtomoles. Es muy sensible y la automatización del proceso le ha conferido gran rapidez y economía.

Con la masa de cada péptido en que quedó dividida cada proteína, se obtiene lo que se denomina huella peptídica (fingerprint). Se define como el espectro de masas característico de cada proteína obtenido al analizar la mezcla de péptidos tras digestión enzimática. Este espectro es comparado con los espectros teóricos calculados de las secuencias proteicas de las bases de datos, empleando motores de búsqueda específicos como el MASCOT. Cuando un número adecuado de péptidos coinciden con los péptidos teóricos de una proteína en la base de datos y cubren un porcentaje adecuado de la proteína, tenemos identificada la misma. En los casos en los que no es posible la identificación de la proteína mediante la huella peptídica, se puede recurrir al análisis de la secuencia de aminoácidos de cada péptido mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS. Q-TOF). Este es un proceso más lento, pero más fiable.

En la tabla 5 exponemos un resumen de las principales técnicas que se están usando para el conocimiento proteico y sus principales características.

	<b>SENSIBILIDAD</b>	<b>IDENTIFICA MARCADOR</b>	<b>USO</b>	<b>CAPACIDAD DE PROCESAMIENTO</b>
<b>ELISA</b> (quimio-inmunofluorescencia)	La más alta	N/A	Detección de un único marcador en plasma, suero, tejido...	Moderada 1) Robusto, bien establecida 2) Requiere buenos anticuerpos para su detección
<b>Electroforesis 2D</b>	Baja cuando hay escasa cantidad. Sensibilidad limitada por los métodos de detección. Microdissección laser la pueden aumentarla	Sí	Identificación y descubrimiento de biomarcadores  Expresión diferencial Modificaciones post-traduccionales	Baja 1) Requiere mucho material 2) Requiere más validaciones antes de su uso clínico 3) Resolución limitada. Muchas proteínas pueden posicionarse en el mismo punto del gel
<b>ICAT</b> (isotope coded affinity tag)	Alta	Sí	Cuantificación de la abundancia relativa de proteínas de dos estados celulares diferentes	Moderada / Baja 1) Automatizada y buena sensibilidad 2) Dificultad para medir concentraciones sub pg/ml
<b>LC-MS/MS</b> Cromatografía líquida	Alta	Sí	Identificación y descubrimiento de posibles biomarcadores	Muy baja 1) Mucha más sensibilidad que a electroforesis 2) Limitada por las proteínas escasas y los fragmentos de bajo peso
<b>SELDI TOF MS / MALDI / QqTOF</b>	Media/alta	Sí	Reconocimiento de proteínas de diversos fluidos. Identificación y descubrimiento de posibles biomarcadores.	Alta 1) Reproducible 2) Rápido análisis de muchas muestras
<b>ARRAYS PROTEICOS</b>	Media/alta	Sí	Análisis multiparamétrico e muchas muestras simultáneamente	Alta 1) Limitado por la especificidad y sensibilidad del anticuerpo. 2) Flexible. Permite analizar simultáneamente varios marcadores en un individuo, o un marcador en muchos individuos

**Tabla 5.** Comparación de diversos métodos de estudio proteico.

### **1.3.3.3-Interpretar los datos: Bioinformática**

Todos estos procesos generan una cantidad ingente de datos que hay que ordenar e interpretar. Los grandes avances en bioinformática, con programas cada vez más potentes y específicos (que permite procesar y ordenar en tiempos muy cortos la avalancha de datos que dichas técnicas ofrecen) han contribuido de manera decisiva al conocimiento proteico<sup>92 93</sup>.

Para la electroforesis bidimensional, resultan fundamentales los programas para escanear y normalizar (cuantificando volumétrica y densitométricamente) los diferentes spots de los geles, programas para la generación informática de agrupaciones de patrones proteicos de casos y compararlos con el patrón normalizado o el patrón control (ej. Progenesis 240 de Non Linear Dynamics; PDQuest de Biorad; DeCyder de GE Healthcare). Son imprescindibles programas para el análisis de imagen a gran escala y para el tratamiento estadístico de la multitud de variables que se recogen.

Para la espectrometría de masas son necesarios programas que cotejan los resultados analíticos con grandes bases de datos online para identificar las proteínas. Los programas de búsqueda en las bases de datos de secuencias peptídicas con datos de pM de péptidos funcionan por comparación de las masas de las muestras con las masas de los péptidos que producirían por la apropiada digestión de cada entrada en la base de datos, calculando el número total de picos de masas característicos de péptidos

coincidentes y ordenando los resultados de acuerdo con el mayor número de coincidencias (matching).

#### **1.3.4-Líneas de investigación de proteómica en oncología**

La proteómica está empezando a dar el salto de la investigación básica a la investigación clínica, colocándose más cerca del umbral de la práctica médica. Vemos certero en este caso aquella expresión anglosajona usada para referirse a las aplicaciones prácticas de la investigación básica: *from the bench to the bed*. La importancia que la proteómica está adquiriendo como herramienta prometedora en oncología lo demuestra, por ejemplo, el hecho de que las comunicaciones sobre el tema en los principales congresos de oncología clínica se han multiplicado. Así, la Sociedad Americana de Oncología Médica introduce el término proteómica por primera vez en el index en el año 2003, incluyéndose tres términos. Desde entonces las comunicaciones han aumentado a 6 en el año 2004, y a 15 y una sesión educacional en el año 2005.

A continuación haré un repaso al estado de la cuestión, incluyendo los estudios más importantes, con los avances más significativos que se están produciendo en el campo de la proteómica en cuanto a su cercanía a la práctica clínica en los diferentes tumores<sup>94</sup>. Finalmente, me centraré en el cáncer de mama, donde se inserta la aportación al tema que queremos hacer con nuestro trabajo.

#### **1.3.4.1-Proteómica y cáncer de ovario**

El cáncer de ovario fue de los primeros tumores en los que se empezó a trabajar con tecnología proteómica, y por tanto es uno de los que más experiencia atesora.

Las altas tasas de mortalidad en el cáncer de ovario son debidas en gran parte a que la mayoría de los diagnósticos se hacen cuando la enfermedad está avanzada dado que los factores pronóstico pre-tratamiento han sido difíciles de identificar. Varios grupos están estudiando, mediante técnicas de proteómica, el diagnóstico precoz<sup>95</sup>.

El grupo de Petricoin<sup>96</sup>, uno de los más prolíficos, fue de los primeros en aplicar estrategias proteómicas para el diagnóstico del cáncer de ovario. Estudiaron la huella peptídica mediante espectrometría de masas (sin separación proteica previa) del suero de 50 mujeres control (37 sin evidencia de quistes ováricos, 11 con quistes ováricos benignos pequeños (< 2,5 cm) y 2 con quistes grandes (> 2.5 cm)) y 50 mujeres con cáncer de ovario (6 en estadio I y 44 en estadios II-IV). El algoritmo generado se aplicó a una muestra de 66 mujeres control y 50 mujeres con cáncer de ovario en diferentes estadios (18 en estadio I y 32 en estadios II-IV). Este grupo obtuvo una sensibilidad diagnóstica del 100% y una especificidad diagnóstica del 95%, con un valor predictivo positivo del 94%. Este valor predictivo fue significativamente muy superior al obtenido con un marcador tumoral clásico, el Ca 125, en el mismo grupo, que fue del 35%. Estos resultados desataron el

optimismo, llevando a 3 compañías americanas a desarrollar de forma conjunta un test para la detección de cáncer de ovario llamado Ovachek®, que sin embargo no acaba de introducirse en la práctica asistencial.

El grupo de autores del citado estudio está evaluando la utilidad de esta tecnología en el control de la recurrencia de enfermedad en mujeres con cáncer de ovario<sup>97</sup>. Otros grupos han presentado trabajos con nuevos biomarcadores (apolipoproteína A1, transthyretin, inter-a-trypsina, transferrina...) obtenidos con estas técnicas proteicas para el diagnóstico precoz de mujeres de alto riesgo<sup>98 99 100</sup>, así como estudios preliminares con marcadores asociados a la resistencias al cisplatino<sup>101</sup>.

#### **1.3.4.2-Proteómica y cáncer de próstata**

El cáncer de próstata es otro de los tumores que está siendo más estudiado con proteómica. El cribado actual del cáncer de próstata incluye la exploración clínica y el Antígeno Específico Prostático sérico (PSA) . Pero se sabe que enfermedades benignas de la próstata elevan también el PSA, y que un significativo número de pacientes con el PSA < 4 µg/ml presentan cáncer de próstata<sup>102</sup>. También aquí existen varios grupos de investigadores que están intentando descubrir nuevos biomarcadores para el diagnóstico. Zheng et al<sup>103</sup> han desarrollado un método para analizar tejido prostático de pacientes con hiperplasia benigna y cáncer invasivo prostático. Han identificado una proteína presente en el 94 % de cánceres de próstata (n= 17), y no presente en el tejido prostático normal (n=17). De nuevo el grupo

de Petricoin<sup>104</sup> examinó, sin separación previa de proteínas, el suero de 266 hombres usando SELDI con algoritmos bioinformáticos. El test detectó correctamente 36 de 38 hombres (95%) con cáncer de próstata (confirmado con biopsia), mientras 177 de 228 (78%) de hombres libres de enfermedad con PSA < 1 fueron detectados como tales. Un dato curioso es que la especificidad diagnóstica disminuyó notablemente con el aumento de la concentración de PSA (el 93% en el grupo con PSA < 4 µg/l, el 71% en el grupo con PSA de 4-10 µg/l y el 63% en el grupo con PSA > 10 (µg/l).

Otros estudios con objetivos y diseños similares han sido publicados, obteniendo resultados diversos, pero en todos los casos van apuntando a que la sensibilidad y la especificidad será mayor que el standard PSA: (S 97%, E 97%<sup>105</sup>, S 63%, E 77%<sup>106</sup>, S 67%, E 67%<sup>107</sup>). Entre las proteínas que se van demostrando como claramente diferenciales están la Apolipoproteína AII<sup>108</sup> (sobrexpresada en el cáncer de próstata) y la proteína Amiloide A<sup>109</sup> (en pacientes con metástasis óseas)

#### **1.3.4.3-Proteómica y cáncer colorectal**

El antígeno carcinoembrionario (CEA) es uno de los marcadores clásicos con una utilidad relativa en el seguimiento y el pronóstico del cáncer colorectal. Pero como hemos visto que sucede para el cáncer de mama, su sensibilidad y especificidad son escasas, lo que le incapacita para el diagnóstico precoz. Por ello parece que la proteómica puede ser útil también en la búsqueda de biomarcadores diagnósticos en el cáncer colorectal.

Engwegen et al<sup>110</sup> han identificado 2 marcadores (Apo C-I y Apo A1) capaces de distinguir pacientes con cáncer colorectal de controles sanos. En la actualidad se está trabajando en unos 15 nuevos potenciales biomarcadores, muchos de los cuales son proteínas séricas bien conocidas y que ahora aparecen en relación con el cáncer de colón<sup>111</sup>.

En esta patología, en la que en más del 30% de las ocasiones se afecta el hígado, se han estudiado las enzimas del sistema citocromo p450 (CYP) en pacientes con metástasis hepáticas, comparándolas con las enzimas de tejido hepático sano de alrededor utilizando tecnología de proteómica. 14 tipos diferentes de enzimas CYP de diferentes subfamilias fueron identificadas, 13 en tejidos sanos y 12 en el tejido tumoral. El perfil de expresión de CYP en cada caso individual pudiera ser determinante e importante en la predicción de la respuesta a la quimioterapia<sup>112</sup>.

#### **1.3.4.4-Proteómica y cáncer de páncreas**

El adenocarcinoma pancreático es uno de los tumores de peor pronóstico de los tumores sólidos, debido en gran medida a que la mayoría de los pacientes no desarrollan síntomas de la enfermedad hasta fases muy avanzadas. El antígeno Ca 19.9 está aceptado actualmente como marcador del cáncer de páncreas, pero por ejemplo la FDA sólo le aprobó para monitorizar la tasa de respuesta al tratamiento, no siendo efectivo para

diagnosticar el cáncer en fases resecables. Estudios preliminares aportan diferencias entre pacientes con cáncer de páncreas resecable, con enfermedad pancreática no maligna y pacientes sanos<sup>113</sup>.

La proteína HIP/PAP-I, (hepatocarcinoma-intestine-páncreas/pancreatic-associated-protein I), es una proteína generada en los acinos pancreáticos durante la pancreatitis aguda y sobre expresada en el hepatocarcinoma. Ha sido identificada por SELDI<sup>114</sup>, y está significativamente elevada en pacientes con adenocarcinoma pancreático frente a controles, pudiendo ser un nuevo marcador en esta enfermedad en el futuro.

El del grupo de Koopmann<sup>115</sup> estudió 3 grupos: 60 pacientes con cáncer de páncreas en diferentes estadios, analizados antes de la resección del tumor, 60 pacientes con enfermedad pancreática no maligna (26 pancreatitis, 8 tumores neuroendocrinos, 8 quistes pancreáticos, 6 adenomas quísticos y 12 con otros procesos) y 60 individuos de control sanos. El análisis realizado por el perfil de espectrometría, obtuvo una sensibilidad y una especificidad diagnóstica del 78% y 97% respectivamente cuando se emplearon sólo los grupos con cáncer de páncreas y los controles. En esta misma situación, el marcador tumoral CA 19.9, comúnmente utilizado en este tipo de tumores, produjo una sensibilidad del 65% y la misma especificidad (97%). Sin embargo, cuando se comparó el grupo de cáncer de páncreas con controles sanos más pacientes con procesos benignos, el análisis proteómico no mostró superioridad con respecto al marcador tumoral.

#### **1.3.4.5-Proteómica y hepatocarcinoma**

Con respecto al hepatocarcinoma, el biomarcador utilizado convencionalmente en el diagnóstico es la alfafetoproteína (AFP). Las concentraciones  $< 10 \mu\text{g/l}$  se consideran normales, mientras que las concentraciones  $> 500 \mu\text{g/l}$  suelen asociarse con el carcinoma hepatocelular. Los valores entre 10 y 500 constituyen una zona intermedia no diagnóstica, en la que se incluyen tanto los pacientes con cáncer como los que presentan una enfermedad hepática crónica. Un estudio<sup>116</sup> analizó mediante las mencionadas técnicas de proteómica clínica a un grupo de 38 pacientes con carcinoma hepatocelular (6 en estadio I, 8 en estadio II, 17 en estadio III y 7 en estadio IV) divididos en 2 subgrupos, según la concentración de AFP. El grupo control estaba formado por 20 pacientes con enfermedad hepática crónica con concentración de AFP  $< 500 \mu\text{g/l}$ . Del estudio de todos los grupos mediante la aplicación de una aproximación estadística se obtuvo una sensibilidad diagnóstica del 92% y una especificidad diagnóstica del 90%. La sensibilidad ascendía al 95% cuando se consideró únicamente al grupo de pacientes con cáncer cuya concentración de AFP no era diagnóstica.

