

CONCENTRACIONES SÉRICAS DE COBRE EN EVALUACIÓN DE RESPUESTA A QUIMIOTERAPIA PRIMARIA EN CÁNCER DE MAMA

PAOLA CELEDÓN ARRIETA, MARIANELLA CASTILLO, ZULAY PASTRÁN, ANALISA CAREDDU, JACDEBLINE DORDELLY, ALFONSO BRAVO

INSTITUTO NACIONAL DE TUMORES, MARACAIBO, ESTADO ZULIA. HOSPITAL GENERAL DEL ESTE "DR. DOMINGO LUCIANI", CARACAS, SERVICIO DE IMÁGENES DE LA POLICLÍNICA METROPOLITANA CARACAS, LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN NUTRICIÓN DE LA UNIVERSIDAD DEL ZULIA, MARACAIBO, VENEZUELA.

RESUMEN

El objetivo principal de este estudio fue determinar la utilidad de las concentraciones séricas de cobre en la evaluación de la respuesta a quimioterapia primaria en pacientes con cáncer de mama, actualmente no se cuenta con un marcador sérico que permita evaluar dicha respuesta. Se evaluó la variación en los niveles de cobre sérico, en seis pacientes con cáncer de mama localmente avanzado, antes de cada ciclo de quimioterapia primaria y se correlacionó con la respuesta clínica por medición del tamaño del tumor y la respuesta imaginológica por mamografía. Los resultados obtenidos indican que las variaciones séricas de cobre no se correlacionaron con la respuesta clínica ($P=0,70$), ni imaginológica ($P=0,43$) a la quimioterapia. En nuestra serie, el cobre sérico no mostró utilidad como marcador para la evaluación de respuesta a quimioterapia primaria en cáncer de mama.

PALABRAS CLAVE: Cobre, elemento, trazador, cáncer, mama.

SUMMARY

The main objective of this study was to determine the usefulness of the serum copper in the evaluation of response to primary chemotherapy in patients with diagnostic of breast cancer, which currently we does not have a serum marker to evaluate the response. The variation in the serum copper levels was evaluated in six patients with locally advanced breast cancer before each cycle of primary chemotherapy and correlated it with clinical response by measuring tumor size and the response imaging by mammography. The results indicate that variations in the serum copper is not correlated with clinical response ($P = 0.70$) nor imaging response in mammography ($P = 0.43$) to the chemotherapy. In our series, the serum copper was not useful as a marker for assessing response to the primary chemotherapy in the diagnostic of breast cancer.

KEY WORDS: Copper, trace, element, breast, cancer.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha investigado ampliamente el papel del cobre como metal trazador en diferentes condiciones fisiológicas y patológicas. En el suero sanguíneo, el cobre se encuentra principalmente unido a sus proteínas transportadoras: albúmina y ceruloplasmina, y le sirve además como cofactor a esta última ⁽¹⁾. La ceruloplasmina junto con la superóxido dismutasa son enzimas antioxidantes dependientes de cobre

Recibido: 30/11/2010 Revisado: 17/01/2011

Aceptado para publicación: 25/02/2011

Correspondencia: Dra. Paola Celedón A. Instituto Nacional de Tumores. Avda. 7 con calle 69A, sector Paraíso, Maracaibo, Estado Zulia. Tel:04141367582.

E-mail: paomela@gmail.com

y zinc en el ser humano ⁽²⁾. Se considera que el rango normal de las concentraciones séricas de cobre varía entre 66 y 130 $\mu\text{g/dL}$. Se han encontrado concentraciones séricas elevadas de cobre, en diversas formas de cáncer, como el cáncer de pulmón, cavidad oral, colon y mama ⁽³⁻⁶⁾. Esta elevación ha sido planteada como parte de una respuesta biológica al cáncer, dirigida a la activación de la superóxido dismutasa y otras enzimas dependientes de cobre, para inhibir el crecimiento de la célula cancerosa ⁽⁷⁾. En 1960, Pagliardi y col., reportaron una alta correlación entre las concentraciones de cobre sérico y la actividad de la enfermedad de Hodgkin ⁽⁸⁾. En la década de los setenta, Hrgovcic y col., publicaron numerosos estudios sobre la variación del cobre según la fase de la enfermedad en pacientes con enfermedad de Hodgkin, leucemias agudas y linfoma maligno, observando niveles elevados en la fase activa, disminución gradual durante la respuesta a tratamiento, valores normales durante la remisión y elevación en las recaídas ⁽⁹⁻¹²⁾. Recientemente, Celedón y col., ⁽¹³⁾ realizaron un estudio en mujeres venezolanas donde observaron una elevación significativa de los niveles séricos de cobre en el grupo con cáncer de mama, a diferencia del grupo con enfermedad benigna de mama y el grupo sano.

