



**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

TESIS DOCTORAL

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR  
DEL CÁNCER DE MAMA PRECOZ  
TRIPLE NEGATIVO MEDIANTE LA  
TÉCNICA PROTEÓMICA SWATH-MS

---

SILVIA GARCÍA ADRIÁN

Madrid, 2018



**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

TESIS DOCTORAL

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR  
DEL CÁNCER DE MAMA PRECOZ  
TRIPLE NEGATIVO MEDIANTE LA  
TÉCNICA PROTEÓMICA SWATH-MS

---

Memoria presentada para la obtención del grado de  
Doctor en Medicina por

SILVIA GARCÍA ADRIÁN

Dirigida por:

Dr. Enrique Espinosa Arranz.  
Dr. Juan Ángel Fresno Vara.

*A Martina y Adela*

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo no habría sido posible sin la ayuda inestimable, los consejos y el apoyo de muchas personas a las que quiero agradecer que me hayan acompañado en este camino.

En primer lugar, a mis directores de tesis, el Dr. Enrique Espinosa y el Dr. Juan Ángel Fresno, sin los que no hubiera podido llegar hasta aquí. Gracias por vuestra paciencia, vuestro permanente buen humor y por tantas cosas que he aprendido de vosotros.

A Lucia Trilla, por su valiosa ayuda en este proyecto, por su sonrisa constante y por ayudarme a entender conceptos para mí incomprensibles.

A la Unidad de Proteómica del *Centre for Genomic Regulation* (CRG) de Barcelona porque sin su colaboración este trabajo hubiera sido imposible.

A la Dra. Eva Ciruelos, y a los compañeros que colaboran con ella en el Hospital Universitario 12 de Octubre, por su participación en este proyecto.

A mis padres, por enseñarme con su ejemplo la importancia del esfuerzo y el trabajo en equipo para conseguir mis objetivos.

A mi hermano, por creer siempre en mí y apoyarme en cada uno de los proyectos que he iniciado a lo largo de mi vida.

A Sonia, por ser mi amiga desde... siempre. Gracias por estar a mi lado y apoyarme incondicionalmente en los buenos y en los malos momentos.

A Lara Iglesias, por su amistad, sus consejos y por mostrarme siempre el lado positivo de las cosas.

A David Marrupe, por ser un compañero maravilloso y, sobre todo, un grandísimo amigo.

A mis amigos, por estar a mi lado, por los buenos momentos que hemos pasado juntos, por animarme a seguir adelante y no tirar la toalla nunca.

A todas las personas con las que trabajo cada día en el Hospital Universitario de Móstoles, que me hacen más fácil la vida y siempre consiguen hacerme sonreír.

# RESUMEN

---

**Introducción:** El cáncer de mama triple negativo (CMTNN) es una enfermedad heterogénea que abarca un amplio espectro de entidades con características biológicas diferentes, que se asocian a distinto comportamiento clínico y pronóstico. A pesar de ello, las pacientes diagnosticadas de CMTN se tratan en la actualidad de forma uniforme, lo que probablemente supone un sobretratamiento de algunas de ellas. Por otra parte, las elevadas tasas de recaída tumoral a pesar de dicha quimioterapia estándar, obligan a buscar nuevas terapias que mejoren el pronóstico de las pacientes con CMTN y alto riesgo de recaída.

La proteómica aplicada al estudio del cáncer permite identificar marcadores de diagnóstico, pronóstico, y posibles dianas terapéuticas. Sin embargo, su uso en la práctica clínica diaria sigue estando limitado. El desarrollo de nuevas técnicas de proteómica, que aporten información pronóstica y/o terapéutica de forma sencilla y fiable, ayudará a generalizar su uso en la rutina diaria del manejo de los pacientes con cáncer.

**Objetivo:** construir un predictor pronóstico de recaída tumoral, basado en la expresión de proteínas de una muestra de pacientes operadas de CMTN, analizadas mediante SWATH-MS.

**Pacientes y Métodos:** estudio retrospectivo en el que se analizaron muestras de tejido tumoral, embebidas en parafina y fijadas en formol (FFPE), de 125 pacientes operadas de CMTN estadios I-III.

**Resultados:** se identificaron un total de 1.206 proteínas mediante SWATH-MS, de las que 29 se asociaron de forma significativa con la recaída tumoral ( $p < 0,01$ ). Se construyó un agrupamiento jerárquico (HCL) mediante el que se establecieron dos grupos de muestras, que no presentaron diferencias significativas en riesgo de recaída tumoral entre sí. Se construyó un predictor proteico de recaída, basado en la expresión dos proteínas (RBM3 y NIPSNAP1), que dividió a la muestra en un grupo de bajo riesgo y otro de alto riesgo de recaída ( $HR = 6,519$ ;  $p = 0,0002$ ).

**Conclusiones:** SWATH-MS permite identificar y cuantificar proteínas en muestras de tejido tumoral FFPE. Se identificó un predictor pronóstico de recaída tumoral en CMTN, basado en dos proteínas, cuya utilidad precisa validación en estudios futuros.

**Introduction:** Triple negative breast cancer (TNBC) is a heterogeneous disease that encompasses a broad spectrum of entities with different biology, clinical behavior and prognosis. In spite of this, patients diagnosed with TNBC are treated in a uniform way, which probably supposes an overtreatment of some of them. On the other hand, the high rates of tumor relapse, even after standard chemotherapy, make it necessary to look for new therapies that improve the prognosis of patients with TNBC and high risk of relapse.

Proteomics applied to the study of cancer allows the identification of diagnostic and prognostic biomarkers, as well as possible therapeutic targets. However, its routine use in daily clinical practice remains limited. The development of new proteomics techniques, which provide prognostic and / or therapeutic information in a simple and reliable way, will help to generalize its use in the daily routine of the management of cancer patients.

**Objective:** to build a protein-based predictor of relapse in patients with TNBC, using SWATH-MS.

**Patients and Methods:** retrospective study. Formalin-fixed paraffin-embedded samples (FFPE) from 125 patients with stage I-III TNBC were analyzed.

**Results:** SWATH-MS identified 1.206 proteins, 29 of which were significantly related to relapse ( $p < 0,01$ ). A hierarchical cluster was built with two groups of samples that did not show differences in relapse rate. The expression of RBM3 and NIP-SNAP1 was used to define a prognostic predictor that split the sample into a low-risk and a high-risk group (HR= 6,519; p-value = 0,0002).

**Conclusions:** SWATH-MS allows identifying and quantifying proteins in samples of FFPE tumor tissue. We identified a prognostic signature of tumor relapse in TNBC based on two proteins, whose usefulness requires validation in future studies.

# ÍNDICE

---



<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<hr/>	
<b>ÍNDICE</b>	<b>4</b>
<hr/>	
1.- ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	4
1.- ÍNDICE DE TABLAS.....	7
1.- ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>10</b>
<hr/>	
1.- GENERALIDADES .....	10
1.1.- Epidemiología. ....	10
1.2.- Factores de Riesgo. ....	10
1.3.- Diagnóstico histológico del cáncer de mama. ....	12
1.4.- Estadificación del cáncer de mama. ....	14
1.5.- Clasificación molecular del cáncer de mama. ....	17
1.6.- Factores pronósticos y predictivos. ....	20
1.7.- Tratamiento del cáncer de mama.....	24
2.- CARCINOMA DE MAMA TRIPLE NEGATIVO (CMTN).....	26
2.1.- Historia Natural y comportamiento clínico del CMTN.....	28
2.2.- Tratamiento adyuvante y neoadyuvante en CMTN.....	30
2.3.- Subtipos moleculares en CMTN.....	34
3.- APLICACIÓN DE LA PROTEÓMICA AL ESTUDIO DEL CÁNCER.....	37
3.1.- Espectrometría de masas SWATH (SWATH-MS).....	39

---

**OBJETIVOS** **43**


---

1.- OBJETIVO PRINCIPAL.....	43
2.- OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	43

**PACIENTES Y MÉTODOS** **46**


---

1.- VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS.....	46
2.- SELECCIÓN DE MUESTRAS TUMORALES.....	47
3.- PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.....	47
4.- ESPECTROMETRÍA DE MASAS SWATH.....	48
5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	49
5.1.- Análisis de variables clínicas. ....	50
5.2.- Análisis de agrupamiento jerárquico y <i>Significance Analysis of Microarrays</i> .....	49
5.3.- Construcción de modelos gráficos probabilísticos y cálculo de actividad de nodos funcionales.....	50
5.3.- Construcción de predictores pronósticos.....	50

**RESULTADOS** **52**


---

1.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LA POBLACIÓN.....	52
2.- CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL CMTN MEDIANTE SWATH-MS.....	57
2.1.- Resultados de los estudios de proteómica.....	57
2.2.- Estudio de proteínas relacionadas con recaída tumoral.....	60
2.3.- Identificación de un predictor de recaída basado en expresión de proteínas .....	61
2.4.- Análisis Funcional de los datos de proteómica.....	62
2.5.- Análisis de proteínas asociadas con recaídas tardías.....	65

<b>DISCUSIÓN</b>	<b>68</b>
<hr/>	
1.- ANÁLISIS DE CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA MUESTRA A ESTUDIO .....	69
2.- ANÁLISIS DEL PROTEOMA DE LA MUESTRA A ESTUDIO.....	71
2.1.- Análisis de los resultados de los experimentos de proteómica.....	72
2.2.- Predictor pronóstico basado en expresión de proteínas.....	73
2.3.- Análisis funcional de la expresión de proteínas.....	76
2.4.- Análisis de proteínas relacionadas con recaídas tardías.....	76
2.5.- Evaluación de resultados de la técnica SWATH-MS.....	80
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>82</b>
<hr/>	
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>84</b>
<hr/>	
<b>CLAVES DE ABREVIATURAS</b>	<b>103</b>
<hr/>	

## ÍNDICE DE TABLAS

---

**Tabla 1a.** Estadificación clínica TNM (8ª Edición).

**Tabla 1b.** Estadificación patológica TNM (8ª Edición).

**Tabla 1c.** Estadios de la clasificación TNM (8ª Edición)

**Tabla 2.** Subtipos intrínsecos subrogados basados en inmunohistoquímica.

**Tabla 3.** Esquemas de quimioterapia adyuvante con antraciclina y taxanos.

**Tabla 4.** Características clínicas de las pacientes.

**Tabla 5.** Características de las pacientes que presentaron recaída tumoral.

**Tabla 6:** Lugar de primera recaída tumoral.

**Tabla 7.** Características clínicas de las pacientes de cada grupo del agrupamiento jerárquico.

**Tabla 8.** Proteínas relacionadas con la recaída tumoral.

**Tabla 9.** Características de las proteínas identificadas en el predictor pronóstico.

**Tabla 10.** Características clínicas de las pacientes con seguimiento mayor de 90 meses.

**Tabla 11.** Proteínas relacionadas con la aparición de recaídas tardías (> 90 meses).

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

**Figura 1.** Incidencia en mujeres de los tumores más frecuentes.

**Figura 2.** Distribución de los subtipos moleculares intrínsecos y patológicos de tumores triple negativos y tumores *basal-like*.

**Figura 3.** Supervivencia libre recaída a distancia en carcinoma de mama triple negativo (CMTN) versus carcinoma de mama no triple negativo.

**Figura 4.** Asociación entre RCp y supervivencia libre de evento en CMTN.

**Figura 5.** Comparación entre subtipo molecular y subtipo intrínseco.

**Figura 6.** Edad al diagnóstico de CMTN.

**Figura 7.** Momento de recaída tumoral.

**Figura 8.** Supervivencia libre de enfermedad (SLE) en función del esquema de quimioterapia adyuvante recibido.

**Figura 9.** Curvas de Kaplan-Meier para Supervivencia libre de enfermedad (SLE) en función de factores pronósticos.

**Figura 10.** SAM entre los dos grupos definidos en el agrupamiento jerárquico.

**Figura 11.** Localización primera recaída según grupo molecular establecido por el HCL.

**Figura 12.** Curvas de supervivencia entre los dos grupos del agrupamiento jerárquico.

**Figura 13.** Predictor proteico de recaída en la población con CMTN a estudio.

**Figura 14.** Red caracterizada funcionalmente.

**Figura 15:** Actividades de los nodos para cada uno de los grupos definidos en el agrupamiento jerárquico.

**Figura 16.** Modelo gráfico probabilístico usando los datos de expresión de proteínas, según recaída o no recaída.

**Figura 17.** Modelo gráfico probabilístico usando los datos de expresión de proteínas.

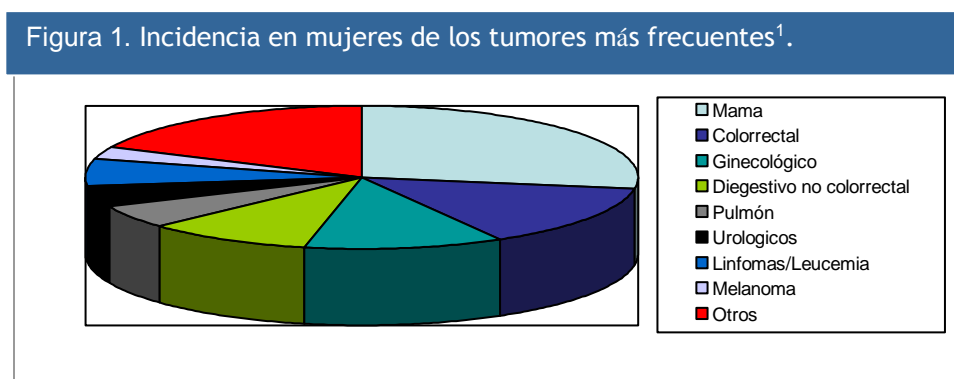
# INTRODUCCIÓN

---

## 1.- GENERALIDADES

### 1.1.- Epidemiología

El carcinoma de mama es el tumor más frecuente en las mujeres. Se estima que en España se diagnostican 25.000 nuevos casos anuales<sup>1,2</sup>, y el cáncer de mama supone casi un tercio de los tumores malignos diagnosticados en mujeres (Figura 1).



La incidencia de cáncer de mama está aumentando en todo el mundo en las últimas décadas. Este cambio es debido, en parte, al aumento del número de mujeres en riesgo (envejecimiento de la población, retraso de la edad del primer embarazo, uso de terapia hormonal sustitutiva, etc.) pero, sobre todo, se debe al uso sistemático de la mamografía de cribado en países desarrollados desde los años 80.

El aumento de incidencia ha coincidido con una disminución de la mortalidad por cáncer de mama en países desarrollados<sup>3,4</sup>. Este descenso de la mortalidad está relacionado con el diagnóstico en fases más precoces debido al cribado, y a la mejora de los métodos diagnósticos y terapéuticos. Según los datos del Instituto Nacional de Estadística (INE), algo más de 6000 mujeres fallecieron por cáncer de mama en nuestro país en 2016<sup>5</sup>.

### 1.2.- Factores de Riesgo:<sup>6</sup>

- a) Sexo femenino. El cáncer de mama es 100 veces más frecuente en mujeres que en varones.

