

## Hacia una medicina personalizada del cáncer de mama: Importancia de la clasificación molecular del tumor.

*Ana Lluch Hernández\**

Catedrática de Medicina de la Facultad de Medicina de Valencia

La última década la podríamos definir como la más prolífica en cuanto a la generación de conocimientos en el área de la biología molecular del cáncer, y en especial del cáncer de mama. Hemos sido testigos en los últimos diez años de un cambio radical en nuestra manera de entender el cáncer de mama a nivel diagnóstico y terapéutico. Gracias a un avance tecnológico sin precedentes con la aparición y la simplificación de técnicas de biología molecular de alto rendimiento, si bien no se nos ha desvelado la verdadera naturaleza de esta enfermedad, sí hemos podido ver que se trata de una patología que implica mecanismos biológicos complejos a distintos niveles, que precisa de la participación de varias vías de señalización interconectadas entre sí, que no sólo es importante la célula desregulada, sino también el microambiente en el que se desregula y las características constitutivas del paciente, y que todos estos factores influyen en la aparición de la neoplasia, su desarrollo y su respuesta al tratamiento. Todas estas aportaciones nos han permitido entender que la enfermedad neoplásica es única en cada paciente, y con ello avanzar un poco más hacia el tratamiento personalizado.

Hasta la fecha los avances terapéuticos se han alcanzando a través de la realización de grandes ensayos clínicos randomizados; pero estos están diseñados para determinar la mejor aproximación terapéutica en la población media, no en un individuo específico. Es más, hemos aprendido a base de ensayo y error que las nuevas dianas terapéuticas deben ser probadas en poblaciones escogidas en base a marcadores moleculares que predigan respuesta, o corremos el riesgo de no ver que un fármaco es útil en un contexto. Así hoy sabemos que el cetuximab no beneficia a los pacientes con k-ras mutado [1], que el trastuzumab beneficia a las pacientes que presentan amplificación del HER-2 en cáncer de mama [2,3] y en carcinoma gástrico [4] y que erlotinib y gefitinib benefician a pacientes con cáncer de pulmón y mutaciones específicas en EGFR [5,6]. Sin embargo, el campo de la medicina personalizada presenta muchos retos, incluyendo una alta tasa de fallos en terapias dirigidas, la dificultad en la identificación y validación de marcadores moleculares, el hallazgo, a veces inesperado de mecanismos de interrelación molecular, feedback y puenteo que la célula tumoral presenta y le confieren resistencia a la droga estudiada, y un largo etc que hacen de la medicina personalizada un reto lejos de estar resuelto [7].

En estos diez últimos años, el gran desarrollo de tecnologías de alto rendimiento y su aplicación en oncología nos ha ofrecido una cantidad enorme de información en el ámbito de la biología molecular. Si nos centramos en el cáncer de mama, desde la publicación en el año 2000 de los subtipos intrínsecos de cáncer de mama basados en perfiles de expresión génica [8], nuestra manera de entender, clasificar, estudiar y tratar el cáncer de mama, así como de buscar nuevas drogas que aumenten nuestro arsenal terapéutico ha cambiado radicalmente. Peso a ello, tanto en Europa como en Estados Unidos, el cáncer de mama sigue siendo el tumor más frecuentemente diagnosticado en mujeres y; si bien hemos mejorado ostensiblemente su pronóstico, en especial en algunos subtipos como el HER2, con la introducción de dianas terapéuticas específicas; sigue siendo la primera causa de muerte por cáncer en mujeres [9, 10]. Además, aunque en los últimos 15 años la mortalidad por cáncer de mama ha disminuido gracias a los programas de cribado, a una mejora en los programas educativos y a la introducción de tratamientos adyuvantes más eficaces

[11-13], lo cierto es que alrededor de un 20-30% de mujeres diagnosticadas de un cáncer de mama desarrollarán enfermedad metastásica, con una mediana de supervivencia entre 2 y 4 años, dependiendo de la localización y extensión de la recaída, la biología tumoral, la edad y el estado general de la paciente. A pesar de la introducción en estos últimos años de un gran número de nuevos fármacos quimioterápicos y anti-diana, el cáncer de mama metastásico sigue siendo en general una enfermedad incurable. La buena noticia es que cada vez somos más conscientes de la necesidad de implementar nuevos objetivos en los ensayos clínicos que incluyan estudios moleculares y así obtener más información acerca de la naturaleza de la enfermedad que estamos tratando. Con todo ello, el objetivo final de todos los que nos dedicamos a la investigación clínica y traslacional en cáncer de mama es llegar al tratamiento personalizado, con un estudio exhaustivo de cada tumor y de cada paciente, para conocer qué vías moleculares dirigen la supervivencia de cada tumor y cómo reaccionará cada paciente a un tratamiento concreto.

Como hemos mencionado anteriormente, nuestra visión del cáncer de mama cambió radicalmente con la publicación en el año 2000 [8] de una nueva clasificación del cáncer de mama basada en perfiles de expresión génica. Esta nueva clasificación, posteriormente validada [14, 15], se basó en un análisis no supervisado que permite la agrupación de los tumores en función de patrones de expresión génica, sin tener en cuenta variables clínicas ni pronósticas. Este análisis clasifica los tumores en virtud de sus características biológicas y aporta mucha información acerca de las diferencias moleculares entre los diferentes subgrupos. Los subtipos hallados fueron 5, Luminal A y B, HER2 positivo (HER2+), basal-like y normal-breast. Hay que añadir que con este análisis, los autores vieron que los subtipos intrínsecos por perfil molecular estaban claramente relacionados con el pronóstico de las pacientes.

Además de esta plataforma de clasificación, se han desarrollado otras, también basadas en el análisis de expresión génica de diferentes tumores de mama, pero con carácter supervisado. Es decir, estas plataformas se desarrollaron partiendo de casos cuyo pronóstico era conocido, y así se pretende elaborar un listado de genes cuya expresión permite diferenciar cualquier tumor en función de su pronóstico. De estos análisis supervisados, los más conocidos y utilizados en la actualidad son el Oncotype DX [16] y el MammaPrint [17]. Si bien se están desarrollando ensayos clínicos prospectivos para validar estas firmas pronósticas, el MammaPrint ya está aprobado por la FDA y el Oncotype DX es una herramienta muy útil en la clínica puesto que permite discernir aquellas pacientes con carcinoma de mama positivo para receptores de estrógeno (RE) que se van a beneficiar de un tratamiento citotóxico de las que no. Existen otras firmas de expresión génica publicadas aunque menos conocidas, éstas son: wound-response model o modelo de cicatrización [18] el modelo de razón de dos genes (HOXB13: IL17BR) [19], y la firma de los 76 genes de Rotterdam [20, 21].

Ante esta plétora de plataformas de clasificación por expresión génica, con una concordancia entre los genes elegidos prácticamente nula, se realizó un estudio en 2006 [22] que comparaba las 5 plataformas más utilizadas en la actualidad Oncotype DX, MammaPrint, wound-response model, el modelo de razón de dos genes y el modelo de subtipos intrínsecos. En un total de 295 tumores, todos los modelos de expresión génica a excepción de ratio de dos genes predecían la supervivencia libre de progresión (SLP) y la supervivencia global (SG). En los 4 modelos, los grupos de peor pronóstico fueron los esperados: los de un perfil de peor pronóstico en la firma de los 70 genes, los que presentaban una respuesta de cicatrización activada, un alto recurrence score en Oncotype DX y los subtipos intrínsecos Luminal B, HER2 y basal-like. Además, en el análisis multivariado, los perfiles de expresión génica añadían más información pronóstica a los factores pronósticos clásicos. Este estudio demostró que existe correlación entre los distintos modelos de clasificación génica en cuanto a la clasificación por riesgo.

El factor más frecuentemente limitante para el uso de estas plataformas no es sólo el elevado coste, sino que algunas precisan de muestras en fresco o congeladas, lo que limita su aplicabilidad clínica, y lo que ha hecho, en parte, que el Oncotype DX (que utiliza RNA extraído de tejido parafinado) se esté utilizando más frecuentemente en la práctica clínica. Sin embargo, la plataforma Oncotype DX también tiene como factor limitante que clasifica un porcentaje de tumores dentro de un subgrupo de riesgo intermedio, lo que deja al oncólogo a la espera de los resultados del ensayo TailorX con la duda de si tratar con hormonoterapia o si, por el contrario, estas pacientes se beneficiarían de tratamiento quimioterápico.

De todas las plataformas de clasificación mencionadas, la que más información aporta en cuanto a la biología molecular del cáncer de mama es la clasificación por subtipos intrínsecos. Como hemos dicho, agrupa los tumores en 5 subclases que además tienen un correlato pronóstico. Estudiando más detalladamente los genes sobreexpresados en cada uno de estos subtipos tumorales hemos podido empezar a comprender con mucha mayor profundidad las vías de señalización que rigen la oncogénesis y con ello se puede explorar nuevas dianas terapéuticas y desarrollar fármacos dirigidos a controlar la enfermedad de una manera más específica. En esta revisión especificamos brevemente cada uno de los subtipos intrínsecos, con sus características moleculares, clínicas y pronósticas. Para finalizar, resumiremos los avances más importantes en el ámbito de la biología molecular y su aplicación terapéutica en este último año.