En el cáncer de mama localmente avanzado, la terapia multimodal que se inicia con quimioterapia primaria o preoperatoria, se ha asociado con buenas tasas de respuesta en más del 70 % de las pacientes, incluyendo respuesta completa en el 10 % al 15 % ⁽¹⁴⁻¹⁷⁾. Tradicionalmente, la respuesta es evaluada a través de cambios en el tamaño de la lesión por examen físico y menos frecuentemente con estudios de imagen utilizando los criterios del grupo RECIST (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*) ⁽¹⁸⁾. Un tumor puede responder a la quimioterapia sin un cambio obvio en su tamaño, si el tejido tumoral es reemplazado por fibrosis o necrosis, por lo que la valoración clínica puede ser imprecisa ⁽¹⁹⁾. Los estudios de imagen no cuentan quizás con la sensibilidad, especificidad

y la relación costo beneficio, para realizarlos con la frecuencia que se amerita. La evaluación de la respuesta al tratamiento primario es de vital importancia en la práctica clínica diaria, indica la necesidad de rediseñar la quimioterapia si se comprueba una pobre respuesta o progresión de la enfermedad.

Se han investigado diversos marcadores tumorales que pudieran aportar una valoración rápida de la efectividad del tratamiento antineoplásico ⁽²⁰⁾. En la actualidad, ningún marcador tumoral ha demostrado utilidad en la evaluación de la respuesta al tratamiento inicial en el cáncer de mama, por lo cual la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO), no recomienda su uso rutinario ⁽²¹⁾. Es necesario seguir en la búsqueda de un método sencillo, que evalúe la efectividad de la quimioterapia primaria para poder tomar tempranamente la decisión de un cambio terapéutico y evitar la exposición innecesaria a agentes citotóxicos y a sus efectos secundarios.

La realización de este estudio fue factible, porque, en nuestro país, existen laboratorios de investigación adscritos a universidades reconocidas que trabajan con mediciones de metales en muestras biológicas, y especialistas en el área de patología mamaria dispuestos a colaborar en el ámbito científico. Entonces se planteó, determinar la utilidad de las concentraciones séricas de cobre como marcador, en la evaluación de la respuesta a la quimioterapia primaria en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado que asistieron a la consulta de oncología médica del departamento de medicina interna del Hospital "Dr. Domingo Luciani".

MÉTODOS

Se diseñó un estudio descriptivo, prospectivo y observacional. Se invitaron a participar en el estudio, a once pacientes de sexo femenino que asistieron a la consulta de oncología