- b) Edad. La incidencia de cáncer de mama aumenta con la edad, duplicándose cada diez años hasta la menopausia, a partir de la cual el ascenso de incidencia es más progresivo<sup>7</sup>.
- c) Edad de menarquia y menopausia. La menarquia precoz y la menopausia tardía se han asociado a un mayor riesgo de desarrollar cáncer. Las mujeres que presentan la menopausia después de los 55 años tienen el doble de riesgo de presentar cáncer de mama que las mujeres que la presentan antes de los 45 años de edad.
- d) Edad del primer embarazo. Tanto la nuliparidad como la edad tardía del primer embarazo se han asociado a mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama a lo largo de la vida. El riesgo de padecer cáncer de mama en mujeres que tienen su primer hijo después de los 30 años es el doble que en mujeres que tiene su primer embarazo antes de los 20 años de edad.
- e) Historia familiar /Cáncer de mama hereditario. 15-20% de los pacientes con carcinomas de mama presentan antecedentes familiares.  
Se estima que el 5-10% de los cánceres de mama son hereditarios. De ellos, más del 90% están asociados a mutaciones los genes BRCA1 y BRCA2. El riesgo de desarrollar un cáncer de mama a lo largo de la vida se sitúa en alrededor de un 60% en los individuos portadores de mutación en BRCA1 y del 50% en portadores de mutación en BRCA2<sup>8</sup>. El cáncer de mama hereditario también se ha asociado a mutaciones en otros genes: TP53 (síndrome de Li Fraumeni)<sup>9</sup>, PTEN (síndrome de Cowden) <sup>10</sup>, SKT11 (síndrome de Peutz Jeghers)<sup>11</sup>, CDH1<sup>12</sup>, ATM, CHEK2, PALB2, NF1.
- f) Enfermedades proliferativas benignas de la mama (ej: hiperplasia epitelial atípica severa, papilomas ductales, etc.).
- g) Radioterapia previa sobre pared torácica.
- h) Sobrepeso. El riesgo de cáncer de mama asociado a la obesidad parece depender del estado menopáusico. En mujeres postmenopáusicas o perimenopáusicas, el sobrepeso se ha asociado en diversos estudios a un incremento de riesgo de cáncer de mama. Un meta-análisis evaluó la relación entre obesidad y cáncer de mama triple negativo, y encontró que las mujeres premenopáusicas obesas tenían un aumento significativo de riesgo de padecer este tipo de tumor (*odds ratio*: 1,43; IC 95% 1,23-1,65)<sup>13</sup>.



- i) Terapia hormonal sustitutiva. La duración y el tipo de formulación hormonal parecen influir en el riesgo de desarrollar cáncer de mama. La duración breve y el uso de combinaciones estrógeno-progestágeno no parecen aumentar el riesgo.

### 1.3.- Diagnóstico histológico del cáncer de mama

---

La mayoría de los tumores malignos de la mama se originan en células epiteliales y se denominan carcinomas (95%). En función de su capacidad de invasión del estroma se clasifican en:

- Carcinomas intraductales o ductales *in situ*. Se caracterizan por la proliferación de células epiteliales malignas en el interior del sistema ductal de la mama, sin evidencia de invasión del estroma subyacente. En la actualidad, gracias al diagnóstico precoz asociado al cribado mamográfico, suponen el 20-25% de todos los carcinomas de mama.
- Carcinomas infiltrantes. Las células tumorales atraviesan la membrana basal subyacente y, por tanto, tienen capacidad de invadir el estroma circundante y diseminarse a otros tejidos.

El diagnóstico inicial del cáncer de mama se basa en la exploración física y las pruebas radiológicas, pero siempre debe ser confirmado mediante estudio histológico de la lesión. El diagnóstico histológico se basa en la biopsia de la tumoración que, siempre que sea posible, debe realizarse antes de iniciar el tratamiento. Las pruebas de imagen previas a la cirugía deben incluir la realización de ecografía de la axila, y estudio citológico o histológico de las adenopatías sospechosas, como parte de la estadificación prequirúrgica.

El informe anatomopatológico definitivo, realizado tras la extirpación de la pieza, debe incluir todos aquellos factores que van a influir en el tratamiento postquirúrgico (quimioterapia, radioterapia y hormonoterapia). Estos factores, en el caso del carcinoma infiltrante, incluyen<sup>14</sup>:

- a) Tipo histológico. El tipo histológico más frecuente es el carcinoma ductal infiltrante (70-80%), seguido del carcinoma lobulillar infiltrante (8%) y el carcinoma mixto ductal/lobulillar (7%). Otros tipos histológicos, que suponen menos

del 5% del total, incluyen el carcinoma mucinoso / coloide, tubular, medular, metaplásico y papilar.

- b) Tamaño tumoral. Debe ser medido al menos en dos dimensiones y la dimensión mayor del componente invasivo será la usada para determinar el estadio tumoral.
- c) Grado histológico (grado 1 o bien diferenciado, grado 2 o moderadamente diferenciado, grado 3 o pobremente diferenciado).
- d) Receptores hormonales. La determinación de la expresión de receptor de estrógeno (RE) y progesterona (RP) se realiza mediante inmunohistoquímica (IHQ). La *American Society of Clinical Oncology (ASCO)* y el *College of American Pathologists (CAP)* consideran RE positivo si existe tinción en al menos el 1% de las células tumorales. El 80% de los carcinomas de mama expresan RE y/o RP<sup>15</sup>.
- e) HER2. La determinación del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) debe realizarse en todas las pacientes diagnosticadas de carcinoma infiltrante de mama. Se estima que HER2 se encuentra amplificado/sobreexpresado en el 18-20% de los carcinomas de mama. Esta determinación puede realizarse mediante técnicas de IHQ, o por la cuantificación de copias del gen HER2 utilizando técnicas de hibridación *in situ* (ISH). Recientemente, la ASCO y el CAP han publicado unas recomendaciones conjuntas para la determinación de HER2. Según estas guías, los tumores se consideran HER2 positivos si cumplen alguna de las siguientes características<sup>16</sup>:
  - Presentan una tinción completa e intensa de la membrana celular en  $\geq$  10% de las células tumorales (3+).
  - Presentan amplificación del gen HER2 mediante ISH (número de copias de HER2  $>$  6 señales/células o relación HER2/CEP17  $\geq$  2.0).

Esta información nos permite dividir los carcinomas infiltrantes de mama en tres grupos, dependiendo de su expresión o no de receptores hormonales y HER2, que presentan distinto pronóstico y precisan tratamiento diferente<sup>17</sup>. Aproximadamente el 60% de los carcinomas infiltrantes de mama expresan receptores hormonales (RH) pero no expresan HER2. El 18-20% de los tumores son HER2 posi-

tivos, de los cuales la mitad expresan RH. Los tumores que no expresan RE, RP ni HER2 se denominan “triple negativos” y suponen el 15-20% del total de los carcinomas infiltrantes de mama.

#### 1.4.- Estadificación del cáncer de mama

---

En todas las pacientes con cáncer de mama debería realizarse una estadificación clínica, previa a la decisión terapéutica, que ayudará a identificar a aquellas pacientes que van a precisar tratamiento local y/o sistémico. Tras la resección quirúrgica se podrá realizar una estadificación patológica.

La estadificación clínica se basa en la realización de las siguientes pruebas diagnósticas preoperatorias:

- Estudio radiológico de la mama. La mamografía bilateral es la prueba diagnóstica de elección, si bien, en algunos casos es necesario complementarla con la realización de ecografía y/o resonancia magnética nuclear.
- Evaluación de la afectación axilar. Se recomienda realizar ecografía axilar ipsilateral para descartar la existencia de adenopatías axilares patológicas. Si existe sospecha de afectación axilar, se recomienda realizar punción-aspiración con aguja fina (PAAF) para confirmar el diagnóstico.
- Evaluación de diseminación a distancia. La realización de pruebas complementarias como TAC, gammagrafía ósea o PET-TAC sólo está indicada en estadios localmente avanzados, o cuando existe sospecha clínica o analítica de afectación metastásica.

El sistema de estadificación más utilizado es el TNM, que clasifica el cáncer de mama en cuatro estadios (I, II, III y IV), dependiendo de las distintas subcategorías del T (tumor primario), N (afectación ganglionar axilar) y de la presencia o no de metástasis a distancia (M). En 2017 el *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) presentó una actualización del sistema de estadificación TNM (8ª edición)<sup>18</sup>, que incluye una estadificación basada en datos clínicos (cTNM, Tabla 1a) y patológicos (pTNM, Tabla 1b). La nueva edición del sistema TNM tiene en cuenta además factores biológicos, que influyen en el pronóstico, como la expresión de receptores hormonales, HER2 y las firmas multigénicas.

La gran mayoría de los carcinomas de mama diagnosticados en países desarrollados se diagnostican en estadio localizado (I, IIA y T2N1M0) o localmente avanzado (T3N0M0 y III). El 5% de los casos presentan metástasis a distancia en el momento del diagnóstico (estadio IV).

Tabla 1a. Estadificación clínica TNM (8ª Edición).

Tumor Primario (T)	
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> .
T1	Tumor ≤ 2 cm.
T2	Tumor > 2 cm pero ≤ 5 cm.
T3	Tumor > 5 cm.
T4	Tumor de cualquier tamaño que se extiende a la pared o la piel.
T4a	- Extensión a pared torácica (no incluye músculo pectoral).
T4b	- Edema (piel de naranja) o ulceración de la piel o nódulos cutáneos satélites confinados a la misma mama.
T4c	- T4a + T4b
T4d	- Carcinoma inflamatorio.
Ganglios regionales (N)	
Nx	No evaluados.
N0	No metástasis ganglionares.
N1	Metástasis en ganglios axilares homolaterales móviles.
N2	Metástasis axilares ipsilaterales fijas o adheridas entre sí o ganglios en mamaria interna ipsilateral (sin afectación axilar).
N2a	- Ganglios axilares fijos entre sí o a otras estructuras.
N2b	- Metástasis clínicamente aparentes en mamaria interna (sin afectación axilar clínica).
N3	Metástasis infraclaviculares ipsilaterales o en cadena mamaria interna asociados a afectación axilar o supraclaviculares ipsilaterales.
N3a	- Infraclaviculares ipsilaterales + axilares.
N3b	- Mamaria interna ipsilateral + axilares.
N3c	- Supraclaviculares ipsilaterales.
Metástasis a distancia (M0)	
Mx	Metástasis a distancia desconocidas.
M0	No metástasis a distancia.
M1	Metástasis a distancia.

Tabla 1b. Estadificación patológica TNM (8ª Edición).

Tumor Primario (T)	
pT0	No evidencia de tumor primario.
pTis	Carcinoma <i>in situ</i> (CDIS, Paget).
pT1	Tumor ≤ 2 cm.
pT1mi	* Tumor ≤ 1 mm.
pT1a	* Tumor > 1 mm pero ≤ 5 mm.
pT1b	* Tumor > 5 mm pero ≤ 10 mm.
pT1c	* Tumor > 10 mm pero ≤ 20 mm.
pT2	Tumor > 20 mm pero ≤ 50 mm.
pT3	Tumor > 50 mm.
pT4	Tumor de cualquier tamaño que se extiende a la pared o la piel.
pT4a	* Extensión a pared torácica (no incluye músculo pectoral).
pT4b	* Edema o ulceración de la piel o nódulos cutáneos satélites confinados a la misma mama.
pT4c	* T4a + T4b.
pT4d	* Carcinoma inflamatorio.
Ganglios regionales (N)	
pNx	No evaluados.
pN0	No metástasis ganglionares o sólo células tumorales aisladas.
pN0(i+)	* Sólo células tumorales aisladas, pero sin acúmulos celulares > 0'2 mm.
pN0(mol+)	* Hallazgos moleculares positivos (RT-PCR), sin evidencia de células tumorales aisladas.
pN1	
pN1mi	* Micrometástasis (aproximadamente 200 células, > 0'2 mm pero ≤ 2 mm).
pN1a	* Metástasis en 1 a 3 ganglios axilares (al menos un depósito tumoral > 2 mm).
pN1b	* Metástasis en ganglios de cadena mamaria interna, detectados por biopsia ganglio centinela pero no evidentes clínicamente.
pN1c	* Metástasis en 1 a 3 ganglios axilares y en ganglios de cadena mamaria interna, detectados por biopsia ganglio centinela pero no evidentes clínicamente.
pN2	
pN2a	* Metástasis en 4 a 9 ganglios axilares (al menos uno > 2 mm).
pN2b	* Metástasis en cadena mamaria interna clínicamente aparentes, en ausencia de ganglios axilares.
pN3	
pN3a	Metástasis en ≥ 10 ganglios axilares (al menos uno > 2 mm) o infraclaviculares ipsilaterales.
pN3b	Metástasis en ganglios cadena mamaria interna clínicamente aparentes en presencia de 1 ó más ganglios axilares ipsilaterales.
pN3c	Metástasis ganglionar supraclavicular ipsilateral.

Tabla 1c. Estadio tumoral según clasificación TNM (8ª Edición).

Estadio IA	T1 N0 M0
Estadio IB	T1 N1mi M0
Estadio IIA	T1 N1 M0 T2 N0 M0
Estadio IIB	T2 N1 M0 T3 N0 M0
Estadio IIIA	T1-T3 N2 M0 T3 N1 M0
Estadio IIIB	T4 N0-N2 M0
Estadio IIIC	Cualquier T N3 M0
Estadio IV	Cualquier T Cualquier N M1

## 1.5.- Clasificación molecular del cáncer de mama

---

Los estudios pioneros sobre expresión génica del cáncer de mama fueron publicados hace más de 15 años por Perou y cols<sup>19</sup>. Este grupo analizó, mediante *microarrays* de ADN, más de 8000 genes humanos en 65 muestras de carcinoma de mama e identificaron, por primera vez, distintos subtipos de tumores de mama con distintos patrones de expresión génica basados en *clusters* (agrupaciones) de genes. Los resultados de dicho estudio evidenciaron la presencia de diversos fenotipos moleculares sugiriendo la existencia de una gran diversidad biológica en los tumores mamarios, estableciendo cuatro subtipos principales: Luminal, HER2, *basal-like* y *normal-like*.

Un estudio posterior, en el que se analizaron 78 carcinomas mediante *microarrays* de ADN, permitió depurar la lista de genes capaces de diferenciar los cuatro patrones previamente descritos y reducirla a 476 genes, algo que actualmente se conoce como perfil intrínseco de expresión<sup>20</sup>.

Estudios realizados en los últimos 15 años, basados en el análisis global de la expresión génica, han permitido identificar 5 subtipos intrínsecos de cáncer de mama (Luminal A, Luminal B, HER2-*enriched*, *Basal-like* y *Claudin-low*), así como un grupo de tumores denominados Normal-like. Estos subtipos muestran diferencias significativas en términos de incidencia, factores de riesgo, edad al diagnóstico, pronóstico y respuesta al tratamiento.

- Subtipos Luminales. Son los subtipos más frecuentes y suponen la mayoría de los tumores con RE positivos. Su nombre se debe a la similitud entre la expresión génica de estos tumores y las células epiteliales luminales normales de la mama. Típicamente expresan citoqueratinas 8 y 18. Se subclasifican en 2 tipos, que presentan importantes diferencias moleculares y pronósticas:

- Luminal A: suponen el 40% de todos los carcinomas infiltrantes de mama. Suelen presentar elevada expresión de genes asociados con el RE, baja expresión de genes relacionados con el *cluster* HER2 y baja expresión de genes relacionados con la proliferación celular. Los tumores Luminal A son, en general, el subtipo de mejor pronóstico.

