

Universitat de Lleida

Biomarcadores predictivos de respuesta al tratamiento en cáncer de mama por inmunohistoquímica

Anna Novell Álvarez

Dipòsit Legal: L.407-2014

<http://hdl.handle.net/10803/132998>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

Programa de doctorado

Estudios Avanzados en Ciencias Biomédicas

**BIOMARCADORES PREDICTIVOS DE
RESPUESTA AL TRATAMIENTO
EN CÁNCER DE MAMA
POR INMUNOHISTOQUÍMICA.**

Anna Novell Álvarez

Directores de tesis:

Dr. Xavier Matias-Guiu Guia

Dra. Antonieta Salud Salvia

31 de Enero del 2014, Lleida.

*Dedicado a mis dos personas favoritas de este mundo, mi marido Esteve y
mi hija Carla. Sois mi motor y mi fuente de inspiración.*



El Dr. Xavier Matías-Guiu Guia, Catedrático de la Universidad de Lleida, Jefe del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Arnau de Vilanova de Lleida y Director del Instituto de Investigación Biomédica de Lleida (IRBLLEIDA)

y

la Dra. Antonieta Salud Salvia, Jefe de Servicio de Oncología Médica y Hematología del Hospital Universitario Arnau de Vilanova de Lleida y Profesora titulada de la Escuela Universitaria de Medicina de Lleida

en calidad de co-Directores,

CERTIFICAN:

que la tesis doctoral titulada “Biomarcadores Predictivos de Respuesta al Tratamiento de Cáncer de Mama por Inmunoquímica”, realizada en el Instituto de Investigación Biomédica de Lleida y tutelada en el Departamento de Patología Oncológica de la Universidad de Lleida.

En nuestra opinión, la tesis realizada por Anna Novell Álvarez reúne todas las condiciones requeridas por la legislación vigente y con la originalidad y calidad científica para poder ser presentada y defendida con el fin de optar al grado de Doctor.

Y para que conste donde procesa, firman el presente certificado.

Lleida, 18 de Noviembre de 2013

Vº Bº del co-Director de la Tesis:

Dr. Xavier Matías-Guiu Guia

Vº Bº de la co-Directora de la Tesis:

Dra. Antonieta Salud Salvia

RESUMEN

RESUMENES.

1. RESUMEN

La persistencia del tumor residual macroscópico (> 1,0 cm) tras quimioterapia neoadyuvante (QTN) está presente en un 70% de pacientes y determina un riesgo de recaída a distancia del 35% a 3 años. En los últimos años, se ha incrementado el número de publicaciones referentes a marcadores con valor predictivo independiente. El objetivo de este trabajo es monitorizar la expresión de 22 proteínas seleccionadas sobre el tumor primario de 115 pacientes, antes de que reciban la QTN estándar para el cáncer de mama estadio II-III (antraciclinas más taxanos x 6-8 ciclos), utilizando técnicas inmunohistoquímicas en *arrays* matriciales de tejidos (TMA). Se ha correlacionado la expresión de estas proteínas con la respuesta al tratamiento, valorada en la pieza quirúrgica de la misma paciente. A partir de los marcadores con valor predictivo independiente, hemos generado una firma molecular predictiva de buena respuesta con un coeficiente de determinación del **55,6%**, una sensibilidad del **100%** y una especificidad del **39%**. Hemos simplificado esta firma molecular constituida por 5 marcadores en dos condiciones. La primera condición se basa en la detección en el tumor primario de 3 o menos de los marcadores de la firma. La segunda condición es la detección de los 4 o 5 marcadores de la firma y presenta **26 veces** más probabilidad de responder bien a la QTN que la primera condición (**p=0,00004**).

Seguidamente, hemos determinado marcadores predictivos según el estatus hormonal del tumor de la paciente. Los marcadores predictivos de buena respuesta para tumores **sin expresión de receptores hormonales (RH)** son Ciclina D1 nuclear, Aldehído deshidrogenasa-1, HER4 citoplasmático, pHER3 de membrana y pAKt citoplasmático. En cambio, Bcl-2 es un marcador de resistencia a la QTN para **los tumores con expresión de los RH**. Además, hemos comparado la expresión de las proteínas del estudio entre la serie de tumores con RH positivos versus RH negativos. Los tumores con RH negativos presentan tanto una mayor expresión de p-Akt, EGFR1, HER2 y p-HER3 como una menor expresión de p27 y Bcl-2 que los tumores con RH positivos.

A continuación, hemos correlacionado la expresión de las 22 proteínas del estudio con la aparición de metástasis. A partir de los marcadores con valor pronóstico independiente, hemos generado una firma de mal pronóstico de la supervivencia libre de metástasis (SLM) con un coeficiente de determinación del **36,4%**, una sensibilidad del **66,6%** y una especificidad del **87,9%**. La primera condición de la firma de mal pronóstico se basa en la detección de 0 o 1 marcador en el tumor primario. La segunda condición es la detección de 2 o 3 marcadores y presenta 14 veces más probabilidad de desarrollar metástasis (**p=0,001**). La SLM a 10 años de la primera condición es del **85%**, mientras que la SLM a 10 años de la segunda condición es del **35%** (**p=0,0006**).

Finalmente, hemos valorado la expresión de Captetina L, 53BP1 y VDR en 249 tumores de cáncer de mama sin tratar. A partir de estos resultados, hemos obtenido que los Triples Negativos (TNBC) presentan una menor expresión de 53BP1 y una mayor expresión de Captetina L que el resto de subtipos de cáncer de mama. La mayoría de los TNBC son deficientes en BRCA1 y pueden ser tratados con inhibidores de PARP. En los tumores deficientes en BRCA1, 53BP1 estimula la recombinación no homóloga del sistema de reparación del ADN que promueve un caos cromosómico catastrófico. Pero, cuando 53BP1 es degradado por Captetina L nuclear con los niveles bajos de VDR, las células tumorales pueden restablecer la recombinación homóloga y ser resistentes los inhibidores de PARP. Esta triple firma no está correlacionada con la resistencia a la QTN ni con la aparición de metástasis en los TNBC.

2. RESUM

La persistència del tumor residual macroscòpic (> 1,0 cm) després de la quimioteràpia neoadyuvant (QTN) està present en un 70% de les pacients i determina un risc de recaiguda a distància del 35% en 3 anys. En els últims anys, s'ha incrementat el nombre de publicacions referents a marcadors amb valor predictiu independent. El objectiu d'aquest estudi es monitoritzar la expressió de les 22 proteïnes seleccionades sobre el tumor primari de 115 pacients, abans de que rebin la QTN estàndard pel càncer de mama estadi II-III (antraciclina més taxans x 6-8 cicles), utilitzant tècniques immunohistoquímiques en *arrays* matricials de teixits (TMA). S'ha correlacionat la expressió d'aquestes proteïnes amb la resposta al tractament valorada en la peça quirúrgica de la mateixa pacient. A partir dels marcadors amb valor predictiu independent, hem generat una signatura molecular predictiva de bona resposta amb un coeficient de determinació del **55,6%**, una sensibilitat del **100%** i una especificitat del **39%**. Hem simplificat aquesta signatura molecular constituïda per 5 marcadors en dues condicions. La primera condició es basa en detectar 3 o menys marcadors de la signatura en el tumor primari. La segona condició és la detecció de 4 o 5 marcadors de la signatura i presenta **26 vegades** més probabilitat a respondre bé a la QTN que la primera condició (**p=0,00004**).

Seguidament, hem determinat marcadors predictius segons l'estat hormonal del tumor de la pacient. Els marcadors predictius de bona resposta per tumors **sense expressió de receptors hormonals** (RH) són Ciclina D1 nuclear, Aldehid deshidrogenasa-1, HER4 citoplasmàtic, pHER3 de membrana i pAkt citoplasmàtic. En canvi, Bcl-2 és un marcador de resistència a la QTN **pels tumors amb expressió dels RH**. Ademés, hem comparat la expressió de les proteïnes del estudi entre la sèrie de tumors amb RH positius versus RH negatius. Els tumors amb RH negatius presenten tant una major expressió de p-Akt, EGFR1, HER2 i p-HER3 com una menor expressió de p27 i Bcl-2 que els tumors amb RH positius.

A continuació, hem correlacionat la expressió de les 22 proteïnes d'estudi amb l'aparició de metàstasis. A partir dels marcadors amb valor pronòstic

independent, hem generat una signatura de baix pronòstic de la supervivència lliure de metàstasis (SLM) amb un coeficient de determinació del **36,4%**, una sensibilitat del **66,6%** i una especificitat del **87,9%**. La primera condició de la signatura de baix pronòstic es basa en la detecció de 0 o 1 marcador en el tumor primari. La segona condició es la detecció de 2 o 3 marcadors i presenta 14 vegades més probabilitat de desenvolupar metàstasis (**p=0,001**). La SLM a 10 anys de la primera condició és del **85%**, mentre que la SLM a 10 anys de la segona condició és del **35%** (**p=0,0006**).

Finalment, hem valorat la expressió de Catepsina L, 53BP1 i VDR en 249 tumors de càncer de mama que no han rebut cap tractament. A partir d'aquests resultats, hem demostrat que els Triples Negatius (TNBC) presenten una menor expressió de 53BP1 i una major expressió nuclear de Catepsina L que la resta de subtipus de càncer de mama. La majoria dels TNBC són deficients en BRCA1 i són tractats amb inhibidors de PARP. En els tumors deficients en BRCA1, 53BP1 estimula la recombinació no homòloga del sistema de reparació del ADN, promouent un caos cromosòmic catastròfic. Però, quan 53BP1 es degradat per Catepsina L nuclear amb baixos nivells de VDR, les cèl·lules tumorals poden restablir la recombinació homòloga i ser resistents als inhibidors de PARP. Aquesta triple signatura no està correlacionada amb la resistència a la QTN ni amb l'aparició de metàstasis en els TNBC.

3. SUMMARY.

In two thirds of breast cancer patients, large (>1 cm) residual tumors are present after neoadjuvant chemotherapy (NCT). A Residual Tumor is an indicator of relapse and survival, and 35% of patients with a macroscopic tumor will relapse within 3 years. The goal of this study was to assess the predictive significance of a panel of molecular biomarkers, related with the response to treatment or drug resistance to NCT, as determined on the diagnostic tumor. To this end, tissue microarrays (TMA) were generated with tumor samples from 115 patients prior to the initiation of NCT for stage II-III breast cancer (anthracyclines plus taxanes for 6 to 8 cycles). The expression of 22 proteins was examined using Immunohistochemistry (IHC). Protein expression was correlated with the response to treatment, evaluated in the surgical specimen. Next, a predictive signature of good response was generated from independent markers of predictive value, with a determination coefficient of **55.6%**, a sensibility of **100%** and a specificity of **39%**. The original predictive signature was simplified to 5 markers and two distinct forms of presentation of these markers in the patient's tumor at diagnosis: Condition 1 includes tumors expressing three or less markers. Condition 2 includes tumors expressing four or five markers, and associates with a 26-fold increase in the chances of these patients to have a good response to NCT (**p=0.00004**).

Next, predictive markers of good response to NCT, according to the expression of hormone receptors in the tumor, were identified. In tumors lacking hormone receptor (HR) expression, nuclear CyclinD1, Aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1), cytoplasmic HER4, p-HER3 and cytoplasmic p-Akt are markers of good response. In tumors expressing HR, Bcl-2 is a marker of resistance to NCT. In addition, the expression of predictive markers was compared in HR positive and HR negative tumors. Tumors lacking HR expression have both an increase of p-Akt, EGFR1, HER2 and p-HER3 and a decrease of p27 and Bcl-2 compared to the expression of these proteins in HR positive tumors.

Thus, protein expression was correlated with appearance of metastases. Next, a worse prognostic signature was generated from independent markers of prognostic value, with a determination coefficient of **36.4%**, a sensibility of

66.6% and a specificity of **87.9%**. Condition 1 of this signature includes tumors expressing 0 or 1 markers. Condition 2 includes tumors expressing 2 or 3 markers, and associates with a 14-fold increase in the chances of these patients to have metastases (**p=0.001**). The 5-year DDFS (Distant Disease Free Survival) for 0-1 and 2-3 markers was **85%** and **35%** (**p =0.0006**).

Finally, analysis of Cathepsin L, 53BP1 and VDR expression in tumors from 249 patients provided an explanation for the loss of 53BP1 associated to resistance to PARP inhibitors in Triple Negative Breast Cancer (TNBC). TNBC tumors have the highest nuclear levels of Cathepsin L causing the lowest levels of 53BP1. The majority of TNBC are deficient in BRCA1 and likely to receive treatment with PARP inhibitors. In tumors without BRCA1, 53BP1 spurs excessive non homologous end joining, a DNA repair mechanism that can cause fatal chromosomal chaos. But with 53BP1 out of the way in tumors with high CTSL, the cells are able to resume homologous recombination and become resistant to PARP inhibitors. Furthermore, the high levels of 53BP1 coexisting with high nuclear CTSL in the presence of high VDR also suggest that 53BP1 is degraded by nuclear Cathepsin L only when there are low levels of vitamin D receptor. Tumor VDR levels can be enhanced by Vitamin D. However, this triple signature was not correlated to both the response of NCT and the appearance of metastases.

ÍNDICE

RESUMENES.....	9
AGRADECIMIENTOS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
ABREVIACIONES.....	27
1. INTRODUCCIÓN	31
1.1. EPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO	31
1.2. DIAGNÓSTICO	33
1.3. SUBTIPOS MOLECULARES.....	35
1.3.1. CORRELACIÓN ENTRE LOS SUBTIPOS INTRÍNSECOS Y LOS SUBTIPOS POR INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ).	37
1.4. TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA.....	40
1.4.1. CIRUGÍA DE LA MAMA.....	40
1.4.1.2. VACIAMIENTO GANGLIONAR AXILAR.....	41
1.4.2. RADIOTERAPIA.....	42
1.4.3. TRATAMIENTO SISTÉMICO: QUIMIOTERAPIA Y TERAPIA DIRIGIDA.....	42
1.4.3.1. QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE VERSUS ADYUVANTE.....	42
1.4.3.2. QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE ESTÁNDAR.....	44
1.4.3.3. HORMONOTERAPIA.....	47
1.4.3.4. ANTI-HER2 (TRASTUZUMAB)	49
1.5. SUBTIPOS INTRÍNSECOS Y CORRELACIONES CLÍNICAS (RCP; SG Y SLE).....	49
1.6. MARCADORES CON VALOR PREDICTIVO Y/O PRONÓSTICO.....	53
1.6.1. BIOMARCADORES DEL FENOTIPADO MOLECULAR.....	56
1.6.2. BIOMARCADORES DEL MECANISMO DE SUPERACIÓN DE LA APOPTOSIS.....	56
1.6.3. BIOMARCADORES DE LA ACTIVACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN	57
1.6.4. BIOMARCADORES DEL MECANISMO DE DESREGULACIÓN DEL CICLO CELULAR.....	59
1.6.5. BIOMARCADORES IMPLICADOS EN PROCESOS IMPORTANTES PARA EL CÁNCER DE MAMA.....	59
1.7. DOBLE PROBLEMÁTICA ASOCIADA A LOS TRIPLE NEGATIVOS.....	60
1.7.1. NUEVA CLASIFICACIÓN DE LOS TNBC.....	61
1.7.2. CATEPSINA-L Y 53BP1: NUEVAS DIANAS TERAPÉUTICAS PARA LOS TRIPLE NEGATIVOS.....	64
1.7.2.1. SISTEMAS DE REPARACIÓN DE LA ROTURA DE LA DOBLE HEBRA DEL ADN (DSBR).....	65
1.7.2.2. INTERACCIÓN DE 53BP1 Y BRCA1 EN LOS SISTEMAS DE REPARACIÓN DE DOBLE HEBRA... ..	68
1.7.2.3. MECANISMO DE REGULACIÓN DE 53BP1 MEDIANTE CATEPSINA L EN UN MODELO DE FIBROBLASTOS.....	70
1.7.2.4. VITAMINA D Y EL CÁNCER.....	72
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	77
2.1. HIPÓTESIS.....	77
2.2. OBJETIVOS.....	78
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	81
3.1. PACIENTES.....	81
3.1.1. ESTUDIO DE MARCADORES PREDICTIVOS.....	81
3.1.2. DEGRADACIÓN DE 53BP1 MEDIANTE CATEPSINA L NUCLEAR EN LOS TNBC.....	84

3.2. DISEÑO DEL ARRAY MATRICIAL DE TEJIDOS (TMA)	85
3.3. MÉTODO INMUNOHISTOQUÍMICO	86
3.4. MÉTODO DE HIBRIDACIÓN “IN SITU” CON FLUORESCENCIA (FISH)	88
3.5. MÉTODO ESTADÍSTICO	88
3.5.1. MÉTODO ESTADÍSTICO PARA BIOMARCADORES PREDICTIVOS DE QT NEOADYUVANTE GLOBALES Y ESPECÍFICOS AL ESTATUS HORMONAL DEL TUMOR.....	88
3.5.2. ESTUDIO DE LA CORRELACIÓN ENTRE VDR, CTSL Y 53BP1 EN LOS TNBC.....	90
4. RESULTADOS	93
4.1. ESTUDIO DE BIOMARCADORES PREDICTIVOS EN LAS CORE BIOPSIAS	93
4.1.1. EVALUACIÓN DE LOS MARCADORES PREDICTIVOS DE LA RESPUESTA A LA QTN DE FORMA INDEPENDIENTE.....	97
4.1.2. ANÁLISIS MULTIVARIANTE	99
4.1.2.1. FIRMA PREDICTIVA DE LA QTN	99
4.1.2.2. ESTUDIO DEL VALOR PRONÓSTICO DE LA FIRMA PREDICTIVA	106
4.2. MARCADORES PREDICTIVOS SEGÚN LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES HORMONALES EN EL TUMOR	109
4.2.1. MARCADORES PREDICTIVOS DE TUMORES CON RECEPTORES HORMONALES NEGATIVOS.	110
4.2.2. MARCADORES PREDICTIVOS DE TUMORES CON RH POSITIVOS.	113
4.2.3. DIFERENCIAS DE EXPRESIÓN PROTEICA SEGÚN LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES HORMONALES DEL TUMOR	115
4.3. MARCADORES PRONÓSTICO DE LA APARICIÓN DE METÁSTASIS	120
4.4. DEGRADACIÓN DE 53BP1 MEDIANTE CATEPSINA L NUCLEAR EN LOS TNBC	127
4.4.1. ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LA TRIPLE FIRMA (VDR, CTSL Y 53BP1) DE LOS TNBC CON LA RESPUESTA A LA QTN Y SLM.....	135
5. DISCUSIÓN	139
5.1. FIRMA DE PREDICCIÓN DEL TIPO DE RESPUESTA A LA QTN	139
5.2. MARCADORES PREDICTIVOS SEGÚN LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES HORMONALES DEL TUMOR	145
5.3. MARCADORES CON VALOR PRONÓSTICO DE LA SLM	148
5.4. DEGRADACIÓN DE 53BP1 MEDIANTE CATEPSINA L NUCLEAR EN LOS TNBC	150
6. CONCLUSIONES	155
7. ANEXOS	159
7.1. ANEXO 1: DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS INMUNOHISTOQUÍMICOS REALIZADOS CON LOS ANTICUERPOS ESTUDIADOS	159
7.2. ANEXO 2: ESTADIAJE	161
7.3. ANEXO 3: DESCRIPCIÓN DE LOS RESULTADOS IHQ OBTENIDOS DE CADA ANTICUERPO EN LA COHORTE DE ESTUDIO (N=115)	163
7.4. ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN ENTRE DEL PORCENTAJE DEL CAMBIO DEL TAMAÑO TUMORAL Y EL ESTADIO DEL TUMOR RESIDUAL	165

7.5. ARTÍCULO SOBRE LA DEGRADACIÓN DE 53BP1 EN CÉLULAS TUMORALES DE MAMA. 169

8. BIBLIOGRAFÍA 179

AGRADECIMIENTOS

Primero de todo, quiero agradecer a mis directores de tesis el Dr. Xavier Matias-Guiu y Dr. Antonieta Salud que me hayan dado la oportunidad de trabajar en un tema tan interesante como es el cáncer de mama. Antes de empezar el doctorado, era un tema totalmente desconocido para mí y lo he encontrado fascinante. Aunque, inicialmente, quién me introdujo en el mundo del cáncer de mama es el Dr. Llombart. Aún recuerdo el primer día que empezamos hablar de los posibles marcadores a estudiar y empezó a nombrar todas las diferentes vías de señalización que podíamos tener en cuenta y pensé para mi, dónde me he metido. Sin embargo, a lo largo de estos 4 años, esas vías y nombres desconocidos empezaron a tomar sentido. De repente, un día, se montó en mi cabeza una gran cantidad de las piezas de este puzle tan complejo que es la biología molecular del cáncer.

También, tengo que agradecer al Dr. Matias de haberme dado la oportunidad de colaborar con dos grandes investigadores como son Adriana Dusso y Susana Gonzalo, de las cuáles he aprendido muchísimo. Con ellas, he llegado a ser mejor investigadora, enseñándome a interpretar los resultados y mostrándome el tipo de investigadora que quiero llegar a ser. Además de ser grandes investigadoras, son de esas personas que merece la pena conocer, dispuestas a escucharte y ayudarte en lo que puedan.

Por otra parte, he tenido también la suerte de colaborar con dos departamentos que van cogidos de la mano para cualquier tipo de cáncer; oncología y anatomía patológica. He de agradecer la paciencia y el tiempo que han invertido en resolver mis interminables preguntas, concretamente a los patólogos de cáncer mama, la Dra. Panadés y el Dr. Vilardell, así como el oncólogo de cáncer mama, el Dr. Morales.

Otro departamento que debo reconocer la ayuda que ha ofrecido a este proyecto es el de Bioestadística. Me ha gustado tener la oportunidad de trabajar con los dos estadísticos del IRB Lleida Montse Martínez y Joan Valls, así he visto diferentes formas de analizar los datos.

Otras personas que me han apoyado durante mi doctorado son el grupo de personas que trabajamos en inmunohistoquímica, formado por Esmeralda Castellblanco, Maria Santacana y Oscar Maiques. A pesar de trabajar en

proyectos diferentes, han sido importantes para mí en el momento de buscar un poco de consuelo delante un anticuerpo que no sale u otros obstáculos que te vas encontrado por el camino de la investigación. En especial, quiero agradecerle a Maria Santacana por haberme enseñado todo lo que sé de las técnicas IHQ y los TMAs, así como, una gran persona con la que he podido hablar de cualquier cosa cuando lo he necesito. Además, ha sido una compañera fantástica de despacho, conjuntamente con Felip Vilardell. También, quiero agradecer a Lúdia Parra, su disposición en ayudar en todo lo que pueda y, sobretodo, su amigable sonrisa cuando le pides que te corte esos interminables TMAs o algún bloque.

También quiero dar las grácias a todos los compañeros del servicio de Anatomía Patológica con los que he trabajado estos años (técnicos y patólogos), en especial, a mis compis de la hora de la comida, así como, las investigadoras pre-doctorales o post-doctorales, quién siempre es un placer hablar con ellas de ciencia o de cualquier cosa en general. En especial, con Anna Macià y Laura Bergadà, que nuestros viajes en coche Tàrrega-Bellpuig-Lleida, siempre nos han permitido divagar de la vida y los interminables problemas del mundo.

Finalmente, quiero agradecer a toda mi familia y amigos el apoyo que he recibido estos años de pre-doctorado. En especial, a Esteve, quién ha sufrido muy de cerca mis alti-bajos en este largo camino, pero siempre ha sabido como animarme y darme fuerzas para seguir adelante y a mi Carla, que me ha mostrado las cosas que son realmente importantes en la vida.

ABREVIATURAS

ABREVIACIONES

ALDH-1 Aldehído Lactato Deshidrogenasa-1

Cit Citoplasmático

CTSL Catepsina L

DSBR Reparación de la rotura de la doble hélice del ADN

EGFR o HER1 Receptor de factores de crecimiento epidermoide de tipo 1

HER Familia de receptores de factores de crecimiento epidermoide

FGFR-2 Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2

H-score Histo-score

HER-2 Receptores de factores de crecimiento epidermoide de tipo 2.

Her2 Subtipo molecular del Cáncer de Mama que sobreexpresa HER-2

IHQ Inmunohistoquímica

Mem Membrana

Neo Neoadyuvante

NHEJ Recombinación No Homóloga

Nuc Nuclear

QT Quimioterapia

QTN Quimioterapia Neoadyuvante

RC Respuesta Clínica

RCp Respuesta Patológica Completa

RE Receptores de Estrógeno

RH Receptores Hormonales

RPG Receptores de Progesterona

ReHo Recombinación Homóloga

SG Supervivencia Global

SLE Supervivencia Libre de Enfermedad

SLM Supervivencia Libre de Metástasis

SLP Supervivencia Libre de Progresión

VDR Receptor de la Vitamina D

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El adecuado control del cáncer de mama precisa de la combinación de terapias sistémicas y locales. Las terapias sistémicas, principalmente la quimioterapia, se ha implantado como la terapia de elección en pacientes con estadios II/III con el doble objetivo: 1) reducir la carga tumoral local, lo cual permite mayores tasas de cirugía conservadora y 2) personalizar el tratamiento según el subtipo molecular para maximizar la quimiosensibilidad, debido a la gran heterogeneidad que presenta el cáncer de mama.

De hecho, la eficacia del tratamiento del cáncer de mama ha mejorado sustancialmente tras la identificación de marcadores para su clasificación en los diferentes subtipos tumorales, tales como la sobreexpresión del receptor de estrógeno (RE) y/o del receptor de progesterona (RPG) y la amplificación de HER2. Estas tres dianas terapéuticas han sido claves para prevenir/atenuar la progresión del carcinoma, proporcionando una terapia específica para los Luminales A y B con el Tamoxifeno o los Inhibidores de Aromatasa y con Herceptin para los Her 2. Estos tratamientos diana combinados con la quimioterapia neoadyuvante (QTN) han mejorado la respuesta del tratamiento y la supervivencia libre de progresión (SLP) para estos subtipos moleculares. Sin embargo, la identificación de marcadores específicos de quimioresistencia/quimiosensibilidad aportará una información valiosa para el clínico en el momento de diseñar la estrategia terapéutica más adecuada para cada paciente. En el momento de elegir tratamiento es importante tener en cuenta el subtipo molecular del tumor para llegar a alcanzar la Respuesta Patológica Completa (RCp) que, actualmente, es el mejor marcador de supervivencia libre de enfermedad (SLE).

1.1. EPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente entre las mujeres, por lo que constituye un importante problema de salud pública, tal como se muestra en la figura 1.1.

Globalmente, el cáncer de mama representa el 23% de todos los cánceres que sufre la mujer y su frecuencia aumenta al 27 % en los países desarrollados (Lakhani et al, 2012). En Europa, en el 2008, se diagnosticaron aproximadamente 3,2 millones de casos nuevos y, de los 1,7 millones de muertes por cáncer, el cáncer de mama era el segundo más común con 421.000 (13,1%) y la tercera causa de muerte por cáncer con 129.000 (7,5%) (Ferlay et al, 2010).

La incidencia estimada en España, en el 2002, era de 1.152,161 casos nuevos de cáncer de mama y 411.093 muertes. Además, en el 2002, la tasa de incidencia ajustada (utilizando como referencia la población mundial) era de 76 casos nuevos por 100.000 mujeres y año, mientras que en la Unión Europea, la media era de 97 casos nuevos por 100.000 mujeres y año. España fue uno de los países europeos con la incidencia más baja de cáncer de mama (Ascunce et al, 2007; Pollan et al, 2010). Sin embargo, recientemente, se ha incrementado la incidencia en las mujeres españolas, mayores de 45 años, debido al uso excesivo de mamografías (Pollan et al, 2010).

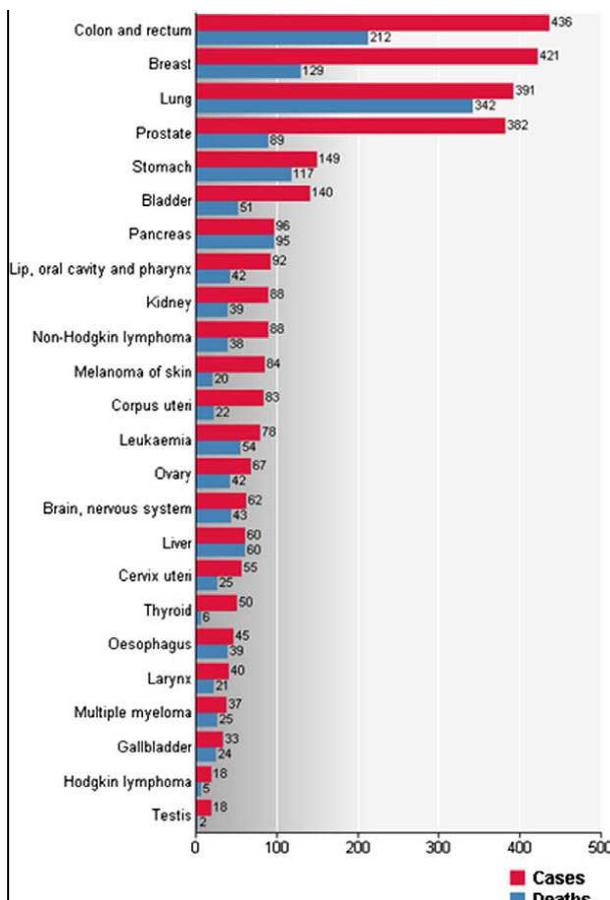


Figura 1.1. Estimación del número de casos de cáncer y de muertes causados por el cáncer en los 40 países Europeos en el 2008. (Ferlay et al, 2010).

La etiología del cáncer de mama es multifactorial, e incluye factores como la dieta, factores reproductivos y hormonales. La historia reproductiva de la mujer está asociada con el riesgo a padecer cáncer de mama. Este tipo de carcinoma es más frecuente en mujeres con menarquía temprana, que tienen pocos hijos, que empiezan a criar a una edad tardía, con infertilidad o con una menopausia tardía. Aunque algunos factores aumentan el riesgo de padecer un cáncer de mama, el 80% de los casos no tienen aparentemente ninguna relación con dichos factores de riesgo (Burstein et al, 2008; Lakhani et al, 2012).

Actualmente, se considera que sólo el 5-10% de los cánceres de mama son hereditarios y las mutaciones germinales en BRCA 1 y BRCA 2 únicamente explican el 15-20% de todos estos casos. Las mujeres portadoras de la mutación germinal en BRCA1 tienen un 50-80% de riesgo a desarrollar el cáncer de mama al largo de su vida y un 20-40% de riesgo a desarrollar un cáncer de ovario (Aly & Ganesan, 2011; King et al, 2003). La función de ambos genes es esencial para la reparación efectiva de la rotura de la doble cadena del ADN mediante el sistema de recombinación homóloga. Se han desarrollado nuevas terapias para los cánceres asociados a la pérdida de la función de BRCA1 y BRCA2 como el inhibidor de poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP). Este inhibidor bloquea la reparación del ADN roto en las células tumorales, volviéndolas deficientes en el sistema de reparación del ADN roto (Rosai, 2011) y las sensibiliza al tratamiento.

1.2. DIAGNÓSTICO

Cualquier área de la mama que presente alguno de los criterios de sospecha de cáncer tanto por exploración como por criterios radiológicos requiere una biopsia o core biopsia para el diagnóstico. La core biopsia es sensible para la detección de lesiones impalpables y es recomendada para la evaluación de microcalcificaciones. Es esencial combinar esta técnica con la valoración

clínica y radiológica para poder dar un diagnóstico definitivo (Lakhani et al, 2012).

La tabla 1.1 muestra las ventajas y desventajas de las core biopsias.

Técnica	Ventajas	Desventajas
Core biopsia	Rápida. Sin incisión quirúrgica. Es posible hacer inmunohistoquímica en la muestra.	Algunos falsos negativos. Error de muestra en lesiones extensas.

Tabla 1.1. Core biopsia: Técnica de diagnóstico del cáncer de mama (De Vita et al, 2006)

La core biopsia puede indicar el tipo histológico, pero nunca de forma definitiva, debido a la existencia de tumores con tipos mixtos. El grado histológico puede ser valorado en la core biopsia con una correlación de un 70% con el grado de la pieza quirúrgica. La valoración de los receptores hormonales y la amplificación de HER2 en la core biopsia tiene una fiabilidad del 98-99% (Lakhani et al, 2012). Sin embargo, si la presencia tumoral en la core biopsia es suficientemente representativa, el pequeño tamaño de la biopsia permite una óptima fijación y un mejor conservación del tumor que la propia pieza quirúrgica. En estas situaciones, el resultado inmunohistoquímico es incluso más fiable en la core biopsia que en la pieza quirúrgica. Es muy importante llegar a un diagnóstico para ayudar a decidir el tratamiento (tratamiento adyuvante vs. neoadyuvante) y el procedimiento quirúrgico.

1.3. SUBTIPOS MOLECULARES.

El desarrollo del cáncer de mama invasivo involucra múltiples alteraciones genéticas. En el 2000, Perou y colaboradores clasificaron el cáncer de mama en diferentes subgrupos basados en la expresión de un mismo grupo de genes usando una plataforma “microarray” que ha sido apoyado por la comunidad médica y científica. Esta nueva clasificación aportó una nueva visión de la biología del cáncer de mama con gran impacto en su estrategia terapéutica (Perou et al, 2000; Rosai, 2011).

Los subtipos de cáncer de mama reconocidos por la firma génica de Perou son: 1) luminal A, 2) luminal B, 3) Her2/neu, 4) basal-like y 5) normal-like.

El subgrupo **Normal-Like** se consideró como algo artefactual o ficticio, que podría tratarse de tejido mamario normal. Por tanto, los subtipos intrínsecos de cáncer de mama resultaron ser 4. Dos de ellos, agrupan tumores con una buena expresión de receptores hormonales (RH) (**Luminal A y Luminal B**). Los otros dos son grupos de tumores sin expresión de RH o con una expresión muy baja, que se subdividen en los subgrupos **Her2 enriquecido y Basal-Like** dependiendo de la expresión o de su ausencia, respectivamente, de los genes relacionados con el receptor del factor de crecimiento epidermoide (ERBB2/HER2) (Sorlie et al, 2001).

La Tabla 1.2 resume algunas características intrínsecas de cada subtipo molecular del cáncer de mama, tanto a nivel de expresión génica como su correlación histológica.

SUBTIPOS MOLECULARES DEL CÁNCER DE MAMA				
	Luminal A	Luminal B	Her2/neu	Basal-like
Perfil de expresión génica	Citoqueratinas, alta expresión de receptores de hormonas y sus genes asociados.	Citoqueratinas, expresión moderada y débil de receptores hormonales y sus genes asociados.	Alta expresión de HER2 y otros genes en el cromosoma 17. Baja expresión de RE y genes asociados.	Alta expresión de genes epiteliales basales, citoqueratinas basales. Baja expresión de RE y sus genes asociados. Baja expresión de HER2/neu
Características biológicas y clínicas	~ 50% de cáncer de mama invasivo. RE/RPG positivos HER2/neu negativo	~20% de cáncer de mama invasivo. RE/RPG positivos Expresión variable de HER2/neu (positivo o negativo). Más proliferación que Luminal A. Luminal B tiende a grados histológicos más altos que el Luminal A.	~15% de cáncer de mama invasivo. RE/RPG negativos. HER2/neu positivo Alta proliferación. Mutación de TP53. Suelen ser de mayor grado y con nódulos positivos	~15% de cáncer de mama invasivo. La mayoría de RE/RPG y HER2/neu negativos (triple negativos) Alta proliferación Mutación TP53; Disfunción de BRCA1 (germinal, esporádica) Especialmente común en mujeres Africanas y Americanas.
Correlación histológica	Carcinoma tubular Carcinoma cribiforme. Carcinoma Ductal invasivo de bajo grado NOS. Carcinoma lobulillar	Carcinoma ductal invasivo NOS. Carcinoma micropapilar.	Carcinoma ductal invasivo de alto grado NOS.	Carcinoma ductal invasivo de alto grado NOS.

Tabla 1.2. Clasificación de los subtipos moleculares del cáncer de mama (Rosai, 2011)

Estos subtipos moleculares presentan claras diferencias en la supervivencia global (SG) y la SLP, tal como se muestra en la figura 1.2. El subtipo molecular de mejor supervivencia es el **Luminal A** y los de peor supervivencia son el subtipo **Her2 enriquecido** y el subtipo **Basal-Like**. El subtipo **Luminal B** tiene

un pronóstico intermedio entre el Luminal A y los otros dos subtipos (Sorlie et al, 2003).

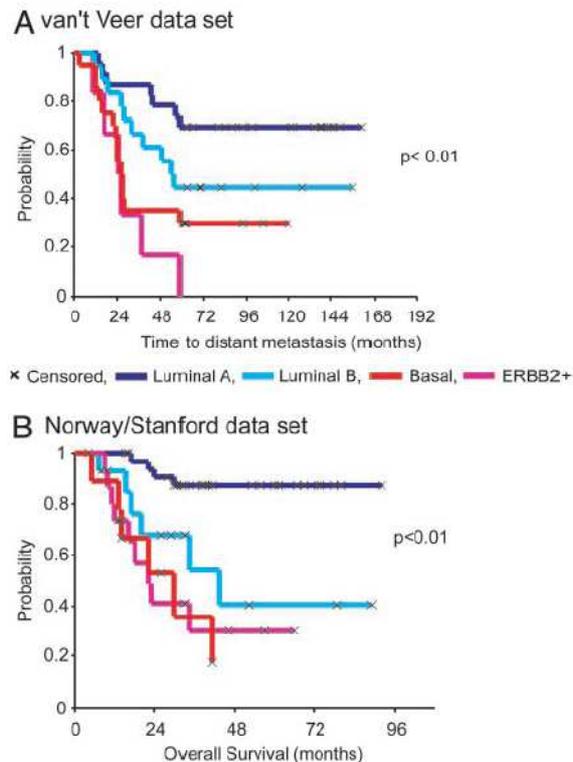


Figura 1.2. Análisis Kaplan-Meier de la supervivencia del cáncer de mama en dos cohortes de pacientes. (A) El tiempo de desarrollo de metástasis en 97 casos esporádicos en Van't Veer et al. (B) La supervivencia global en 72 pacientes con cáncer mama localmente avanzado en la cohorte de Noruega. Los subgrupos de tumor Normal-like fueron eliminados del análisis (Sorlie et al, 2003).