clínica del departamento de medicina interna del Hospital “Dr. Domingo Luciani”, con diagnóstico reciente de cáncer de mama localmente avanzado (estadios IIB, IIIA, IIIB y IIIC o T3-T4N0M0, T2N1M0, TXN2-3M0) quienes cumplieron los siguientes criterios de inclusión: ausencia de enfermedad metastásica, escala del estado de salud del grupo oncológico cooperativo del este (ECOG) grado 1 o 2, prueba de embarazo negativa, perfil hematológico, renal y hepático dentro de límites adecuados (cuenta blanca $> 4,0 \times 10^9/L$, plaquetas $> 100 \times 10^9/L$, creatinina, bilirrubina y transaminasas dentro de rangos normales) y presencia de enfermedad mensurable. Los criterios de exclusión fueron: historia previa de cardiopatía o alteraciones electrocardiográficas, historia previa de enfermedad maligna (con excepción de carcinoma *in situ* de cuello uterino y carcinoma basocelular), terapia citotóxica o endocrina previa, proceso infeccioso activo u otra enfermedad que pudiera afectar la tolerancia al tratamiento, uso de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, trastorno cognitivo significativo e imposibilidad para proveer el consentimiento informado. El estudio se llevó a cabo en concordancia con los principios de la declaración de Helsinki. El protocolo y el consentimiento informado fueron aprobados por el comité de ética del hospital. Las pacientes fueron sometidas a una historia clínica y examen físico completo, que incluyó: peso, talla, índice de masa corporal, superficie corporal y tensión arterial. Se aplicó la escala de salud ECOG. Se revisaron los estudios complementarios traídos por la paciente para su evaluación rutinaria: hematología completa, urea, creatinina, glicemia ayunas, perfil hepático, fosfatasa alcalina, prueba de embarazo, calcio y fósforo, electrocardiograma, ecocardiograma, radiografía de tórax en proyección pósterior-anterior y lateral izquierda, biopsia del tumor y receptores hormonales, mamografía bilateral, gammagrama óseo, ultrasonido abdominal o tomografía axial computada abdominal con doble

contraste. Una vez verificados los criterios de inclusión y exclusión se procedió a la obtención del consentimiento informado. La quimioterapia fue bajo el esquema: 5-fluorouracilo a dosis de 500 mg/m^2 endovenoso día 1, doxorubicina a dosis de 50 mg/m^2 endovenoso día 1 y ciclofosfamida a dosis 500 mg/m^2 endovenoso día 1, cada 21 días por 6 ciclos. Antes de cada ciclo de quimioterapia y al culminar los seis ciclos, se recolectaron 10 mL de sangre periférica por venopunción en envases de vidrio tratados previamente con detergente no iónico y agua no ionizada. La sangre se centrifugó a 2 000 rpm por diez minutos. Las alícuotas de suero se recuperaron del sobrenadante y se congelaron a -20°C hasta el momento de su traslado bajo cadena de frío. Los sueros fueron digeridos con HNO_3 concentrado en bombas de digestión PARR según técnica descrita previamente ⁽²²⁾. Las muestras procesadas se analizaron en un espectrofotómetro de absorción atómica marca *Perkin Elmer* modelo 3100®, bajo la modalidad de llama, provisto con lámpara de cátodo hueco sin electrodo. Las lecturas fueron realizadas a 324,8 nm bajo parámetros operacionales y estándares de calibración ⁽²³⁾ en el laboratorio de investigación y desarrollo en nutrición de la escuela de nutrición y dietética de la facultad de medicina de La Universidad del Zulia.

Previo a cada ciclo de quimioterapia y al culminar la quimioterapia primaria, se evaluó la respuesta a tratamiento mediante la medición del tumor utilizando un calíper. Se realizaron mamografías bilaterales el día previo a los ciclos 1, 3 y posterior al último ciclo de quimioterapia. Las mamografías fueron evaluadas por un panel independiente de tres radiólogos; dos de ellos adscritos al servicio de radiodiagnóstico del Hospital “Dr. Domingo Luciani” y el otro a la unidad de mamografía de la Policlínica Metropolitana. La respuesta clínica se determinó a través de los criterios del grupo RECIST ⁽¹⁸⁾ aplicados al examen físico y a las mamografías.

Para estimar la respuesta histológica a través

de la biopsia de la pieza operatoria se utilizaron los siguientes criterios:

- Respuesta completa: ausencia de tumor en la pieza operatoria
- Respuesta parcial: presencia de tumor residual en la pieza operatoria, de menor tamaño a la medida clínica inicial.
- Enfermedad estable: presencia de tumor en la pieza operatoria, de tamaño igual a la medida clínica inicial.
- Enfermedad progresiva: presencia de tumor en la pieza operatoria, de mayor tamaño a la medida clínica inicial.