## **CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA POR SUBTIPOS INTRÍNSECOS**

### **Luminal A**

El cáncer de mama de perfil luminal A (50-60% del total) se caracteriza por la expresión de genes activados por el RE como factor de transcripción, que se encuentran expresados en el epitelio de la luz de los ductos mamarios. Además, se caracteriza por presentar una baja expresión de genes relacionados con la proliferación celular [8, 14, 23]. A nivel inmunohistoquímico, se ha caracterizado el perfil Luminal A con la expresión de RE, receptor de progesterona (RPg), Bcl-2 y citoqueratina CK8/18 así como un bajo índice proliferativo medido mediante Ki67 y un bajo grado histológico. El mejor punto de corte de expresión en Ki67 para diferenciar entre Luminal A y B se estableció en 13.25% [24] sin embargo, la técnica para la evaluación del Ki67 no ha sido estandarizada, lo que aumenta la variabilidad en la evaluación de dicho factor.

Por otro lado, estos tumores presentan un mejor pronóstico con una menor incidencia de recaídas y con una mayor supervivencia desde el momento del diagnóstico de la recaída. Un estudio publicado el pasado año [25], el primero que evalúa de forma sistemática los patrones de recaída por subtipos intrínsecos, establece que la tasa de recaída en los tumores Luminal A es del 27.8%, siendo ésta significativamente inferior a la del resto de subtipos. Además, la supervivencia de estas pacientes tras la recaída es más prolongada (2.2 años) y el patrón de metástasis claramente diferente. Estas pacientes presentan un mayor índice de recaídas a nivel óseo (18.7%) siendo la tasa de incidencia de recaídas a nivel visceral (SNC, hepática, pulmonar, etc) inferior al 10%. La piedra angular del tratamiento para estas pacientes, tanto en adyuvancia como en el contexto de enfermedad metastásica es la terapia hormonal, o más bien, anti-hormonal, basada en inhibidores de aromatasas (IA) de tercera generación en pacientes postmenopáusicas, moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERMs) como el tamoxifeno y reguladores selectivos puros del receptor de estrógeno como el fulvestran [13].

## **Luminal B**

Los tumores de este perfil de expresión génica suponen un 10-20% de los tumores en total. Presentan un fenotipo más agresivo, un grado histológico mayor, un índice proliferativo más elevado (Ki67 superior a 14%) [24] y un peor pronóstico que los luminales A. Tienen un patrón de recaídas a distancia diferente, ya que, si bien la localización más frecuente de progresión es a nivel óseo (alrededor de un 30%) también presentan una mayor tasa de recidivas viscerales, sobre todo a nivel hepático (13.8%) con una supervivencia inferior desde el momento de la recaída (mediana de 1.6 años) [25]. Este subtipo tumoral sería clasificado por el Oncotype DX y el MammaPrint dentro del grupo de tumores RE positivos con mal pronóstico [22]. Si observamos detenidamente la lista de los 21 genes que componen el Oncotype DX, veremos que el cálculo del recurrence score está basado fundamentalmente en genes implicados en proliferación celular, por lo tanto se entiende que los tumores de perfil luminal B tengan un grado histológico mayor y un ki67 superior. Como hemos dicho, este subtipo tumoral presenta un peor pronóstico al compararlo con los luminales A a pesar del tratamiento con tamoxifeno [16] e IA y si bien responden mejor al tratamiento con quimioterapia neoadyuvante que los luminales A (17% vs 7% respectivamente); su respuesta es claramente inferior si los comparamos con las tasas de respuesta completa patológica (pCR) de los tumores HER-2 positivos y basal-like, con un 36% y 43% respectivamente [26]. Por este motivo, este subtipo de cáncer de mama supone un reto en la actualidad, porque presenta muchos interrogantes acerca de las vías de señalización que se encuentran activadas y conducen su proliferación, supervivencia y capacidad de metastatización. Como veremos más adelante, la profundización en la vía de señalización de PI3K/AKT/mTOR parece haber abierto una ventana terapéutica nueva en este subtipo de carcinoma y son numerosos los ensayos clínicos con moléculas que inhiben esta ruta a diferentes niveles que están siendo enfocados hacia el tratamiento de los tumores luminal B [27].

## **HER2 positivo**

El cáncer de mama HER2 positivo se caracteriza por una elevada expresión del gen HER2 y otros genes asociados a la vía de señalización de este receptor de membrana y al amplicón HER2 localizado en el cromosoma 17q12. Presenta sobreexpresión de genes relacionados con la activación de la proliferación celular. El estudio de la biología de este subtipo tumoral y su abordaje terapéutico han presentado los mayores avances en la última década, hasta culminar en este año pasado en la presentación en el San Antonio Breast Cancer Symposium de los datos de la combinación de terapias anti-HER2 en neoadyuvancia que detallaremos más adelante. El hecho de encontrar una vía de adicción oncogénica que poder inhibir ha revolucionado el campo de la terapéutica en oncología, y así, este subtipo tumoral de mal pronóstico [28], en la actualidad presenta una clara mejora en la supervivencia tanto en enfermedad metastática como en estadios iniciales [3, 29, 30]. Hemos podido comprobar que la inhibición a diferentes niveles de la misma diana terapéutica supone una mejora en la respuesta al tratamiento neoadyuvante y un mayor conocimiento en la biología molecular se ha traducido en la puesta en marcha de ensayos clínicos que combinan drogas que inhiben la misma vía de señalización pero a diferentes niveles de la cascada, con resultados prometedores en cuanto a tasa de respuestas y tolerancia.

## **Basal-Like**

Los tumores de mama basal-like suponen alrededor de un 15% de todos los carcinomas de mama. Sus características clínicas comprenden su desarrollo en edades más tempranas, un predominio en mujeres de origen africano, un tamaño tumoral mayor al diagnóstico, un grado histológico más elevado y una mayor frecuencia de afectación ganglionar [31]. A nivel morfológico, los carcinoma de mama basal-like suelen ser carcinomas ductales infiltrantes, presentan un elevado índice mitótico, necrosis tumoral asociada, márgenes expansivos, y una evidente respuesta linfocítica estromal [32] Este subtipo tumoral presenta un peor pronóstico

cuando se compara con el subtipo luminal [14, 15] y presentan una mayor tasa de recaídas durante los primeros tres años [33]. En cuanto a los patrones de recaída, las metástasis tienden a ser más agresivas y de predominio visceral, sobretodo a nivel pulmonar, del sistema nervioso central y ganglionar. [25, 34]. La mayor agresividad y peor pronóstico podría ser explicada por el alto índice de mutaciones en p53 que presentan estos tumores [14]. Además, los tumores basal-like sobreexpresan citoqueratinas de alto peso molecular como la CK 5/6 y 17, así como laminina, la p-cadherina, caveolinas1 y 2, nestina, CD44 y EGFR [23]. Sin embargo, la característica más representativa de este tipo de tumores es la ausencia de expresión de los tres receptores clave en cáncer de mama RE, RPg y HER2, por lo que en la práctica clínica se asimila el término basal-like al de triple negativo (TN); si bien no son términos 100% intercambiables puesto que una discordancia del 30% ha sido descrita entre los dos grupos [35]. Una definición basada en la ausencia de expresión de receptores no es la más adecuada, dado que aumenta la posibilidad de errores de clasificación, por este motivo se ha ampliado el número de anticuerpos utilizados para clasificar este subtipo de neoplasia mamaria y en la actualidad se utiliza un panel de 5 anticuerpos, RE, RPg, HER2, EGFR y CK5/6 que clasifica este subtipo de tumores con una especificidad del 100% y una sensibilidad del 76% [36].

Por otro lado, las neoplasias mamarias relacionadas con mutaciones en la línea germinal de BRCA1 también caen en el subtipo basal-like cuando se utiliza esta clasificación por subtipos intrínsecos [15]. Esto indica que una alteración que implique una disminución en la función del gen, ya sea por mutación o por mecanismos epigenéticos de silenciamiento, predispone al desarrollo de tumores mamarios del tipo basal-like, una falta de expresión de RE y un peor pronóstico [31]. La inactivación de este gen, fundamental en la reparación del DNA, induce el desarrollo tumoral gracias a un proceso por el que se van acumulando errores dando lugar a una inestabilidad genética. Esta característica ha sido la base para el uso de citostáticos inductores de daño en el DNA como las sales de platino. Otra de las estrategias que se está desarrollando en el tratamiento de los tumores basal-like, o más bien en los TN, es el uso de fármacos anti-diana específicos frente a una enzima que participa en procesos de reparación del DNA, la poli(ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP1).

## **NORMAL-BREAST**

Estos tumores, que suponen alrededor de un 5-10% de todos los carcinomas de mama, están mal caracterizados y se agrupan, dentro de la clasificación de subtipos intrínsecos [8], junto con el tejido mamario normal. Expresan genes característicos de tejido adiposo y presentan un pronóstico intermedio entre luminal y basal-like. Dada la ausencia de expresión de RE, RPg y HER2, también pueden quedar clasificados como TN, pero sin ser basal-like. Puesto que son muy poco frecuentes, poco ha sido estudiado sobre este subtipo y de hecho, existen dudas acerca de su existencia real, pudiendo ser que su aparición como subtipo tumoral se deba a un artefacto técnico (contaminación desproporcionada por alto contenido de tejido normal) en los estudios de microarrays de expresión [23, 37].

