



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**  
División de Estudios de Posgrado e Investigación

**INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA**

**Asociación del polimorfismo de Her2Neu (Ile655Val) con las  
características clínicas, respuesta y sensibilidad al tratamiento  
neoadyuvante del cáncer de mama localmente avanzado**

**TESIS DE POSGRADO**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:

**ONCOLOGÍA MÉDICA**

**P R E S E N T A :**

**ALMA MAGDALENA ASTORGA RAMOS**

**TUTORES:**

**DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO  
DRA. CLAUDIA HAYDEÉ ARCE SALINAS**



INSTITUTO NACIONAL  
DE CANCEROLOGÍA

México, D.F., Agosto de 2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

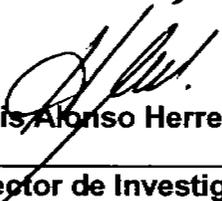
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# Instituto Nacional de Cancerología

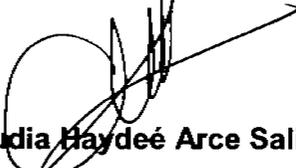
*"Asociación del polimorfismo de Her2Neu lle655Val con las características clínicas, respuesta y sensibilidad al tratamiento neoadyuvante del cáncer de mama localmente avanzado"*

  
Dra. Alma Magdalena Astorga Ramos

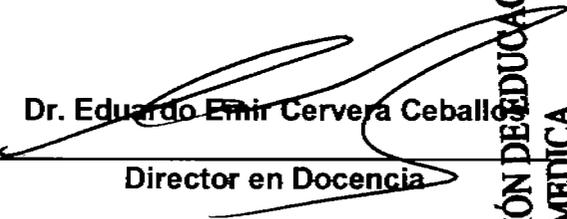
Residente de Oncología Médica

  
Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo

Subdirector de Investigación Básica

  
Dra. Claudia Haydeé Arce Salinas

Médico Adscrito Servicio de Tumores Mamarios

  
Dr. Eduardo Emir Cervera Ceballos

Director en Docencia

SUBDIRECCIÓN DE EDUCACIÓN  
MÉDICA

26 AGO 2008



INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA  
Av. San Fernando No. 22 C.P. 14080  
México D.F.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Carcinogénesis de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto de Investigaciones Biomédicas y el Instituto Nacional de Cancerología bajo la Tutela del Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo y la Dra. Claudia Haydeé Arce Salinas.

Además del apoyo en laboratorio de así como de la M. C. Clementina Castro Hernández y el Biólogo Miguel Santibáñez Andrade.

"El individuo ha luchado siempre para no ser absorbido por la tribu. Si lo intentas, a menudo estarás solo, y a veces asustado. Pero ningún precio es demasiado alto por el privilegio de ser uno mismo."

1844-1900. Friedrich Wilhelm Nietzsche. Filósofo alemán.

# INDICE

**Dedicatoria** 6



**Resumen** 9



**Justificación** 32

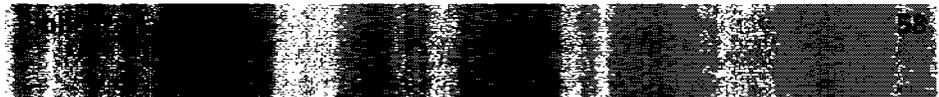


**Hipótesis** 34



**Discusión** 53

**Conclusiones** 57



## *Dedicatoria*

*Este trabajo va dirigido al apoyo incondicional de mi familia desde que decidí acudir a esta institución a realizar mis estudios de subespecialización, nunca hubiera sido posible sin su ayuda; hacer el esfuerzo de concluir un trayecto más de mi paso por el aprendizaje de una de las partes más importantes de mi desarrollo personal.*

### *A mis padres:*

*Sr. Roberto Astorga Quiñones y María P. Ramos López por siempre estar ahí...*

*A mis hermanos, por poner el ejemplo de superación y trabajo*

- Luz del Carmen Astorga Ramos*
- José Ramón Astorga Ramos*
- Antolín Astorga Ramos*
- Eleazar Astorga Ramos*
- José Guadalupe Astorga Ramos*

*A mis amigos de siempre y actuales por ayudarme cuando los he necesitado y estar ahí: Violeta, Mirna Salas Estrada.*

## **Agradecimientos:**

Con un profundo agradecimiento a todas las personas que siempre han creído en mí, en el esfuerzo del día a día y que me han apoyado en tiempos de alegría y satisfacción personal.

En especial a mis tutores por el apoyo, tolerancia y paciencia, Dra. Claudia Arce Salinas y Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo a quienes admiro.

A mis profesores que han servido como base y ejemplo a seguir en esta difícil tarea: Dr. Juan Zinser Sierra, Dr. Jorge Martínez Cedillo, Dr. Oscar Gerardo Arrieta Rodríguez, Dr. Germán Calderillo, Dra. Claudia Arce Salinas, Dr. José Luis Aguilar, Dra. Claudia Cano, Dra. Dolores Gallardo, Dr. Noel Castañeda, Dr. Alberto Alvarado, Dr. Fernando Lara Medina, Dra. Morales, Dra. Lucely Cetina.

A mis amigos y compañeros: Pedro Figueroa, Liliana Sámano, Alejandro Crismatt, Dámaris Sánchez, Emilio Murillo, Consuelo Díaz, Migdania Madrigal, Javier Aguirre, Marsela Vallejo, Artfy Bandera, Enrique Vaca, Rubén Martínez, Marcelino Morales, Miguel Ángel Álvarez y Marsela Ramírez. Y a los que ya no están aquí: Felipe Sánchez, Carlos Hernández, Jesica Reyes y Daniel Mendoza, gracias por su apoyo.

Muchas gracias a M.C Clementina Castro Hernández por ser una de las personas más importantes para que se realizara este trabajo y el Biólogo Miguel Santibáñez Andrade por su apoyo y trabajo. Además a Patricia Santaella y Julieta Santamaría.

## **Dedicatoria especial**

Una dedicatoria especial a todos mis compañeros del Laboratorio de Carcinogénesis del tercer piso, por hacerme parte de su aprendizaje y de su trabajo, que siempre me orientaron, apoyaron, brindaron ayuda en la realización de todo el trabajo experimental: Didier Prada, Julia Mendoza, Roxanna Pérez, Julieta Domínguez, Miguel Santibáñez, Alejandro López, Rodrigo González-Barrios, Delina Montes, José Luis Mosqueda, Alejandro Avilés, Marco Andonegui, Eunice Fabián, Alfredo Rodríguez.

*"Los grandes espíritus siempre han encontrado una violenta oposición de parte de mentes mediocres."*

## Resumen

**Introducción:** El cáncer de mama es una de las neoplasias más frecuentes a nivel mundial, en la cual están implicadas varias modalidades de tratamientos que tratan de controlar la enfermedad y disminuir la recaída. Hay diversos factores predictivos y pronósticos que nos ayudan a determinar la supervivencia de la enfermedad, en el caso de las pacientes con cáncer de mama localmente avanzado (CMLA) se están buscando factores que nos ayuden a predecir la respuesta al tratamiento y la posible toxicidad de los mismos. En México se desconocía la frecuencia del polimorfismo de Her2Neu lle 655 Val el cual se ha mencionado en estudios de poblaciones a nivel mundial que su presencia se asocia con mayor riesgo para padecer cáncer de mama y de ovario en pacientes con antecedentes heredofamiliares y una posible asociación al desarrollo de toxicidad cardíaca en pacientes tratadas con trastuzumab. La frecuencia del polimorfismo en caucásicos puede ser de hasta de 29-34% (alemanas y británicas) en Hong Kong y Shanghai de 21 a 23% y en africanas puede estar ausente. Es por este motivo que se decidió llevar este estudio clínico, prospectivo en la población mexicana de pacientes de cáncer de mama localmente avanzado en el Instituto Nacional de Cancerología.

**Material y métodos:** Mujeres con cáncer de mama localmente avanzado, que se reclutaron desde Diciembre del 2005 hasta el 31 de Marzo del 2008. Sin antecedente de toxicidad cardíaca previa, que fueron tratadas con quimioterapia citotóxica a base de 5-Fluracilo, adriamicina y ciclofosfamida (500/50/500mgs/m<sup>2</sup>) (4 ciclos) y posteriormente secuencial paclitaxel a 80mg/m<sup>2</sup> 12 semanas (4 ciclos) y en pacientes con sobreexpresión de Her2Neu trastuzumab a dosis de carga de 4/mg/kg y posteriormente 2 mg/m<sup>2</sup> durante el tratamiento neoadyuvante. La toxicidad cardíaca fue evaluada antes del inicio de la quimioterapia, al término del paclitaxel y posteriormente cada 3 meses y posteriormente completar seguimiento posterior a cirugía, radioterapia o terapia hormonal. En este reporte solo se incluyen las pacientes que han sido evaluadas hasta el término del tratamiento neoadyuvante.

**Resultados:** La presencia del polimorfismo lle655Val en los controles de nuestra población fue de 20.56% y 25.4% para las pacientes con cáncer de mama localmente avanzado. La frecuencia de Val/Val fue de 0%. La frecuencia del alelo val en los controles 0.102 y del alelo lle 0.897, en las pacientes con cáncer de mama de 0.994. El análisis de los pacientes se encontró que la

mayoría eran tumores mayores de 5 cms, en 86.5%, alto grado fue de 49.2%, permeación vascular en 61.5%, la expresión de Her2Neu 53% vs 46.4% las que no presentaron, esto no presentó asociación estadísticamente significativa. En cuanto al posible desarrollo de toxicidad cardiaca por la existencia del polimorfismo no se demostró que la toxicidad presentada en este estudio 27.1%(31 casos) tuviera relación con el polimorfismo y tampoco fue clínicamente significativa ya que era grado 1.

Se deberá aumentar el tamaño de muestra ya que algunas asociaciones como la posible respuesta y la toxicidad pudieran no ser significativas solo por el número de casos y no porque no se encuentra una verdadera asociación.

## Introducción

### *Generalidades de cáncer de mama*

El cáncer de mama es una neoplasia considerada un problema de salud mundial, afecta la calidad de vida, puede producir discapacidad, además de disminuir la supervivencia de las pacientes afectadas. Ha sido considerado como la primera causa de muerte en mujeres a nivel mundial; la incidencia aumenta cada año, dependiendo de la zona socioeconómica afectada, afecta principalmente a los países desarrollados<sup>1</sup>. Aunque, en los países en vías de desarrollo ha aumentado la incidencia en los últimos 30 años. En el mundo, más de 1 millón de nuevos casos son diagnosticados cada año<sup>1,3</sup>.

En Estados Unidos, la incidencia de esta neoplasia es de 101/100 mil habitantes, en Europa occidental su incidencia es de 85/100 mil habitantes en las regiones con menor desarrollo económico como en Asia es de 21/100 mil habitantes y en África es de 23/100 mil habitantes; esto puede explicarse por la presencia de factores, genéticos o ambientales, en las diferentes zonas geográficas<sup>2</sup>.