#### **1.3.4.6-Proteómica y cáncer de pulmón**

El cáncer de pulmón es la primera causa de muerte por cáncer en los varones, y en algunos países lo está empezando a ser también entre las mujeres. Esta letalidad se debe a que el 70% de los casos se diagnostican en

estadios irresecables. Hasta la fecha ninguna técnica de imagen ni de inmunoanálisis se ha mostrado eficaz para el cribado y el diagnóstico precoz.

Los estudios con proteómica en esta patología también son menores y mucho más preliminares. En el Congreso Mundial de Cáncer de Pulmón celebrado en el 2007 se presentaron varios trabajos al respecto. Uno de ellos compara el suero de 7 pacientes en estadio IA con 10 controles sanos<sup>117</sup>. Se encontraron 29 posibles proteínas con cierto potencial estadístico diferencial, que deberán ser confirmados en posteriores estudios.

También se están abriendo líneas de investigación con proteómica en la búsqueda de factores predictivos de respuesta y marcadores de resistencia o no a determinados tratamiento quimioterápicos. En un estudio se encontraron 8 péptidos en suero que pueden estar relacionados con la resistencia a quimioterapia<sup>118</sup>. Un grupo irlandés ha identificado perfiles proteicos relacionados con la resistencia al Mitoxantrone<sup>119</sup>. Con tecnología MALDI MS aplicada al suero de pacientes con cáncer de pulmón no de célula pequeña se está desarrollando un algoritmo para ver que grupo de pacientes se beneficiarían o no del tratamiento con inhibidores de la vía tirosina kinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR TKi), como son los anticuerpos gefitinib y erlotinib<sup>120</sup>.

#### **1.3.4.7-Proteómica y otros tumores**

Se están abriendo líneas de investigación con proteómica en otros muchos tumores de menor incidencia, como por ejemplo el glioma<sup>121</sup>, sobre el que se publicó un estudio<sup>122</sup> con 34 individuos con glioma y 22 individuos sanos, y se obtuvo una sensibilidad diagnóstica del 96% y una especificidad diagnóstica del 91%.

Existen otros estudios en melanoma<sup>123</sup>, cervix<sup>124</sup>, renal<sup>125</sup>, leucemia linfocítica aguda<sup>126</sup>, etc. Otra estrategia que se está desarrollando es la de buscar proteínas diferenciales en el propio tumor en lugar de en el suero. Dado que escapa el objeto y la metodología de este trabajo en cuanto al diagnóstico precoz queda simplemente apuntado.

#### **1.3.4.8-Proteómica y cáncer de mama**

La gran heterogeneidad clínica y biológica del cáncer de mama, como hemos visto en el capítulo primero, pone de manifiesto la importancia de analizar globalmente los perfiles de expresión de genes y proteínas. El análisis mediante herramientas proteómicas está siendo utilizado con el objetivo de mejorar el diagnóstico y el pronóstico de esta enfermedad en una dirección integradora.

El estudio de patrones proteicos en sangre periférica con un panel definido de éstos, puede ser una técnica capaz de proveernos con un test

válido. El grupo de la Eastern Virginia Medical School presentó un estudio<sup>127</sup> que combina espectrometría con tecnología de microarrays. El objetivo era definir posibles patrones de identificación de cáncer de mama. Se analizaron muestras en suero de 139 mujeres pendientes de biopsia mamaria por lesión sospechosa. Se estratificó en función del resultado histológico de la biopsia en normal, benigno y tumoral. Tras múltiples combinaciones se identificó un patrón proteico con una sensibilidad y especificidad del 78 % y 83% de cáncer frente a normal. Cuando se combinaban dos chips la sensibilidad y la especificidad incrementaba a 90% y 93%. Aunque un análisis de validación propio confirmó una especificidad similar (93,3%), un tercer estudio de confirmación por la FDA (Food and Drugs Administration) obtuvo resultados sensiblemente inferiores, y la técnica sigue estando pendiente de validación.

Otro grupo de investigadores publicó un estudio<sup>128</sup> con 108 mujeres (41 sanas, 25 con tumor benigno de mama y 32 con cáncer de mama in situ). El grupo de validación estaba formado por 66 mujeres control (41 sanas y 25 con tumor benigno) y 103 mujeres con cáncer de mama. Identificaron 2 proteínas en suero de mujeres con carcinoma ductal: una forma truncada C-terminal de C3a (desArg) y un componente complementario de C3a (desArg) capaces de discriminar suero de pacientes y de controles, con una sensibilidad diagnóstica del 93% en estadios 0-I, el 85% en estadios II y el 94% en estadio III. La especificidad diagnóstica fue del 91%, significativamente superior a las obtenidas con el Ca 15.3 (sensibilidad diagnóstica del 23% y especificidad diagnóstica del 69%).

Otros biomarcadores identificados mediante SELDI son Hsp27, 14-3-3 sigma y la mamoglobulin/lipophilin B complex<sup>129 130</sup>. Algunos estudios han investigado el efecto que produce en el proteoma la quimioterapia, como el grupo de Heike et al<sup>131</sup> que identificaron en el suero dos proteínas (Apolipoproteína AII y kininogen) relacionadas con los efectos adversos de la infusión de Docetaxel. Otras líneas de investigación están yendo por el estudio proteico en otros sustratos diferentes del suero, como en la punción-aspiración con aguja fina<sup>132</sup>, el fluido-lavado ductal<sup>133</sup> e incluso el propio tejido tumoral<sup>134</sup>. Un reciente estudio ha encontrado diferencias de perfil proteico en las biopsias de tejido tumoral de mujeres recién diagnosticadas y a las que todavía no se había realizado el ganglio centinela. El array proteico construido era capaz de predecir la presencia y el número de adenopatía metastásicas axilares<sup>135</sup>.

Aunque todos estos resultados son prometedores, el papel que tendrán los futuros biomarcadores todavía no está bien establecido y serán necesarios nuevos estudios, validaciones bien definidas y mejoras técnicas para incorporar estos avances a la práctica clínica diaria<sup>136</sup>.

## **2.-HIPÓTESIS DE TRABAJO**

---



Las actuales técnicas de cribado en el cáncer de mama (exploración, mamografía, y resonancia magnética en mujeres de alto riesgo) presentan limitaciones importantes. Es necesario incrementar la sensibilidad de estos procedimientos.

Este estudio se basa en la hipótesis de que el proteoma del suero refleja desde estadios muy precoces la actividad tumoral, ya sea por secreción aumentada o disminuida de ciertas proteínas, o por diferencias en el grado de proteólisis, glucosilación u otras modificaciones bioquímicas postraduccionales que sufren las proteínas.

Si así fuera, los cambios en el proteoma se producirían mucho antes del inicio de los síntomas clínicos y existirían patrones de expresión proteica diferenciales entre mujeres sanas o con patología benigna de mama y mujeres recién diagnosticadas de un carcinoma de mama. Además, la detección de cambios de múltiples proteínas aportará ventajas sobre la detección de una única proteína para el diagnóstico precoz del cáncer.

Estos patrones en un futuro pueden representar nuevos biomarcadores que, en complementariedad con las técnicas ya existentes, aumenten la sensibilidad y la especificidad en el cribado, el diagnóstico precoz y el seguimiento del cáncer de mama.



## **3.-OBJETIVOS**

---



Los objetivos que se buscan en esta tesis son:

- 1) Estudiar patrones proteicos de mujeres sanas, de mujeres con patología mamaria benigna y de mujeres con carcinoma de mama mediante técnicas de proteómica, para identificar un patrón proteico útil en el diagnóstico precoz del cáncer de mama.
- 2) Identificar en suero proteínas implicadas en el desarrollo del cáncer de mama, que puedan ser en un futuro, marcadores moleculares con valor diagnóstico y pronóstico.
- 3) Establecer asociaciones entre patrones proteicos y otros parámetros como el estadio, la edad o la afectación ganglionar.
- 4) Evaluar posibles líneas futuras de actuación y posibles aplicaciones clínicas de los hallazgos, revisando la complementariedad de las técnicas moleculares con las técnicas de imagen en el cribado y el diagnóstico precoz del cáncer de mama.



## **4.-PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS**

---



## **4.1-Pacientes**

### **4.1.1-Universo poblacional**

El universo poblacional de este estudio lo componen mujeres (sanas, o con patología benigna de mama), y mujeres recién diagnosticadas de carcinoma de mama en diferentes estadios.

Por nuestra parte, las mujeres seleccionadas provenían de la consulta de cáncer de mama del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza (España), Hospital de la red pública que abarca el área III de Salud del Servicio Aragonés de Salud (SALUD, de un total de V áreas). El área III esta formada por el sector oeste de la ciudad de Zaragoza y la parte oeste, noroeste y suroeste de su provincia, por lo tanto población rural (60,7%) y urbana (39,3%). Una vez seleccionadas las candidatas se les explicaba el estudio, se firmaba el consentimiento informado y se realizaba una historia clínica personal y familiar detallada.

En este estudio han participado otros centros colaboradores aportando muestras de suero de las áreas de Vitoria (Hospital de Txagorritxu), de Santander (Hospital Universitario Marqués de Valdecilla), de San Sebastián (Instituto Oncológico de San Sebastián) y de Madrid (Hospital Universitario San Carlos).

#### **4.1.2-Criterios de inclusión y exclusión. Universo muestral**

Sobre ese universo poblacional descrito se consideró como candidatos al estudio a aquellas pacientes mayores de edad, recién diagnosticadas de cáncer de mama, que hubieran firmado el consentimiento informado para la extracción suero y que no hubieran sido tratadas anteriormente con cirugía mamaria, quimioterapia ni hormonoterapia. O bien mujeres sanas o con patología benigna de la mama para el grupo control.

## **4.2-Material y métodos**

#### **4.2.1-Recogida y procesado de muestras de suero**

De cada mujer seleccionada se recogían 5 mililitros de sangre periférica en un tubo sin anticoagulante. Una vez extraída la sangre, se seguían los siguientes pasos:

- Incubación a 37° C durante 1 hora. A los pocos minutos se pasaba alrededor del coágulo que se formaba la punta de una Pasteur para evitar que se adhiriera a las paredes del tubo.
- Incubación 10 minutos a 4° C para permitir una buena compactación del coágulo.

- Decantación del sobrenadante (suero) y centrifugarlo a 5000 xg durante 5 minutos para eliminar las células que pudieran quedar.
- Se recogía de nuevo el sobrenadante y se conservaba en nevera de -80° C.
- Cuando se acumulaban 5-6 muestras se hacía un envío en nieve carbónica al laboratorio de Proteomika S.L., situado en el parque tecnológico de Zamudio (Vizcaya)

#### **4.2.2-Elaboración de mapas proteicos mediante la técnica de electroforesis bidimensional.**

A partir de este punto, todo el procesamiento posterior fue elaborado por los investigadores de Proteomika S.L.

Las proteínas contenidas en las muestras se separaron primero mediante la técnica del enfoque isoelectrico según su punto isoelectrico (pI) en tiras de un rango de pH de 3 a 10. Seguidamente las proteínas *enfocadas* se separaron en una segunda dimensión según su peso molecular en maxigeles de poliacrilamida de 20 x 26 cm mediante electroforesis convencional. El mapa proteico resultante se reveló mediante su tinción con nitrato de plata, ofreciendo una imagen característica de puntos proteicos o spots.

#### **4.2.3-Análisis bioinformático de proteómica**

Una vez separadas las proteínas, se seleccionaron e identificaron aquellos spots con manifestaciones de expresión que pudieran ser empleados como marcadores de valor diagnóstico y/o pronóstico. Los geles teñidos con nitrato de plata se digitalizaron con un escáner usando el software LabScan™ (Amersham). Las imágenes resultantes se analizaron mediante el software Evolution (Nonlinear Dynamics). El análisis mediante este software consistía en comparar los geles entre ellos para determinar las manchas proteicas diferenciales. Mediante este software se creó un gel de referencia a partir de los geles de cada grupo de muestras. El gel de referencia se elaboró de manera que solamente mostraba manchas proteicas presentes en toda la serie de muestras, así como el volumen medio de la mancha en el grupo de muestras. El proceso de análisis comparativo comprendía los siguientes pasos:

1. Detección de las manchas presentes en cada gel.
2. Elaboración de un gel de referencia a partir de la comparación entre los geles de cada estadio o grupo control.
3. Superposición y ajuste de los geles originales con respecto al gel de referencia.
4. Emparejamiento de las manchas para determinar las que eran diferenciales. Las diferencias podían ser de dos tipos: ausente/presente o bien sobreexpresión/represión.

#### **4.2.4-Identificación de las manchas proteicas diferenciales mediante espectrometría de masas en tándem.**

Para ello las manchas de interés se escindieron de una de las réplicas del gel realizadas y se sometieron a una digestión proteolítica con tripsina. La mezcla peptídica resultante se analizó en un espectrómetro de masas en tándem (MALDI-TOF. En algún caso fue necesario utilizar Q-TOF para identificar agrupaciones de aminoácidos y no sólo de péptidos).

La identificación de la proteína se lograba comparando los datos resultantes de la espectrometría de masas con una base de datos de los pesos moleculares de fragmentos peptídicos cortados por tripsina teóricos (base de datos MASCOTT para la identificación de proteínas).

#### **4.2.5-Análisis estadístico de los datos**

Con los datos obtenidos se extrajeron conclusiones utilizando las herramientas estadísticas apropiadas (Phoretix™ 2D Evolution software) y se generaron agrupaciones informáticas de sueros en función de los perfiles proteicos (correlación de Pearson), estableciendo las diferencias entre grupos mediante el test de t-student ( $p < 0,05$ ).