## **CLAUDIN-LOW**

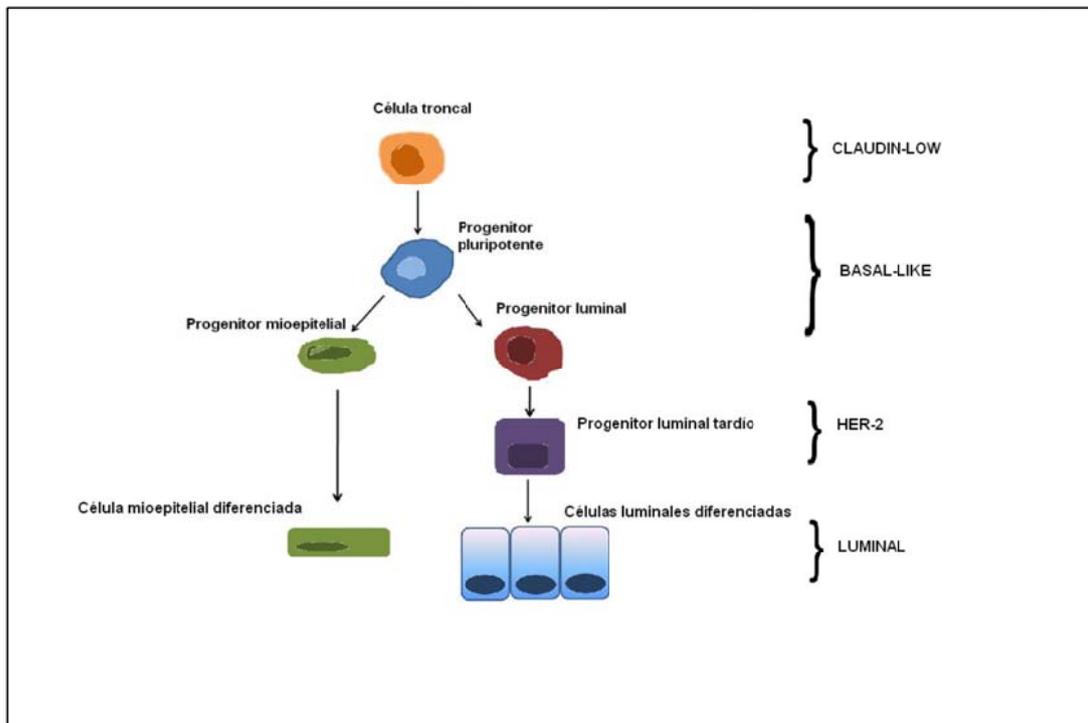
Finalmente, no podemos obviar un nuevo subtipo tumoral que no fue descrito en la clasificación inicial pero que sin duda ha dado mucho que hablar este pasado año, el subtipo claudin-low (bajo en claudina), sobretodo por su implicación en la teoría de las células troncales de cáncer de mama.

Este subgrupo de tumores de mama, fue inicialmente descrito en 2007 [38]. Se caracteriza por presentar una baja expresión de genes relacionados con las uniones estrechas y la adhesión intercelular. El grupo bajo en claudina se sitúa junto al subtipo basal-like en la agrupación jerárquica, lo que indica que ambas clases tumorales comparten algunas características en cuanto a

expresión génica. Sin embargo, este grupo se caracteriza por la baja expresión del grupo de genes de adhesión celular: claudinas 3, 4, 7, cingulina y ocludina, presentes en las uniones estrechas; y e-cadherina, una proteína de adhesión celular dependiente de calcio. Por otro lado, sobreexpresa un grupo de 40 genes relacionados con la respuesta del sistema inmune. Muchos de estos genes se encuentran expresados por linfocitos T y B, lo que indica una alta infiltración de estos tumores por células del sistema inmune [39, 40]. Además, a pesar de presentar un pronóstico desfavorable, los tumores bajos en claudina presentan una baja expresión de genes relacionados con proliferación celular, a diferencia de los subtipos luminal B, HER2 y basal-like, pero sobreexpresan un subgrupo de genes estrechamente ligados con la diferenciación mesenquimal y la transición epitelio-mesenquima. Brevemente añadiremos que la alta expresión de características de mesénquima y la baja representación de genes de diferenciación epitelial se ha asociado a la adquisición de un fenotipo de célula troncal cancerosa (CTC). En resumen, la caracterización molecular de los tumores bajos en claudina sugiere que este subtipo de carcinoma de mama carece de rasgos de epitelio luminal y está particularmente relacionado con las CTCs y la diferenciación mesenquimal, con un microambiente tumoral particularmente enriquecido de células del estroma y/o del sistema inmune.

Clínicamente estos tumores se suelen ser carcinomas ductales infiltrantes, si bien presentan una alta frecuencia de carcinomas metaplásicos o con diferenciación medular [40, 41] y se caracterizan por presentar un alto grado histológico, ser negativos para RE, RPg y HER2 en inmunohistoquímica, es decir, TN, aunque, como en el caso de los tumores basal-like, la concordancia entre la IHQ y los estudios de expresión génica no es del 100% y alrededor de un 20% de tumores bajos en claudina pueden presentar positividad para receptores hormonales [42]. Presentan un mal pronóstico a largo plazo [40] y una pobre respuesta a quimioterapia.

La figura 1 representa esquemáticamente los diferentes estadios evolutivos de las células que componen el tejido glandular mamario así como su hipotético correlato con los diferentes subtipos intrínsecos de cáncer de mama.



**Figura 1.** Esquema representativo de las diferentes subpoblaciones de células que conforman el tejido glandular mamario y su origen. Correlato teórico con el subtipo intrínseco de cáncer de mama que originan [Adaptado de 43].

Si por algo se han caracterizado estos últimos años es por la profundización en vías de señalización que dirigen procesos constitutivos de la carcinogénesis, como son la proliferación y crecimiento celular sostenidos, la desregulación del metabolismo celular y la inestabilidad genética, así como los procesos de neoformación vascular [44]. En este segundo apartado resumiremos las principales aportaciones en estas áreas, así como los avances terapéuticos alcanzados.

A diferencia de las células normales, las células neoplásicas tienen una menor dependencia de estímulos exógenos que condicionan su crecimiento. De hecho, las células tumorales pueden adquirir la capacidad de una señalización pro-proliferativa sostenida y no sujeta a los controles sistémicos habituales gracias a varios mecanismos. Entre ellos podríamos destacar la capacidad adquirida de producir sus propios factores de crecimiento que estimulen sus receptores de una forma auto o paracrina; también pueden emitir señales de estímulo a células normales del estroma circundante que recíprocamente producirán los factores de crecimiento que la célula neoplásica precisa [45]. Otros mecanismos desarrollados son la sobreexpresión y la adquisición de mutaciones en los receptores de dichos factores o en los efectores intracelulares, de forma que la vía de señalización proliferativa se encuentre activada independientemente de la presencia o no del ligando activador.

Uno de los mejores ejemplos en cuanto a actividad oncogénica dependiente de receptores de membrana viene representado por la familia de Human Epidermal Receptor o HER. Se trata de una familia de receptores de membrana que constan de un dominio extracelular a través del cual se unen al ligando, un dominio transmembrana y un dominio intracitoplasmático con actividad tirosina-cinasa. En la actualidad esta familia consta de cuatro miembros [46] HER1, o EGFR, HER2, HER3 y HER4 que tras la unión con el ligando, forman homo o heterodímeros activando así su función tirosina-cinasa en el lado citoplásmico. A raíz de este proceso se activan las tres principales vías de señalización: la vía Ras/Raf/MAPK, la vía Jak/Stat y la vía PI3K/Akt/mTOR. Las tres vías regulan funciones celulares como el crecimiento y supervivencia celular, la proliferación, la división y la apoptosis, así como funciones de migración y metabolismo. (Figura 2) [47, 48].

En cáncer de mama, el subtipo HER2 es un claro ejemplo de adición oncogénica a una vía de señalización. Históricamente, las pacientes con este subtipo tumoral suponían un reto para el oncólogo, puesto que presentar una sobreexpresión de HER2 o una amplificación del gen era sinónimo de mal pronóstico [28]. Con la introducción de trastuzumab en combinación con quimioterapia primero en el contexto de enfermedad metastática [29] y posteriormente en adyuvancia [3] hemos logrado que el riesgo de recaídas descienda en un 50% aproximadamente, lo que ha supuesto una mejora en la supervivencia de más de un 33%, algo sin precedentes en el tratamiento del cáncer en general.