En México, según el registro histopatológico de neoplasias 2003 (RHP 2003) la incidencia de cáncer de mama invasor fue de 12,488 casos y 519 son de cáncer in situ, la mortalidad en ese mismo año fue de 3,889 casos<sup>4</sup>. Durante el 2006, en el Instituto Nacional de Cancerología se diagnosticaron 635 casos de cáncer de mama y 70% de estos correspondían a etapas clínicas localmente avanzadas, 5% de los casos presentaban enfermedad metastásica desde el momento del diagnóstico<sup>4</sup>.

### ***Características y factores de riesgo***

La incidencia del cáncer de mama aumenta en forma progresiva con la edad y durante la vida reproductiva de la mujer; se ha reportado que el riesgo de desarrollar cáncer de mama en países Europeos y en Norteamérica es de aproximadamente 2.7% a los 55 años, entre un 5% más a los 65 años e incrementa a 7.7% a los 75 años de edad.<sup>5</sup> Los factores de riesgo conocidos hasta el momento para el desarrollo de cáncer de mama son los siguientes: menarca temprana, menopausia tardía, la situación geográfica, la historia familiar, la ingesta de alcohol, uso de hormonales orales y terapia hormonal de reemplazo.

La clasificación de cáncer de mama comprende 4 grandes grupos, *cáncer in situ*, *cáncer local*, *cáncer localmente avanzado* y *enfermedad metastásica*.<sup>6</sup> El estadio clínico del tumor se hace por medio del sistema TNM (Tumor, Nodes and Metastases) el sistema de clasificación del American Joint Committee on Cancer y la Union Internacional Contre le Cancer (del inglés AJCC/UICC)<sup>6</sup>

La relación entre supervivencia y tamaño tumoral es lineal como se puede observar en la tabla 1, asimismo, el pronóstico guarda relación directa con el número de ganglios afectados y la extensión extracapsular; agrupándose con el número de ganglios afectados si es de 1-3, 4-9 y más de 10 ganglios<sup>6</sup>.

A pesar de tener ganglios negativos, tienen un porcentaje de recaída elevado, aproximadamente del 30%, motivo el que es importante identificar a las personas que están

en riesgo, en este caso; el tamaño tumoral representa el factor pronóstico más importante (tabla 1).

Tabla 1. Supervivencia a 5 años en relación con el tamaño del tumor para las pacientes con ganglios negativos

Tamaño tumoral (cms)	Número de pacientes	Supervivencia a 5 años (%)
1-2	2,014	79
2-3	1,162	77
3-4	536	72
4-5	276	74
5-6	134	72
>6	144	57

**Edad:** El cáncer de mama es raro en la mujer joven, es una enfermedad más frecuente en las mujeres mayores de 50 años, ya que hasta el 75% de los casos se presentan en este grupo de pacientes, solo el 6.5% de las pacientes se presenta en edad menor a 40 años y el 0.6% de las pacientes tienen una edad  $\leq 30$  años. En Estados Unidos cada años hay aproximadamente 1,200 casos de cáncer de mama en mujeres menores de 30 años. Generalmente, el cáncer de mama en la mujer joven es más agresivo ya que es difícil de diagnosticar, los motivos son múltiples, el primero es que puede confundirse con patologías benignas, el segundo es porque los métodos diagnósticos, específicamente la mastografía disminuye su sensibilidad con la densidad mamaria, lo que favorece diagnóstico tardío. En edades tempranas se asocia al factor hereditario, el cual ocurre solo en el 5 a 10% de todos los cánceres de mama. Se considera que las mujeres menores de 35 años de edad, tienen peor pronóstico por la presencia de tumores de mayor tamaño, más agresivos.

**Estado menopáusico:** Las mujeres postmenopáusicas tienen mayor riesgo de cáncer de mama que las mujeres en estado premenopáusico. Las mujeres con estado perimenopáusico tendrán un riesgo intermedio para desarrollar cáncer de mama. Esto se ha demostrado en varios estudios, donde la presencia de niveles altos de estrógenos en sangre en mujeres postmenopáusicas es un factor importante para el desarrollo de la carcinogénesis, sobre todo en las pacientes con obesidad por la producción de estrógenos por actividad de la aromatasas en el tejido adiposo. Por lo tanto, la exposición prolongada a los estrógenos durante la vida de la mujer, es un importante factor de riesgo para el desarrollo de esta neoplasia. El mecanismo de la carcinogénesis en el tejido mamario causado por la exposición.

**Histología:** Hay diferentes subtipos histopatológicos, el más frecuente es el ductal presente en 50-80% de todos los cánceres, seguido por el tipo lobulillar en 5-15%, el tipo mixto (lobulillar y ductal) presente en 4-5% de los casos, en estos últimos han reportado la supervivencia global a 10 años de 35-50%, otros tipos histológicos menos frecuentes son el tipo tubular, mucinoso y medular que representan entre el 1-7% que se han asociado con mejor pronóstico, con una supervivencia a 10 años de 90-100%, inclusive sin tratamiento con quimioterapia adyuvante. El subtipo histológico papilar, micropapilar y metaplásico tienen una frecuencia de 1-5% con una supervivencia a 10 años desconocida. Otros tipos menos frecuentes son el adenocarcinoma quístico, 0.1%, carcinoma secretor de la mama 0.01-0.15%, rico en lípidos 1-6%, rico en glucógeno 1-3%, de los cuales, también por su escasa presentación se desconoce su supervivencia a 10 años. El grado histológico y el grado nuclear también suministran información importante para el pronóstico de las pacientes<sup>6,7</sup>.

**Permeación vascular linfática:** También llamada compromiso linfovascular. Se usa para referirse a la presencia de células tumorales en la luz de los vasos y se relaciona con metástasis ganglionares que se han descrito como factor pronóstico independiente en pacientes con ganglios positivos y/o negativos<sup>6</sup>.

**Estado de los receptores hormonales:** Desde hace dos siglos, Albert Schinzinger un cirujano alemán, propuso la idea de manipulación hormonal. Posteriormente George Beatson fue probablemente el primer cirujano que llevó a ooforectomía bilateral a una paciente con cáncer de mama avanzado, esto fue reportado en 1896, muchos años antes del descubrimiento de los receptores de estrógenos. En 1962, Jensen y Jacobson reportaron el descubrimiento del receptor de estrógeno y con esto se planteó un tratamiento endócrino para el cáncer de mama.

En nuestros días, los receptores hormonales son medidos cuantitativamente por inmunohistoquímica y juegan un papel importante en las características del tumor y la respuesta al tratamiento. La fisiología normal del tejido mamario es regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario durante la etapa reproductiva de la mujer y después de la menopausia, el tejido glandular de la mama es reemplazado por tejido adiposo. El desarrollo de cáncer de mama es el proceso final de una aberración producida por las células epiteliales de la mama, tanto de los conductos como de los lobulillos que siguen preservando un crecimiento aberrante, y muchas veces dependiente de estrógenos. Esto demuestra que las células siguen preservando un crecimiento dependiendo del linaje celular<sup>9,10,11</sup>.

Los receptores de estrógenos son una familia de receptores nucleares de tipo esteroideos se han descrito dos subtipos  $\alpha$  y  $\beta$  localizados en el cromosoma 6q25.1 y 14q22.25 respectivamente comparten características similares en un 30%. Tienen 6 dominios, llamados A, B, C, D, E y F. Los receptores de estrógeno  $\alpha$  se han asociado con cáncer de mama hasta en un 70-80%; en general, se sabe que los tumores que expresan este tipo son bien diferenciados, tienen un crecimiento lento y tienen por consiguiente un mejor pronóstico. En cambio, el presentar receptores de estrógenos  $\beta$  se considera de peor pronóstico, se ha relacionado con tumores de alto grado, que expresan además receptores de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y se han asociado con resistencia al tamoxifeno y con pérdida del receptor de progesterona. Los receptores de progesterona también son de dos tipos, PgA y PgB, que están implicados en el desarrollo del lobulillo mamario.

El receptor de progesterona PgB se ha asociado con el riesgo de presentar cáncer de mama, estos receptores están directamente regulados por los receptores de estrógenos (en la tabla 2 se relacionan los fenotipos de la expresión de receptores hormonales y su porcentaje de presentación).

Tabla 2.- Los fenotipos y el porcentaje de presentación del estado de los receptores en cáncer de mama es el siguiente

FENOTIPO	PORCENTAJE
RE+/RPg+	66
RE-/RPg-	19
RE+/RPg-	12.5
RE-/RPg+	3.4

Las pacientes premenopáusicas expresan hasta en un 30-50% los receptores estrogénicos, y el 80% de las postmenopáusicas expresan receptores estrogénicos o de progesterona. La presencia de los receptores tanto de estrógenos como de progesterona no es constante durante la evolución de la enfermedad, sino que puede variar con el tratamiento hormonal.

**Etapa clínica y tamaño del tumor:** La clasificación de cáncer de mama comprende 4 grandes grupos: Cáncer in situ, cáncer local, cáncer localmente avanzado y enfermedad metastásica (Tabla 3). De acuerdo con la etapa clínica, la supervivencia a 5 años va disminuyendo en forma progresiva en cuanto más avanzada sea la enfermedad <sup>6</sup>.

**Tabla3.- Clasificación TNM de cáncer de mama, AJCC 2002**

EC	T	N	M0
0	Tis	N0	M1
I	T1	N0	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1-3	N1-2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	QT	N3	M0
IV	QT	Q3	M1

#### Cáncer de mama localmente avanzado

**Definición de cáncer de mama localmente avanzado:** Es un grupo heterogéneo de neoplasias en las que por definición, no se pueden operar de primera instancia y requerirán, de tratamiento sistémico con quimioterapia en forma inicial posteriormente se deberá en forma local con cirugía y radioterapia.

Ocupa el 10-20 % de los cánceres de mama recientemente diagnosticados. La conservación de la mama se logra hasta en un 10-40% de los casos. El cáncer de mama localmente avanzado comprende una gran variedad de estadios, en donde se incluyen tumores grandes (mayores generalmente a 5 cm) y con ganglios, con afección de la piel o la

pared torácica pero sin desarrollo de metástasis a distancia. La etapa clínica III se considera localmente avanzada, pero hay casos, como EC IIB (T3N0M0) que se considera así por el tamaño del tumor. Estas etapas son importantes ya que la mayoría de las pacientes tendrán o desarrollarán una recaída de la enfermedad y morirán de cáncer. La mediana de supervivencia es de 4.9 años y la supervivencia a los 3 y 5 años es de 70 y 55% respectivamente<sup>7</sup>. La presencia de diferentes características clínico-patológicas como la edad, etapa clínica, estado de los receptores para estrógenos y/o progesterona, tipo histológico, grado de diferenciación, la presencia de permeación vascular linfática y sobreexpresión de Her2neu, factores pronósticos tomados en cuenta para la supervivencia a la enfermedad<sup>7</sup>.