#### **4.2.6- Revisión bibliográfica y comparación de los datos**

Se ha realizado una exhaustiva búsqueda bibliográfica en los principales buscadores médicos (Medline, Pubmed, UptoDate) para definir y describir el estado actual del cribado y diagnóstico precoz del cáncer de mama y el estado de las investigaciones en nuevos biomarcadores. Con ello se ha cotejado nuestro trabajo para extraer conclusiones, tanto en lo que se refiere a limitaciones y como las novedades, posibilidades y puntos de avance.

## **5.-RESULTADOS**

---



## **5.1-Primera Fase: Identificación de patrones proteicos diferenciales**

En esta primera fase se analizaron muestras de suero de 114 mujeres con el objetivo de determinar patrones proteicos diferenciales de mujeres con cáncer de mama frente a mujeres sanas.

### **5.1.1-Características de las pacientes**

De las 114 mujeres, 72 acababan de ser diagnosticadas de cáncer de mama en diferentes estadios, pero todavía no habían llevado ningún tipo de tratamiento oncológico (ni cirugía, ni radioterapia, ni quimioterapia, ni hormonoterapia). Del resto de las 42 mujeres control, 19 presentaban o habían presentado patología mamaria benigna (fibroadenomas 6, hiperplasia 3, adenosis 2, fibrosis 2 e infiltración adiposa 6) y las otras 23 no presentaban ningún tipo de patología mamaria.

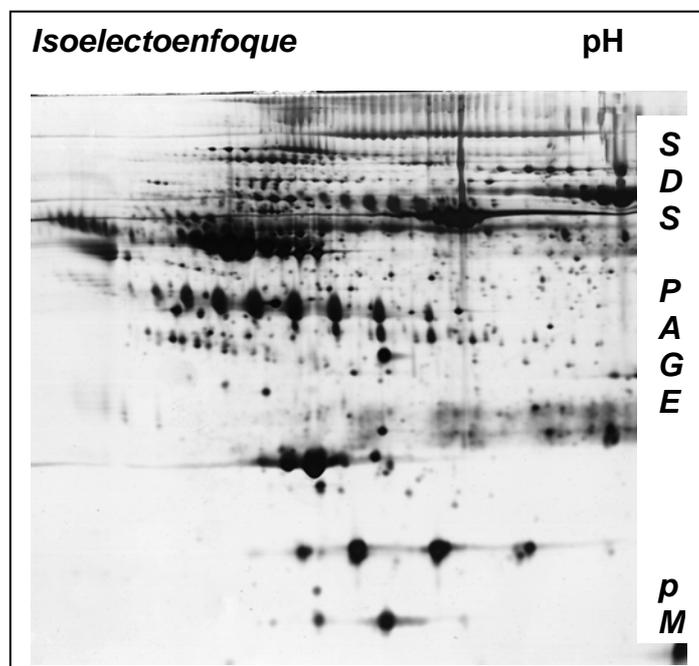
Las características de las pacientes quedan reflejadas en la tabla 6:

<b>DATOS CLINICOS</b>	<b>GRUPO CONTROL</b>	<b>CANCER DE MAMA</b>
	<b>n=42</b>	<b>n=72</b>
<b>Edad</b>	43 ± 14	57 ± 15
<b>Menopausia (+)</b>	8 (29%)	39 (59%)
<b>Tipo de Histología</b>		
CDI	-	51
CLI	-	10
Otras	-	11
<b>Estadio del tumor</b>		
0	-	4 (5%)
I	-	25 (35%)
II	-	21 (29%)
III	-	16 (6%)
IV	-	6 (8%)
<b>Ki 67</b>		
1	-	22 (43%)
2	-	13 (25%)
3	-	16 (31%)
<b>HER-2</b>		
0	-	27 (45%)
1	-	13 (22%)
2	-	3 (5%)
3	-	17 (28%)
<b>p53 (+)</b>	-	19 (36%)
<b>ER (+)</b>	-	45 (70%)
<b>PR (+)</b>	-	40 (63%)

**Tabla 6.** Características clínicas y anatomopatológicas de las 114 mujeres

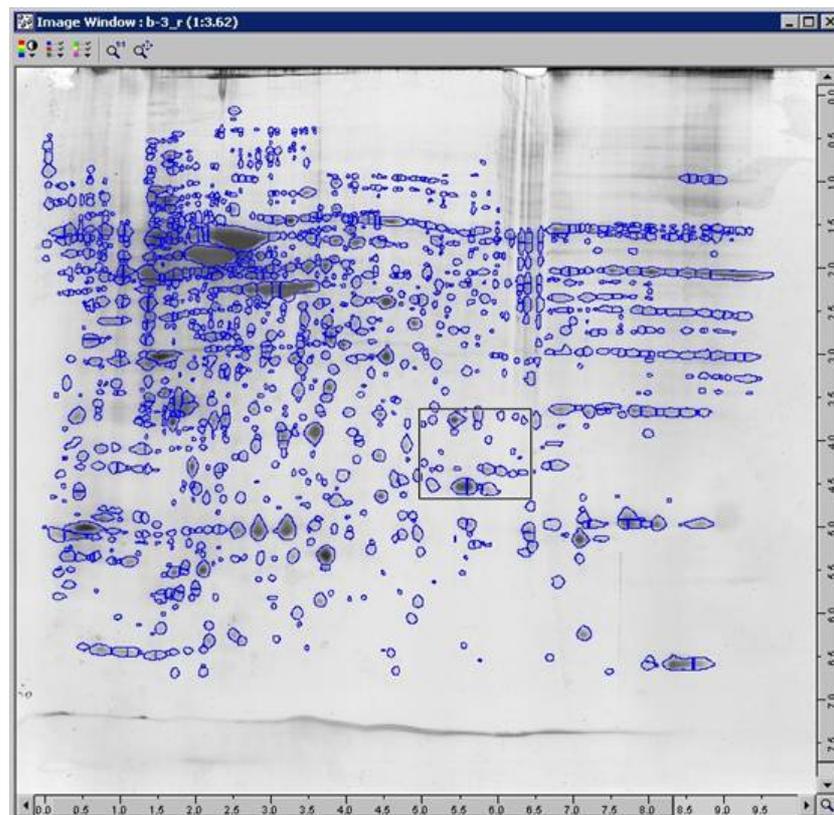
### 5.1.2-Análisis por agrupamiento

Las muestras de cada mujer eran sometidas a un proceso, descrito en el capítulo de material y métodos, para eliminar del suero los restos celulares que pudieran quedar, así como las proteínas mayoritarias cuya presencia distorsionaría los resultados y enmascararía la existencia de proteínas minoritarias objeto de nuestra búsqueda. Tras este procesamiento previo, las muestras de cada mujer fueron sometidas a técnicas de electroforesis bidimensional en geles 2D para la separación de las proteínas y obtener un mapa proteico por cada paciente, similar al de la figura 8. Cada punto negro, se denomina *spot*, y corresponde a una proteína diferente, que se ha separado en función de su punto isoeléctrico (pH, eje de abcisas) y en función de su peso molecular (SDS-PAGE, eje de ordenadas).

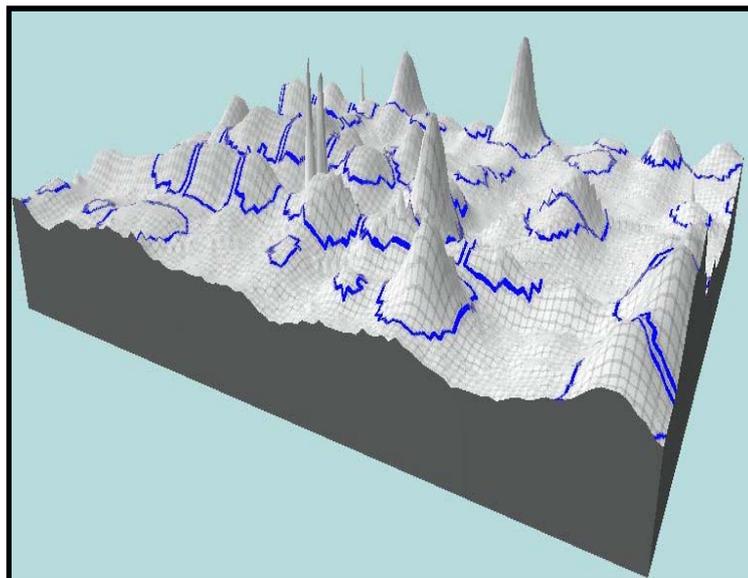


**Figura 8.** Gel 2D. Separación de las proteínas en función de su punto isoeléctrico (pH, eje de abcisas) y en función de su peso molecular (SDS-PAGE, eje de ordenadas).

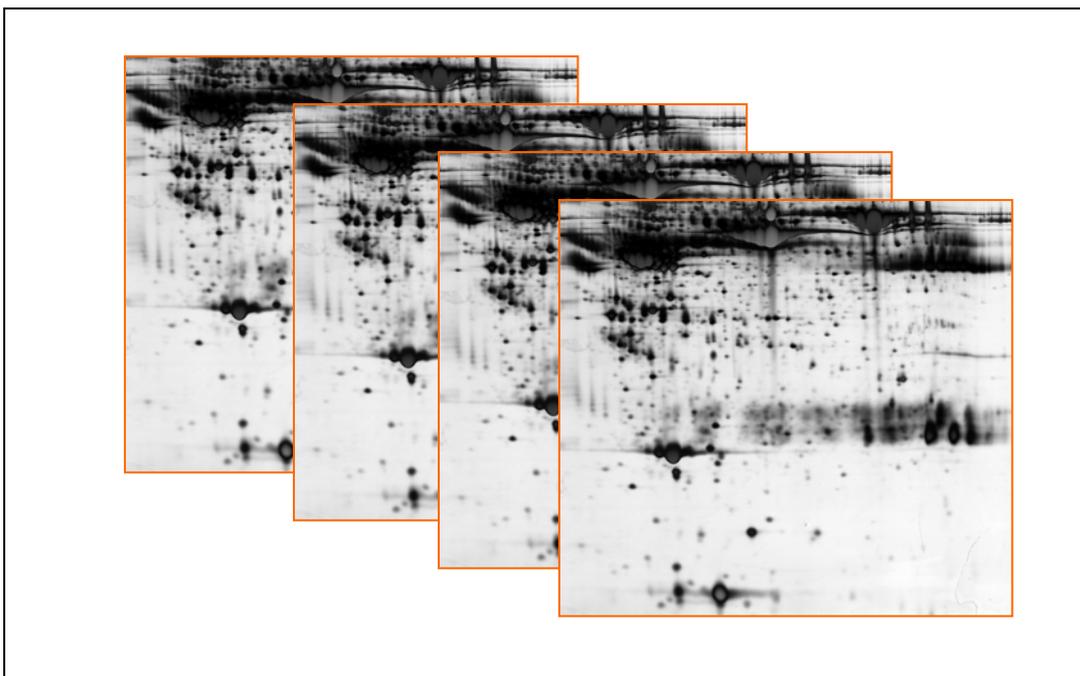
Cada uno de estos geles fue posteriormente digitalizado y editado (figuras 10 y 11), cuantificándose el volumen de expresión de cada spot en función de parámetros determinables por el software, como superficie y la intensidad de captación. Una vez digitalizados, se procede a la *normalización* (figura 12), obteniéndose un mapa de referencia normalizado con el total de los volúmenes de expresión de los spots de todas las muestras y de los diferentes subgrupos. Con esto, se buscaron diferencias entre los diversos grupos de muestras para conseguir patrones diferenciales de sobreexpresión o represión de determinados spots (proteínas).



**Figura 10.** Digitalización de los spots mediante escáner usando el software LabScan™ (Amersham).

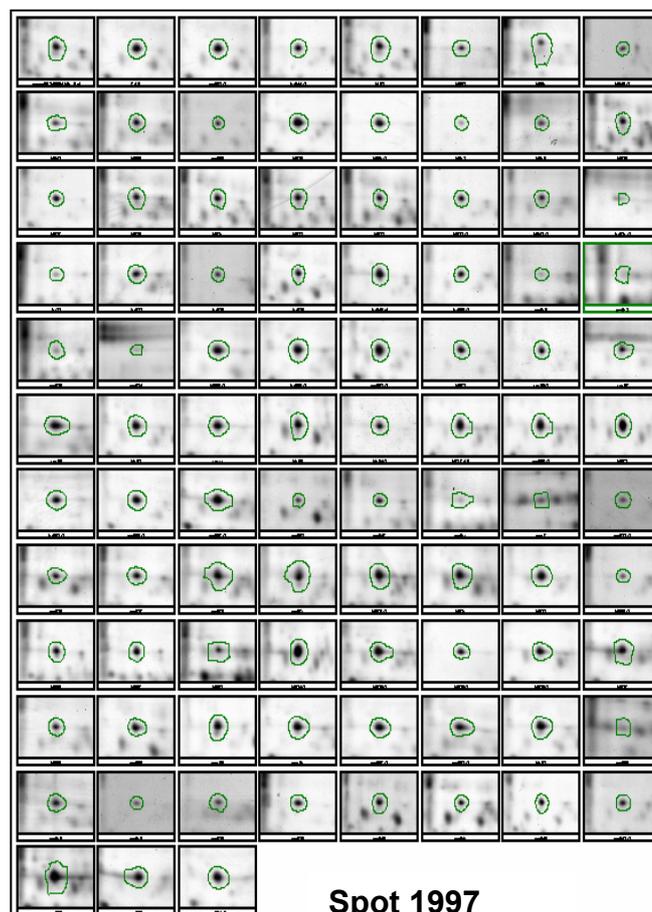


**Figura 11.** Edición y cuantificación de los spots.

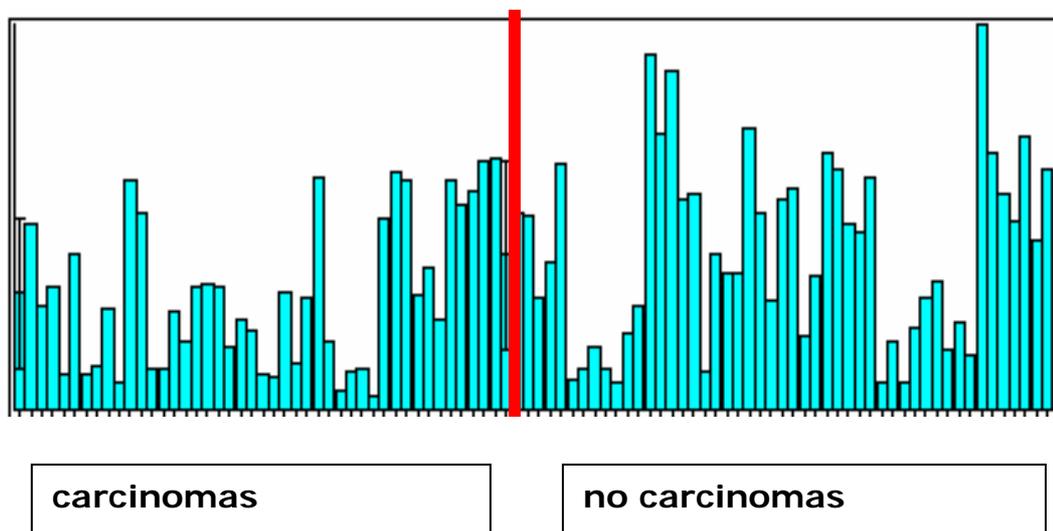


**Figura 12.** Normalización, para obtener un mapa de referencia.

Se realizaron diversas comparaciones informáticas en función de la expresión cuantificada de los diversos spots (clustering) (figuras 13 y 14). Los datos del grupo de las 72 mujeres con el diagnóstico con cáncer de mama fueron comparados con los de las 42 mujeres control, para establecer diferencias de expresión proteica. Se compararon los mapas de referencia normalizados con cada uno de los diferentes grupos. Así, se realizaron comparaciones entre los controles y los pacientes subagrupados en función de su tipo histológico (CDI, CLI), de su estadio (I-IV) y la afectación ganglionar (-/+).