1.3.1. CORRELACIÓN ENTRE LOS SUBTIPOS INTRÍNSECOS Y LOS SUBTIPOS POR INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ).

El uso de los subgrupos de cáncer de mama a partir de los perfiles de expresión génica está muy restringido en la clínica habitual, tanto por el coste económico como por la dificultad de la técnica en la realización de perfiles de expresión génica de alto rendimiento utilizando un material parafinado. En consecuencia, existe un gran interés en clasificar los tumores en subtipos a partir de marcadores inmunohistoquímicos (IHQ) con las mismas

características que los subtipos clasificados por expresión génica (Callagy et al, 2003).

En principio, los **subtipos luminales** se identifican IHQ a partir de la expresión de receptores de estrógenos (RE) y/o progesterona (RPG). Las pacientes con tumores que expresan RH son tratadas con tamoxifeno adyuvante y reducen en más de un 30% la probabilidad de recaída y muerte. En cambio, estos tumores responden muy mal al tratamiento adyuvante con quimioterapia debido a su expresión hormonal (Cheang et al, 2009). Los **Luminales A** se distinguen de los **Luminales B** por una menor expresión de genes implicados en proliferación. Se ha elegido como marcador de proliferación al Ki67 con el punto de corte del 14% (Cheang et al, 2009; Oh et al, 2006). Sin embargo, en la actualidad, se sospecha que el punto de corte de Ki67 debe ser más elevado, probablemente sobre el 20%.

Los tumores que no expresan RH por IHQ, suelen subdividirse en 2 grupos: 1) El subtipo **Her2 enriquecido** que sobre-expresa o amplifican HER2, es fácil de identificar por IHQ o por hibridación de fluorescencia “in situ”. 2) El subtipo **Triple negativo** (TNBC) que no sobre-expresa HER2 (**RE-, RPG-, HER2-**), en muchas ocasiones se le considera como equivalente al **subtipo Basal-like**, ya que la mayoría de los TNBC son Basal-like (Perou, 2011). No obstante, todos los tumores TNBC no expresan citoqueratinas basales (CK), que sería la forma de confirmar la equivalencia con el subtipo Basal-Like de Perou. En la identificación del subtipo basal-like es necesaria la expresión positiva de CK5/6 y/o EGFR. Estos 2 marcadores nos clasifican los Basal-like con una especificidad del 100% y una sensibilidad del 76% (Millar et al, 2009; Nielsen et al, 2004).

En resumen, la tabla 1.3 muestra los marcadores utilizados para clasificar los fenotipos moleculares de cáncer de mama mediante IHQ, que se corresponden con los subtipos intrínsecos de Perou.

SUBTIPOS MOLECULAR POR IHQ				
Firma inmuno	Luminal A	Luminal B	Her2/neu	Basal-like
RE, PGR	RE + y/o RPG+	RE + y/o RPG+	RE- RPG-	RE- RPG-
HER2	HER2 -	HER2+ o HER2-	HER2+	HER2-
Otros	Ki67 <14	Ki67≥14		CK5/6+ y/o EGFR +

Tabla 1.3. Clasificación de los Subtipos Moleculares por Inmunohistoquímica (Cheang et al, 2009; Hugh et al, 2009; Lakhani et al, 2012; Millar et al, 2009; O'Brien et al, 2010).

La figura 1.3 muestra las diferencias significativas del valor pronóstico de los diferentes subtipos moleculares clasificados por IHQ a los 5 años después del diagnóstico. Este estudio trató sólo a las pacientes cualificadas para el tratamiento anti-hormonal de forma adyuvante. En él, se concluyó que los Luminales A presentaban la mejor supervivencia o pronóstico, mientras que los Her2 conjuntamente con el fenotipo con 5 negativos (que equivale al Triple Negativo) eran los de peor pronóstico o supervivencia. Curiosamente, el subtipo Her2/RH- es uno de los grupos de peor supervivencia a 5 años. Por el contrario, los Her2/RH+ tienen una mejor supervivencia a 5 años debido a la influencia de la expresión de los receptores hormonales del tumor en la supervivencia (Engstrom et al, 2013).

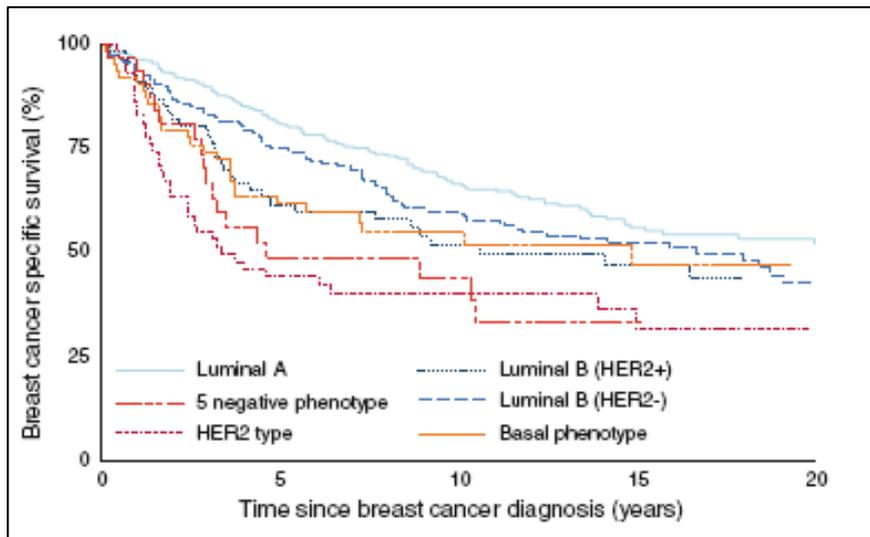


Figura 1.3. Curvas de Kaplan-Meier. Supervivencia específica del cáncer de mama según el tipo molecular determinado por IHQ. P-valor del test del long-rank de las diferencias de las curvas de supervivencia es $\lt;0,0001$ (Engstrom et al, 2013).

1.4. TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA.

El tratamiento del cáncer de mama es multidisciplinar, combina una o varias de las siguientes terapias: cirugía local y ganglionar, radioterapia, quimioterapia, hormonoterapia en pacientes hormosensibles y nuevas terapias biológicas. El tratamiento del carcinoma de mama puede ser **neoadyuvante** (cualquier droga o radiación administrada antes de la cirugía de la mama) o **adyuvante** (la administración de droga o radiación después de la cirugía de mama).

1.4.1. CIRUGÍA DE LA MAMA.

El abordaje quirúrgico incluye el tumor primario mamario con claros márgenes de escisión, intentando una cirugía conservadora. No existe uniformidad acerca de la definición de **márgenes negativos**. El NSABP (Proyecto de Cirugía Nacional de Mama e Intestino) requiere una distancia libre de tumor de 1 a 2

mm, mientras otros grupos prefieren dejar de 5 a 10 mm. En general, la primera definición de márgenes libres (entre 1 y 2 mm) se considera aceptable, siempre y cuando tras la cirugía conservadora se aplique una radioterapia complementaria (Vicini et al, 1992; Weiss et al, 1992).

Diferentes estudios aleatorios han demostrado que no existen diferencias entre la cirugía conservadora combinada con radioterapia y la mastectomía. Aunque existen algunas ocasiones dónde está más indicada la mastectomía como: 1) presencia de dos o más tumores primarios de mama en diferentes cuadrantes de la misma, 2) microcalcificaciones de aspecto maligno difusas en toda la mama y 3) historia de irradiación mamaria previa (Fisher et al, 2002; Veronesi et al, 2002). Incluso se ha demostrado que la terapia conservadora de mama es la mejor opción para el tratamiento de cánceres de mama en los estadios iniciales. Los márgenes libres de la escisión quirúrgica combinado con la radioterapia local pueden bajar exitosamente la tasa de recidivas aproximadamente al 5% a los 5 años (Millar et al, 2009).

1.4.1.2. VACIAMIENTO GANGLIONAR AXILAR.

La afectación ganglionar axilar es valorada mediante la técnica del ganglio centinela. Cuando el resultado es positivo se procede al vaciamiento ganglionar, ya que normalmente el primer sitio donde se origina una recidiva regional es en los nódulos ganglionares. Dicho vaciamiento cumple dos objetivos: 1) aportar información sobre el pronóstico y el estadiaje del carcinoma mediante el correcto estudio patológico de los ganglios axilares y 2) disminuir el riesgo de la recidiva local axilar (Straver et al, 2010). Las complicaciones asociadas al vaciamiento ganglionar, incluyendo la exéresis de los niveles I y II, son entre otras, el linfedema que se produce alrededor del 3 al 5% de casos y la neuropatía del territorio del nervio intercostobraquial (Whitworth et al, 2000).

1.4.2. RADIOTERAPIA.

El NIH (Instituto Nacional de la Salud) recomienda siempre administrar la radioterapia estándar sobre el volumen mamario o la axila tras una cirugía conservadora. El riesgo de la aparición de recidivas después de una cirugía conservadora es muy elevado, incluso sin metástasis en los nódulos linfáticos confirmado por el vaciamiento ganglionar axilar.

La radioterapia de la mama realizada inmediatamente después de la cirugía conservadora mejora la supervivencia a largo plazo. Por el contrario, la espera de aplicar radioterapia en la detección de alguna recidiva local, resulta más difícil de controlar la enfermedad local e incluso reduce levemente la mortalidad a largo plazo (Clarke et al, 2005; Darby et al, 2011).

En general, la radioterapia reduce a la mitad el riesgo de la aparición de la primera recidiva a los 10 años (del 35% al 19,3%) y reduce un 4% la tasa de mortalidad causada por cáncer de mama a los 15 años (del 25,2% al 21,4%) (Darby et al, 2011). La dosis total prescrita de la irradiación mamaria típica es de 50 Gy en 25 fracciones, usando 1,8 o 2Gy/fracción (Livi et al, 2013).

El NIH recomienda la radioterapia post-mastectomía (incluye la irradiación de la pared torácica y normalmente las áreas de drenaje ganglionar), cuando el riesgo de recidivas locales es muy alto como la afectación de 1 a 3 ganglios detectados en el vaciamiento ganglionar, tumores en estadio III o la afectación extracapsular (Clarke et al, 2005).

1.4.3. TRATAMIENTO SISTÉMICO: quimioterapia y terapia dirigida.

1.4.3.1. QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE VERSUS ADYUVANTE.

El esquema de fármacos estándar que se administra a las pacientes es una antraciclina, un taxano y un agente alquilante durante un período comprendido entre 3 y 6 meses (1998; 2005; Peto et al, 2012).

En estadios iniciales de cáncer de mama, la QTN y adyuvante generan aparentemente la misma tasa de supervivencia y de progresión libre de

enfermedad. Sin embargo, la terapia neoadyuvante permite reducir sustancialmente el tamaño del tumor primario y de los nódulos linfáticos afectados en más del 80% de los casos, permitiendo realizar un mayor número de cirugías conservadoras (Kim et al, 2013; Mauri et al, 2005; Schneeweiss et al, 2011). La quimioterapia adyuvante y neoadyuvante presentan una tasa similar de RCp (10-30% vs 10-25% a 5 años), dependiendo del esquema y de las características del tumor (Mathieu et al, 2004).

Diferentes estudios aleatorios han demostrado que no existen diferencias entre la cirugía conservadora combinada con radioterapia local respecto a la mastectomía. Incluso, se ha observado que la cirugía conservadora puede bajar aproximadamente a un 5% la tasa de recidivas a los 10 años (Darby et al, 2011; Millar et al, 2009). La QTN de las micrometástasis existentes está asociada a una mejor supervivencia en el subgrupo de mujeres jóvenes. Además, el tratamiento neoadyuvante permite una valoración rápida de la respuesta del tumor primario a un particular régimen de la quimioterapia. Por tanto, se da la oportunidad de cambiar a otro fármaco, cuando el tumor es resistente a éste ya que se obtiene una respuesta mínima o ninguna.

La quimioterapia adyuvante (después de la cirugía conservadora) con 2 o más drogas citotóxicas (poliquimioterapia) puede mejorar la supervivencia a los 10 años. El efecto de la poliquimioterapia difiere dependiendo de la edad de las mujeres, el tipo de enfermedad y los diferentes regímenes del tratamiento. La reducción de la tasa de mortalidad es más grande generalmente en las mujeres con nódulos positivos (10%) que con nódulos negativos (5%). Cuando el tratamiento se aplica en mujeres jóvenes, la reducción de la tasa de mortalidad es del 25%. Por tanto, la poliquimioterapia adyuvante es ineficaz en un estatus menopáusico, nódulos negativos o con el uso del tamoxifeno. El tamoxifeno frena la división de las células cancerosas y las convierte en menos sensible a la quimioterapia. Por ese motivo, se recomienda usarlo una vez finalizada la poliquimioterapia (1998).

1.4.3.2. QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE ESTÁNDAR.

En la mayoría de los casos, el tratamiento neoadyuvante consiste en regímenes basados en antraciclinas y taxanos concomitantes o secuenciales. (guía del 2009 de AGO para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer de mama de la versión disponible en www.agoonline.com).

El tratamiento neoadyuvante de taxanos y antraciclinas consigue doblar la tasa de RCp (respuestas completas patológicas) frente antraciclinas solas (26% Taxanos y Antraciclinas versus el 14% Antraciclinas solas). El grupo que más se beneficia del tratamiento es los tumores con RH (receptores hormonales) negativos. La poliquimioterapia permite incrementar la tasa de respuesta completa clínica y la proporción de pacientes con nódulos axilares negativos. Sin embargo, la administración de un tratamiento adicional de 4 ciclos con taxanos, tanto de forma neoadyuvante como adyuvante, en tumores que no responden a un tratamiento neoadyuvante de antraciclinas, consigue un mínimo beneficio de respuesta al tratamiento sin que se traslade a la supervivencia (Bear et al, 2006).

Por otro lado, los tratamientos más prolongados (superiores a tres meses) de seis a ocho ciclos de quimioterapia consiguen mayores tasas de remisión completa respecto a los de cuatro ciclos (34-20% vs. 5-17%)(Bear et al, 2006; von Minckwitz et al, 2008).

Las **Antraciclinas** (ej. Doxorubicina y Epirubicina) son agentes que dañan el ADN. Interaccionan con el ADN por intercalación. Se unen a la doble hélice del ADN e interfiere en la replicación, transcripción y reparación del ADN. Su máxima actividad tumoral se encuentra en la fase S. Generan radicales libres de hidroxilo que ocasionan la rotura del ADN y activa la apoptosis mitocondrial (Chaudhry & Asselin, 2009). La sobre-expresión de Bcl-2 provoca la resistencia a las antraciclinas (Cleator et al, 2002), en cambio la pérdida de BRCA1 incrementa la sensibilidad a estos agentes que dañan el ADN, ya que presentan bloqueado el sistema de reparación de Recombinación Homóloga (ReHo) (Lai et al, 2012).

Los **Taxanos** (ej. Paclitaxel y Docetaxel) interfieren en la polimerización de los microtúbulos. Los taxanos estabilizan el guanosindifosfato (GDP) unido a la tubulina. Por consiguiente, se estabilizan los microtúbulos y lo protegen de su despolimerización, evitando la formación del huso mitótico necesario para la mitosis celular. El bloqueo de la mitosis conlleva a la célula a entrar en apoptosis o a revertir el ciclo celular a la fase G, evitando la división celular (Cleator et al, 2002). La pérdida de BRCA1 impide a la célula entrar en la fase de mitosis y activa la vía pro-apoptótica JNK, dando lugar a la resistencia de los agentes anti-microtúbulos (Lai et al, 2012).

La respuesta a la QTN presenta un valor pronóstico confirmado desde hace más de 25 años (Scholl et al, 1995). Las pacientes que consiguen con la QTN una RCp, en la mama y en la axila, son las que obtienen un mayor beneficio en supervivencia a largo plazo (Pierga et al, 2003). Actualmente, la remisión completa o RCp es el objetivo habitual en la mayoría de estudios que evalúan la eficacia al tratamiento neoadyuvante.

Los efectos post-terapia incluyen alteraciones morfológicas y biológicas en el cáncer y en el tejido normal después del tratamiento. Esta terminología se utiliza para describir cambios después de la terapia neoadyuvante (basada tanto en QT como en terapia dirigida) administrada antes de la cirugía, dónde se evalúa su respuesta in vivo (Lakhani et al, 2012).

No existe un consenso sobre el método más adecuado para evaluar la RCp. Sin embargo, es necesario que los métodos sean reproducibles por diferentes patólogos para facilitar la interpretación de los resultados.

La tabla 1.4 presenta los diferentes sistemas posibles para evaluar la respuesta a la QTN a partir del tumor residual.

Nombre	Factores evaluados en la mama	RCp en la mama	Nódulos linfáticos incluidos	Nº de categorías de respuestas parciales
B-18	Efecto de cualquier tratamiento en carcinoma invasivo	No carcinoma invasivo	Si, el tamaño de la metástasis más grande.	1
Chevallier	Presencia de carcinoma invasivo con esclerosis o fibrosis	No invasivo o carcinoma in situ	Si	1
Sataloff	Presencia de carcinoma invasivo. Presencia del efecto del tratamiento	Efecto terapéutico total o casi total	Si, ± efecto del tratamiento.	2
Miller-Payne	Presencia de carcinoma invasivo. Celularidad.	No carcinoma invasivo.	No	3
RCB (residual cancer burden)	Tamaño del lecho tumoral en 2D. Celularidad del carcinoma invasivo residual.	No carcinoma invasivo.	Si, número y tamaño del depósito más grande.	2 (con valores individuales calculados para cada caso)
AJCC	Tamaño del carcinoma invasivo	Carcinoma no invasivo	Si, número	Más de 4 (dependiendo de la categoría inicial de AJCC de T y N.
MNPI (Índice Pronóstico de Nottingham Modificado)	Tamaño del carcinoma invasivo. Grado del tumor.	Carcinoma no invasivo.	Si, número	3
Prinder	% de tumores que permanecen en la mama	Carcinoma no invasivo	Si, evidencia de respuesta	Mama:3 Nódulos linfáticos:1

Tabla.1.4. Comparación de los sistemas de evaluación de la respuesta a la terapia neoadyuvante en cáncer de mama (Lakhani et al, 2012)

(Ver anexo 2 para ver descrita más detalladamente la evaluación según el sistema AJCC).

1.4.3.3. HORMONOTERAPIA.

La vía de señalización de los receptores endocrinos está muy vinculada con el crecimiento y el desarrollo de los tumores. Por consiguiente, la terapia endocrina ha resultado ser un tratamiento muy atractivo. Existen dos tipos de moduladores de RE: 1) **tamoxifeno** inhibe los estrógenos uniéndose al receptor de éstos y 2) los **inhibidores de aromatasa (IAs)** suprimen la síntesis de estrógenos mediante el bloqueo del citocromo P450 de la aromatasa. Esta enzima convierte los andrógenos en estrógenos de los tejidos de la periferia que utiliza el tumor para estimular su crecimiento (Morandi et al, 2004; Pritchard, 2013). Recientemente, se ha encontrado que hay al menos dos formas de RE, RE α y RE β . La terapia endocrina responde a cualquiera de las dos formas. La mayoría de los tumores con RE α positivo son luminales A o luminales B. Sin embargo, los Luminales B son los que peor responden al tratamiento hormonal respecto el resto de los subtipos moleculares. Curiosamente, la terapia endocrina no se ve influenciada por la presencia o ausencia de RPG (Pritchard, 2013).

Los IAs son un tratamiento más efectivo que el tamoxifeno para evitar las recidivas locales y distantes del cáncer de mama (10-20% pacientes con RE positivo tratadas con tamoxifeno desarrollan recidivas y mueren antes de finalizar el tratamiento a 5 años). Además, el uso de IAs permite evitar un nuevo primario de carcinoma de mama contra-lateral en pacientes post-menopáusicas en 3 situaciones específicas: 1) la terapia endocrina adyuvante como único tratamiento, 2) pacientes que han recibido de 2 a 3 años de tamoxifeno y 3) pacientes que han completado el tratamiento de tamoxifeno a los 5 años (alargar el tratamiento de tamoxifeno más de 5 años no aporta más beneficios) (Morandi et al, 2004).

Sin embargo, el tratamiento con Als promueve la reabsorción del hueso, provocando osteoporosis e incrementa el riesgo de fractura a las pacientes. Por tanto, todas las pacientes se les administra conjuntamente con IAs adyuvante,

suplementos de calcio y vitamina D. Por el contrario, el tamoxifeno protege de la reabsorción hueso, debido al incremento de los niveles de estrógeno del propio tratamiento. Algunas pacientes tratadas con tamoxifeno son resistentes a este fármaco alrededor de los 12 y 18 meses. En tal caso, el tamoxifeno actúa estimulando el crecimiento celular del carcinoma de mama (Morandi et al, 2004).

Las pacientes RE positivos que presentan sobre-expresado HER2 son las que suelen responder peor a cualquier terapia endocrina. Cuando se administra Als de forma neoadyuvante a las pacientes HER2 positivas, se induce un incremento de expresión de niveles de Ki67, que demuestra que la proliferación del tumor no está controlada. Sin embargo, la administración de la terapia anti-HER2 con hormonas tiene un efecto aditivo e incluso sinérgico (Pritchard, 2013).

Estudios pre-clínicos de carcinoma de mama RE positivos encuentran apropiado usar inhibidores de m-TOR, ya que las vías de m-TOR y RE se entrelazan.

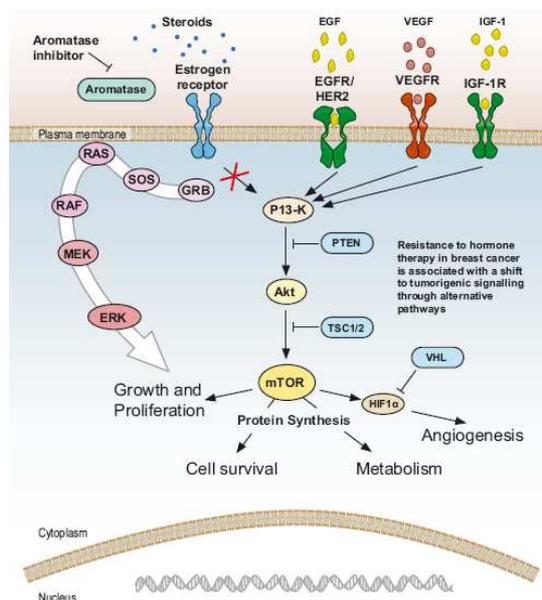


Figura 1.4. La resistencia a la terapia hormonal en carcinoma de mama está asociada a señales oncogénicas mediante la vía m-TOR (Pritchard, 2013).

El tratamiento con inhibidores m-TOR como temsirolimus y everolimus conjuntamente con el endocrino como letrozol, tamoxifen y exemestano previene el desarrollo de resistencias secundarias en tumores con RE positivos (Pritchard, 2013).

1.4.3.4. ANTI-HER2 (TRASTUZUMAB)

La administración adyuvante de Trastuzumab (Herceptin®; Genentech, San Francisco, CA, USA) durante dos años en tumores que amplifican o sobre-expresan HER2 reduce sustancialmente el riesgo de la aparición de recidivas y de muerte. Aunque un sólo año de tratamiento con Trastuzumab produce los mismos beneficios que dos años (Goldhirsch et al, 2013). Además, sólo el 30-40% de los pacientes que reciben trastuzumab se benefician del tratamiento, el resto desarrollan algún tipo de resistencia a este fármaco.

De hecho, la combinación secuencial de agentes quimioterapéuticos con trastuzumab incrementa la eficacia de éste, obteniendo una mayor respuesta al tratamiento. La naturaleza citotóxica del agente quimioterápico se complementa con el efecto anti-proliferativo del trastuzumab, mostrando diferencias en la viabilidad celular respecto a usar únicamente la QT (Hurrell & Outhoff, 2013).

1.5. SUBTIPOS INTRÍNSECOS Y CORRELACIONES CLÍNICAS (RCp; SG y SLE)

Los Triples Negativos (TNBC) y los Her2 son los 2 subtipos moleculares con mayor sensibilidad al tratamiento de quimioterapia, debido a su alta expresión de genes de proliferación. Su elevada sensibilidad a la QTN, les permite presentar un alto porcentaje de RCp y conservar una exitosa supervivencia libre de enfermedad (SLE). Paradójicamente, la mayoría de los Basal-like y Her2+/RH- con tumor residual recaen tempranamente y mueren. De hecho, ésto refleja la importancia de la terapia endocrina en la reducción de recidivas, que se administra en los tumores luminales y no pueden recibir los basal-like y los HER2+/RH-, porque no expresan dichas dianas moleculares (Carey et al, 2007; Liedtke et al, 2008).

La terapia endocrina reduce hasta un 30% la aparición de recidivas y la muerte en los Luminales (Berry et al, 2006; Carey et al, 2007; Cheang et al, 2009). Sin embargo, los Luminales presentan una fuerte quimioresistencia debida a la expresión elevada de los RH (Sui et al, 2011). Los Luminales B son más quimiosensibles que los Luminales A porque son más proliferativos y expresan menos RH. Por tanto, los Luminales B tienen una mejor respuesta patológica (Cheang et al, 2009) pero presentan más recidivas y de forma más temprana que los Luminales A (Blows et al, 2010; Carey et al, 2007).

Las pacientes con cáncer de mama con receptores hormonales positivos (RH+) se benefician mucho del tratamiento endocrino adyuvante, pero si tratamos con tamoxifeno a pacientes sin expresión de receptores hormonales (RH-), sólo reducen un 15% las recidivas y un 11% la tasa de mortalidad. En cambio, las pacientes con RH- sin tamoxifeno, cuando reciben un tratamiento con poliquimioterapia, reducen la tasa de recidivas en un 33% y la tasa de la mortalidad en un 26%. Curiosamente, las pacientes jóvenes (por debajo de los 50 años) presentan una interacción entre los beneficios de la quimioterapia y su función ovárica, reduciendo las recidivas al 32% y la mortalidad al 39% (Berry et al, 2006).

La pobre supervivencia de los Basal-like y Her2/RH- con tumor residual ratifica la necesidad de que sean tratados continuamente. De hecho, la curva de supervivencia de los Her2/RH- ha mejorado mucho con la administración del trastuzumab (Carey et al, 2007). Los Her2/RH- responden mejor a la quimioterapia que los Luminales, especialmente son muy sensibles a antraciclinas y tienen un mayor número de RCp (Liedtke et al, 2008).

Los pacientes TNBC con tumor residual después de la quimioterapia presentan una menor supervivencia global (SG) y SLP que el resto de subtipos moleculares, debido a la combinación de dos factores. Primero, los TNBC tienen peor pronóstico porque están poco diferenciados (los tumores son muy sólidos, con alto número de mitosis y mucha atipia nuclear), tienen una mayor incidencia de metástasis viscerales y un menor tiempo libre de recidivas comparado con el resto de subtipos. Segundo, los TNBC sólo tienen la opción de recibir un tratamiento sistémico; mientras que los HER2+ se benefician de la

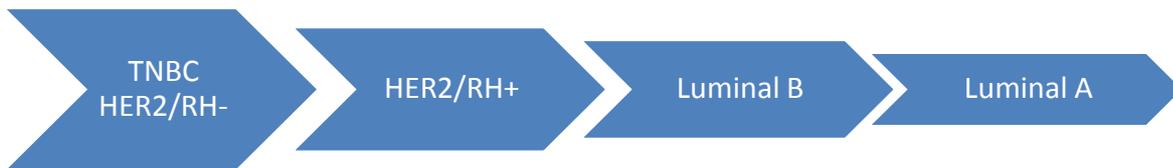
quimioterapia y del trastuzumab y los Luminales con cáncer residual después de la QTN, reciben terapia endocrina adyuvante, mejorando su supervivencia (Carey et al, 2007; Liedtke et al, 2008). Los TNBC suelen obtener una respuesta parcial muy importante superior al 90% de remisión. A pesar del éxito de respuesta a la QTN, tienen un mayor riesgo de presentar recidivas antes de los 3 años después del tratamiento. Contrariamente, los Luminales suelen recaer entre los 4 y 6 años después del tratamiento (Carey et al, 2007; Liedtke et al, 2008).

A continuación, mostramos en la figura 1.5, unos esquemas que resumen el comportamiento de los diferentes subtipos moleculares a la respuesta al tratamiento y a la supervivencia. Es importante puntualizar que la SG y SLP de Her2+ mostrada en la figura 1.5, hace referencia a datos históricos previos a la aparición del Trastuzumab en el 2005. A partir de la introducción del Trastuzumab, el subtipo Her2 ha pasado a tener mejor pronóstico que los Luminales B, mejorando significativamente su SLE (Vrbic et al, 2013).

RESPUESTA AL TRATAMIENTO:



% RESPUESTAS PATOLÓGICAS COMPLETAS



SUPERVIVENCIA GLOBAL



SUPERVIVENCIA DE LIBRE PROGRESIÓN:



Figura 1.5. Esquema de la respuesta al tratamiento y la repercusión en supervivencia (SG y SLP) de los diferentes subtipos moleculares. Los subtipos de izquierda son los de mayor respuesta y mayor supervivencia, mientras que los de la derecha son los de menor respuesta al tratamiento y peor supervivencia

Curiosamente, algunas veces se encuentran tumores clasificados con un subtipo molecular y con un grupo histológico que no presentan el mismo valor

pronóstico para predecir la SG del cáncer de mama. Por ejemplo, en el estudio de Su et al., se diagnosticaron unos tumores como cáncer de mama medular, considerado un grupo histológico de buen pronóstico, y fueron clasificados en el subtipo molecular de Her2 y TNBC, los cuáles presentan un mal pronóstico. Estos resultados sugieren que el cáncer de mama debe ser más heterogéneo que los 4 subtipos moleculares definidos hasta el momento por RE, RPG y HER2 (Su et al, 2011).

Las metástasis que generalmente presenta el cáncer de mama son en el sistema esquelético, pulmón y pleura, riñón, ovario, glándula adrenal y sistema nervioso central (incluyendo las leptomeninges y ojos). Cabe destacar que algunas características morfológicas del tumor primario se correlacionan con el sitio preferencial de la metástasis. De hecho, la presencia de focos de fibrosis está asociado con la metástasis en el hueso; la necrosis de tumor y la negatividad de RH está asociada a la metástasis en el pulmón; y el estadio N3 en metástasis de hígado. Las metástasis en el cerebro suelen encontrarse en tumores que son RH negativos, los cuáles expresen CK 5/6 y sobre-expresen HER2 o EGFR (Rosai, 2011).

Además, se ha encontrado que los diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama presentan un patrón preferencial de metástasis, tal como se muestra en la tabla 1.6 (Liedtke et al, 2008; Millar et al, 2009; Voduc et al, 2010).

Fenotipo Molecular	Órganos viscerales	Tejidos Blandos	Huesos
Triple Negativo	ALTA	ALTA	BAJA
Her2	ALTA	ALTA	BAJA
Luminales	BAJA	BAJA	ALTA

Tabla 1.6. Incidencia del sitio preferente de metástasis según el tipo molecular(Liedtke et al, 2008).

1.6. MARCADORES CON VALOR PREDICTIVO Y/O PRONÓSTICO.

Los biomarcadores tumorales son esenciales en el diagnóstico y después del tratamiento del cáncer. Durante el diagnóstico, los biomarcadores nos ayudan

tanto en la valoración del pronóstico como en la elección del tratamiento. Después del tratamiento, los biomarcadores nos permiten el seguimiento de la respuesta al tratamiento, la selección de terapia adicional y la predicción de la aparición de recidivas (Ludwig & Weinstein, 2005).

Los **marcadores Predictivos** proporcionan información sobre el grado de respuesta a un determinado tratamiento. Los **marcadores Pronósticos** proporcionan información sobre la historia natural de la enfermedad. La identificación de los mejores biomarcadores tumorales en el carcinoma de mama es un primer paso para el desarrollo de un tratamiento con unos regímenes más personalizados e individualizados (Brennan et al, 2010; Ludwig & Weinstein, 2005)

Los avances en la metodología proteómica ofrecen una gran oportunidad de identificar marcadores usando anticuerpos para el desarrollo de una firma proteica, mediante la IHQ de “arrays” matriciales de tejidos (TMAs). Una ventaja clave en estas firmas es que se obtienen de una metodología estandarizada con una buena relación de efectividad/coste, y se complementan con la valoración rutinaria patológica (Brennan et al, 2010).

En la práctica clínica, sólo el grado histológico (bajo) y la expresión (elevada) de RH son marcadores útiles para identificar pacientes con escasas posibilidades de RCp (Lee H et al, 2006). Sin embargo, la presencia de alguna de estas características no excluye un beneficio de la quimioterapia como pone de manifiesto el meta-análisis del EBCTCG (Mathieu et al, 2004). En la actualidad, no existe ningún marcador ni perfil genómico que permita identificar poblaciones con posibilidad nula de beneficio de quimioterapia.

La aparición de cambios moleculares precoces como marcadores predictivos y pronósticos han sido estudiados en profundidad sólo en el caso de la neoadyuvancia hormonal (Perez-Tomas, 2006). En este modelo, se observó cambios moleculares con sólo dos semanas de tratamiento, los cuáles daban información precoz y predictiva de la respuesta a 4 - 6 meses de tratamiento. Concretamente, las caídas de más del 50% del marcador de proliferación celular Ki67 en dos semanas, se traducían en una mayor posibilidad de respuesta al tratamiento y también en una mayor supervivencia (Gonzalez-

Angulo et al, 2007). No existen estudios actuales analizando cambios moleculares precoces o tardíos en curso o tras quimioterapia. Sin embargo, se están empezando a diseñar estudios clínicos con nuevos fármacos en pacientes con un tumor residual viable tras quimioterapia neoadyuvante. La mejor caracterización pronóstica de esta población es básica para poder seleccionar las pacientes con gran riesgo de recaída frente a un segundo grupo que tendría un buen pronóstico por su estructura molecular del tumor, a pesar de la aparente resistencia a la QTN.

Las técnicas de análisis molecular a gran escala, como los microarrays de ADN, han revelado la gran complejidad de los mecanismos moleculares ligados al cáncer de mama. Su valor pronóstico, demostrado en estudios retrospectivos, está siendo validado en estudios clínicos (MINDACT). Dos ejemplos de firmas génicas consolidadas son Mammaprint y Oncotype, las cuáles permiten predecir el riesgo de recidivas y la eficacia al tratamiento (Pritchard, 2013). Sin embargo, el coste, la complejidad y la dificultad en la interpretación de estas plataformas de ADN limitan el uso en la clínica diaria de esta tecnología.

La oportunidad de identificar y/o validar firmas de expresión molecular mediante otras alternativas como las plataformas matriciales de tejidos (TMA), se ha demostrado altamente eficiente (Montagut et al, 2006). La técnica puede ser ligada a la inmunohistoquímica (IHQ) con el análisis simultáneo de cientos de muestras. La IHQ es aplicable en muestras parafinadas, evitando la necesidad de muestras congeladas. De hecho, la IHQ sobre TMA es un método práctico tanto para estudios de validación como en la rutina clínica. Un primer estudio de Jacquemier (Chekhun et al, 2007), sobre 552 casos consecutivos de cáncer de mama operado, demostró la validez de una firma molecular en el pronóstico de una población. El análisis incluía 26 proteínas medidas por IHQ y TMA sobre más de 1600 muestras. El análisis multivariante, identificó una firma molecular con 21 proteínas ($p < 0.0001$), que fue junto al tamaño tumoral inicial y la afectación axilar los únicos marcadores independientes.

1.6.1. BIOMARCADORES DEL FENOTIPADO MOLECULAR.

La mayor evolución en el conocimiento del cáncer de mama obtenido con las plataformas genómicas ha sido el fenotipado molecular de esta enfermedad. Perou y sus colaboradores (Perou et al, 2000) identificaron en función del GEP 5 fenotipos (luminal A, B, HER2, TN basal-like y normal-like). Hemos estudiado las siguientes proteínas (**RE, RP, HER2, Ki67, EGFR y citoqueratinas 5/6**) que nos han permitido clasificar las pacientes en los diferentes subtipos moleculares basados en la correlación IHQ. Además, Ki67 es un marcador nuclear de proliferación, asociado con el peor pronóstico (Cheang et al, 2009).

1.6.2. BIOMARCADORES DEL MECANISMO DE SUPERACIÓN DE LA APOPTOSIS.

El mecanismo de acción más común de los agentes citotóxicos pasa por la activación de vías que llevan a la muerte programada de la célula tumoral. Las caspasas son enzimas con capacidad proteolítica activadas por la vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis. **Bcl-2** es una de las principales proteínas anti-apoptóticas de la vía intrínseca que bloquea la apoptosis. La familia de Bcl-2 consta de Bax, Bcl-2 y Bcl-XL (Wolter et al, 1997). Tanto la doxorubicina como el paclitaxel disminuyen las proteínas pro-apoptóticas e incrementan la expresión de Bax. Expresión elevada de Bcl-2 y Bcl-XL condicionan una peor respuesta a la quimioterapia (Gonzalez-Angulo et al, 2007; Simstein et al, 2003).

Survivin (BIRC5) es un miembro de la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) que inhibe las caspasas y bloquea la muerte celular. Se encuentra altamente expresada en el cáncer y está asociada con un mal pronóstico. En estudios anteriores, Survivin ha sido asociada con tumores de alto grado, con aceleradas tasas de recidivas y a la resistencia a la quimio-radioterapia (Kelly et al, 2011)

1.6.3. BIOMARCADORES DE LA ACTIVACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN.

AKT es una Serina/Treonina quinasa multifuncional activada en respuesta de muchas señales extracelulares. Se encuentra tanto a nivel citoplasmático como nuclear. Cuando AKT se encuentra a nivel nuclear puede bloquear la apoptosis (Badve et al, 2010). La actividad de AKT es regulada por **PTEN**. PTEN es una fosfatasa localizada en la membrana, que antagoniza a PI3K (quinasa-3-fosfatidil-inositol) e inactiva la actividad de AKT (vía de la supervivencia celular) y el crecimiento tumoral. En estudios preclínicos, se ha observado que PTEN inactiva la expresión de HER2 en células cancerosas, concediéndoles resistencia al tratamiento de trastuzumab (Gori et al, 2009). El grupo de los receptores de factores de crecimiento con actividad tirosina quinasa, como HER2, EGFR, RE y RPG, han sido unos de los receptores más estudiados como factores de predicción y pronóstico, ya que su activación promueve diferentes cadenas de transducción, como la vía de MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos) y PI3K/AKT (Osborne et al, 2004; Simstein et al, 2003).