**Respuesta al tratamiento (clínica y patológica):** La respuesta clínica se evalúa mediante la medición del tumor al administrar cada ciclo de quimioterapia neoadyuvante, según criterios RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors). Se considera que la enfermedad estable y/o progresión tras la administración de 2 ciclos de quimioterapia basada en antraciclinas, es un factor pronóstico adverso en las paciente<sup>7,8</sup>. La respuesta patológica completa es definida como ausencia de cáncer invasor en la mama y en la axila al realizar la extirpación de la mama por mastectomía o segmentectomía y la disección axilar. El carcinoma residual in situ en ausencia de cáncer invasor se ha considerado como respuesta patológica completa. Las personas que alcanzan una respuesta patológica completa tienen mayor supervivencia y período libre de enfermedad, esto predice la probabilidad que cursen con una enfermedad más indolente. El tener receptores hormonales negativos, un tumor de alto grado

y un alto grado de proliferación son factores que pueden predecir respuesta patológica a la quimioterapia y por lo tanto la mayor quimiosensibilidad del tumor<sup>4,5</sup>.

### Estado de Her2Neu

El *Her2Neu* es un protooncogén (localizado en el cromosoma 17q12.21 (imagen1), tiene 38 kB y comprende 27 exones que codifican para una glucoproteína de membrana de 1255 aminoácidos y 187kD con actividad de cinasa de tirosina. Pertenece a una familia constituida por 4 miembros conocidos erb-1, erb-2, erb-3, erb-4, que promueven la división celular, migración, adhesión, diferenciación y apoptosis. A Her2 no se le han identificado ligandos específicos, pero forma homodímeros y heterodímeros con erb-1, erb-4

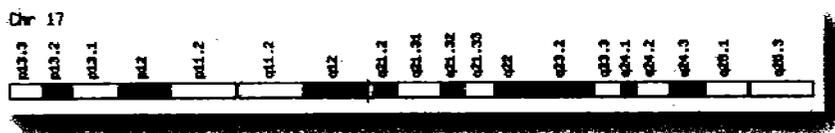


Imagen No. 1

Representación esquemática del gen de Her2Neu, localizado en el cromosoma 17q21

La familia de receptores tirosín-cinasa lleva a cabo comunicación célula-célula y estroma-célula, afectando así la transducción de varios genes por fosforilación o defosforilación de una serie de varias proteínas intramembranales e intracitoplasmáticas que interviene en los procesos enzimáticos. La sobreexpresión de her2 afecta las vías de señalización (ver imagen 2) que involucran a Ras/MAPK y PI3K/Akt, JAK/STAT y la vía de la fosfolipasa C<sup>10,11</sup>.

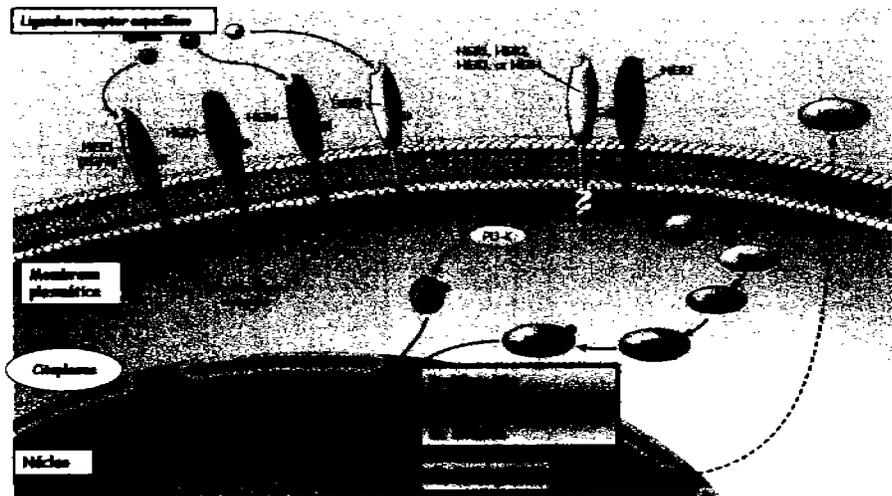


Imagen 2.- Esquemización de las vías de señalización inhibidas por trastuzumab, donde al unirse el anticuerpo hay una inhibición de la actividad de cinasa de tirosina al inhibir las siguientes vías de señalización intracitoplasmáticas y hacia el núcleo, como PI3K, AKT, MAPK, RAS y RAF, VEGF.

Her2 se encuentra sobrepresado en 25-30% de las pacientes con cáncer de mama y predice mal pronóstico pues se asocia a la disminución de la supervivencia, poca respuesta al tratamiento e incremento en la actividad metastásica<sup>10,11</sup>.

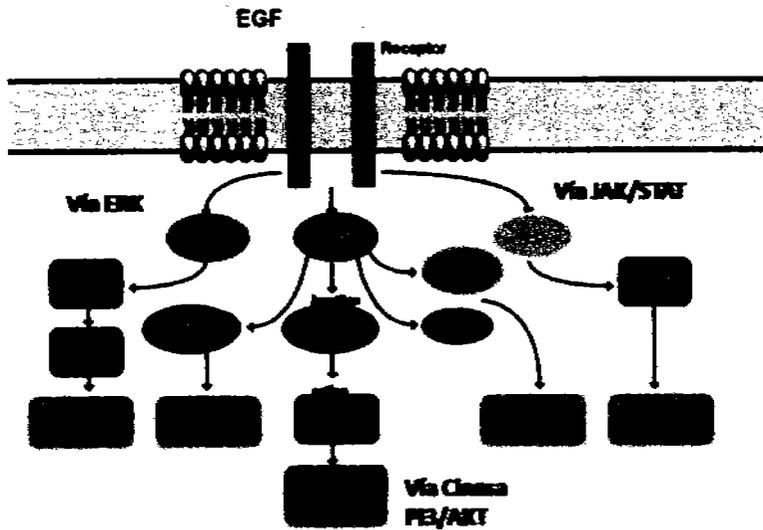


Imagen 3.- Vías de activación por la presencia de la proteína con actividad cinasa de tirosina.

La detección de Her2 se realiza mediante inmunohistoquímica o mediante FISH (Fluorescence in situ Hybridization). La mejor forma de identificar quien responde al trastuzumab es por medio de inmunohistoquímica, por lo que se ha estandarizado la reproducibilidad y análisis de esta metodología en centros a nivel internacional.

#### Tratamiento del cáncer de mama localmente avanzado

La quimioterapia neoadyuvante, también llamada quimioterapia primaria, en combinación con otras modalidades de tratamiento es frecuentemente usada para el manejo

de cáncer de mama en estadios avanzados. Desde inicios de la década de 1970, la quimioterapia neoadyuvante ha sido el estándar de tratamiento para el manejo del cáncer de mama localmente avanzado y va incrementando su uso en etapas clínicas tempranas. Este tipo de quimioterapia tiene como fin disminuir el tamaño del tumor, y así ofrecer mejores opciones quirúrgicas y a su vez permite obtener una información sobre la respuesta del tumor a estos agentes de quimioterapia. La respuesta al tratamiento neoadyuvante se relaciona con mejor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global y control de enfermedad metastásica. Sin embargo, no se ha mostrado diferencia entre el beneficio en la supervivencia de las pacientes que reciben quimioterapia adyuvante ó neoadyuvante. Se conoce hasta el momento, que los pacientes que alcanzan respuesta patológica completa después de la quimioterapia neoadyuvante tienen significativamente un periodo libre de recurrencia y supervivencia más largo.<sup>8</sup> La respuesta patológica completa y la respuesta clínica, son frecuentemente usadas como predictores para medir la efectividad del tratamiento neoadyuvante, en general; se conoce que de 60 a 90% de los pacientes que reciben quimioterapia de este tipo tendrá respuesta, pero un 3-33% respuestas patológica completa (para antraciclinas y antracidinas con taxanos respectivamente)<sup>20</sup>.

La definición de la respuesta y de los métodos para determinarla han sido muy heterogéneos, por ejemplo, en el estudio NSABP B-18 y B-27 (Nacional Surgical Adjuvant Breast Bowel Project) definen la respuesta patológica completa como ausencia de cáncer de mama invasor, otros estudios también toman en cuenta la ausencia de ganglios linfáticos afectados y la ausencia de cáncer invasor en los mismos<sup>15, 16, 17, 18</sup>.

Como ya se ha mencionado, entre los factores que afectan importantemente la sensibilidad a la quimioterapia es el estado hormonal. Sobre el estado de los receptores, tanto RE como RPg son definidos como variables independientes, que se asocian significativamente a la supervivencia y a la respuesta patológica completa. En un análisis retrospectivo, se evaluaron 1,700 pacientes que recibieron diversos esquemas de tratamiento neoadyuvante, y se observó en los que tenían RH negativos una respuesta de 24% y 8% en los que tenían RH positivos (con una diferencia significativa  $p=.001$ )<sup>8,9</sup>.

Otro factor es la histología del tumor, ya que si es tipo lobulillar tienen una menor respuesta de 3% en comparación con los que tiene carcinoma ductal que tiene una respuesta de 15%. También los tumores pobremente diferenciados, de alto grado y alto índice de proliferación, tiene mayor sensibilidad a la quimioterapia neoadyuvante<sup>15, 16, 17,18</sup>.

Las antraciclinas y taxanos son los fármacos usualmente utilizados para pacientes con enfermedad ganglionar y con riesgo de recurrencia. En un estudio publicado por *Mazouni* y colaboradores, en donde se analizaron 1079 pacientes en 2001, valoraron la inclusión de los taxanos al tratamiento preoperatorio, y observaron que la adición de paclitaxel incrementó los porcentajes de respuesta patológica completa en un 28.1% a los pacientes que recibieron FAC (5-FU, adriamicina y ciclofosfamida) y paclitaxel en comparación con los que recibieron FAC y docetaxel, que solo tuvieron una respuesta patológica de 6.5%.

Los pacientes con receptores hormonales positivos tuvieron mayor respuesta patológica con el tratamiento secuencial de FAC otorgado por 4 ciclos y paclitaxel 12 semanas. El esquema de quimioterapia basado en antraciclinas al ser comparado con el esquema CMF (ciclofosfamida, metotrexate y 5FU) demostró un beneficio en la disminución riesgo de

recurrencia de un 11%, disminución en el riesgo de muerte del 16%, con beneficio absoluto a 5 y 10 años de 3% y 4% en la reducción de la mortalidad respectivamente<sup>20</sup>.