**Figura 13.** Ejemplo de las diferencias de expresión de un spot en los geles.



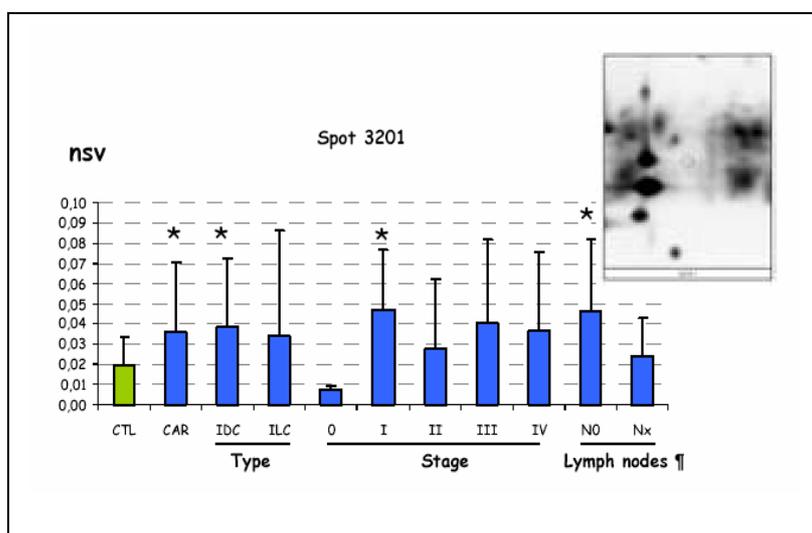
**Figura 14.** Ejemplo de la distribución de spot, el 1997.

Finalmente se encontraron diferencias de expresión estadísticamente significativas en un total de 43 spots. Las diferencias entre cada uno de los grupos y el grupo control fueron analizadas aplicando el test t Student ( $p < 0.05$ ). La tabla 7 recoge los 43 spots con expresión diferencial (vertical) como resultado de todas estas comparaciones de cada subgrupo (horizontal) con respecto al grupo control. El + que aparece en verde significa que ese subgrupo (columna) presentaba diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control para un spot determinado (fila).

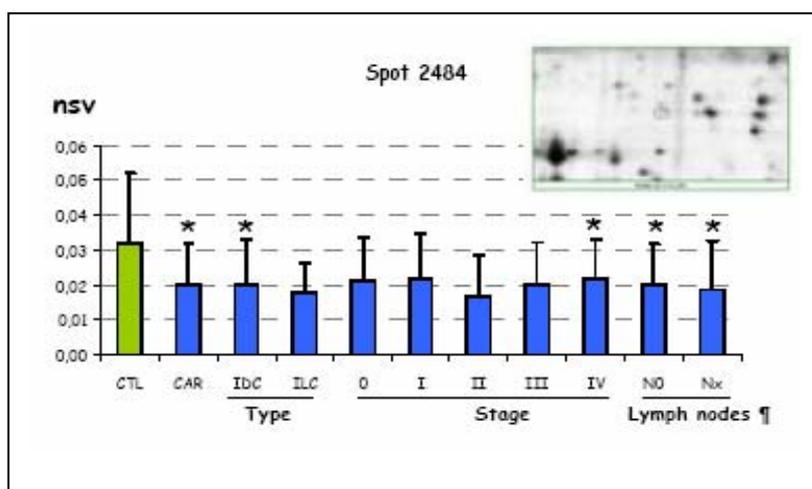
Spot	Todos los carcinomas n=72	HISTOLOGÍA			ESTADIO TUMORAL					AFECTACIÓN GANGLIONAR	
		CDI + CLI n=61	CDI n=51	CLI n=10	Estadio 0 n=4	Estadio I n=25	Estadio II n=21	Estadio III n=16	Estadio IV n=6	NO n=36	N+ n=22
3201	+	+	+			+				+	
2773	+		+			+		+		+	
2812						+				+	
4091								+			+
2451							+				
2484	+	+	+					+		+	+
2753	+	+	+	+		+		+		+	+
2798	+	+	+				+			+	
2800	+	+	+								
2655	+	+								+	+
44181									+		
44101						+					+
44136					+						
2357						+					
2284			+	+		+			+		
2368						+				+	
44518								+			+
44534							+				
2068			+								
2309			+								
2070				+							
2275				+							
3734				+							
2842				+					+		
44150				+			+				
44204				+							
2682				+							+
2717					+						
44531									+		
44203					+				+		
2395					+						
2415					+						
44133					+						
44141					+				+		
3201					+						
3958					+						
4800									+		
44073						+				+	
2339									+		
2793									+		
3159						+					
44084						+				+	
2437									+		

**Tabla 7.** Expresión diferencial de 43 spots entre mujeres con cáncer de mama y grupo control

En las figuras 15 y 16 mostramos un ejemplo de las diferentes comparaciones que se realizaron con el spot 3201 y en spot 2484, en donde *nsv* corresponde al volumen normalizado de los spots, CTL es el grupo control y CAR son todos los pacientes. Los subgrupos que muestran un asterisco son aquellos en los que se encontraron diferencias estadísticamente significativas mediante el test de t Student cuando se compararon con el grupo control.



**Figura 15.** Expresión (sobreexpresión) diferencial del spot 3201.

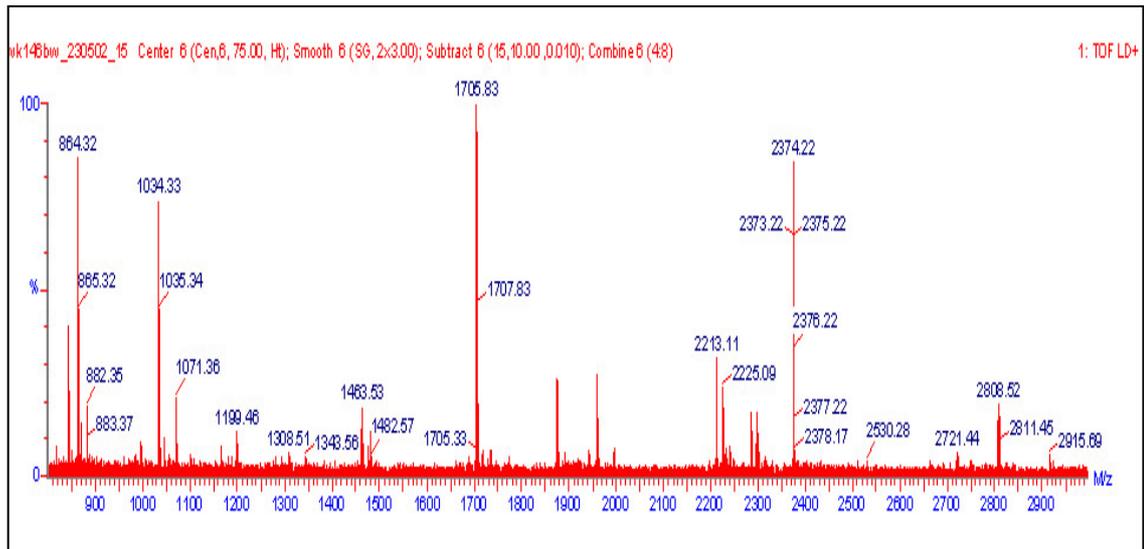


**Figura 16.** Expresión (represión) diferencial del spot 2484.

En el spot 3201 podemos ver como los subgrupos que difieren de manera estadísticamente significativa con el grupo control, lo hacen por sobreexpresión de una proteína diferencial, mientras que en spot 2484 la diferencia la aporta la represión o regresión proteica. Este tipo de análisis se llevó a cabo con cada uno de los spots identificados en el gel 2D.

### **5.1.3-Identificación de los spots**

Una vez identificados estos spots diferenciales que podrían corresponder a proteínas candidatas para nuestro estudio, se escindieron del gel, se digirieron con tripsina separándose en numerosos péptidos, y se analizaron mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) (figura 17). Las huellas peptídicas de cada proteína originada en el espectrómetro fueron cotejadas en la base de datos MASCOTT para la identificación de proteínas. En algunos casos no fue posible su identificación de la proteína mediante la huella peptídico, teniendo que recurrir al análisis de la secuencia de aminoácidos de cada péptido mediante espectrometría de masas en tandem (MS/MS. Q-TOF).



**Figura 17.** Espectro peptídico de una proteína por espectrometría de masas

Finalmente de los 43 spots diferenciales, se seleccionaron los 6 con más fuerza estadística de cara a validar los resultados en una población más amplia y desarrollar un chip con anticuerpos frente a esas proteínas.

## **5.2-Segunda Fase: Validación de los resultados**

### **5.2.1-Validación de anticuerpos frente a proteínas diferenciales**

Para esta fase, la empresa Proteomika S.L. validó 9 anticuerpos frente a las seis proteínas que se querían validar como posibles biomarcadores y frente a 3 proteínas control mediante técnica de western blotting 1D y 2D. Estas tres proteínas control eran el antígeno tumoral CA 15.3, un anticuerpo para la detección de un punto control de cada a la posterior normalización de los datos obtenidos, y una proteína como control positivo. Con estos anticuerpos diseñaron un proteichip que se utilizó para comparar las muestras de suero de esta segunda fase.

### **5.2.2-Características de las pacientes**

En esta segunda fase se obtuvieron muestras de 200 mujeres, 125 de pacientes con recién diagnosticadas de cáncer de mama en diversos estadios, que todavía no habían recibido ningún tipo de tratamiento oncológico, y 75 muestras de mujeres control sin patología mamaria. Las características de las pacientes quedan reflejadas en la tabla 8:

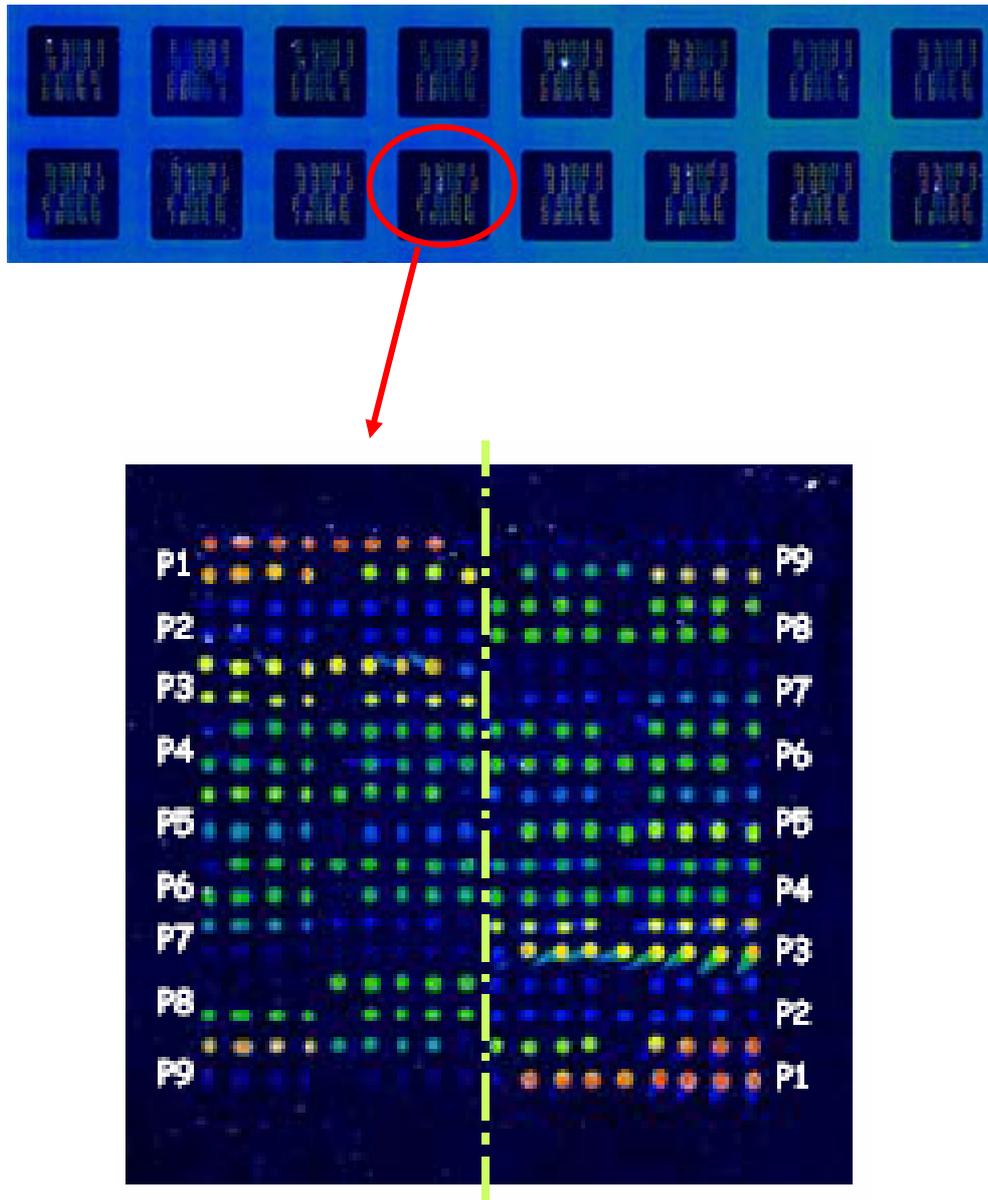
<b>DATOS CLINICOS</b>	<b>GRUPO CONTROL</b>	<b>CANCER DE MAMA</b>
	n=75	n=125
<b>Edad</b>	43 ± 14	55 ± 14
<b>Menopausia (+)</b>	37 (72%)	64 (58%)
<b>Histología</b>		
CDI	-	99
CLI	-	7
Otras	-	18
<b>Estadio del tumor</b>		
0		53 (43%)
I	-	36 (29%)
II	-	21 (29%)
III	-	20 (16%)
IV	-	5 (4%)
<b>Ki67</b>		
1	-	32 (45%)
2	-	21 (30%)
3	-	18 (25%)
<b>HER-2</b>		
0	-	41 (48%)
1	-	17 (20%)
2	-	6 (7%)
3	-	21 (25%)
<b>p53 (+)</b>	-	25 (34%)
<b>ER (+)</b>	-	81 (76%)
<b>PR (+)</b>	-	74 (70%)

**Tabla 8.** Características clínicas y anatomopatológicas de las 200 mujeres

### 5.2.3-Proteinchip

Se desarrolló un proteinchip usando tecnología Microgrid II 610 Biorobotics que incluía 16 paneles para el estudio simultáneo de 16 muestras diferentes de suero. Cada panel consta de 324 pocillos, separados en 9 grupos (que corresponden a los 9 anticuerpos) de 36 pocillos cada uno (P1-

P9). De esos 36 pocillos de cada grupo, 32 son 8 réplicas a 4 concentraciones diferentes, 2 son puntos de control negativo y otros dos puntos en blanco (figura 18 y 19).