FGFR-2 es un miembro de la familia de receptores de los factores de crecimiento de los fibroblastos. Es un gen supresor de tumor, se encuentra amplificado y sobre-expresado en 10-15% de los cánceres de mama. La inhibición de la vía de FGFR-2 puede inhibir la proliferación celular en el cáncer de mama (Rebbeck et al, 2009). La amplificación de FGFR-2 suele encontrarse en los Triple Negativos. La terapia dirigida hacia los inhibidores de FGFR, promete ser una gran estrategia para el tratamiento refractario del cáncer en la era de la medicina personalizada (Kato & Nakagama, 2013).

La familia de factores de crecimiento epidermoide (HER) tiene una importante función en la carcinogénesis de la mama. En estudios previos, se encontró que el 20,1% de cánceres de mama presentan sobre-expresado **EGFR o HER1**, 31,8% sobre-expresan **Her-2**, 45% sobre-expresan **Her-3** y 45,1% sobre-expresan **Her-4** (Abd El-Rehim et al, 2004). La activación de estos receptores tiene un efecto muy importante en la patogénesis del cáncer de mama. La combinación de los receptores HER2 y HER3 tiene un papel clave en la

progresión del crecimiento y la progresión de este cáncer. Además, HER3 podría ser una de las rutas de la resistencia a la terapia dirigida contra EGFR y HER2 (Koutras et al, 2010).

La dimerización de estos receptores activa su dominio quinasa, e inducen la cascada de señalización intracelular que finaliza en el crecimiento y supervivencia celular. La activación de la vía de la señalización es específica de cada receptor y de su ligando. El dímero de EGFR y HER2 activa MAPK (la proteína quinasa activada en Ras-Raf-MEK-mitógeno), mientras que HER3 es un potente activador de la vía (PI3-k)/AKt (Machleidt et al, 2013).

Además, se ha estudiado la asociación de cada uno de los miembros de la familia HER con la supervivencia del cáncer de mama. La sobre-expresión de HER2 tiene un impacto negativo en el pronóstico de la supervivencia. La expresión de HER1 y HER3 está asociada con una mala evolución y una pobre SLE. HER4 es el receptor que no está muy claro su papel pronóstico y predictivo (Machleidt et al, 2013).

NFKB es un factor de transcripción con múltiples subunidades que regula distintas funciones celulares, incluyendo el crecimiento celular, la diferenciación, la apoptosis, etc. La subunidad mejor caracterizada de **NF- κ B** es **p65**, el cuál forma heterodímeros con p50 y es activada por la vía clásica y atípica (Voboril & Weberova-Voborilova, 2007). La vía Atípica es independiente de IKK (Quinasa del Inhibidor de κ B) y es activada por UV y la doxorubicina, ambos causan daños al ADN y contribuyen en la inducción de la quimio- o radio-resistencia (Lee et al, 2007). El heterodímero p65/p50 es un potente activador de genes que tiene un papel clave en la resistencia del tratamiento, ya que se ha visto que la vía NF- κ B puede mediar la supresión de la expresión de Bax. La inhibición de NF- κ B potencia los señales apoptóticas en respuesta a la radio-quimioterapia (Lee et al, 2007; Montagut et al, 2006).

1.6.4. BIOMARCADORES DEL MECANISMO DE DESREGULACIÓN DEL CICLO CELULAR.

La **Ciclina D1** y **p27^{Kip1}** son proteínas clave en la regulación del ciclo celular. La **Ciclina D1** actúa como subunidad reguladora de un complejo formado con Cdk4 o Cdk6 y su actividad es necesaria para la transición G1/S del ciclo celular. La Ciclina D1 se encuentra sobre-expresada en un 40-50% de los cánceres de mama infiltrantes y amplificada en un 10-20% de los casos. El **p27^{Kip1}** es un regulador negativo del ciclo celular, concretamente es un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclinas y su función es frenar la entrada al ciclo celular. Se ha visto que la ausencia de p27^{Kip1} está implicada en la resistencia de agentes anti-tumorales (Jacquemier et al, 2005; Osborne et al, 2004).

1.6.5. BIOMARCADORES IMPLICADOS EN PROCESOS IMPORTANTES PARA EL CÁNCER DE MAMA.

El factor de transcripción **GATA3** es esencial en el desarrollo de la glándula mamaria e interviene en la diferenciación de las células luminales. La expresión de GATA3 está muy asociada con los RE y FOXA1 (horquilla de las proteínas unidas al ADN de la clase A) en el cáncer de mama. FOXA1 interviene en la transcripción de RE. Los tumores con GATA-3 positivos suelen ser del subtipo Luminal y se coexpresan conjuntamente con el RE. Estudios previos asocian GATA-3 con un buen pronóstico y una mala respuesta al tratamiento de QT (Tominaga et al, 2012).

E-cadherina es una proteína de adhesión y sólo se presenta en los cánceres de mama ductales. La unión de E-cadherina con Mucina-1 regula la expresión de un número importante de genes que intervienen en la diferenciación celular y la proliferación. En estudios previos, se ha observado que la pérdida de expresión de E-cadherina está asociada a mal pronóstico y potencia la agresividad del tumor, la metástasis y la resistencia al tratamiento (Weissenbacher et al, 2013).

La expresión de **ALDH-1** (aldehído deshidrogenasa tipo 1) permite identificar a las células madre de cáncer. Por tanto, las células tumorales con expresión de ALDH-1 muestran propiedades de células madre de cáncer y son resistentes a la quimioterapia (Deng et al, 2010). ALDH-1 se encuentra expresado en los subtipos Basal-like y Her-2 (Tsang et al, 2012).

El **53BP1** es un factor clave en el sistema de la recombinación no homólogo de la reparación del ADN. La degradación de 53BP1 mediante **Catepsina L** está asociada con la inestabilidad genómica y la progresión del cáncer. Además, se ha demostrado que la **vitamina D** estabiliza 53BP1 y promueve la reparación del ADN inhibiendo Catepsina L (Gonzalez-Suarez et al, 2011).

1.7. DOBLE PROBLEMÁTICA ASOCIADA A LOS TRIPLE NEGATIVOS.

Los TNBC es el subtipo molecular del cáncer de mama definido por una triple negación (ausencia de RE, RPG y HER2). Este fenotipo molecular es un “cajón de sastre” donde tiene cabida los más diversos tipos de tumores. Algunos de estos tumores presentan muy buen pronóstico, obteniendo una RCp del tratamiento y quedando libre de la enfermedad. En cambio, otros presentan el peor pronóstico de cáncer de mama, en los cuáles permanece un tumor residual después del tratamiento y desarrollan metástasis al poco tiempo. Es necesario encontrar una buena clasificación para predecir el comportamiento tan divergente de este grupo de tumores.

Por otra parte, no existen dianas terapéuticas específicas para los TNBC. Estos tumores sólo se pueden tratar con una terapia sistémica ya que no se les conoce la expresión de dianas a las que poder dirigir un tratamiento. Los TNBC no son sensibles a las terapias dirigidas usadas para los HER-2 positivos (trastuzumab y lapatinib) y los RE positivos (tamoxifeno e inhibidores de aromatasas). Sin embargo, los cánceres mutados en BRCA1 y BRCA2 son muy sensibles a los inhibidores de la poli-(ADP-ribosa)-polimerasa (PARP). Por consiguiente, en estos últimos años, los Basal-like también han sido tratados únicamente con estos inhibidores o combinados con la radiación y quimioterapia, presentando una alta respuesta a estos fármacos.

La actividad de PARP interviene en la modificación de cambios post-transcripcionales de proteínas, que intervienen en el reclutamiento de las proteínas reparadoras del ADN en los sitios de las roturas monocatenarias (Do & Chen, 2013). La inhibición de PARP acumula roturas de ADN monocatenario sin reparar, debido al bloqueo de las horquillas de replicación. Las roturas de ADN monocatenario se transforman en roturas de doble hebra que sólo son reparadas a partir de la vía de ReHo. Por tanto, estas lesiones en el ADN resultan letales en las células sin este sistema de reparación (como las células con BRCA1 mutada). (Aly & Ganesan, 2011; Farmer et al, 2005). Sin embargo, una fracción significativa de tumores Basal-like presenta una importante resistencia inicial o adquirida a estos inhibidores, provocando un crítico problema clínico.

En resumen, es necesario conocer mejor la biología de este subtipo molecular tan heterogéneo para mejorar su supervivencia, encontrar nuevas dianas para elaborar nuevos fármacos y evitar problemas de resistencia a estos agentes.

1.7.1. NUEVA CLASIFICACIÓN DE LOS TNBC.

Lehmann y sus colaboradores (2011) elaboraron una clasificación del subtipo molecular TNBC en **6 subcategorías**, a partir de la recopilación de la información extraída en 16 estudios previos de firmas génicas de TNBC.

1) Basal-like 1 (BL1)

El BL1 es el subtipo enriquecido en la expresión génica de componentes del ciclo y de la división celular, así como la sobre-expresión de las vías del (ciclo celular, replicación del ADN, la fase G2 del ciclo celular, ARN polimerasa y la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular). Además, este subtipo presenta una sobre-expresión de las vías de proliferación y la pérdida de los puntos de control del ciclo celular que conlleva a una elevada expresión de genes de los mecanismos de respuesta de los daños del ADN (ATR/BRCA).

En la comparación de la tinción nuclear de Ki67 por IHQ de todos los subtipos del TNBC, se encontró que los basal-like son los más proliferativos (BL1+BL2 =

70% versus el resto de subtipos = 42%; $p < 0,05$). Por su naturaleza proliferativa, los basal-like responden principalmente a agentes anti-mitóticos como los taxanos (paclitaxel o docetaxel). Las pacientes TNBC, cuyos tumores se correlacionan con los Basal-like (BL1 o BL2), presentan significativamente un mayor número de RCp (63%, $p = 0,042$) cuando se tratan con taxanos comparado con los grupos mesenquimal-like (31%) o LAR (14%).

2) Basal-like 2 (BL2)

BL2 presenta una sobre-expresión de las vías de los factores de crecimiento (vía EGFR, la vía NGF, la vía MET, la vía Wnt/ β -catenina y la vía IGF1R) conjuntamente con la glicólisis y gluconeogénesis.

Este subtipo presenta características mioepiteliales/basales, tal como sugieren los elevados niveles de expresión de TP63 y MME (CD10).

3) Inmuno-modulador (IM)

El subtipo IM se encuentra enriquecido por genes del sistema inmune celular. Estos procesos incluyen las siguientes vías: la vía TH1/TH2, la vía celular NK, la vía de señalización de los receptores de las células B (BCR), la vía DC, y las vías de receptores de las células T, la señalización de citoqueratinas (la vía de citoqueratinas, la vía de IL-12 y la vía de IL-7), la presentación y el procesamiento de antígenos y las vías de transducción de señales inmunológicas (la vía de NF- κ β , la vía de TNF y la señalización de JAK/STAT).

El subtipo IM se correlaciona con el **cáncer de mama medular**, el cual es histológicamente distinto del resto de los TNBC. A pesar de su histología de alto grado, se asocia con el pronóstico más favorable.

4) Mesenquimal (M)

El subtipo M está enriquecido de los componentes y de las vías implicadas en la movilidad celular (regulación de la actina por Rho), la interacción de receptores de los componentes de la matriz extracelular, las vías de la diferenciación celular (la vía Wnt, la vía de la quinasa del linfoma anaplásico (ALK) y la señalización de TGF- β).

5) Mesenquimal asociado a células madre (MSL)

El MSL expresa genes de procesos biológicos similares al subtipo M. Además, este subtipo presenta genes vinculados con las vías de señalización de los factores de crecimiento, del metabolismo del fosfato inositol, la señalización del calcio, el receptor acoplado de la proteína G, la señalización de ERK1/2, también el transportador de ABC y la señalización de adipo-citoquinas.

Curiosamente, el subtipo MSL se encuentra enriquecido por genes involucrados con la angiogénesis y la señalización del sistema inmune celular, solapándose con el subtipo IM.

Otra interesante diferencia entre los subtipos M y ML es que el subtipo ML presenta una baja expresión de genes de proliferación.

A pesar de las diferencias de expresión génica entre estos dos subtipos, comparten unas características similares con el cáncer de mama altamente indiferenciado conocido como metaplásico. El **cáncer de mama metaplásico** presenta características escamosas o mesenquimales/sarcomatoides y son quimioresistentes. Hay algunos subtipos de los metáplasicos que tienen un buen pronóstico, incluso mejor que los carcinomas convencionales, como los tumores de tipo fibromatosis de bajo grado y los adenoescamosos de bajo grado (Lakhani et al, 2012).

El subtipo MSL presenta una baja expresión de las claudinas 3, 4 y 7. Recientemente, se ha identificado como el subtipo de cáncer de mama "*claudin-low*". La expresión de claudinas permite separar los subtipos M de los ML.

6) Luminales con receptores de andrógenos (LAR)

LAR es un subtipo con RE negativos como el resto de TNBC, pero que se encuentra enriquecido por vías reguladas hormonalmente, como la síntesis de esteroides, el metabolismo de porfirinas y el metabolismo de andrógenos/estrógenos. Los tumores del tipo LAR sobre-expresan numerosas dianas reguladas por debajo de los receptores de andrógenos (AR) y sus

coactivadores. Además, este subtipo presenta una elevada expresión de citoqueratinas luminales.

Los tumores del subtipo LAR presentan una elevada probabilidad de presentar recidivas locales, debido a su poca sensibilidad hacia el tratamiento recibido (QT estándar).

Existe una fuerte correlación con los tumores LAR y los tumores de mama del tipo **apocrino** (Lehmann et al, 2011).

1.7.2. CATEPSINA-L y 53BP1: NUEVAS DIANAS TERAPÉUTICAS PARA LOS TRIPLE NEGATIVOS.

Tal como hemos comentado anteriormente, **BRCA1** es un supresor tumoral y las mujeres portadoras de esta mutación germinal pueden desarrollar cáncer de mama del tipo TNBC o cáncer de ovario. Las mujeres portadoras de la **mutación BRCA1** en la línea germinal desarrollan un cáncer de mama de alto grado del fenotipo Triple Negativo. Estos tumores expresan marcadores en las células epiteliales basales como citoqueratina 5/6, perteneciendo al subgrupo de los Triple Negativos llamado Basal-like, según la firma de expresión génica de Perou. También existe una evidencia concluyente de que los tumores esporádicos del fenotipo Basal-like contienen alteraciones en la vía de BRCA1. Por el contrario, las mujeres portadoras de la **mutación germinal BRCA2** desarrollan mayormente cánceres de mama con RH positivos, perteneciendo al subtipo Luminal (Bouwman et al, 2010; Rosai, 2011).

BRCA1 participa en la reparación de la rotura de la doble hebra después de un daño en el ADN, controla el ciclo celular en la fase S y G2/M, controla el número de centrosomas, mantiene la heterocromatina y regula la transcripción de muchos genes (Grotzky et al, 2013; Mullan et al, 2006; Scully & Livingston, 2000). En el momento que se daña el ADN, BRCA1 se fosforila rápidamente y se redistribuye en los sitios de rotura, dónde colocaliza con RAD51 y otras proteínas implicadas en la reparación de la rotura de la doble hebra (DSBR) (Aly & Ganesan, 2011). El reclutamiento de BRCA1 interviene en el sistema de

reparación libre de errores de la rotura de la doble hebra del ADN llamada Recombinación Homóloga (ReHo). BRCA1 forma un heterodímero estable con BARD1, y el complejo BRCA1-BARD1 actúa como un potente E3-ubiquitin-ligasa in vitro. Esta actividad enzimática podría ser crucial para la función de la reparación del ADN y la carcinogénesis (Aly & Ganesan, 2011; Gonzalez-Suarez et al, 2011).

Se ha demostrado que BRCA1 es necesario para que se realice de forma eficiente la ReHo. Una deficiente ReHo causa inestabilidad cromosómica, ya que la célula tiene que utilizar el sistema de reparación alternativo, Unión de Extremos No Homólogos (NHEJ). El uso de NHEJ lleva a la acumulación de aberraciones cromosómicas asociadas a la predisposición del desarrollo tumoral (Kass et al, 2010).

1.7.2.1. SISTEMAS DE REPARACIÓN DE LA ROTURA DE LA DOBLE HEBRA DEL ADN (DSBR).

La rotura bicatenaria está entre las formas más citotóxicas del daño del ADN, y da lugar a aberraciones cromosómicas, inestabilidad genómica y carcinogénesis. La capacidad de reparar eficazmente las hebras de ADN es esencial para una buena propagación de la información genética. Estas roturas pueden originarse en el genoma por distintas causas como la radiación ionizante o diferentes agentes químicos, aunque la principal causa de la aparición de la rotura bicatenaria del ADN en una célula suele ser por la producción de errores durante la replicación del ADN. Este proceso puede convertir una rotura monocatenaria en una bicatenaria (Kass & Jasin, 2010).

Tal como se muestra en la figura 1.6, hay dos sistemas de reparación de DSB (Kass & Jasin, 2010):

1) **La Recombinación Homóloga (ReHo)**: es el sistema de reparación libre de errores de la fase S tardía y G2/M del ciclo celular. Utiliza secuencias homólogas no dañadas como moldes para la síntesis de ADN nuevo para la reparación, preferiblemente de las cromátidas hermanas. Se considera el

sistema de reparación más preciso de DSB. La ReHo se inicia con un corte en la cadena 5' a 3', generando unos extremos sobresalientes de ADN en 3', donde se une RAD51 (un filamento de nucleoproteína) e invade la hebra homóloga de la cromátida hermana, utilizándola como molde de síntesis para la reparación. A continuación, se anilla en el extremo del ADN roto, formando el bucle de desplazamiento (D-loop) (el paso del anillamiento no se muestra en la figura 1.6). La cadena sintetizada "de novo" se disocia del bucle para que el otro extremo de ADN complete la reacción de reparación.

Otro sistema de reparación de la ReHo es el anillamiento de una sola cadena (SSA). SSA sucede cuando en los extremos del corte existen unas secuencias repetidas en ambos lados de la doble hebra del ADN. Por tanto, se anillan las dos cadenas por las zonas de las secuencias repetidas perdiendo la secuencia que está en medio. SSA es un sistema más mutagénico que la ReHo convencional, ya que implica la pérdida de información genética.

2) **La Unión de Extremos No Homóloga (NHEJ)** es el sistema de reparación que funciona a lo largo del ciclo celular, sobretodo suele darse en la fase S. Implica la unión de los extremos de ADN con el mínimo procesamiento en los sitios de unión en los extremos. Inicialmente, el heterodímero Ku70/80 (Ku) se une a los extremos de los cortes, protegiéndolos de la pérdida de nucleótidos. Ku interacciona con la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente del ADN (ADN-PKcs) y juntas, intervienen en la reparación de los extremos del ADN. Los extremos de ADN se juntan con una ADN ligasa y son reparados. El NHEJ puede unir a los extremos de ADN de diferentes tipos de estructuras. Por tanto, esta vía necesita cortar y rellenar huecos antes del proceso de la ligación. La reparación por NHEJ incorpora más errores que ReHo, debido a las deleciones e inserciones que sufren los extremos de ADN antes de ser unidos. Es el primer sistema de reparación que se establece en los humanos.

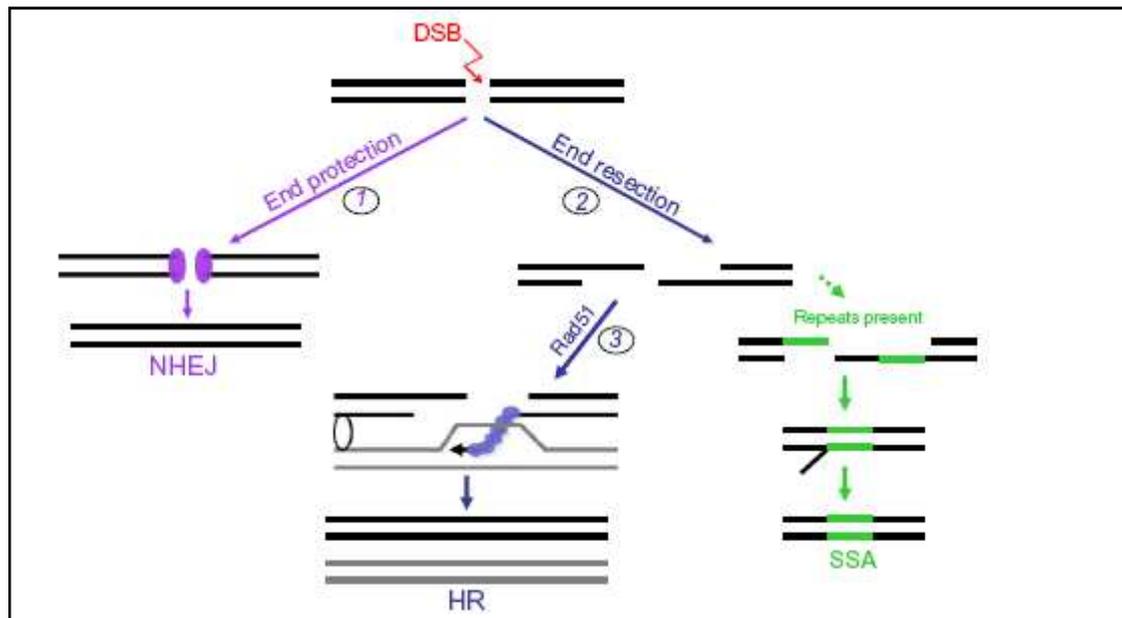


Figura 1.6. Competición entre los sistemas de reparación de la rotura de la doble cadena de ADN (DSB). Hay dos sistemas de reparación de la rotura del ADN de doble cadena, la Recombinación Homóloga (ReHo) y la Unión de Extremos no –Homólogos (NHEJ)(Kass & Jasin, 2010).

La elección entre el sistema de reparación ReHo y NHEJ está regulado por muchos factores, entre ellos: la naturaleza de la lesión y la fase del ciclo celular.

El ciclo celular regula la elección entre ReHo y NHEJ mediante la inhibición de la actividad de las ciclinas -dependientes de proteínas quinasas (CDK). CDKs pertenecen a la familia de las quinasas que exclusivamente fosforilan serinas o treoninas que precedan a prolinas (estructuras S/T-P). Estas estructuras S/T-P se desfosforilan ampliamente en respuesta a la rotura de doble hebra debido a daños en el ADN y se reduce la actividad de CDK, que a su vez, induce la activación de los puntos de control del ciclo celular. La actividad de CDK modula los niveles de las ciclinas que oscilan durante el ciclo celular. La actividad de CDK es estrictamente necesaria para el procesamiento preciso y la reparación de la doble hebra en la fase S/G2 (Ferretti et al, 2013).

Por otra parte, se ha observado que la proteína que controla el sistema de reparación ReHo es diferente a la de NHEJ. 53BP1 presenta un papel crucial

en la reparación de la rotura de doble hélice de la vía de NHEJ, mientras que BRCA1 es la proteína crítica en el sistema de reparación de la ReHo. Inicialmente, se pensaba que BRCA1 y 53BP1 no interactuaban. Aunque estudios recientes con modelos de ratones han demostrado que BRCA1 y 53BP1 compiten para establecer su sistema de reparación. La delección genética de 53BP1 rescata de la letalidad embrionaria, causada por la deficiencia de ReHo y también de la inestabilidad genómica asociada con la pérdida de BRCA1. El mecanismo detallado de cómo 53BP1 participa en esta competición sigue siendo un misterio (Feng et al, 2013).

1.7.2.2. INTERACCIÓN DE 53BP1 Y BRCA1 EN LOS SISTEMAS DE REPARACIÓN DE DOBLE HEBRA.

Las células pueden seguir con la proliferación y la carcinogénesis en las situaciones con mutaciones en BRCA1, adquiriendo mutaciones en otros genes, como 53BP1, que permitan tolerar la pérdida de BRCA1.

La pérdida de 53BP1 es capaz de revertir muchos aspectos del fenotipo asociado a la pérdida de BRCA1. La rotura de la doble hebra induce a que 53BP1 se redistribuya rápidamente en el núcleo con una localización difusa donde colocaliza con la histona H2AX fosforilada y otras proteínas reparadoras como BRCA1. Parece ser que 53BP1 bloquea el acceso de las nucleasas a los extremos del ADN, impidiendo el corte de los extremos de la ReHo (Bothmer et al, 2010; Bunting et al, 2010). La proteína RIF-1 se une a 53BP1 fosforilada desencadenando el reclutamiento de las proteínas reparadoras de la vía de NHEJ. La ausencia de 53BP1, pero no la de RIF-1, suprime la NHEJ e incrementa la frecuencia de la reparación por la vía de ReHo (Aly & Ganesan, 2011; Feng et al, 2013; Xie et al, 2007). ATM (Ataxia Telangiectasia Mutada) es una quinasa que fosforila todas las enzimas que intervienen en el proceso de la reparación. Cuando la célula presenta 53BP1 es fosforilada por ATM, a continuación RIF-1 se une a 53BP1 activando la vía NHEJ. Por el contrario, en ausencia de 53BP1, ATM fosforila a CtIP, reclutándolo en la zona de rotura. CtIP realiza los cortes en los extremos del ADN roto conjuntamente con MRN

para la vía ReHo (Bothmer et al, 2010; Bunting et al, 2010; Feng et al, 2013). A partir de esta observación se pudo establecer el modelo presentado en la figura 1.6. Durante la fase G0/G1, BRCA1 no está presente y 53BP1 inhibe la función de CtIP en el corte de los extremos. Durante la fase S, BRCA1 inhibe la función de 53BP1 en la rotura de ADN (aún no se conoce el mecanismo empleado), permitiendo la activación de CtIP que corta los extremos de las cadenas rotas y promueve el sistema de reparación ReHo. La pérdida de BRCA1 permite a 53BP1 inhibir la función de rotura de CtIP, suspendiendo la ReHo y promoviendo la NHEJ durante la fase S. Si 53BP1 también está mutado, entonces CtIP es liberado de la inhibición y se realizan los cortes en los extremos de ADN roto y se restablece la capacidad de mantener la reparación ReHo (Aly & Ganesan, 2011).

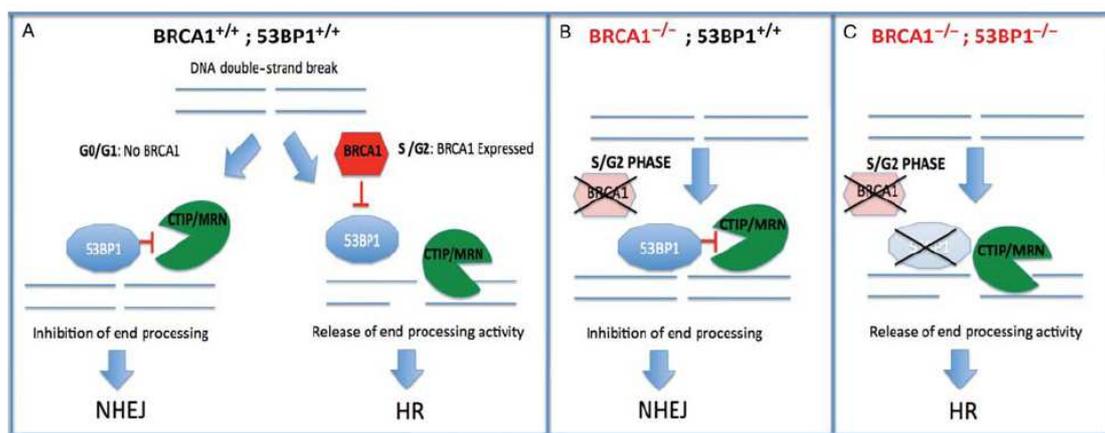


Figura 1.7. Colaboración de la pérdida de BRCA1 y de 53BP1 permite la viabilidad celular y restablece la reparación del ADN mediante ReHo. (A) Las células normales no presentan expresión de BRCA1 en la fase G0/G1, 53BP1 es reclutada en la rotura de la doble hebra promoviendo NHEJ. En la fase S/G2 del ciclo celular, BRCA1 se expresa normalmente y es reclutado en los puntos de rotura, donde inhibe la acción de 53BP1, promoviendo la reparación mediada por ReHo. (B) En las células mutadas en BRCA1, BRCA1 no está presente en la fase S y 53BP1 permanece libre para inhibir la función de CtIP, implicada en la rotura de los extremos libres, con lo cuál se suprime ReHo y se promueve NHEJ. (C) En las células con una doble mutación de BRCA1 y 53BP1, CtIP es reclutada en los puntos de la rotura del ADN durante la fase S. La ausencia de 53BP1 permite la reparación del sistema ReHo (Aly & Ganesan, 2011).

Las células deficientes en la ReHo presentan una aguda sensibilidad a los agentes inhibidores de PARP. La pérdida de la actividad de PARP evita la reparación de las roturas monocatenarias o de doble hebra del ADN por la vía de ReHo, ya que inhibe proteínas reparadoras como RAD51. Los inhibidores de PARP incrementan la sensibilidad de las células tumorales deficientes en BRCA1 o BRCA2 a los daños del ADN mediante quimio y radioterapia. Sin embargo, la pérdida de 53BP1 revierte la sensibilidad de las células mutadas en BRCA1 por los inhibidores de PARP y restablece la formación de los focos de RAD51. Es muy interesante la capacidad de los inhibidores de PARP para matar selectivamente a las células deficientes en ReHo (Bunting et al, 2010).

Por otra parte, 53BP1 es un activador de p53 y la supresión de 53BP1 conjuntamente con p53 tiene un efecto sinérgico en el desarrollo del tumor. La expresión de 53BP1 se encuentra claramente disminuida en cánceres esporádicos del tipo TNBC y en los germinales asociados a BRCA1. Además, la deficiencia de 53BP1 se correlaciona significativamente con la aparición más temprana de metástasis en los TNBC disminuyendo significativamente la supervivencia (Bouwman et al, 2010).

Curiosamente, la baja expresión de 53BP1 en los cánceres de mama deficientes en BRCA1 y en los TNBC, permite a estos tumores superar la inestabilidad genómica causada por la defectuosa vía ReHo, y permite la viabilidad de estas células tumorales. Por el contrario, la acumulación de 53BP1 en tumores BRCA1 deficientes y TNBC promueve la reparación indiscriminada de NHEJ que genera una gran inestabilidad genómica, causando la detención de la proliferación o incluso la muerte celular (Bouwman et al, 2010; Grotzky et al, 2013).

1.7.2.3. MECANISMO DE REGULACIÓN DE 53BP1 MEDIANTE CATEPSINA L EN UN MODELO DE FIBROBLASTOS.

Las laminas tipo-A participan en la estabilización de 53BP1, aunque no se sabía el mecanismo que atenuaba su degradación. En las células eucariotas

hay dos mecanismos principales de degradación de proteínas: el sistema ubiquitin-proteasa y la vía endosomal/lisosomal (Gonzalez-Suarez et al, 2011).

Catepsina L es una de las cisteínas proteasas más abundantes en los endosomas/lisosomas. Sin embargo, recientemente, se la ha localizado sobre-expresada en el núcleo de las células tumorales. Curiosamente, la sobre-regulación de los niveles de ARNm de Catepsina L fueron observados en un modelo de ratón con progeria, caracterizado por un procesamiento defectuoso de la lamina A (Varela et al, 2005). Un estudio recientes en un modelo celular de fibroblastos, (Gonzalez-Suarez et al, 2011) demuestra el papel crítico de los niveles nucleares de Catepsina L en el mecanismo molecular que regula la estabilidad de los niveles de 53BP1 en el núcleo y la reparación de las roturas de doble hebra de ADN (figura 1.8).

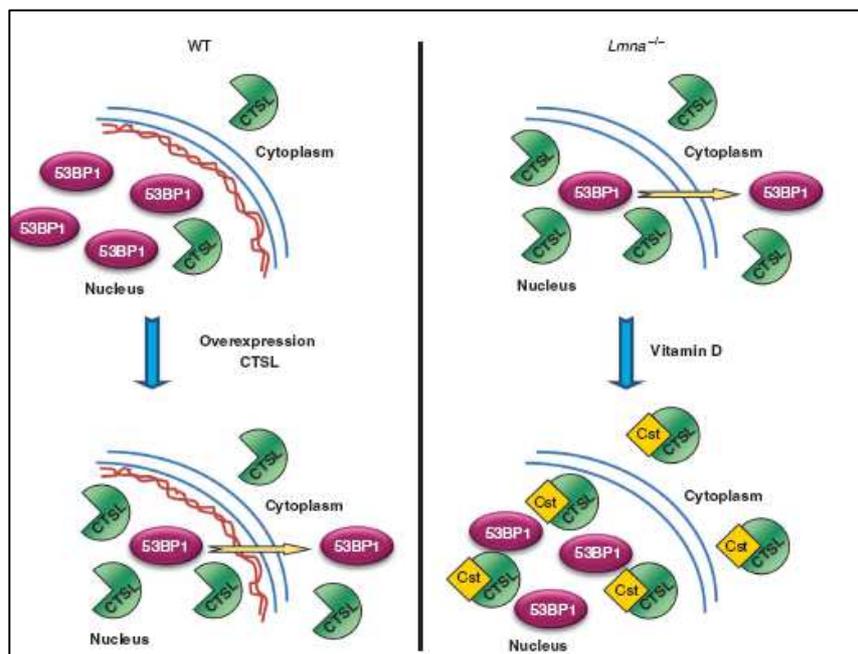


Figura 1.8. Modelo del nuevo mecanismo que regula la estabilidad de 53BP1. (Izquierda) Las laminas (*wild type*) estabilizan los niveles de 53BP1 en el núcleo y evitan que sea degradado por el proteosoma y mantiene bajos los niveles de ARNm de Catepsina L. La presencia de 53BP1 en el núcleo permite la reparación de las roturas de doble hebra inducidas por radioterapia, manteniendo la estabilidad genómica. La sobre-expresión de Catepsina L promueve el transporte de 53BP1 fuera del núcleo y su degradación. Las células con una sobre-expresión de CTSL tienen defectuosa una de las vías de reparación del ADN. **(Derecha)** La pérdida de las laminas (-/-) está vinculada con la sobre-expresión de Catepsina L y la acumulación de la forma activa de la enzima en el núcleo que promueve la acumulación de

53BP1 fuera del núcleo y su degradación. La ausencia de 53BP1 conlleva que el sistema de reparación del ADN más rápido (NHEJ) sea defectuoso. Un tratamiento con vitamina D induce la sobre-expresión de la Cistatina D, que inhibe la actividad de Catepsina L en células deficientes de laminas, y rescata a las células de la vía defectuosa de reparación del ADN (Gonzalez-Suarez et al, 2011).

La sobre-expresión de Catepsina L es un marcador de muchos tipos de cáncer que está correlacionado con el incremento de invasión, metástasis y el grado de malignidad. La catepsina L nuclear se encuentra exclusivamente sobre-expresada en las células tumorales, por lo que promete ser una diana muy interesante para el tratamiento del cáncer, concretamente para los TNBC. Además, la sobre-expresión de Catepsina L incrementa la sensibilidad del tratamiento con radiación y agentes quimioterápicos (Gonzalez-Suarez et al, 2011).

Un posible tratamiento contra Catepsina L es la **vitamina D**. En el cáncer de colon, se demostró que el tratamiento con calcitriol incrementa los niveles de VDR, que a su vez inducen la expresión de las Cistatinas D (inhibidor de Catepsina L) (Alvarez-Diaz et al, 2009; Gonzalez-Suarez et al, 2011; Grotsky et al, 2013).

1.7.2.4. VITAMINA D Y EL CÁNCER.

La **vitamina D** se obtiene fundamentalmente a través de la conversión de un precursor de la piel con la exposición de la luz UV del Sol, y en un menor grado de la dieta o de la suplementación de ciertos alimentos. Interviene en el metabolismo del hueso, en la absorción intestinal del calcio y otros procesos fisiológicos. La forma de la vitamina D de mayor concentración circulatoria es 25-hidroxicolecalciferol (25-OH vitamina D; calcidiol) que se origina por la hidroxilación de la vitamina D3 en el hígado. La 25-OH vitamina D se hidroxila en la forma hormonal más activa, el **calcitriol** (1,25-dihidroxicolecalciferol) principalmente en los túbulos renales pero también en muchos otros sitios, incluyendo las células epiteliales del tejido mamario.

En estos tejidos, el calcitriol se une y activa al receptor de la vitamina D (VDR), el cuál actúa como un factor de transcripción que modula la expresión de genes que inhiben la proliferación celular a través del freno del ciclo celular e inducen la diferenciación celular y la apoptosis (Peppone et al, 2012).

Los niveles adecuados de vitamina D reducen el riesgo de padecer cáncer de mama y mejora la supervivencia después del diagnóstico. Las pacientes con altos niveles plasmáticos de la vitamina D (tanto de calcidiol como de calcitriol) presentan hasta un 45% menos de riesgo a desarrollar un cáncer de mama comparado con aquellas pacientes con bajos niveles de vitamina D (Peppone et al, 2012). Por otra parte, la deficiencia de la vitamina D está asociada a una mayor incidencia a padecer cáncer de mama y a un peor pronóstico en mujeres en el estadio inicial de la enfermedad (Ooi et al, 2010). Además, la deficiencia de la vitamina D está fuertemente asociada al subtipo molecular TN y basal-like, que presentan las tasas más elevadas de mortalidad (Peppone et al, 2012).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

2.1. HIPÓTESIS.

El hallazgo de biomarcadores, que permitan al clínico predecir el tipo de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante (QTN) de forma individualizada, es uno de los grandes retos de la medicina moderna. La aplicación de tratamientos estandarizados en el cáncer de mama conduce en muchas ocasiones a sobre-tratar innecesariamente a las pacientes, que han de asumir toda su toxicidad con ningún beneficio o de forma muy marginal. Por consiguiente, establecer la probabilidad de respuesta a la QTN en el momento del diagnóstico, permitirá orientar al clínico sobre el mejor modelo terapéutico de tal forma, que las pacientes con un mínimo beneficio esperable, puedan ser orientadas hacia la cirugía de inicio o a otras terapias alternativas.