Al culminar la quimioterapia, las pacientes fueron evaluadas por cirujanos oncólogos adscritos al servicio de cirugía II de nuestro centro para definir el tratamiento quirúrgico. Los especímenes quirúrgicos fueron analizados en el servicio de anatomía patológica de la Policlínica Metropolitana para evaluar la respuesta al tratamiento bajo los criterios previamente establecidos. La recolección de datos se llevó a cabo en un cuaderno de registros y formularios diseñado por los investigadores. Se calculó la media y la desviación estándar de las variables continuas; en el caso de las variables nominales se calcularon sus frecuencias y sus porcentajes. Se verificó si los datos seguían una distribución normal o no, para ello se utilizó la prueba no paramétrica Kolmogorov-Smirnov. Las correlaciones se comprobaron usando el coeficiente de correlación no paramétrico rho de Spearman. Las correlaciones se expresaron usando gráficos de dispersión de tipo eje doble XY. Se consideró una correlación significativa con valores de $P < 0,05$. Los datos fueron analizados con *SPSS 14.0 para Windows®*.

RESULTADOS

Se invitaron a participar en el estudio a once pacientes, de las cuales seis aceptaron ingresar

formalmente luego de la firma del consentimiento informado. Las características de las pacientes se detallan en el Cuadro 1. Las medidas clínicas realizadas al inicio y después de cada ciclo de quimioterapia se reflejan en el Cuadro 2; así como las medidas obtenidas de las mamografías previo al inicio de la quimioterapia y después del tercero y sexto ciclo de quimioterapia, se encuentran en el Cuadro 3. La respuesta histológica predominante fue parcial, obtenida en cinco de las seis pacientes estudiadas (Cuadro 4). El promedio inicial de los valores de cobre sérico de las pacientes fue: $138,76 \pm 26,78$ y las concentraciones séricas al inicio y después de cada ciclo de quimioterapia pueden observarse en el Cuadro 5.

La paciente 1 presentó por método clínico una respuesta parcial del 60 %, mientras que desde el punto de vista imaginológico mostró una enfermedad estable. Al evaluar la variación de las concentraciones séricas de cobre hubo una disminución del 25,8 % con respecto a los valores iniciales y en la biopsia de la pieza operatoria de la mastectomía, se evidenció una respuesta completa a la quimioterapia al no identificarse tumor residual en la misma.

La paciente 2 presentó una respuesta parcial con disminución del 60 % en las medidas clínicas del tumor. En las mamografías se reportó una respuesta parcial del 33,9 %; sin embargo, se reportaba un área con calcificaciones sospechosa en la mama contralateral (mama izquierda) durante las tres evaluaciones mamográficas, que posteriormente resultaron positivas para malignidad en la biopsia dirigida por estereotaxia. Las concentraciones séricas de cobre mostraron una disminución del 40 % de su valor inicial, compatible con una respuesta bioquímica parcial.

La paciente número tres registró una respuesta parcial del 44,4 % por el método clínico. Los estudios de imagen fueron compatibles con una enfermedad estable. El cobre sérico mostró una disminución del 33,2 % con respecto a su concentración inicial, compatible con una respuesta bioquímica parcial.

Cuadro 1. Características de las pacientes

Paciente	Edad (años) (ECOG)	Estado de salud	Estadio TNM	Clasificación	Diagnóstico histológico	Receptores hormonales	Expresión del Her2-neu del tumor
1	61	1	IIIB	cT4bN1M0	Carcinoma ductal grado III	RE (-) RP (-)	(-)
2	53	0	IIIA	cT3N1M0	Carcinoma ductal grado III	RE (3+) RP(2+)	(-)
3	53	0	IIB	cT3N0M0	Carcinoma ductal grado III	RE (-) RP (-)	(-)
4	28	0	IIB	cT2N1M0	Carcinoma ductal grado II	No disponible	No disponible
5	35	0	IIIA	cT3N1M0	Carcinoma ductal grado II	RE (1+) RP(1+)	(3+)
6	42	1	IIIC	cT2N3M0	Carcinoma ductal grado II	RE (-) RP (-)	(3+)

Cuadro 2. Medición clínica de las lesiones blanco antes del inicio de la quimioterapia y después de cada ciclo de quimioterapia primaria (expresadas en mm)