**Figura 18.** Imagen en detalle de un pocillo: scanning a 560 nm

**324 pocillos:**

- 6 biomarcadores (**P2, P4, P5, P6, P7, P8**).

- Ca 15.3 (**P3**)

- Un punto control para la normalización (**P1**)

- Un control positivo (**P9**)



- 4 concentraciones x 8 réplicas

- 18 puntos de control negativo

- 18 puntos en blanco

Este chip, que contiene los anticuerpos a diferentes concentraciones frente a las proteínas diana, fue puesto en contacto con los 200 sueros muestra (75 controles y 125 pacientes) e incubado con anticuerpos marcados con inmunofluorescencia (biotina-estreptavidina-Cy3) (figura 20). Posteriormente los paneles del chip fueron escaneados y la fluorescencia que emitía fue cuantificada y normalizada utilizando el punto control para la normalización (P1).

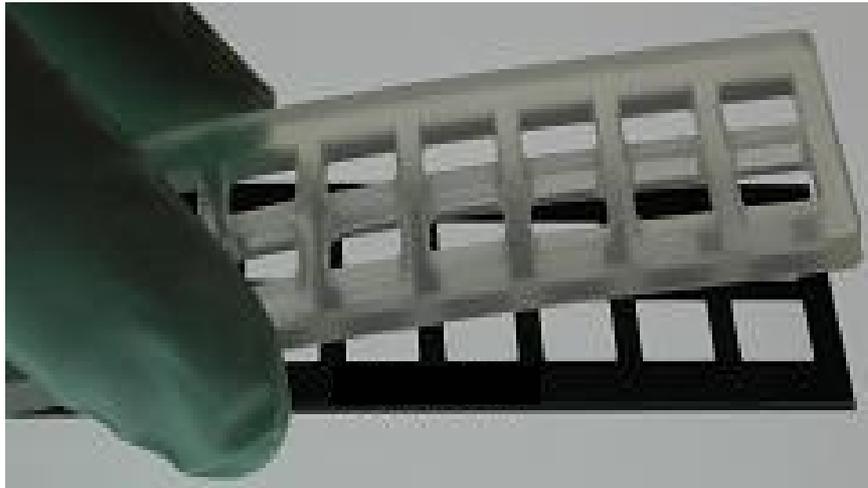


Figura 19. Estructura del proteinchip, con los 16 paneles.

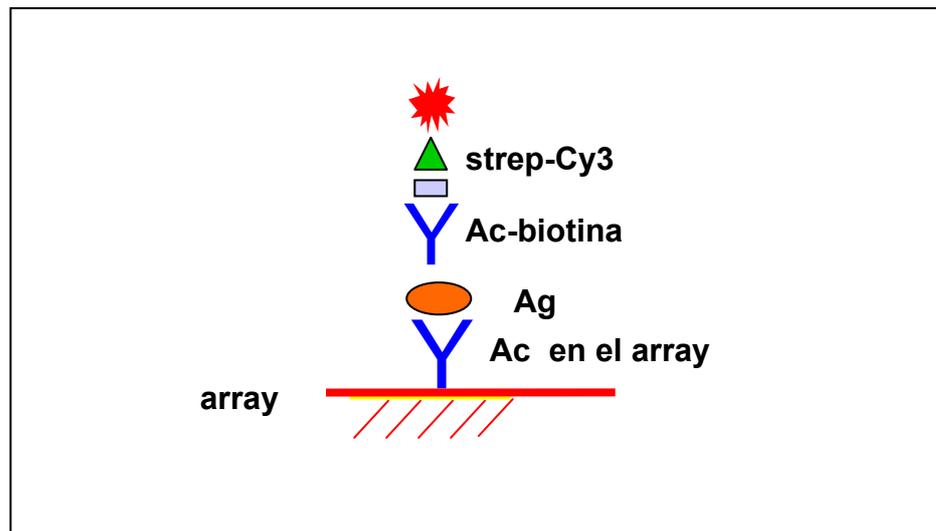
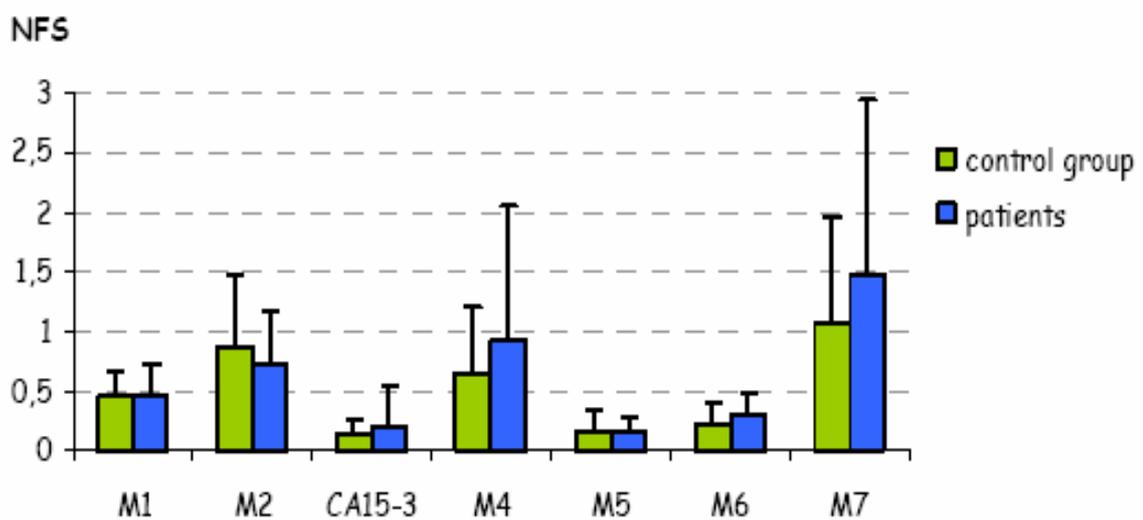


Figura 20. Esquema de trabajo en el array.

Los niveles de emisión de los biomarcadores del suero de las 125 pacientes recién diagnosticadas de cáncer de mama sin haber recibido en el momento de la extracción ningún tipo de tratamiento oncológico fueron comparados con los niveles de emisión del suero de las 75 mujeres sanas (figura 21).



**Figura 21.** En el eje de ordenadas NFS (Normalizad Fluorescent Signal).

Con los resultados normalizados de todas las muestras junto con datos clínicos como la edad y el estado pre o postmenopáusico, se realizó un análisis multivariable para generar modelos predictivos (algoritmos) y determinar la sensibilidad y la especificidad del proteinchip.

Con los datos de la comparación de 5 de las proteínas y del estado menopáusico se elaboró finalmente un modelo predictivo que obtenía una sensibilidad del 95% y una especificidad del 27% para detectar pacientes

recién diagnosticadas de cáncer de mama (tabla 9). La proteína CA 15.3 y la proteína P7 fueron excluidas por su baja significación estadística.

<b>VARIABLES CHIP PROTEICO</b>	<b>P</b>	<b>IC (95%)</b>	<b>SENSIBILIDAD 95 %</b>	<b>ESPECIFICIDAD 27 %</b>
Estado Menopáusico	0.077	0,928-4,2		
M1	0.482	0,211-27,17		
M2	0.02	0,048-0,769		
M4	0.022	1,141-5,615		
M5	0.144	0,356-1183,5		
M6	0.443	0,239-26,51		

**Tabla 9.** Modelo predictivo con 5 proteínas y el estado menopáusico.

## **6.-DISCUSIÓN**

---



A pesar de que la labor de los oncólogos médicos parezca muchas veces quedar reducida al tratamiento y posterior seguimiento del cáncer, la prevención y el diagnóstico precoz son objetivos principales para la oncología. Y para ello son cada vez más importantes los conocimientos de biología molecular y el contacto con la investigación básica, ya que éste parece ser el camino por el que se resuelvan muchas cuestiones que la medicina tiene hoy pendientes.

## **6.1- Se confirma la hipótesis**

La hipótesis de la que partíamos, de que el proteoma del suero refleja desde estadios muy precoces la actividad tumoral (por secreción aumentada o disminuida de ciertas proteínas o por diferencias en el grado de proteolisis, glicosilación u otras modificaciones químicas que sufren las proteínas) queda confirmada en este trabajo.

En el grupo de mujeres recién diagnosticadas de carcinoma in situ (estadio 0) se detectaron al menos 9 spots diferenciales con respecto al grupo control con significación estadística ( $p < 0,05$ ). En el grupo de pacientes de estadio I el número de spots fue de 11. Si agrupamos los pacientes que no tenían afectación axilar y los comparábamos con el grupo control, el número de spots diferenciales era de 10. Estos datos confirman la idea de la existencia de un patrón proteico diferencial en el suero de las mujeres con cáncer de mama en estadios muy incipientes.

Esto concuerda con los estudios más amplios publicados al respecto, como el de Vlahou<sup>123</sup> en el que analizando el suero pre-biopsia de 45 mujeres con lesiones sospechosas de malignidad y que luego se confirmaron como carcinoma, con 47 sueros de mujeres pre-biopsia con lesiones benignas de la mama, detectaron un perfil diferencial con espectrometría (sin llegar a conocer la función ni la identidad de las proteínas), que con una sensibilidad del 78% y una especificidad del 83% discriminaba patología benigna de maligna. De manera similar, como hemos visto, sucede con el grupo de Li<sup>124</sup>, en el que el análisis del suero de 61 mujeres con cáncer de mama (32 de ellas estadio 0), mediante electroforesis 1D y espectrometría en tandem, identificaba 2 biomarcadores con potencial diferencial con respecto a mujeres sanas o con patología benigna de la mama.

Los estudios citados anteriormente y la mayoría de los estudios publicados al respecto en otras neoplasias y presentados en el capítulo 3 de la introducción (incluidos los estudios más avanzados como los de ovario, y sobre los que se han construido los primeros kits comerciales de diagnóstico precoz, el Ovachek®)<sup>93</sup> presentan una limitación importante: se basan en la generación de espectros de masas de proteínas, que no han sido sometidas a procesos de separación exhaustivos, del suero de individuos control y de enfermos (gel 2D). El diagnóstico se centra en unos picos de un espectro que representan péptidos de una determinada relación masa/carga pero que no han sido asignados a ninguna proteína en concreto. Una vez obtenidos estos datos, se crea un algoritmo de clasificación a partir de las decenas,

centenares o miles de picos que se obtienen de la espectrometría, mediante el uso de diferentes aproximaciones bioestadísticas y bioinformáticas.

El algoritmo se construye a partir de las diferencias entre individuos control y enfermos de la intensidad de los picos (representativa de la abundancia de un péptido) y su relación masa/carga (representativa del péptido), sin que en ese momento se sepa a qué péptido o proteína corresponde un espectro determinado. Este algoritmo se aplica en una segunda fase a individuos control y enfermos diferentes de los anteriores (grupo de validación) de forma ciega, y se calcula la sensibilidad y la especificidad diagnósticas obtenidas.

Este hecho ha generado críticas por intentar basar el diagnóstico en proteínas de entidad desconocida o más bien perfiles peptídicos. Es decir se ven diferencias significativas, sin saber quien, cómo y porque las provoca, lo que puede generar problemas de interpretación, validación y reproducibilidad.

Sin embargo, y visto desde otro punto de vista, esta estrategia diagnóstica puede considerarse como una herramienta de investigación muy útil por su rapidez y versatilidad. Y además, en teoría, a partir de esos datos obtenidos se debería poder identificar las proteínas que causan las diferencias constatadas, aportando mucha más rapidez al proceso de investigación.

En nuestro estudio se ha usado la doble estrategia, más costosa en tiempo y recursos, pero probablemente más fiable, de separar los spots

mediante electroforesis bidimensional, y aplicar la espectrometría aun spot concreto y no a una muestra de suero sin separar. Posteriormente se seleccionan aquellos con mayor poder estadístico y se validan mediante chip proteico, teniendo en todo momento un grupo de proteínas con expresión diferencial y no únicamente un perfil proteico. Esta estrategia es la que han seguido otros grupos como el de Rui et al<sup>125</sup> para identificar dos proteínas (Hsp27, y 14-3-3 sigma) como posibles biomarcadores, o el de Hudelist et al<sup>137</sup> que encontrado 32 spots con potencial diferenciador.