La persistencia de tumor residual viable (> 1 cm) o la afectación ganglionar tras QTN en cáncer de mama condiciona un riesgo de recaída a distancia a 3 años del 35% y del 45% a 5 años.

Por otra parte, el subgrupo TNBC representa el reto terapéutico más importante de esta patología, debido a su rápida recaída después del tratamiento. En un estudio previo en cultivos celulares (Gonzalez-Suarez et al, 2011), se demostró que uno de los mecanismos causantes de la resistencia en los TNBC al tratamiento con inhibidores de PARP era por la degradación de 53BP1 a través de Captetina L nuclear.

Hipótesis 1: La expresión de ciertas proteínas en el tumor primario contribuye en la predicción de la respuesta a la QT neoadyuvante y/o en el pronóstico de la supervivencia de las pacientes.

Hipótesis 2: Uno de los mecanismos que causa la resistencia al tratamiento (inhibidores de PARP o QTN) en los TNBC es por la degradación de 53BP1 a través de captetina L nuclear. La actividad de Captetina L es modulada por los niveles del receptor de la vitamina D (VDR).

2.2. OBJETIVOS

De la hipótesis 1:

- Identificar biomarcadores predictivos del tipo de respuesta al tratamiento neoadyuvante de Antraciclinas y Taxanos de las 22 proteínas valoradas por IHQ en la corebiopsia de 115 pacientes con estadios II – III de cáncer de mama.
- Elaborar una firma predictiva del tipo de respuesta al tratamiento neoadyuvante de Antraciclinas y Taxanos a partir de los marcadores predictivos independientes.
- Identificar biomarcadores predictivos del tipo de respuesta al tratamiento neoadyuvante de Antraciclinas y Taxanos a partir de las 22 proteínas valoradas según el estatus hormonal del tumor.
- Identificar biomarcadores pronósticos de la aparición de metástasis de las 22 proteínas valoradas por IHQ en la corebiopsia de 115 pacientes con estadios II – III de cáncer de mama.
- Elaborar una firma con valor pronóstico de la aparición de metástasis a partir de los marcadores pronóstico independientes.

De la hipótesis 2:

- Valorar la expresión de VDR, Catepsina L y 53BP1 en los diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama en 249 tumores primarios.
- Identificar la relación entre 53BP1, Catepsina L nuclear y VDR en los TNBC.
- Explorar la asociación de la cascada de 53BP1; Catepsina L nuclear y VDR en los TNBC con la respuesta a la QTN y la aparición de metástasis.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. PACIENTES

3.1.1. ESTUDIO DE MARCADORES PREDICTIVOS.

Cálculo del tamaño muestral:

En una serie de 126 pacientes del Hospital Universitario Arnau de Vilanova de Lleida (HUAV) tratadas con QTN y con tumor residual macroscópico (> 1cm), la tasa de eventos metastásicos a 5 años fue del 37%.

Los cálculos para el objetivo del hallazgo de marcadores pronóstico de supervivencia libre de enfermedad a distancia (SLED) se realizó con una potencia del 80%, asumiendo una SLED en el grupo de buen pronóstico del 90% a 5 años. Asumiendo encontrar un 37% de eventos y una SLED en el grupo de mal pronóstico del 50%, se necesitará un mínimo de **167** pacientes para la muestra de análisis.

En esta parte del estudio, se analizó 174 pacientes diagnosticadas de un estadio II o III de cáncer de mama, entre 1998 y 2011, en el HUAV de Lleida. Sin embargo, sólo se incluyeron en la base de datos 115 pacientes porque el resto fueron tratadas con trastuzumab o tamoxifen conjuntamente con la QTN o no disponían de material suficiente en la core biopsia. La reducción del número de pacientes en este estudio de marcadores predictivos de respuesta a la QTN, que tendrá repercusión en la SLED, no afectó a su potencia estadística, ya que encontramos marcadores con significación muy relevante.

El estudio fue aprobado por el Comité ético del HUAV, y las pacientes supervivientes en el momento del estudio firmaron un consentimiento informado retrospectivamente.

De cada paciente, se obtuvo dos muestras: la core biopsia inicial (diagnóstico) y la pieza quirúrgica (en caso de persistencia de tumor residual), las cuáles fueron fijadas previamente en formol e incluidas en parafina

Criterios de Inclusión de Pacientes:

Las características que deben reunir los casos para ser incluidos en el análisis son:

- 1) Diagnóstico histológico de adenocarcinoma infiltrante de mama por core biopsia- BAG.
- 2) Estadio clínico inicial II – III (ausencia de metástasis).
- 3) Quimioterapia sistémica primaria, sin recibir hormonoterapia ni trastuzumab de forma neoadyuvante.
- 4) Ausencia de cualquier otro tratamiento previo a la cirugía (RT, terapia molecular u hormonal).
- 5) Cirugía radical incluyendo el vaciamiento axilar (GC) efectuada en el propio centro.
- 6) Preservación adecuada y suficiente de material histológico de la cirugía final para la realización del TMA.
- 7) Seguimiento adecuado y cumplimiento clínico del tratamiento.

Características clínico-patológicas y tipo de régimen recibido de QTN:

	N total=115	%
Edad		
< 40 años	15	13,04
40-69 años	84	73,04
> 70 años	16	13,91
Tamaño Tumor Diagnóstico		
< 2cm	23	20,00
2-5 cm	71	61,74
> 5 cm	21	18,26
Tamaño Tumor Residual		
<1 cm	43	36,75
1-3 cm	52	44,44
> 3 cm	22	18,80
Nº Ganglios Afectados		
0	43	37,39
1-3	51	44,35
> 3	21	18,26
Tipo molecular		
HER2	23	20
HER2RE	11	9,57
LUMA	21	18,26
LUMB	34	29,57
TN	26	22,61
Grado de Respuesta (Miller-Payne)		
Desconocidos	3	2,61
1	35	30,43
2	10	8,70
3	32	27,83
4	13	11,30
5	22	19,13
Estadio ypTNM		
Desconocidos	2	1,74
estadio 0	21	18,26
estadio 1	18	15,65
estadio 2	46	40,00
estadio 3	28	24,35
Metástasis	25	
Tiempo de seguimiento	(meses)	150,00
Tiempo de supervivencia	media	51
(meses)	(min-máx)	(6-150)
	P25	24,5
	P75	72,5

Tabla 3.1. Características clínico-patológicas de las pacientes de cáncer de mama en el momento del diagnóstico (core biopsias).

Los tumores han sido clasificados según 5 tipos moleculares: Luminales A, Luminales B, Triple Negativo y los HER2. Estos últimos, han sido divididos según si expresan receptores hormonales (HER2/RH+) o no (HER2/RH-).

La mayoría de las pacientes recibieron un tratamiento neoadyuvante secuencial de Antraciclinas y Taxanos de 6 y 8 ciclos. Sin embargo, hay un pequeño número de pacientes que no han recibido el tratamiento neoadyuvante estándar como se muestra en la tabla 3.2.

QT neoadyuvante	Nº ciclos								TOTAL
	1	2	3	4	5	6	8	Desconocido	
Antraciclinas	1	2	2	1	0	5	0	0	11 (9,6%)
Antraciclinas y Taxanos	0	0	1	9	1	18	66	1	96 (83,5%)
Taxanos	0	0	0	3	0	3	1	0	7 (6%)
Desconocidos	0	0	0	0	0	1	0	0	1 (0,9%)
Total	1 (0,9)	2 (1,7%)	3 (2,6%)	13 (11,3%)	1 (0,9%)	27 (23,5%)	67 (58,3%)	1 (0,9%)	115

Tabla 3.2. Descripción y frecuencia de las variaciones de regímenes del tratamiento neoadyuvante administrado en la cohorte.

3.1.2. DEGRADACIÓN DE 53BP1 MEDIANTE CATEPSINA L NUCLEAR EN LOS TNBC.

En el estudio de la relación lineal entre 53BP1 y CTSL en tumores de mama con una potencia estadística del 80%, un nivel de confianza del 95% y teniendo en cuenta que la frecuencia de cada subtipo molecular es distinta en la población, era necesario un tamaño de TNBC mínimo de 36 casos para detectar un evento con un coeficiente de determinación significativo de más del 20% (equivalente a un coeficiente de correlación del 0,45).

El estudio fue aprobado por el Comité ético del HUAV, y las pacientes supervivientes en el momento del estudio firmaron un consentimiento informado retrospectivamente.

Esta serie de 249 muestras de tumores de cáncer de mama del HUAV de Lleida, del 1998 al 2012, están fijadas con formol e incluidas en bloques de parafina. Estas muestras están constituidas por 165 core-biopsias (antes de iniciar el tratamiento neoadyuvante) y 84 piezas quirúrgicas de pacientes que no habían recibido tratamiento neoadyuvante. Los tumores fueron clasificados según la expresión inmunohistoquímica de Ki67, RE, RPG y HER2 en los 4

subtipos moleculares: luminal A (n=99), luminal B (n=69), Her2 (n=45) y Triple Negativos (n=36).

Además, se obtuvieron del Hospital de Santa Creu y Sant Pau (Barcelona), 18 tumores de cáncer de mama portadores de la mutación germinal BRCA1 (luminal A, n=1; luminal B, n=1; Her2, n=2; triple negativo, n=15) y 14 tumores portadores de la mutación germinal BRCA2 (luminal A, n=6; luminal B, n=2; Her2, n=3; triple negativo, n=3).

3.2. DISEÑO DEL ARRAY MATRICIAL DE TEJIDOS (TMA).

Inicialmente, se confeccionó un esquema del *array* de tejidos que permita la identificación de cada cilindro, la disposición de la muestra en el *array* y la determinación del número de muestras que incluimos en el estudio, para asegurarnos que sean representativas del tumor de origen.

La construcción de un *array de tejidos* se inició con la recolección de bloques representativos de los carcinomas incluidos en el estudio, así como la confección de la base de datos correspondiente. Los bloques debían mostrar una adecuada preservación antigénica. A continuación, se seleccionó las áreas representativas de todas las muestras en el correspondiente bloque de parafina a partir de la hematoxilina-eosina hecha previamente de cada bloque. De la core biopsia de cada paciente, se intentó extraer tres cilindros de tejido tumoral de un diámetro de 0,6 mm. Para la construcción del array, utilizamos un “*tissue arrayer*” manual de Beecher Instruments.

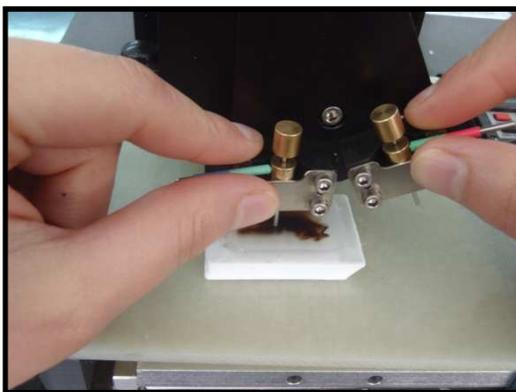


Figura 3. 1- Instrumento Beecher para construir TMA.



Figura. 3.2. Bloque TMA.

3.3. MÉTODO INMUNOHISTOQUÍMICO.

Los bloques del TMA fueron cortados en secciones de 3 µm de grosor y secados durante 1h a 65°C. A continuación, las secciones de TMA fueron desparafinadas con xilol y rehidratadas con concentraciones decrecientes de etanol y lavadas con PBS (Tampón de Fosfato Salino). Después, se realizó un pre-tratamiento de recuperación antigénica para todos los anticuerpos con calor a 95°C durante 20 minutos con un tampón con Citrato (Low; Dako) o EDTA (High; Dako) según la optimización de cada anticuerpo. Antes de realizar la incubación con el anticuerpo primario, se bloqueó las peroxidases endógenas.

A continuación, se detallan los anticuerpos primarios utilizados con sus tiempos de incubación y su dilución: **Ki67** (1:1; MIB; DAKO; incubación de 20 min a temperatura ambiente); **RE** (1:1; 1D5; DAKO; incubación de 25 min a temperatura ambiente); **RPG** (1:1; PgR636; DAKO; incubación de 25 min a temperatura ambiente); **HER2** (“kit” de Herceptest; Dako); **NF-κβ p65** (1:600,c-20; Santa Cruz Biotechnology, Inc; incubación de 20 min a temperatura ambiente); **Bcl-2** (1:1; 124 ; DAKO; incubación de 33 min a temperatura ambiente); **PTEN** (1:50; 6H2.1; DAKO; incubación de 40 min a temperatura ambiente); **53BP1** (1:2500; NB100-304; Novus Biologicals; incubación de 20 min a temperatura ambiente); **ALDH-1** (1:100; 44; BD Transduction Laboratories; incubación de 20 min a temperatura ambiente); **Ciclina D1** (1:1; EP12; DAKO; incubación de 30 min a temperatura ambiente); **E-cadherina** (1:1; NCH-38; DAKO; incubación de 20 min a temperatura ambiente); **p-HER3** (1:200; 21D3; Cell Signaling; incubación de 40 min a temperatura ambiente); **pAKt** (1:50; 736E11; Cell Signaling; incubación toda la noche a 4°C); **VDR** (1:2000; ab3508; Abcam; incubación toda la noche a 4°C); **Survivin** (1.50; D-8; Santa Cruz Biotechnology; incubación toda la noche a 4°C); **FGFR2** (1:200; ab58201; Abcam; incubación de 15 min a temperatura ambiente); **CK5/6** (1:1; D5/16 B4; Dako; incubación 20 min a temperatura ambiente); **EGFR** (1:1; “Kit” EGFR pharmaDx; DAKO); **p27^{Kip1}** (1:100; SX53G8; DAKO; incubación de 30 min a temperatura ambiente); **HER-4** (1:2;RB-9045; Thermo Scientific; incubación de 35 min a temperatura ambiente) y **CTSL** (1:50;S-20; Santa Cruz Biotechnology; incubación toda la noche 4°C). La visualización del anticuerpo primario se realiza con el anticuerpo secundario Envision Flex (Dako) para la

mayoría de anticuerpos, excepto CTSL, para el que se utilizó el complejo Streptavidina-Biotina, y Her2 y EGFR que utilizan los secundarios indicados por sus kits respectivos. Finalmente, las secciones fueron teñidas con hematoxilina/eosina. Las condiciones óptimas de cada anticuerpo fueron comprobadas con controles negativos y positivos. (Ver **anexo 1** para una descripción detallada del método IHQ para cada anticuerpo, así como el clon y la casa comercial de origen).

Histo-score (H-score) es una medida semicuantitativa de la expresión de la proteína, basada en el porcentaje de núcleos o citoplasmas positivos y la intensidad de su tinción. El rango del H-score es de 0 (no hay inmunoexpresión) a 300 (máxima inmunoexpresión), se obtiene a partir de la fórmula: **H-score= 1x (% tinción leve)+ 2x (% tinción moderada) + 3x (% tinción intensa)**.

La **tinción de Her2** es evaluada según el protocolo estándar (HercepTest; Dako) y se valora en 4 intensidades (0= negativo; 1+= débil; 2+= moderado y 3+= fuerte). La expresión de Her2 se considera negativa para los valores 0,1+ y 2+ no amplificado con FISH y positiva para 3+ y 2+ amplificado por FISH.

La **tinción de EGFR** es evaluada según el protocolo estándar (EGFR pharmaDx; DAKO) y se valora en 4 intensidades (0= negativo; 1+= débil; 2+= moderado y 3+= fuerte). La expresión de EGFR se considera positiva a partir de 1+.

La fiabilidad de la valoración de la tinción inmunohistoquímica de los TMAs ha sido documentada en estudios anteriores (Pallares et al, 2009; Rimm et al, 2001). Para asegurarnos que las muestras incluidas en el array eran representativas de los tumores de origen, se realizó una validación. La validación consistió en la tinción aleatoria de unos 20 casos del bloque de origen y la obtención de una concordancia del 90% entre las áreas del tumor seleccionadas en los TMAs y la sección del bloque de origen del mismo caso.

3.4. MÉTODO DE HIBRIDACIÓN “IN SITU” CON FLUORESCENCIA (FISH).

FISH es una técnica cuantitativa para determinar la amplificación del gen HER2 en tejido fijado parafinado. Se ha utilizado y seguido el protocolo del Kit HER2 IQFISH pharmDx (DAKO).

3.5. MÉTODO ESTADÍSTICO.

Se ha usado el programa R y el Spss para todas las valoraciones estadísticas de los TMAs. Las diferencias observadas son consideradas como significativas cuando $p < 0,05$.

3.5.1. MÉTODO ESTADÍSTICO PARA BIOMARCADORES PREDICTIVOS DE QT NEOADYUVANTE GLOBALES Y ESPECÍFICOS AL ESTATUS HORMONAL DEL TUMOR.

Se realizó el mismo procedimiento para el análisis de los biomarcadores del cáncer de mama de forma global que discriminando por el estatus hormonal del tumor.

Primero, evaluamos el potencial predictivo de la respuesta al tratamiento de cada una de las proteínas analizadas, utilizando para ello un modelo de regresión logística univariante. Los resultados de la expresión IHQ fueron tratados en una escala lineal y categorizándolos en diferentes puntos de corte. Escogimos el punto de corte más óptimo de los 4 criterios diferentes utilizados para la categorización: 1) H-score= 0 vs. H-score>0; 2) según la media; 3) según los cuartiles y 4) usando el punto de corte óptimo valorado por el índice de Gini. Para cada marcador y criterio, obtuvimos una odds-ratio (OR) con su p-valor y el coeficiente de pseudo-determinación de Nagelkerke para medir el grado de asociación con la respuesta a la quimioterapia, con su correspondiente intervalo de confianza al 95% a partir del modelo ajustado.

Segundo, definimos la firma molecular, seleccionando la combinación de biomarcadores que presentaban conjuntamente mayor valor predictivo del

grado de respuesta a la QTN. Se consideró sólo aquellos biomarcadores independientes estadísticamente significativos. En la construcción de la firma predictiva, usamos el algoritmo *stepwise* en el marco de un modelo de regresión logística multivariante. En la realización de este procedimiento, consideramos diferentes posibles combinaciones y seleccionamos aquella firma que presentaba mayor valor discriminante e interpretabilidad desde el punto de vista clínico.

Para evaluar la validez de dicha firma, se efectuó un análisis de sensibilidad y especificidad. Además, a posteriori, se efectuó un análisis comparativo de las curvas de supervivencia respecto al tiempo libre de progresión, utilizando para ello, las curvas de Kaplan-Meier, la prueba del log-rank y la prueba exacta de Fisher.

A continuación, la comparativa de la expresión de las proteínas estudiadas en la serie de tumores con RH negativos respecto los positivos, se realizó mediante una prueba de Mann-Whitney.

Finalmente, evaluamos el potencial pronóstico de la supervivencia libre de metástasis (SLM) de cada proteína del estudio con un modelo de regresión logístico univariante. Los resultados de la expresión inmunohistoquímica fueron tratados en una escala lineal y categorizándolos en diferentes puntos de corte. Escogimos el punto de corte más óptimo de los 4 criterios diferentes utilizados para la categorización: 1) H-score= 0 vs. H-score>0; 2) según la media; 3) según los cuartiles y 4) usando el punto de corte óptimo valorado por el índice de Gini. A continuación, definimos la firma molecular de mal pronóstico, seleccionando la combinación de biomarcadores que presentaban conjuntamente mayor valor predictivo de la aparición de metástasis. Se consideró sólo aquellos biomarcadores independientes estadísticamente significativos. En la construcción de la firma predictiva, usamos el algoritmo *stepwise* en el marco de un modelo de regresión logística multivariante. Además, se efectuó un análisis comparativo de las curvas de supervivencia respecto al tiempo libre de progresión, utilizando para ello, las curvas de Kaplan-Meier, la prueba del log-rank y la prueba exacta de Fisher.

3.5.2. ESTUDIO DE LA CORRELACIÓN ENTRE VDR, CTSL Y 53BP1 EN LOS TNBC.

En la segunda parte del estudio, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para observar si había diferencias estadísticamente significativas entre los H-scores de Catepsina L, VDR y 53BP1 en los diferentes tipos moleculares. A continuación, se eligió las medianas de los H-scores de cada uno de los tres biomarcadores como punto de corte, siendo $CTSL > 0$, $VDR < 120$ y $53BP1 < 150$. Seguidamente, se determinó la frecuencia de la expresión de CTSL nuclear, 53BP1 y VDR nuclear en los diferentes subtipos moleculares en función del valor de la mediana mediante una prueba de exactitud de Fisher.

Por otro lado, se analizó con una prueba de Mann-Whitney, las diferencias existentes de la expresión de cada uno de los 3 biomarcadores :

- 1) entre los tumores con mutación germinal en BRCA1 versus BRCA2.
- 2) entre los tumores del subtipo TNBC versus los tumores con mutación germinal en BRCA1.
- 3) entre los tumores con mutación germinal en BRCA1 versus la cohorte de 249 tumores de mama.
- 4) entre los tumores con mutación germinal en BRCA2 versus la cohorte de 249 tumores de mama.

Se valoró la relación existente entre los H-scores de CTSL nuclear y 53BP1 para el cáncer de mama globalmente y específicamente para los TNBC, mediante un modelo de regresión lineal con su coeficiente de determinación asociado y el coeficiente de correlación de Pearson.

Finalmente, se comprobó la existencia de la correlación entre la triple firma (VDR, CTSL y 53BP1) en los TNBC con la respuesta a la QTN y la aparición de metástasis con una prueba de exactitud de Fisher.

RESULTADOS

4. RESULTADOS.

4.1. ESTUDIO DE BIOMARCADORES PREDICTIVOS EN LAS CORE BIOPSIAS.

En este trabajo, se han identificado marcadores predictivos de la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante (QTN) de Antraciclinas y Taxanos, a partir del análisis de la expresión de 22 proteínas en las core biopsias de una cohorte de 115 pacientes con cáncer mama. Se ha diseñado un **estudio estadístico dual** basado en la búsqueda de marcadores de **buena respuesta al tratamiento** (estadio 0 o I del tumor residual) versus **marcadores de mala respuesta al tratamiento** (estadio II o III del tumor residual), tal como se muestra en la tabla 4.1.1. (Ver **anexo 2** para la definición de ypTNM o estadio del tumor residual).

Tipo de Respuesta a la QT neoadyuvante			
		N	%
Buena Respuesta	ypTNM 0 y I	39	34,22
Mala Respuesta	ypTNM II y III	75	65,78
	Desconocidos	1	
		115	100

Tabla.4.1.1. Distribución y frecuencia de la cohorte estudiada según ypTNM. (ypTNM 0= estadio 0 del tumor residual; ypTNM I= estadio I del tumor residual; ypTNM II= estadio II del tumor residual; ypTNM III= estadio III del tumor residual).

Categorizamos el tipo de respuesta a la QTN según el tipo de estadio patológico (ypTNM) determinado en el tumor residual de cada paciente. Este criterio lo hemos extraído de estudios previos encontrados en la bibliografía (Carey et al, 2005; Charpin et al, 2012). Carey y colaboradores (2005) demostraron que las tasas más bajas de supervivencia libre de metástasis (SLM) estaban altamente asociadas estadísticamente con los altos estadios patológicos del tumor residual (Carey et al, 2005). Por consiguiente, hemos demostrado que ocurre lo mismo en nuestra cohorte. La tabla 4.1.2 muestra la clasificación de la aparición de metástasis en nuestra cohorte, dónde un **5%** de

las pacientes de estadio 0 y I desarrollaron metástasis frente a un **20%** de las pacientes de estadio II y III que presentaron metástasis.

ypTNM	N y (%) pacientes sin metástasis	N y (%) pacientes con metástasis
0	20 (95,2%)	1 (4,8%)
I	17 (94,4%)	1 (5,6%)
II	35 (80,7%)	11 (19,3%)
III	19 (76,1%)	10 (23,9%)
Total	91 (79,8%)	23 (20,2%)

Tabla 4.1.2. Número y frecuencia de las metástasis según el estadio del tumor residual (ypTNM).

La figura 4.1.1 muestra las curvas de supervivencia para el tiempo libre de metástasis de cada estadio del tumor residual. Las pacientes con estadio 0 del tumor residual equivalen a la RCp (Respuesta Patológica Completa) y las de estadio I, a la RC (Respuesta Clínica). Estos dos estadios de tumor residual se comportan de manera similar frente a la aparición de metástasis. Han obtenido una supervivencia libre de metástasis (SLM) a 10 años del 95%. En cambio, el estadio II presenta una SLM a 10 años del 65% y el estadio III del 43% aproximadamente.

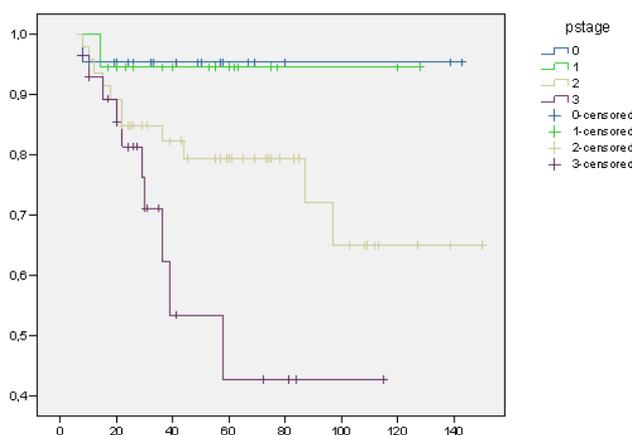


Figura 4.1.1. Curvas de supervivencia libre de metástasis (SLM) según los distintos ypTNM. El eje de las y es la probabilidad acumulada de SLM, mientras que el eje de las x es el tiempo (meses) de seguimiento.

Además, hemos comprobado que el 85% de las pacientes del estadio 0 y I en el tumor residual obtuvieron, después de recibir la QTN, una reducción tumoral de más de un 65%. En cambio, el 75,7% de las pacientes del estadio II y III obtuvieron una reducción tumoral de menos del 65%. (Ver el análisis en el anexo 7.4).

En definitiva, definimos nuestro criterio de **buena respuesta a la QTN** como las pacientes que presentaron menos de 2 cm de tumor residual, sin afectación ganglionar en el momento del diagnóstico, con más de un 65% de reducción tumoral después del tratamiento y una SLM del 95%. Este criterio nos permite encontrar marcadores predictivos de buena respuesta a la QTN que tienen repercusión en la SLM.

A continuación, analizamos las diferencias de régimen de los tratamientos administrados en nuestra cohorte en la tabla 4.1.3, tanto en el número de ciclos como en el número de fármacos del tratamiento, valorados mediante un modelo de regresión logística univariante. Encontramos que el tipo de respuesta al tratamiento depende del número de agentes quimioterapéuticos administrados (**$p=0,004$**). Sin embargo, el **84,2%** de las pacientes fueron tratadas con el tratamiento secuencial, el resto de los grupos son muy pequeños para tengan una repercusión estadística. Sin embargo, observamos que la mayoría de las pacientes tratadas con sólo taxanos tuvieron una buena respuesta a la QTN, mientras que la mayoría de las tratadas con sólo antraciclinas obtuvieron una mala respuesta.

Por otro lado, no encontramos una correlación significativa entre el tipo de respuesta y las diferencias del número de ciclos administrados ($p=0,453$) independientemente del agente quimioterapéutico utilizado en ese ciclo. No encontramos que el número de ciclos influya en la respuesta a la QTN, tal como comentamos en la introducción, debido a la pequeña sub-muestra de pacientes (15%) que sólo recibieron de 1 a 4 ciclos de QTN. La mayoría de la cohorte recibió entre 6 y 8 ciclos.

QT	Buena Respuesta	Mala Respuesta	Total	p-valor
Antraciclinas	1 (9,1%)	10 (90,9%)	11	0,004
Antraciclinas y Taxanos	32 (33,7%)	63 (66,3%)	95	
Taxanos	6 (85,7%)	1 (14,3%)	7	
Nº de ciclos				
1-4	6 (33,3%)	12 (66,7%)	18	0,453
5-6	8 (28,6%)	20 (71,4%)	28	
8	24 (35,8%)	43 (64,2%)	67	

Tabla 4.1.3. Descripción del tipo de respuesta al tratamiento en función de la quimioterapia y de los ciclos realizados. El análisis de los ciclos realizados se ha valorado independientemente de los agentes quimioterapéuticos administrados en el régimen de ciclos.

En la tabla 4.1.4, hemos profundizado sobre el análisis del efecto de recibir sólo taxanos, sólo antraciclinas o antraciclinas y taxanos secuencialmente sobre el grado de respuesta del tratamiento. Primero de todo, es importante puntualizar que la mayoría de las pacientes de la cohorte (84,2%) recibieron el tratamiento secuencial de antraciclinas y Taxanos, es el tratamiento que hemos asignado como grupo de referencia. A continuación, el grupo de Antraciclinas que ha obtenida una $OR > 1$, que es un indicador que representa un mayor riesgo a tener una peor respuesta al tratamiento que el grupo de referencia, pero el tamaño del grupo es tan pequeño que no sale significativo ($p = 0,129$). Finalmente, el grupo de Taxanos presenta una $OR < 1$, que es un indicador de un menor riesgo a obtener peor respuesta al tratamiento que el grupo de referencia.

QT	OR	IC 95%	p-valor	%
Antraciclinas y Taxanos	1	-	0,002	84,2
Antraciclinas	5,079	0,623-41,45	0,129	9,6
Taxanos	0,085	0,01-0,734	0,025	6,1

Tabla 4.1.4. Estimación del OR, p-valor y frecuencias del número de fármacos recibidos.

Estas variaciones de administrar diferentes regímenes surgieron por decisión del oncólogo de las pacientes en base de su diagnóstico y su seguimiento. Las pacientes tratadas únicamente con antraciclinas presentaban tumores con el

peor pronóstico en el momento del diagnóstico. Inicialmente, estos tumores se pretendía tratar con el tratamiento estándar, pero al no responder a los primeros cuatro ciclos de antraciclinas e incluso en algunos casos, el cáncer había progresado, se interrumpió el tratamiento secuencial y fueron intervenidas rápidamente. Contrariamente, las pacientes tratadas únicamente con taxanos presentaban pequeños tumores diagnosticados con un buen pronóstico. Por consiguiente, el oncólogo decidió sustituir el tratamiento secuencial estándar por un tratamiento únicamente con taxanos, para reducir la toxicidad del tratamiento, sobretodo en pacientes mayores o con cardiopatías. Creemos que eliminar estas pacientes del estudio predictivo supondría sesgar la cohorte de la proporción de pacientes de mejor y peor pronóstico.

4.1.1. EVALUACIÓN DE LOS MARCADORES PREDICTIVOS DE LA RESPUESTA A LA QTN DE FORMA INDEPENDIENTE.

Evaluamos la contribución individual de los marcadores predictivos de la respuesta a la QTN en el diagnóstico, según un modelo de regresión logística univariante, a partir de los niveles de inmunoexpresión analizados según los 4 siguientes criterios:

- A) A partir de sus valores de H-score expresados de forma **escalar** (en el rango de 0 a 300).
- B) A partir de la categorización de los valores de la inmunoexpresión según **H-score = 0 versus H-score >0**.
- C) A partir de la categorización de los valores de la inmunoexpresión según su **mediana**.
- D) A partir del punto de corte del valor que más discrimina una buena respuesta del tratamiento obtenido por **el índice de Gini**.

La siguiente tabla 4.1.5 muestra el resumen de los marcadores con valor predictivo individual ($p < 0.05$) obtenidos según los 4 criterios que acabamos de comentar.

Biomarcadores	OR	IC 95%	p-valor	R ² .Naglekerke
Escalar				
RPG	0,99	(0,991-0,9995)	0,034	0,06
Punto de Corte=0				
ALDH >0	4,81	(1,797-13,5)	0,002	0,13
BCL2 >0	0,38	(0,14-1,01)	0,051	0,06
CTSLnucl >0	2,58	(1,15 -5,86)	0,022	0,06
Punto de Corte = mediana				
ALDH>0	4,82	(1,797-13,50)	0,002	0,13
CTSLnucl>0	2,58	(1,15-5,86)	0,022	0,06
Índice de Gini				
ALDH>=10	5,77	(1,95-18,69)	0,002	0,14
BCL2 ≥ 25	0,27	(0,11-0,68)	0,006	0,11
CTSLnucl ≥ 10	2,94	(1,31-6,77)	0,01	0,08
Ciclina D1cit ≥110	0,22	(0,03- 0,85)	0,054	0,06
FGFRcit ≥115	0,36	(0,13- 93,0)	0,039	0,07
HER4cit ≥110	4,91	(1,61-18,5)	0,009	0,1
pAKTcit>=135	5,00	(1,22- 25,2)	0,031	0,07
pHER3mem ≥ 1	3,47	(1,01- 12,8)	0,050	0,06
Survivin cit ≥ 70	0,19	(0,03- 0,745)	0,036	0,09
Survivin nuc ≥115	3,61	(1,35- 10,92)	0,014	0,10
RE ≥255	0,21	(0,048-0,68)	0,018	0,09
RPG ≥175	0,15	(0,033- 0,462)	0,003	0,14
KI67 ≥40	2,29	(1,04- 5,11)	0,041	0,05
ratio.Survivin Cit/Nuc>=0.52	0,28	(0,075-0,83)	0,034	0,08

Tabla 4.1.5. Resumen de los Biomarcadores con valor predictivo significativos. Los biomarcadores con una **OR<1** son indicadores de **resistencia** a la QTN (menor probabilidad de obtener buena respuesta), mientras que los biomarcadores con una **OR>1** son indicadores de mayor probabilidad de obtener **una buena respuesta** a la QTN. (R² Naglekerke es el coeficiente de determinación).

Los puntos de corte, obtenidos por el índice de Gini, de los marcadores con valor predictivo son los que mejor discriminan el tipo de respuesta, como se puede comprobar con sus Odds-Ratio (OR) y R^2 Naglekerke. Aunque los puntos de cortes utilizados para RE y RPG son demasiado altos y se descartan del modelo multivariante por no tener un sentido clínico relevante. De hecho, los puntos de cortes de RE y RPG utilizados en la clínica son mayor de 0 o mayor de 100.

(Ver **anexo 3** para la descripción de la media y mediana de los H-scores de cada anticuerpo)

4.1.2. ANÁLISIS MULTIVARIANTE.

Hemos ajustado un modelo de regresión logística multivariante, utilizando todas las variables significativas del análisis univariante (excepto RE y RPG). Se ha aplicado un algoritmo “*Stepwise*” para determinar una combinación significativa de marcadores predictivos con el mayor poder para discriminar las pacientes de buena respuesta versus las de mala respuesta al tratamiento.

Inicialmente, se comprobó que no existiera ningún tipo de interacción entre estos marcadores, tanto de los efectos principales como de los efectos principales más las interacciones de segundo orden. Por tanto, estos marcadores predictivos no muestran interacciones entre ellos, sino que presentan un efecto aditivo en la discriminación de las respuestas a la QTN de las pacientes.

4.1.2.1. FIRMA PREDICTIVA DE LA QTN.

La tabla 4.1.6 muestra la composición de nuestra firma predictiva de la respuesta a la QTN, formada por cinco marcadores, extraída del modelo logístico multivariante. Nuestra firma explica un **55,8%** de la variabilidad del tipo de respuesta al tratamiento.

MARCADORES	Buena Respuesta QTN	Mala Respuesta QTN
1º marcador	Catepsina L nuclear ≥ 10	Catepsina L nuclear < 10
2º marcador	HER4 cit ≥ 110	HER4 cit < 110
3º marcador	Survivin cit < 70	Survivin cit ≥ 70
4º marcador	ALDH > 0	ALDH = 0
5º marcador	Bcl2 < 25	Bcl2 ≥ 25

Tabla 4.1.6. Firma predictiva de la respuesta neoadyuvante de Antraciclinas y Taxanos.

La figura 4.1.2 refleja el efecto sumatorio de las ORs de todos los marcadores de la firma predictiva en el análisis multivariante. La combinación de marcadores presenta un mayor potencial discriminativo de la respuesta a la QTN que un sólo marcador.

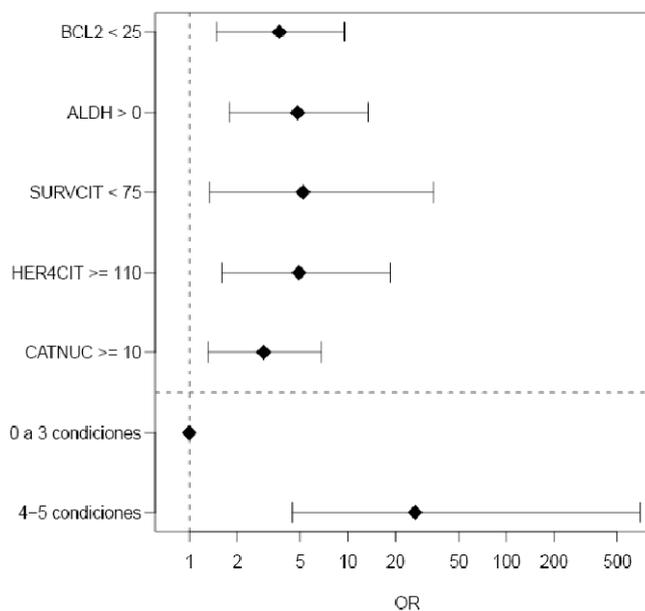


Figura 4.1.2. Gráfico de las ORs de cada marcador individual de la firma en el análisis univariante versus la OR de la firma predictiva en el análisis multivariante. El eje de las x se presenta en escala logarítmica para mejorar la visualización del gráfico.

A continuación, la tabla 4.1.7 resume la frecuencia de malas o buenas respuesta a la QTN que obtuvo la cohorte, según el punto de corte de cada uno de los marcadores de la firma predictiva.

Los tumores de mama con la forma **nuclear de Catepsina L ≥ 10** presentan un **50%** de buenas respuestas a la QTN frente al **25,3%** de las buenas respuestas obtenidas por los tumores con CTSL nuclear <10 .

Los tumores de mama con altos niveles de **HER4 citoplasmático (H-score ≥ 110)** presentan un **47,2%** de buenas respuestas frente al **15,4%** de las buenas respuestas obtenidas por los tumores que presentan bajos niveles citoplasmático de HER4 (H-score <110).

Los tumores de mama con bajos niveles **citoplasmáticos de Survivin (H-score <70)** presentan un **39,4%** de buenas respuestas frente al **11,1%** de las buenas respuestas obtenidas por los tumores con altos niveles citoplasmáticos de Survivin (H-score ≥ 70).