En este aspecto, el año 2010 supuso un gran avance en el tratamiento de este subgrupo. En el Symposium de San Antonio Breast Cancer se presentaron los resultados de los ensayos en neoadyuvancia que introducían por primera vez terapia anti-HER2 combinada. El estudio Neo-ALTTO [49] evaluaba la eficacia de lapatinib, trastuzumab o su combinación junto con paclitaxel en cáncer de mama HER2 positivo. El objetivo primario de este estudio era evaluar y comparar la tasa pCR entre las tres ramas. Este estudio presentaba un diseño innovador en tanto que las pacientes, antes de iniciar el tratamiento con quimioterapia, recibían 6 semanas de tratamiento biológico exclusivamente, con biopsias antes y en el día 15 del tratamiento lo que nos aportará mucha información en cuanto a la biología molecular de este subtipo tumoral y nos permitirá profundizar en los mecanismos de respuesta/resistencia a las diferentes terapias anti-HER2. En cuanto a los resultados presentados, se vio que la combinación de lapatinib-trastuzumab era significativamente superior en cuanto a tasa de pCR cuando se comparaba con trastuzumab o

lapatinib (51.3% vs 29.5% vs 24.7% respectivamente; p 0.01). Estos resultados, junto con los del ensayo Geparquinto [50], que también muestran una mayor tasa de pCR cuando la quimioterapia se combina con trastuzumab y no así con lapatinib, nos apuntan al papel de la citotoxicidad mediada por anticuerpos como otro de los mecanismos de acción de trastuzumab. Por otra parte, se presentó el estudio NeoSphere [51] un ensayo fase II randomizado que exploraba el papel de la combinación de trastuzumab con pertuzumab (otro anticuerpo monoclonal anti-HER2 que inhibe la dimerización del receptor de membrana) también en neoadyuvancia. El esquema de este estudio era randomizar a las pacientes a recibir 4 ciclos de trastuzumab en combinación con docetaxel, docetaxel con pertuzumab y trastuzumab, pertuzumab en combinación con docetaxel, o tratamiento neoadyuvante con los dos monoclonales sin docetaxel. Este estudio es metodológicamente similar al NeoALTTO en cuanto que su objetivo primario también era evaluar la tasa de pCR. El estudio contemplaba el análisis de biomarcadores de respuesta antes y tras recibir el tratamiento. Los resultados del NeoSphere también han sido muy alentadores. En la rama que combinaba los dos anticuerpos con docetaxel la tasa de pCR fue del 45.8%, comparado con un 29.0% y 24.0% en las ramas que combinaban docetaxel con trastuzumab o pertuzumab respectivamente. Pero lo más destacable quizá sea que un 17.8% de las pacientes alcanzó pCR habiendo recibido sólo los dos anticuerpos, lo que abre una puerta más a la idea de que en un futuro podríamos elegir pacientes para no recibir tratamiento citotóxico ya que una estrategia anti-diana específica bien diseñada sería suficiente para curar a estas pacientes.

Otra de las nuevas moléculas basadas en el receptor de membrana HER2 que han tomado importancia es el Trastuzumab-DM1 (T-DM1). Se trata del primer fármaco que conjuga trastuzumab con un agente citotóxico, la maytansina o DM1, un agente anti-microtúbulo, de forma que este potente agente citotóxico actúa de manera selectiva en las células que sobreexpresan el receptor, limitando así la toxicidad sistémica. Los resultados del ensayo clínico fase II publicados a finales del 2010 revelaron que en monoterapia y en pacientes que previamente habían recibido varias líneas anti-HER2 (mediana de 8 líneas previas), el T-DM1 conseguía tasas de respuesta de alrededor del 25% con una mediana de SLP de 4.6 meses. Los resultados y la excelente tolerancia han alentado el inicio de dos ensayos fase III que están en marcha en la actualidad (Marianne y Emilia), uno evalúa la actividad de T-DM1 frente al estándar docetaxel-trastuzumab en primera línea de enfermedad metastásica y el segundo evalúa su eficacia frente capecitabina-lapatinib en segunda línea [52]. Además, este pasado año se presentaron los varios ensayos fase I que combinaban el T-DM1 con otras terapias dirigidas como por ejemplo, inhibidores de la PI3K [53] con algunos datos preliminares de respuesta clínica, lo que afianza nuestro avance en el terreno de la terapia dirigida.

La proliferación celular descontrolada que se da en el desarrollo neoplásico no sólo implica una desregulación en el control del crecimiento y división celular, también supone un ajuste en el metabolismo celular que asegure una fuente energética constante. Ya en los años 30 del siglo pasado se describió este fenómeno de metabolismo energético anómalo por el que las células tumorales reprograman el metabolismo de la glucosa, limitándolo en gran parte exclusivamente al proceso de glicolisis [54]. Debido a este fenómeno, denominado efecto Warburg o glicolisis aeróbica [44], las células tumorales tienen que compensar por preferir un mecanismo mucho más ineficiente para la obtención de energía.

Otra de las vías implicadas en el crecimiento celular y la proliferación sostenida que ha cobrado protagonismo esta pasada década y sobre la que se ha publicado mucho en cáncer de mama este último año es la vía del PI3K/AKT/mTOR. Esta vía está íntimamente relacionada con la regulación del metabolismo celular ya que, como es lógico, la señalización energética en cáncer regula el crecimiento y supervivencia celular. En este apartado de metabolismo celular y cáncer

podríamos hablar brevemente de enfermedades, como la obesidad y la diabetes mellitus, estrechamente relacionadas con el metabolismo y la desregulación de las vías energéticas que han sido ligadas epidemiológicamente el cáncer de mama.

La obesidad es un factor de riesgo para desarrollar cáncer de mama en pacientes postmenopáusicas y a su vez se han relacionado con un mayor riesgo de recaída y un peor pronóstico en términos de supervivencia global [55-57]. A nivel molecular, la explicación de esta relación se ha establecido a través de dos posibles vías, la de los receptores de estrógenos y la del receptor del Insulin like Growth Factor 1 (IGF1). Tras la menopausia, la principal fuente de estrógenos es la conversión de androstenodiona a estrona gracias a la acción de la aromatasa en el tejido adiposo. Esto conlleva un mayor nivel de estrógenos en mujeres obesas postmenopáusicas que en mujeres de la misma edad y con un índice de masa corporal (IMC) normal [58-59]. Un trabajo publicado en julio de este año pasado [60] analizó el impacto de la obesidad en el pronóstico de pacientes con carcinoma de mama intervenido y tratadas con Tamoxifeno 20mg/día o anastrozol 1mg/día dentro del ensayo clínico ATAC. Los autores concluyen que las pacientes obesas presentaban un peor pronóstico y si bien el anastrozol mantenía su superioridad con respecto a tamoxifeno independientemente del IMC, la eficacia relativa del IA comparado con tamoxifeno era superior en mujeres delgadas. Este estudio descriptivo no establece una base biológica definida por la que se explique este fenómeno, pero si se apunta a varias hipótesis. Por un lado, como hemos descrito previamente, la principal fuente de estrógenos en la mujer postmenopáusica es el tejido adiposo, por este motivo es plausible pensar que a igualdad de dosis de IA, el efecto será inferior en pacientes con mayor IMC. Para evaluar esta hipótesis sería necesario un estudio de supresión estrogénica mediante IA en función del IMC [60]. Pero la obesidad no sólo se relaciona con un peor pronóstico en el cáncer de mama vía una conexión estrogénica [61] también existen otros factores relacionados con la obesidad que pueden influir en el crecimiento tumoral independientemente de los niveles de estrógenos. La obesidad condiciona la presencia de factores asociados como la resistencia a la insulina, las adipocitoquinas y mediadores de la inflamación que pueden influir a nivel molecular en vías de proliferación celular y metabolismo anómalo que favorezca la oncogénesis [62]. Como hemos especificado previamente, otra de las vías posiblemente implicadas en la desregulación del metabolismo celular en cáncer es la del IGF1. Esta vía, de la cual presentamos un esquema en la figura 2, en condiciones normales se activa cuando existe un aporte de nutrientes adecuado promoviendo la biosíntesis de lípidos, proteínas y glucógeno. Por el contrario, la vía de la cinasa activada por adenosina monofosfato (AMPK) (figura 2) se activa cuando las células presentan una carestía energética e inhibe estos procesos de biosíntesis [63].