- Luminal B: suponen el 20% de los carcinomas de mama. Se asocian a una menor expresión, aunque presente, de genes asociados con el RE, expresión variable del *cluster* HER2 y elevada expresión de genes relacionados con la proliferación celular. Presentan a peor pronóstico que los tumores Luminal A.
- HER2-enriched. Supone el 10-15% de todos los carcinomas de mama y se caracteriza por la elevada expresión de HER2 y de *clusters* de genes de proliferación, así como la baja expresión de *clusters* de genes luminales y basales. Habitualmente son negativos para receptores hormonales. Sólo la mitad de los tumores HER2 positivos son “*HER2-enriched*” en el estudio molecular. La mitad restante puede incluir cualquier subtipo molecular, aunque la mayoría son subtipos luminales HER2 positivos.
- Subtipo Basal. El cáncer mama basal se caracteriza por la expresión del *cluster* basal, un grupo de genes que incluye el gen del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR, HER1), citoqueratinas basales 5/6, c-Kit, el *cluster* de proliferación, y baja expresión de genes relacionados con los receptores hormonales y el receptor de HER2.
- Subtipo Claudin-Low. Fue descrito con posterioridad a los anteriores<sup>21</sup> y supone un 5-10% de los carcinomas de mama (y hasta un 30% de los tumores triple negativos)<sup>22</sup>. Son tumores de alto grado, con mal pronóstico, y que habitualmente no expresan receptores hormonales ni HER2 (triple negativos), aunque hasta un 15-25% de ellos son positivos para receptores hormonales. Aunque la mayoría de los tumores *Claudin-low* son carcinomas ductales infiltrantes, son frecuentes en este subtipo intrínseco las histologías carcinoma medular y carcinoma metaplásico. Presentan una tasa de respuesta a quimioterapia preoperatoria intermedia entre los tumores basales y los luminales. Se caracteriza por una escasa o ausente expresión de genes de proliferación y adhesión celular, pero presenta una importante expresión de genes de transición epitelio-mesénquima, asociados con respuesta inmune y marcadores de células pluripotentes (*stem cell*).

Recientemente, el grupo *The Cancer Genome Atlas Network* ha completado la mayor caracterización molecular de cáncer de mama realizada hasta la fecha<sup>23</sup>. Se analizaron datos moleculares en 466 muestras de tumores de mama mediante expresión génica, expresión de miARN, mutaciones somáticas de ADN, estado de

metilación del ADN y aberraciones en el número de copias de ADN. Los 10 genes más frecuentemente mutados fueron TP53 (37% de los casos), PIK3CA (36%), GATA3 (11%), MAP3K1 (8%), MLL3 (7%), CDH1 (6.5%), MAP2K4 (4%), RUNX1 (3.5%), PTEN (3.4%) y TBX3 (2.5%). Los subtipos intrínsecos de cáncer de mama mostraron diferencias significativas en la distribución de estas mutaciones. Así, el 80% de los tumores *basal-like* mostraron mutaciones somáticas de TP53, 72% de los HER2-enriched, 32% de los luminal B y 12% de los luminal A. En cambio, mutaciones en PIK3CA se encontraron en 45% de los tumores luminal A, y sólo en un 9% de los *basal-like*.

Desde 2011, el consenso de expertos internacionales de St. Gallen adoptó una aproximación a estos subtipos intrínsecos, basándose en los hallazgos patológicos, para recomendar tratamientos complementarios en el cáncer de mama precoz. Aunque el panel de expertos reconoce que las plataformas moleculares de expresión multigénica son más exactas, estas no están disponibles de forma generalizada para todas las pacientes. La tabla 2 recoge los subtipos intrínsecos subrogados, recomendados por el panel de expertos de St. Gallen, para realizar clasificación pronóstica y ayudar en las decisiones terapéuticas, en los casos en los que no sea posible realizar el análisis molecular<sup>24</sup>.

Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados en los últimos años para mejorar las definiciones subrogadas de los subtipos intrínsecos, éstas siguen siendo subóptimas.



Tabla 2. Subtipos intrínsecos subrogados basados en inmunohistoquímica<sup>24</sup>

Subtipo intrínseco	Definición clínico-patológica surrogada
Luminal A	“Luminal A like” <i>RE positivo</i> <i>HER2 negativo</i> <i>Ki 67 bajo*</i> <i>RP alto**</i> <i>Bajo riesgo en perfil molecular (si disponible)</i>
Luminal B	“Luminal B like (HER2 positivo)” <i>RE positivo, HER2 negativo y Ki 67 bajo o RP alto.</i> <i>Alto riesgo en perfil molecular (si disponible).</i>  “Luminal B like (HER2 negativo)” <i>RE positivo HER2 positivo, independientemente de Ki 67 y RP.</i>
HER2	“HER2 no luminal” <i>Expresión de HER2</i> <i>Ausencia de expresión de RE y RP</i>
Basal like	Triple negativo (ausencia de expresión de RE, RP y HER2)

\*Los valores de Ki-67 deberían ser evaluados a la luz de los valores del laboratorio local: por ejemplo, si el laboratorio tiene un valor medio de Ki 67 en RE positivo de 20%, valores  $\geq 30\%$  podrían considerarse claramente altos, y valores  $<10\%$  claramente bajos. \*\*Se sugiere un punto de corte para RP de 20%.

### 1.6.- Factores pronósticos y predictivos.

La identificación de **factores pronósticos** tiene un importante valor a la hora de determinar qué pacientes que presentan mayor riesgo de recaída tumoral y, por tanto, van a beneficiarse de un tratamiento adyuvante tras la cirugía. Los factores pronósticos son generalmente marcadores de proliferación, invasión y potencial de diseminación.

- Afectación ganglionar. La ausencia o presencia de afectación ganglionar axilar es el factor pronóstico independiente más importante en el cáncer de mama operado. Aunque la presencia de macrometástasis en los ganglios axilares es un factor pronóstico independiente bien establecido, está menos claro el significado pronóstico de la presencia de micrometástasis (afectación ganglionar  $\leq 2$  mm, pN1mi) o células tumorales aisladas (pN0(i+)).
- Tamaño tumoral.
- Tipo histológico. No existen diferencias pronósticas significativas entre el carcinoma ductal y lobulillar infiltrantes. Las formas histológicas de pronóstico favorable son: carcinoma tubular y tubulolobulillar, cribiforme invasivo, mucinoso, papilar, secretor y adenoide quístico.
- Grado histológico.

- e) Invasión vascular y linfática.
- f) Edad. La presencia de cáncer de mama en pacientes menores de 35 años se asocia a peor supervivencia. Estas pacientes suelen presentar tumores en estadios más avanzados y frecuentemente receptores hormonales negativos.
- g) Marcadores de proliferación. Varios estudios apoyan el valor pronóstico de Ki-67. Sin embargo, su validación clínica ha mostrado dificultades. Aunque los valores altos o bajos de Ki-67 son útiles clínicamente, no está claro cual es el punto de corte óptimo para tomar decisiones clínicas.
- h) Receptores hormonales. Los datos sugieren que la tasa anual de recaída durante los primeros 5 años es mayor para los tumores con receptores hormonales negativos en comparación con los tumores con receptores hormonales positivos.
- i) Sobreexpresión/Amplificación de HER2. En ausencia de terapia dirigida anti-HER2, la sobreexpresión de HER2 se asocia a peor pronóstico, tanto en pacientes con ganglios positivos como negativos. Varios estudios muestran que este valor pronóstico se mantiene incluso en tumores de pequeño tamaño ( $\leq 1$  cm).
- j) Plataformas moleculares de expresión génica. Tradicionalmente las decisiones sobre la administración de tratamiento adyuvante se han basado en las características histológicas del tumor (tamaño, grado, expresión de HER2 y RH, afectación ganglionar), así como las características individuales de la paciente (edad, estado menopáusico, situación funcional, comorbilidad), sin tener en cuenta las características “biológicas” del tumor. La sospecha de que esto podría suponer sobretratar a un significativo número de pacientes, y exponerlas a efectos secundarios de forma innecesaria, hizo que se desarrollaran nuevas herramientas (firmas génicas) con el fin de identificar aquellos tumores que presentan mejor pronóstico. Estas firmas han demostrado que, evaluando las características moleculares de cada tumor, podemos identificar a aquellas pacientes con cáncer de mama localizado que presentan bajo riesgo de recaída a distancia y en las que, por tanto, podríamos evitar la administración de quimioterapia adyuvante.

A continuación, se recogen las plataformas moleculares más utilizadas en la actualidad:

- **MammaPrint®**. Usa una plataforma de 70 genes para clasificar a las pacientes en estadio temprano de la enfermedad en 2 categorías de riesgo (alto o bajo riesgo de recidiva a distancia), utilizando la tecnología de *microarrays* de ADN<sup>25</sup>. Esta firma genética ha sido validada de forma prospectiva en un estudio fase III (MINDACT), en el que se incluyeron 6693 pacientes con carcinoma de mama precoz (T1-T3, con 0 a 3 ganglios axilares afectados). El estudio demostró que las pacientes con características clínicas de alto riesgo de recaída, pero perfil de expresión génica de bajo riesgo usando MammaPrint®, presentaban una supervivencia libre de recaída a distancia a 5 años de 94,7% a pesar de no haber recibido quimioterapia adyuvante. Por tanto, este test permite identificar pacientes que no se van a beneficiar de tratamiento con quimioterapia adyuvante<sup>26</sup>.
- **OncotypeDX®**. Esta firma génica se basa en la tecnología de RT-PCR (proceso de transcripción inversa seguida de PCR a tiempo real), y evalúa la expresión de 21 genes. El nivel de expresión de los genes se analiza y se obtiene un valor que se denomina *Recurrence Score* (RS de 0 a 100 puntos), que cuantifica el riesgo de recaída de la enfermedad. Aunque la aprobación del test se realizó en base a resultados de estudios retrospectivos<sup>27,28</sup>, la publicación reciente del ensayo clínico TAILORx confirma los buenos resultados de estudios previos. El TAILORx incluyó pacientes diagnosticadas de carcinoma de mama sin afectación axilar, con receptores hormonales positivos y HER2 negativo. Los resultados preliminares muestran una supervivencia libre de recaída a distancia de 99,3% en el subgrupo de bajo riesgo (RS menor de 11 puntos), que no recibió quimioterapia<sup>29</sup>. En el subgrupo de riesgo intermedio (RS 11-25 puntos), la supervivencia libre de enfermedad invasiva no fue inferior en las mujeres que recibieron sólo hormonoterapia adyuvante frente a las que recibieron quimioterapia y hormonoterapia. Sin embargo, en las mujeres menores de 50 años con RS entre 16 y 25 puntos la quimioterapia sí parece disminuir el riesgo de recaída<sup>30</sup>.

- Prosigna™/PAM 50. Es un análisis molecular de expresión génica de 50 genes, que permite clasificar el tumor en uno de los 4 subtipos intrínsecos (Luminal A, Luminal B, HER2-enriched y Basal-like), y aporta información del riesgo de recurrencia (*risk of recurrence, ROR*) a 10 años. Prosigna™ ha demostrado su valor pronóstico tras su validación retrospectiva en dos estudios independientes (TransATAC y ABCG-8)<sup>31,32</sup>.
- EndoPredict®. Este test está basado en la expresión de 12 genes. Presenta la peculiaridad de que incluye características clínicas como el tamaño tumoral o la presencia o ausencia de metástasis axilares, para clasificar a las pacientes en dos grupos de riesgo (alto y bajo)<sup>33,34</sup>.
- Breast Cancer Index (BCI). Es un perfil de expresión génica que evalúa 11 genes, que ha sido validado de forma retrospectiva en varios estudios<sup>35,36,37</sup>, demostrando ser una herramienta útil para predecir pronóstico, así como para evaluar el beneficio de tratamiento hormonal.

Para pacientes con tumores RE positivos y HER2 negativos, las firmas multi-génicas permiten identificar a un grupo de pacientes con muy buen pronóstico, para las cuales los escasos beneficios de la quimioterapia adyuvante no justifican los riesgos asociados a la misma. Sin embargo, las guías internacionales no recomiendan usar estas plataformas para tomar decisiones sobre la administración de quimioterapia adyuvante en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo o triple negativo<sup>38,39,40</sup>.

Los **factores predictivos** aportan información sobre la posibilidad de respuesta a una determinada terapia. Los únicos marcadores predictivos bien establecidos en cáncer de mama precoz hasta el momento son la expresión de receptor estrogénico (se asocia a respuesta a terapia hormonal) y la expresión de HER2 (se asocia a beneficio de terapias antiHER2). Datos recientes sugieren el valor predictivo de algunos test genómicos (especialmente Oncotype®)<sup>41</sup> para evaluar el beneficio de quimioterapia adyuvante en pacientes con receptores hormonales positivos.

## 1.7.- Tratamiento del cáncer de mama.

---

En general, las pacientes con estadios precoces son tratadas con resección del tumor primario (tumorectomía o mastectomía) y de los ganglios linfáticos (biopsia selectiva de ganglio centinela  $\pm$  linfadenectomía axilar), seguida o no de radioterapia complementaria. Una vez completado el tratamiento quirúrgico, se valorará la necesidad de tratamiento sistémico adyuvante (hormonoterapia y/o quimioterapia) en función los hallazgos anatómo-patológicos en la pieza quirúrgica.

La evidencia fundamental para apoyar el uso de tratamientos adyuvantes en cáncer de mama proviene de los meta-análisis del *Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group* (EBCTCG), que periódicamente realiza un meta-análisis revisando los datos disponibles en tratamiento adyuvante de cáncer de mama. El último meta-análisis del EBCTCG publicado mostraba una reducción significativa del riesgo de recaída y muerte para pacientes que recibían quimioterapia basada en antraciclinas frente a las que no recibían quimioterapia adyuvante<sup>42</sup>.

Así mismo, el meta-análisis mostraba que la incorporación de taxanos (Paclitaxel o Docetaxel) a esquemas con antraciclinas, se asocia a una reducción significativa del riesgo de recaída y muerte frente a esquemas que sólo utilizan antraciclinas<sup>42</sup>. Estos datos, así como los resultados de varios estudios fase III que confirman el beneficio de la adición de taxanos a los esquemas con antraciclinas<sup>43,44,45,46</sup>, han convertido a esta combinación en el tratamiento adyuvante estándar en pacientes con alto riesgo de recaída. Varios esquemas de quimioterapia, que combinan ambos fármacos, son recomendados por las guías internacionales<sup>83</sup> para el tratamiento adyuvante (Tabla 3).

Varios ensayos clínicos y meta-análisis han demostrado que la hormonoterapia adyuvante mejora la supervivencia en mujeres con cáncer de mama no metastásico con receptores hormonales positivos. Por ello, existe un consenso unánime sobre la indicación de hormonoterapia en estas pacientes, así como su falta de utilidad en tumores con receptores hormonales negativos<sup>47,48</sup>.

Tabla 3. Esquemas de quimioterapia adyuvante con antraciclinas y taxanos

AC (4 ciclos) → Paclitaxel semanal (12 semanas)	- Adriamicina: 60 mg/m <sup>2</sup> día 1, cada 21 días. - Ciclofosfamida: 600 mg/m <sup>2</sup> día 1, cada 21 días. ↓ - Paclitaxel: 80 mg/m <sup>2</sup> /semana.
AC dosis densas (4 ciclos) → Paclitaxel semanal (12 semanas):	- Adriamicina: 60 mg/m <sup>2</sup> día 1, cada 14 días. - Ciclofosfamida: 600 mg/m <sup>2</sup> día 1, cada 14 días. ↓ - Paclitaxel: 80 mg/m <sup>2</sup> /semana.
AC (4 ciclos) → Docetaxel (4 ciclos):	- Adriamicina: 60 mg/m <sup>2</sup> día 1, cada 21 días. - Ciclofosfamida: 600 mg/m <sup>2</sup> día 1, cada 21 días. ↓ - Docetaxel 100 mg/m <sup>2</sup> día 1 cada 21 días.
TAC (6 ciclos):	- Adriamicina: 50 mg/m <sup>2</sup> día 1, cada 21 días. - Ciclofosfamida: 500 mg/m <sup>2</sup> día 1, cada 21 días. - Docetaxel: 75 mg/m <sup>2</sup> día 1, cada 21 días.
FEC (3 ciclos) → Docetaxel (3 ciclos):	- Epirrubicina: 100 mg/m <sup>2</sup> día 1, cada 21 días. - Ciclofosfamida: 500 mg/m <sup>2</sup> día 1, cada 21 días. - 5 FU: 500 mg/m <sup>2</sup> día 1, cada 21 días. ↓ - Docetaxel 100 mg/m <sup>2</sup> día, cada 21 días.
FEC (4 ciclos) → Paclitaxel (8 semanas):	- Epirrubicina: 90 mg/m <sup>2</sup> día 1, cada 21 días. - Ciclofosfamida: 500 mg/m <sup>2</sup> día 1, cada 21 días. - 5 FU: 500 mg/m <sup>2</sup> día 1, cada 21 días. ↓ - Paclitaxel: 100 mg/m <sup>2</sup> /semana (8 semanas).