Los tumores con **ALDH-1 (H-score >0)** presentan un **59,1%** de buenas respuestas frente al **23,1%** de las buenas respuestas obtenidas por los tumores que no expresan ALDH-1 (H-score $=0$).

Finalmente, los tumores con bajos niveles de **Bcl-2 (H-score <25)** presentan un **50%** de buenas respuestas frente el **21,3%** de las buenas respuestas obtenidas por los tumores que sobre-expresan Bcl-2 (H-score ≥ 25).

Nº de marcadores	Biomarcadores	N (%) Mala Respuesta	N (%) Buena Respuesta	Nº casos valorados
1º marcador	CSL nuclear < 10	53 (74,64%)	18 (25,35%)	111
	CTSL nuclear ≥10	20 (50%)	20 (50%)	
2º marcador	Her4cit < 110	22 (84,6%)	4 (15,4%)	79
	Her4 cit ≥110	28 (52,8%)	25 (47,2%)	
3º marcador	Survivin cit ≥ 70	16 (88,8%)	2 (11,1%)	105
	Survivin cit <70	43 (60,6%)	28 (39,4%)	
4º marcador	ALDH = 0	60 (76,9%)	18 (23,1%)	100
	ALDH >0	9 (40,9%)	13 (59,1%)	
5º marcador	Bcl2 ≥25	48 (78,7%)	13 (21,3%)	100
	Bcl2 <25	16 (50%)	16 (50%)	

Tabla 4.1.7. Número y frecuencia del tipo de respuesta de las pacientes según el punto de corte de los marcadores de la firma predictiva.

En la realización del modelo multivariante, es necesario que todas las pacientes del estudio dispongan de todos los resultados IHQ de los marcadores seleccionados para la firma. Sólo disponemos de **69 pacientes** con resultados de los 5 marcadores para la detección de Buena Respuesta al Tratamiento (**CTSL ≥10; Her4 ≥110; Surv cit <70; ALDH >0 y Bcl2 <25**). Por consiguiente, hemos reducido nuestra cohorte de 115 a 69 pacientes. La muestra de las core biopsias suele ser pequeña y de poca profundidad. Durante el proceso de la valoración de los 22 marcadores, se fueron perdiendo muestras que no disponían de suficiente material tumoral para seguir siendo valoradas.

Los marcadores Her4 y Survivin fueron de los últimos analizados por IHQ. Por consiguiente, las pacientes que disponían de material escaso ya tenían agotado el tejido en el momento de realizar las inmunotinciones correspondientes de estos marcadores.

La tabla 4.1.8 presenta la distribución del tipo de respuesta al tratamiento de la cohorte de 69 pacientes según el número de marcadores expresados de la

firma. Es muy interesante comprobar que todas las pacientes que presentaron sólo de 0 a 2 marcadores obtuvieron mala respuesta a la QTN. Por el contrario, todas las pacientes que expresaron 4 o 5 marcadores presentaron buena respuesta. Las pacientes que presentaron 3 marcadores obtuvieron un 53% de malas respuestas frente un 47% de buenas respuestas.

Nº marcadores	N (%) Mala Respuesta	N (%) Buena Respuesta
0	2 (100%)	0 (0%)
1	11 (100%)	0 (0%)
2	23 (82%)	5 (18%)
3	10 (53%)	9 (47%)
4	0 (0%)	4 (100%)
5	0 (0%)	5 (100%)

Tabla 4.1.8. Número y frecuencia del tipo de respuesta a la QTN según el nº de marcadores de la firma expresados por cada paciente.

Tal como se puede observar en la tabla 4.1.9, hemos decidido simplificar la firma agrupando los 5 marcadores en 2 condiciones. La **primera condición** incluye las pacientes que expresan de 0 a 3 marcadores, mientras que la **segunda condición** son las que expresan de 4 a 5 marcadores.

Nº condiciones	Nº marcadores	N (%) Mala Respuesta	N (%) Buena Respuesta
1ª condición	0-1-2-3	46 (77%)	14 (23%)
2ª condición	4-5	0 (0%)	9 (100%)

Tabla 4.1.9. Número y la frecuencia del tipo de respuesta según la reagrupación de los marcadores de la firma en 2 condiciones.

A continuación, comprobamos que las pacientes que cumplen la segunda condición tienen 26,6 veces más probabilidad de presentar una buena respuesta que las pacientes que cumplen la primera condición, de forma estadísticamente significativa ($p=0,00004$), tal como vemos en la tabla 4.1.10.

PRESENCIA DE BUENAS RESPUESTAS A QTN					
Nº Condiciones	Nº marcadores	% Buenas respuestas	OR	IC 95%	p-valor
1ª condición	0-1-2-3	23%	1	-	-
2ª condición	4-5	100%	26,61	4,47-697,4	0,00004

Tabla 4.1.10. Estimación de la OR y el p-valor de la segunda condición versus la primera condición de la firma predictiva.

Tal como era de esperar, 7 de las 9 pacientes (**78%**) que cumplen la segunda condición de la firma, pertenecen al subtipo molecular **Triple Negativo y Her2 enriquecidos** (tabla 4.1.11), que como ya hemos comentado anteriormente, son los subtipos que responden mejor a la QTN.

Condiciones	Her2 RH-	Her2RH+	Luminales A	Luminales B	TN
1ª condición	8	6	13	24	9
2ª condición	4	0	0	2	3

Tabla 4.1.11. Descripción y frecuencia de las pacientes de los distintos subtipos moleculares según la condición que cumplen de la firma predictiva.

A continuación, hemos realizado un estudio de sensibilidad y especificidad de nuestra firma predictiva para conocer su fiabilidad. En la tabla 4.1.12, mostramos los falsos positivos y negativos de nuestra firma. La Sensibilidad (la fracción de verdaderos positivos) es del **100% (IC 89-100%)** y la Especificidad (la fracción de verdaderos negativos) es del **39% (IC19-61%)**. Por tanto, todas las buenas respuestas predichas por la firma predictiva realizarán una buena respuesta después del tratamiento. Pero, sólo un 39% de las malas respuestas predichas realizarán finalmente una mala respuesta.

Condiciones	Buena Respuesta	Mala Respuesta
4-5 marcadores (POSITIVO)	9 Verdaderos positivos	0 Falsos positivos
0-1-2-3 marcadores (NEGATIVO)	14 falsos negativos	46 verdaderos negativos

Tabla 4.1.12. Estimación de la cantidad de falsos positivos y falsos negativos de la firma predictiva de buena respuesta a la QTN.

Cabe destacar que la firma clasificó en la segunda condición a la mayoría de las pacientes tratadas sólo con taxanos, consideradas como las de buen pronóstico por el clínico en el momento del diagnóstico. Sin embargo, una paciente tratada con taxanos obtuvo una mala respuesta del tratamiento, pero cumplió la primera condición de nuestra firma predictiva. El diagrama de la figura 4.1.3 muestra la relación de las pacientes tratadas con taxanos con la condición cumplida de la firma predictiva y la respuesta al tratamiento que realizaron finalmente.

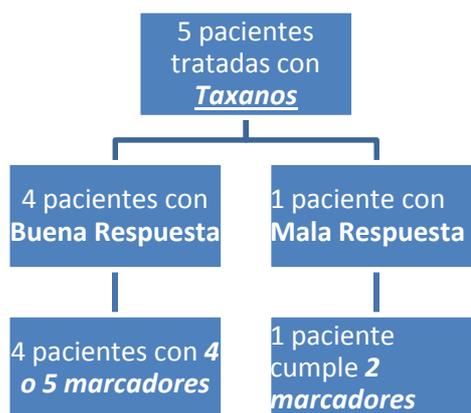


Figura 4.1.3. Diagrama de la relación de las pacientes tratadas con taxanos con su tipo de respuesta a la QT y el número de marcadores que expresan de la firma predictiva. Sólo 5 de 7 pacientes tratadas con Taxanos disponían de todos los resultados IHQ de la firma.

Finalmente, puntualizar que en el caso de preferir que nuestra firma detecte las Malas Respuestas a la QTN, únicamente se debería invertir el sentido de los puntos de corte de los marcadores de la firma predictiva, siendo (CTSL < 10; Her4 < 110; Surv cit ≥ 70; ALDH = 0; Bcl2 ≥ 25). Evidentemente, la firma para predecir las Malas Respuestas al Tratamiento presentará la misma Sensibilidad (100%) y Especificidad (39%) que la predicción de las Buenas Respuestas.

4.1.2.2. ESTUDIO DEL VALOR PRONÓSTICO DE LA FIRMA PREDICTIVA.

A continuación, hemos comprobado si nuestra firma predictiva de la respuesta al tratamiento era capaz de predecir la aparición de metástasis. A pesar de no encontrar una correlación significativa entre la firma predictiva y la aparición de metástasis ($p=0,738$), es interesante observar que las 9 pacientes que cumplían la **segunda condición** no desarrollaron metástasis al largo de su enfermedad. Las otras 60 pacientes que cumplían la **primera condición**, 49 pacientes (82%) no desarrollaron metástasis y las otras 11 (18%), si. En definitiva, las pacientes que cumplían la primera condición parecen presentar más riesgo a la aparición de metástasis que las pacientes de la segunda condición.

Finalmente, realizamos un análisis del tiempo libre de metástasis de las pacientes, según la condición de la firma cumplida, para ver la tendencia de las curvas de SLM (La figura 4.1.4). A pesar de observar claras diferencias en las curvas de la SLM, éstas no alcanzan la significación estadística ($p=0,22$; prueba del log-rank). Las pacientes que cumplían la segunda condición presentaban una SLM a 10 años del 100%, mientras que SLM a 10 años de la primera condición era del 65%.

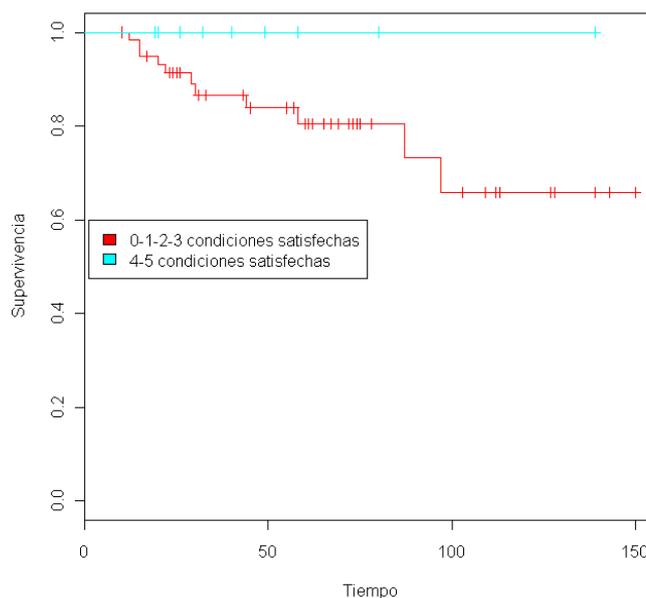


Figura 4.1.4. Curvas de la supervivencia libre de metástasis de las pacientes de la cohorte según la condición cumplida de la firma predictiva.

La figura 4.1.5 muestra dos ejemplos de las imágenes IHQ de dos pacientes de la cohorte que cumplen condiciones distintas de la firma predictiva. La primera paciente cumple la 2ª condición con la expresión de los 5 marcadores de la firma. Esta paciente presenta un tumor del subtipo TNBC con un ypTNM 0 y un Miller-Payne de grado 5, y obtuvo una RCp. Por el contrario, la segunda paciente cumple la 1ª condición con la expresión de 2 marcadores. En este caso, la paciente presenta un tumor del subtipo Luminal A con un ypTNM 2 y un grado 1 de Miller-Payne, y no respondió a la QT.

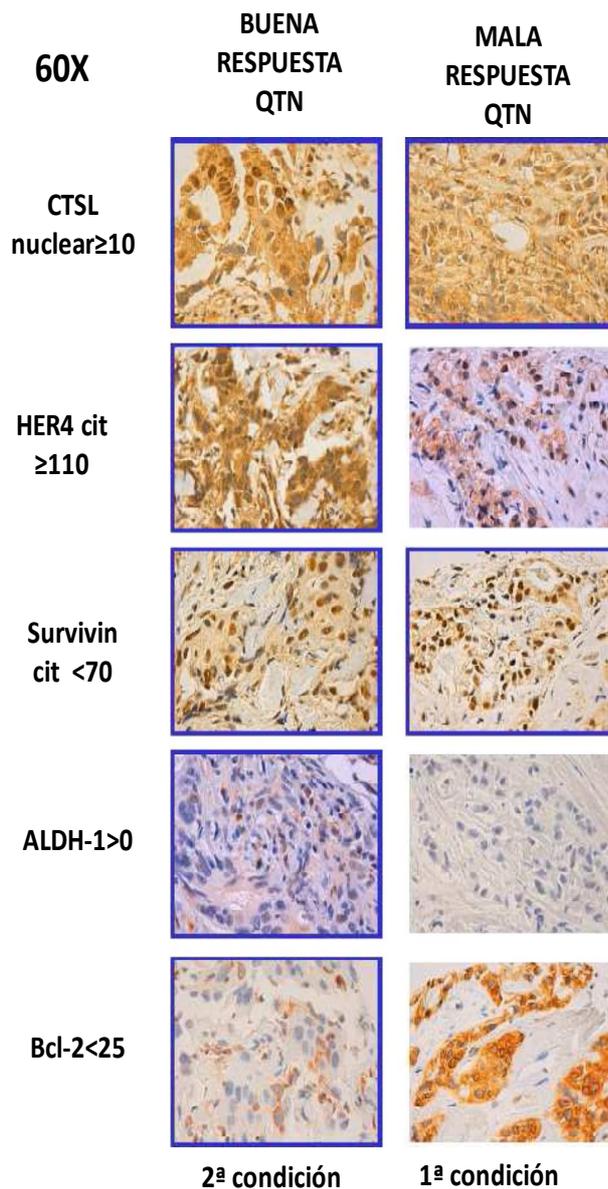


Figura 4.1.5. Imágenes IHQ (60x) representativas de los marcadores de la firma predictiva de 2 pacientes de la cohorte. La paciente de la izquierda cumplió con la 2ª condición realizó un RCp (estadio 0). La paciente de la derecha cumplió la 1ª condición no respondió a la QTN (estadio 2). Las imágenes remarcadas en azul indican los marcadores que cumplen con nuestra firma predictiva.

4.2. MARCADORES PREDICTIVOS SEGÚN LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES HORMONALES EN EL TUMOR.

En este apartado del estudio, se pretende hallar marcadores predictivos específicos para las pacientes con RE=0 y RPG=0 (TNBC y Her2/RH-) versus las pacientes con RE>0 y/o RPG>0 (Luminales y Her2RH+) en el tumor primario.

La figura 4.2.1 muestra la distribución de nuestra cohorte según la expresión de receptores hormonales y su respuesta al tratamiento. De la cohorte de 115 pacientes, un **38% (N=44)** de ellas, no expresan RE ni RPG frente el **62% (N=71)** que expresan alguno de estos dos receptores.

La subserie formada por las pacientes con RH negativos presenta una tasa de buena respuesta a la QTN del **38,63% (N=17)**. En cambio, la subserie formada por pacientes con RH positivos presenta un **31,4% (N=22)** de buenas respuestas a la QTN.

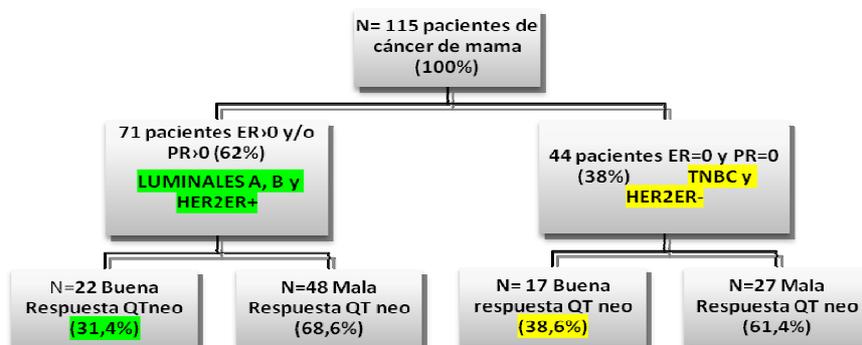


Figura 4.2.1 Distribución (N y %) de la cohorte según su expresión de RH y su respuesta al tratamiento.

La frecuencia de RCp en la serie de RH negativos es del **22%** frente al **14,50%** en las pacientes con RH positivos, aunque esta diferencia no es significativa (p-valor =0,2346) (tabla4.2.1).

ypTNM	N de RH	%	N de RH+	%	Total
0	13	22%	8	14,50%	21
1	8	13,60%	10	18,20%	18
2	21	35,60%	25	45,40%	46
3	17	28,90%	12	21,8%	29
Total	59		55		114

Tabla 4.2.1. Número y frecuencia de RCp según la expresión de los RH.

4.2.1. MARCADORES PREDICTIVOS DE TUMORES CON RECEPTORES HORMONALES NEGATIVOS.

Inicialmente, determinamos los marcadores predictivos independientes de la subserie de tumores con RH negativos, obtenidos a partir de un modelo de regresión logística univariante según los mismos criterios de punto de corte que en el apartado 4.1.

A continuación, mostramos en la tabla 4.2.2 únicamente, los marcadores predictivos individuales significativos ($p < 0,05$). El índice de Gini es el criterio que extrae el mejor punto de corte para discriminar la variable (tipo de respuesta) de cada marcador.

Biomarcadores RH-	OR	IC 95%	p-valor	R ² .Naglekerke
Escarlar				
p-AKT	1,01	(1,00-1,03)	0,05	0,18
Punto de corte =0				
ALDH >0	4,96	(1,11-25,4)	0,04	0,17
Punto de corte = mediana				
ALDH>0	4,96	(1,11- 25,45)	0,04	0,17
p-HER3 mem >1	7,00	(1,42-42,17)	0,02	0,21
Índice de Gini				
ALDH-1≥ 5	4,96	(1,11-25,4)	0,04	0,17
Ciclina D1 nuc≥90	3,86	(1,028- 15,8)	0,05	0,13
Her4 cit ≥110	16,5	(2,3- 344)	0,02	0,36
p-AKt cit≥110	7,00	(1,44- 40,9)	0,02	0,24
p-HER3mem≥1	7,00	(1,42- 42,0)	0,02	0,21

Tabla 4.2.2. Biomarcadores predictivo para receptores hormonales negativos. Los biomarcadores con una **OR**<1 son indicadores de **resistencia** a la QT o menos probabilidad de buena respuesta a la QTN, mientras que los biomarcadores con una **OR**>1 son indicadores de mayor probabilidad de **buena respuesta** a la QTN.

Hemos desestimado la opción de determinar una firma predictiva exclusiva para RH negativos en un modelo multivariante, debido al pequeño tamaño muestral (N=27). Sólo disponemos de 27 pacientes, de los 40 pacientes con RH negativos, con resultados para los 5 marcadores obtenidos. Los marcadores p-AKt, Her4 y Survivin fueron de los últimos analizados por IHQ. Por consiguiente, las pacientes que disponían de material escaso ya tenían agotado el tejido en el momento de realizar las inmunotinciones correspondientes de estos marcadores.

La tabla 4.2.3 muestra la distribución del tipo de respuesta a la QTN de la cohorte, según el punto de corte de cada uno de los marcadores predictivos encontrados en las *pacientes con ausencia de RH*.

Los tumores con RH negativos que expresaron **ALDH-1** (H-score \geq 5) presentan un **53,8%** de buenas respuestas a la QTN frente al **19,1%** de las buenas respuestas obtenidas por los tumores que no expresaron ALDH-1 (H-score $<$ 5).

Los tumores con RH negativos que expresaron altos niveles nucleares de **Ciclina D1** (H-score \geq 90) presentaron un **55,3%** de buenas respuestas frente al **25%** de las buenas respuestas obtenidas por los tumores que expresaron bajos niveles nucleares de Ciclina D1 (H-score $<$ 90).

Los tumores con RH negativos que expresaron altos niveles citoplasmáticos de **HER4** (H-score \geq 110) presentaron un **64,7%** de buenas respuestas frente al **10%** de las buenas respuestas obtenidas por los tumores que expresaron bajos niveles citoplasmáticos de HER4 (H-score $<$ 110).

Los tumores con RH negativos con altos niveles citoplasmáticos **p-Akt** (H-score \geq 110) presentaron un **63,6%** de buenas respuestas frente al **20%** de las buenas respuestas obtenidas por los tumores que expresaron bajos niveles de p-Akt (H-score $<$ 110).

Finalmente, los tumores con RH negativos que presentaron activado **p-HER3** (\geq 1 de membrana) obtuvieron un **66,6%** de buenas respuestas frente el **22,3%** de las buenas respuestas obtenidas por los tumores que no presentaron activado **p-HER3** ($<$ 1).

Nº marcadores	Biomarcadores RH-	N y (%) Mala Respuesta	N y (%) Buena Respuesta	Nº casos valorados
1º marcador	ALDH-1 < 5	17 (80,9%)	4 (19,1%)	34
	ALDH-1 ≥5	6 (46,2%)	7 (53,8%)	
2º marcador	Ciclina D1 nuc <90	18 (75%)	6 (25%)	40
	Ciclina D1 nuc ≥90	7 (43,7%)	9 (56,3%)	
3º marcador	Her4 cit <110	9 (90%)	1 (10%)	27
	Her4 cit ≥110	6 (35,3%)	11 (64,7%)	
4º marcador	pAKt cit <110	16 (80%)	4 (20%)	31
	p-AKt cit ≥110	4 (36,4%)	7 (63,6%)	
5º marcador	pHer3 mem <1	21 (77,7%)	6 (22,3%)	36
	p-Her3 mem ≥1	3 (33,4%)	6 (66,6%)	

Tabla 4.2.3. Número y Frecuencia de tipo de respuesta al tratamiento según el punto de corte de los biomarcadores predictivos de los tumores RH negativos.

4.2.2. MARCADORES PREDICTIVOS DE TUMORES CON RH POSITIVOS.

Primero, hallamos los marcadores predictivos de los tumores con RH positivos a partir de un modelo de regresión logística univariante, según los diferentes criterios de punto de corte establecidos en el apartado 4.1.

A continuación, resumimos en la tabla 4.2.4 los marcadores predictivos individuales significativos para los tumores con RH positivos. A partir del índice de Gini, obtuvimos los 4 marcadores con el punto de corte más discriminativo para nuestra variable (respuesta a la QTN). Sin embargo, volvemos a descartar los marcadores RE y RPG por su elevado punto de corte.

Biomarcadores RH+	OR	IC 95%	p-valor	R ² .Naglekerke
Escalar				
ALDH-1	1,12	(1,04-1,27)	0,034	0,06
FGFR2 cit	0,99	(0,988-1,000)	0,047	0,11
RE	0,99	(0,986-1,000)	0,048	0,08
RPG	0,99	(0,989-0,999)	0,033	0,10
Punto de corte =0				
ALDH >0	6,14	(1,429-32,3)	0,019	0,12
Punto de corte = mediana				
ALDH>0	6,14	(1,429-32,3)	0,02	0,12
FGFR-2 cit >135	0,26	(0,069-0,842)	0,031	0,13
RPG>140	0,21	(0,061-0,628)	0,008	0,15
Índice de Gini				
Bcl-2>=25	0,13	(0,026-0,56)	0,009	0,16
CTSLnucl>=10	3,52	(1,168- 11)	0,026	0,10
FGFR-2 cit >=115	0,18	(0,046- 0,59)	0,007	0,20
RE>=255	0,2	(0,043- 0,696)	0,020	0,13
RPG>=175	0,12	(0,026-0,42)	0,002	0,23

Tabla 4.2.4. Biomarcadores predictivos para receptores hormonales positivos. Los biomarcadores con una **OR<1** son indicadores de **resistencia** a la QTN, mientras que los biomarcadores con una **OR>1** son indicadores de mayor probabilidad de **buena respuesta** a la QTN.

No se pudo elaborar una firma predictiva de respuesta a la QTN para los tumores con RH positivos con estos 4 marcadores predictivos (Bcl-2, CTSL y FGFR-2 y ALDH>0). Las posibles combinaciones de estos 4 marcadores en el modelo multivariante generaban firmas con un bajo coeficiente de determinación, capaces de explicar menos del 30% de la variabilidad de la respuesta al tratamiento.

A continuación, mostramos la distribución del tipo de respuesta a la QTN de la cohorte en la tabla 4.2.5, según el punto de corte de los 3 marcadores seleccionados por el índice de Gini y ALDH-1 que es un marcador predictivo significativo para los otros 3 criterios estadísticos establecidos.

Los tumores con RH positivos que expresaron **bajos niveles de Bcl-2** (H-score <25) obtuvieron un **70%** de buenas respuestas a la QTN frente al **24,1%** de las buenas respuestas obtenidas por los tumores que expresaron altos niveles de Bcl-2 (H-score ≥ 25).

Los tumores con RH positivos que expresaron **Catepsina L nuclear** (H-score ≥ 10) presentaron un **52,6%** de buenas respuestas frente al **24%** de los tumores que no expresaron CTSL nuclear (H-score <10).

Los tumores con RH positivos con baja expresión citoplasmática de FGFR2 (H-score <115) obtuvieron un **54,2%** de buenas respuestas frente el **17,2%** de las buenas respuestas obtenidas por los tumores con altos niveles citoplasmáticos de **FGFR-2** (H-score ≥ 115).

Finalmente, los tumores con RH positivos con expresión de ALDH-1 (H-score >0) presentaron un **66,6%** de buenas respuestas al tratamiento frente al **24,6%** de las buenas respuestas obtenidas por los tumores que **no expresaron ALDH-1** (H-score=0).

Nº marcadores	Biomarcador RH+	N (%) Mala Respuesta	N (%) Buena Respuesta	Nº casos valorados
1º marcador	Bcl-2≥ 25	41 (75.9%)	13 (24.1%)	66
	Bcl-2<25	3 (30%)	7 (70%)	
2º marcador	CTSLnucl<10	38 (76%)	12 (24%)	69
	CTSLnucl≥ 10	9 (47.4%)	10 (52.6%)	
3º marcador	FGFR-2 cit <115	11 (45,8%)	13 (54,2%)	54
	FGFR-2 cit ≥ 115	24 (82,3%)	5 (17,2%)	
4º marcador	ALDH-1 =0	43 (75.4%)	14 (24.6%)	66
	ALDH-1 >0	3 (33.3%)	6 (66.6%)	

Tabla 4.2.5. Número y frecuencia de buenas y malas respuestas a la QTN de la cohorte con RH positivos, según el punto de corte de sus biomarcadores predictivos.

4.2.3. DIFERENCIAS DE EXPRESIÓN PROTEICA SEGÚN LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES HORMONALES DEL TUMOR.

La tabla 4.2.6.1 muestra únicamente las proteínas que presentan diferencias de expresión según la expresión de los RH del tumor.

Marcadores	Estatus Hormonal		Mann-Whitney p-valor	RATIO RH-/RH+
	RH= 0	RH> 0		
	N	41	65	
53BP1	Media	127.7	143.4	0,0140
	Mediana	130	160	0,89
	N	35	66	
ALDH-1	Media	13	6.5	0,0070
	Mediana	0	0	2
	N	30	64	
Bcl-2	Media	29	147.2	<0,0001
	Mediana	0	160	0,1
	N	44	68	
CTSL nuclear	Media	28.7	19	0,0330
	Mediana	0	0	1,5
	N	42	64	
Ciclina D1 citoplasmático	Media	18	53.4	0,0013
	Mediana	0	25	0,33
	N	42	64	
Ciclina D1 nuclear	Media	78.8	133.2	<0,0001
	Mediana	82.5	135	0,6
	N	28	56	
EGFR	Media	1	0.2	<0,0001
	Mediana	1	0	NP
	N	46	69	
HER2	Media	1.85	1.2	0,0040
	Mediana	1	1	NP
	N	38	55	
pHER3 membrana	Media	0.79	0.23	<0,0001
	Mediana	1	0	NP
	N	28	54	
FGFR-2 nuclear	Media	15.5	50	0,0400
	Mediana	0	0	0,3
	N	33	63	
P27	Media	74.6	119.8	0,0020
	Mediana	50	120	0,6
	N	31	63	
pAKT citoplasmático	Media	79.2	42.2	0,0050
	Mediana	70	20	1,87
	N	45	69	
Ki67	Media	53.6	32.5	<0,0001
	Mediana	50	30	1,6

Tabla 4.2.6.1 Descripción, p-valor y ratio de las proteínas con diferente expresión en los tumores con receptores hormonales positivos y negativos. NP= no procede.

La figura 4.2.2 muestra la comparación de la activación diferenciada de la vía de proliferación y de la supervivencia celular de los tumores con RH negativos versus los positivos. Los tumores con RH negativos son mucho más proliferativos y agresivos que los tumores con RH positivos. Gran parte de la actividad proliferativa de los tumores con RH negativos subyace en la sobreexpresión de todos los miembros de la familia de receptores de crecimiento (HER), p-AKt y Ki67. Además, los tumores RH negativos no presentan inhibida la apoptosis intrínseca (la baja expresión de Bcl-2) ni el ciclo celular frenado, al menos en la transición de la fase de G1 a S, porque expresan bajos niveles de p27^{Kip1}.

En cambio, la baja proliferación de los tumores con RH positivos se puede atribuir a: 1) la escasa activación de los receptores de la familia HER, sólo presentan activado HER4 y algunos tumores también tienen a HER2. 2) presentan 3,5 veces menos activada la p-AKt citoplasmática que los tumores RH negativos. 3) expresan casi la mitad de Ki67 que los tumores RH negativos. 4) presentan bloqueado el ciclo celular en la fase G1, debido a la alta expresión de p27^{Kip1} (2,5 veces más que los RH negativos) y 5) presentan bloqueada la apoptosis intrínseca, en consecuencia de la elevada expresión de Bcl-2.

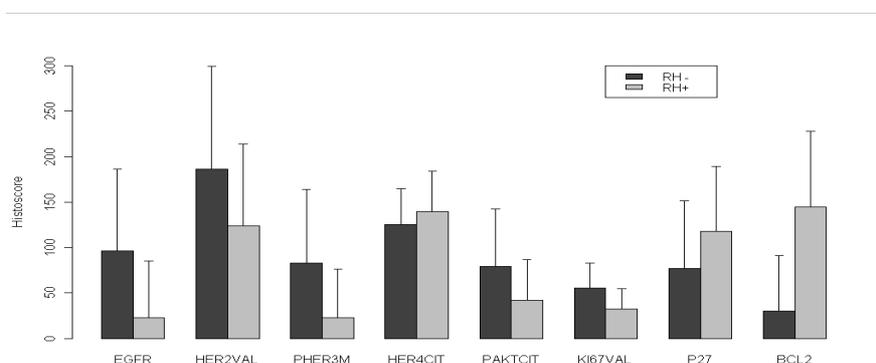


Figura 4.2.2. Comparación de la expresión de los biomarcadores implicados en la activación de las vías de proliferación y de supervivencia celular según la expresión de los RH del tumor. Los resultados de los marcadores EGFR y HER2 son valorados de 1 a 3. Por ese motivo, han sido re-escalados (x100) para ser visualizados en el mismo gráfico que el resto de marcadores. Todos los marcadores del gráfico presentan una expresión diferenciada significativamente entre RH+ y los RH-, excepto Her4 citoplasmático.

Las figuras 4.2.3 y 4.2.4 muestran las imágenes IHQ de los marcadores de proliferación y de supervivencia celular de dos tumores con diferente expresión de sus RH.

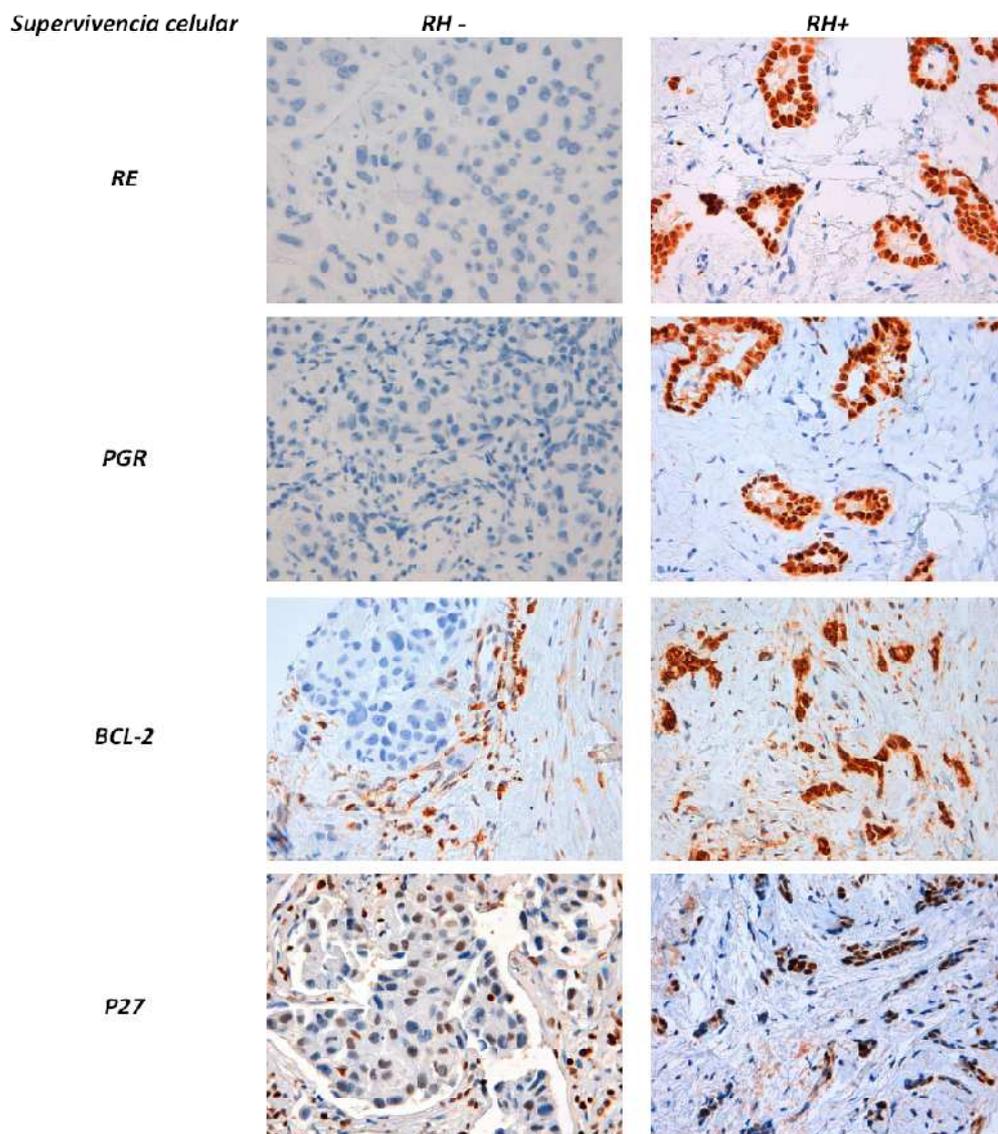


Figura 4.2.3. Imágenes (60x) de los biomarcadores implicados en la supervivencia celular en dos tumores, uno con RH + y el otro RH -.

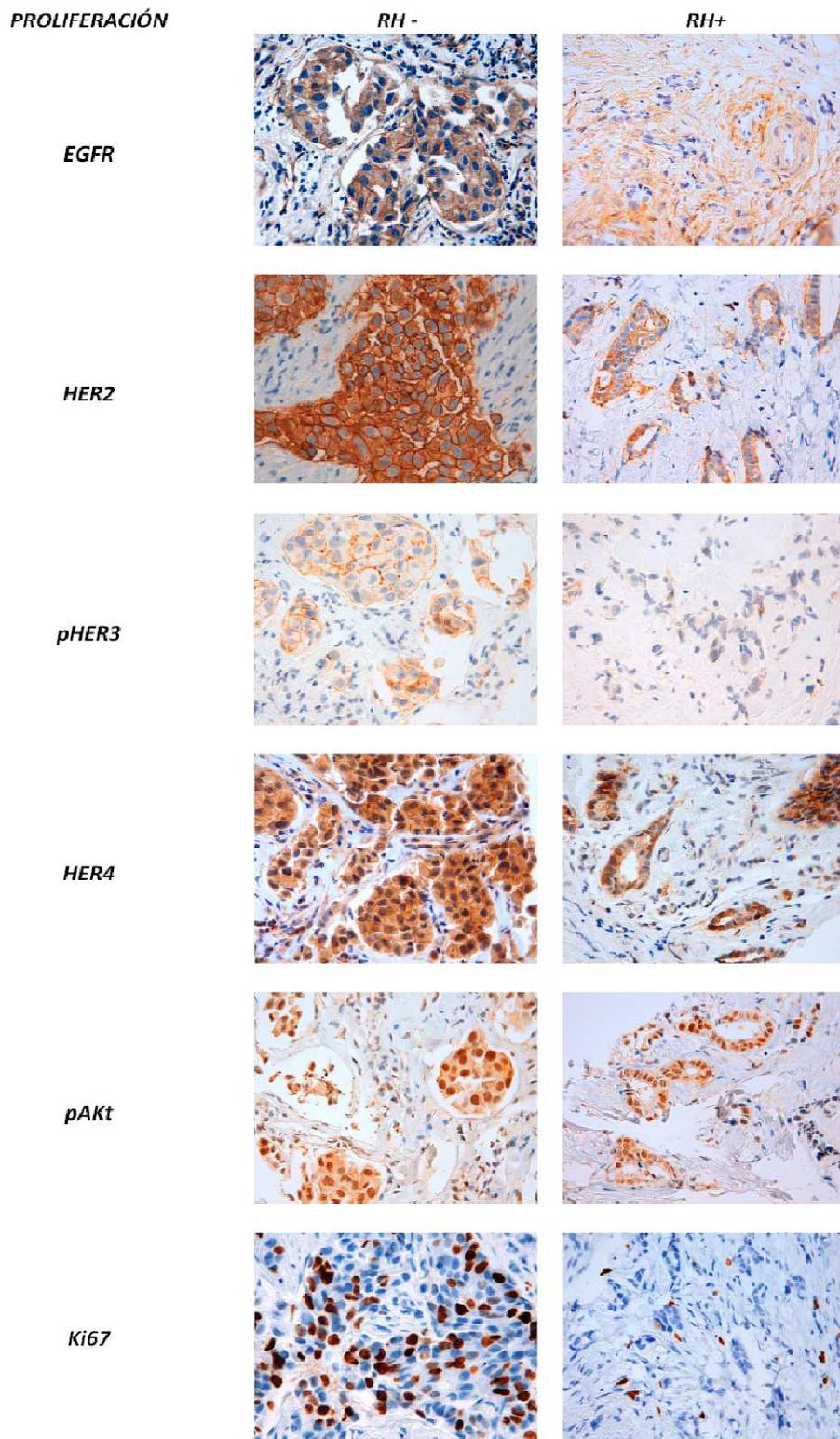


Figura 4.2.4. Imágenes (60x) de los biomarcadores implicados en la proliferación celular en dos tumores, uno con RH + y el otro RH -.