El tratamiento con trastuzumab en combinación con la quimioterapia para el tratamiento de enfermedad metastásica, demostró incrementar el tiempo a la progresión, así como el porcentaje de respuesta. Pocos estudios han evaluado el tratamiento neoadyuvante con quimioterapia y trastuzumab, observando un porcentaje de respuestas completas entre un 18% y 65%. En un estudio fase II aleatorizado con pacientes con sobreexpresión Her2Neu, donde recibieron 4 ciclos de FEC (5-fu, epirubicina y ciclofosfamida) y 4 ciclos de paclitaxel, el brazo de combinación recibieron el mismo esquema más trastuzumab, demostrando que 42 pacientes tuvieron respuesta patológica completa sin incremento de la toxicidad. La respuesta patológica completa fue de 67 a 25% con beneficio para el grupo de combinación de quimioterapia con trastuzumab<sup>16, 17,18</sup>.

### **Mecanismo de acción de trastuzumab**

Trastuzumab, es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra el dominio extracelular del receptor de cinasa de tirosina Her2 y es realizado por ingeniería genética insertando regiones determinantes de un anticuerpo murino (clona 4D5) y un anticuerpo IgG1 humano. Fue aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento del cáncer de mama metastásico desde 1998. Trastuzumab disminuye la señalización del receptor, promoviendo la apoptosis, ya que produce internalización y degradación del receptor, inhibiendo así la señalización de MAPK y P13K, promoviendo el arresto en G1 mediado por

p27, disminuyendo la producción de la ciclina D1 e inhibiendo la formación de ciclina E/cdk2. La disminución del tamaño del tumor está relacionada a disminución de la angiogénesis, esto debido a que los estudios in vitro, han reportado una disminución de factores angiogénicos VEGF, TGF- $\alpha$  y Ang-1, también se ha observado una disminución de la concentración de microvasos in vivo. En relación a los mecanismos inmunológicos, se sabe que tiene efectos citotóxicos ya que activa la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (activated and antibody-dependent cellular cytotoxicity ADCC) mediante la producción de células asesinas naturales (Natural Killer NK) produciendo muerte celular mediada por complemento (lisis celular) (Imagen 3) <sup>21,22</sup>.

## Mecanismo de acción de trastuzumab

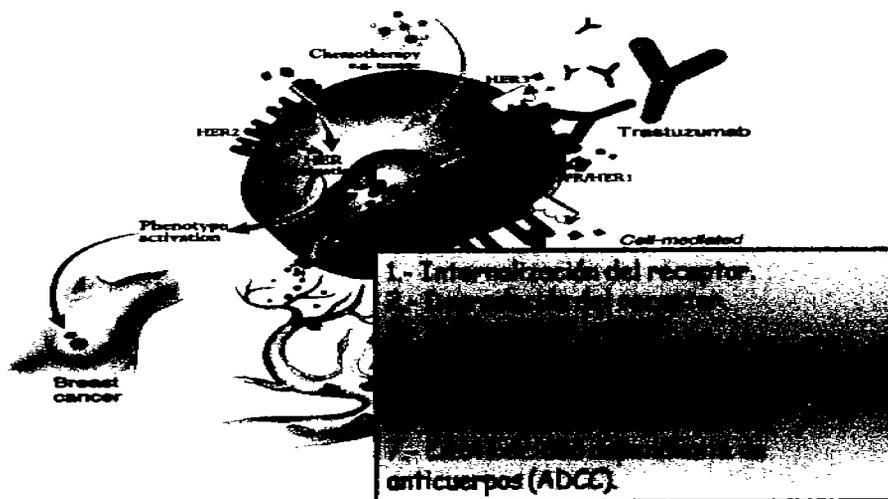


Imagen 3.- Esquematización del mecanismo de acción de trastuzumab, un anticuerpo humanizado, con propiedades antitumorales al inhibir el receptor de Her2Neu extracelular.

A lo largo del receptor el dominio extracelular, tiene una hendidura proteolítica de 110kD que puede ser detectada en cultivos celulares y un fragmento amino-terminal 95kD con actividad cinasa de tirosina aumentada, que se correlaciona con un pobre pronóstico, incremento de la actividad metastásica y disminución de la respuesta a la quimioterapia y a la terapia endócrina<sup>19,20,21,22,23</sup>.

### **Importancia del polimorfismo de Her2Neu Ile655Val**

Los polimorfismos son la variante alélica de un gen, que está representado en por lo menos en el 1% de la población. Hay dos grandes grupos de polimorfismos los de nucleótido sencillo o SNP'S (en el cual hay un cambio de un nucleótido) y los polimorfismos de longitud de secuencia variable (SSLP).

Han y colaboradores<sup>28</sup>, mostraron que el gen de Her2Neu puede presentar 29 polimorfismos de nucleótido sencillo, 6 de los cuales presentan más del 10% de la frecuencia alélica y además analizaron si estos polimorfismos exhiben un desequilibrio alélico. El polimorfismo más estudiado en el gen Her2Neu es el que corresponde a una transición de adenina (A) por guanina (G) en la primera posición del triplete que codifica para el codón 655, lo cual genera un cambio de aminoácido de isoleucina (Ile) por valina (Val)<sup>28</sup>.

Hay dos grandes líneas de investigación de la presencia de polimorfismos y su repercusión clínica. Por un lado, se encuentran los estudios que determinan el polimorfismo y que lo asocian como factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama, y por otro lado, se

encuentran los estudios en los cuales la presencia del polimorfismo puede contribuir a la sensibilidad y/o a la toxicidad al tratamiento.

*Fleishmann y colaboradores*<sup>29</sup> demostraron que la presencia del alelo Val en la posición 655 transmembranal estabiliza la formación de un dímero activo de la proteína que predispone a una autoactividad del receptor, concluyendo que los alelos Val podrían activar de manera intrínseca la proteína con actividad de tirosina cinasa; además los cambios de Ile/Val podrían alterar la hidrofobicidad de proteínas afectando la estabilidad conformacional de los dominios hidrofóbicos presentes en la región transmembrana. Complementariamente la sobreexpresión de Her2Neu induce la activación de vías de señalización del crecimiento tumoral y protege a las células de apoptosis<sup>29</sup>.

El bloqueo de este receptor con trastuzumab reduce la fosforilación de forma dosis-dependiente; esta reducción es máxima después de 24 hr de exposición a la droga. *Beauchair y colaboradores*<sup>30</sup>, estudiaron a 61 pacientes con cáncer de mama avanzado, encontraron que la expresión de la isoforma Val muestra mayor capacidad de crecimiento y desarrollo de tumores agresivos, sin embargo, éstos son más sensibles a trastuzumab. Trastuzumab fue más efectivo para la isoforma Val demostrado por la disminución en la fosforilación de Her2Neu de manera rápida y obteniendo una inhibición máxima de Erk tras 72 hrs de exposición, en estudios *in vitro* esto confirma una alta sensibilidad al trastuzumab para las clonas de la isoforma Val<sup>30</sup>.

Es improbable que la variabilidad en un receptor de tirosín –cinasa sea el único responsable de una diferencia en la terapia antitumoral de una terapia blanco. La variabilidad en el efecto de trastuzumab está probablemente más relacionada a cambios en las vías de señalización de Her2Neu como ocurre seguido de la pérdida de PTEN o a la presencia de una vía de señalización alterna para crecimiento y supervivencia como HIF-1.

El tratamiento con trastuzumab se asocia con la presencia del desarrollo de cardiotoxicidad, en el estudio de *Beauclair*<sup>30</sup> 5 pacientes 8.2% presentaron cardiotoxicidad, manifestada por una disminución de la fracción de expulsión del ventrículo izquierdo en un 20% (FEVI). Este efecto adverso, no se encontró en los sujetos con el genotipo Ile /Ile y en contraste, los casos fueron vistos en el grupo Ile/Val. El hecho que se observara cardiotoxicidad en los pacientes Ile/Val sugiere un posible papel para el alelo Val como un factor predisponente para cardiotoxicidad<sup>30</sup>.

Algunos argumentos experimentales que apoyen un papel significativo para la vía de señalización Her2Neu en cardiopatías y en todo caso, uno podría considerar que Her2Neu juega o tiene significancia en la función cardíaca pero no en cardiomiopatías. Las células que expresan Val mostraron una mayor capacidad de crecimiento y mayor sensibilidad a trastuzumab, entonces, la presencia del alelo Val puede agotar al miocardio particularmente, aquellos dependientes de la vía Her2Neu y que son altamente sensibles a trastuzumab.

En cuanto a la otra línea de investigación del polimorfismo de Her2Neu se han estudiado con la asociación de factor de riesgo de desarrollar cáncer de mama o de ovario en

las diferentes poblaciones, se estudian pacientes con antecedentes heredofamiliares o sin este y en especial en aquellas pacientes que son jóvenes, los estudios muestran la frecuencia del polimorfismo en las diversas poblaciones, como los estudios alemanes en los que la presentan una donde Frank y Hemminki estudiaron casos de cáncer de mama y controles con número de 348 casos y 960 controles, reportaron una frecuencia del polimorfismo Ile/Ile 54.4 % en controles y 53.6% de los casos, el polimorfismo Ile/Val en frecuencia de 39.3% de los controles y 38% de los casos y 6% de alelos Val/Val en los controles y 8.4% de los casos<sup>31</sup>.

El polimorfismo Ile/Val se ha reportado que está asociado con un aumento de riesgo en la población China. Ameyaw y colaboradores reportaron que la distribución del polimorfismo varía considerablemente entre los grupos étnicos desde el 30% en los caucásicos hasta estar ausente en la población Africana. Se ha propuesto que la influencia del alelo Val considerablemente dependiendo de la población étnica<sup>32</sup>. La razón de las diferencias entre poblaciones como las Chinas y Caucásicas no se conocen existen propuestas sobre la posibilidad de un desequilibrio del alelo funcional en otros sitios de la población China<sup>33, 31,32</sup>.

Se ha logrado establecer en una forma una clara diferencia entre las isoformas con respecto a su potencial tumorigénico, con una ventaja para la isoforma Val y con respecto al tratamiento, sin embargo la presencia del alelo Val, puede constituir un factor de riesgo para toxicidad cardíaca<sup>30</sup>

Ante los pocos estudios encontrados en la literatura mundial y la ausencia de estudios en nuestro país creemos importante conocer la posible asociación en la presencia del polimorfismo en México y en nuestras pacientes con cáncer de mama conocer si existe alguna

asociación entre los factores pronósticos de cáncer de mama y la posible sensibilidad al tratamiento neoadyuvante o el desarrollo o la prevención de cardiotoxicidad por el uso de trastuzumab en pacientes tratadas.

## Justificación

El cáncer de mama es una de las neoplasias más frecuentes a nivel mundial, y están implicados múltiples tratamientos que tratan de controlar la enfermedad y disminuir la recaída. En el caso del cáncer de mama localmente avanzado, las pacientes son tratadas con quimioterapia neoadyuvante para tratar en forma sistémica y realizar cirugía conservadora.