La quimioterapia preoperatoria (también denominada neoadyuvante) se asocia con tasas elevadas de respuesta, que favorecen la realización de cirugía con mejor resultado cosmético, aunque no ha demostrado aumentar la SLE ni la SG respecto a la quimioterapia adyuvante<sup>47,48</sup>. Aunque inicialmente la quimioterapia preoperatoria se desarrolló con intención de reducir el tamaño tumoral y poder resear tumores localmente avanzados irreseables, con el paso de los años se ha convertido en un tratamiento habitual en pacientes con tumores operables, con el objetivo de conseguir mejores resultados estéticos y reducir el número de mastectomías realizadas.

En el caso del cáncer de mama, la quimioterapia se asocia a elevadas tasas de respuesta, incluso de respuesta completa patológica (RCp). La definición más aceptada en la actualidad de RCp requiere la ausencia de tumor residual infiltrante en la mama y en la axila (ypT0/is ypTN0), tras la quimioterapia neoadyuvante. La

presencia de carcinoma *in situ* residual en la pieza no parece tener impacto en el riesgo de recaída a distancia.

Las pacientes que alcanzan RCp tras quimioterapia preoperatoria presentan mejor SLE y SG que aquellas en las que persiste enfermedad residual en la pieza quirúrgica. Esto supone una importante información sobre la quimiosensibilidad tumoral, así como información pronóstica respecto a la evolución de la enfermedad, lo que ha llevado a la *Food and Drug Administration* (FDA) a aceptar la RCp como un objetivo primario adecuado para el registro de nuevas terapias en estudios de quimioterapia preoperatoria en tumores HER2 positivos y triple negativos<sup>51</sup>.

Recientemente se ha postulado que mujeres con carcinoma de mama en estadios iniciales HER2 positivo o triple negativo, que van a recibir quimioterapia adyuvante por dicha histología, se beneficiarían de recibir dicho tratamiento en el escenario neoadyuvante debido a la elevada tasa de RCp observada en estos subtipos<sup>51</sup>. Muchos autores consideran que la quimioterapia preoperatoria debería ser el tratamiento de elección en carcinoma de mama estadio II-III e histología triple negativa o HER2 positiva<sup>52</sup>.

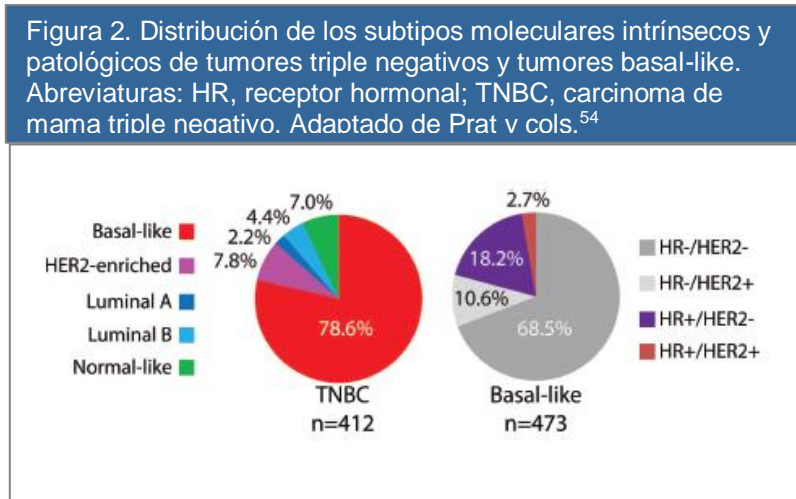
## **2.- CARCINOMA DE MAMA TRIPLE NEGATIVO.**

---

El cáncer de mama triple negativo (CMTN) es una enfermedad heterogénea que se define por la ausencia de expresión de receptores de estrógeno y progesterona, así como la ausencia de sobreexpresión/amplificación de HER2. El CMTN, que es un concepto anatomo-patológico, supone alrededor del 15%-20% de todos los carcinomas infiltrantes de mama. Tradicionalmente hemos utilizado los conceptos Triple Negativo y *Basal-like* de forma intercambiable. Sin embargo, se ha comprobado que dentro del grupo de CMTN pueden identificarse todos los subtipos moleculares, aunque la gran mayoría (75%-80%) corresponden a tumores *Basal-like*<sup>53,54,55</sup>. Varios estudios sugieren que la expresión de citoqueratinas CK5/6 y factor de crecimiento epidérmico (EGFR /HER1) en tumores triple negativos se asocia a fenotipo basal<sup>56,57,58</sup>.

Prat y cols. analizaron, mediante PAM50, 421 tumores triple negativos por IHQ, y encontraron que el 78,6% de ellos se correspondían con subtipo intrínseco basal-

like (7,8% *HER2-enriched*, 6,6% luminal y 7,0% *normal-like*). Por el contrario, de los 473 tumores subtipo *basal-like*, sólo el 68,5% eran triple negativos por IHQ<sup>54</sup>. (Figura 2).



En el análisis del proyecto *The Cancer Genome Atlas (TCGA)* se incluyeron 81 carcinomas de mama basal-like (65 de los cuales eran además triple negativos). Este estudio mostró una elevada frecuencia de mutaciones en TP53 (80%) en los tumores basal-like, lo que sugiere que una pérdida de función de TP53 ocurre en la mayoría de estos tumores. Esta publicación también mostró que la pérdida / mutación de BRCA1 y la pérdida de retinoblastoma 1 (RB1) son frecuentes en estos tumores, así como la activación de la vía PI3K (bien por mutación del gen PIK3CA o por pérdida de los reguladores negativos INPP4B y/o PTEN). En este estudio también se comprobó una similitud genética entre los carcinomas de mama basal-like y los carcinomas serosos de ovario (elevada frecuencia de mutaciones ATM y TP53, elevada expresión de AKT3 y MYC, inactivación de BRCA1 y BRCA2, y amplificación de ciclina E1)<sup>23</sup>.

Hasta el 20% de los CMTN presentan mutaciones en el gen BRCA, especialmente en BRCA1, mientras que menos del 6% de los carcinomas de mama se asocian a mutación de BRCA. El 90% de los tumores con mutación de BRCA1 son triple negativos.



## 2.1.- Historia Natural y comportamiento clínico del CMTN.

---

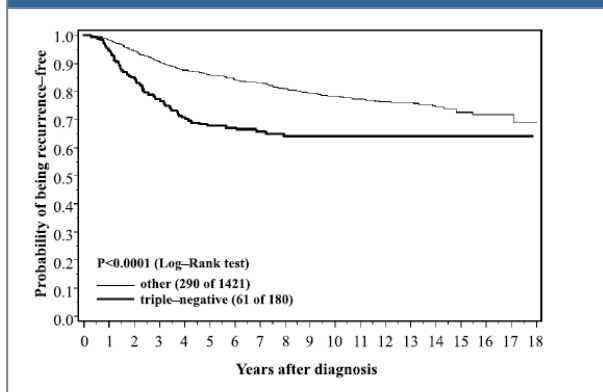
Las pacientes con CMTN presentan mayor riesgo de recaída, tanto local como a distancia, y las metástasis suelen ocurrir más frecuentemente a nivel visceral que a nivel óseo, a diferencia de otros subtipos histológicos<sup>59,60,61,62,63</sup>. Harrell y cols. encontraron que el pulmón y el sistema nervioso central eran la primera localización de metástasis en pacientes con tumores triple negativos, mientras que en tumores HER2 positivos la localización más frecuente fue el hígado y en tumores RE positivos fue el hueso<sup>60</sup>. Resultados concordantes mostró el estudio de Smid y cols. que, tras analizar la relación entre los subtipos moleculares de cáncer de mama y el lugar de recaída, encontraron que las metástasis pulmonares y cerebrales eran significativamente más frecuentes en el subtipo basal que en los subtipos luminales<sup>59</sup>.

Los CMTN son generalmente tumores de alto grado<sup>64,65</sup>, y el subtipo histológico más frecuente es el carcinoma ductal infiltrante. Otros tipos histológicos poco frecuentes, como el carcinoma medular o el carcinoma metaplásico, suelen ser también triple negativos. En un análisis de 426 CMTN realizado por Pogoda y cols.<sup>66</sup>, el 82% de los casos resultaron ser carcinomas ductales, 5% lobulillares, 4% metaplásicos, 2,3% medulares, 1,6% apocrinos, 0,9% neuroendocrinos, 0,5% cribiformes y 0,5% mucinosos. En esta serie, la supervivencia a 5 años, fue inferior para el carcinoma ductal que para otros subtipos histológicos (100% para los subtipos medular, apocrino y neuroendocrino)<sup>66</sup>. Otros estudios también han mostrado una mejor supervivencia para los subtipos medular<sup>67</sup> y adenoide quístico<sup>68</sup> en comparación con carcinomas ductales infiltrantes triple negativos.

El CMTN tiende a aparecer en mujeres más jóvenes<sup>63,64,69</sup>, y tiene un curso clínico agresivo, siendo el tumor de mama de peor pronóstico<sup>65</sup>. Dent y cols. analizaron la evolución clínica de 1601 pacientes con cáncer de mama (11% de ellas tenían tumores triples negativos). La tasa de recaída a distancia fue significativamente mayor en el grupo con tumores triple negativos (34% frente a 20%;  $p < 0,0001$ ), así como la probabilidad de muerte a 5 años (Hazard ratio 3,2; IC 95% 2,3-4,5;  $p < 0,0001$ )<sup>64</sup>.

La mayoría de las recaídas ocurren en los tres primeros años desde el diagnóstico<sup>64,70,71</sup>, y las pacientes que no recaen en estos primeros años muestran un pronóstico similar a las que tienen tumores RE positivos. En el estudio de Dent y cols<sup>64</sup>, referido previamente, el tiempo a la recaída a distancia fue significativamente menor en los tumores triple negativos (2,6 años versus 5,0 años;  $p < 0,0001$ . Figura 3), ocurriendo el 70% de las muertes en mujeres con CMTN en los primeros 5 años tras la cirugía. No se observaron recaídas a distancia después de los 8 años del diagnóstico, mientras que en el grupo RE positivos se produjeron recaídas incluso 17 años después del diagnóstico<sup>64</sup>.

Figura 3. Supervivencia libre recaída a distancia en CMTN versus carcinoma de mama no triple negativo. Adaptado de Dent y cols<sup>64</sup>



El microambiente tumoral, y más concretamente la infiltración linfocitaria peritumoral, han sido relacionados con la supervivencia y la respuesta a los tratamientos oncológicos. La expresión de linfocitos infiltrantes de tumores (TILs), determinada mediante IHQ, ha demostrado tener valor pronóstico y predictivo de respuesta, tanto en adyuvancia<sup>72,73,74,75,76</sup> como en neoadyuvancia<sup>77,78</sup> de cáncer de mama, especialmente en CMTN y tumores HER2 positivos<sup>72,79</sup>. Los TILs, tanto estromales como intratumorales, se asocian con tumores de alto grado, receptores hormonales negativos y elevada expresión de Ki-67. Se estima que un 70% de los CMTN contienen  $\geq 20\%$  de TILs en el estroma tumoral<sup>72</sup>.

Varios estudios han mostrado que la presencia de TILs se asocia a mayor probabilidad de alcanzar RCp tras quimioterapia preoperatoria<sup>77,78,80</sup>, menor riesgo de recaída a distancia y mejor supervivencia<sup>73,74,76</sup>.

A pesar de que varios estudios han demostrado el valor pronóstico de la presencia del TILs, en pacientes con CMTN tratado con quimioterapia adyuvante basada en antraciclinas<sup>81</sup>, las guías clínicas y los grupos de expertos no recomiendan usarlos como base para la toma de decisiones<sup>24,82</sup>.

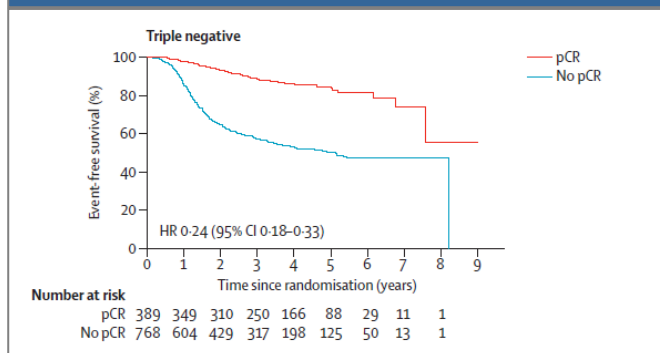
## 2.2.- Tratamiento adyuvante y neoadyuvante en CMTN.

---

El uso de quimioterapia adyuvante se recomienda en todas las mujeres con CMTN y tamaño tumoral  $\geq 0,5$  cm o ganglios positivos (independiente del tamaño tumoral)<sup>83</sup>. La ausencia de expresión de receptores hormonales y HER2 hace que estas pacientes no se beneficien de tratamiento hormonal ni de terapias antiHER2. En el momento actual no existe ninguna terapia específica para este tipo de tumores, por lo que el tratamiento adyuvante se basa en el uso de quimioterapia basada en antraciclinas y taxanos<sup>84</sup>, al igual que el resto de carcinomas de mama con alto riesgo de recaída. Esta quimioterapia estándar es muy eficaz en un subgrupo de pacientes con CMTN, y la identificación de estas pacientes, así como de las que tienen menos probabilidades de responder a estas terapias, tendrá impacto en los tratamientos elegidos y en los resultados finales.

La quimioterapia preoperatoria en CMTN se asocia a elevadas tasa de RCp (30-40%)<sup>85,86,87</sup>. Sin embargo, las pacientes que no alcanzan RCp tienen un alto riesgo de recaída tumoral precoz y un pobre pronóstico. Varios estudios recientes<sup>70,85</sup> y meta-análisis<sup>42</sup> muestran una mayor supervivencia en aquellos pacientes en los que la quimioterapia neoadyuvante consigue erradicar por completo el tumor. El *CTNeoBC pooled analysis*<sup>85</sup>, que analizó casi 12.000 pacientes incluidos en 12 ensayos de quimioterapia preoperatoria, mostró que la RCp (ypT0/is ypN0) se asociaba de forma significativa con una mejor supervivencia libre de evento y SG. Esta asociación fue especialmente fuerte en CMTN (HR para supervivencia libre de evento: 0,24; IC 95% 0,18-0,33; Figura 4. HR para SG: 0,16, IC 95% 0,11-0,25) y tumores HER 2 positivos con receptores hormonales negativos (HR para supervivencia libre de evento: 0,15; IC 95% 0,09-0,27. HR para SG: 0,08; IC 95% 0,03-0,22).