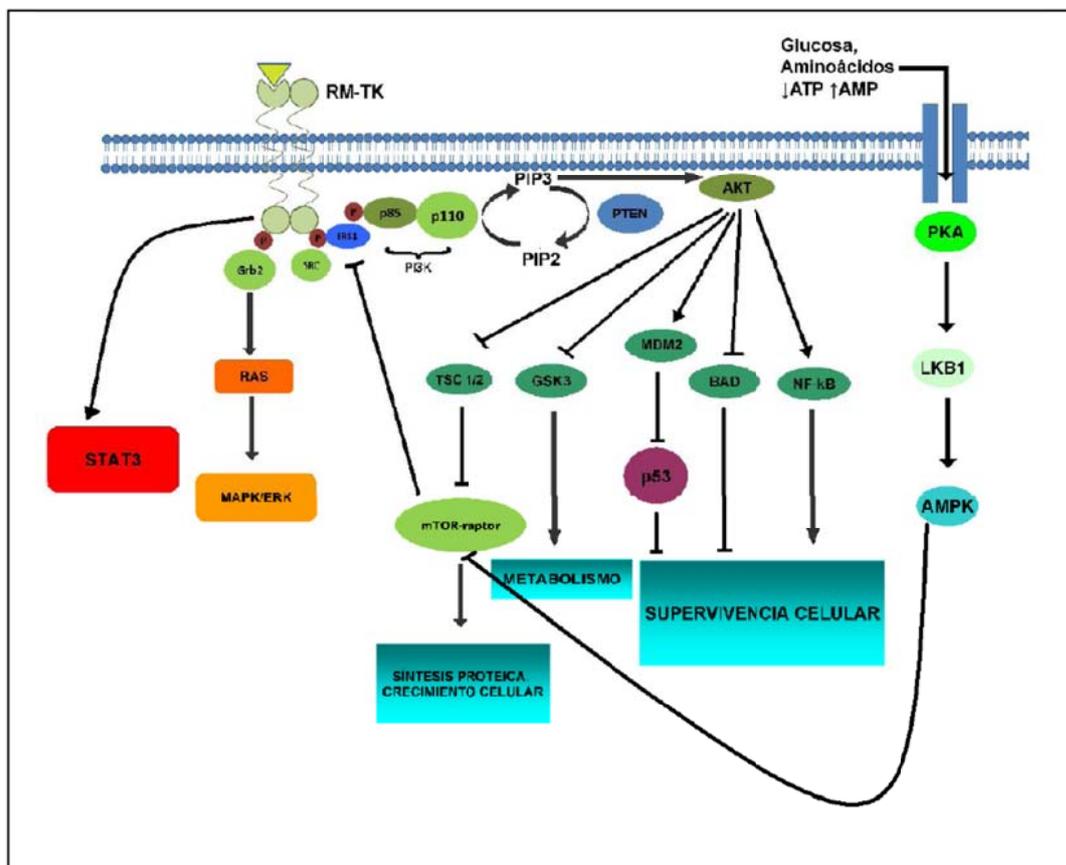
La unión del IGF1 a su receptor (IGF1-R) conlleva la autofosforilación de residuos de tirosina en el dominio cinasa intracelular del mismo, lo que inducirá la fosforilación de residuos de tirosina y serina del sustrato del receptor de insulina (IRS) y de Src con la subsiguiente activación de PI3K/AKT/mTOR y de la vía de las MAPK [64, 65]. La vía del IGF se regula a múltiples niveles, desde la disponibilidad de ligando hasta la autoregulación por mecanismos de retroalimentación negativa vía mTOR [66]. En cuanto a su papel en la oncogénesis, estudios preclínicos han demostrado que la sobreexpresión de IGF1-R puede inducir la formación de neoplasias y facilitar la metastatización [67].

Dado el papel de esta vía en la regulación del metabolismo de la célula neoplásica y su papel en la promoción del crecimiento y la supervivencia celular, cada una de las moléculas que la integran es una posible diana terapéutica. Además, esta vía presenta frecuentemente mutaciones activadoras a nivel de receptor de membrana, de la subunidad catalítica de PI3K, AKT o de pérdida de función de inhibidores de la vía como PTEN y TSC1/2 [68]. De hecho, algunas series

retrospectivas han definido mutaciones activadoras en la subunidad catalítica de PI3K en hasta un 20-25% de los tumores mamarios, variando este porcentaje en función del subtipo de carcinoma del que se trate [69]. Este porcentaje de mutaciones asciende a 35% en tumores positivos para RE, y se postula que una hiperactivación de esta vía, así como de la vía de las MAPKs, conlleva una interacción con la vía de activación de los RE confirmando resistencia a los tratamientos antihormonales convencionales [70]. Además, mutaciones en esta vía han sido relacionadas con mecanismos de resistencia a agentes anti HER2 [71].

Estos datos, más los obtenidos en los estudios de farmacodinámica de ensayos fase I de inhibidores de mTOR [72] en los que se subrayó el que la pérdida de la autorregulación negativa sobre PI3K y AKT de mTOR tras su inhibición farmacológica resulta en un aumento de la actividad PI3K y por ende, se pierde el efecto antiproliferativo de la inhibición de mTOR, nos han hecho cambiar la estrategia en el desarrollo de este tipo de fármacos dirigidos. En la actualidad se está optando por una inhibición dual de la vía, de forma que se asegure un bloqueo más efectivo. En este sentido, un ensayo fase I cuyos resultados fueron presentados en ASCO del 2010 [73] exploraba la combinación de ridaforolimus (un inhibidor oral de mTOR) con dalotuzumab (un anticuerpo monoclonal frente IGF1-R) demuestra que la combinación no sólo tiene un perfil de toxicidad aceptable sino que además presentaba una actividad antitumoral prometedora en pacientes con cáncer de mama avanzado RE positivo y alto índice proliferativo, que podríamos asimilar al grupo luminal B, subgrupo que presenta resistencia al tratamiento hormonal en parte debido a la hiperactivación de vías de supervivencia celular como la del PI3K/AKT.

Otra de las vías implicadas en la regulación del metabolismo celular es la del AMPK, que, como hemos dicho, se encuentra estrechamente relacionada con la vía del IGF1-R y del PI3K. Su activación contrarresta la activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR, inactiva muchos procesos metabólicos que dependen de la presencia de niveles adecuados de ATP en la célula, como la gluconeogénesis y la síntesis de ácidos grasos, colesterol y proteínas, promoviendo procesos catabólicos. Además, la vía del AMPK tiene un doble efecto inhibitorio sobre mTOR, a través de la fosforilación de TSC2 y de raptor (figura 2) [74, 75]. Estos datos apoyan la activación de la vía del AMPK para contrarrestar la hiperactivación de la vía mTOR. Uno de los fármacos propuestos para dicha activación es la metformina. De hecho, existen numerosos estudios preclínicos que avalan la capacidad antiproliferativa de la metformina en modelos de carcinogénesis *in vitro* e *in vivo*, y se han publicado datos acerca de su capacidad de inducir muerte celular en modelos de células troncales de carcinoma de mama [76] existiendo en la actualidad varios ensayos clínicos que exploran el papel de este fármaco en cáncer de mama avanzado así como en adyuvancia y neoadyuvancia ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).



**Figura 2.** Vía de señalización del PI3K/AKT/mTOR y de AMPK. La activación de receptores de membrana con actividad tirosín kinasa (RM-TK) como la familia HER e IGF1-R provoca la activación de fenómenos de dimerización de receptores, fosforilación y activación de efectores intracitoplasmáticos. AKT se activa vía PI3K y tiene múltiples dianas, entre ellas, mTOR, que tras su activación puede ejercer su función activando mecanismos de síntesis proteica y crecimiento celular. Los sensores de energía celular LKB1 y AMPK ejercen un efecto opuesto, inhibiendo mTOR. La activación de RM-TK también conduce a la activación de otras vías como la de las MAPK y STAT3 [Adaptado de 65 y 68]

Para que un tumor se inicie y adquiera todos los requisitos necesarios para su desarrollo, supervivencia y capacidad de metastatización, debe adquirir una serie de características fundamentales. Estas capacidades van desde la habilidad para escapar a la respuesta inmune, la generación de neovasos, la proliferación descontrolada obviando mecanismos de apoptosis, etc [44]. Muchas de estas características las alcanzan a través de mutación de genes que confieren ventajas en supervivencia. Estas mutaciones se deben a un fallo en el sistema de mantenimiento del DNA, y así se van sucediendo errores no reparados que conllevarán pérdida de función en genes supresores de tumores y ganancia de función en oncogenes, lo que finalmente favorecerá la carcinogénesis. Este es el mecanismo de carcinogénesis que se da en los tumores de mama que se generan en base a la inactivación de BRCA1, ya sea por silenciamiento o mutación.

El uso de inhibidores de la PARP1 se basa en esta incapacidad de la célula para reparar el daño en el DNA, inducido por el uso concomitante de agentes citotóxicos que generan roturas en la cadena de DNA como las sales de platino. Así, la célula, al carecer de dos mecanismos esenciales para reparar el DNA (BRCA1/2 y PARP) acumula una serie de aberraciones cromosómicas que la obligan a entrar en apoptosis. Un ensayo clínico fase II basado en este concepto de letalidad sintética, randomizaba a pacientes con carcinoma de mama metastático TN a recibir carboplatino-gemcitabina con o sin el inhibidor de PARP1 iniparib [77]. La rama que incluía el inhibidor consiguió una mejora en la SLP de 2 meses y una mejora en SG cercana a los 5 meses. Así se abría

la puerta a lo que prometía ser la primera terapia anti-diana en cáncer de mama TN. Sin embargo, recientemente se ha comunicado que en la evaluación preliminar del ensayo fase III con iniparib no se cumplen los objetivos primarios de mejora en SLP y SG, lo cual nos vuelve a dejar con un panorama un tanto descorazonador para el tratamiento de este subtipo tumoral “huérfano”.

Finalmente, añadir que, como hemos explicado antes, otro tipo de fármacos que se está explorando en el contexto del carcinoma de mama basal-like y también en la línea de provocar una mayor inestabilidad genómica son las sales de platino. La tabla 1 resume los principales ensayos clínicos con resultados publicados a fecha de hoy que evalúan el papel de las sales de platino en contexto de neoadyuvancia y enfermedad metastática TN.

**Tabla 1.**

**Tabla 1.** Resumen de ensayos clínicos que introducen sales de platino en el tratamiento de cáncer de mama triple negativo.