En nuestro medio, esta enfermedad ocupa el mayor volumen de pacientes en la consulta externa. Las pacientes sometidas a quimioterapia desarrollan toxicidad tanto por la dosis, vía de administración, etapa de la enfermedad, otras pueden presentar algún tipo de mecanismo que las lleve a ser más sensible a un determinado tratamiento, es por eso que actualmente la farmacogenómica se está dirigiendo hacia la identificación de individuos que puedan recibir algún tratamiento específico.

No se conoce la incidencia del polimorfismo de her2neu en la población mexicana pero es de una las metas de este estudio conocer la in frecuencia incidencia y conocer si el polimorfimos puede intervenir en la respuesta patológica al tratamiento.

Por este motivo el estudio de factores que mejoren o empeoren la respuesta al tratamiento con quimioterapia neoadyuvante, podría traer un nuevo conocimiento a esta área, ya que al conocer de antemano que pacientes puedes ser más sensibles al tratamiento también podría prevenirse el desarrollo de toxicidad cardiaca.

## **Objetivos**

### **Objetivo primario:**

1.- Asociar la presencia del polimorfismo Her2 Ile655Val y características clínicas en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado con o sin sobreexpresión de Her2 tratadas con quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclinas, taxanos y en su caso trastuzumab.

### **Objetivos secundarios:**

- 1.- Determinar la frecuencia del polimorfismo Her2 Ile655Val en población mexicana sana.
- 2.- Determinar la frecuencia del polimorfismo Her2Ile655Val en pacientes con cáncer de mama.
- 3.- Establecer la asociación entre la respuesta clínica y patológica a la quimioterapia neoadyuvante y el polimorfismo de Her2 Ile655Val.
- 4.- Determinar la influencia del polimorfismo de Her2 Ile655Val en la sensibilidad al tratamiento con trastuzumab.

## Hipótesis

1. La presencia del polimorfismo de Her Val/Val predispone al desarrollo de tumores más agresivos definidos como tumores >5 cm, con metástasis ganglionares y de alto grado de diferenciación.
2. La presencia de la variante alélica Val/Val del polimorfismo del codón (Ile655Val) se asocia con respuesta patológica completa a trastuzumab.
3. La presencia del polimorfismo de Her Ile655Val predispone al desarrollo de cardiotoxicidad.

## Diseño Metodológico

**Diseño del estudio:** Estudio transversal, ambielectivo, descriptivo.

**Análisis estadístico:** Para propósitos descriptivos, las variables continuas serán mostradas con media, mediana y desviación estándar y las variables categóricas con proporciones e intervalos de confianza del 95%. Las comparaciones de las variables continuas y el tipo de polimorfismo se realizara con la prueba T de student o U de Mann-Whitne y de acuerdo al tipo de distribución según la prueba de Kolmogorov-Smirnov. La comparación entre variables categóricas y los polimorfismos serán analizados con Chi cuadrada y la prueba exacta de Fisher. Las variables significativas ( $p < 0.05$ ) o cercanas a serlo ( $p < 0.1$ ) se incluirán al análisis multivariado. Con el fin de determinar relación independiente entre las variables clínico-

patológicas y los polimorfismos de HER-2, utilizaremos el análisis de regresión logística múltiple donde también se determinaran coeficientes de regresión y riesgos relativos con intervalos de confianza.

### **Definiciones operacionales**

**Inclusión de pacientes:** Pacientes con cáncer de mama localmente avanzado T2-4, N0-3, M0, sin tratamiento previo, que acepten recibir tratamiento neoadyuvante con FAC (5-fluorouracilo, adriamicina y ciclofosfamida a dosis de 500/50/500 mgs/m<sup>2</sup> posteriormente trastuzumab 4mg/kg carga y 2mg/kg de forma semanal y paclitaxel 80mg/m<sup>2</sup> y para pacientes con Her2Neu positivo, y paclitaxel 80/mg/m<sup>2</sup>.

**Her2Neu positivo:** Si por la técnica de inmunohistoquímica se reportan +++ ó ++ y confirmación por FISH como sobrepresado como positivo.

**Her2Neu negativo:** Negatividad para FISH o inmunohistoquímica +.

**Toxicidad cardíaca:** Disminución de la fracción de expulsión del ventrículo izquierdo mayor al 20% de la basal.

**Respuesta patológica completa:** Ausencia de carcinoma invasor en la pieza patológica, o menos del 10% del carcinoma in situ, así como en ganglios linfáticos.

### **Criterios de inclusión**

- Mujeres mayores de 18 años con diagnóstico histopatológico de cáncer de mama de cualquier histología.
- Con expediente físico y electrónico completo.

- Cáncer de mama localmente avanzado (T2-4, N0-3, M0).
- Sin historia de cáncer de mama previo.
- No haber recibido tratamiento previo.
- Con función hematológica, hepática, renal normales (Hb >10 gr/dl, plt >100 000, leucocitos >4000, TGO, TGP, FA <2 veces lo normal, creatinina sérica <1.2 mg/dl)
- Función del ventrículo izquierdo determinada por MUGA >55%.
- Enfermedad medible por TNM.
- Posterior a tratamiento quirúrgico la evaluación patológica de la pieza histopatológica por el servicio de patología.
- Que sean tratadas con quimioterapia neoadyuvante basada en 4 ciclos de FAC (5FU 500 mg/m<sup>2</sup>, adriamicina 50 mg/m<sup>2</sup>, ciclofosfamida 500 mg/m<sup>2</sup>), seguido de paclitaxel semanal 80 mg/m<sup>2</sup> por 12 semanas concomitante con trastuzumab 4 mg/kg (dosis de impregnación) y 2 mg/kg dosis de carga.
- Que posterior al tratamiento neoadyuvante sean sometidas a tratamiento quirúrgico local (mastectomía o cirugía conservadora).

## **Metodología del Estudio**

### **A.- Pacientes**

Se reclutaron pacientes con cáncer de mama localmente avanzado, tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología que cumplan los criterios de inclusión ya descritos previamente.

Se recolectaron los datos, que incluyeran ficha de identificación, historia clínica completa, diagnóstico histológico, estadificación por TNM, estado de los receptores

hormonales, estado her2neu por inmunohistoquímica y los que presenten inmunohistoquímica ++ se llevarán a FISH y detalles con respecto al tratamiento sistémico neoadyuvante o primario.

Se obtendrán una muestra de 10 ml de sangre con vacutainer en tubo con anticoagulante EDTA previa autorización de la paciente con el formato previamente citado.

#### **B.- Valoración de la cardiotoxicidad**

Determinación de fracción del ventrículo izquierdo a las pacientes con Her2Neu positivo y que recibieron tratamiento con FAC, paclitaxel –trastuzumab de tipo neoadyuvante, se realizó estudio basal (antes del inicio del tratamiento), al término de los 4 ciclos de FAC y al término de los ciclos de paclitaxel. Si la fracción de expulsión disminuía un 10% de la inicial.

#### **C.- Obtención de muestras de sangre periférica**

Se obtuvo una muestra de 10 ml de sangre periférica a cada una de las pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión para el estudio, previo consentimiento de los Comités de Investigación y de Ética del Instituto Nacional de Cancerología.

#### **C.- Obtención de muestras de DNA**

De cada individuo se obtuvieron (por venopunción de la región cubital del brazo) 5 ml de sangre periférica, la cual fue recolectada en tubos Vacutainer® (Becton Dickinson, USA) adicionados con EDTA. Para promover la lisis de eritrocitos, el volumen de sangre obtenido fue trasladado posteriormente a un tubo cónico de polipropileno para ser almacenado durante 24

h a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Pasado este tiempo, la sangre fue llevada a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  aproximadamente 15 min. Con la intención de eliminar la mayor cantidad posible de glóbulos rojos, se realizó a la sangre una serie de lavados con buffer SSC 1x, seguidos de una centrifugación a  $3500 \times G$  5 min. Al pellet que se obtuvo, se le añadieron 2 ml de acetato de sodio 0.2 M, 125  $\mu\text{l}$  de SDS al 10% y 30  $\mu\text{l}$  de proteinasa K (20 mg/ml, Qiagen, Germany). El producto fue incubado durante 1 h a  $55^{\circ}\text{C}$  para posteriormente añadir 600  $\mu\text{l}$  de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico en una proporción 25/24/1. El tubo se mantuvo en agitación 10 min y se centrifugó a  $3500 \times G$  5 min. Se recuperó la fase acuosa y se adicionaron 600  $\mu\text{l}$  de cloroformo, para dar paso a otro ciclo de agitación y centrifugación. La fase acuosa fue nuevamente sustraída y se añadió etanol absoluto ( $-20^{\circ}\text{C}$ , 2.5 volúmenes con respecto al volumen de la fase acuosa), para después mezclar por inversión y permitir la asociación y precipitación del DNA, en este momento, el material puede ser detectado a simple vista. El DNA fue recuperado en un tubo de 1.5 ml, al que se le añadió 1 ml etanol al 70 %. Se centrifugó el tubo a  $153 \times G$  durante 2 min para posteriormente retirar el etanol. Se permitió la evaporación del etanol residual a temperatura ambiente y se resuspendió el material en TE (10/0.1) a  $55^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Finalmente, el material fue cuantificado (lectura a partir de 1.5  $\mu\text{l}$  de muestra en espectrofotómetro ND-1000, Nanodrop Technologies, Inc., USA) y analizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8 %, utilizando buffer TBE 0.5x y tinción con bromuro de etidio.

#### D.- Amplificación del exón 17 de Her2Neu mediante PCR y RFLP

A partir de las muestras de DNA genómico obtenidas, se llevo a cabo la PCR utilizando los oligonucleótidos para la amplificación del exón 17 del gen *Her2Neu* reportados en el trabajo de Wang-Gohrke S y colaboradores<sup>34</sup>.

*Her2Neu* → Exón 17

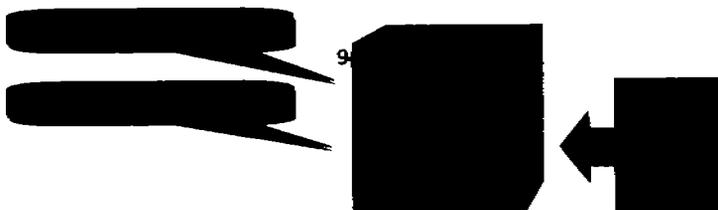
Sentido (*Forward*) → 5'-AGAGCGCCAGCCCTCTGACGTCCAT-3'

Anti-sentido (*Reverse*) → 5'-CCGTTTCTGCAGCAGTCTCCGA-3'

La amplificación se realizó a partir de 1 µl de DNA en una mezcla de componentes de PCR (Invitrogen, Brasil) con un volumen final de 10 µl como se muestra a continuación:

Componente	Volumen final (µl)
DNTP's 10 mM	0.2
<i>Her2</i> Forward 10 µM	0.2
Templado (DNA)	1.0
H <sub>2</sub> O	7.0

Las temperaturas y tiempos de la reacción fueron los siguientes:



94°C → 30 seg

58°C → 30 seg

72

7

El producto de PCR de cada muestra de DNA fue analizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 3%, utilizando buffer TBE 0.5x y tinción con bromuro de etidio. El fragmento de DNA que se obtiene en las condiciones anteriormente descritas tiene una longitud de 111 pb.