Pacientes	Inicial	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4	Ciclo 5	Ciclo 6	Respuesta clínica al tratamiento (%)
1	245	225	150	118	108	101	98	Respuesta parcial (60)
2	120	75	75	50	48	48	48	Respuesta parcial (60)
3	36	30	30	30	30	20	20	Respuesta parcial (44,4)
4	80	60	60	35	30	28	28	Respuesta parcial (65)
5	68	45	35	30	30	30	30	Respuesta parcial (55,8)
6	160	160	120	70	40	30	25	Respuesta parcial (84,3)

Cuadro 3. Medición de las lesiones blanco por mamografía, al inicio, después del tercero y sexto ciclo de quimioterapia primaria (expresadas en mm)

Pacientes	Inicial	Ciclo 3	Ciclo 6	Respuesta imaginológica (%)
1	72	64	58	Enfermedad estable (19,4)
2	53	53	35	Respuesta parcial (33,9)
3	55	60	55	Enfermedad estable (0)
4	85	81	60	Enfermedad estable (29,4)
5	61	61	61	Enfermedad estable (0)
6	55	55	55	Enfermedad estable (0)

Cuadro 4. Respuesta a la quimioterapia primaria en la biopsia de la pieza operatoria

Pacientes	Respuesta histológica
1	Respuesta completa
2	Respuesta parcial
3	Respuesta parcial
4	Respuesta parcial
5	Respuesta parcial
6	Respuesta parcial

La paciente número cuatro presentó una respuesta parcial del 65 % en las mediciones hechas al tumor por el examen físico, mientras que las mamografías revelaron una enfermedad estable, dada por una respuesta del 29 %. Los niveles séricos de cobre mostraron una discreta disminución del 11 % con respecto a los valores de base de la paciente, es decir, enfermedad estable desde el punto de vista bioquímico.

La paciente número cinco registró un 55,8 % de respuesta clínica, es decir, respuesta

parcial. Desde el punto de vista de imágenes, no se evidenciaron cambios en las medidas del tumor, compatible con una enfermedad estable. Las concentraciones séricas de cobre solo disminuyeron en un 11 %.

La paciente número seis presentó una respuesta clínica parcial del 84,3 % y enfermedad estable en la evaluación imaginológica. El cobre sérico tuvo una discreta disminución del 12,4 % con respecto a su valor de base.

Al realizar el análisis estadístico, la variación en las concentraciones séricas de cobre no se correlacionó con la respuesta clínica ($P=0,70$), ni imaginológica ($P=0,43$) a la quimioterapia. La respuesta clínica tampoco se correlacionó con la respuesta imaginológica en nuestra serie ($P=0,595$).

DISCUSIÓN

En la década de los sesenta, los resultados obtenidos por Hrgovic y col.,⁽⁹⁾ en el estudio de las concentraciones séricas de cobre como marcador

Cuadro 5. Concentraciones séricas de cobre iniciales y después de cada ciclo de quimioterapia primaria (expresadas en $\mu\text{g/dL}$)

Pacientes	Inicial	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4	Ciclo 5	Ciclo 6	Respuesta bioquímica (%)
1	167,69	167,69	136,7	136,7	130,5	124,3	124,3	Enfermedad estable (25,8)
2	155,29	111,9	105,7	124,3	111,9	99,5	93,3	Respuesta parcial (40)
3	149,09	111,9	130,5	111,9	105,7	105,7	99,5	Respuesta parcial (33,2)
4	99,5	111,9	105,7	99,5	105,7	111,9	111,9	Enfermedad progresiva (+ 11)
5	111,9	149,09	130,5	118,1	124,3	130,5	124,9	Enfermedad progresiva (+ 10,4)
6	149,09	136,7	124,3	136,7	130,5	136,7	130,5	Enfermedad estable (12,4)

para la evaluación de respuesta a quimioterapia en neoplasias hematológicas, fueron muy alentadores. Más recientemente, un estudio demostró elevación de las concentraciones séricas de cobre en un grupo de mujeres venezolanas con cáncer de mama⁽¹³⁾. Por tanto, en nuestra serie se planteó evaluar la utilidad de este metal trazador en la evaluación de la respuesta a la quimioterapia primaria de un tumor sólido como el cáncer de mama localmente avanzado en un grupo de pacientes venezolanas.