Ensayo	Fase	Agente terapéutico	Régimen	N	Eficacia					
					pCR (n)	TR (n)	EE (n)	BC (n)	SLP (meses)	HR (95% IC)
Gronwald <sup>78</sup> (BRCA1)	II	CDDP	Neoadyuvancia CDDP 75mg/m <sup>2</sup> c3s x 4 ciclos	25	72% (18)	NA	NA	NA	NA	NA
Garber <sup>79</sup> (pacientes TN)	II	CDDP	Neoadyuvancia CDDP 75mg/m <sup>2</sup> c3s x 4 ciclos	28	22% (6)	NA	NA	NA	NA	NA
Ryan <sup>80</sup> (pacientes TN)	II	CDDP, Bevacizumab	Neoadyuvancia CDDP 75mg/m <sup>2</sup> c3s x 4 ciclos + bevacizumab 15mg/kg c3s x 3 ciclos	51	16% (8)	NA	NA	NA	NA	NA
O'Shaughnessy <sup>81</sup>	II	Cetuximab	ICb ± cetuximab	103	NA	49% vs 30%	NA	NA	NA	NA
TBCRC 001 <sup>82</sup>	II	Cetuximab, Cb	Cetuximab ± Cb	102	NA	18% vs 6%	9% vs 4%	27% vs 10% <sup>a</sup>		
O'Shaughnessy <sup>77</sup>	II	BSI-201	Cb-gem ± BSI-201	120	NA	48% vs 16% p= 0.002		62% vs 21% p= 0.0002 <sup>a</sup>	6.9 vs 3.3 p< 0.0001	0.34 (0.2-0.58)
Baselga BALI-1 <sup>83</sup>	II	CDDP, Cetuximab	CDDP 75mg/ m <sup>2</sup> c3sx 6 ciclos ± cetuximab semanal 400mg/m <sup>2</sup> seguido de 250mg/m <sup>2</sup>	48	NA	20% vs 10% p=0.5	NA	NA	3.7 vs 1.5	0.675 (0.47-0.97)

CDDP, cisplatino; ICb, irinotecan; Cb, Carboplatino; Gem, Gemcitabina

pCR, Respuesta patológica completa; TR, Tasa de respuestas (respuesta completa + respuesta parcial); EE, Enfermedad estable; BC, Beneficio clínico; SLP, Supervivencia libre de progresión; HR, Hazard ratio; NA, No aplicable.

<sup>a</sup> BC= RC + RP + EE > 6 meses

La angiogénesis es uno de los procesos constitutivos del desarrollo neoplásico a través del cual los tumores se aseguran el aporte de nutrientes y oxígeno así como una vía de eliminación de residuos metabólicos y dióxido de carbono [44]. El proceso de angiogénesis está finamente regulado en los tejidos adultos normales, de forma que éste sólo se activa de forma transitoria en momentos concretos como la cicatrización y del ciclo reproductor femenino. Durante la carcinogénesis, esta activación se perpetúa, de manera que, un proceso que normalmente se encuentra quiescente, se ve activado continuamente dando lugar a la formación de nuevos vasos que soportarán la lesión neoplásica durante su formación, crecimiento, expansión y metastatización.

Uno de los factores más importantes en la activación de la angiogénesis es el *vascular endothelial growth factor- A* (VEGF-A). El gen de VEGF-A da lugar a diferentes ligandos vía splicing alternativo [84] que están implicados en la neovascularización durante el desarrollo embrionario y postnatal. Su señalización se realiza a través de tres receptores de membrana del tipo tirosín-cinasa, los VEGFR 1-3 [85]. La neovasculatura tumoral se caracteriza por ramificación capilar excesiva, distorsión arquitectural de los neovasos, flujo sanguíneo errático, permeabilidad excesiva, microhemorragias, apoptosis y proliferación de células endoteliales anormal [86]. Otra de las características importantes de la neoangiogénesis tumoral es que se trata de un proceso que empieza ya en las fases precoces de la carcinogénesis y se mantiene a lo largo de todo el proceso de desarrollo y metastatización tumoral; pero es en las fases precoces donde el VEGF-A parece tener un papel predominante sobre el resto de factores de crecimiento y citoquinas que pueden regular la vasculogénesis tumoral. Así pues, dado su papel en la neoangiogénesis tumoral como su limitada actuación en la fisiología tisular del adulto, el VEGF es una diana terapéutica ideal. El 2010 ha sido el año de revisar los datos de anti-angiogénesis que teníamos para salir reforzados acerca de la importancia que tiene interferir en este aspecto del desarrollo neoplásico.

Los tres estudios que apoyan el uso de bevacizumab en el contexto de enfermedad avanzada HER2 negativa son el ensayo fase III E2100 [87], el AVADO [88] y el RIBBON-1 [89]. Todos ellos han demostrado una mejora en la SLP a favor de la rama que combina tratamiento citotóxico con el monoclonal. Un metaanálisis presentado en ASCO del 2010 [90] resume certeramente la información aportada por estos tres estudios. Los tres ensayos han demostrado una mejora significativa en la SLP para bevacizumab en combinación con quimioterapia, independientemente del status de los receptores hormonales, la localización y el número de lugares metastáticos, el intervalo libre de enfermedad y el uso previo de taxanos. Así pues, en este análisis conjunto se evaluaron el total de las 2646 pacientes incluidas en los tres estudios. Se concluyó que la mediana de SLP es, para la combinación de quimioterapia con bevacizumab de 9,2 meses, y ésta es significativamente superior a la mediana de SLP con quimioterapia sólo, de 6,7 meses, con un hazard ratio (HR) de 0,64 (IC 95% 0,57-0,71). En el análisis por subgrupos todos ellos se beneficiaban de la combinación de bevacizumab con quimioterapia. Además, la tasa de respuestas objetivas fue del 49% con la combinación y sólo del 32% en ausencia de bevacizumab, sin embargo, al igual que con los estudios por separado, no se encontraron mejorías en cuanto a SG.

Otro metaanálisis presentado en San Antonio Breast Cancer Symposium también en 2010 [91] realizaba una evaluación del impacto de la adición de ese monoclonal al tratamiento quimioterápico en las pacientes con carcinoma de mama TN. Como hemos dicho, este subtipo de carcinoma se caracteriza por la ausencia de diana específica a inhibir en la actualidad; lo que hace más urgente el encontrar terapias dirigidas que aumenten la eficacia terapéutica. El análisis incluía las 621 pacientes diagnosticadas de neoplasias que cumplían la característica de ser TN en los tres ensayos randomizados mencionados previamente. En este metaanálisis también se puso de manifiesto que la combinación del anticuerpo frente a VEGF con quimioterapia era superior en

cuanto a SLP con una mediana de 8,1 meses vs 5,4 meses en la rama sin bevacizumab (HR 0,68; IC 95% 0,538-0,783) y una mayor tasa de respuestas objetivas (42% vs 23% a favor de la combinación). Además, el porcentaje de pacientes con resistencia primaria al tratamiento fue significativamente inferior en la rama de la combinatoria (11% vs 28%).

En un afán por definir otras subpoblaciones que se beneficien de la adición de bevacizumab al tratamiento de quimioterapia otro subanálisis expone que aquellas pacientes que ya han recibido tratamiento con taxanos con anterioridad [92] se benefician más de recibir taxanos de nuevo si es en combinación con bevacizumab.

Tras obtener una aprobación acelerada por la FDA para su uso en combinación con paclitaxel en primera línea de cáncer de mama metastático, en la actualidad esta decisión está siendo replanteada. Se está cuestionando que la mejora en SLP que bevacizumab ofrece sea un parámetro lo suficientemente bueno como para determinar un cambio en nuestra práctica clínica. Está claro que nada es más objetivo midiendo un beneficio real derivado de un tratamiento que la SG. Sin embargo, si tenemos en cuenta la mayoría de estudios fase III randomizados en cáncer en general y en carcinoma de mama metastático en concreto, rara vez el objetivo principal del estudio es encontrar una mejoría en la SG. Si bien es cierto que en la mayoría de ellos se incluye como un objetivo secundario, los estudios no están potenciados en la mayoría de los casos para encontrar diferencias a este nivel [93.]. Tratándose de cáncer de mama metastático, con un arsenal terapéutico especialmente amplio, encontrar diferencias en SG cuando este parámetro se verá influido por todas las terapias sucesivas que las pacientes recibirán a la progresión, se precisarían ensayos clínicos con poblaciones mayores, aumentando su coste, el tiempo invertido, y el tiempo necesario para sacar conclusiones válidas que mejoren nuestra práctica clínica. Además, la ausencia de prolongación en la SG estadísticamente significativa no implica una falta de mejoría real en SG. De hecho, es muy difícil demostrar un efecto del tratamiento sobre la SG dado que ésta depende de la supervivencia post-progresión (SPP), es decir, el tiempo transcurrido entre la progresión al tratamiento que se está evaluando y la muerte. Considerando datos estadísticos, la probabilidad de encontrar un beneficio en SG es inferior al 30% si la SPP es mayor de 12 meses [94]. En los estudios fase III E2100, AVADO y RIBBON-1 la SPP es superior a 12 meses, y en concreto, en el AVADO y RIBBON-1 es superior a 20 meses [90], lo que dificulta sobremanera encontrar una mejora en la SG, a no ser que se modifiquen los estudios como hemos especificado previamente (aumento de la población, tiempo invertido, seguimiento) con el sobrecoste adicional que ello supone.