La genotipificación a partir del producto de PCR se realizó por medio de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, polimorfismo de tamaño de fragmento por enzima de restricción), utilizando la enzima BsmA1 (New England BioLabs, USA), la cual reconoce un sitio de corte entre la secuencia gtctc. Este sitio no se presenta en el alelo silvestre, por lo que al digerirse la muestra nos indica la presencia del alelo polimórfico. Las condiciones se especifican a continuación:

BsmA1 (10 U/ $\mu$ l)	0.2
H <sub>2</sub> O	5.8

La reacción de digestión se llevó a cabo a una temperatura de 55 °C por 16 h. Las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa 1000 al 3 % utilizando buffer TBE 0.5x y tinción con bromuro de etidio.

Dentro de la secuencia amplificada de un individuo que no presenta el polimorfismo, no existen sitios de corte para la enzima, lo que permite que se mantenga el fragmento de 111 pb obtenido de la amplificación. La sustitución de una adenina por una guanina, presente en el polimorfismo, genera un sitio de restricción (el que se presenta entre el fragmento de 62 y 49 pb), de manera que la secuencia en este caso es *atctc*. Los individuos heterocigos presentan todos los fragmentos posibles (111, 62 y 49 pb).

#### E.- Determinación del genotipo por medio de secuenciación

Con el objetivo de corroborar los resultados obtenidos por medio de la digestión con enzimas de restricción específicas, se secuenciaron 4 muestras. Esto fue realizado a partir de 300 ng de producto de PCR para el exón 17 del gen *Her2Neu* (por reacción), utilizando el oligonucleótido sentido (*forward*) descrito en la amplificación (aprox. 3 pmoles) y 0.5  $\mu$ l de Big Dye™ Terminator V 3.1 Cycle Sequencing Kit.

Las condiciones se describen a continuación:

<i>Her2Neu Forward</i> 10 $\mu$ M	3.0
Big Dye™	0.5
<b>Volumen total</b>	<b>10.0</b>

La PCR para la secuenciación se realizó con los siguientes parámetros:



 96°C → 10 seg  
 55°C → 10 seg  
 60

La purificación se llevó a cabo mediante la precipitación en columnas de Sephadex G-50 DNA Grade (50 mg/ml de H<sub>2</sub>O, Pharmacia Biotech, Sweden). Las columnas fueron previamente deshidratadas por centrifugación a 750 x G durante 1 min. El volumen final de PCR de secuenciación de cada muestra (10 µl) fue administrado al centro de la columna para después centrifugar a 2000 x G 3 min. El producto purificado fue deshidratado utilizando el DNA 120 SpeedVac Concentrator (Thermo Electron Corporation, USA) durante 20 min, y resuspendido posteriormente en 25 µl de Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems, USA). Finalmente, se desnaturalizó a 96 °C por 5 min, y se incubó inmediatamente en hielo el mismo tiempo.

Las muestras fueron colocadas en placas y secuenciadas utilizando el secuenciador ABI PRISM® 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, USA). El análisis de la secuencia obtenida se realizó utilizando el software BioEdit® (Biological Sequence Alignment Editor, 2007, Ibis Biosciences).

Tabla4.-Esquematzación del fragmento que se quería conocer donde los primers se adhieren a la secuencia conocida (amarillo) y delimitan el fragmento a determinar. Y la enzima de restricción ATCTC (rosa), se secuenciaron 4 muestras 1 heteróciga y tres silvestres.

```

gggtaacodttccgacttbocttttcgaaatgocaaacacodtctatgtccodgtggcccoctttgtccc
ttccaccoraaactagocctcaatccodtgcoccttcttcggcccccagCCTCTGAGGTTCATC
TGCGGTGGTTGGCAITCTGCTGGTCTGGTCTTGGGGTGGTCTTTGGGATCTTCATCAAGCGACGGGCG
CAGAAGATCGGAAGTACACGATGCGGAGACTGCTGCAGGAAACGGA Gctgagcggatgaagtctctc
cagcorgctgggtctgacagggcccccgcactgaactaaccaccccttcacccagCTGGTGGAGCCG
CTGACADCTAGCGGAGGATGCCAACGAGCGCAGATGCGGATCTGAAGAGACGGAGCTGAGGAAGG
TGAAGGTGCTTGGATCTGGCGCTTTTGGCACAGTCTACAAGctcaggccaggtctggatggcggc
ccagagatggggcgttcctggagggtgtctggcagttctgatggagggcaagactggagc
  
```

#### F.- Frecuencia del polimorfismo en la población abierta mexicana

Debido a que no se conocía la frecuencia del polimorfismo en la población mexicana fue necesario determinarla; para esto, se utilizaron muestras de un banco de población abierta mexicana del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Se utilizará la misma metodología que para las muestras de pacientes.

Se realizó una estimación estadística para determinar el tamaño de la muestra. Se tomó en cuenta el promedio de las frecuencias reportadas .1 para Val y 10% utilizando la siguiente fórmula:

Donde:

$$n = \frac{Z^2 \alpha / (2) (pq)}{B^2}$$

$Z^2 \alpha / 2 = 1.96$  (95% confianza)

$B = 0.05$  (amplitud del intervalo de confianza)

$p$  y  $q = 0.95$  y  $0.05$

Estimación del número de individuos necesarios para obtener la frecuencia del polimorfismo HER-2 Ile655val en población mexicana con un nivel de confianza del 95%.

$$\text{HER-2 Ile655val} = (1.96)^2 (0.9)(0.01) / (0.05)^2 = 138 \text{ individuos}$$

## Resultados

### Frecuencia del polimorfismo de Her2Neu (Ile655Val) en la población mexicana

Debido a que no se conocía la frecuencia del polimorfismo de Her2neu Ile655Val en México se determinó utilizando muestras de un banco de población abierta mexicana del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, se analizaron 107 controles.

Se obtuvo por digestión de PCR los fragmentos

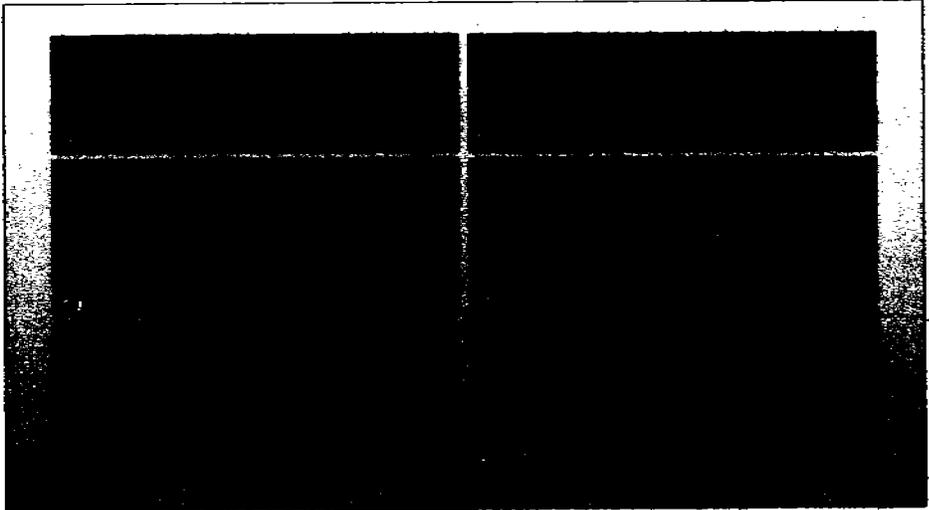


Imagen 4.- Digestión de PCR donde se observan los diferentes genotipos, a y b), muestran la amplificación del fragmento de 111 pb, c y d) Digestiones con la enzima BsmA1 para identificar los diferentes genotipos.



La frecuencia en la población mexicana del polimorfismo Her2  $\#655Val$  es el siguiente (tabla 4):

**Tabla 4.- Frecuencia de los genotipos y frecuencia alélica en población mexicana sana**

<b>lle/lle</b>	<b>79.43</b>
<b>lle/Val</b>	<b>20.56</b>
<b>Val/Val</b>	<b>0</b>
<b>Frecuencia Val</b>	<b>0.102</b>
<b>Frecuencia lle</b>	<b>0.8971</b>

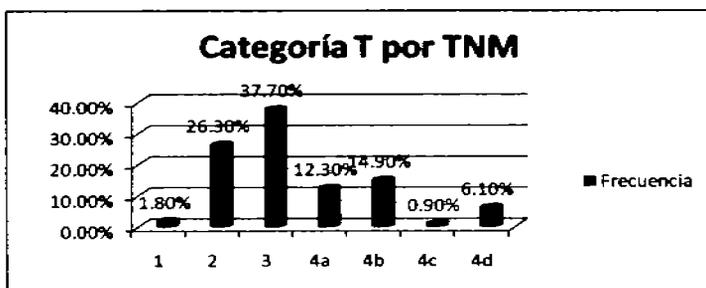
Frecuencia del polimorfismo her2  $\#655Val$  en las pacientes con cáncer de mama localmente avanzadas y la población mexicana (tabla 5):

**Tabla 5.- Frecuencia de los genotipos y frecuencia alélica en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado**

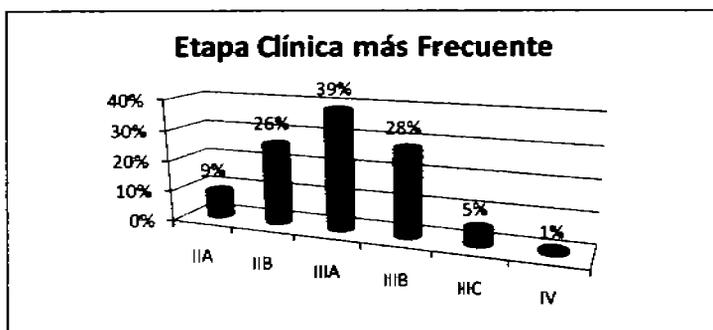
<b>lle/lle</b>	<b>74</b>
<b>lle/Val</b>	<b>25.4</b>
<b>Val/Val</b>	<b>2.6</b>
<b>Frecuencia Val</b>	<b>.0319</b>
<b>Frecuencia lle</b>	<b>.964</b>

#### **Características de las pacientes con cáncer de mama localmente avanzado**

**Edad y tamaño del tumor:** La mediana de edad fue de 46 años, con un intervalo de 27 a 66 años. El 14% (16) de las pacientes tenían  $\leq 40$  años. La mayoría de las pacientes presentaron tumores T3 (tumores mayores de 5 cm) 37.7% (43) y T2 (tumores 2 a 5 cm en su dimensión mayor) 26.3% (30) como se muestra en la gráfica 1 y en la gráfica 2 se esquematiza la etapa clínica más frecuente que es la IIIA en un 39%.