4.3. MARCADORES PRONÓSTICO DE LA APARICIÓN DE METÁSTASIS.

En esta parte del estudio, analizamos biomarcadores con valor pronóstico de la aparición de metástasis en las 22 proteínas valoradas por IHQ en el momento del diagnóstico. En este estudio, no valoramos las recidivas locales porque no había suficientes eventos para estudiar este tipo de marcadores. Decidimos no mezclar las recidivas locales con la distantes, ya que el efecto en la supervivencia de la paciente es muy distinto entre ellas. Las metástasis siempre reducen la SG, mientras que las recidivas locales no siempre e incluso pueden ser tratadas adecuadamente considerándolas como un segundo tumor.

En nuestra cohorte de 115 pacientes disponemos de 25 pacientes con metástasis (21,7%).

Inicialmente, ajustamos a un modelo de regresión logística univariante para evaluar el valor pronóstico (metástasis si/no) de los niveles de inmunoexpresión de cada marcador de forma independiente, a partir de los 4 criterios establecidos anteriormente, tal como se muestra en la tabla 4.3.1.

Biomarcadores	OR	IC 95%	p-valor	R ² .Naglekerke
Escalar				
HER4 MEM	0,075	0,7823 - 0,0236	0,0236	0,12
RE	0,991	0,9995 - 0,0322	0,0321	0,06
RPG	0,987	0,9987 - 0,0261	0,0261	0,08
PUNTO DE CORTE =0				
HER4 MEM >0	0,256	0,0720 - 0,8113	0,0247	0,11
HER4 NUC >0	3,500	1,0959 - 11,5192	0,0344	0,09
RE >0	0,267	0,1020 - 0,6642	0,0054	0,11
PR >0	0,253	0,0853 - 0,6596	0,0074	0,11
PUNTO DE CORTE =MEDIANA				
53BP1>145	0,352	0,124 – 0,916	0,038	0,07
HER4 NUC>0	3,50	1,096 -11,519	0,034	0,09
PTEN NUC>150	0,30	0,088 – 0,860	0,033	0,08
RE >150	0,34	0,122 – 0,863	0,029	0,07
RPG >0	0,25	0,085 – 0,66	0,007	0,11
ÍNDICE DE GINI				
53BP1>=155	0,22	0,059 – 0,632	0,0096	0,12
BCL2>=145	0,30	0,0810 – 0,931	0,051	0,07
CTSL CIT>=227,5	12,43	1,5076 - 258,25	0,033	0,07
CICLINA D1 NUC>=95	0,35	0,1276 - 0,914	0,035	0,07
HER4 NUC>=20	3,81	1,187 – 12,62	0,025	0,10
PTEN CIT>=65	0,24	0,064 – 0,947	0,036	0,07
PTEN NUC>=65	0,24	0,077 – 0,728	0,011	0,10
VDR CIT>=95	3,24	0,965 - 10,45	0,049	0,05
RE >=2.5	0,27	0,102 - 6.642000e-01	0,005	0,11
RPG>=20	0,21	0,065 - 0,568	0,004	0,13
ratio.Survivin Cit/Nuc>=0.56	4,01	1,333 – 12,386	0,0135	0,11

Tabla 4.3.1. Resumen de los Biomarcadores con valor pronóstico significativos. Los biomarcadores con una OR<1 son indicadores de reducir el riesgo de la aparición de metástasis, mientras que los biomarcadores con una OR>1 son indicadores de incrementar el riesgo de la aparición de metástasis. R² Naglekerke es el coeficiente de determinación.

En segundo lugar, ajustamos a un modelo de regresión logística multivariante, utilizando todas las variables significativas del análisis univariante y aplicamos un algoritmo “*Stepwise*” para determinar la combinación de marcadores pronóstico con mayor poder para discriminar significativamente la aparición de metástasis si/no.

A continuación, mostramos la composición de nuestra firma de mal pronóstico en el tumor primario formada por 3 marcadores. El coeficiente de determinación de la firma es del **36,4%**.

MARCADORES	METÁSTASIS
1r marcador	ratio.Survivin Cit/Nuc ≥ 0.56
2o marcador	VDR citoplasmático ≥ 95
3r marcador	HER4 membrana = 0

Tabla 4.3.2. Firma de mal pronóstico de la aparición de metástasis en el tumor primario.

La figura 4.3.1 refleja el efecto sumatorio de las ORs de todos los marcadores de la firma de mal pronóstico en el análisis multivariante, obteniendo un mayor potencial discriminativo que un sólo marcador.

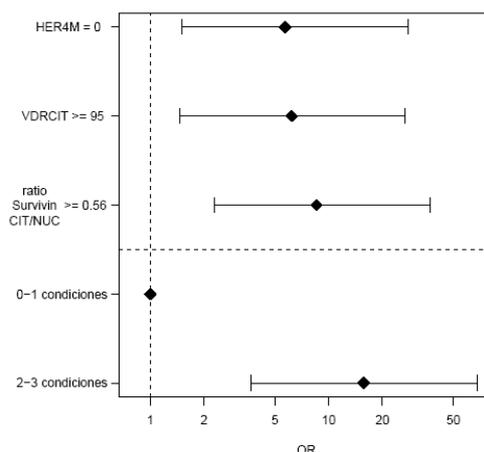


Figura 4.3.1. Gráfico del ORs de cada marcador con valor pronóstico individual del análisis univariante versus el OR de la firma de mal pronóstico en el análisis multivariante. El eje de las x se presenta en escala logarítmica para mejorar la visualización del gráfico.

En la tabla 4.3.3, describimos la distribución de pacientes con o sin metástasis de la cohorte, según el punto de corte de cada marcador de la firma de mal pronóstico.

Los tumores de mama con un **ratio de Survivin citoplasmática/ nuclear $\geq 0,56$** desarrollaron metástasis en un **36%** de los casos, mientras que sólo el **12,4%** de los tumores con ratio de Survivin inferior a 0,56 presentaron metástasis.

Los tumores que expresaron altos niveles citoplasmáticos de **VDR** (H-score ≥ 95) presentaron metástasis en un **40%** de los casos, mientras que sólo **17,1%** de los tumores con baja expresión citoplasmática de VDR presentaron metástasis (H-score <95).

Finalmente, los tumores que no expresaron **HER4** a nivel de membrana (<0) desarrollaron metástasis en un **31,3%** de los casos, mientras que el **10,4%** de los tumores con HER4 activado (>0) presentaron metástasis.

Nº	Biomarcador	N (%)		Nº casos con resultados del marcador
		No Metástasis	Metástasis	
1 ^r marcador	ratio.Survivin CIT/NUC <0.56	57 (87,6%)	8 (12,4%)	90
	ratio.Survivin CIT/NUC ≥ 0.56	16 (64%)	9 (36%)	
2 ^o marcador	VDR CIT < 95	73 (82,9%)	15 (17,1%)	103
	VDR CIT ≥ 95	9 (60%)	6 (40%)	
3 ^r marcador	HER4 Mem > 0	43 (89,5%)	5 (10,4%)	80
	HER4 Mem = 0	22 (68,7%)	10 (31,3%)	

Tabla 4.3.3. Descripción y frecuencia de la aparición de metástasis según el punto de corte de los marcadores de la firma de mal pronóstico en el tumor primario.

En la realización del modelo multivariante, es necesario que todas las pacientes del estudio dispongan de todos los resultados IHQ de los marcadores de la firma. En esta parte del estudio, disponemos de **70 pacientes** con resultados de los 3 marcadores, de las cuáles 12 pacientes (17%) tuvieron metástasis.

La tabla 4.3.4 refleja la distribución de la detección de las pacientes con metástasis según el número de marcadores expresados de la firma de mal pronóstico. Cabe destacar que sólo un 7,5% de los tumores primarios que

cumplieron la primera condición de la firma desarrollaron metástasis después del tratamiento. En cambio, un 36% de los tumores que expresaron 2 de los marcadores tuvieron metástasis y el 100% de los tumores que expresaron los 3 marcadores terminaron con metástasis.

Nº marcadores	N (%) NO METÁSTASIS	N (%) METÁSTASIS
0	28 (93%)	2 (7%)
1	23 (92%)	2 (8%)
2	7 (64%)	4 (36%)
3	0 (0%)	4 (100%)

Tabla 4.3.4. Número y frecuencia de la aparición de metástasis según el nº de marcadores de la firma de mal pronóstico que expresa cada paciente.

Por tanto, decidimos simplificar la firma agrupando los 3 marcadores en 2 condiciones. La **primera condición** se basa en la expresión de 0 o 1 marcador, mientras que la **segunda condición** es la expresión de 2 o 3 marcadores, tal como se puede ver en la tabla 4.3.5. Seguimos el mismo criterio que en la firma predictiva anterior.

Condiciones	Nº MARCADORES	N (%)	
		NO METÁSTASIS	METÁSTASIS
1ª condición	0-1	51 (93%)	4 (7%)
2ª condición	2-3	7 (47%)	8 (53%)

Tabla 4.3.5. Número y frecuencia de la aparición de metástasis según la reagrupación de los marcadores de la firma de mal pronóstico en 2 condiciones.

Curiosamente, las pacientes que cumplen la segunda condición tienen 14,6 veces más riesgo a desarrollar metástasis en comparación con las pacientes que cumplen la primera condición de forma estadísticamente significativa (**p=0,001**) (tabla 4.3.6).

APARICIÓN DE METÁSTASIS					
Nº Condiciones	Nº Marcadores	% Metástasis	OR	IC 95%	p-valor
1ª condición	0-1	7%	1	-	-
2ª condición	2-3	53%	14,57	(3,67 -68,15)	0,001

Tabla 4.3.6. Estimación del OR y el p-valor de la segunda condición respecto la primera condición de la firma de mal pronóstico de SLM.

A continuación, realizamos un estudio de sensibilidad y especificidad de la firma de mal pronóstico para evaluar su fiabilidad. La tabla 4.3.7 muestra los falsos positivos y negativos de nuestra firma de mal pronóstico. La Sensibilidad de predicción de metástasis es del **66,6% (IC 34,8- 90%)** y la Especificidad es del **87,9% (IC 76,7-95%)**. Por tanto, nuestra firma no detectará un 33,4% de las pacientes que desarrollaran metástasis después del tratamiento. Un 12,9% de las pacientes que predecimos que presentarán metástasis, no la desarrollarán.

Condiciones	METÁSTASIS	No METÁSTASIS
2-3 marcadores	8	7
(POSITIVOS)	verdaderos positivos	falsos positivos
0-1 marcadores	4	51
(NEGATIVOS)	Falsos negativos	Verdaderos negativos

Tabla 4.3.7. Estimación de los falsos positivos y falsos negativos de la firma de mal pronóstico de SLM en el tumor primario.

Después, realizamos un estudio de la supervivencia libre de metástasis (SLM) para valorar la diferencia de las curvas de supervivencia para cada condición de la firma (Figura 4.3.2). La SLM a 10 años en las pacientes que cumplían la primera condición (que expresaron 0 o 1 marcador) era del 85%. En cambio, la

SLM a 10 años en las pacientes que cumplían la segunda condición (que expresaron 2 o 3 marcadores) era del 35%. La prueba del log-rank indica que las diferencias encontradas entre las curvas son altamente significativas ($p=0,0006$).

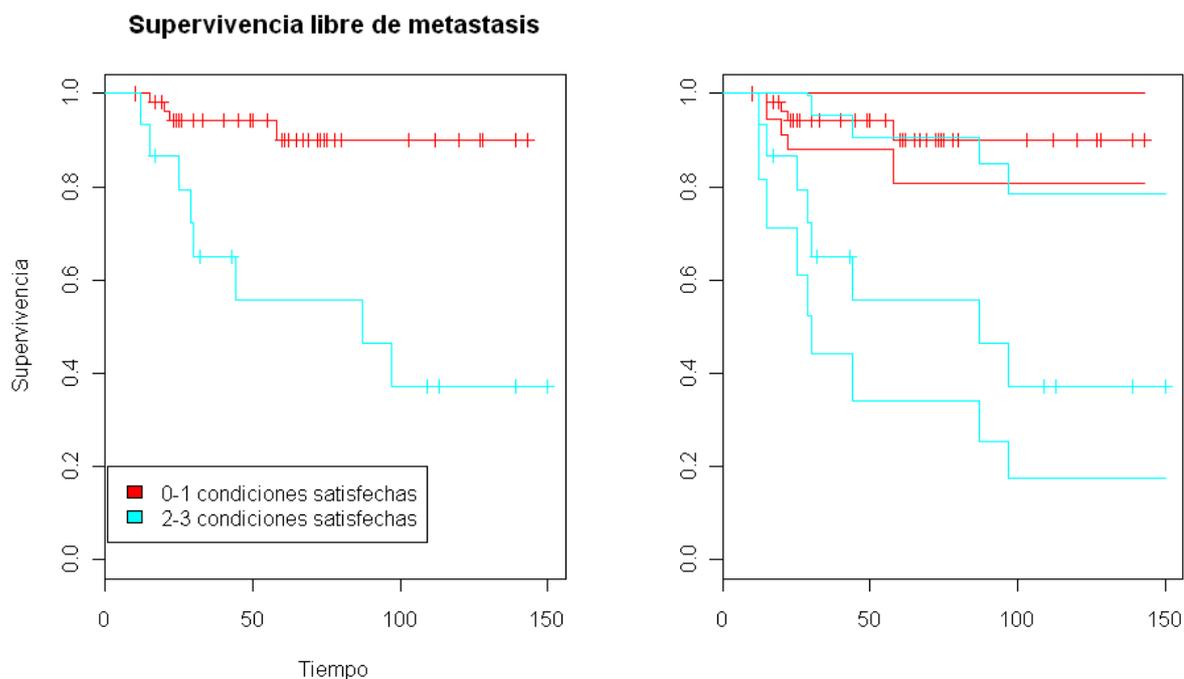


Figura 4.3.2 Curvas de SLM de cada una de las 2 condiciones de la firma mal pronóstico de la aparición de metástasis. El gráfico de la derecha presenta los intervalos de confianza al 95% de las curvas de SLM. El tiempo de seguimiento del gráfico se encuentra en meses.

Finalmente, mostramos dos imágenes IHQ representativas de los marcadores de la firma de mal pronóstico de dos pacientes de la cohorte con diferente progresión de la enfermedad. La paciente A cumplía la 1ª condición en el tumor primario y no desarrolló metástasis después del tratamiento, mientras que el tumor de la paciente B cumplía la 2ª condición y progresó en metástasis.

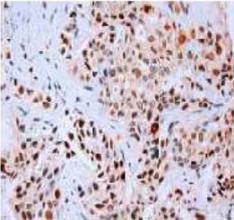
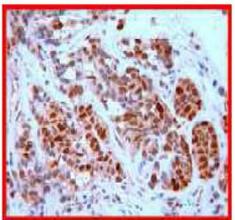
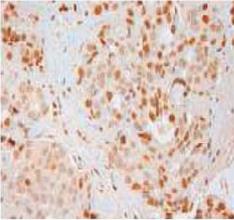
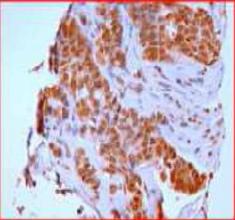
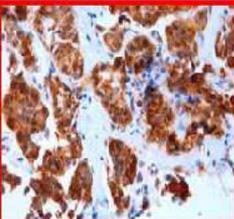
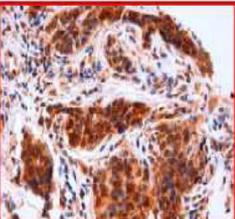
40X	PACIENTE A	PACIENTE B
Ratio Survivin cit/nuc >0,56		
VDR citoplasmático ≥ 95		
Her4 membrana = 0		
Nº condiciones	2ª condición	1ª condición
Metástasis	no	si

Figura 4.3.3 Imágenes IHQ (40x) representativas de la firma de mal pronóstico de la aparición de metástasis de dos pacientes de la cohorte. La paciente A (Her2+/RH+) cumplía la 1ª condición, no presentó ningún marcador y no llegó a desarrollar metástasis. Contrariamente, la paciente B (luminal B) cumplía la segunda condición presentando los 3 marcadores de la firma y desarrolló metástasis. Los marcadores remarcados en rojo indican que cumplen la firma de mal pronóstico.

4.4. DEGRADACIÓN DE 53BP1 MEDIANTE CATEPSINA L NUCLEAR EN LOS TNBC.

Se valoró inmunohistoquímicamente CTSL, VDR, 53BP1 en los TMAs hechos con la cohorte de tumores de 249 pacientes de cáncer de mama, clasificados en los 4 subtipos moleculares: luminal A, luminal B, Her2 y TNBC.

En la tabla 4.4.1, se puede comprobar que los H-scores citoplasmáticos de CTSL son similares para todos los subtipos de tumores. Sin embargo, los TNBC presentaron tanto los H-scores más altos de CTSL nuclear ($p < 0,0001$) como los H-scores más bajos de 53BP1 ($p = 0,0002$).

Marcadores	Tipo Molecular	H-score			Kruskal-Wallis p-valor
		Media(SD)	Mediana [P25,P75]	Min-Max	
Catepsina L Citoplasmático	Luminal A	137 (36,6)	135[110,160]	50-205	0,50
	Luminal B	134 (35,2)	130[110,155]	75-230	
	Her2 ⁽⁻¹⁾	141 (43,1)	135[110,171]	50-230	
	Triple Negativo ⁽⁻¹⁾	145 (35,2)	140[120,175]	80-200	
Catepsina L Nuclear	Luminal A	8 (18,0)	0 [0, 0]	0- 90	<0,0001
	Luminal B	8 (14,9)	0 [0, 15]	0- 75	
	Her2 ⁽⁻¹⁾	9 (18,3)	0 [0, 5]	0- 75	
	Triple Negativo ⁽⁻¹⁾	42 (44,3)	30 [0, 83]	0-125	
53BP1	Luminal A	155 (56,5)	160[120,200]	0-270	0,0002
	Luminal B	150 (45,8)	150[120,170]	40-280	
	Her2 ⁽⁻⁴⁾	154 (58,1)	150[110,200]	20-300	
	Triple Negativo	112 (44,4)	105 [80,143]	0-190	
VDR Citoplasmático	Luminal A ⁽⁻⁴⁾	50 (50,9)	50 [0, 90]	0-185	0,22
	Luminal B ⁽⁻⁴⁾	52 (50,8)	50 [0, 80]	0-190	
	Her2 ⁽⁻²⁾	53 (48,8)	50 [0, 95]	0-160	
	Triple Negativo ⁽⁻³⁾	69 (50,6)	50 [20,110]	0-170	
VDR Nuclear	Luminal A ⁽⁻⁴⁾	121 (68,2)	110[100,170]	0-300	0,78
	Luminal B ⁽⁻⁴⁾	125 (65,2)	130 [90,160]	0-300	
	Her2 ⁽⁻²⁾	122 (73,3)	125 [95,160]	0-300	
	Triple Negativo ⁽⁻³⁾	114 (62,3)	110 [80,150]	0-270	

Tabla 4.4.1. Análisis de IHQ de la expresión de CTSL, 53BP1 y VDR en la cohorte de 249 pacientes de cáncer de mama. Los valores son las medias y medianas del H-score nuclear y citoplasmático de cada marcador para cada subtipo molecular. Min-Max se refiere al valor mínimo y máximo de cada subtipo molecular. La variabilidad de cada marcador es valorada por SD (desviación estándar) y por los percentiles 25 y 75 [P25; P75]. (-X) representa el número de resultados perdidos en cada subtipo molecular debido a la insuficiencia de tejido valorable. Los valores de H-score marcados en negrita identifican el subtipo molecular con una expresión significativamente distinta del marcador del resto, mediante la prueba de Kruskal-Wallis (el p-valor en negrita indica las diferencias significativas, $p < 0,05$) (Grotzky et al, 2013).

A continuación, escogimos las medianas de los H-scores nucleares de VDR, 53BP1 y CTSL (120, 150 y 0, respectivamente) como punto de corte de cada marcador. Estos puntos de corte nos han permitido confirmar las diferencias estadísticamente significativas de la expresión de CTSL nuclear y 53BP1 entre los diferentes subtipos moleculares.

Un 60% de los tumores TNBC presentaron un H-score nuclear de CTSL >0 con una frecuencia de más del doble respecto el resto de subtipos (**p=0,0013**) (tabla 4.4.2). Además, el 75% de los tumores de TNBC presentaron un H-score de 53BP1 inferior a 150 respecto al 39-49% del resto de subtipos (**p=0,0049**) (tabla 4.4.2).

Marcadores	Tipo Molecular	n (%)	Prueba exacta Fisher p-valor
Catepsina L Nuclear > 0	Luminal A	23 (23,2)	0,0013
	Luminal B	22 (31,9)	
	Her2 ⁽⁻¹⁾	12 (27,3)	
	Triple Negativo⁽⁻¹⁾	21 (60,0)	
53BP1 < 150	Luminal A	40 (40,4)	0,0049
	Luminal B	34 (49,3)	
	Her2 ⁽⁻⁴⁾	20 (48,8)	
	Triple Negativo	27 (75,0)	
VDR Nuclear < 120	Luminal A	49 (51,6)	0,34
	Luminal B	25 (38,5)	
	Her2 ⁽⁻⁴⁾	18 (41,9)	
	Triple Negativo	17 (51,5)	

Tabla 4.4.2. Frecuencia de la expresión de CTSL, 53BP1 y VDR de los diferentes subtipos moleculares en función del valor de la mediana de la cohorte de 249 pacientes de cáncer de mama. Los valores hacen referencia a las frecuencias absolutas (n) y relativas (%) de los tumores con un valor de H-score por encima (CTSL nuclear) o por debajo (53BP1 y VDR nuclear) de la mediana de los valores del H-score para cada una de las tres proteínas de la cohorte de 249 pacientes. El valor de la frecuencia marcada en negrita identifica el subtipo molecular con una frecuencia estadísticamente distinta del resto, mediante la prueba de exactitud de Fisher (el p-valor marcado en negrita indica diferencias significativas, $p < 0,05$) (Grotsky et al, 2013). En resumen, la expresión nuclear de CTSL está asociada significativamente con la baja expresión de 53BP1 en los TNBC y no en cualquier otro subtipo molecular. Por tanto, hallamos CTSL nuclear como un

nuevo biomarcador para las pacientes TNBC. Esta nueva firma (CTSL nuclear alto y 53BP1 bajo) puede servir para identificar un subgrupo de los pacientes TNBC, tal como se muestra en la figura 4.4.1.

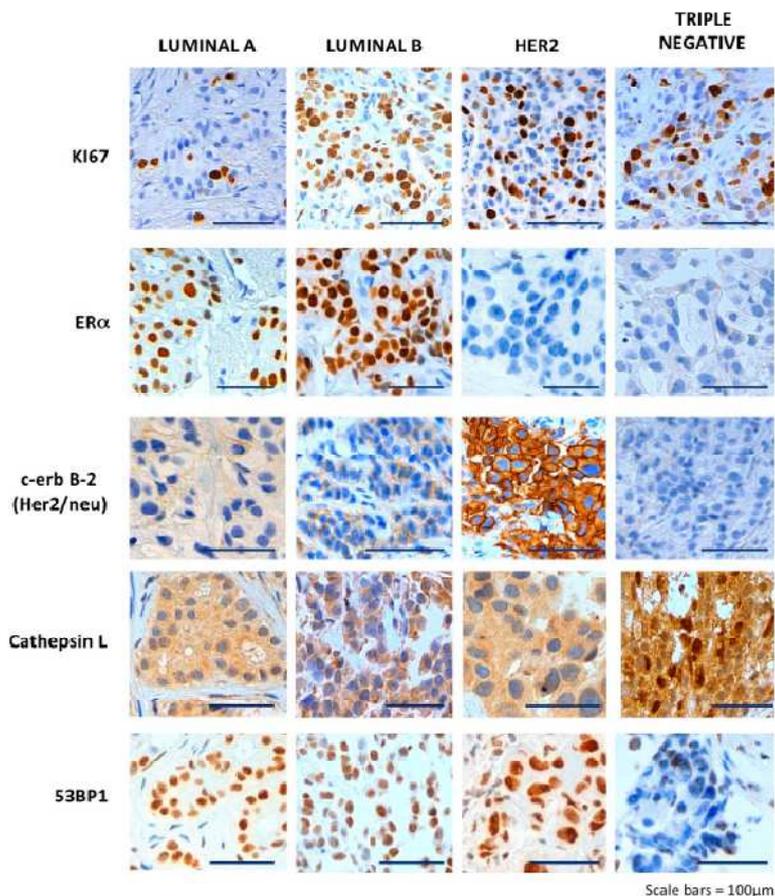


Figura 4.4.1. Nueva firma para el subtipo molecular de los TNBC. Análisis IHQ valorado en los TMAs de 249 pacientes de cáncer de mama de los diferentes subtipos moleculares: luminal A, luminal B, Her2 y TNBC. Esta imagen muestra la expresión IHQ de Ki67, RE, Her2, CTSL y 53BP1 en los 4 cuatro subtipos moleculares, dónde se observa que los TNBC presentan una sobre-expresión de la CTSL nuclear con una acentuada disminución de la expresión de 53BP1 en la misma paciente. Escala de Barra es 100 µm y 60X (Grotsky et al, 2013).

En esta parte del estudio, nuestro objetivo era examinar la asociación del mecanismo entre 53BP1 y CTSL nuclear, encontrado previamente en cultivos celulares, si existe en tumores humanos de cáncer de mama. Este mecanismo se identificó en células BRCA1 deficientes que perdieron 53BP1 debido a su

degradación por CTSL nuclear. Hasta ahora asumimos, tal como indica bibliografía, que la mayoría de nuestras pacientes TNBC son BRCA1 deficientes.

A continuación, analizamos, por IHQ, tumores humanos con mutación germinal en BRCA1 (n=18) y otros con mutación germinal en BRCA2 (n=14), para comprobar que los TNBC de nuestra cohorte se comportan como los tumores con mutación germinal en BRCA1.

Primero, comparamos los H-scores de CTSL nuclear y 53BP1 de los **TNBC** de los carcinomas de nuestra cohorte con los carcinomas con mutación germinal en **BRCA1**, sin obtener diferencias significativas entre ellos. Ambos tipos de tumores presentaron una expresión de CTSL nuclear ($p=0,95$) y una baja expresión de 53BP1 ($p=1$).

Curiosamente, observamos diferencias significativas de la expresión de CTSL nuclear y 53BP1 entre los tumores con mutación germinal en BRCA1 y en BRCA2. Los tumores con mutación germinal en **BRCA2** presentaron una mayor expresión de 53BP1 que los BRCA1 ($p=0,0001$; Tabla 4.4.3) y una menor expresión de CTSL nuclear ($p=0,0494$; Tabla 4.4.3).

Otro de los hallazgos interesantes del estudio fue que los tumores con mutación germinal en BRCA1 presentaron los niveles de VDR más bajos (mediana del H-score de VDR nuclear es 53, tabla 4.4.3), incluso más bajos que los TNBC (mediana del H-score de VDR nuclear es 110, tabla 4.4.1).

MARCADORES	Tipo de Mutación Germinal	H-score			p-valor (tumores con mutación germinal vs el resto) M-W	p-valor (BRCA1 vs. 2) M-W
		Media(SD)	Mediana (P25,P75)	Rango		
Catepsina L Citoplasmático	BRCA1 ⁽⁻⁴⁾	119 (34,2)	110 [100, 138]	60-190	0,0563	0,88
	BRCA2 ⁽⁻¹⁾	118 (17,2)	120 [100, 120]	100-150	0,0437	
Catepsina L Nuclear	BRCA1 ⁽⁻⁴⁾	38 (45,2)	30 [15, 45]	0-180	0,0001	0,0494
	BRCA2 ⁽⁻¹⁾	15 (22,7)	4 [0, 15]	0- 75	0,19	
53BP1	BRCA1 ⁽⁻¹⁾	111 (28,4)	115 [100, 125]	70-175	0,0016	0,0001
	BRCA2 ⁽⁻¹⁾	198 (43,6)	210 [185, 220]	110-270	0,0008	
VDR Citoplasmático	BRCA1	86 (38,5)	100 [50, 100]	0-150	0,0048	0,0011
	BRCA2 ⁽⁻³⁾	145 (36,7)	150 [115, 165]	100-200	<0,0001	
VDR Nuclear	BRCA1	66 (52,9)	53 [27, 100]	0-180	0,0010	0,0001
	BRCA2 ⁽⁻³⁾	175 (57,8)	170 [135, 193]	110-300	0,0074	

Tabla 4.4.3. Análisis IHQ de la expresión de CTSL, 53BP1 y VDR en tumores con mutaciones germinales en BRCA1 o BRCA2. Los valores son las medias y medianas del H-score nuclear y citoplasmático de cada marcador según si los tumores presentan la mutación BRCA1 o BRCA2. El rango se refiere al valor mínimo y máximo de cada marcador según el tipo de mutación germinal. La variabilidad es valorada por SD (desviación estándar) y por los percentiles 25 y 75 [P25; P75]. (-X) representa el número de resultados perdidos para cada tipo de mutación germinal debido a la insuficiencia de tejido. El p-valor en negrita muestra las diferencias significativas entre los tumores de cada subtipo de mutación germinal versus la población global de cáncer de mama o entre los tumores con mutación germinal en BRCA1 versus BRCA2, mediante el método de Mann-Whitney (M-W) (Grotsky et al, 2013).

A continuación, estudiamos el tipo de relación existente entre CTSL nuclear y 53BP1 en la cohorte de 249 pacientes de cáncer de mama. La **figura 4.4.2A** muestra la existencia de una correlación lineal inversa entre los H-scores nucleares de 53BP1 y CTSL en la cohorte de cáncer de mama con expresión positiva de CTSL nuclear. Sin embargo, este modelo sólo tiene un coeficiente de determinación del **6,6%**, indicando que hay un 93,4% de variabilidad de la disminución de 53BP1 que no puede ser explicada por el incremento de CTSL

nuclear. La identificación de estos dos marcadores nos permite discriminar el subgrupo de pacientes que recuperan la ReHo como mecanismo de reparación del ADN.

A continuación, proponemos un punto de corte para VDR nuclear, a partir del cual consideramos que VDR inhibe a CTSL y éste último no puede degradar a 53BP1. Los altos niveles de VDR nuclear pueden explicar la firma de tumores con altos H-scores de 53BP1 a pesar de presentar altos niveles de CTSL nuclear. En nuestros resultados, encontramos una correlación lineal directa entre los niveles de VDR y 53BP1 para los 249 pacientes con cáncer de mama (correlación de Pearson $r=0,238$; $p=0,0002$).

La **figura 4.4.2B** muestra la relación entre CTSL nuclear y 53BP1 considerando los niveles nucleares de VDR. En esta situación, encontramos una correlación inversa con una mayor pendiente de la regresión lineal de los H-scores nucleares de 53BP1 y CTSL. Cabe destacar que esta nueva relación analizada contempla aquellos tumores que presentaron una expresión de VDR nuclear inferior a 120 e incrementa el coeficiente de determinación de **6,6%** a un **29,2**.

Finalmente, la **figura 4.4.2C** muestra la correlación entre 53BP1 y CTSL estudiada exclusivamente en los TNBC, aunque no es estadísticamente significativa. Sin embargo, cuando nos centramos en la relación existente entre CTSL nuclear y 53BP1, sólo en los tumores TNBC con $VDR < 120$, se obtiene una correlación lineal inversa estadísticamente significativa ($p < 0,0027$) con un coeficiente de determinación del **80,2%**. Curiosamente, los casos que se escapan del modelo lineal, corresponden a pacientes TNBC con valores de VDR superiores a 120 que mantienen una alta expresión de 53BP1 a pesar de presentar altos niveles de CTSL nuclear, como se muestra en **la figura 4.4.2 E del panel de arriba**. Mientras que la **figura 2E del panel de abajo** muestra la firma que hemos determinado (bajos niveles de 53BP1 con altos niveles de CTSL y bajos niveles de VDR) en los TNBC y los tumores con mutación germinal en BRCA1. Además, las pacientes TNBC y deficientes en BRCA1 presentan una media de los H-scores nucleares de VDR más bajo que el resto (Tabla 4.3.1 y 4.3.3), sugiriendo que la pérdida de BRCA1 puede impedir la translocación de VDR al núcleo.

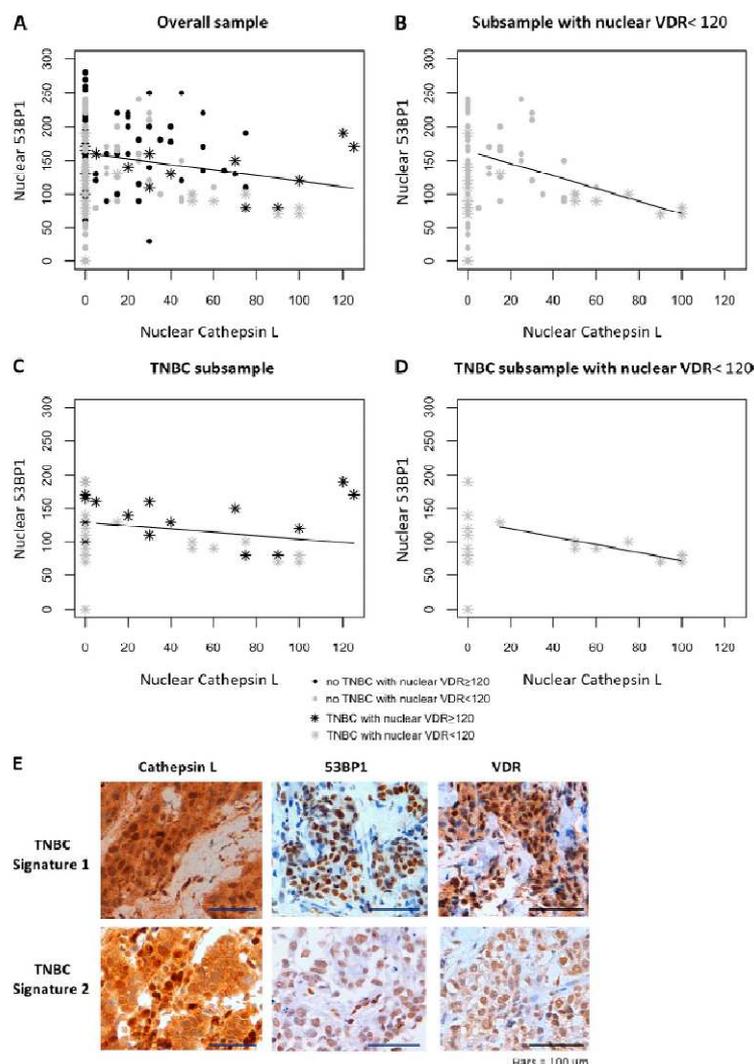


Figura 4.4.2. Correlación inversa entre la expresión de 53BP1 con CTSL nuclear en la cohorte de 249 pacientes de cáncer de mama. (A-D) Análisis de regresión lineal entre H-scores nucleares de 53BP1 y CTSL en los tumores de mama con H-scores de CTSL nuclear >0. Hay una alta variabilidad en los H-scores de 53BP1 en tumores sin CTSL nuclear. El análisis de la regresión lineal de la asociación nuclear entre 53BP1 y CTSL observado en: **A** (coeficiente de regresión lineal $r=-0,42$; $p=0,02$; coeficiente de determinación $r^2=6,6\%$); **B** ($r=-0,93$; $P=0,0025$; $r^2=29,2\%$) incluyendo todos los pacientes con $VDR < 120$; **C** ($r=-0,255$; $P=0,294$; $r^2=5,8$) incluyendo sólo los pacientes TNBC y **D** ($r=-0,89$; $P=0,0027$; $r^2=80,2\%$) incluyendo sólo los pacientes TNBC con $VDR < 120$). **(E)** Imágenes de los resultados del análisis inmunohistoquímico de TNBC, dónde se comprueba el efecto de VDR en la activación de CTSL para degradar 53BP1. El panel de arriba muestra la firma en TNBC de VDR nuclear alto, CTSL alto y 53BP1 alto. El panel de abajo muestra la firma en TNBC de VDR nuclear bajo, CTSL alto y 53BP1 bajo. Escala de Barra, 100 μm (Grotzky et al, 2013).

4.4.1. ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LA TRIPLE FIRMA (VDR, CTSL Y 53BP1) DE LOS TNBC CON LA RESPUESTA A LA QTN Y SLM.

En esta parte final del estudio, valoramos la expresión de estos 3 marcadores (VDR, CTSL y 53BP1) en el tumor primario de 22 pacientes TNBC tratados con QTN (Taxanos y Antraciclinas). Exploramos la posible relación existente de esta triple firma (que detecta a las pacientes TNBC resistentes a los inhibidores de PARP) con el grado de respuesta a la QTN y con la aparición de metástasis.

Primero, no encontramos una relación entre los TNBC que cumplían la triple firma (VDR<120, CTSL>0 y 53BP1<150) y el grado de respuesta a la QTN, tal como se muestra en la tabla 4.4.4. El 50% de las pacientes TNBC que expresaron la triple firma presentaron una buena respuesta a la QTN. En cambio, el 33% de las pacientes TNBC que expresaron dos o menos marcadores de esta firma obtuvieron una buena respuesta. Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas (p-valor=0,631).