En todos los casos parece confirmarse la existencia de patrones proteicos diferenciales en el suero de pacientes con mínima enfermedad. Patrones proteicos que por tanto aparecen en muchos casos antes de que la enfermedad manifieste sus primeros síntomas, por lo que se abre una vía interesantísima para llegar a conocer esos patrones y por tanto avanzar en el diagnóstico precoz y en el desarrollo de nuevos factores pronósticos y factores predictivos de respuesta.

Aunque todos estos resultados son prometedores, y parece claro que en estadios preclínicos el proteoma de los pacientes tiene elementos diferenciadores, ¿cómo llevar esto a la práctica clínica?

## **6.2 Valores y deficiencias del cribado y diagnóstico precoz del cáncer de mama.**

La prevención secundaria, tendente al diagnóstico precoz del cáncer de mama mediante campañas poblacionales de cribado en aquellas mujeres en edad de riesgo de padecer cáncer de mama, seguido de los nuevos tratamientos médico y quirúrgicos de las lesiones detectadas, son, sin duda, los responsables de gran parte de la disminución de la mortalidad del cáncer de mama al que estamos asistiendo<sup>138</sup>. La finalidad de un programa de cribado de cáncer es detectar precozmente la enfermedad en su fase asintomática con el fin de disminuir su morbimortalidad

Como hemos visto en la introducción, en una serie de 100 mujeres no seleccionadas, vistas en nuestras consultas de oncología del Hospital San Jorge de Huesca, el 57% de las mujeres se diagnosticó por manifestaciones clínicas (40% nódulo, 7% retracción de pezón, 7% dolor y 3% telorrea o inflamación), de las cuales el 37% (16 mujeres) estaban en programa de cribado con mamografía anual o bianual. El 43% restante se diagnosticó por pruebas de imagen (42% mamografías, 1% RMN). El total de las mujeres que estaban dentro de un programa de cribado era del 66%. El alto porcentaje de mujeres que se diagnostican por autoexploración en comparación con otras series<sup>139</sup>, es en parte, debido a que las mujeres recogidas en este estudio pertenecen mayoritariamente a un área rural con tasas mayores de

envejecimiento que la media nacional, y por tanto el porcentaje de población cubierta por las campañas de cribado es menor<sup>140</sup>.

Es cierto que, al igual que hay un porcentaje de pacientes que se benefician de las campañas de cribado (35% del total de mujeres, 63% si nos ceñimos sólo al grupo de mujeres en programa de cribado, según nuestra serie) con un porcentaje mayor de diagnósticos en estadio 0 o I, que las mujeres fuera de los programas, existe un nada desdeñable porcentaje de mujeres que a pesar de ser sometidas a pruebas de imagen anuales o bianuales (37%), estas no resultan eficaces y se da un diagnóstico de intervalo. Esto puede ser debido bien, a fugas debido a la conocida sensibilidad de la mamografía, o bien a que en el momento del cribado, existiendo ya lesiones malignas o pre-malignas, estas sean de carácter microscópico o de un volumen tan pequeño que las haga indetectables a las pruebas de imagen.

La mamografía resulta más eficaz para detectar tumores ocultos a medida que la mujer envejece y el tejido mamario se va sustituyendo por grasa. La densidad de la mamografía convencional influye mucho en el riesgo de interpretación de los falsos negativos y positivos<sup>141</sup>. Así mismo, la sensibilidad está también muy ligada a factores subjetivos, como la experiencia del radiólogo que las interpreta, como demostró un estudio con 150 mamografías interpretadas por 10 radiólogos con diferente experiencia<sup>142</sup>.

Las recomendaciones actuales más extendidas para los programas de cribado son la realización de mamografías a intervalos de uno a dos años en mujeres mayores de 40 años con exploración física anual. La mamografía se indicará en periodos más cortos en mujeres con síntomas mamarios, o en mujeres con factores de riesgo identificables (antecedentes familiares, alteraciones genéticas demostradas...)

Pero estas técnicas diagnosticas y de cribado presentan importantes limitaciones:

- a) La mayoría de los cánceres de mama, a pesar de las campañas de screening son detectadas por la propia paciente tras autoexploración.
- b) La mamografía tiene una sensibilidad en torno al 70-80%<sup>143 144</sup>. Usadas de forma conjunta, mamografía y exploración física detectan entre el 85 % y el 90% de los cánceres comprobados mediante biopsia, por lo que toda masa o nódulo sospechoso debe ser sometido a citología/biopsia.
- c) El uso de mamografías en el cribado de mujeres menores de 50 años tiene un beneficio muy pequeño, siendo casi nulo en las menores de 40 años, por lo que algunos investigadores han dudado de su valor en los programas sistemáticos de cribado para este grupo de población.

- d) Presenta limitaciones importantes para todas aquellas lesiones que no se acompañen de microcalcificaciones. Así lo ha demostrado el estudio con 939 pacientes recién diagnosticadas de cáncer de mama, y en las que en 30 mujeres (3,1%) la mamografía era incapaz de detectar la existencia de una tumoración contralateral <sup>63</sup>.

Respecto a la periodicidad, entre hacer el cribado anual o bianualmente, un estudio realizado con 7840 mujeres en EEUU sometidas a mamografía de screening entre 1996 y 2001 concluyó que sólo las pacientes del grupo de edad entre 40 y 49 años obtenían beneficio con la mamografía anual respecto a la bianual. El beneficio consistía en detectar cánceres en estadio más tempranos (28% vs 21%) en el grupo de cribado anual, lo cual en principio se traduciría en un aumento de la supervivencia<sup>145</sup>. En las mujeres mayores de 50 años no habría diferencia.

Precisamente son las situaciones donde más carencias tiene la mamografía (edad joven, mamas densas...) las que presentan las mujeres con más riesgo de padecer cáncer de mama. En esta población especialmente sensible, por tratarse de gente joven y con gran componente de incertidumbre generador de ansiedad, al ser familias con más de un caso de cánceres de mama en familiares de primer o segundo grado, es donde la mamografía pierde mucho su sensibilidad y especificidad.

Dos grandes trabajos con muestras cercanas al millar de mujeres de alto riesgo coinciden al respecto. El grupo de Kriege<sup>146</sup> aporta una sensibilidad

de la RMN para el diagnóstico precoz de cáncer de mama en mujeres de alto riesgo era de 79,5% mientras que la de la mamografía y la exploración era del 33% y 17,9 % respectivamente. La mamografía descendía al 14% si se trataba de diagnosticar tumores menores de 1 cm.

De manera similar, el grupo de Warner<sup>147</sup> con mujeres canadienses BCRA1 o 2 + entre 25 y 65 años describe una sensibilidad de la RMN para el diagnóstico precoz de cáncer de mama de 77%, 36% para la mamografía, 33% para la ecografía y 9,1% para la exploración. Sólo se alcanzaba sensibilidades mayores al 90% combinando las cuatro modalidades diagnósticas<sup>148</sup>.

Por otra parte, en ambos estudios la especificidad de la RMN era menor que la mamografía, en torno al 60%. (60). En cribado de población general<sup>149</sup> la RMN presenta una sensibilidad del 88,1%, pero con una especificidad del 67,4%. Además presenta un elevado número de falsos positivos. En este estudio, de 492 casos en los que la RMN informaba como maligna, 136 no lo eran, pero obliga a realizar biopsia a todas con el aumento del coste que eso supone.

Esto hace que por el momento el papel de la RMN en el cribado quede reducido al cribado de mujeres de alto riesgo hereditario de padecer cáncer de mama, como ha puesto de manifiesto la guía clínica de la Sociedad Americana del año 2007 <sup>61</sup>.

Todas estas limitaciones de las pruebas de imagen hacen surgir la necesidad de otras técnicas, que las complementen y que puedan robustecer el cribado y el diagnóstico precoz. Aquí es donde tiene mucho que aportar el estudio proteómico.

## **6.3-Sensibilidad y especificidad de nuestra serie.**

### **Limitaciones**

La sensibilidad y la especificidad del chip proteico seleccionado en esta serie para identificar mujeres con cáncer de mama recién diagnosticadas y sin haber recibido tratamiento previo, frente a mujeres sanas (y que incluye 6 proteínas con patrón de expresión diferencial) es del 95% y 27% respectivamente, como hemos expuesto en el apartado de resultados. A continuación mostramos la tabla comparativa de las sensibilidades y especificidades de diferentes trabajos y técnicas de cribado y diagnóstico precoz:

	<b>SENSIBILIDAD</b>	<b>ESPECIFICIDAD</b>
<b>Mamografía anual+ exploración física en mujeres ≥ 50 años</b> <sup>139, 140</sup>	70-80%	85-90%
<b>Mamografía anual en mujeres de alto riesgo</b> <sup>60,142,143</sup>	33-36%	80%
<b>RMN en población general</b> <sup>145</sup>	88 %	67%
<b>RMN en mujeres de alto riesgo</b> <sup>60,142,143</sup>	77-79%	60%
<b>Exploración + mamografía + RMN + ecografía</b> <sup>144</sup>	85-95%	85-95%
<b>Proteómica en cáncer de próstata</b> <sup>102</sup>	100%	95%
<b>Proteómica en cáncer de mama, Vahlou et al</b> <sup>123</sup>	97%	97%
<b>Proteómica en cáncer de mama, Li et al</b> <sup>124</sup>	81-95%	93%
<b>Proteómica en cáncer de mama del presente trabajo</b> <sup>150</sup>	<b>95 %</b>	<b>27%</b>

**Tabla 10.** Sensibilidad y especificidad de diversas pruebas de cribado

Los estudios con proteómica, aunque pequeños en número, están generando gran expectación y también fuerte discusión. A priori, estos estudios están mostrando una sensibilidad mayor que las pruebas de imagen clásicas, como vemos en la tabla 10. En relación a los estudios publicados para cáncer de mama con tecnología proteómica, nuestro estudio presenta una sensibilidad similar (en torno a 95%) pero sin embargo se obtuvo una especificidad llamativamente más baja (27%)<sup>150</sup>.

Esto pone de manifiesto determinadas limitaciones de nuestro trabajo.

En primer lugar, en las muestras obtenidas (tanto en las mujeres de la primera fase, como en las mujeres de la fase de validación) no obtuvimos la homogeneidad deseada en cuanto a balanceo de los grupos. La edad media de las mujeres de los grupos control fue de 42 años y medio, mientras que en el grupo de pacientes fue de 56. Teniendo como referencia el estado menopáusico, en los grupos controles lo eran el 29% y el 37% respectivamente, frente al 59 y 58% del grupo de las pacientes.

Por otra parte, en los análisis multivariantes se han podido escapar otros factores clínico-epidemiológicos, como el de valorar aquellos subgrupos de pacientes o controles con muy alto riesgo familiar de padecer cáncer de mama, o estratificar y comparar subgrupos en función de la forma de llegar al diagnóstico (diagnóstico de intervalo, cribado, autoexploración), lugar en que realmente jugaría un papel fundamental esta técnica. O ser más selectivos a la hora de homogenizar las muestras en cuanto a factores pronósticos (a la hora de buscar proteínas diferenciales para el diagnóstico precoz, el 14% de las pacientes tenían enfermedad localmente avanzada o metastásica, lo cual pudo introducir factores de confusión). Quedan por resolver ciertos temas, como la reproducibilidad y el control de calidad tanto del instrumento como del proceso.

Sin duda habrá que optimizar las técnicas y mejorar la selección y las estrategias de búsqueda de patrones diferenciales, aspectos ambos

primordiales en cualquier análisis que pretenda extraer datos de utilidad clínica.

## **6.4-Posibles usos: líneas de futuro**

El estudio presentado parece indicar que el análisis proteómico del suero mediante técnicas de proteómica (electroforesis bidimensional y espectrometría de masas) es una potente herramienta de investigación dirigida a la identificación de nuevos marcadores biológico, que quizá, en un futuro, puedan aplicarse directamente al diagnóstico clínico, a pesar de todas las limitaciones enumeradas. Sin embargo, y antes de plantearse cualquier aplicación asistencial, deberán completarse al menos 2 aspectos:

a) La realización de estudios más completos que delimiten mejor el grado de certidumbre (e incertidumbre) existente para cada una de las aplicaciones propuestas.

b) La estandarización de la recogida de muestras y de la metodología empleada.

Dada la alta sensibilidad de estos estudios, parece especialmente que pueden ofrecer un papel en el cribado, como complemento de las técnicas de actualmente reconocidas (mamografía en población general, y RMN en mujeres de alto riesgo), especialmente en aquellas situaciones en las que

estas pruebas pierden eficiencia o sencillamente no son validas. Análisis de este tipo se podrían emplear:

- 1) Complemento de la mamografía anual o bianual en las mujeres > 50 años edad, para aumentar la sensibilidad del diagnóstico, de tal manera que en mujeres con mamografía negativa y estudio proteómico positivo, se podría repetir la mamografía en un plazo más cercano o indicar otras pruebas.
- 2) Aplazar la mamografía (bianual o trianual) en mujeres de poco riesgo y con estudios proteicos consecutivamente negativos.
- 3) Mujeres jóvenes (menores de 40 años), mamas densas, que presentan criterios de alto riesgo, como complemento de la RMN y la ecografía.
- 4) Complemento de la RMN y de la mamografía en mujeres de alto riesgo, con mutación conocida o con importante agregación familiar pero sin mutación conocida.

## **7. CONCLUSIONES**

---



- 1) El carcinoma de mama es el cáncer femenino más frecuente en el mundo, y una de las principales causas de muerte en las mujeres con enormes repercusiones sociales, psicológicas, culturales e incluso político-económicas. Es por eso, que abordamos en este trabajo una aportación en el campo del diagnóstico precoz del cáncer de mama.
- 2) Las limitaciones de las pruebas de imagen y los marcadores clásicos hacen surgir la necesidad de otras técnicas, que las complementen y que puedan robustecer el cribado y el diagnóstico precoz. Aquí es donde tiene mucho que aportar el estudio proteómico.
- 3) La proteómica supone abrir las puertas al conocimiento de las proteínas a gran escala, la posibilidad de analizar de una forma exhaustiva y simultánea, cambios en un gran número de proteínas en el contexto de una enfermedad o de distintas condiciones fisiológicas. Es, por tanto, una prometedora herramienta para abrir soluciones a cuestiones difíciles de la investigación clínica.
- 4) Parece confirmarse la existencia de patrones proteicos diferenciales en el suero de pacientes con mínima enfermedad

(por secreción aumentada o disminuida de ciertas proteínas o por diferencias en el grado de proteólisis, glicosilación u otras modificaciones químicas o postraduccionales que sufren las proteínas). Patrones proteicos que por tanto aparecen en muchos casos antes de que la enfermedad manifieste sus primeros síntomas, por lo que se abre una vía interesantísima para llegar a conocer esos patrones y por tanto avanzar en el diagnóstico precoz.