Figura 4. Asociación entre RCp y supervivencia libre de evento en CMTN. Adaptado de Cortazar y cols.<sup>83</sup>



El subtipo intrínseco de cáncer de mama ha demostrado asociarse con la probabilidad de alcanzar RCp tras quimioterapia preoperatoria. Prat y cols. analizaron retrospectivamente casi mil muestras de tumor de pacientes tratadas con quimioterapia neoadyuvante, y encontraron una tasa de RCp de 6%, 16%, 37% y 38% para los subtipos Luminal A, Luminal B, HER 2-*enriched* y *Basal-like* respectivamente. En el análisis multivariante, el subtipo intrínseco se asoció de forma independiente con la RCp, después de haber ajustado por edad, tamaño tumoral, grado, expresión de HER2, expresión de receptores hormonales y estudio<sup>88</sup>.

Varios estudios realizados en CMTN, tanto en enfermedad avanzada<sup>90</sup> como en estadios iniciales, sugieren un beneficio del uso de sales de platino en esta subpoblación de pacientes. BRCA1 y BRCA2 son genes supresores, que participan directamente en la reparación de las roturas de la doble cadena de ADN mediada por recombinación homóloga. Las sales de platino son citostáticos que se unen directamente al ADN, dando lugar a entrecruzamientos que impiden la división celular. El interés en la quimioterapia basada en platino en el CMTN se basa en la hipótesis de una mayor susceptibilidad de los tumores con disfunción de la reparación de ADN mediada por recombinación homóloga a los agentes citostáticos que actúan dañando el ADN. Un estudio analizó, en 1824 pacientes con CMTN no seleccionadas por historia familiar, la presencia de mutaciones germinales en 17 genes asociados con predisposición familiar a cáncer. Se encontró que 16,6% de las pacientes presentaban mutación germinal en alguno de estos genes (8,5% en BRCA1, 2,7% en BRCA2 y 3,7% en otros genes)<sup>90</sup>.

El *Triple Negative Breast Cancer (TNT) Trial* comparó, en primera línea de enfermedad avanzada, docetaxel frente a carboplatino. En el global de la población con CMTN no se observaron diferencias significativas en tasa de respuestas objetivas (31,4% frente a 35,6%;  $p=0,44$ ). Sin embargo, en el subgrupo de tumores con mutación germinal de BRCA, la tasa de respuestas se duplicó con el uso de carboplatino frente a docetaxel (68% frente a 33%;  $p=0,03$ ), lo que supuso un beneficio en supervivencia libre de progresión (6,8 frente a 3,1 meses;  $p=0,03$ )<sup>91</sup>.

Dos estudios aleatorizados (GeparSixto, CALGB 40603)<sup>92,93</sup> han evaluado el beneficio de añadir sales de platino a la quimioterapia preoperatoria. El estudio GeparSixto, que incluyó 315 pacientes con CMTN, demostró una mayor tasa de RCp en las pacientes que recibían carboplatino semanal (53% frente a 37%;  $p = 0,005$ )<sup>90</sup>, lo que se tradujo en un beneficio significativo en SLE<sup>94</sup>. En el estudio CALGB 40603 la administración de carboplatino aumentó la tasa de RCp<sup>93</sup>, pero este hallazgo no supuso un beneficio en SLE ni en SG, a diferencia del GeparSixto<sup>95</sup>.

Recientemente, Sharma y cols.<sup>96</sup> han sugerido la posibilidad de evitar la toxicidad asociada a antraciclinas en esta población, usando un esquema de quimioterapia basado en la combinación de carboplatino con docetaxel. Este esquema mostró resultados prometedores con una elevada tasa de RCp (superior al 50%) en las 190 pacientes con CMTN estadios I-III incluidas en el análisis,

Varios estudios fase III están en marcha en la actualidad, con el objetivo de evaluar el verdadero impacto en supervivencia de añadir sales de platino a la quimioterapia adyuvante / neoadyuvante en pacientes con CMTN, así como conocer la dosis y secuencia óptima de tratamiento.

La reciente publicación del estudio CREATE-X<sup>97</sup>, que exploraba el beneficio de Capecitabina adyuvante en pacientes que no habían alcanzado RCp tras quimioterapia adyuvante basada en antraciclinas y/o taxanos, muestra un beneficio significativo en SLE y SG al añadir dicho fármaco tras la cirugía. En el subgrupo de pacientes con tumores triple negativo, que suponían 32% del total de la muestra, se observó un aumento de SLE con Capecitabina, que se tradujo en un beneficio significativo en SG (79% frente a 70%, HR 0,52; IC 95% 0,30-0,90).

A pesar de un adecuado tratamiento con quimioterapia basada en antraciclinas y taxanos, hasta un 30-40% de las pacientes con CMTN en estadio precoz van a recaer y fallecer como consecuencia de la enfermedad. Por este motivo, se están investigando nuevas estrategias de tratamiento que disminuyan la mortalidad de estas pacientes.

Las Poli-ADP ribosa polimerasas (PARP) son enzimas que reconocen el daño en el ADN y facilitan la reparación del mismo, manteniendo la estabilidad genómica. Los inhibidores de PARP (iPARP) han mostrado actividad en tumores con defectos preexistentes en la reparación de ADN, especialmente en carcinomas de mama y ovario con mutación de BRCA. Un estudio fase III recientemente publicado (OlympiAD) ha demostrado un aumento significativo de la supervivencia libre de progresión con el uso de Olaparib en 302 pacientes con cáncer de mama metastásico HER2 negativo (50% de ellos eran CMTN) y mutación de BRCA<sup>96</sup>. Varios estudios en marcha pretenden demostrar el beneficio de estos fármacos en pacientes con mutación de BRCA en el contexto de la adyuvancia / neoadyuvancia<sup>99,100,101</sup>.

Por otra parte, la elevada inestabilidad genómica y carga mutacional<sup>102,103,104</sup> que presentan los CMTN hace que estos tumores tengan mayor inclinación a formar neoantígenos y, por tanto, se puedan beneficiar del uso de inmunoterapia. Los resultados prometedores observados en enfermedad avanzada con el uso de inmunoterapia<sup>105, 106,107,153</sup> avalan la puesta en marcha de estudios en estadios más iniciales.

Otras estrategias terapéuticas han demostrado beneficio en mujeres con CMTN y enfermedad avanzada, como es el caso de la terapia antiandrogénica<sup>108,109,110</sup>, los anticuerpos anti-Trop-2<sup>111</sup>, los anticuerpos dirigidos contra la glicoproteína no metastásica B (gpNMB)<sup>112</sup>, y las terapias dirigidas a la inhibición de la vía PI3K/AKT/mTOR<sup>113</sup>.

### 2.3.- Subtipos moleculares en CMTN.

---

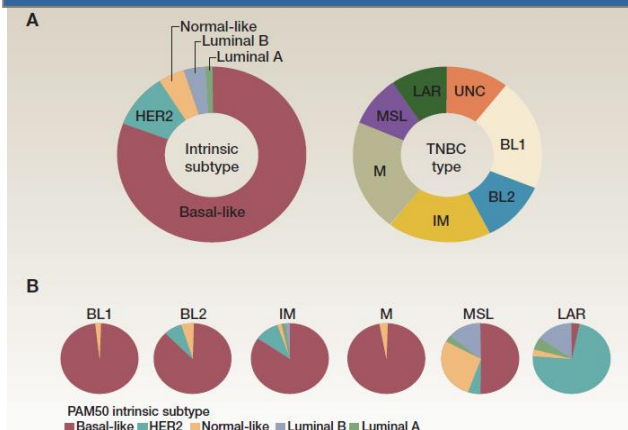
Tradicionalmente el CMTN ha sido considerado una entidad clínica única y se ha tratado con quimioterapia de forma uniforme. Sin embargo, los estudios moleculares han mostrado una elevada heterogeneidad en este tipo de tumores. En los últimos años han surgido subclasificaciones dentro de los CMTN basadas en perfiles de expresión génica. La más aceptada es la publicada por Lehmann y cols. que describieron 6 subtipos moleculares de CMTN<sup>114</sup>: dos *Basal-like* (BL1 and BL2), un inmunomodulador (IM), un mesenquimal (M), un mesenquimal *stem-like* (MSL) y un subtipo luminal con receptor androgénico (LAR). Con el fin de descifrar la heterogeneidad molecular de los CMTN, Lehman realizó un meta-análisis de 21 bases de datos y analizó 587 tumores triple negativos y comprobó que:

- Subtipo *basal-like* BL1: es rico en componentes de la vía de división celular, así como de las vías de reparación de ADN (ATR/BRCA).
- Subtipo *basal-like* BL2: muestra genes implicados en las vías de señalización del factor de crecimiento (Vía EGF, vía NGF, vía MET, Wnt/ $\beta$ -catenina y vía IGF1R), la glucólisis y la gluconeogénesis y la expresión de marcadores mioepiteliales (TP63 y MME).
- Subtipo IM: presenta genes implicados en los procesos celulares inmunitarios y las vías de transducción de señales inmunes.
- Subtipos M y MSL: se caracterizan por la elevada expresión de genes implicados en la diferenciación celular y la transición epitelio-mesénquima. El subtipo MSL expresa bajos niveles de genes de proliferación y está enriquecido con genes asociados con las *stem-cell* mesenquimales.
- Subtipo LAR: presenta expresión génica de patrón luminal, con elevada expresión de genes implicados en la síntesis de esteroides y el metabolismo andrógeno / estrógeno, incluyendo niveles altos de receptor de andrógeno.

Lehman y cols. evaluaron posteriormente, en 374 muestras de CMTN, la relación entre estos subtipos moleculares y los subtipos intrínsecos analizados por PAM50 (Figura 5). Encontraron que los subtipos BL1, BL2, IM y M, estaban compuestos mayoritariamente por el subtipo intrínseco basal-like (99%, 95%, 84% y 97% respectivamente). Por el contrario, en el subtipo LAR, el 74% de los casos eran HER2-enriched y el 14% luminal B cuando se analizaban con PAM50<sup>53</sup>.



Figura 5. Comparación entre subtipo molecular y subtipo intrínseco. Adaptado de Mayer y cols<sup>115</sup>.



Recientemente, el mismo grupo<sup>116</sup> ha redefinido el CMTN, clasificando estos tumores en sólo 4 subtipos (TNBCtype-4: BL1, BL2, M y LAR), tras comprobar que los subtipos IM y MSL simplemente representan tumores con considerable infiltración linfocitaria y células mesenquimales asociadas a tumor respectivamente. Lehmann y cols. analizaron, de forma retrospectiva, 592 muestras de tumores triple negativos usando PAM50, y comprobaron que la mayoría de ellos (77%) eran tumores basales. Por otra parte, clasificaron estos mismos tumores en función de los 4 subtipos descritos previamente, con la siguiente distribución: 35% eran BL1, 22% BL2, 25% M, 16% LAR y 2% inclasificados. Cuando analizaron la relación entre las características clínico-patológicas de los tumores y cada subtipo, comprobaron que los tumores BL1 solían ser tumores de alto grado. Por el contrario, los tumores LAR eran mayoritariamente tumores de bajo grado, frecuentemente luminales cuando se analizaban con PAM50, y aparecían a edades más tardías que el resto de CMTN. La incidencia de metástasis óseas fue significativamente mayor en el subtipo LAR que en los otros subtipos (46% versus 16%;  $p = 0,046$ ). En cuanto a los subtipos histológicos poco frecuentes, se comprobó que prácticamente todos los carcinomas lobulillares infiltrantes eran LAR, los carcinomas metaplásicos eran BL2 o M, y los carcinomas medulares eran BL1, BL2 o LAR.

En 2014, investigadores de la Universidad de Baylor propusieron otra clasificación molecular del los CMTN<sup>117</sup>. Analizaron 198 muestras de tumores triple negativos, mediante perfiles de ADN y expresión de ARNm, e identificaron 4 subtipos: LAR,



mesenquimal (MES), *basal-like* inmunosuprimido (BLIS) y *basal-like* inmunoactivo (BLIA). El subtipo BLIS se asoció a peor pronóstico y el BLIA fue el de mejor pronóstico. Los autores compararon sus resultados con los de Lehman y cols.<sup>53</sup>, y comprobaron que los subtipos LAR eran idénticos en ambas clasificaciones, y que la mayoría de los tumores MSL y M estaban incluidos en el subtipo MES de la clasificación de Baylor. Los subtipos BL1 y BL2 de la clasificación de Lehman se distribuían dentro de los subtipos BLIS y BLIA, mientras que el IM se correspondía con tumores MES y BLIA.

Un estudio francés analizó 194 muestras de CMTN mediante perfiles de expresión génica<sup>118</sup> y encontró 3 subtipos moleculares: C1 (luminal AR), C2 (*basal-like* con respuesta inmune baja) y C3 (*basal-like* con elevada respuesta inmune). Los autores encontraron que el subtipo C1 era similar al subtipo LAR de las clasificaciones de Vanderbilt y Baylor, y se relacionaba con tumores de bajo grado. El subtipo C2 se correspondía en su mayoría con tumores basales, y el C3 mostraba similitudes con el subtipo IM de la clasificación de Lehman y con el subtipo BLIA de Baylor.

Estudios recientes demuestran que la respuesta a quimioterapia neoadyuvante en CMTN varía en función del subtipo molecular. Un análisis de 130 pacientes con CMTN tratadas en el MD Anderson con quimioterapia preoperatoria basada en antraciclinas y taxanos, mostró que el subtipo BL1 presentaba la tasa de RCp más elevada (52%), mientras que el subtipo BL2 presentaba la tasa más baja (0%). El subtipo LAR se asoció a escasas RCp (10%) y a recaídas tardías (75% ocurrieron después del tercer año), como era esperable por tratarse de tumores mayoritariamente luminales, lo cual no implicó menor supervivencia<sup>119</sup>.

Lehmann y cols. analizaron, de forma retrospectiva, la respuesta a quimioterapia neoadyuvante de 176 tumores triple negativos. La tasa de RCp fue significativamente mayor en el subtipo molecular BL1, en comparación con el resto de subtipos. Los subtipos BL2 y LAR fueron los que presentaron menor tasa de RCp. Estos resultados sugieren la necesidad de seguir investigando en esta línea para identificar subtipos moleculares con valor predictivo de respuesta a quimioterapia preoperatoria<sup>62</sup>.

A pesar de los recientes avances en la subclasificación molecular del CMTN, su uso para la toma de decisiones en la práctica clínica diaria es todavía un reto, de-

bido a la complejidad de las firmas génicas empleadas en los estudios publicados hasta la fecha. La clasificación inicial presentada por Lehman y cols. se basaba en el análisis de un total de 2188 genes<sup>114</sup>. Recientemente el mismo grupo ha mostrado que el número de genes analizados podría reducirse a 101 con resultados similares<sup>120</sup>, mientras que la subclasificación de Baylor analiza 80 genes. Por otra parte, los estudios publicados hasta la fecha no aportan información pronóstica que nos permita identificar qué pacientes se benefician de recibir quimioterapia y cuáles podrían evitar dicho tratamiento por su mejor pronóstico. Por ejemplo, en lo referente al subtipo LAR, los resultados son contradictorios con un estudio que sugiere mejor pronóstico para este subtipo y otro que muestra una tendencia a peor supervivencia<sup>75</sup>.

Se necesitan nuevos estudios que identifiquen marcadores pronósticos que establezcan qué pacientes con CMTN presentan un buen pronóstico y, por tanto, podrían no necesitar quimioterapia con antraciclinas y taxanos. Por otro lado, también sería importante un marcador que identificara qué pacientes presentan elevado riesgo de recaída tumoral, incluso tras tratamiento con antraciclinas y taxanos, y podrían beneficiarse de terapias dirigidas contra nuevas dianas.