Condiciones	N (%) Mala respuesta a QTN	N (%) Buena Respuesta a QTN	Prueba de Fisher P-valor
0, 1 o 2 marcadores	10 (67,0%)	5 (33,0%)	0,631
TRIPLE FIRMA VDR<120, CTSL nuclear>0 y 53BP1<150	3 (50%)	3 (50%)	

Tabla 4.4.4. Descripción del número de pacientes TNBC y de la frecuencia del tipo de respuesta obtenida de la QTN, según el número de marcadores que cumplen de la Triple Firma en los TNBC.

Segundo, no hallamos una relación entre los tumores primarios TNBC que cumplían la triple firma y la aparición de metástasis (tabla 4.4.5). El 50% de los TNBC que cumplieron la firma desarrollaron metástasis, mientras que el 33% de los que no la cumplieron presentaron metástasis. Sin embargo, estas diferencias tampoco eran significativas (p=0,4422).

Condiciones	N (%) NO METÁSTASIS	N (%) METÁSTASIS	Prueba de Fisher P-valor
0, 1 o 2 marcadores	10 (67,0%)	5 (33,0%)	0,4422
TRIPLE FIRMA VDR<120, CTSL nuclear>0 y 53BP1<150	5 (50%)	5 (50%)	

Tabla 4.4.5 Descripción del número de pacientes TNBC y de la frecuencia de metástasis según el número de condiciones cumplidas de la triple firma en los TNBC.

En resumen, este estudio preliminar demuestra que no existe una relación entre la expresión de esta triple firma (VDR<120, CTSL nuclear>0 y 53BP1<150) en los tumores primarios de TNBC y la resistencia a la QTN ni en la aparición de metástasis después del tratamiento.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN.

5.1. FIRMA DE PREDICCIÓN DEL TIPO DE RESPUESTA A LA QTN.

La supervivencia a cinco años en pacientes con cáncer de mama en Cataluña se situó en 2012 en el 91%, en un rango similar al de países de primer nivel como Francia o Estados Unidos (<http://www20.gencat.cat/portal/site/cancer/>). La mejora en las terapias para hacer frente a esta enfermedad ha sido el principal causante de las altas tasas de supervivencia o de la disminución de la mortalidad.

Un 15% – 20% de las pacientes de cáncer de mama presentan tumores mayores de 3,0cm de diámetro en el momento del diagnóstico. Estos tumores de estadios II y III de cáncer de mama representan uno de los retos clínicos más importantes, al precisar de la combinación del tratamiento quirúrgico y sistémico para el adecuado control de la enfermedad. En la década de los años 80, confluyeron dos factores que marcaron el rumbo para el tratamiento óptimo para estas pacientes. El primer factor fue la consolidación de la cirugía conservadora de la mama en tumores pequeños (inferiores a 3,0cm) y el segundo fue el establecimiento de la quimioterapia como arma eficaz para disminuir el riesgo de recaída y muerte (Peto et al, 2012).

Estos dos factores desencadenaron los primeros estudios planteando la QTN con el doble objetivo de mantener los beneficios en la supervivencia y permitir una disminución del tamaño tumoral final (*downstaging*) que permitiera mejorar las opciones de cirugía conservadora. Los primeros estudios randomizados permitieron confirmar la equivalencia en supervivencia de la QTN frente a los mismos esquemas en adyuvancia con incrementos muy significativos en las tasas de cirugía conservadora.

En los siguientes 30 años, la QTN se ha establecido como la terapia de elección en tumores con estadios II mayores de 3,0 cm y en todos los estadios III. Este paso ha contribuido a un tercer hallazgo, la determinación de la respuesta al tratamiento neoadyuvante, tanto clínica como patológica, como factores pronósticos de primer rango. De hecho, el grado de respuesta al

tratamiento preoperatorio predice la SG en términos de la SLE (Colleoni et al, 2009).

En este estudio, hemos identificado marcadores con valor predictivo y pronóstico en el tumor primario de mama, con la finalidad de elaborar dos firmas de predicción, una del grado de respuesta a Antraciclinas y Taxanos y la otra de la aparición de metástasis.

En primer lugar, hemos demostrado que la pequeña variabilidad introducida en el tratamiento de nuestra cohorte no ha influido con el tipo de respuesta obtenido. La mayoría de pacientes (80% aproximadamente) han recibido el tratamiento estándar basado en la administración secuencial de 6 a 8 ciclos de Antraciclinas y Taxanos. El 20% restante han recibido menos de 6 ciclos de QTN y sólo uno de los dos fármacos. Sin embargo, sólo se encontró una asociación significativa entre el tipo de respuesta al tratamiento y el número de agentes citotóxicos administrados, pero prescindimos de este factor, porque el hecho de recibir sólo uno de los fármacos, no era la causa del tipo de respuesta que tuvo la paciente, sino de la biología intrínseca del propio tumor. Las pacientes que recibieron sólo Antraciclinas presentaban un pronóstico muy desfavorable en el momento del diagnóstico, mientras que a las que se administró sólo Taxanos mostraron un pronóstico muy favorable. Además, los tumores de buen pronóstico tratados con Taxanos, nos sirvieron de control interno de nuestra firma predictiva de buena respuesta a QTN, ya que la mayoría de ellas, cumplieron con la segunda condición (4 o 5 marcadores) y obtuvieron una buena respuesta a la QTN.

A continuación, se correlacionó la expresión IHQ independiente de cada una de las 22 proteínas del estudio con el tipo de respuesta obtenida del tratamiento. Se encontró 14 marcadores independientes con su punto de corte con valor predictivo significativo ($p < 0.05$) para discriminar nuestra variable (tipo de respuesta a la QTN). Para algunos de estos marcadores, no se había demostrado anteriormente su valor predictivo como Catepsina L nuclear, ALDH-1, Ciclina D1 citoplasmático y FGFR citoplasmático.

Nuestra firma predictiva es una de las posibles múltiples combinaciones que podemos extraer con los 14 marcadores obtenidos. La selección de la

combinación de marcadores de nuestra firma se basa en 3 criterios: 1) obtener el mayor poder discriminativo del tipo de respuesta a la QTN (**OR=26,6**), 2) mantener la correlación entre la respuesta a la QTN y la firma molecular de forma significativa (**p=0,00004**) y 3) permitir explicar la máxima variabilidad de nuestra variable (**R²=55,4%**).

Tanto el tejido sano como el crecimiento tumoral necesitan de un equilibrio entre las vías de proliferación y de apoptosis. La quimioterapia actúa destruyendo aleatoriamente a las células tumorales que proliferan rápidamente mediante la activación de la apoptosis. En muchas ocasiones, una apoptosis defectuosa es probablemente la base de la quimioresistencia. Por esta razón, la identificación de biomarcadores clínicamente relevantes para cuantificar la apoptosis y la proliferación de los tumores de mama podría ser de gran valor pronóstico y predictivo (Colleoni et al, 2000; Engels et al, 2013).

La relevancia clínica de nuestra firma predictiva yace en la combinación de marcadores de la vía proliferativa (CTSL nuclear, HER4 citoplasmático y ALDH-1) conjuntamente con la vía intrínseca de la apoptosis (Bcl2 y Survivin). Además, cabe destacar que la segunda condición de esta firma identifica principalmente a **TNBC y HER2/RH-**; 7 de las 9 pacientes (**78%**) que respondieron bien a la QTN cumplieron la 2ª condición de la firma, pertenecían al subtipo molecular **TNBC y HER2/RH-**. Es ampliamente conocido que los TNBC y los Her2 son los que mejor responden a la QTN, porque son tumores de alto grado asociados a una elevada tasa de proliferación y apoptosis.

En nuestros resultados, los tumores de mama que presentaban una sobreexpresión de **Bcl-2** (65% de los tumores) y **Survivin** (20% de los tumores) no respondieron a la QT. Este hallazgo verifica dicha asociación de la resistencia a la QTN con el bloqueo de la vía intrínseca de la apoptosis.

Survivin es una proteína bifuncional implicada en la inhibición de la apoptosis (bloquea la activación de la caspasa-9) y la regulación de la mitosis (Andersen et al, 2007). Existe una gran discordancia en la interpretación de la tinción IHQ de la Survivin. Esta proteína se encuentra en diferentes zonas subcelulares (núcleo y citoplasma) y se desconoce la fracción que aporta más información (Rexhepaj et al, 2010). En nuestro estudio, evaluamos la tinción de ambas

fracciones subcelulares e incluso el ratio entre ellas, teniendo los 3 tipos de valoraciones un valor predictivo significativo individual. Sin embargo, la fracción citoplasmática es la que presentó un mayor valor predictivo en el proceso de la elaboración de la firma. Nuestros hallazgos con Survivin como marcador de respuesta a la QTN, corroboran estudios previos in vitro e in vivo que sugieren que una baja expresión de Survivin reduce el crecimiento tumoral y sensibiliza a las células tumorales a los fármacos como taxanos, agentes de platino, radiación gamma e inmunoterapia (Kelly et al, 2011).

Bcl-2 es una proteína que bloquea la apoptosis intrínseca, evitando la liberación del citocromo c mediante la regulación de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (Andersen et al, 2007). La expresión de Bcl-2 está vinculada con la resistencia de la QT, especialmente de las Antraciclinas (Cleator et al, 2002).

La expresión nuclear de **Catepsina L** presenta una función completamente distinta a la conocida en el citoplasma. En el 2004, se demostró que la catepsina L podía traducirse en una forma más corta, que se transporta al núcleo (Goulet et al, 2004; Goulet et al, 2007). Sólo un 36% de nuestros tumores expresaron catepsina L nuclear. Es curioso observar que el 74,6% de los tumores que no expresaron catepsina L nuclear no respondieron al tratamiento. La quimiosensibilidad que introduce la expresión nuclear de la Catepsina L en el tumor puede explicarse por las diferentes funciones que se le atribuyen en el núcleo. Una de ellas, es la degradación de 53BP1 (Gonzalez-Suarez et al, 2011), impidiendo la reparación de la rotura de la doble hélice del ADN por la vía de NHEJ. Por consiguiente, estas células sólo pueden reparar todos los daños de su ADN, causados por las Antraciclinas, mediante la vía de ReHo. Es posible que la célula, con sólo esta única vía de reparación funcional, más precisa pero más lenta que NHEJ, no pueda asumir la reparación de todos los daños producidos y tenga que entrar en apoptosis. Por otra parte, la catepsina L nuclear es la responsable del procesamiento proteolítico de CDP-Cux. CDP-Cux, que es un factor de transcripción que controla la expresión de genes en la fase S y promueve la proliferación celular de diferentes tipos de células (Goulet et al, 2007). Además, la mayoría de tumores que expresan Catepsina L nuclear son el subtipo TNBC (Grotsky et al, 2013). Por tanto, es

probable pensar que las células que presentan catepsina L nuclear son más proliferativas y quimiosensibles.

ALDH-1 es una enzima sobre-expresada en las células madre tumorales, las cuáles presentan la capacidad de iniciar y perpetuar el crecimiento tumoral (Deng et al, 2010). En nuestra cohorte se expresó en el 22% de los tumores, corroborando la frecuencia de expresión de esta enzima en el cáncer de mama publicado anteriormente. El ALDH-1 se encuentra expresado en el 30% de los tumores de mama y se correlaciona con la supervivencia clínica, el grado del tumor y la expresión de HER2 y de Ki67, pero no con el subtipo molecular (Currie et al, 2013). La expresión de ALDH-1 se encuentra en los tumores más proliferativos y más agresivos. En nuestros hallazgos hemos observado que los tumores que expresan ALDH-1 responden mejor al tratamiento, obteniendo un 59,1% de buenas respuestas respecto el 23,1% de los tumores sin ALDH-1.

La activación de la familia de los receptores de crecimiento epidermoide (EGFR) promueve la proliferación celular. Un hallazgo interesante de este estudio es haber encontrado HER3 y HER4 como valor predictivo de respuesta a la QTN, siendo dichos receptores los menos conocidos de la familia. En nuestros hallazgos, HER4 es el marcador con mayor poder discriminativo del tipo de respuesta al tratamiento de esta familia. El 67,1 % de nuestros tumores presentan una alta expresión citoplasmática de HER4. El 84% de los tumores que presentan una baja expresión de HER4 no respondieron a la QTN.

En resumen, nuestra firma predictiva para discriminar una buena respuesta al tratamiento estándar sería:

$CTSL \text{ nuclear} \geq 10 + HER4 \text{ cit} \geq 110 + Survivin \text{ Cit} < 75 + ALDH > 0 + Bcl2 < 25$

O en el caso de preferir discriminar una pobre respuesta al tratamiento estándar:

$CTSL \text{ nuclear} < 10 + HER4 \text{ cit} < 110 + Survivin \text{ Cit} \geq 75 + ALDH < 0 + Bcl2 \geq 25$

Un aporte muy interesante de la elaboración de esta firma predictiva es su simplificación en dos condiciones, aunque para ello, hemos tenido que suponer que los 5 marcadores tienen la misma importancia en la quimiosensibilidad,

restándole especificidad. Las pacientes que cumplen la segunda condición (4 o 5 marcadores) en el tumor primario presentan **26,6** veces más probabilidad de tener una buena respuesta a la QTN que las pacientes que cumplen la primera condición (3 o menos marcadores) (**p=0,0004**). Esta firma presenta una excelente sensibilidad del 100%, pero carece de una robusta especificidad (39%). Sería interesante validarla en una cohorte más grande e intentar ponderar sus marcadores para verificar si se puede mejorar su especificidad. Es evidente que no todos estos marcadores repercuten con la misma intensidad en la respuesta al tratamiento.

El coeficiente de determinación de nuestra firma predictiva es del **55,8%**, detectando 1 buena respuesta de cada 2. En nuestra cohorte de 69 pacientes, hemos identificado 9 buenas respuestas (13%) de las 23 existentes (20%). Por tanto, conseguimos explicar una variabilidad de más del 50% de la respuesta al tratamiento con la expresión de sólo 5 proteínas. Las firmas genéticas existentes en el cáncer de mama están formadas por más de 20 genes para obtener su elevada sensibilidad y especificidad. Por ejemplo, el Oncotype está constituido por 21 genes para predecir la probabilidad de recidiva local a 10 años. En conclusión, creemos que hemos hallado una primera parte de una firma predictiva muy interesante, pero necesitaría añadirle más marcadores que nos ayuden a mejorar el coeficiente de determinación y la especificidad de ésta.

Finalmente, comprobamos el valor pronóstico de nuestra firma predictiva que no está relacionada con la aparición de metástasis ($p=0,738$). En ella, se puede observar una tendencia de que las pacientes que cumplen la segunda condición de la firma son libres de metástasis a los 10 años de seguimiento. En cambio, la SLM a los 10 años en las pacientes que cumplen la primera condición es del 65%. A pesar de observar estas diferencias en las curvas de supervivencia, no son significativas estadísticamente ($p=0,22$). Esta firma no nos permite pronosticar la aparición de metástasis, debido a que hay tumores que no responden bien a la QTN (los luminales) pero que presentan un buen pronóstico de la enfermedad.

5.2. MARCADORES PREDICTIVOS SEGÚN LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES HORMONALES DEL TUMOR.

El cáncer de mama es uno de los carcinomas más heterogéneos. Actualmente, se sigue investigando para poderlo categorizar en subgrupos cada vez más pequeños según un valor pronóstico parecido y una misma sensibilidad a las dianas terapéuticas actuales para el desarrollo de tratamientos más eficaces. Por ese motivo, es importante encontrar marcadores específicos de los diferentes subtipos de cáncer de mama que nos permitan conocer la biología del tumor y su comportamiento clínico.

La primera gran división del cáncer de mama se basa en la expresión de los RH. La expresión de RE y PRG está vinculada con la quimioresistencia. Los tumores con RH positivos (los Luminales A, Luminales B y los Her2/RH+) son poco proliferativos y no suelen responder a la QTN. En cambio, los tumores con RH negativos (los TNBC y Her2/RH-) son muy proliferativos y suelen presentar un mayor número de RCp que los tumores con RH positivos (Cleator et al, 2002; Colleoni et al, 2000; Colleoni et al, 2009). A pesar de que las diferencias encontradas en nuestros resultados no son significativas, los tumores con RH negativos presentaron un **24%** de RCp respecto al **14%** de RCp de los tumores con RH positivos.

Es muy importante encontrar marcadores que nos ayuden a predecir el tipo de respuesta a la QT según la expresión de los RH. En este estudio, encontramos 5 marcadores predictivos de buena respuesta a la QTN para los tumores con ***RH negativos***: **HER4 citoplasmático ≥ 115** (OR=16,5); **p-Akt citoplasmático ≥ 110** (OR=7); **p-HER3 de membrana > 1** (OR=7), **ALDH-1 ≥ 5** (OR= 5) y **Ciclina D1 nuclear ≥ 95** (OR= 3,9).

En los ***tumores con RH positivos***, sólo se encontró un marcador predictivo interesante y con mucha repercusión clínica, Bcl-2.

Bcl-2 ≥ 25 (OR=0,13) es un marcador de resistencia a la QTN para los tumores con RH positivos. Estudios in vitro sugieren que la vía de los RE incrementa los niveles de **Bcl-2** que inducen la resistencia de Antraciclinas (Colleoni et al, 2000).

El resto de marcadores significativos obtenidos en el estudio no presentan relevancia clínica para las pacientes con RH positivos. El marcador predictivo de buena respuesta CTSL nuclear ≥ 10 (OR=3,5) sólo se encuentra en un 14% de los tumores con RH positivos, debido que es un marcador que se expresa principalmente en los TNBC. Lo mismo sucede con el marcador de buena respuesta, ALDH-1 (OR=6). ALDH-1 se encuentra mayormente en RH negativos. Sólo un 9% de tumores RH positivos expresan ALDH-1.

El hallazgo de **FGFR-2 citoplasmático** ≥ 115 (OR=0,18) como marcador predictivo de resistencia a la QTN en los tumores RH+ es difícil de explicar y necesita de un estudio más exhaustivo que apoye esta afirmación. Este resultado no se corrobora con la bibliografía previa, que describe que la activación principal de este receptor subyace en los TNBC, mientras que los Luminales presentan sobre-expresado FGFR-1 (Katoh & Nakagama, 2013). La principal función atribuida a este receptor es la inducción de la proliferación celular del tumor a través de la activación de su tirosina quinasa que promueve a su vez las vías de PI-3Quinasa/Akt, MAPK, apoptosis, angiogénesis, etc (Rebbeck et al, 2009). Sin embargo, FGFR-2 se le conoce una función dual: anti-proliferativa y proliferativa. La regulación de este efecto dual, no está muy claro, puede ser causado por una forma truncada del receptor debida principalmente por un polimorfismo de un solo nucleótido, suele encontrarse mayormente en los BRCA2 deficientes (Katoh & Katoh, 2009; Katoh & Nakagama, 2013).

Por último, los marcadores de resistencia a la QT como **RPG** ≥ 175 (OR=0,12) y **RE** ≥ 255 (OR=0,2) presentan un punto de corte muy elevado para el uso clínico, como ya se ha comentado anteriormente.

A continuación, hemos comparado la expresión de las 22 proteínas del estudio en los tumores con RH positivos versus negativos, con la finalidad de encontrar alguna asociación de alguna de las vía de señalización con la quimioresistencia de los tumores con RH positivos.

Tal y como ya he comentado anteriormente, la respuesta de la QT depende tanto de los cambios en la tasa proliferativa como en la tasa apoptótica del tumor. Los tumores con RH positivos se caracterizan por ser muy poco

proliferativos, como se refleja con su baja expresión de Ki67. Los agentes anti-mitóticos como los táxanos no pueden intervenir sobre los tumores que no entran en mitosis.

El RE es un factor de transcripción que regula muchos de los genes que promueven la proliferación y la supervivencia celular, como el regulador del ciclo celular ciclina D1 y el factor antiapoptótico Bcl-2 (Schiff et al, 2005). Nuestros hallazgos muestran que los tumores con RH positivos presentan muy poca activación de los miembros de la familia EGFR y de p-Akt. Por tanto, la baja proliferación de los tumores con RH positivos puede estar asociada a la escasa activación de la vía PI3-Quinasa/Akt/mTOR. En estudios anteriores, se encontró que los luminales A eran los tumores con menor actividad de la vía PI3-Quinasa, mientras que los TNBC y los Her2 eran los tumores con mayor actividad de esta vía (2012). Por otro lado, también se demostró que los tumores Basal-like presentaban la Ciclina E1 amplificada y ausencia de la expresión del Retinoblastoma, explicando la alta proliferación atribuida a estos tumores (2012). En coincidencia con este estudio, nosotros encontramos que los tumores con RH positivos presentan 3,5 veces menos expresión citoplasmática de pAkt y 1,6 veces más expresión de p27^{Kip1}. Además, los tumores RH positivos expresan 5 veces más Bcl-2 que los tumores RH negativos, bloqueando la vía intrínseca de la apoptosis. En definitiva, una explicación posible de la quimioresistencia de los tumores RH positivos podría ser la baja activación PI3-Quinasa/Akt/mTOR, la detención del ciclo celular en la fase G1 a través de p27^{Kip1} y el bloqueo de la vía intrínseca de la apoptosis por Bcl-2.

Por el contrario, la quimiosensibilidad de los tumores con RH negativos es consecuencia tanto de una elevada tasa proliferativa como apoptótica. Los tumores RH negativos presentan una elevada activación de la vía PI3Quinasa/Akt/mTOR (que tiene un papel clave en la oncogénesis, ya que interviene en las vías de proliferación celular, supervivencia y movilidad), una baja o casi nula expresión de Bcl-2 y una baja expresión de p27.

5.3. MARCADORES CON VALOR PRONÓSTICO DE LA SLM.

La identificación de marcadores con valor pronóstico para predecir la aparición de metástasis, en el momento del diagnóstico, supondrá un gran avance clínico para el tratamiento de cáncer de mama. Actualmente, la RCp es el mejor marcador predictivo de supervivencia aceptado incluso, por la FDA. Sin embargo, existe un grupo de pacientes (con elevados niveles de RH o bajos niveles de Ki67) que no responden a la QTN, pero que presentan el pronóstico más favorable de dicha enfermedad y no suelen desarrollar metástasis. Por tanto, es necesario determinar marcadores pronóstico específicos para predecir la supervivencia que sean independientes a la respuesta al tratamiento.

En nuestros resultados, hallamos marcadores pronóstico estadísticamente significativos que protegen del riesgo de la aparición de metástasis como: 53BP1>155 (OR=0,22); Bcl-2 >145 (OR=0,3), Ciclina D1 nuclear> 95 (OR=0,35); PTEN cit>65 (OR=0,243); PTEN nuc>65 (OR=0,24); RE>2,5 (OR=0,28); RPG>20 (OR=0,21) y HER4 mem>0 (OR=0,256).

Por otro lado, también encontramos marcadores que incrementan el riesgo de la aparición de metástasis como Catepsina L cit>230 (OR=12,4); HER4 nuc>20 (OR=3,81); VDR cit>95 (OR=3,24) y el ratio de Survivin cit/nuc>0,56 (OR=4,0).

A partir de estos marcadores, desarrollamos una firma de mal pronóstico compuesta por 3 marcadores para predecir la SLM en el tumor primario.

Ratio Survivin cit/nuc \geq 0,56 + VDR citoplasmático \geq 95 + HER4 membrana=0

La vitamina D, mediante su receptor (**VDR**), tiene un importante efecto anti-proliferativo, pro-diferenciación y pro-apoptótico. Por consiguiente, ejerce un efecto protector sobre el cáncer de mama (Ooi et al, 2010). Contrariamente, la deficiencia de vitamina D puede contribuir en la progresión de dicha patogénesis (Fuhrman et al, 2013). En nuestros hallazgos, hemos corroborado que el bloqueo de la translocación nuclear de VDR está relacionado con la progresión del cáncer, como se refleja con el valor de mal pronóstico de SLM que presenta la elevada expresión de VDR citoplasmático en el tumor primario (**OR=3,24; p=0,049**). Por consiguiente, es probable que los niveles en sangre de 25-hidroxivitamina D no sean un indicador suficiente para valorar los

adecuados niveles de vitamina D en la respuesta intratumoral, como se había dicho hasta ahora (Ooi et al, 2010). El bloqueo de la translocación de VDR al núcleo puede inducir los mismos efectos que la deficiencia de la vitamina D en suero que disminuye los niveles de VDR, promoviendo la aparición de metástasis.

El **ratio de la expresión entre el citoplasma y el núcleo de Survivin** superior a 0,56 en el momento del diagnóstico es un marcador de mal pronóstico (**OR=4; p=0,0135**) en cuanto a la aparición de metástasis. Este hallazgo está en concordancia con muchos estudios previos (Dedic Plavetic et al, 2013; Engels et al, 2013; Kelly et al, 2011), que también demostraron una asociación entre los altos niveles de expresión de Survivin con un mayor riesgo de quimioresistencia y de progresión del tumor en muchos tipos de tumores.

En el tumor primario, la activación del receptor HER4 en la membrana es un marcador de buen pronóstico (**OR=0,075; p=0,02**) de la aparición de metástasis. El valor pronóstico de la expresión de HER4 ha sido contradictorio en varios estudios pre-clínicos previos, de los cuáles unos demostraron que ejercía un efecto positivo o anti-tumoral (Junttila et al, 2000; Naresh et al, 2006), mientras que otros, lo marcaron de negativo o oncogénico (Rokicki et al, 2010; Sundvall et al, 2008). Esta ambivalencia de la función de HER4 se puede explicar por la existencia de 4 tipos distintos de transcripción de HER4 (JM-a/CYT1, JM-a/CYT2, JM-b/CYT1 y JM-b/CYT2). La actividad anti-tumoral o oncogénica de HER4 depende de la forma transcrita del receptor. La activación de las isoformas JM-a se ha demostrado que mejoran la SG y SLE de los TNBC y Her2 (Hollmen et al, 2012; Veikkolainen et al, 2011).

Esta firma de mal pronóstico, a pesar de sus limitaciones por su coeficiente de determinación del 36,4%, nos ofrece una interesante información en el momento del diagnóstico. Las pacientes que cumplan la segunda condición presentarán un riesgo de **14** veces mayor a desarrollar metástasis respecto a las pacientes de la primera condición (**p=0,001**), con una aceptable sensibilidad del 66,6% y una especificidad del 87,9%. Además, esa mayor probabilidad de desarrollar metástasis se traduce en una menor SLM a 10 años (**p=0,0006**), siendo del 85% para las pacientes que cumplían la primera condición (0 y 1

marcador) y del 35% para las que cumplían la segunda condición (2 y 3 marcadores).

Disponer del grado de respuesta a la QTN y la probabilidad del desarrollo de metástasis en el momento del diagnóstico, permitirá al clínico tener una información muy relevante para poder diseñar la estrategia terapéutica más adecuada para cada paciente.

Cabe destacar que Survivin y HER4 son los únicos marcadores que aparecieron en los dos modelos multivariantes propuestos en este trabajo. Las dos proteínas son marcadores con valor predictivo de QT y pronóstico de SLM. Por esta razón, son dos dianas muy atractivas para el diseño de nuevas terapias dirigidas.

5.4. DEGRADACIÓN DE 53BP1 MEDIANTE CATEPSINA L NUCLEAR EN LOS TNBC.

Los TNBC o deficientes en BRCA1 son considerados el subtipo molecular más agresivo y difícil de tratar en cáncer de mama. Estos tumores presentan deficiencias en la reparación del ADN y carecen de firmas moleculares para predecir la ausencia de la reparación de daños en el ADN (Foulkes et al, 2010).

La pérdida de la función de BRCA1 y la disminución de los niveles de 53BP1 son dos factores de gran relevancia que condicionan a la célula en la decisión del mecanismo más adecuado de reparación de la rotura de la doble hebra: ReHo (Recombinación Homóloga) o NHEJ (Recombinación No Homóloga) (Bouwman et al, 2010). En las células sin BRCA1, 53BP1 promueve una excesiva NHEJ que ocasiona un caos cromosómico catastrófico para la célula. Sin embargo, las células sin BRCA1 que también pierden a 53BP1, pueden proseguir con la ReHo.

Se ha demostrado que la pérdida de 53BP1 permite que las células deficientes en BRCA1, que sobrevivan y sean resistentes a las estrategias terapéuticas dirigidas a provocar daños en el ADN (Bothmer et al, 2010; Bouwman et al, 2010; Bunting et al, 2010; Cao et al, 2006). Por consiguiente, la estabilización

de los niveles de 53BP1 parece ser una interesante estrategia para tratar a los TNBC.

Este estudio demuestra una fuerte asociación negativa estadísticamente significativa entre los bajos niveles de 53BP1 y los altos niveles de CTSL (Catepsina) nuclear en los TNBC y en los tumores con mutaciones germinales de BRCA1, pero sólo cuando los niveles nucleares del receptor de la vitamina D (VDR) son bajos. La CTSL nuclear no es el único mecanismo de degradación de 53BP1 en las células deficientes de BRCA1, pueden existir otros como la vía proteosómica.

Esta correlación inversa entre 53BP1 y CTSL, sólo se encuentra en situaciones sin BRCA1, contribuye a la progresión del cáncer de mama. Por ello, la eliminación de CTSL nuclear o la inhibición de su actividad podría ser una interesante diana terapéutica dirigida a estabilizar los niveles de 53BP1. Los niveles estables de 53BP1 incrementan la inestabilidad genómica e incrementa la sensibilidad de los tumores TNBC al tratamiento de radioterapia o inhibidores de PARP. En consecuencia, una nueva estrategia terapéutica para el cáncer de mama de los TNBC podría ser la inhibición de CTSL nuclear, mediante un tratamiento de vitamina D (que induce la transcripción del inhibidor natural de CTSL, la Cistatina D) o con agentes inhibidores de CTSL (Gonzalez-Suarez et al, 2011). Además, con nuestra Triple firma en los TNBC, hemos reafirmado esta función poco conocida del receptor de **la vitamina D**. La forma nuclear de VDR actúa como factor transcripción de la Cistatina D, que es un inhibidor de CTSL. (Alvarez-Diaz et al, 2010; Alvarez-Diaz et al, 2009). Sólo existe una fuerte correlación negativa entre los bajos niveles de 53BP1 y los altos niveles de CTSL nuclear cuando hay una escasa expresión de VDR y no se inhibe la actividad de CTSL mediante la Cistatina. Curiosamente, hallamos que los tumores con mutación germinal en BRCA1 eran los que presentaban los niveles más bajos de VDR. Este hallazgo se corrobora con estudios previos que asocian a los TNBC con una deficiencia severa de la vitamina D (Peppone et al, 2011). Por ese motivo, los TNBC no pueden inhibir la actividad de CTSL nuclear con la Cistatina. (Ver en **anexo 4**, el mecanismo detallado de 53BP1, CTSL y VDR en células deficientes de BRCA1 sometidas a radioterapia o inhibidores de PARP).

Finalmente, hemos demostrado, en un pequeño estudio preliminar, que esta Triple Firma, que predice la resistencia a los inhibidores de PARP, no parece estar relacionada con la resistencia a la QTN ni tampoco con la aparición de metástasis después del tratamiento en los TNBC.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

PRIMERA Todos los biomarcadores estudiados en esta tesis necesitan un punto de corte óptimo para obtener su máximo poder discriminativo de la variable de estudio, validado por una metodología estadística adecuada, en relación con los objetivos planteados.

SEGUNDA Los biomarcadores con valor predictivo de **buena respuesta** a la quimioterapia neoadyuvante (QTN) del análisis univariante, en el tumor primario de mama, son ALDH-1 \geq 0 (OR =5,77); Catepsina L nuclear \geq 10 (OR=2,94); Her4 citoplasmático \geq 110 (OR=4,91); p-Akt citoplasmático \geq 135 (OR=5,00); p-HER3 membrana \geq 1 (OR=3,47); Survivin nuclear \geq 115 (OR=3,61) y Ki67 \geq 40 (OR=2,29).

TERCERA Los biomarcadores con valor predictivo de **resistencia** a la QTN del análisis univariante, en el tumor primario de mama, son Bcl-2 \geq 25 (OR=0,25); Ciclina D1 citoplasmático \geq 110 (OR=0,22); FGFR citoplasmático \geq 115 (OR=0,36); Survivin citoplasmático \geq 70 (OR=0,19); RE \geq 255 (OR=0,21) y RPG (OR=0,15).

CUARTA La **firma molecular predictiva de buena respuesta** a la QTN del análisis multivariante, en el tumor primario de mama, está constituida por Catepsina L nuclear \geq 10; Her4 citoplasmático \geq 110; Survivin citoplasmático $<$ 70; ALDH-1 \geq 0 y Bcl-2 $<$ 25 ($R^2= 55,4$; OR=16,6; una sensibilidad= 100% y una especificidad= 39%).

QUINTA Los biomarcadores con valor predictivo de **buena respuesta** a la QTN del análisis univariante asociados a tumores con RH negativos (TNBC y HER2-RH-) son ALDH \geq 5 (OR=4,96); Ciclina D1 \geq 90 (3,86); Her 4 citoplasmático \geq 110 (16,5); pAkt citoplasmático \geq 110 (OR=7) y pHer3 membrana \geq 1 (OR=7).

SEXTA El único biomarcador asociado a la **resistencia** a la QTN en el análisis univariante en tumores con RH positivos (Luminales y HER2+RH+) es Bcl-2 \geq 25 (OR=0,13).

SÉPTIMA Los biomarcadores de **buen pronóstico de Supervivencia Libre de Metástasis (SLM)** del análisis univariante en el tumor primario de mama son 53BP1>155 (OR=0,216); Bcl-2 > 145 (OR=0,3), Ciclina D1 nuclear> 95 (OR=0,35); PTEN cit> 65 (OR=0,243); PTEN nuc>65 (OR=0,24); RE> 2,5 (OR=0,28); RPG >20 (OR=0,21) y HER4 mem>0 (OR=0,26).

OCTAVA Los biomarcadores de **mal pronóstico de SLM** del análisis univariante en el tumor primario de mama son Catepsina L citoplasmático> 230 (OR=12,4); HER4 nuclear>20 (OR=3,81); VDR citoplasmático>95 (OR=3,24) y el ratio de Survivin cit/nuc>0,56 (OR=4,0).

NOVENA *La firma molecular de mal pronóstico de SLM* del análisis multivariante, en el tumor primario de mama, está constituida por el ratio de Survivin cit/nuc≥0,56, VDR cit≥95 y HER4 mem=0 ($R^2=36,4$; OR=14,6; Sensibilidad= 66,6% y Especificidad=87,9%).

DÉCIMA Los únicos biomarcadores asociados a ambos modelos multivariantes, es decir, con valor predictivo de respuesta y pronóstico de SLM en el tumor primario son **HER4 y Survivin**.

DECIMOPRIMERA La resistencia a la QTN en los tumores con RH positivos está asociada a la baja expresión de las proteínas implicadas en la vía PI3-Quinasa/Akt/mTOR (familia HER2 y Akt), al bloqueo de la apoptosis de la vía intrínseca (Bcl-2) y al freno del ciclo celular en la fase G1 (p27).

DECIMOSEGUNDA Los tumores TNBC o con mutación germinal en BRCA1 presentan una **asociación lineal inversa** entre la expresión de 53BP1 y la expresión nuclear de Catepsina L, sólo cuando les acompaña una baja expresión nuclear de VDR ($R^2=80,2\%$; $p=0,0027$).

DECIMOTERCERA La respuesta a la QTN ($p=0,63$) y la SLM ($p=0,44$) en los tumores TNBC no está relacionada con la *asociación lineal inversa* entre 53BP1 y Catepsina L acompañada de una baja expresión nuclear de VDR.

ANEXOS

7. ANEXOS

7.1. ANEXO 1: Descripción de los métodos inmunohistoquímicos realizados con los anticuerpos estudiados.

Anticuerpo	Tipo Ac	Clon	Compañía	Recuperación antigénica 95°C 20min	Linker	Dilución	Tiempo de incubación	Control
53BP1	PaB	NB100-304	Novus Biologicals	Low		1/2500	20 min	Normal Próstata
ALDH-1	MaB	44	BD Transduction Laboratories	Low		1/100	20 min	Carcinoma de Pulmón
Bcl-2	MaB	124	DAKO	High		1/1	33 min	Normal Amígdala
Captarina L	PaB	S-20	Santa Cruz Biotechnology	High		1/50	toda la noche 4°C	Carcinoma de Vejiga
CICLINA D1	MaB	EP12	DAKO	Low	Conejo 15 min	1/1	30 min	Linfoma del Manto
CK 5/6	MaB	D5/16 B4	DAKO	High		1/1	20 min	Normal Amígdala
E-cadherina	MaB	NCH-38	DAKO	High		1/1	20 min	Carcinoma Colorectal
EGFR	MaB	2-18C9	Kit DAKO	Proteína Quinasa		1/1	30 min	Celular del Kit
RE	MaB	1D5	DAKO	High		1/1	25 min	Normal de Mama
FGFR2	MaB	ab58201	ABCAM	Low	Ratón 15 min	1/200	15 min	Carcinoma Intestinal
GATA-3	MaB	HG3-31	Santa Cruz Biotechnology	High		1/50	30 min	Normal Amígdala
HER 2	MaB		Kit DAKO	97 °C 40 min Tampón específico para HER2		1/1	30 min	Celular perteneciente al Kit
HER 4	PaB	RB-9045	Thermo Scientific	High	Conejo 15 min	1/2	35 min	Control de Her2
KI67	MaB	MIB-1	DAKO	Low		1/1	20 min	Normal Amígdala
p27 ^{KIP}	MaB	SX53G8	DAKO	Low	Ratón 15 min	1/100	30 min	Normal Amígdala
p65	PaB	c-20	Santa Cruz Biotechnology	High	Conejo 15 min	1/600	20 min	Normal Amígdala

Anexos

pAKT	MaB	736E11	Cell Signaling	Low	Conejo 20 min	1/50	toda la noche 4°C	Carcinoma Próstata
pHER3	MaB	21D3	Cell Signaling	High		1/200	40 min	Control de Her2
RPG	MaB	PgR 636	DAKO	High		1/1	25 min	Normal de Mama
PTEN	MaB	6H2.1	DAKO	High	Ratón15 min	1/50	40 min	Carcinoma de Enometrio
SURVIVIN	MaB	D-8	Santa Cruz Biotechnology	Low	Ratón 15 min	1/50	toda la noche 4°C	Carcinoma Colorectal
VDR	PaB	ab3508	ABCAM	Low	Conejo 15 min	1/2000	20 min	Normal de Riñon

7.2. ANEXO 2: Estadiaje

El estadiaje del carcinoma de mama es el TNM publicado por American Joint Committee on Cancer (AJCC)/ Union for International Cancer Control (UICC) del 2002. El TNM contiene información sobre la extensión del cáncer en lugar primario (tumor o T), los nódulos linfáticos regionales (nódulos o N) y la diseminación de lugares metastáticos distantes (metástasis o M)(Lakhani et al, 2012).