Gráfica 1.- Etapa clínica más frecuente en las pacientes con cáncer de mama localmente avanzado.



Gráfica 1.- Etapa clínica más frecuente en las pacientes con cáncer de mama localmente avanzado

La siguiente tabla muestra las características demográficas de los pacientes, como se muestra en la tabla la mayoría fueron homogéneas y tratando de asociar los factores predictivos más importantes en la respuesta al tratamiento en cáncer de mama y su asociación con el polimorfismo, se analizaron para valorar las características a las 114 pacientes (Tabla 6).

## Características demográficas de las pacientes

Tabla 6.- Características generales de los pacientes, asociación con polimorfismo de Her2Neu lle655Val

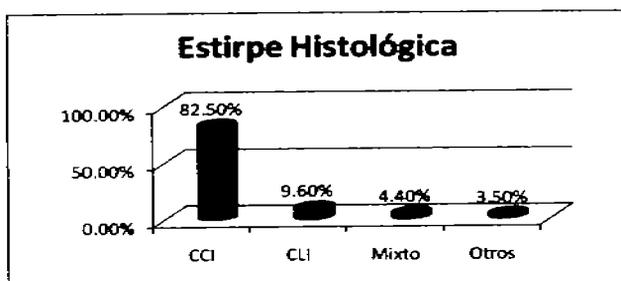
<40 años	15.5 (14/29)	55.7 (60/85)	0.241
>40 años	9.6 (11/29)	19.2 (22/85)	
T >3	23.6 (27/29)	63.1 (72/85)	0.927
T <3	17.5% (2/29)	11.4 (13/85)	
Her2 +	14.09 (18/29)	39.4 (43/85)	0.835
Her2 -	11.4 (13/29)	35 (40/85)	
RH positivos	4.3 (20/29)	58.7 (67/85)	0.281
RH negativos	15.5 (9/29)	15.78 (18/85)	
Canalicular puro	4.3 (5/29)	34.2 (39/85)	0.999
Canalicular mixto	11.5 (20/29)	22.3 (24/85)	
Alto grado	11.4 (19/29)	44.7 (51/85)	0.424
Bajo grado	8.7 (10/29)	25.4 (29/85)	
ML PNL	9.6 (11/29)	69.5 (80/85)	0.040
ML PNL	15.78 (16/19)	14 (16/85)	
CCL	21 (24/29)	61 (70/85)	0.392
CLI	6.14 (7/29)	7 (8/85)	
Mixto	1.7 (2/29)	4.3 (5/85)	
Otros	1.7 (2/29)	1.7 (2/85)	

En esta tabla se puede observar la presencia del polimorfismo con la edad en las pacientes menores de 40 años, tumores mayores de de 3 cm, el estado del Her2Neu, el alto grado de diferenciación, la permeación vascular y el tipo canalicular infiltrante como factores con una tendencia de asociación pero la cual no presentó evidencia significativa (tabla 6)

**Características histológicas y respuesta patológica:** La estirpe histológica más frecuente fue la tipo ductor infiltrante o canalicular infiltrante en un 82.5% y el lobulillar infiltrante fue de 9.6%, en el caso de los tumores mixtos fueron de 4.4%, entre los otros tipos se encontraron las

histologías menos frecuentes el 3.5% los de tipo a respuesta patológica completa fue evaluada en 89 pacientes ya que 21 pacientes no habían completado el tratamiento neoadyuvante y 4 recayeron durante el tratamiento.

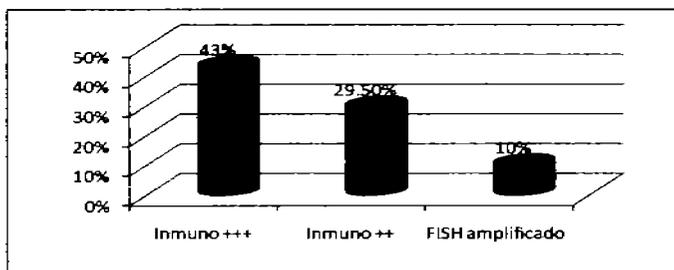
La respuesta patológica completa fue de (37) 41.5% y la enfermedad las que presentaron enfermedad residual fue de 58.4% (52). La permeación vascular y linfática se presentó en un 24% (28) y la presencia de alto grado fue 61.4% (70). El carcinoma canalicular infiltrante se presentó en un 82.5% (94) y el lobulillar en un 7.6% (11), tumores mixtos en un 4.4% (5 pacientes). El 51% de las pacientes presentaron ganglios negativos en la pieza patológica y el 31% eran positivos (gráfica 3).



Gráfica 3.- Estirpe histológica más frecuente

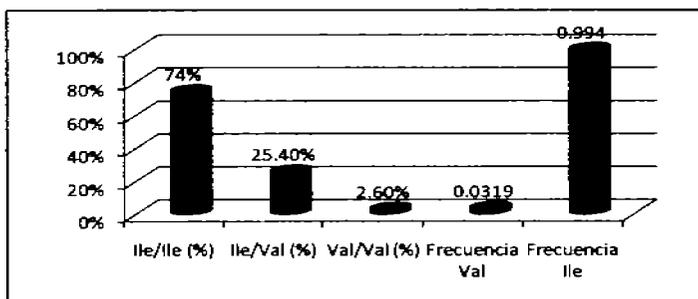
Receptores hormonales y estado de her2Neu en 114 pacientes el 46.5% (53) presentaban RHE positivos y RH Pg 24.6%(28) y la sobreexpresión de Her2Neu 43% (49 pacientes) medido por inmunohistoquímica +++ y a los de 2 cruces se corroboraron por FISH los cuales eres 30% (33) y solo en 10%( 4) fue amplificado, las pacientes triple negativo fueron

13.2%(15); el subgrupo de receptores hormonales negativos y Her2Neu positivo se encontró en 7% (8).



Gráfica 4.- Determinación de Her2Neu por Inmunohistoquímica y FISH.

Frecuencia de polimorfismo de Her2Neu la presencia del polimorfismo en 114 pacientes de un alelo polimórfico (Val) fue de .0319 (29) y el genotipo fue el siguiente Ile/Ile 74.6% (85), Ile/Val 25.8% (29) Val/Val 2.6% (3) (gráfica 5)



Gráfica 5.- Frecuencia de los diferentes genotipos y frecuencia alélica en pacientes con cáncer de mama.

El 16% (19) de las pacientes tenían edad  $\leq 40$  años, de este grupo 7 presentaron polimorfismo, presentando significancia estadística (tabla 7):

<b>Polimorfismo y asociación con menores de &lt;40 Años</b>				
		<b>EDAD_GPO2</b>		<b>Total</b>
		<b>0</b>	<b>1</b>	
<b>POLIMORFISMO</b>	<b>no</b>	<b>63</b>	<b>22</b>	<b>85</b>
	<b>polimorfismo</b>	<b>18</b>	<b>11</b>	<b>29</b>
<b>Total</b>		<b>81</b>	<b>33</b>	<b>114</b>

Tabla 7.- Asociación del polimorfismo con la edad.

**Respuesta patológica y asociación con polimorfismo de Her2:** Las pacientes con respuesta patológica completa y polimorfismo fueron 11 (29.2%), y 26 pacientes con respuesta patológica completa y sin polimorfismo (30.5%). No se encontró asociación entre la respuesta patológica y el polimorfismo. La respuesta completa se presentó en forma significativa en las pacientes con expresión de Her2Neu y que recibieron tratamiento con trastuzumab con una  $p < 0.001$  y con un valor de asociación de 0.772 (tabla 8).

## Respuesta patológica y su asociación con los diferentes factores pronósticos

Tabla 8.- Respuesta patológica y asociación de variables

Her2Neu+	27	7	0.001
Her2Neu -	19	33	
RH Positivos	30	38	0.381
RH negativos	7	14	
	26	1	
	38		

**Supervivencia libre de recaída** el estado paciente fue evaluada desde el tiempo del diagnóstico a la fecha de la última consulta, el seguimiento más prolongado fueron 20 meses, vivas 113 pacientes, muerte en 1 paciente durante el tratamiento, la paciente se encontraba en tratamiento neoadyuvante y falleció por recaída a SNC, 3 pacientes recayeron en forma sistémica a hueso, pulmón y cerebro y 1 paciente con recurrencia local. Cabe mencionar que 4 pacientes progresaron a nivel local durante al tratamiento neoadyuvante.

**Toxicidad cardíaca:** Se evaluaron 107 pacientes para toxicidad cardíaca la cual se determinó por medio del Fracción de Expulsión del Ventrículo Izquierdo (FEVI) determinada por MUGA (multiple-gated acquisition) se compararon dos determinaciones, la basal antes del inicio de la quimioterapia y al término de tratamiento con paclitaxel. Se encontró que el 28% (31 casos) de las pacientes tuvo una disminución de la FEVI menor a 55%,  $p < 0.001$ , sin

embargo, esta disminución en la FEVI fue grado 1, sin repercusión clínica y sin asociarse con la presencia del polimorfismo (ver tabla 9).

### Cardiotoxicidad

Tabla 9.- Cardiotoxicidad y asociación con edad y polimorfismo

Variables	Toxicidad	No toxicidad	P
Polimorfismo	9	19	.667

### Discusión

Este trabajo es el primer estudio en el que se ha determinado la frecuencia del polimorfismo de Her2Neu Ile655Val en población mexicana sana y en pacientes con cáncer de mama. Es también el primer trabajo prospectivo sobre asociación de polimorfismo y cáncer de mama. El tamaño de muestra fue un poco menor al calculado en el diseño, pero se pudo observar que los resultados eran muy similares a los esperados en otras poblaciones.

Las frecuencias que se obtuvieron en la población sana son similares a las de las poblaciones asiáticas para la presencia del genotipo Val/Va (tabla 10).

En el caso de cáncer de mama si se encontraron individuos con el polimorfismo Val/Val, al igual que en otras poblaciones (tabla10) la frecuencia es más alta que para los controles. En México la presencia alélica para Val también es más alta en los pacientes con cáncer de mama como en la población de Shanghái.

Tabla10.- Porcentajes de genotipos de polimorfismos de Her2Ile655Val en las diferentes poblaciones

Población	Personas	No. Pacientes	Genotipos			Frecuencia alélica Val%	Valor de p
			Val/Val	Val/Va	Va/Va		
Hong Kong	Control	205	0%	23.4%	76.6%	11.7	0.022
	Ca de Ovario	250	0%	13.7%	86.3%	6.8	
Británicos	Control	256	0.3%	39.4%	53.9%	26.4	.13
	Ca de mama	315	3.2%	34.6%	60.3%	22.4	.13
Caucásicos	Total	257	5.4	29.2	65.4	20	...