En nuestro estudio llama la atención, el reducido número de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama localmente avanzado no operado que consultaron en el período de seis meses para recibir quimioterapia primaria, probablemente relacionado con el hecho que un mayor número de pacientes consultaría primero al especialista en cirugía oncológica, pudiéndose ofrecer de primera intención el tratamiento quirúrgico. Solamente, seis de las once pacientes invitadas al estudio aceptaron participar. Las negativas o rechazos estuvieron relacionadas con aprehensión de los familiares, más que con rechazo de la propia paciente.

El promedio de la concentraciones séricas de cobre antes del inicio de la quimioterapia fue $138,76 \pm 26,78$; encontrándose por encima del valor superior del rango considerado normal; hallazgo similar a una serie venezolana previamente publicada⁽¹³⁾. Se pudo observar una tendencia a la disminución de las concentraciones de cobre a través de cada ciclo de quimioterapia, sin embargo, esta variación no fue estadísticamente significativa al correlacionarse con la respuesta clínica ($P=0,70$) o de imagen ($P=0,43$), pudiendo concluir que en la muestra analizada, el cobre sérico no mostró utilidad como marcador para la evaluación de la respuesta a quimioterapia primaria en cáncer de mama localmente avanzado.

Un hallazgo incidental pero interesante, fue que en nuestro estudio, la respuesta clínica no se correlacionó con la respuesta imagenológica ($P=0,59$); es decir, que en nuestra serie, la mamografía no mostró utilidad en la evaluación de respuesta a la quimioterapia primaria. Por otra parte, en cinco de las seis pacientes estudiadas, la respuesta clínica se correlacionó con los hallazgos patológicos en la biopsia de la pieza operatoria en cinco de las seis pacientes

estudiadas.

Al detallar los hallazgos en la paciente 1, se pudo observar que clínicamente mostraba una respuesta parcial de 60 %, palpándose un tumor en la mama de 98 mm después de seis ciclos de quimioterapia y antes de ser llevada a cirugía. El análisis de la pieza operatoria mostró que no había tumor residual, es decir, que la masa que se palpaba era probablemente una reacción desmoplásica o fibrosis residual.

Las pacientes números cuatro y cinco, evidenciaron una respuesta parcial por el método clínico y enfermedad estable por el análisis de las mamografías. Pero se observó un aumento progresivo en las concentraciones séricas de cobre a través de los ciclos de quimioterapia. ¿Se podría correlacionar la elevación del cobre sérico en la paciente número cinco, con la evidencia de un segundo primario en la mama contralateral?

Sigue entonces la inquietud por la búsqueda de un método de evaluación de respuesta a la quimioterapia primaria del cáncer de mama,

que sea más exacto y menos dependiente del operador. El número reducido de la muestra podría ser un factor determinante en los resultados obtenidos, y es por ello que se plantea realizar un estudio multicéntrico que permita alcanzar mayor número de pacientes.

Los resultados del presente estudio indican que las concentraciones séricas de cobre no mostraron utilidad en la evaluación de la respuesta a la quimioterapia primaria del cáncer de mama localmente avanzado; sin embargo, es necesario realizar estudios que incluyan una muestra mayor a fin de corroborar estos hallazgos. Es imperante además, en hospitales generales donde se atienden pacientes oncológicos, una integración entre los servicios de medicina interna, oncología médica y cirugía, a fin de brindar una atención médica óptima y poder desarrollar mejores estudios clínicos y de investigación que permita el crecimiento de la actividad científica en nuestro país y el resto de Latinoamérica.