- 5) La sensibilidad y la especificidad del chip proteico seleccionado en esta serie para identificar mujeres con cáncer de mama recién diagnosticadas y sin haber recibido tratamiento previo, frente a mujeres sanas es del 95% y 27% respectivamente.
  
- 6) Probablemente en un futuro, puedan aplicarse estas técnicas directamente al diagnóstico clínico. Sin embargo, y antes de plantearse cualquier aplicación asistencial deberán superar también importantes limitaciones, y deberán completarse al menos 2 aspectos: *a)* la realización de estudios más completos que delimiten mejor el grado de certidumbre (e incertidumbre) existente para cada una de las aplicaciones propuestas, y *b)* la estandarización de la recogida de muestras y de la metodología empleada.

## **8. BIBLIOGRAFIA**

---



- <sup>1</sup> Key TJ, Verkasalo PK, Banks E. Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol.* 2001; 2:133-140.
- <sup>2</sup> Breast Cancer Statistics, 2002. National Cancer Institute. [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov).
- <sup>3</sup> Libro Blanco de la Oncología en España. Federación de Sociedades Españolas de Oncología (FESEO). 2005.
- <sup>4</sup> La situación del cáncer en España. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de salud Carlos III. Ministerio de Sanidad y Consumo 2005.
- <sup>5</sup> Berrino F. et al. Survival on cancer patients in Europe: the EURO CARE-3 study. *Ann Oncol.* 2003; 14 (Suppl 5).
- <sup>6</sup> Moynahan ME, Chiu JW, Koller BH, et al. BRCA1 controls homology-directed DNA repair. *Mol Cell.* 1999; 4:511-18.
- <sup>7</sup> Martín M. Molecular biology of breast cancer. *Clin Transl Oncol.* 2006; 8 (1):7-14.
- <sup>8</sup> Subramaniam D, Isaacs C. Utilizing prognostic and predictive factors in breast cancer. *Curr Treat Options in Oncol.* 2005;6:147-59.
- <sup>9</sup> Colozza M, Cardoso F, Sotiriou C, et al. Bringing Molecular Prognosis and Prediction to the Clinic. *Clinical Breast Cancer.* 2005;6:61-76.
- <sup>10</sup> Pharoah PDP, Day NE, Caldas C. Somatic mutations in the p53 gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 1999;80:1968-73.
- <sup>11</sup> Janicke F, Smith M, Pache L, et al. Urokinase-type plasminogen (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1993 ;24:195-208.
- <sup>12</sup> Keryomarsi K., Tucker SL, Buchholz TA, et al. Cyclin E and survival in patients with breast cancer. *NEngl J Med.* 2003; 347:1566-75.

- <sup>13</sup> Knowlton K, Manzini M, Creason S, et al. Bcl-2 slow a in vitro breast cancer growth despite its antiapoptotic effect. *J Sug Res.* 1998; 76:22-6.
- <sup>14</sup> Yamauchi H, Stearns V, Hayes DF. When is a tumor market ready for prime time? A case study of c-erb-2 as a predictive factor in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2001;19:2334-56.
- <sup>15</sup> Mirza AN, Mirza NQ, Vlastos G, et al. Prognostic factors in node-negative breast cancer: a review of studies with simple size more than 200 and follow up more than 5 years. *Ann Surg.* 2002; 235:10-26.
- <sup>16</sup> Romond EH, Pérez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable her2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2005; 353:1673-84.
- <sup>17</sup> Geyer C., Forster J., Lindquist D. Lapatinib plus Capecitabine for HER2-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2007;356(14):1487.
- <sup>18</sup> Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst.* 1990; 82: 4-6.
- <sup>19</sup> Gasparini G. Prognostic value of vascular endotelial growth factor in breast cancer. *Oncologist.* 2000; 5 Suppl 1: 37-44.
- <sup>20</sup> Millar KD, Wang M, Gralow J. A randomized phase III trial of paclitaxel versus paclitaxel plus bevacizumab as first-line therapy for locally recurrent or metastatic breast cancer. *SABCS Satellite Symposium.* 2005. E2100.
- <sup>21</sup> Ristimaki A, Sivula A, Lundin J, et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res.* 2002; 62:632-5.
- <sup>22</sup> Lastra R, Polo E, Ortega E, et al. Frequency of familiar cancer in a cohort of newly-diagnosed patients with breast cancer. 4th European Conference. Perspectives in Breast Cancer. Póster nº 8 Madrid 22-25 September 2004.

- <sup>23</sup> Reichman ME, Judd JT, Long COPE C, et al. Effects of alcohol consumption on plasma and urinary hormona concentrations in premenopausal women. *J. Natl Cancer Inst.* 1993; 85:722-27.
- <sup>24</sup> Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: Collaborative reanalysis of individual data on 53.297 women with breast cancer and 100.239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet.* 1996; 347: 1713-27.
- <sup>25</sup> Kvale G, Heuch I. Menstrual factors and breast cancer risk. *Cancer.*1988; 62:1625-31.
- <sup>26</sup> Kvale G. Reproductive factors in breast cancer epidemiology. *Acta Oncol.* 1992;31:187-94.
- <sup>27</sup> UICC. TNM Classification of Malignant Tumours. 2002.
- <sup>28</sup> Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, et al. Meeting highlights:international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol.* 2005; 16: 1569-8.
- <sup>29</sup> Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, et al. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast conserving surgery wish radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med.* 2002; 347: 1227-32.
- <sup>30</sup> Fisher B, Anderson S, Bryant J, et al. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med.* 2002; 347: 1233-41.
- <sup>31</sup> Lyman GH, Giuliano AE, Somerfield MR et al. American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005 Oct 20;23 (30):7703-20.

- <sup>32</sup> Sadetzki S, Oberman B, Zipple D, et al. Breast conservation after neoadjuvant chemotherapy. *Ann Surg Oncol*. 2005; 12: 480-7.
- <sup>33</sup> Recht A, Edge SB, Solin LJ, et al. Postmastectomy radiotherapy: Clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1539-69.
- <sup>34</sup> Howell A, Cuzick J, Baum M, et al. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet*. 2005; 365: 60-2.
- <sup>35</sup> Coombes RC, Hall E, Gibson LJ, et al. A randomised trial of exemestane after two or three years of tamoxifen therapy in postmenopausal women with primary breast cancer. *N Engl J Med*. 2004; 350: 1081-92.
- <sup>36</sup> Goss PE, Ingle JN, Martino S, et al. A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer. *N Engl J Med*. 2003; 349: 1793-802.
- <sup>37</sup> Dellapasqua S, Colleoni M, Gelber RD, et al. Adjuvant endocrine therapy for premenopausal women with early breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 1736-50.
- <sup>38</sup> Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005; 353: 1673-84.
- <sup>39</sup> Piccart-Gebhart M, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005; 353: 1659-72.
- <sup>40</sup> Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence

and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005; 365: 1687-717.

<sup>41</sup> Mauri D, Pavlidis N, Ioannidis JP. Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2005; 97: 188-94.

<sup>42</sup> Smith IC, Heys SC, Hutcheon AV, et al. Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: significantly enhanced response with docetaxel. *J Clin Oncol*. 2002; 20: 1456-66.

<sup>43</sup> B-27: Bear HD, Anderson S, Smith RE, et al. A randomized trial comparing preoperative (preop) doxorubicin/cyclophosphamide (AC) to preop AC followed by preop docetaxel (T) and to preop AC followed by postoperative (postop) T in patients (pts) with operable carcinoma of the breast: results of NSABP B-27. *Breast Cancer Res Treat*. 2004; 88 (abstr 26).

<sup>44</sup> Buzdar AU, Ibrahim NK, Francis D. Significant higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2 positive operable breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 3676-85.

<sup>45</sup> Prowell TM, Davidson NE. What is the role of ovarian ablation in the management of primary and metastatic breast cancer today?. *The Oncologist*. 2004; 9: 507-17.

<sup>46</sup> Osborne CK. A double blind randomised trial comparing the efficacy and tolerability of faslodex (fulvestrant) with arimidex in postmenopausal women with advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2000; 64: 27.

- <sup>47</sup> Jones SE, Erban J, Overmoyer B, et al. Randomized phase III study of docetaxel compared with paclitaxel in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 5542-51.
- <sup>48</sup> Biganzoli L, Cufer T, Bruning P, et al. Doxorubicin and paclitaxel versus doxorubicin and cyclophosphamide as first-line chemotherapy in metastatic breast cancer: the European Organization for Research and Treatment of Cancer 10961 Multicenter Phase III Trial. *J Clin Oncol.* 2002; 20: 3114-21.
- <sup>49</sup> Batista N, Perez-Manga G, Constenla M, et al. Phase II study of capecitabine in combination with paclitaxel in patients with anthracycline-pretreated advanced/metastatic breast cancer. *Br J Cancer.* 2004; 90: 1740-6.
- <sup>50</sup> Brandi M, Vici P, Lopez M, et al. Novel association with gemcitabine and docetaxel as salvage chemotherapy in metastatic breast cancer previously treated with anthracyclines: results of a multicenter phase II study. *Semin Oncol.* 2004; 31: 13-9.
- <sup>51</sup> Spano JP, Bouillet T, Boaziz C, et al. Phase II study of paclitaxel combined with vinorelbine in patients with advanced breast cancer. *Am J Clin Oncol.* 2004; 27: 317-21.
- <sup>52</sup> Robert N, Leyland-Jones B et al. Randomized phase III study of trastuzumab, paclitaxel, and carboplatin compared with trastuzumab and paclitaxel in women with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2006;24(18):2786-92.
- <sup>53</sup> Millar KD, Wang M, Gralow J. et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2007; 357:2666-26776.

<sup>54</sup> Marty M, Coggnetti F, Maraninchi D, et al. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2 positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 Study Group. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 4265-74.

<sup>55</sup> Daubiné F, Le Gall C, Gasser J et al. Antitumor effects of clinical dosing regimens of bisphosphonates in experimental breast cancer bone metastasis. *J Natl Cancer Inst.* 2007; 99(4):322-30.

<sup>56</sup> ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up of primary breast cancer. *Ann of Oncol.* 16 2005; (Supplement 1): 17–19.

<sup>57</sup> NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Breast Cancer. V.2. 2007.

<sup>58</sup> Prosnitz L, Dirk J, Giner E. En Rubin P: *Oncología Clínica*, octava edición. Elsevier Science. 2002.

<sup>59</sup> Naviero JC, Peral A, Flores L, Burón JL. Cáncer de mama diagnosticado mediante un programa de detección precoz. ¿Difiere del diagnosticado en el marco asistencial habitual? *Med Clin.* 2007; 128(1):18-20.

<sup>60</sup> Asua J. Mamografía y detección precoz del cáncer de mama. *Rev Esp Salud Pública* 2005; 79:517-520.

<sup>61</sup> Bassett LW. Imaging of breast masses. *Radiol Clin of North Am.* 2000; 38: 669-91.

<sup>62</sup> The ACR Breast Imaging reporting and data system (BIRADS), 4th ed. American College of Radiology ([www.acr.org](http://www.acr.org)). 2003.

- <sup>63</sup> Kneeshaw PJ, Turnbull LW, Drew PJ. Current applications and future directions of MR mammography. *Br J Cancer*. 2003; 88: 4-10.
- <sup>64</sup> Saslow D, Boetes C, Burke W, et al. American cancer society guidelines for breast screening with MRI as an adjunct to mammography. *CA Cancer J Clin*. 2007;57: 75-89.
- <sup>65</sup> Thibault F, Nos C, Meunier M, et al. MRI for surgical planning in patients with breast cancer who undergo preoperative chemotherapy. *AJR Am J Roentgenol*. 2004 Oct;183 (4):1159-68.
- <sup>66</sup> Lehman CD, Gatsonis C, Kuhl CK, et al. MRI evaluation of the contralateral breast in women with recently diagnosed breast cancer. *N Eng J Med*. 2007; 29; 356 (13): 1362-4.
- <sup>67</sup> Gordon PB, Goldenberg SL. Malignant breast masses detected only by ultrasound. A retrospective review. *Cancer*. 1995; 76: 626-30.
- <sup>68</sup> Baker JA, Soo MS. The evolving role of sonography in evaluating solid breast masses. *Sem Ultrasound CT MR*. 2000; 2: 286-96.
- <sup>69</sup> European Group for Tumor Markers (EGTM). Consensus recommendations. *Anticancer Res*. 1999; 19: 2785-2820.
- <sup>70</sup> Nakamura T, Kimura T, Umehara Y, et al. Periodic measurement of serum CEA and Ca15.3 levels as postoperative surveillance after breast cancer surgery. *Surg Today*. 2005;35:19-21.
- <sup>71</sup> Ebeling FG, Stieber P, Untch M, et al. Serum CEA and Ca 15.3 as prognosis in primary breast cancer. *Br J Cancer*. 2002; 86: 1217-22.
- <sup>72</sup> Gion M, Daidone MG. Circulating biomarkers from tumour bulk to tumour machinery: promises and pitfalls. *Eur J Cancer*. 2004; 40: 2613-2622.

- <sup>73</sup> Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409: 860-914.
- <sup>74</sup> Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome *Science*. 2001; 291: 1304-48.
- <sup>75</sup> Taramelli R, Acquati F. The human genome project and the discovery of generic determinants of cancer susceptibility. *Eur J Cancer*. 2004; 40: 2537-2543.
- <sup>76</sup> Ponder B. Cancer genetics. *Nature*. 2001; 411:336-341.
- <sup>77</sup> Workman P. The impact of genomic and proteomic technologies on the development of new cancer drugs. *Annals of Oncology*. Educational book of the 27<sup>th</sup> ESMO congress. 2002.
- <sup>78</sup> Jensen O. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol*. 2004; 8 (1): 33-41.
- <sup>79</sup> Emanuel F, Petricoin III, Vereda E, Bichsel, Valerie S, Calvert. Mapping molecular networks using proteomics: A vision for patient-tailored combination therapy. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 3614-3621.
- <sup>80</sup> Monteoliva L, Albar JP. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*. 2004 Nov; 3(3): 220-39.
- <sup>81</sup> Zerkowski HR, Grussenmeyer T, Matt P, et al. Proteomics strategies in cardiovascular research. *Proteome Res*. 2004;3: 200-8.
- <sup>82</sup> Donners MM, Verluyten MJ, Bouwman FG. Proteomic analysis of differential protein expression in human atherosclerotic plaque progression, *J Pathol*. 2005;206: 39-45.