En cuanto a las características de las pacientes, la edad  $\leq 40$  años que en este estudio se encontró en 16% presentó asociación con el polimorfismo Ile655Val de Her2Neu con el riesgo de padecer cáncer de mama. Se han descrito estudios en poblaciones alemanas,

británicas, asiáticas (China) Montgomery y colaboradores<sup>38</sup> en donde la edad y la presencia del polimorfismo se ha relacionado fuertemente, sobre todo en aquellas mujeres menores de 45 años, esto confirmado en los controles y en los casos donde la frecuencia del polimorfismo fue de 7.6 y 3% respectivamente y además se encontró en pacientes con antecedentes familiares de cáncer de mama de primer grado.

En cuanto a las características de las pacientes el tamaño de tumor reportado fue mucho más grandes que los reportados en otros centros como en Europa o en Estados Unidos, esto puede traducir en un diagnóstico más tardío, mayor agresividad y esto relacionado directamente con la supervivencia global.

El estado de los receptores hormonales, Her2Neu y ganglios patológicos no presentó significancia estadística para la asociación entre el polimorfismo. Otras características como los tumores de alto grado en 11.4%(19) se relaciona con peor pronóstico y mayor agresividad de los tumores<sup>39</sup>. El tamaño del tumor también predice la posibilidad de recaer y entre mayor tamaño se presente la recaída a 5 años es mayor al 80% Vagalussa y colaboradores<sup>40</sup>. En el reporte de 1987 de Slamon<sup>35</sup> se hace énfasis a la agresividad de los tumores con respecto a la sobreexpresión de Her2Neu. No se encontró asociación entre la respuesta completa y el polimorfismo y la respuesta completa fue de 41.5% (89). La respuesta patológica completa se ha descrito en diversa literatura como un factor pronóstico muy importante para la supervivencia libre de enfermedad ya que las pacientes que responden a la quimioterapia neoadyuvante tiene mayor supervivencia que las que no la presentan, en este caso, además de tomar en cuenta otros factores como la expresión de Her2Neu, en este estudio se pudo observar que las pacientes con respuesta completa y sobreexpresión de Her2Neu y que

recibieron tratamiento con trastuzumab ( $p < 0.0001$ ) La edad mayor de 40 años se asoció con mayor porcentaje de respuesta patología completa 33%, se intentó relacionar el polimorfismo con la capacidad de respuesta pero aunque se encontró una ligera tendencia no se encontró asociación al momento del análisis no se obtuvo asociación pero tiene algo de tendencia, pero es posible que al incrementar el tamaño de la muestra pudiera hacerse alguna asociación.

En cuanto a la estirpe histológica fue muy similar a lo reportado en la literatura mundial, la mayoría fueron tumores canalicular en el 82% y lobulillar 7.6%, el resto fueron mixtos. El estado de los receptores hormonales positivos (uno de los dos receptores tanto de estrógeno como de progesterona) fue de 73% (87) y la presencia de receptores hormonales negativos y Her2Neu positivos se correlacionó en 7%(8), esto es marcado en la literatura mundial como factor de mal pronóstico.

Se encontró que el 28% (31 casos) de las pacientes tuvieron una disminución de la FEVI menor a 55%,  $p < 0.001$ , sin embargo, esta disminución en la FEVI fue grado 1, sin repercusión clínica y sin asociarse con la presencia del polimorfismo.

La mediana de seguimiento de las pacientes fue de 19.8 meses, con un rango de 6 a 29 meses, 113 pacientes se encuentran vivas, 1 falleció por sospecha de progresión a nivel de sistema nervioso central, 4 pacientes tuvieron progresión durante el tratamiento 3 sistémicas a hueso, hígado, pulmón y sistema nervioso. En 25 pacientes que aun no se habían llevado a cirugía y se analizarán en seguimientos posteriores.

## Conclusiones

En este estudio se pudo conocer la frecuencia del polimorfismo de Her2Neu Ile655Val en la población sana mexicana es de 20.56% y en la población con cáncer de mama es de 25.4% la asociación de las características de las pacientes y la presencia del polimorfismo es más importante o se relaciona hasta el momento en pacientes con edad menor a 40 años, sin que esto llegue a ser concluyente, una posible explicación es la presencia de tumores más agresivos en estas pacientes ya que la mayoría pueden presentar receptores hormonales negativos y tumores de alto grado aunado así la existencia de la sobreexpresión del Her2Neu.

En cuanto al posible desarrollo de toxicidad cardiaca por la existencia del polimorfismo no se demostró que la toxicidad presentada en este estudio 27.1%(31 casos) tuviera relación con el polimorfismo y tampoco fue clínicamente significativa ya que era grado 1.

## Bibliografía

1. Key T, Verkasalo P, Banks E. Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol* 2001; 2:133-140.
2. Porter P. "Westernizing" Women's Risks? Breast Cancer in Lower-Income Countries. *N Engl J Med* 2008; 358:213-6.
3. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J. Cancer Statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007; 57:43-66.
4. Compendio de Cáncer 2003. Registro Histopatológico de Neoplasias. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y control de Enfermedades. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud. México.
5. Archivo INCAN 2006.
6. Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, Orechia R, Viale G. Breast cancer. *Lancet* 2005; 365: 1727-1741.
7. Popat S, Smith I. Breast cancer: Update on cancer therapeutics 2006; 187(1):187-210.
8. Portera Chia C, Swain Sandra M. Neoadjuvant Chemotherapy: A step closer to Individualized therapy. *Educational Book* 2007. ASCO.
9. 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 randomized trials. *Lancet* 2005; 365:1687-1717.
10. Navolinic PM, Steelman LS, McCubrey JA. EGFR family signaling and its association with breast cancer development and resistance to chemotherapy. *Int J Oncol* 2003; 22:237-252.
11. Karunakaran D, Tzahar E, Beerli RR, et al. Erb-2 is common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *EMBO J* 1996;15:254-64.
12. Cordera F & Jordan C. Steroid Receptors and their role in the biology and control of breast cancer growth. *Semin Oncol* 2006; 33:631-641.
13. Yager JD, Davidson N. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med* 2006; 354:270-82.
14. Clemons M, Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 2001; 344:276-85. (Erratum, *N Engl J Med* 2001; 344:1804).

15. Page DL, Rogers LW. Combined histologic and cytologic criteria for diagnosis of mammary atypical ductal hyperplasia. *Hum Pathol* 1992; 23:1095-97.
16. Ross J, Fletcher J, Bloom K, Linette G, Stec J, Symaman F, Pustaztai L, Hortobagy G. Targeted therapy in Breast Cancer. The her2Neu Gene and protein. *Molecular & Cellular Proteomics* 2004; 3:379-398.
17. Gonzalez-Angulo A, McGuire S, Buchholz T *et al.* Factors predictive of distant metastases in patients with breast cancer who have a pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 2005; 23:7098-7104.
18. Mauriac L, Keshaviah A, Debled M, Mouridsen H, Forbes JF *et al.* Predictors of early relapse in postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer in the BIG1-98 trial. *Annals of Oncology* 2007; 18:859-867.
19. Amat S, Abrial C, Penault-Llorca F, Delva R *et al.* High prognostic significance of residual disease after neoadjuvant chemotherapy: a retrospective study in 710 patients with operable breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 2005; 94:255-263.
20. Mazouni C, Kau S. W. Andre F. *et al.* Inclusion of taxanes, particularly weekly paclitaxel, pre-operative chemotherapy improves pathologic complete response rate in estrogen receptor-positive breast cancer. *Annals of Oncology* 2007, 18; 874-880.
21. Nahta R, Esteva J. Herceptin: mechanism of action and resistance. *Cancer Letters* 2006; 232:123-138.
22. Hudis C A. Trastuzumab-Mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med* 2007;357: 39-51.
23. Press MF, Bernstein L, Thomas PH *et al.* Her 2/neu gene amplification characterized by fluorescence *in situ* hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas.
24. Ravdin PM. Is Her2 of value in identifying patients who particularly benefit from anthracyclines during adjuvant therapy? *J Natl Cancer Inst Monogr* 2001; 30-80.
25. Levin B. (2004) *Genes VIII* Person Prentice Hall.
26. Benusiglio PR, Lesuer F, Luccarini C, Conroy D *et al.* Common erb2 polymorphisms and risk of breast cancer in a White British population: a case-control study. *Breast Cancer Res* 2005; 7:R204-R209.
27. Hisida A, Hamajima N, Iwata H, *et al.* Re: Population-based, case-control Her2 genetic polymorphism and breast cancer risk. (Letter) *J Natl Cancer Inst* 200;92, 94:1807-1808.

28. Han W, Kang D, Lee JE et al. A haplotype analysis of HER-2 gene polymorphisms: association with breast cancer risk, HER-2 protein expression in the tumor, and disease recurrence in Korea. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 4775–4778.
29. Fleishman S, Schlesinger J, Ben-Tal N. A putative molecular-activation switch in the transmembranal domain of erb2. *PNAS* 2002; 99:15937-15940.
30. Beauclair S, Formeto P, Fischel J.L., Lescaut W, Largillier R, et al. Role of her2 Ile655Val genetic polymorphism in the tumorigenesis and in the risk of trastuzumab-related cardiotoxicity. *Annals of Oncology* 2007; 18:1335-1341.
31. Frank Bernard, Hemminki Kari, Wirtenberger J et al. The rare ERBB2 variant Ile654Val is associated with an increased familial breast cancer risk. *Carcinogenesis* 2005; 26: 643- 647.
32. Chan Y- K. and Cheung AM. et al. Re: Population-based case-control study of Her2neu genetic
33. Papewalis J, Nikitin AY, Rajewsky MF. A polymorphism at amino acid codon 655 of the human erbB-2/HER2 gene. *Nucleic Acids Res* 1991;19:5452-6 Xie D, Shu XO, Deng Z, Wen WQ, Creek KE, Dai Q, et al. Population-based, case-control study of HER2 genetic polymorphism and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2000;92: ds polymorphism and breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002, 94: 21-23.
34. Wang-Gohrke S, Chang-Claude J. Re: Population-based, case-control study of HER2 genetic polymorphism and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:1657–1659.
35. Cox D, Hankinson S, Hunter D. The erb2/Her2/NEU receptor polymorphism Ile655Val and breast cancer risk. *Pharmacogenetics and Genomics* 2005; 15:447-450.
36. Nelson S. E, Gould M, Hampton J, et al. A case-control study of the her2 Ile655Val polymorphism in relation to risk of invasive breast cancer.
37. Xie D, Xiao-Ou, Deng Zonling et al. Population-based, case-control study of her2 genetic polymorphism and breast cancer risk. *Journal of National Cancer Institute* 2000; 92:412-417.
38. Montgomery Karen G, Gertig, Dorota, Baxter Simon W. et al. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2003, 12: 1109–1111.
39. Slamon Dennis, Clark G, Steven G, Wendy J. Levin. Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplification of the HER-2neu Oncogene. *Science* 1987, 237:177-181.

40. Vagalussa P. Zambbeti M et al. Size of invasive breast cancer and risk of local recurrence after breast-conservation therapy.