### **3.- APLICACIÓN DE LA PROTEÓMICA AL ESTUDIO DEL CÁNCER**

---

El ADN constituye la información genómica. Sin embargo, el ADN no es capaz de ejecutar esta información que almacena, sino que esta es transferida a las proteínas, que son las que verdaderamente ejecutan las funciones recogidas en dicha información genética. El ARN es la molécula “puente” que actúa transmitiendo la información recogida en el ADN para que sea ejecutada por las proteínas. El ARN mensajero (ARNm) informa sobre las actividades relacionadas con los genes, es decir, la expresión de proteínas y las funciones en las que estas están implicadas. El sufijo “ómica” se utiliza en Biología Molecular para referirse al estudio de la totalidad o del conjunto de algo. De esta forma han surgido los términos genómica (que estudia los datos relativos al ADN), transcriptómica (ARN), y proteómica (proteínas).

La proteómica presenta varias ventajas respecto a la genómica. La proteómica permite estudiar interacciones proteína-proteína, identificar variantes de proteínas no identificadas mediante el estudio del genoma y, probablemente, refleja mejor el microambiente tumoral que el estudio del genoma.

Es sabido que las alteraciones moleculares de un tumor condicionan de forma significativa su respuesta al tratamiento, lo que en los últimos años nos ha ayudado a buscar terapias dirigidas contra algunas de estas alteraciones. La proteómica aplicada al estudio del cáncer permite identificar marcadores de diagnóstico, pronóstico, e incluso posibles dianas terapéuticas. De hecho, la medición de la expresión de proteínas se usa en la práctica clínica diaria como marcador pronóstico y predictivo de respuesta para tratamientos hormonales y anti-HER2 en cáncer de mama, mediante estudio de receptores de estrógeno, progesterona y HER2 por inmunohistoquímica. Por otra parte, es conocido que en la mayoría de los tumores la sensibilidad de las células tumorales a fármacos no depende de un único gen sino de un conjunto de alteraciones genómicas, que podrían ser identificadas mediante proteómica.

Por tanto, tanto la genómica como la proteómica pueden ayudarnos a identificar posibles dianas terapéuticas para pacientes con cáncer.

En los últimos años se han llevado a cabo algunos estudios para identificar perfiles proteicos en CMTN<sup>121,122,123</sup>. Liu y cols.<sup>121</sup> validaron hace unos años la primera firma proteómica, basada en la expresión de 11 proteínas, como posible marcador pronóstico en mujeres con CMTN, ganglios negativos y que no habían recibido quimioterapia adyuvante. Gámez-Pozo y cols. también han presentado recientemente una firma proteómica, con valor predictivo de respuesta a quimioterapia adyuvante en CMTN<sup>123</sup>.

A pesar de los importantes avances obtenidos mediante la proteómica en los últimos años, y de las perspectivas prometedoras, siguen existiendo algunos obstáculos que limitan su uso rutinario en la práctica clínica diaria. El desarrollo de nuevas técnicas de proteómica, que aporten información pronóstica y/o terapéutica de forma sencilla y fiable, ayudará a generalizar su uso en la rutina diaria del manejo de los pacientes con cáncer.

### 3.1.- Espectrometría de masas SWATH (SWATH-MS).

---

La espectrometría de masas (MS) es una herramienta analítica enfocada a la separación de especies moleculares y atómicas de acuerdo a su masa. Es una técnica en la que los átomos o moléculas de una muestra son ionizados, separados por su relación masa/carga y posteriormente detectados y registrados.

En los últimos años se han desarrollado diversos métodos en los que la MS se acopla a un sistema de separación eficaz, dando lugar a los denominados métodos acoplados. Dentro de ellos los más empleados son:

- a) Espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases (GC/MS).
- b) Espectrometría de masas acoplada a la cromatografía líquida (LC/MS). Es una tecnología más adecuada para el análisis de mezclas de compuestos poco volátiles solubles en disolventes orgánicos.
- c) Espectrometría de masas acoplada a electroforesis capilar (CE/MS).
- d) Espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Es una tecnología que permite el análisis de mezclas complejas en un tiempo muy corto. Se puede acoplar a un sistema cromatográfico, lo que ha dado lugar al desarrollo de la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).

En las últimas décadas, la LC-MS/MS se ha convertido en la tecnología de elección para la caracterización de alto rendimiento de proteínas y proteomas<sup>124</sup>. El análisis de proteomas completos se ha realizado tradicionalmente utilizando la denominada "Proteómica de Descubrimiento", a través de un método llamado Adquisición Dependiente de Datos (*Data Dependent Acquisition, DDA*), que ha sido la estrategia más utilizada durante los últimos 20 años, junto con la cromatografía líquida (LC). En el enfoque DDA, a medida que los compuestos eluyen desde la columna cromatográfica y entran en el espectrómetro de masas, el instrumento rápidamente los escanea todos y elige un subconjunto de esos compuestos, o precursores, para un análisis posterior. El instrumento se centra entonces en cada uno de esos precursores y lo fragmenta generando datos de MS/MS. A partir de los datos MS/MS, pueden conocerse las identidades de los compuestos. La selección de los iones que se fragmentan depende de algunos criterios previamente establecidos en el método y normalmente se eligen en función de su abundancia. Así,

por ejemplo, el método podría especificar que sólo los 20 iones más abundantes se fragmentan para cada ciclo. Este ciclo puede durar unos segundos mientras los 20 precursores son fragmentados, y luego el ciclo comenzará otra vez con un nuevo conjunto de precursores. A lo largo de la carrera cromatográfica, se generan datos de MS/MS a partir de los 20 precursores más abundantes que se están eluyendo en cada ciclo. Debido a que el subconjunto de precursores seleccionado depende de la composición precisa de la mezcla de compuestos que entran en el instrumento simultáneamente, el método DDA es bastante aleatorio. Como resultado, la reproducibilidad entre análisis puede verse afectada; no tienen por qué seleccionarse los mismos compuestos para MS/MS en cada análisis. Además, especialmente en muestras más complejas, hay mucho más de 20 compuestos que pueden eluir al mismo tiempo.

En contraste con el DDA tradicional, SWATH (*Sequential Windowed Acquisition of All Theoretical Fragment Ion Mass Spectra*) es una estrategia de Adquisición Independiente de Datos (*Data Independent Acquisition, DIA*). Con SWATH, cada analito detectable se fragmenta, no sólo un subconjunto. El flujo de trabajo de SWATH implica varios pasos. El primer paso implica la generación de una biblioteca espectral que es necesaria para identificar los péptidos adquiridos en las ejecuciones de SWATH-MS. La forma más simple de generar bibliotecas espectrales es el LC-MS/MS convencional, utilizando muestras que son representativas de las que se utilizarán para SWATH. El segundo paso implica la adquisición de datos SWATH para cada muestra analizada. Las condiciones típicas de SWATH incluyen el muestreo del rango  $m/z$  que va de 400-1200 en hasta 100 ventanas variables. Durante cada ciclo, el espectrómetro de masas fragmenta todos los precursores de la ventana (por ejemplo, 475-500  $m/z$  para ventanas de 25 Da de ancho) y registra un espectro de iones de fragmentos completo y de alta precisión de todos los precursores seleccionados en esa ventana de aislamiento. Esta ventana de masa recorre entonces todo el rango de masa, recogiendo sistemáticamente datos de MS/MS de cada masa y de todos los precursores detectados. Esto asegura una cobertura completa de la muestra. El tercer paso consiste en comparar carreras individuales de SWATH con la biblioteca espectral generada al inicio. Actualmente, este enfoque de emparejamiento es la única manera de identificar los péptidos de

espectros SWATH adquiridos de manera independiente de los datos. Es importante señalar que si un péptido no está contenido en la biblioteca espectral no será identificado en el análisis SWATH-MS. El cuarto paso consiste en la extracción de iones peptídicos específicos para permitir la cuantificación del área bajo la curva entre muestras. Una vez extraídos los datos, se pueden realizar análisis estadísticos más sofisticados para identificar los cambios de expresión en las proteínas.

La adquisición mediante SWATH resulta en un conjunto de datos completo. A diferencia del DDA, en el que sólo un subconjunto de precursores se envía para su fragmentación y puede ser identificado, en SWATH cada ion está fragmentado y puede ser identificado. La fragmentación es "independiente" de cualquier característica que posea el ion (como la abundancia). Además, debido a que todo el rango de masas de los precursores está fragmentado, no se observan vacíos en los datos, y la reproducibilidad de un ensayo a otro es extremadamente alta. Además, con SWATH, los compuestos no sólo se identifican, sino que también se cuantifican. La cuantificación es comparable a las técnicas de control de la reacción seleccionada (*selected reaction monitoring*, SRM) que se consideran el patrón oro para la cuantificación por espectrometría de masas. La capacidad de identificar exhaustivamente y cuantificar con precisión compuestos en muestras muy complejas en un amplio rango dinámico y de una manera extremadamente reproducible abre un mundo de posibilidades y llena un vacío muy necesario en los estudios de investigación comparativa<sup>125</sup>.

# OBJETIVOS

---

A pesar de los importantes avances obtenidos en las dos últimas décadas en el diagnóstico y el tratamiento del cáncer de mama, esta sigue siendo una enfermedad heterogénea de la que todavía desconocemos muchos aspectos sobre pronóstico y tratamiento. Tradicionalmente hemos dividido el cáncer de mama en distintos subtipos histológicos basados en la expresión de receptores hormonales y HER2 por inmunohistoquímica. Actualmente sabemos que tan importante como las características histológicas del tumor son sus características moleculares, lo que ha llevado a investigar, mediante genómica y/o proteómica, qué alteraciones moleculares pueden ayudar en la toma de decisiones por su impacto pronóstico y/o terapéutico.

El cáncer es una enfermedad “genética”, debida a la expresión aberrante de determinados genes, los cuales codifican proteínas, que son las que determinan el funcionamiento de la célula tumoral. La proteómica nos ayuda a conocer las bases moleculares del cáncer, mediante la identificación de las proteínas que intervienen en las distintas fases de la enfermedad. Estas proteínas pueden ser útiles como marcadores pronósticos o, incluso, como posibles dianas terapéuticas para nuevas terapias.

Teniendo en cuenta que el CMTN es una enfermedad heterogénea que, a pesar de su comportamiento habitualmente agresivo, incluye pacientes que muestran un amplio espectro de características clínicas y moleculares, hemos planteado este estudio con los siguientes objetivos:

#### **OBJETIVO PRINCIPAL:**

- Construir un predictor de recaída tumoral, basado en expresión de proteínas identificadas mediante SWATH-MS, de nuestra muestra de CMTN.

#### **OBJETIVOS SECUNDARIOS:**

- Describir el patrón de recaída tumoral de una muestra de mujeres con CMTN tratadas en la práctica clínica habitual.



- Identificar, mediante SWATH-MS, aquellas proteínas asociadas de forma significativa a recaída tumoral en nuestra muestra de CMTN.
- Identificar aquellas proteínas asociadas a recaídas tardías (después de los 90 meses del diagnóstico) en nuestra muestra de CMTN.

# PACIENTES Y MÉTODOS

---

## 1.- VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS

---

El estudio se basa en el análisis retrospectivo de los datos clínicos y las muestras tumorales de mujeres diagnosticadas de carcinoma de mama triple negativo no metastático (estadios I-III) en dos centros de la Comunidad de Madrid (Hospital Universitario La Paz y Hospital Universitario 12 de Octubre) entre 1997 y 2004.

Los criterios de inclusión en el estudio fueron los siguientes:

- a) Pacientes diagnosticadas de carcinoma infiltrante de mama triple negativo (ausencia de expresión de receptores de estrógeno, progesterona y HER2).
- b) Pacientes con enfermedad no metastásica al diagnóstico (estadios I a III).
- c) Seguimiento mínimo de dos años desde la cirugía del tumor primario.

Las variables clínicas y anatomopatológicas que se recogieron fueron las siguientes:

- a) Estadio al diagnóstico (según clasificación TNM 7ª Edición).
- b) Grado histológico del tumor primario.
- c) Edad al diagnóstico del carcinoma de mama triple negativo.
- d) Esquema de quimioterapia adyuvante recibido tras la cirugía del tumor primario.
- e) Recaída (sí/no).
- f) Supervivencia libre de enfermedad (SLE). Se definió SLE como el tiempo transcurrido desde la cirugía del tumor primario hasta la recaída (local y/o a distancia) o la última revisión (en las pacientes que no experimentaron recaída tumoral).
- g) Localización de primera recaída tumoral.

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación Clínica del Hospital Universitario La Paz y el Hospital 12 de Octubre y todas las pacientes firmaron el correspondiente consentimiento informado.

## 2.- SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS TUMORALES

---

Inicialmente se identificaron 136 pacientes que cumplían los criterios clínicos de inclusión. Se seleccionaron las muestras tumorales de estas pacientes, embebidas en parafina y fijadas en formol (FFPE), 84 procedentes del Biobanco del Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ (RD09/0076/00073) y 52 procedentes del Biobanco del Hospital Universitario 12 de Octubre, I+12 (RD09/0076/00118), ambos integrados en la red Nacional de Biobancos (RetBioH; [www.redbiobancos.es](http://www.redbiobancos.es)).

Las características histopatológicas de cada muestra fueron revisadas por un patólogo experimentado para confirmar el diagnóstico y el contenido tumoral. Las muestras elegibles debían incluir al menos el 50% de las células tumorales.

## 3.- PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

---

Las proteínas se extrajeron de las muestras de FFPE siguiendo la metodología descrita previamente<sup>126</sup>. Brevemente, las secciones de FFPE se desparafinizaron en xileno y se lavaron dos veces con etanol. Los extractos de proteínas de las muestras de FFPE se prepararon en tampón de SDS al 2% utilizando un protocolo basado en la recuperación de antígenos inducido por calor<sup>127</sup>. La concentración de proteínas se determinó utilizando el *MicroBCA Protein Assay Kit* (ThermoFisher Scientific). Los extractos de proteínas (10 µg) se digirieron con tripsina (1:50) y el SDS se eliminó de los lisados digeridos mediante las *Detergent Removal Spin Columns* (ThermoFisher Scientific). Las muestras de péptidos fueron desaladas, secadas y solubilizadas en una solución de ácido fórmico al 0,1% y de acetonitrilo al 3% antes del análisis de espectrometría de masas (MS), y los péptidos marcados isotópicamente se añadieron a las mezclas de péptidos y se utilizaron como patrón interno multipunto para la cuantificación con monitorización de reacciones seleccionadas (SRM).

Los péptidos así preparados fueron remitidos a la Unidad de Proteómica del *Centre for Genomic Regulation* (CRG) de Barcelona para su análisis.

#### 4.- ESPECTROMETRÍA DE MASAS SWATH

---

Para generar la biblioteca de iones para el análisis SWATH-MS, los péptidos de diferentes muestras de tejido de cáncer de mama se agruparon y analizaron en abordaje *shotgun* con un espectrómetro de masas TripleTOF® 5600 MS (AB SCIEX). En detalle, los péptidos fueron analizados en el modo IDA de alta sensibilidad; el rango de selección de iones precursores fue de 350-1500 m/z, usando una acumulación de 0,25 s. Para cada ion precursor con un tiempo mínimo de acumulación de 50 ms en el rango de 100-1500 m/z, el número máximo de precursores por ciclo se fijó en 40. Se aplicó exclusión dinámica.

A continuación, los péptidos de cada muestra de tejido se analizaron individualmente en el modo SWATH<sup>128</sup>. Específicamente, la ventana de aislamiento de precursores de 14 m/z se utilizó para la adquisición consecutiva independiente de datos en el rango de 400-1150 m/z. El tiempo de acumulación se ajustó a 50 ms, y el tiempo total del ciclo fue de ~3,2 s.