A fecha de hoy consideramos que bevacizumab ha demostrado, con un nivel de evidencia I, una mejora en la SLP cuando se combina con quimioterapia de primera línea en tratamiento de cáncer de mama metastático. Consideramos además que beneficia a todos los subgrupos de pacientes, en especial a las pacientes con carcinoma de mama triple negativo cuyo pronóstico hace necesaria la búsqueda e introducción de nuevas dianas moleculares. Y por supuesto, hace falta volver al laboratorio y a nuestros pacientes y contestar mejor a las preguntas ¿cuándo puedo dar bevacizumab? Y ¿quién se va a beneficiar realmente de este agente biológico? Aunque, como hemos dicho, a fecha de hoy, sabemos que bevacizumab es útil, aunque no tengamos todas las preguntas contestadas.

## **Conclusiones**

La pasada década ha supuesto un avance muy importante en la investigación en cáncer. El desarrollo excepcional de tecnologías de alto rendimiento, la introducción de la bioinformática y la integración de estudios moleculares en los ensayos clínicos ha generado una cantidad ingente de información sobre la naturaleza de esta enfermedad. En cáncer de mama hemos aprendido que no

sólo existe un tipo de tumor sino varios, con sus especificidades a nivel molecular que se traducen en respuestas al tratamiento diferenciadas y en pronósticos claramente dispares. Además, hoy sabemos que si identificamos la vía de regulación principal implicada en el desarrollo neoplásico, podemos hacer un uso más racional de los fármacos disponibles minimizando la toxicidad.

Los ensayos clínicos en cáncer han supuesto tradicionalmente la inclusión de pacientes con enfermedad no caracterizada molecularmente, lo que en muchas ocasiones nos ha llevado a perder en el camino fármacos potencialmente eficaces en contextos determinados. La aprobación de un fármaco y un cambio en nuestra práctica clínica implicaba la realización previa de ensayos clínicos con poblaciones grandes, largo tiempo de seguimiento y costosas inversiones. Este cambio en nuestra manera de abordar la investigación en cáncer nos está permitiendo avanzar de forma más rápida y segura hacia el objetivo que todos tenemos en mente, la medicina personalizada.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Van Cutsem E, Köhne CH, Láng I, et al. Cetuximab Plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin As First-Line Treatment for Metastatic Colorectal Cancer: Updated Analysis of Overall Survival According to Tumor KRAS and BRAF Mutation Status. *J Clin Oncol*. 2011 Apr 18. [Epub ahead of print]
2. Marty M, Cognetti F, Maraninchi D, Snyder R, 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 Jul 1;23(19):4265-74.
3. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005 Oct 20;353(16):1659-72.
4. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*. 2010 Aug 28;376(9742):687-97
5. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004 May 20;350(21):2129-39.
6. Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Sep 7;101(36):13306-11.
7. Gonzalez-Angulo AM, Hennessy BT, Mills GB. Future of personalized medicine in oncology: a systems biology approach. *J Clin Oncol*. 2010 Jun 1;28(16):2777-83.
8. Perou CM, Sørliie T, Eisen MB, van de Rijn M, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747-52.
9. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*. 2008 Mar-Apr;58(2):71-96.

10. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol*. 2007 Mar;18(3):581-92.
11. Peto R, Boreham J, Clarke M, Davies C, Beral V. UK and USA breast cancer deaths down 25% in year 2000 at ages 20-69 years. *Lancet*. 2000 May 20;355(9217):1822.
12. Sant M, Francisci S, Capocaccia R, Verdecchia A, Allemani C, Berrino F. Time trends of breast cancer survival in Europe in relation to incidence and mortality. *Int J Cancer*. 2006 Nov 15;119(10):2417-22.
13. Guarneri V, Conte P. Metastatic breast cancer: therapeutic options according to molecular subtypes and prior adjuvant therapy. *Oncologist*. 2009 Jul;14(7):645-56.
14. Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 11;98(19):10869-74.
15. Sørli T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 8;100(14):8418-23.
16. Paik S, Shak S, Tang G, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004 Dec 30;351(27):2817-26.
17. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*. 2002 Dec 19;347(25):1999-2009.
18. Chang HY, Nuyten DS, Sneddon JB, et al. Robustness, scalability, and integration of a wound-response gene expression signature in predicting breast cancer survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Mar 8;102(10):3738-43.
19. Ma XJ, Wang Z, Ryan PD, et al. A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer Cell*. 2004 Jun;5(6):607-16.
20. Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet*. 2005 Feb 19-25;365(9460):671-9.
21. Foekens JA, Atkins D, Zhang Y et al. Multicenter validation of a gene expression-based prognostic signature in lymph node-negative primary breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006 Apr 10;24(11):1665-71.
22. Fan C, Oh DS, Wessels L, et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med*. 2006 Aug 10;355(6):560-9.
23. Martínez de Dueñas E, Lluch A, Eroles P. *Cáncer de Mama*. Ed. FECMA, pendiente de publicación.
24. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009 May 20;101(10):736-50.

25. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. 2010 Jul 10;28(20):3271-7.
26. Parker JS, Prat A, Cheang MCU, Lenburg ME, Paik S, Perou CM. Breast Cancer Molecular Subtypes Predict Response to Anthracycline/Taxane-Based Chemotherapy. *Cancer Research*: December 15, 2009; Volume 69, Issue 24, Supplement 3 doi: 10.1158/0008-5472.SABCS-09-2019.
27. <http://www.clinicaltrial.gov/ct2/results?term=PI3K+AND+breast+cancer>.
28. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987 Jan 9;235(4785):177-82.
29. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001 Mar 15;344(11):783-92.
30. Gianni L, Dafni U, Gelber RD, et al. Treatment with trastuzumab for 1 year after adjuvant chemotherapy in patients with HER2-positive early breast cancer: a 4-year follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2011 Mar;12(3):236-44.
31. Bosch A, Eroles P, Zaragoza R, Viña JR, Lluch A. Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer Treat Rev*. 2010 May;36(3):206-15.
32. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol* 2006;19(2):264–71.
33. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res* 2007; 13(15 Pt.1):4429–34
34. Smid M, Wang Y, Zhang Y, et al. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res* 2008;68(9):3108–14
35. Kreike B, van Kouwenhove M, Horlings H, et al. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res* 2007;9(5):R65.
36. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004 Aug 15;10(16):5367-74.
37. Weigelt B, Mackay A, A'Hern R, Natrajan R, Tan DS, Dowsett M, et al. Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis. *Lancet Oncol* 2010;11(4):339-49
38. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*. 2007;8(5):R76.

39. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009 Mar 10;27(8):1160-7.
40. Prat A, Parker JS, Karginova O, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010 Sep 2;12(5):R68.
41. Hennessey BT, Gonzalez-Angulo AM, Stenke-Hale K, et al. Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Res*. 2009 May 15;69(10):4116-24
42. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*. 2011 Feb;5(1):5-23.
43. Prat A, Perou CM. Mammary development meets cancer genomics. *Nat Med*. 2009 Aug;15(8):842-4.
44. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
45. Cheng N, Chytil A, Shyr Y, Joly A, Moses HL. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol Cancer Res*. 2008 Oct;6(10):1521-33.
46. Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2005 May;5(5):341-54.
47. Prat A, Baselga J. [Biologic therapy: current and future applications in oncology]. *Med Clin (Barc)*. 2007 Jun 30;129(5):184-93. Review. Spanish.
48. Hennessey BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2005 Dec;4(12):988-1004. Review.
49. Baselga J, Bradbury I, Eidtmann H, et al. Abstract S3-3: First Results of the NeoALTTO Trial (BIG 01-06/EGF 106903): A Phase III, Randomized, Open Label, Neoadjuvant Study of Lapatinib, Trastuzumab, and Their Combination Plus Paclitaxel in Women with HER2-Positive Primary Breast Cancer. *Cancer Research* April 26, 2011 70:S3-3; doi:10.1158/0008-5472.SABCS10-S3-3.
50. Untch M, Loibl S, Bischoff J, et al. Lapatinib vs Trastuzumab in Combination with Neoadjuvant Anthracycline-Taxane-Based Chemotherapy: Primary Efficacy Endpoint Analysis of the GEPARQUINTO STUDY (GBG 44). *Cancer Research*: December 15, 2010; Volume 70, Issue 24, Supplement 2 doi:10.1158/0008-5472.SABCS10-S3-1.
51. Gianni L, Pienkowski T, Im Y-H, Roman L, et al. G. Abstract S3-2: Neoadjuvant Pertuzumab (P) and Trastuzumab (H): Antitumor and Safety Analysis of a Randomized Phase II Study ('NeoSphere') *Cancer Research* April 26, 2011 70:S3-2; doi:10.1158/0008-5472.SABCS10-S3-2.