REFERENCIAS

1. Solomons NW. Biochemical, metabolic, and clinical role of copper in human nutrition. *J Am Coll Nutr.* 1985;4(1):83-105.
2. Harris ED. Copper in human and animal health. En: Harris ED, editor. *Trace Elements in Health.* Butterworths, Londres: Editorial J. Rose; 1983.p.44-54.
3. Milde D, Novák O, Stuka V, Vyslouil K, Machálek J. Serum levels of selenium, manganese, copper, and iron in colorectal cancer patients. *Biol Trace Elem Res.* 2001;79(2):107-114.
4. Ferrigno D, Buccheri G, Camilla T. Serum copper and zinc content in non-small cell lung cancer: Abnormalities and clinical correlates. *Monaldi Arch Chest Dis.* 1999;54(3):204-208.
5. Jayadeep A, Raveendran Pillai K, Kannan S, Nalinakumari KR, Mathew B, Krishnan Nair M, et al. Serum levels of copper, zinc, iron and ceruloplasmin in oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 1997;16(3):295-300.
6. Piccinini L, Borella P, Bargellini A, Medici CI, Zoboli A. A case-control study on selenium, zinc, and copper in plasma and hair of subjects affected by breast and lung cancer. *Biol Trace Elem Res.* 1996;51(1):23-30.
7. Linder M, Hazegh-Azam M. Copper biochemistry and molecular biology. *Am J Clin Nutr.* 1996;63(5 Suppl):797-811.
8. Pagliardi E, Giangrandi E. Clinical significance of the blood copper in Hodgkin's disease. *Acta Haematol.* 1960;24:201-212.

9. Hrgovcic M, Tessmer C, Minckler TM, Mosier B, Taylor GH. Serum copper levels in lymphoma and leukemia. Special reference to Hodgkin's disease. *Cancer*. 1968;21(4):743-755.
10. Tessmer C, Hrgovcic M, Thomas FB, Wilbur J, Mumford DM. Long-term serum copper studies in acute leukemia in children. *Cancer*. 1972;30(2):358-365.
11. Hrgovcic M, Tessmer C, Thomas FB, Fuller LM, Gamble JF, Shullenberger CC. Significance of serum copper levels in adult patients with Hodgkin's disease. *Cancer*. 1973;31(6):1337-1345.
12. Hrgovcic M, Tessmer C, Thomas FB, Ong PS, Gamble JF, Shullenberger CC. Serum copper observations in patients with malignant lymphoma. *Cancer*. 1973;32(6):1512-1524.
13. Celedón P, González L, Bellagamba R, Vilorio M, González J, Ramos M, et al. Niveles séricos de cobre en pacientes con enfermedad benigna y cáncer de mama. *Rev Venez Oncol*. 2005;17:18-24.
14. Eltahir A, Heys SD, Hutcheon AW, Sarkar TK, Smith I, Walker LG, et al. Treatment of large and locally advanced breast cancers using neoadjuvant chemotherapy. *Am J Surg*. 1998;175(2):127-132.
15. Gazet JC, Coombes RC, Ford HT, Griffin M, Corbishley C, Makinde V, et al. Assessment of the effect of pretreatment with neoadjuvant therapy on primary breast cancer. *Br J Cancer*. 1996;73(6):758-762.
16. Bergh J, Jonsson PE, Glimelius B, Nygren P. A systematic overview of chemotherapy effects in breast cancer. *Acta Oncol*. 2001;40(2-3):253-281.
17. Wang HC, Lo SS. Future prospects of neoadjuvant chemotherapy in treatment of primary breast cancer. *Semin Surg Oncol*. 1996;12(1):59-66.
18. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer E, Wanders J, Kaplan R, Rubinstein L, et al. New Guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for research and treatment of cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92:205-216.
19. Gunn B. Monitoring treatment response. Decisions in imaging economics. Disponible en: URL: <http://www.imagingeconomics.com/library/200210-11.asp>
20. Kuban DA, El-Mahdi AM, Schellhammer PF. PSA for outcome prediction and post treatment evaluation following radiation for prostate cancer: Do we know how to use it? *Semin Radiat Oncol*. 1998;8(2):72-80.
21. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, et al. American Society of Clinical Oncology 2007. Update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25(33):5287-5312.
22. Okamoto K, Fuwa K. Low contamination digestion bomb method using a teflon double vessel for biological materials. *Anal Chem*. 1984;56(9):1758-1760.
23. Perkin-Elmer Corporation. Analytical methods for atomic absorption spectrophotometer. Perkin-Elmer Corporation. Norwalk, Connecticut; 1976.