Los datos en bruto de SWATH-MS fueron buscados por ProteinPilot contra la base de datos de Human Swiss-Prot (Feb, 2015). El archivo de grupo resultante se cargó en PeakView® v1.2.0.3 (SWATH™ Acquisition MicroApp: v1.0.0.653). El Número Máximo de Proteínas a importar fue establecido como el número de proteínas identificadas con una tasa global de falsos positivos (FDR) del 1%. Otros parámetros incluidos fueron: la tolerancia en masa de la biblioteca de iones, 75 ppm; la ventana de extracción XIC, 20 min; y el ancho XIC, 75 ppm. La biblioteca de iones fue filtrada por 6 péptidos por proteína y 6 fragmentos de iones por péptido con una confianza peptídica de 85 por proteína. Se excluyeron los péptidos modificados de forma variable o compartidos. El área bajo la curva de intensidad para iones individuales de un péptido objetivo se sumó para representar el péptido y las áreas de los péptidos correspondientes se sumaron para representar las proteínas objetivo. Estas áreas se utilizaron para la cuantificación relativa y el análisis estadístico.

## 5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

---

### 5.1.- Análisis de variables clínicas.

---

Se realizó un análisis descriptivo de las variables clínicas, en el que las variables cuantitativas se describieron mediante su mediana y rango (valor mínimo y máximo), y las variables cualitativas mediante sus frecuencias absolutas y porcentajes. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante el test de  $\chi^2$  para las variables categóricas y el t-test de Student para las variables continuas.

Las funciones de supervivencia se estimaron usando el método de Kaplan-Meier. La comparación entre funciones de supervivencia se realizó mediante el test exacto de log-rank.

Los cálculos estadísticos de las variables clínicas, así como las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier se realizaron con el programa SPSS (*versión 15.0 SPSS Inc Chicago, IL, USA*).

### 5.2.- Análisis de agrupamiento jerárquico y *Significance Analysis of Microarrays*.

---

Tanto el agrupamiento jerárquico (en inglés *hierarchical cluster*, HCL) como el *Significance Analysis of Microarrays* (SAM) se realizaron en el software MeV<sup>129</sup>.

Un HCL es un análisis no supervisado que permite agrupar las muestras por similitud en sus patrones de expresión. Por otro lado, el SAM nos permite establecer las proteínas diferenciales entre dos o más grupos previamente establecidos. Este análisis consiste en un t-test corregido por el número de muestras. La significación se establece en base a un parámetro delta, que a su vez está basado en la tasa de falsos descubrimientos (FDR)<sup>130</sup>.

### 5.3.- Construcción de modelos gráficos probabilísticos y cálculo de la actividad de los nodos funcionales

---

El modelo gráfico probabilístico (MGP) se construyó mediante el paquete graph<sup>131</sup> y R v3.2.5. La red resultante se dividió en ramas o nodos funcionales mediante análisis de ontología para establecer la función biológica mayoritaria de cada nodo. Los análisis ontológicos se llevaron a cabo en DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*)<sup>132</sup> seleccionando “Homo sapiens” como referencia y GOTERM-FAT, KEGG y Biocarta como categorías. La actividad de los nodos se calculó como en trabajos previos<sup>133,134,135</sup> como el promedio de la expresión de aquellas proteínas relacionadas con la función mayoritaria asignada al nodo y se hicieron comparativas entre grupos empleando un test de U de Mann Whitney.

### 5.4.- Construcción de predictores.

---

Para establecer las proteínas que estaban relacionadas con la recaída tumoral se empleó BRB Array Tools, herramienta diseñada por el equipo del Dr. Richard Simon<sup>132</sup>. Se seleccionaron aquellas proteínas relacionadas con la SLE de forma estadísticamente significativa (para lo que se eligió un p-valor inferior a 0,01) en el análisis univariante. Estas proteínas se emplearon para construir un predictor pronóstico, que identificara a las pacientes en dos grupos (alto riesgo o bajo riesgo) en función de su riesgo de recaída, mediante una regresión de Cox. El predictor se validó internamente mediante *leave-one-out cross validation*.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo en GraphPad Prism v6 y SPSS IBM Statistics. Se consideraron significativos los p-valores por debajo de 0,05.

# RESULTADOS

---



## 1.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LA POBLACIÓN

Se identificaron un total de 136 casos de CMTN estadio I-III, intervenidos en el Hospital Universitario la Paz y en el Hospital 12 de Octubre, cuyas muestras tumorales fueron enviadas a la Unidad de Proteómica del *Centre for Genomic Regulation* (CRG) de Barcelona para su análisis mediante espectrometría de masas. Se excluyeron cuatro casos que no cumplían los criterios de inclusión: tres en los que el seguimiento fue inferior a 2 años y uno que presentaba metástasis a distancia al diagnóstico. Se excluyeron dos muestras por pobre calidad de la medición de proteínas, una muestra que no se envió al laboratorio y cuatro muestras que se enviaron al laboratorio pero de las que no se recibieron datos de proteómica. El análisis final incluyó 125 tumores (78 pertenecientes al Hospital La Paz y 47 al Hospital 12 de Octubre).

Las características clínicas y anatómo-patológicas de la muestra se recogen en la tabla 4.

La mediana de edad de las pacientes fue 56,8 años, el 10% de ellas eran menores de 40 años al diagnóstico del CMTN. La figura 6 recoge la distribución de edad al diagnóstico.

Figura 6. Edad al diagnóstico de CMTN.

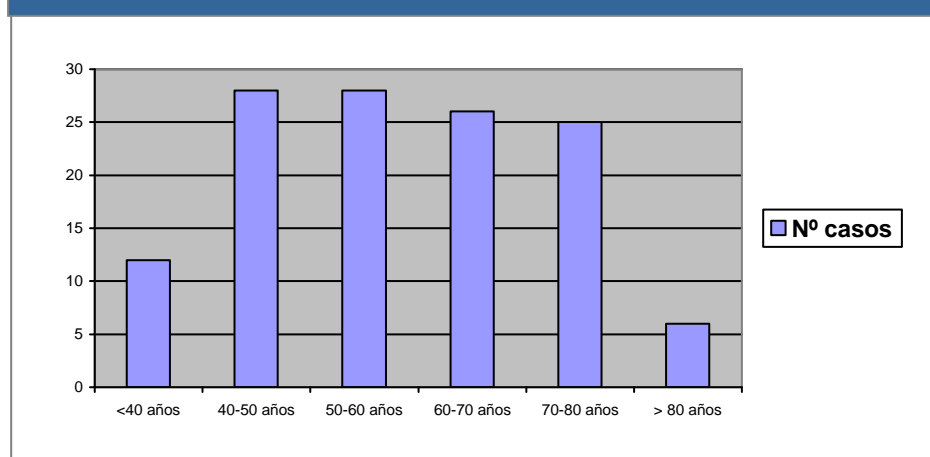


Tabla 4: Características clínicas de las pacientes		
	Total (n=125)	%
<b>Edad al diagnóstico</b>		
Mediana, rango	56,8 años	24,7-85,2
<b>Tamaño tumoral</b>		
T1	44	35,2%
T2	67	53,6%
T3	7	5,6%
T4	7	5,6%
<b>Afectación ganglionar</b>		
N0	63	50,4%
N1	39	31,2%
N2	8	6,4%
N3	14	11,2%
Desconocido	1	0,8%
<b>Grado</b>		
Grado 1	3	2,4%
Grado 2	17	13,6%
Grado 3	103	82,4%
Desconocido	2	1,6%
<b>Estadio TNM</b>		
Estadio I	31	24,8%
Estadio IIA	39	31,2%
Estadio IIB	25	20,0%
Estadio IIIA	10	8,0%
Estadio IIIB	5	4,0%
Estadio IIIC	14	11,2%
Desconocido	1	0,8%
<b>Tipo de quimioterapia adyuvante</b>		
No quimioterapia adyuvante	7	5,6%
Esquemas sin antraciclinas ni taxanos	33	26,4%
Esquemas con antraciclinas	48	38,4%
Esquemas con antraciclinas y taxanos	31	24,8%
Esquemas con taxanos sin antraciclinas	1	0,8%
Desconocido	5	4,0%

La mediana de seguimiento de la muestra a estudio fue 64,6 meses (rango 1,1-257 meses). Cincuenta y seis pacientes (44,8%) presentaron recidiva tumoral a lo largo del seguimiento. La mayoría de las recaídas ocurrieron en mujeres con tumores de más de dos centímetros de diámetro, grado 3 y ganglios axilares afectos (Tabla 5).

La mediana de seguimiento de las pacientes que no experimentaron recaída fue de 8,0 años (rango 2,0-21,4 años).

Tabla 5. Características de las pacientes que presentaron recaída tumoral

	N = 56	Porcentaje (%)
Tamaño tumoral:		
T1	11	19,6%
T2	33	58,9%
T3	6	10,7%
T4	6	10,7%
Grado:		
Grado 1	2	3,6%
Grado 2	9	16,1%
Grado 3	43	76,8%
Desconocido	2	3,6%
Afectación ganglionar:		
N0	16	28,6%
N1	21	37,5%
N2	6	10,7%
N3	13	23,2%

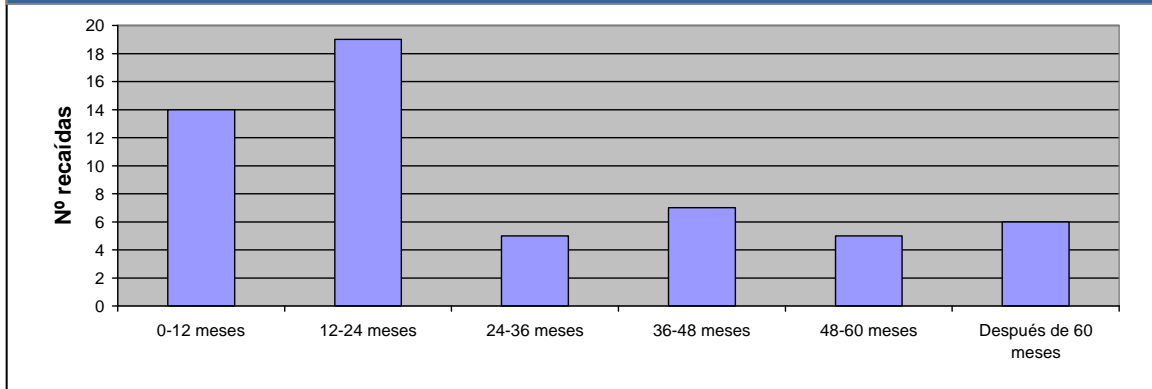
La localización de la primera recaída tumoral se recoge en la tabla 6. Diez pacientes (18%) presentaron una recidiva local y/o regional (mama restante, cicatriz de mastectomía y/o ganglios regionales), y el 82% restante mostraron recaída a distancia (11 pacientes presentaron más de una localización metastásica en la primera recaída). Las localizaciones más frecuentes de recaída a distancia fueron el sistema nervioso central (SNC) y el pulmón.

Tabla 6. Lugar de primera recaída tumoral.

	N = 56	Porcentaje
Recaída local y/o regional	10	17,9%
Sistema nervioso central	12	21,4%
Pulmón	10	17,9%
Hueso	3	5,4%
Hígado	3	5,4%
Ganglionar no regional	3	5,4%
Pleura	2	3,6%
Varias localizaciones metastásicas	11	19,6%
Desconocido	2	3,6%

Como recoge la figura 7, más de la mitad de las recidivas (n= 33; 59%) ocurrieron en los dos primeros años desde la cirugía del tumor primario (mediana 20,2 meses; rango 1,1-135 meses). Tanto las recaídas locales como a distancia ocurrieron de forma precoz (mediana 22,8 meses y 18,6 meses respectivamente).

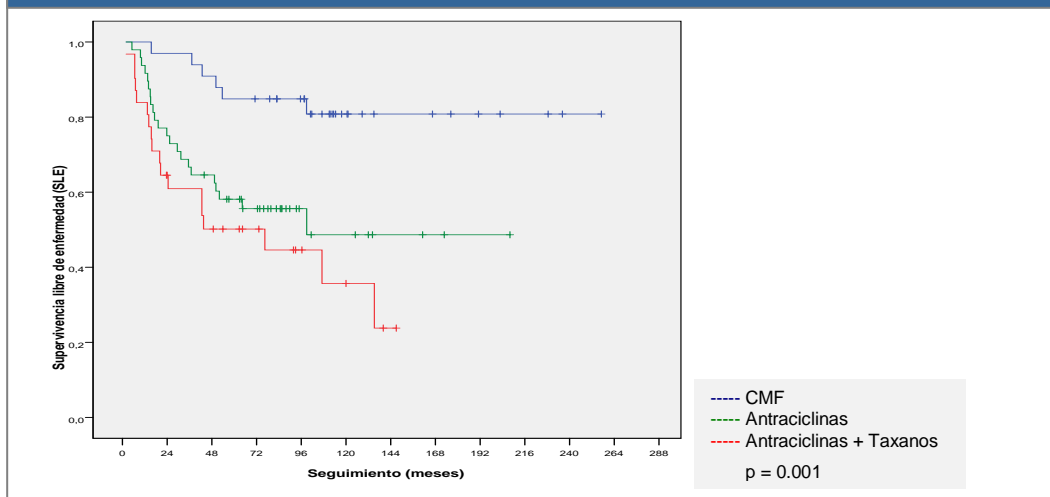
Figura 7: Momento de recaída tumoral (meses desde la cirugía del tumor primario a la recaída tumoral).



A pesar de que la mayoría de las pacientes recibieron tratamiento adyuvante, 7 de ellas no lo recibieron tras la cirugía (de las cuales tres eran mayores de 80 años de edad al diagnóstico). Treinta y tres pacientes recibieron esquemas que no incluían antraciclinas ni taxanos (todas ellas recibieron el esquema CMF).

Sólo seis (18%) de las 33 pacientes que recibieron CMF experimentaron recaída tumoral, lo que podría estar en relación con un estadio más favorable al diagnóstico de estas pacientes (11 casos con estadio I, 21 con estadio II y sólo una paciente con estadio III). Por el contrario, más de la mitad de las mujeres tratadas con quimioterapia adyuvante basada en antraciclinas y taxanos presentaron recaída tumoral. De estas 31 pacientes tratadas con la combinación, la mayoría (15 casos, 48%) presentaban estadio III al diagnóstico, lo que se traduce en una menor supervivencia libre de recaída (Figura 8).

Figura 8. SLE en función del esquema de quimioterapia adyuvante recibido.



Como era de esperar, las curvas de supervivencia (figura 9) muestran una supervivencia libre de enfermedad significativamente menor para las pacientes con mayor estadio al diagnóstico (figura 9b). Sin embargo, el grado histológico (figura 9c) y la edad menor o igual a 40 años (figura 9d), no se asociaron a una reducción significativa de la supervivencia libre de recaída.

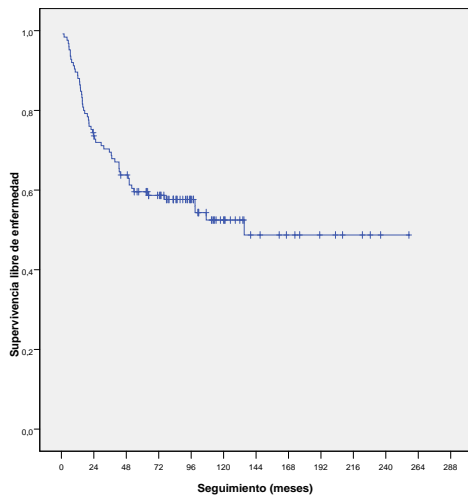


Figura 9a.