52. [http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=TDM1&recr=Open&rslt=&type=Intr&cond=&int&outc=&lead=&spons=&id=&state1=&cntry1=&state2=&cntry2=&state3=&cntry3=&locn=&gndr=&rcv\\_s=&rcv\\_e=&lup\\_s=&lup\\_e=](http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=TDM1&recr=Open&rslt=&type=Intr&cond=&int&outc=&lead=&spons=&id=&state1=&cntry1=&state2=&cntry2=&state3=&cntry3=&locn=&gndr=&rcv_s=&rcv_e=&lup_s=&lup_e=)

53. Krop IE, Modi S, Elias A, LoRusso P, Choi YJ, Lu M. Abstract P6-15-02: A Phase Ib Study Evaluating Safety, Tolerability, Pharmacokinetics (PK), and Activity of the Phosphoinositide-3 Kinase (PI3K) Inhibitor GDC-0941 in Combination with Trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1) in Patients with Advanced HER2-Positive Breast Cancer. *Cancer Research* April 26, 2011 70:P6-15-02; doi:10.1158/0008 5472.SABCS10-P6-15-02.

54. Warburg OH. *The Metabolism of Tumours: Investigations from the Kaiser Wilhem Institute for Biology, Berlin-Dahlem* (London, UK: Arnold Constable 1930).

55. Reeves GK, Pirie K, Beral V, Green J, Spencer E, Bull D; Million Women Study Collaboration. Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study. *BMJ*. 2007 Dec 1;335(7630):1134.

56. Loi S, Milne RL, Friedlander ML, et al. Obesity and outcomes in premenopausal and postmenopausal breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 Jul;14(7):1686-91.

57. Dignam JJ, Wieand K, Johnson KA, Fisher B, Xu L, Mamounas EP. Obesity, tamoxifen use, and outcomes in women with estrogen receptor-positive early-stage breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2003 Oct 1;95(19):1467-76.

58. Judd HL, Shamonki IM, Frumar AM, Lagasse LD. Origin of serum estradiol in postmenopausal women. *Obstet Gynecol*. 1982 Jun;59(6):680-6.

59. Siiteri PK. Adipose tissue as a source of hormones. *Am J Clin Nutr*. 1987 Jan;45(1 Suppl):277-82. Review.

60. Sestak I, Distler W, Forbes JF, Dowsett M, Howell A, Cuzick J. Effect of body mass index on recurrences in tamoxifen and anastrozole treated women: an exploratory analysis from the ATAC trial. *J Clin Oncol*. 2010 Jul 20;28(21):3411-5.

61. Cleary MP, Grossmann ME. Minireview: Obesity and breast cancer: the estrogen connection. *Endocrinology*. 2009 Jun;150(6):2537-42

62. Goodwin PJ, Pritchard KI. Obesity and hormone therapy in breast cancer: an unfinished puzzle. *J Clin Oncol*. 2010 Jul 20;28(21):3405-7.

63. Towler MC, Hardie DG. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res*. 2007 Feb 16;100(3):328-41. Review.

64. Baserga R, Peruzzi F, Reiss K. The IGF-1 receptor in cancer biology. *Int J Cancer*. 2003 Dec 20;107(6):873-7. Review.

65. Gonzalez-Angulo AM, Meric-Bernstam F. Metformin: a therapeutic opportunity in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2010 Mar 15;16(6):1695-700.

66. Wan X, Harkavy B, Shen N, Grohar P, Helman LJ. Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism. *Oncogene*. 2007 Mar 22;26(13):1932-40.
67. Jones RA, Campbell CI, Gunther EJ, et al. Transgenic overexpression of IGF-1R disrupts mammary ductal morphogenesis and induces tumor formation. *Oncogene*. 2007 Mar 8;26(11):1636-44.
68. Baselga J. Targeting the phosphoinositide-3 (PI3) kinase pathway in breast cancer. *Oncologist*. 2011;16 Suppl 1:12-9.
69. Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, Neve RM, Kuo WL, Davies M, Carey M, Hu Z, Guan Y, Sahin A, Symmans WF, Pusztai L, Nolden LK, Horlings H, Berns K, Hung MC, van de Vijver MJ, Valero V, Gray JW, Bernardis R, Mills GB, Hennessy BT. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res*. 2008 Aug 1;68(15):6084-91.
70. Eroles P, Bosch A, Bermejo B, Lluch A. Mechanisms of resistance to hormonal treatment in breast cancer. *Clin Transl Oncol*. 2010 Apr;12(4):246-52. Review.
71. Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, et al. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell*. 2007 Oct;12(4):395-402.
72. Tabernero J, Rojo F, Calvo E, et al. Dose- and schedule-dependent inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: a phase I tumor pharmacodynamic study in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*. 2008 Apr 1;26(10):1603-10.
73. Di Cosimo S, Bendell JC, Cervantes-Ruiperez A, et al. A phase I study of the oral mTOR inhibitor ridaforolimus (RIDA) in combination with the IGF-1R antibody dalotuzumab (DALO) in patients (pts) with advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 2010 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition). Vol 28, No 15\_suppl (May 20 Supplement), 2010: 3008.
74. Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Oct;8(10):774-85. Review.
75. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 2008; 30:214-26.
76. Hirsch HA, Iliopoulos D, Tsihchlis PN, Struhl K. Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. *Cancer Res* 2009; 69:7507-11.
77. O'Shaughnessy J, Osborne C, Pippen JE, et al. Iniparib plus chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2011 Jan 20;364(3):205-14.
78. Gronwald J, Byrski T, Huzarski T, et al. Neoadjuvant therapy with cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2009;27(Suppl.):15s. [abstr 502].
79. Garber JE, Richardson A, Harris LN, et al. Neo-adjuvant cisplatin (CDDP) in "triple-negative" breast cancer (BC). *Breast Cancer Res Treat* 2006;105(Suppl. 1): S149.

80. Ryan PD, Tung NM, Isakoff SJ, et al. Neoadjuvant cisplatin and bevacizumab in triple negative breast cancer (TNBC): safety and efficacy. *J Clin Oncol* 2009;27(Suppl.):15s. [abstr 551].
81. O'Shaughnessy J, Weckstein DJ, Vukelja SJ, et al. Preliminary results of a randomized phase II study of weekly irinotecan/carboplatin with or without cetuximab in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2007;106 (Suppl. 1):S32. [abstr 308]
82. Carey LA, Rugo HS, Marcom PK, et al. TBCRC 001: EGFR inhibition with cetuximab added to carboplatin in metastatic triple-negative (basal-like) breast cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:1009. [meeting abstracts].
83. Baselga J, Stemmer S, Pego A, et al. Cetuximab + Cisplatin in Estrogen Receptor-Negative, Progesterone Receptor-Negative, HER2-Negative (Triple-Negative) Metastatic Breast Cancer: Results of the Randomized Phase II BALI-1 Trial. *Cancer Research: December 15, 2010; Volume 70, Issue 24, Supplement 2* doi: 10.1158/0008-5472.SABCS10-PD01-01.
84. Houck, K. A., Ferrara, N., Winer, J., Cachianes, G., Li, B., and Leung, D W. (1991) *Mol. Endocrinol.* 6,1806-1814
85. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000 Sep 14;407(6801):249-57. Review.
86. Baluk P, Hashizume H, McDonald DM. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2005 Feb;15(1):102-11. Review.
87. Miller K, Wang M, Gralow J, et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2007 Dec 27;357(26):2666-76.
88. Miles DW, Chan A, Dirix LY, Cortés J, et al. Phase III study of bevacizumab plus docetaxel compared with placebo plus docetaxel for the first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010 Jul 10;28(20):3239-47.
89. Robert NJ, Diéras V, Glaspy J, et al. RIBBON-1: Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase III Trial of Chemotherapy With or Without Bevacizumab for First-Line Treatment of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative, Locally Recurrent or Metastatic Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2011 Apr 1;29(10):1252-60.
90. O'Shaughnessy J, Miles D, Gray RJ, et al. A meta-analysis of overall survival data from three randomized trials of bevacizumab (BV) and first-line chemotherapy as treatment for patients with metastatic breast cancer (MBC). *Journal of Clinical Oncology, 2010 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition).* Vol 28, No 15\_suppl (May 20 Supplement), 2010: 1005
91. O'Shaughnessy J, Romieu G, Diéras V, Byrtek M, Duenne A-A, Miles D. Meta-Analysis of Patients with Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) from Three Randomized Trials of First-Line Bevacizumab (BV) and Chemotherapy Treatment for Metastatic Breast Cancer (MBC). *Cancer Research* April 26, 2011 70:P6-12-03; doi:10.1158/0008-5472.SABCS10-P6-12-03.

92. Miles DW, Romieu G, Dieras V, Chen D, Duenne A, O'Shaughnessy J. Meta-Analysis of patients (pts) previously treated with taxanes from three randomized trials of bevacizumab (bv) and first-line chemotherapy as treatment for metastatic breast cancer (MBC) Ann Oncol (2010) 21(suppl 8): Abstract 279PD.

93. Saad ED, Katz A, Buyse M. Overall survival and post-progression survival in advanced breast cancer: a review of recent randomized clinical trials. J Clin Oncol. 2010 Apr 10;28(11):1958-62.

94. Broglio KR, Berry DA. Detecting an overall survival benefit that is derived from progression-free survival. J Natl Cancer Inst. 2009 Dec 2;101(23):1642-9