- <sup>83</sup> Castaño EM, Roher AE, Esh CL, et al. Comparative proteomics of cerebrospinal fluid in neuropathologically-confirmed Alzheimer's disease and non-demented elderly subjects. *Neurol Res.* 2006;2:155-63.
- <sup>84</sup> Pierson J, Norris JL, Aerni HR, et al. Molecular profiling of experimental Parkinson's disease. Direct analysis of peptides and proteins on brain tissue sections by MALDI mass spectrometry. *J Proteome Res.* 2004;3:289-95.
- <sup>85</sup> Petricoin EE, Paweletz CP, Liotta LA. Clinical applications of proteomics: proteomic patterns diagnostics. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2002; 7 (4): 433-40.
- <sup>86</sup> Ciordia S, de los Ríos V, Albar JP. Contributions of advanced proteomics technologies to cancer diagnosis. *Clin Transl Oncol.* 2006;8(8):566-80
- <sup>87</sup> Wulfkuhle J, Espina V, Lione L. Genomic and proteomic technologies for individualisation and improvement of cancer treatment. *Eur J Cancer.* 2004; 40: 2623-2632.
- <sup>88</sup> Fey MF. Genomics and proteomics: expression arrays in clinical oncology. *Ann of Oncol.* 2004; 15: iv163-iv165.
- <sup>89</sup> Karas M, Hillenkamp F. Matrix Assisted Laser Desorption Ionization. *Anal Chem.* 1988; 60: 2299.
- <sup>90</sup> Abersold R, Mann M: Mass spectrometry-based proteomics. *Nature.* 2003; 422: 198-207.
- <sup>91</sup> Lotze et al. Serum, Plasma and tumor proteomics. State of the art. *J Immunother.* 2004. 28: 89-99.
- <sup>92</sup> Righetti PG, Castagna A, Antonucci F, et al. The proteome: Anno Domini 2002. *Clin Chem Lab Med.* 2002; 41: 425-438.

- <sup>93</sup> Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, Wang YY, Chan DW. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin Chem*. 2002. 48 (8):1296-304.
- <sup>94</sup> García-Foncillas J, Bandrés E, Zárata R, Ramirez N. Proteomic análisis in cancer research: potencial application in clinical use. *Clin Transl Oncol*. 2006;8(4):250-61.
- <sup>95</sup> Agarwal R, Kaye SB. Prognosis factors in ovarian cancer: how close are we to a complete picture? *Ann Oncol*. 2004; 16:4-6.
- <sup>96</sup> Petricom EF III, Ardekani AM, Hitt BA, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet*. 2002; 359: 572-7.
- <sup>97</sup> Rapkiewicz AV, Espina V, Petricoin EF. Biomarkers of ovarian tumours. *Eur J Cancer*. 2004; 40: 2604-2612.
- <sup>98</sup> Zhang Z et al. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res*. 2004, 64: 5882-90.
- <sup>99</sup> Ahmed N et al. Proteomic-based identification of haptoglobin-1 precursor as a novel circulating biomarker of ovarian cancer. *British J of Cancer*. 2004; 91: 129-40.
- <sup>100</sup> Kozak KR, Su E, Whitelegge JP, et al. Characterization of serum biomarkers for detection of early stage ovarian cancer. *Proteomics*. 2005;5:4589-96.
- <sup>101</sup> Stewart JJ, White JT, Yan X, et al. Proteins associated with Cisplatin resistance in ovarian cancer cells identified by quantitative proteomic technology and integrated with mRNA expression levels. *Mol Cell Proteomics*. 2006;5 (3):433-43.

- <sup>102</sup> Brawer MK. Prostate –specific antigen: current status. CA Cancer J Clin. 1999; 49: 264-281.
- <sup>103</sup> Zheng Y, Xu Y, Ye B, et al. Prostate carcinoma tissue proteomics for biomarker discovery. Cancer. 2004; 98: 2576-2582.
- <sup>104</sup> Petricoin EF, 3<sup>rd</sup>, Ornstein DK, Paweletz CP, et al. Serum proteomic patterns for detection of prostate cancer. J Natl Cancer Inst. 2002; 94: 1576-1578.
- <sup>105</sup> Adam B, Qu Y, Davis JW, et al. Serum protein fingerprinting coupled with a pattern matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. Cancer Res. 2002;.62:3609-14.
- <sup>106</sup> Bañez L, Prasanna P, Sun L, et al. Diagnostic potential of serum proteomic patterns in prostate cancer. J Urol. 2003;170: 442-6.
- <sup>107</sup> Li J, White N. Zhang Z, et al. Detecticn of prostate cancer using serum proteomics pattern in s hislologically confirmed population. J Urol. 2004; 171:1782-7.
- <sup>108</sup> Maliki G, Ward MD, Gupta SK, et al. *Serum levels* of an Isoform of Apolipo-protein A-II as a Potential Marker for prostate cancer. Clin Cancer Res. 2005;11:1073-85.
- <sup>109</sup> Le L, Chi K, Tyldesley S, et al. Identification of Serum Amyloid A as a Biomarker to Distinguish Prostate Cancer Patients with Bone Lesions. Clin Chem. 2005;51(4):695-707.
- <sup>110</sup> Engwegen JY, Helgason HH, Cats A, et al. Identification of serum proteins discriminating colorectal cáncer patients and healthy controls using surface enhanced laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS). World J Gastroenterol. 2006;12:1536-44. 94.

- <sup>111</sup> Ward DG, Suggett N, Cheng Y, et al. Identification of serum biomarkers for colon cancer by proteomic analysis. *Br J Cáncer*. 2006;94(12):1898-905.
- <sup>112</sup> Lane CS, Nisar S, Griffiths WJ, et al. Identification of cytochrome p450 enzymes in human colorectal metastases and the surrounding liver : a proteomic approach. *Eur J Cancer*. 2004, 40, 2127-2134.
- <sup>113</sup> Goggins M. Molecular markers of early pancreatic cancer. *J Clin Oncol*. 2005; 23:4534-4531.
- <sup>114</sup> Rosty C, Christa L, Kuzdzal S et al. Identification of hepatocarcinoma-intestine-páncreas/pancreatic-associated-protein I as a biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma by protein biochip technology. *Cancer Res*. 2002; 62: 1868-1875.
- <sup>115</sup> Koopmanp J Zrrang Z, Wtiite N, et al. Serum diagnosis of pancreatic adenocarcinoma using SELDI-MS. *Clin Cancer Res*. 2004; 10:860-8.
- <sup>116</sup> Poon TCW. Yip TT, Chan ATC, et al. Comprehensive proteomic profiling identifies serum proteomic signatures for detection of hepatocelular carcinoma and its subtypes. *Clin Cliem*. 2003;49:752-60.
- <sup>117</sup> Hirano T, Ohira T, Suga Y, et al. Quantitative proteomic exploration of biomarkers for early detection of adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer*. 2005; 49 (2): S179.
- <sup>118</sup> Lam K, Mok T, Poon T, Chan A. Identification of predicative serum markers for chemotherapy response in non-small cell lung cancer by quantitative proteomics. *Lung Cancer*. 2005; 49 (2): S71.
- <sup>119</sup> Murphy L, Clynes M, Keenan J. Proteomic analysis to dissect mitoxantrone resistance-associate proteins in a squamous lung carcinoma. *Anticancer Res*. 2007;27(3A):1277-84.

- <sup>120</sup> Fumiko T, Solomon B, Gregorc V et al. Mass spectrometry to classify NSCLC patients for clinical outcome after treatment with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: a multicohort cross-institutional study. *J Natl Cancer Inst.* 2007; 99:838-46.
- <sup>121</sup> Rao RD, James CD. Altered molecular pathways in gliomas: an overview of clinically relevant issues. *Semin Oncol.* 2004. 31: 595-604.
- <sup>122</sup> Villanueva J, Philip J, Entenberg D, et al. Serum peptide profiling by magnetic particle-assisted, automated sample processing and MALDI TDF mass spectrometry. *Anal Chem.* 2004; 76:1560-70.
- <sup>123</sup> Mian S, Ugurel S, Parkinson E, et al. Serum proteomics fingerprinting discriminates between clinical stages and predicts disease progression in melanoma patients. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 5088-5093.
- <sup>124</sup> Wong YF, Cheung TH, Lo KWK, et al. Protein profiling of cervical cancer by protein-biochips: proteomic scoring to discriminate cervical cancer from normal cervix. *Cancer Letter.* 2004;211:227-34.
- <sup>125</sup> Unwin RD, Craven RA, Harnden P, et al. Proteomic changes in renal cancer. *Proteomics.* 2003;3:1620-32.
- <sup>126</sup> Bueso-Ramos C, Xu Y, Timothy J, et al. Protein expression of a triad of frequently methylated genes, p73, p57 y p15, has prognostic value in adult acute lymphocytic leukemia independently of its methylation status. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 3932-3939.
- <sup>127</sup> Vlahou A, Laronga C, Wilson L, et al. A novel approach toward development of a rapid blood test for breast cancer. *Clin Breast Cancer.* 2003; 4 (3):203-9.

- <sup>128</sup> Li J, Orlandi R, White CN, et al. Independent validation of candidate breast cancer serum biomarkers identified by mass spectrometry. *Clin Chem.* 2005;51:2229-35.
- <sup>129</sup> Rui Z, Jian-Guo J, Yuang-Peng T, et al. Use of serological proteomic methods to find biomarkers associated with breast cancer. *Proteomics.* 2003; 433-439.
- <sup>130</sup> VeenstraTD, Prieto DA, Conrads TR. Proteomic patterns for early cancer detection. *Drug Discov Today.* 2004 Ort 15;9 (20):889-97.
- <sup>131</sup> Heike Y, Hosokawa M, Osumi S. et al. Identification of serum proteins related to adverse effects induced by docetaxel infusion from protein expression profiles of serum using SELDI Protein Chip system. *Anticancer Res.* 2005;25:1197-203.
- <sup>132</sup> Sauter ER, Shan S, Hewett JE, et al. Proteomic analysis of nipple aspirate fluid using SELDI-TOF-MS. *Int J Cáncer.* 2005; 114:791-6.
- <sup>133</sup> Li J, et al. Identification of biomarkers for breast cancer in nipple aspiration and ductal lavage fluid. *Clin Cancer Res.* 2005; 11:8312-20.
- <sup>134</sup> Traub F, Feist H, Kreipe HH, Pich A. SELDI-MS-based expression profiling of ductal invasive and lobular invasive human breast carcinomas. *Pathol Res Pract.* 2005;201. 763-70.
- <sup>135</sup> Nakagawa T, Huang SK, Martinez SR. Proteomic profiling of primary breast cancer predicts axillary lymph node metastasis. *Cancer Res.* 2006;66 (24):11825-30.
- <sup>136</sup> Zapico E, Mora J, Blanco F. Diagnóstico precoz del cáncer mediante análisis proteómicos del suero: ¿ficción o realidad? *Med Clin.* 2005;124 (5):181-5.

- <sup>137</sup> Hudelist G, Singer CF, Pischinger KI, et al. Proteomic analysis in human breast cancer : identification of a characteristic protein expression profile of malignant breast epithelium. *Proteomics*. 2006;6(6):1989-2002.
- <sup>138</sup> Boyle P, Ferlay J. Cancer-incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol*. 2005;16: 481-8.
- <sup>139</sup> Naviero JC, Peral A, Flores L, Burón JL. Cáncer de mama diagnosticado mediante un programa de detección precoz. ¿Difiere del diagnosticado en el marco asistencial habitual? *Med Clin*. 2007; 128(1):18-20.
- <sup>140</sup> Asua J. Mamografía y detección precoz del cáncer de mama. *Rev Esp Salud Pública*. 2005;79:517-520.
- <sup>141</sup> Kerlikowske K. Effect of age, breast density and family history on the sensitivity of first screen mammography. *JAMA*. 1996; 276: 33.
- <sup>142</sup> Liberman L, Abramson AF., Squires FB. Est al. The breast imaging reporting and data system: positive predictive value of mammographic features and final assessment categories. *Am J Roentgenol*. 1998; 171:35.
- <sup>143</sup> Byrne C, Smart CR, Chu CK, eta l. Survival advantage differences by age. Evaluation of the extended follow up of Breast Cancer Detection Demonstration Project. *Cancer*. 1994; 74:301-310.
- <sup>144</sup> Morrison AS, Brisson J, Khalid N. Breast cancer incidence and mortality in the Breast Cancer Detection Demonstration Project. *J Natl Cancer Inst*. 1988;80:1540-1547.
- <sup>145</sup> White E, Miglioretti D, Yankaskas B et al. Annual mamography versus bianual mamograohy. *J Natl Cancer Inst*. 2004; 15:96(24): 1832-9.

<sup>146</sup> Kriege M, Brekelmans CT, Boetes C, et al. Efficacy of MRI and mammography for breast cancer screening in women with a familial or genetic predisposition. *N Eng Med.* 2004; 351:427-437.

<sup>147</sup> Warner E, Plewe DB, Hill KA, et al. Surveillance of BRCA1 and BRCA2 mutation carriers with MRI, ultrasound, mammography, and clinical breast examination. *JAMA.* 2004; 292:1317-1325.

<sup>148</sup> Smith RA, Saslow D, Sawyer KA, et al. American Cancer Society guidelines for breast cancer screening: update 2003. *CA Cancer J Clin.* 2003; 53:141-169.

<sup>149</sup> Bluemke D, Gatsonis CA, Chen MH. MRI previous breast cancer biopsy. *JAMA.* 2004;292:1779-2780.

<sup>150</sup> Monasterio A, Lastra R, Torres N, et al. Aplicación de un protein-chip de detección de 7 biomarcadores séricos en diagnóstico en cáncer de mama. *SEOM.* 2007; comunicación oral nº 0-60.