La descripción del estadiaje después de recibir un tratamiento neoadyuvante se identifica como **ypTNM**.

1) El *pT* (Tamaño del tumor primario patológico) se clasifica en:

TX: el tumor primario no puede ser valorado.

T0: no hay evidencia del tumor primario.

Tis: Carcinoma in situ.

T1: el tumor primario es ≤ 2 cm.

T2: el tumor primario es entre 2 y 5 cm.

T3: el tumor primario es mayor de 5 cm.

T4: el tumor primario cualquier tamaño que se extiende hacia la pared de la mama y/o piel.

2) El *pN* (Valoración patológica de Nódulos) se clasifica en:

Nx: no se ha podido estudiar los nódulos.

N0: ganglios sin metástasis.

N1: metástasis de 1 a 3 ganglios axilares y/o de la cadena mamaria interna.

N2: metástasis de 4 a 9 ganglios axilares y/o de la cadena mamaria interna.

N3: metástasis de 10 o más ganglios axilares y/o de la cadena mamaria interna.

3) La pM (Metástasis valorada por el patólogo) se clasifica en:

M0: No hay metástasis.

M1: Metástasis.

Para los pacientes individualmente, esta información es muy importante para tomar decisiones respecto el control local de la enfermedad y la valoración de la terapia sistémica. La determinación del estadio del tumor es esencial para organizar grupos de pacientes similares a nivel clínico para la comparación en ensayos clínicos, estudios epidemiológicos u otro tipo de investigaciones (Lakhani et al, 2012).

A partir del ypTNM que determina el patólogo se clasifica el estadio clínico del paciente que se agrupa en:

ESTADIO	T	N	M
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio IA	T1	N0	M0
Estadio IB	T0,T1	N1 mi	M0
Estadio IIA	T0,T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Estadio IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estadio IIIA	T0, T1, T2	N2	M0
	T3	N1,N2	M0
Estadio IIIB	T4	N0,N1,N2	M0
Estadio IIIC	Cualquier T	N3	M0
Estadio IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

7.3.ANEXO 3: Descripción de los resultados IHQ obtenidos de cada anticuerpo en la cohorte de estudio (N=115).

H-score					
Anticuerpo	Nº casos perdidos	Media	Mediana	Mínimo	Máximo
<i>53BP1 nuclear</i>	9	143,4	142.5	0	300
<i>ALDH-1 nuclear</i>	14	6,49	0	0	100
<i>BCL-2 nuclear</i>	21	109,5	115	0	300
<i>Catepsina L citoplasmática</i>	3	150,4	145	70	230
<i>Catepsina L nuclear</i>	3	18,98	0	0	170
<i>Ciclina D1 citoplasmática</i>	9	39,43	10	0	180
<i>Ciclina D1 nuclear</i>	9	111,7	105	0	270
<i>Citoqueratina 5/6</i>	25	24,54	0	0	300
<i>E-cadherina membrana*</i>	33	2,48	3	0	3
<i>E-caherina citoplasmática</i>	33	149,8	160	0	250
<i>EGFR membrana*</i>	31	0,46	0.0	0	3
<i>FGFR-2 citoplasmática</i>	33	119,1	105	0	300
<i>FGFR-2 nuclear</i>	33	38,3	0	0	300
<i>HER-4 membrana*</i>	35	0,65	1	0	3
<i>HER-4 citoplasmática</i>	35	134,6	130	20	215
<i>HER-4 nuclear</i>	35	11,6	0	0	75
<i>P27^{Kip1} nuclear</i>	19	104,3	100	0	280
<i>P65 citoplasmática</i>	27	182,4	190	50	300

<i>P65 nuclear</i>	27	31	20	0	180
<i>pAKt citoplasmática</i>	21	54,4	45	0	200
<i>pAKt nuclear</i>	21	87,9	90	0	230
<i>pHER-3 membrana*</i>	22	0,46	0	0	2
<i>pHER-3 nuclear</i>	22	36,8	0	0	285
<i>PTEN citoplasmático</i>	21	161,9	165	0	300
<i>PTEN nuclear</i>	21	155,3	150	0	300
<i>Survivin Citoplasmática</i>	25	46,1	50	0	200
<i>Survivin nuclear</i>	25	123,1	120	0	260
<i>VDR citoplasmática</i>	12	41,1	50	0	170
<i>VDR nuclear</i>	12	114,7	110	0	260
<i>HER 2 membrana*</i>	3	1,48	1	0	3
<i>RE nuclear</i>	0	130,6	150	0	300
<i>RPG nuclear</i>	0	81,7	0	0	300
<i>Ki67 nuclear (%)</i>	1	40,9	35,5	0	97

La mayoría de los anticuerpos se ha valorado por H-score (0-300).

*los anticuerpos localizados en la membrana se han valorado en 0,1, 2 o 3.

Ki67 está valorado por el porcentaje de núcleos teñidos sin tener en cuenta la intensidad de la tinción (0-100%).

7.4. ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN ENTRE DEL PORCENTAJE DEL CAMBIO DEL TAMAÑO TUMORAL Y EL ESTADIO DEL TUMOR RESIDUAL.

En esta parte del estudio, se pretende comprobar si nuestro criterio para separar el grado de respuesta a la QTN basado en el estadio del tumor residual se ajusta con el porcentaje de cambio de tamaño tumoral debido a la QTN y con la clasificación de Miller-Payne. La tabla 7.1 muestra que la mayoría de las pacientes del estadio 0 o I del tumor residual experimentaron una reducción tumoral de más del 65%, mientras que la mayoría de las pacientes del estadio II o III presentaron una reducción del tumor inferior al 65%.

Porcentaje de reducción tumoral	ypTNM				Total
	0	I	II	III	
≤65%	0	6	31	25	62
>65%	22	12	14	4	52
Total	22	18	45	29	114

Tabla 7.1 Distribución de la cohorte según su estadio del tumor residual y el porcentaje de reducción del tumor después de recibir la QTN.

En definitiva, el 85% de las pacientes con estadio 0 y I presentaron una buena respuesta a la QTN, definida por la reducción tumoral de más del 65%. En cambio, las pacientes con estadio II y III obtuvieron una mala respuesta a la QTN.

ypTNM	Buena Respuesta QTN	Mala Respuesta QTN
	>65% reducción Tumoral	≤65% reducción Tumoral
0- I	34 (85%)	6 (15%)
II -III	18 (24,3%)	56 (75,7%)

Tabla 7.2. Comparación de la Buena o Mala Respuesta a la QTN entre las pacientes del estadio 0-I versus II-III.

A continuación, comparamos el criterio de Miller-Payne con el estadio del tumor residual, comprobando si clasifican las pacientes de nuestra cohorte de manera similar. Tal como vemos en la tabla 7.3, la clasificación es muy parecida excepto por 9 pacientes que el Miller-Payne considera de grado 4 (buena respuesta), mientras que AJCC las clasifica en en estadio II y III (mala respuesta). Esta divergencia es debida a que el Miller-Payne no tiene en cuenta la afectación ganglionar de las pacientes. Estas pacientes presentan un tumor residual inferior a 2 cm pero con afectación ganglionar, lo que supondrá una reducción de SLP. Sin embargo, conocer el grado de Miller-Payne de las pacientes nos ha permitido corroborar que los estadios 0 del tumor residual coincidían con el grado 5 del Miller-Payne, pudiendo afirmar que habían hecho una RCp.

MILLER-PAYNE	ypTNM				Total
	0	I	II	III	
Desconocido	0	0	2	1	3
1	0	3	19	12	34
2	0	3	5	2	10
3	1	7	14	10	32
4	2	2	5	4	13
5	19	3	0	0	22
TOTAL	21	18	46	29	114

7.3. Comparación del Miller- Payne versus el AJCC (estadio del tumor residual). El número de pacientes de color rojo son los que no coinciden en las dos clasificaciones.

La clasificación Miller-Payne es una de las más utilizadas, consta de 5 grados histológicos:

- Grado 1: Cambios celulares mínimos o sin reducción de la densidad celular.
- Grado 2: Disminución discreta de la cantidad de células tumorales infiltrante inferior al 30% de la masa tumoral.
- Grado 3: Reducción de las células tumorales entre 30- 90% de la masa tumoral.

- Grado 4: Marcada desaparición de células tumorales (más del 90%), quedando grupos pequeños de células o células individuales ampliamente dispersadas.
- Grado 5: Ausencia de células tumorales, quedando estroma fibro-elástico vascular. Puede estar represente carcinoma ductal in situ.

Los grados de 1 a 4 son las categorías de la respuesta patológica parcial y el grado 5 se refiere a la respuesta patológica completa (Ogston et al, 2003).

7.5. Artículo sobre la degradación de 53BP1 en células tumorales de mama.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

- (1998) Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* **352**: 930-942
- (2005) Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* **365**: 1687-1717
- (2012) Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **490**: 61-70
- Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE, Bell JA, Rampaul RS, Blamey RW, Robertson JFR, Nicholson RI, Ellis IO (2004) Expression and co-expression of the members of the epidermal growth factor receptor (EGFR) family in invasive breast carcinoma. In *Br J Cancer* Vol. 91, pp 1532-1542.
- Alvarez-Diaz S, Larriba MJ, Lopez-Otin C, Munoz A (2010) Vitamin D: Proteases, protease inhibitors and cancer. *Cell Cycle* **9**: 32-37
- Alvarez-Diaz S, Valle N, Garcia JM, Pena C, Freije JM, Quesada V, Astudillo A, Bonilla F, Lopez-Otin C, Munoz A (2009) Cystatin D is a candidate tumor suppressor gene induced by vitamin D in human colon cancer cells. *J Clin Invest* **119**: 2343-2358
- Aly A, Ganesan S (2011) BRCA1, PARP, and 53BP1: conditional synthetic lethality and synthetic viability. *J Mol Cell Biol* **3**: 66-74
- Andersen MH, Svane IM, Becker JC, Straten PT (2007) The universal character of the tumor-associated antigen survivin. *Clin Cancer Res* **13**: 5991-5994
- Ascunce N, Ederria M, Barcos A. (2007) Situación del cribado del cáncer de mama en España, características y principales resultados de los programas existentes. Madrid: Agencia d'avaluació detecnologia i recerca medica de Catalunya.
- Badve S, Collins NR, Bhat-Nakshatri P, Turbin D, Leung S, Thorat M, Dunn SE, Geistlinger TR, Carroll JS, Brown M, Bose S, Teitell MA, Nakshatri H (2010) Subcellular localization of activated AKT in estrogen receptor- and progesterone receptor-expressing breast cancers: potential clinical implications. *Am J Pathol* **176**: 2139-2149
- Bear HD, Anderson S, Smith RE, Geyer CE, Jr., Mamounas EP, Fisher B, Brown AM, Robidoux A, Margolese R, Kahlenberg MS, Paik S, Soran A, Wickerham DL, Wolmark N (2006) Sequential preoperative or postoperative docetaxel added to preoperative doxorubicin plus cyclophosphamide for operable breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol* **24**: 2019-2027
- Berry DA, Cirincione C, Henderson IC, Citron ML, Budman DR, Goldstein LJ, Martino S, Perez EA, Muss HB, Norton L, Hudis C, Winer EP (2006) Estrogen-receptor status and outcomes of modern chemotherapy for patients with node-positive breast cancer. *Jama* **295**: 1658-1667
- Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE, Wesseling J, Cheang MC, Gelmon K, Nielsen TO, Blomqvist C, Heikkila P, Heikkinen T, Nevanlinna H, Akslen LA, Begin LR, Foulkes WD, Couch FJ, Wang X, Cafourek V, Olson JE, Baglietto L, Giles GG, Severi G, McLean CA, Southey MC, Rakha E, Green AR, Ellis IO, Sherman ME, Lissowska J, Anderson WF, Cox A, Cross SS, Reed MW, Provenzano E, Dawson SJ, Dunning AM, Humphreys M, Easton DF, Garcia-Closas M, Caldas C, Pharoah PD, Huntsman D (2010)

- Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med* **7**: e1000279
- Bothmer A, Robbiani DF, Feldhahn N, Gazumyan A, Nussenzweig A, Nussenzweig MC (2010) 53BP1 regulates DNA resection and the choice between classical and alternative end joining during class switch recombination. *J Exp Med* **207**: 855-865
- Bouwman P, Aly A, Escandell JM, Pieterse M, Bartkova J, van der Gulden H, Hiddingh S, Thanasoula M, Kulkarni A, Yang Q, Haffty BG, Tommiska J, Blomqvist C, Drapkin R, Adams DJ, Nevanlinna H, Bartek J, Tarsounas M, Ganesan S, Jonkers J (2010) 53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 688-695
- Brennan DJ, O'Connor DP, Rexhepaj E, Ponten F, Gallagher WM (2010) Antibody-based proteomics: fast-tracking molecular diagnostics in oncology. *Nat Rev Cancer* **10**: 605-617
- Bunting SF, Callen E, Wong N, Chen HT, Polato F, Gunn A, Bothmer A, Feldhahn N, Fernandez-Capetillo O, Cao L, Xu X, Deng CX, Finkel T, Nussenzweig M, Stark JM, Nussenzweig A (2010) 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell* **141**: 243-254
- Burstein H, Harris J, Morrow M (2008) *Malignant Tumors on the breast*. In: de Vita , Hellman, Rosemberg, editors. *Cancer : Principles & Practice of Oncology*: 8^a ed. . Philadelphia: Lippincott-Williams.
- Callagy G, Cattaneo E, Daigo Y, Happerfield L, Bobrow LG, Pharoah PD, Caldas C (2003) Molecular classification of breast carcinomas using tissue microarrays. *Diagn Mol Pathol* **12**: 27-34
- Cao L, Kim S, Xiao C, Wang RH, Coumoul X, Wang X, Li WM, Xu XL, De Soto JA, Takai H, Mai S, Elledge SJ, Motoyama N, Deng CX (2006) ATM-Chk2-p53 activation prevents tumorigenesis at an expense of organ homeostasis upon Brca1 deficiency. *Embo j* **25**: 2167-2177
- Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, Ollila DW, Sartor CI, Graham ML, Perou CM (2007) The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res* **13**: 2329-2334
- Carey LA, Metzger R, Dees EC, Collichio F, Sartor CI, Ollila DW, Klauber-DeMore N, Halle J, Sawyer L, Moore DT, Graham ML (2005) American Joint Committee on Cancer tumor-node-metastasis stage after neoadjuvant chemotherapy and breast cancer outcome. *J Natl Cancer Inst* **97**: 1137-1142
- Charpin C, Tavassoli F, Secq V, Giusiano S, Villeret J, Garcia S, Birnbaum D, Bonnier P, Lavaut MN, Boubli L, Carcopino X, Iovanna J (2012) Validation of an immunohistochemical signature predictive of 8-year outcome for patients with breast carcinoma. *Int J Cancer* **131**: E236-243
- Chaudhry P, Asselin E (2009) Resistance to chemotherapy and hormone therapy in endometrial cancer. *Endocr Relat Cancer* **16**: 363-380

- Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO (2009) Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* **101**: 736-750
- Chekhun VF, Lukyanova NY, Kovalchuk O, Tryndyak VP, Pogribny IP (2007) Epigenetic profiling of multidrug-resistant human MCF-7 breast adenocarcinoma cells reveals novel hyper- and hypomethylated targets. *Mol Cancer Ther* **6**: 1089-1098
- Clarke M, Collins R, Darby S, Davies C, Elphinstone P, Evans E, Godwin J, Gray R, Hicks C, James S, MacKinnon E, McGale P, McHugh T, Peto R, Taylor C, Wang Y (2005) Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* **366**: 2087-2106
- Cleator S, Parton M, Dowsett M (2002) The biology of neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Endocr Relat Cancer* **9**: 183-195
- Colleoni M, Minchella I, Mazzarol G, Nole F, Peruzzotti G, Rocca A, Viale G, Orlando L, Ferretti G, Curigliano G, Veronesi P, Intra M, Goldhirsch A (2000) Response to primary chemotherapy in breast cancer patients with tumors not expressing estrogen and progesterone receptors. *Ann Oncol* **11**: 1057-1059
- Colleoni M, Viale G, Goldhirsch A (2009) Lessons on responsiveness to adjuvant systemic therapies learned from the neoadjuvant setting. *Breast* **18 Suppl 3**: S137-140
- Currie MJ, Beardsley BE, Harris GC, Gunningham SP, Dachs GU, Dijkstra B, Morrin HR, Wells JE, Robinson BA (2013) Immunohistochemical analysis of cancer stem cell markers in invasive breast carcinoma and associated ductal carcinoma in situ: relationships with markers of tumor hypoxia and microvasculature. *Hum Pathol* **44**: 402-411
- Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, Clarke M, Cutter D, Davies C, Ewertz M, Godwin J, Gray R, Pierce L, Whelan T, Wang Y, Peto R (2011) Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet* **378**: 1707-1716
- De Vita V, Hellmann S, Rosenberg SA (2006) *Cancer Principles & Practice of oncology*, 9th ed. edn.: Lippincott Williams & Wilkins.
- Dedic Plavetic N, Jakic-Razumovic J, Kulic A, Vrbancic D (2013) Prognostic value of proliferation markers expression in breast cancer. *Med Oncol* **30**: 523
- Deng S, Yang X, Lassus H, Liang S, Kaur S, Ye Q, Li C, Wang LP, Roby KF, Orsulic S, Connolly DC, Zhang Y, Montone K, Butzow R, Coukos G, Zhang L (2010) Distinct expression levels and patterns of stem cell marker, aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1), in human epithelial cancers. *PLoS One* **5**: e10277
- Do K, Chen AP (2013) Molecular pathways: targeting PARP in cancer treatment. *Clin Cancer Res* **19**: 977-984
- Engels CC, Ruberta F, de Kruijf EM, van Pelt GW, Smit VT, Liefers GJ, Matsushima T, Shibayama M, Ishihara H, van de Velde CJ, Kuppen PJ (2013) The prognostic value of apoptotic and proliferative markers in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **142**: 323-339

- Engstrom MJ, Opdahl S, Hagen AI, Romundstad PR, Akslen LA, Haugen OA, Vatten LJ, Bofin AM (2013) Molecular subtypes, histopathological grade and survival in a historic cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* **140**: 463-473
- Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NM, Jackson SP, Smith GC, Ashworth A (2005) Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* **434**: 917-921
- Feng L, Fong KW, Wang J, Wang W, Chen J (2013) RIF1 counteracts BRCA1-mediated end resection during DNA repair. *J Biol Chem* **288**: 11135-11143
- Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E (2010) Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* **46**: 765-781
- Ferretti LP, Lafranchi L, Sartori AA (2013) Controlling DNA-end resection: a new task for CDKs. *Front Genet* **4**
- Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, Jeong JH, Wolmark N (2002) Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med* **347**: 1233-1241
- Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS (2010) Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* **363**: 1938-1948
- Fuhrman BJ, Freedman DM, Bhatti P, Doody MM, Fu YP, Chang SC, Linet MS, Sigurdson AJ (2013) Sunlight, polymorphisms of vitamin D-related genes and risk of breast cancer. *Anticancer Res* **33**: 543-551
- Goldhirsch A, Gelber RD, Piccart-Gebhart MJ, de Azambuja E, Procter M, Suter TM, Jackisch C, Cameron D, Weber HA, Heinzmann D, Lago LD, McFadden E, Dowsett M, Untch M, Gianni L, Bell R, Kohne CH, Vindevoghel A, Andersson M, Brunt AM, Otero-Reyes D, Song S, Smith I, Leyland-Jones B, Baselga J (2013) 2 years versus 1 year of adjuvant trastuzumab for HER2-positive breast cancer (HERA): an open-label, randomised controlled trial. *Lancet*
- Gonzalez-Angulo AM, Morales-Vasquez F, Hortobagyi GN (2007) Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv Exp Med Biol* **608**: 1-22
- Gonzalez-Suarez I, Redwood AB, Grotzky DA, Neumann MA, Cheng EH, Stewart CL, Dusso A, Gonzalo S (2011) A new pathway that regulates 53BP1 stability implicates cathepsin L and vitamin D in DNA repair. *Embo j* **30**: 3383-3396
- Gori S, Sidoni A, Colozza M, Ferri I, Mameli MG, Fenocchio D, Stocchi L, Foglietta J, Ludovini V, Minenza E, De Angelis V, Crino L (2009) EGFR, pMAPK, pAkt and PTEN status by immunohistochemistry: correlation with clinical outcome in HER2-positive metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab. *Ann Oncol* **20**: 648-654
- Goulet B, Baruch A, Moon NS, Poirier M, Sansregret LL, Erickson A, Bogyo M, Nepveu A (2004) A cathepsin L isoform that is devoid of a signal peptide localizes to the nucleus in S phase and processes the CDP/Cux transcription factor. *Mol Cell* **14**: 207-219

- Goulet B, Sansregret L, Leduy L, Bogyo M, Weber E, Chauhan SS, Nepveu A (2007) Increased expression and activity of nuclear cathepsin L in cancer cells suggests a novel mechanism of cell transformation. *Mol Cancer Res* **5**: 899-907
- Grotsky DA, Gonzalez-Suarez I, Novell A, Neumann MA, Yaddanapudi SC, Croke M, Martinez-Alonso M, Redwood AB, Ortega-Martinez S, Feng Z, Lerma E, Ramon y Cajal T, Zhang J, Matias-Guiu X, Dusso A, Gonzalo S (2013) BRCA1 loss activates cathepsin L-mediated degradation of 53BP1 in breast cancer cells. *J Cell Biol* **200**: 187-202
- Hollmen M, Liu P, Kurppa K, Wildiers H, Reinvald I, Vandrope T, Smeets A, Deraedt K, Vahlberg T, Joensuu H, Leahy DJ, Schoffski P, Elenius K (2012) Proteolytic processing of ErbB4 in breast cancer. *PLoS One* **7**: e39413
- Hugh J, Hanson J, Cheang MC, Nielsen TO, Perou CM, Dumontet C, Reed J, Krajewska M, Treilleux I, Rupin M, Magherini E, Mackey J, Martin M, Vogel C (2009) Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *J Clin Oncol* **27**: 1168-1176
- Hurrell T, Outhoff K (2013) Human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: which cytotoxic agent best complements trastuzumab's efficacy in vitro? *Onco Targets Ther* **6**: 693-701
- Jacquemier J, Ginestier C, Rougemont J, Bardou VJ, Charafe-Jauffret E, Geneix J, Adelaide J, Koki A, Houvenaeghel G, Hassoun J, Maraninchi D, Viens P, Birnbaum D, Bertucci F (2005) Protein expression profiling identifies subclasses of breast cancer and predicts prognosis. *Cancer Res* **65**: 767-779
- Junttila TT, Sundvall M, Maatta JA, Elenius K (2000) ErbB4 and its isoforms: selective regulation of growth factor responses by naturally occurring receptor variants. *Trends Cardiovasc Med* **10**: 304-310
- Kass EM, Jasin M (2010) Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. *FEBS Lett* **584**: 3703-3708
- Kass EM, Moynahan ME, Jasin M (2010) Loss of 53BP1 is a gain for BRCA1 mutant cells. *Cancer Cell* **17**: 423-425
- Katoh M, Nakagama H (2013) FGF Receptors: Cancer Biology and Therapeutics. *Med Res Rev*
- Katoh Y, Katoh M (2009) FGFR2-related pathogenesis and FGFR2-targeted therapeutics (Review). *Int J Mol Med* **23**: 307-311
- Kelly RJ, Lopez-Chavez A, Citrin D, Janik JE, Morris JC (2011) Impacting tumor cell-fate by targeting the inhibitor of apoptosis protein survivin. *Mol Cancer* **10**: 35
- Kim B, Fatayer H, Hanby AM, Horgan K, Perry SL, Valleley EM, Verghese ET, Williams BJ, Thorne JL, Hughes TA (2013) Neoadjuvant chemotherapy induces expression levels of breast cancer resistance protein that predict disease-free survival in breast cancer. *PLoS One* **8**: e62766
- King MC, Marks JH, Mandell JB (2003) Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* **302**: 643-646

- Koutras AK, Fountzilas G, Kalogeras KT, Starakis I, Iconomou G, Kalofonos HP (2010) The upgraded role of HER3 and HER4 receptors in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **74**: 73-78
- Lai D, Visser-Grieve S, Yang X (2012) Tumour suppressor genes in chemotherapeutic drug response. *Biosci Rep* **32**: 361-374
- Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Hoon Tan P, Van de Vijver MJ (2012) *World Health Organization Classification of Tumors of the Breast*.
- Lee CH, Jeon YT, Kim SH, Song YS (2007) NF-kappaB as a potential molecular target for cancer therapy. *Biofactors* **29**: 19-35
- Lee H, Llombart-Cussac A, al. e. (2006) Predictive biomarker discovery and validation for the targeted chemotherapeutic ixabepilone. ASCO Annual Meeting Proceedings:24,3011,2006, J Clin Oncol.
- Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, Pietenpol JA (2011) Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* **121**: 2750-2767
- Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, Andre F, Tordai A, Mejia JA, Symmans WF, Gonzalez-Angulo AM, Hennessy B, Green M, Cristofanilli M, Hortobagyi GN, Pusztai L (2008) Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* **26**: 1275-1281
- Livi L, Meattini I, Franceschini D, Saieva C, Meacci F, Marrazzo L, Gerlain E, Desideri I, Scotti V, Nori J, Sanchez LJ, Orzalesi L, Bonomo P, Greto D, Bianchi S, Biti G (2013) Radiotherapy boost dose-escalation for invasive breast cancer after breast-conserving surgery: 2093 Patients treated with a prospective margin-directed policy. *Radiother Oncol*
- Ludwig JA, Weinstein JN (2005) Biomarkers in Cancer Staging, Prognosis and Treatment Selection. *Nature Reviews Cancer* **5**: 845-856
- Machleidt A, Buchholz S, Diermeier-Daucher S, Zeman F, Ortman O, Brockhoff G (2013) The prognostic value of Her4 receptor isoform expression in triple-negative and Her2 positive breast cancer patients. *BMC Cancer* **13**: 437
- Mathieu MC, Rouzier R, Llombart-Cussac A, Sideris L, Koscielny S, Travagli JP, Contesso G, Delalage S, Spielmann M (2004) The poor responsiveness of infiltrating lobular breast carcinomas to neoadjuvant chemotherapy can be explained by their biological profile. *Eur J Cancer* **40**: 342-351
- Mauri D, Pavlidis N, Ioannidis JP (2005) Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* **97**: 188-194
- Millar EK, Graham PH, O'Toole SA, McNeil CM, Browne L, Morey AL, Eggleton S, Beretov J, Theocharous C, Capp A, Nasser E, Kearsley JH, Delaney G, Papadatos G, Fox C, Sutherland RL (2009) Prediction of local recurrence, distant metastases, and death after breast-conserving therapy in early-stage invasive breast cancer using a five-biomarker panel. *J Clin Oncol* **27**: 4701-4708

- Montagut C, Tusquets I, Ferrer B, Corominas JM, Bellosillo B, Campas C, Suarez M, Fabregat X, Campo E, Gascon P, Serrano S, Fernandez PL, Rovira A, Albanell J (2006) Activation of nuclear factor-kappa B is linked to resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Endocr Relat Cancer* **13**: 607-616
- Morandi P, Rouzier R, Altundag K, Buzdar AU, Theriault RL, Hortobagyi G (2004) The role of aromatase inhibitors in the adjuvant treatment of breast carcinoma: the M. D. Anderson Cancer Center evidence-based approach. *Cancer* **101**: 1482-1489
- Mullan PB, Quinn JE, Harkin DP (2006) The role of BRCA1 in transcriptional regulation and cell cycle control. *Oncogene* **25**: 5854-5863
- Naresh A, Long W, Vidal GA, Wimley WC, Marrero L, Sartor CI, Tovey S, Cooke TG, Bartlett JM, Jones FE (2006) The ERBB4/HER4 intracellular domain 4ICD is a BH3-only protein promoting apoptosis of breast cancer cells. *Cancer Res* **66**: 6412-6420
- Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, Hernandez-Boussard T, Livasy C, Cowan D, Dressler L, Akslen LA, Ragaz J, Gown AM, Gilks CB, van de Rijn M, Perou CM (2004) Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* **10**: 5367-5374
- O'Brien KM, Cole SR, Tse CK, Perou CM, Carey LA, Foulkes WD, Dressler LG, Geradts J, Millikan RC (2010) Intrinsic breast tumor subtypes, race, and long-term survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Clin Cancer Res* **16**: 6100-6110
- Oh DS, Troester MA, Usary J, Hu Z, He X, Fan C, Wu J, Carey LA, Perou CM (2006) Estrogen-regulated genes predict survival in hormone receptor-positive breast cancers. *J Clin Oncol* **24**: 1656-1664
- Ooi LL, Zhou H, Kalak R, Zheng Y, Conigrave AD, Seibel MJ, Dunstan CR (2010) Vitamin D deficiency promotes human breast cancer growth in a murine model of bone metastasis. *Cancer Res* **70**: 1835-1844
- Osborne C, Wilson P, Tripathy D (2004) Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist* **9**: 361-377
- Pallares J, Santacana M, Puente S, Lopez S, Yeramian A, Eritja N, Sorolla A, Llobet D, Dolcet X, Matias-Guiu X (2009) A review of the applications of tissue microarray technology in understanding the molecular features of endometrial carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* **31**: 217-226
- Peppone LJ, Huston AJ, Reid ME, Rosier RN, Zakharia Y, Trump DL, Mustian KM, Janelins MC, Purnell JQ, Morrow GR (2011) The effect of various vitamin D supplementation regimens in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* **127**: 171-177
- Peppone LJ, Rickles AS, Janelins MC, Insalaco MR, Skinner KA (2012) The association between breast cancer prognostic indicators and serum 25-OH vitamin D levels. *Ann Surg Oncol* **19**: 2590-2599
- Perez-Tomas R (2006) Multidrug resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment. *Curr Med Chem* **13**: 1859-1876

- Perou CM (2011) Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist* **16 Suppl 1**: 61-70
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**: 747-752
- Peto R, Davies C, Godwin J, Gray R, Pan HC, Clarke M, Cutter D, Darby S, McGale P, Taylor C, Wang YC, Bergh J, Di Leo A, Albain K, Swain S, Piccart M, Pritchard K (2012) Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet* **379**: 432-444
- Pierga JY, Mouret E, Laurence V, Dieras V, Savigioni A, Beuzeboc P, Dorval T, Palangie T, Jouve M, Pouillart P (2003) Prognostic factors for survival after neoadjuvant chemotherapy in operable breast cancer. the role of clinical response. *Eur J Cancer* **39**: 1089-1096
- Pollan M, Michelena MJ, Ardanaz E, Izquierdo A, Sanchez-Perez MJ, Torrella A (2010) Breast cancer incidence in Spain before, during and after the implementation of screening programmes. *Ann Oncol* **21 Suppl 3**: iii97-102
- Pritchard KI (2013) Endocrine therapy: is the first generation of targeted drugs the last? *J Intern Med* **274**: 144-152
- Rebbeck TR, DeMichele A, Tran TV, Panossian S, Bunin GR, Troxel AB, Strom BL (2009) Hormone-dependent effects of FGFR2 and MAP3K1 in breast cancer susceptibility in a population-based sample of post-menopausal African-American and European-American women. *Carcinogenesis* **30**: 269-274
- Rexhepaj E, Jirstrom K, O'Connor DP, O'Brien SL, Landberg G, Duffy MJ, Brennan DJ, Gallagher WM (2010) Validation of cytoplasmic-to-nuclear ratio of survivin as an indicator of improved prognosis in breast cancer. *BMC Cancer* **10**: 639
- Rimm DL, Camp RL, Charette LA, Costa J, Olsen DA, Reiss M (2001) Tissue microarray: a new technology for amplification of tissue resources. *Cancer J* **7**: 24-31
- Rokicki J, Das PM, Giltane JM, Wansbury O, Rimm DL, Howard BA, Jones FE (2010) The ERalpha coactivator, HER4/4ICD, regulates progesterone receptor expression in normal and malignant breast epithelium. *Mol Cancer* **9**: 150
- Rosai J (2011) *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology tenth edition*, Vol. 2.
- Schiff R, Massarweh SA, Shou J, Bharwani L, Arpino G, Rimawi M, Osborne CK (2005) Advanced concepts in estrogen receptor biology and breast cancer endocrine resistance: implicated role of growth factor signaling and estrogen receptor coregulators. *Cancer Chemother Pharmacol* **56 Suppl 1**: 10-20
- Schneeweiss A, Marme F, Ruiz A, Manikhas AG, Bottini A, Wolf M, Sinn HP, Mansouri K, Kennedy L, Bauknecht T (2011) A randomized phase II trial of doxorubicin plus pemetrexed followed by docetaxel versus doxorubicin plus cyclophosphamide followed by docetaxel as neoadjuvant treatment of early breast cancer. *Ann Oncol* **22**: 609-617

- Scholl SM, Pierga JY, Asselain B, Beuzeboc P, Dorval T, Garcia-Giralt E, Jouve M, Palangie T, Remvikos Y, Durand JC, et al. (1995) Breast tumour response to primary chemotherapy predicts local and distant control as well as survival. *Eur J Cancer* **31a**: 1969-1975
- Scully R, Livingston DM (2000) In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature* **408**: 429-432
- Simstein R, Burow M, Parker A, Weldon C, Beckman B (2003) Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from the MCF-7 cell model system. *Exp Biol Med (Maywood)* **228**: 995-1003
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lonning PE, Borresen-Dale AL (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10869-10874
- Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lonning PE, Brown PO, Borresen-Dale AL, Botstein D (2003) Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8418-8423
- Straver ME, Meijnen P, van Tienhoven G, van de Velde CJ, Mansel RE, Bogaerts J, Demonty G, Duez N, Cataliotti L, Klinkenbijn J, Westenberg HA, van der Mijle H, Hurkmans C, Rutgers EJ (2010) Role of axillary clearance after a tumor-positive sentinel node in the administration of adjuvant therapy in early breast cancer. *J Clin Oncol* **28**: 731-737
- Su Y, Zheng Y, Zheng W, Gu K, Chen Z, Li G, Cai Q, Lu W, Shu XO (2011) Distinct distribution and prognostic significance of molecular subtypes of breast cancer in Chinese women: a population-based cohort study. *BMC Cancer* **11**: 292
- Sui M, Zhang H, Fan W (2011) The role of estrogen and estrogen receptors in chemoresistance. *Curr Med Chem* **18**: 4674-4683
- Sundvall M, Iljin K, Kilpinen S, Sara H, Kallioniemi OP, Elenius K (2008) Role of ErbB4 in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **13**: 259-268
- Tominaga N, Naoi Y, Shimazu K, Nakayama T, Maruyama N, Shimomura A, Kim SJ, Tamaki Y, Noguchi S (2012) Clinicopathological analysis of GATA3-positive breast cancers with special reference to response to neoadjuvant chemotherapy. *Ann Oncol* **23**: 3051-3057
- Tsang JY, Huang YH, Luo MH, Ni YB, Chan SK, Lui PC, Yu AM, Tan PH, Tse GM (2012) Cancer stem cell markers are associated with adverse biomarker profiles and molecular subtypes of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **136**: 407-417
- Varela I, Cadinanos J, Pendas AM, Gutierrez-Fernandez A, Folgueras AR, Sanchez LM, Zhou Z, Rodriguez FJ, Stewart CL, Vega JA, Tryggvason K, Freije JM, Lopez-Otin C (2005) Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. *Nature* **437**: 564-568
- Veikkolainen V, Vaparanta K, Halkilahti K, Iljin K, Sundvall M, Elenius K (2011) Function of ERBB4 is determined by alternative splicing. *Cell Cycle* **10**: 2647-2657

- Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccozzi R, Luini A, Aguilar M, Marubini E (2002) Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med* **347**: 1227-1232
- Vicini FA, Recht A, Abner A, Boyages J, Cady B, Connolly JL, Gelman R, Osteen RT, Schnitt SJ, Silen W, et al. (1992) Recurrence in the breast following conservative surgery and radiation therapy for early-stage breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr*: 33-39
- Voboril R, Weberova-Voborilova J (2007) Sensitization of colorectal cancer cells to irradiation by IL-4 and IL-10 is associated with inhibition of NF-kappaB. *Neoplasma* **54**: 495-502
- Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H (2010) Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol* **28**: 1684-1691
- Von Minckwitz G, Kummel S, Vogel P, Hanusch C, Eidtmann H, Hilfrich J, Gerber B, Huober J, Costa SD, Jackisch C, Loibl S, Mehta K, Kaufmann M (2008) Neoadjuvant vinorelbine-capcitabine versus docetaxel-doxorubicin-cyclophosphamide in early nonresponsive breast cancer: phase III randomized GeparTrio trial. *J Natl Cancer Inst* **100**: 542-551
- Vrbic S, Pejic I, Filipovic S, Kocic B, Vrbic M (2013) Current and future anti-HER2 therapy in breast cancer. *J buon* **18**: 4-16
- Weiss MC, Fowble BL, Solin LJ, Yeh IT, Schultz DJ (1992) Outcome of conservative therapy for invasive breast cancer by histologic subtype. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **23**: 941-947
- Weissenbacher T, Hirte E, Kuhn C, Janni W, Mayr D, Karsten U, Rack B, Friese K, Jeschke U, Heublein S, Dian D, Ditsch N (2013) Multicentric and multifocal versus unifocal breast cancer: differences in the expression of E-cadherin suggest differences in tumor biology. *BMC Cancer* **13**: 361
- Whitworth P, McMasters KM, Tafra L, Edwards MJ (2000) State-of-the-art lymph node staging for breast cancer in the year 2000. *Am J Surg* **180**: 262-267
- Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ (1997) Movement of Bax from the Cytosol to Mitochondria during Apoptosis. *J Cell Biol* **139**: 1281-1292
- Xie A, Hartlerode A, Stucki M, Odate S, Puget N, Kwok A, Nagaraju G, Yan C, Alt FW, Chen J, Jackson SP, Scully R (2007) Distinct roles of chromatin-associated proteins MDC1 and 53BP1 in mammalian double-strand break repair. *Mol Cell* **28**: 1045-1057