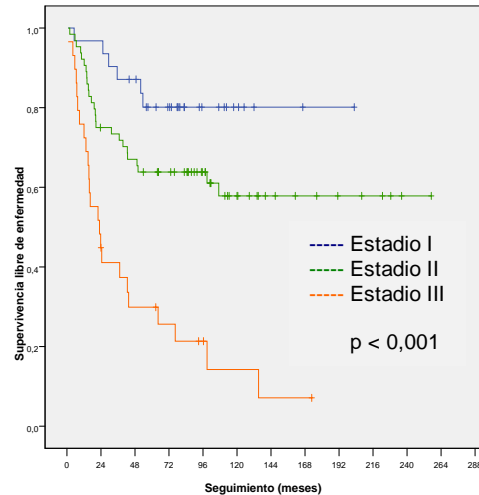


Figura 9b.

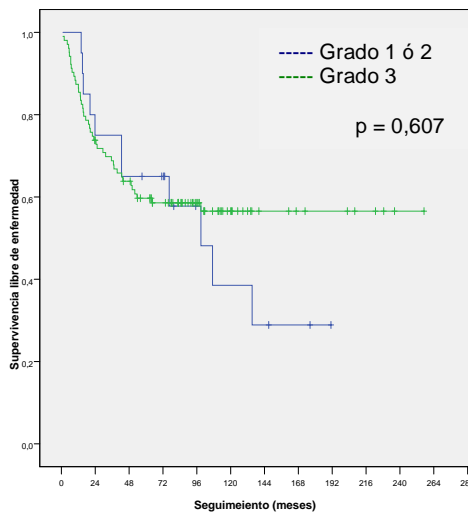


Figura 9c.

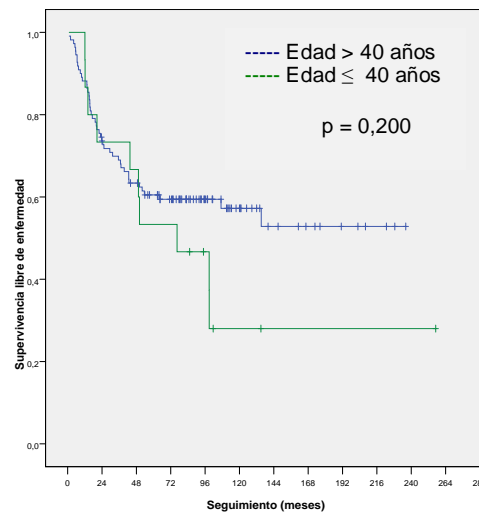


Figura 9d.

Figura 9: Curvas Kaplan-Meier para Supervivencia libre de enfermedad (SLE).

Figura 9a. SLE del global de la muestra. Figura 9b. SLE según estadio al diagnóstico. Figura 9c. SLE según grado histológico. Figura 9d. SLE según edad al diagnóstico.

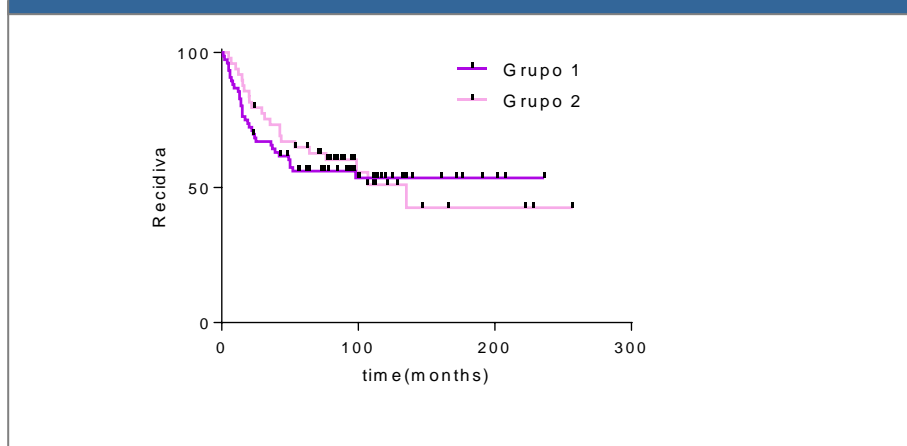
## 2.- CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL CMTN MEDIANTE SWATH-MS

### 2.1.- Resultados de los estudios de proteómica

Se cuantificaron mediante SWATH 1.206 proteínas que estaban presentes en más del 66% de las muestras. De las muestras analizadas, una de ellas se descartó por presentar menos de 600 proteínas cuantificadas. Los datos de proteómica obtenidos se normalizaron en base a las mediciones de los péptidos pesados incluidos como control en todas las muestras.

Mediante agrupamiento jerárquico (HCL), se definieron dos grupos moleculares diferentes en los datos de proteómica, que no presentaban diferencias en riesgo de recaída tumoral (Figura 10). El grupo 1 incluía 76 pacientes y el grupo 2 incluía 49 pacientes. La tasa de recaídas fue del 42% en el grupo 1, frente al 49% en el grupo 2.

Figura 10. Curvas de supervivencia entre los dos grupos del agrupamiento jerárquico.



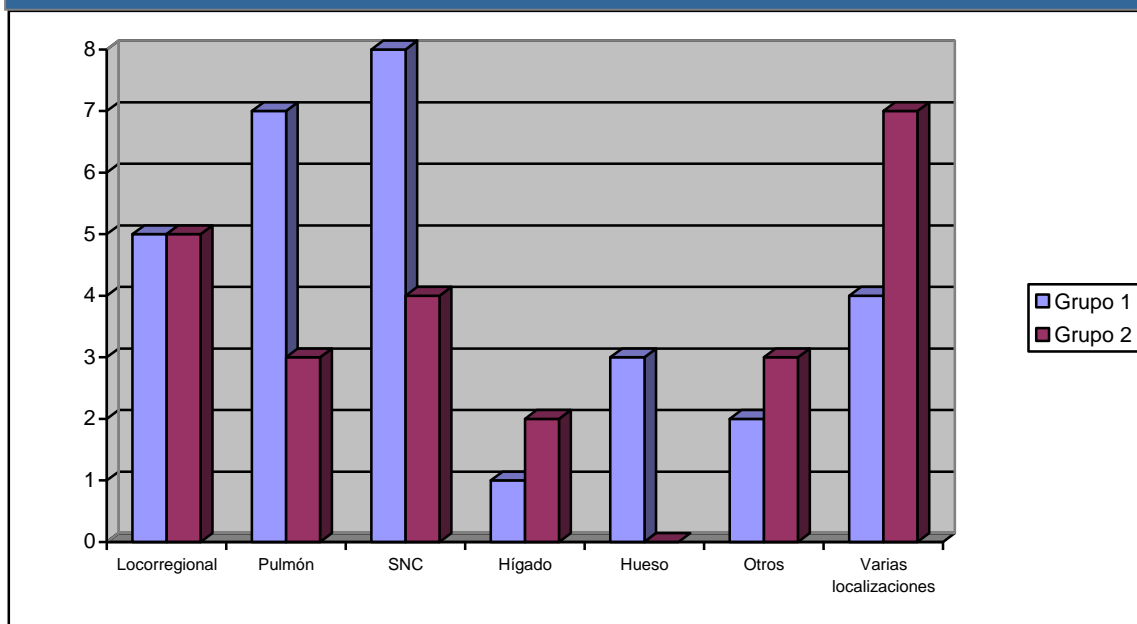
Como recoge la tabla 7, no hubo diferencias significativas en las principales características clínicas de las pacientes incluidas en cada uno de los grupos moleculares (grado, estadio, edad, tasa de recaídas, localización de recaída local o a distancia). No se observaron diferencias en la localización de primera recaída, aunque las 3 recaídas óseas ocurrieron en el grupo 1 (Figura 11). Al igual que en el global de la muestra a estudio, la mayoría de recaídas ocurrieron en los primeros 2 años del diagnóstico en ambos grupos moleculares (60% en el grupo 1, 58% en

el grupo 2). De las cuatro recaídas tardías (después de 90 meses de la cirugía) observadas, dos ocurrieron en el grupo 1 y dos en el grupo 2.

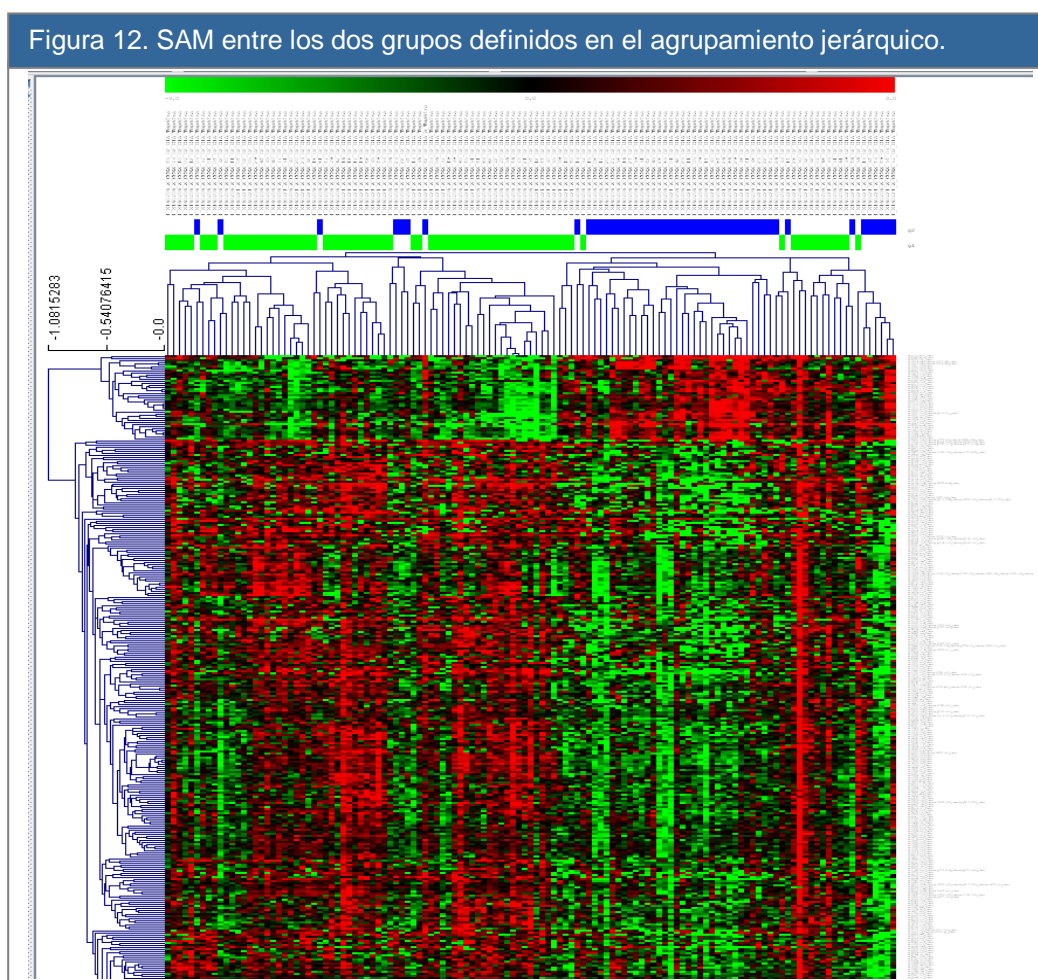
Tabla 7. Características clínicas de las pacientes de cada grupo del agrupamiento jerárquico.

	Grupo 1 (n= 76)	Grupo 2 (n=49)	
<b>Grado</b>			
Grado 1-2	13 (17%)	7 (14%)	p = 0,687
Grado 3	62 (82%)	41 (84%)	
<b>Afectación ganglionar al diagnóstico</b>			
Negativos	37 (49%)	26 (53%)	p = 0,465
Positivos	38 (50%)	23 (47%)	
<b>Estadio al diagnóstico</b>			
Estadio I	16 (21%)	15 (31%)	p = 0,325
Estadio II	43 (57%)	21 (43%)	
Estadio III	17 (22%)	12 (25%)	
<b>Edad al diagnóstico</b>			
Edad ≤ 40 años	7 (9%)	8 (16%)	p = 0,232
Edad > 40 años	69 (91%)	41 (84%)	
<b>Recaída</b>			
No	44 (58%)	25 (51%)	p = 0,451
Sí	32 (42%)	24 (49%)	
<b>Localización recaída</b>			
Locorregional	5 (16%)	5 (21%)	p = 0,425
A distancia	25 (78%)	19 (79%)	
Desconocido	2 (6%)	0	

Figura 11. Localización primera recaída según grupo molecular establecido por el HCL.



Mediante un Análisis de Significación de *Microarrays* (*Significance Analysis of Microarrays*, SAM)<sup>130</sup> se establecieron 439 proteínas diferencialmente expresadas entre ambos grupos (Figura 12). La mayoría de estas proteínas estaban relacionadas con membrana, adhesión, traducción, glucólisis y mitocondria.



Con el objetivo de identificar posibles dianas terapéuticas conocidas entre las proteínas identificadas en nuestra muestra mediante SWATH-MS, buscamos dichas proteínas en la base de datos del *Genomics of Drug Sensitivity in Cancer*<sup>137</sup> (<http://www.cancerrxgene.org>). Esta supone la mayor fuente pública de información de la que disponemos actualmente respecto a la sensibilidad a fármacos, ya sean citostáticos o terapias dirigidas, de los distintos tipos tumorales en relación con sus marcadores moleculares. No encontramos ninguna de las proteínas en dicha base de datos.



## 2.2.- Estudio de proteínas relacionadas con recaída tumoral

De las 1.206 proteínas identificadas en los experimentos de proteómica, sólo 29 se relacionaron de forma significativa con la recaída tumoral ( $p < 0,01$ ) en el análisis univariante, y aparecen recogidas en la Tabla 8.

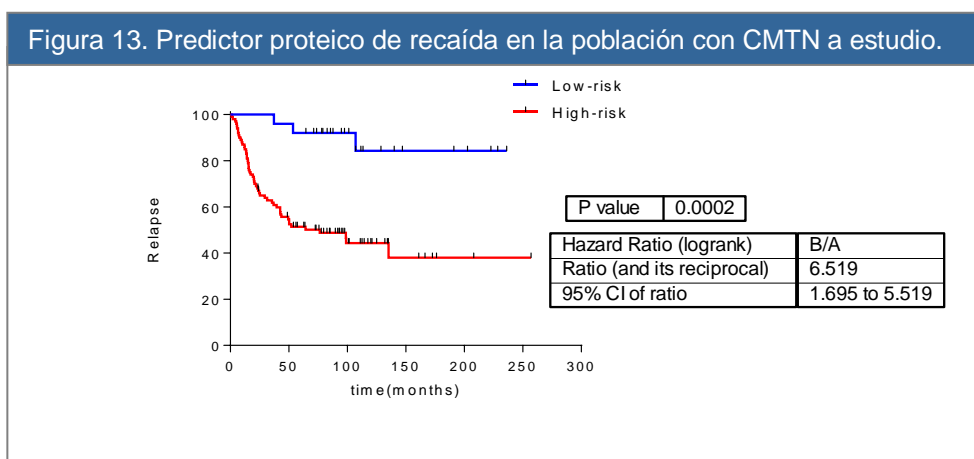
Tabla 8. Proteínas relacionadas con la recaída tumoral

orden	p-valor paramétrico	FDR	Hazard Ratio	DE de log de las intensidades	UniquelD
1	1,68E-05	0,0202	1,609	1,232	sp Q9BPW8 NIPS1_HUMAN;
2	5,12E-05	0,0308	1,414	1,691	sp Q00610 CLH1_HUMAN;
3	0,0001144	0,0459	0,862	2,651	sp Q8NCX0 CC150_HUMAN;
4	0,0001758	0,0529	1,408	1,55	sp Q14204 DYHC1_HUMAN;
5	0,0007118	0,142	0,71	1,372	sp Q5SSJ5 HP1B3_HUMAN;
6	0,0007492	0,142	1,31	1,73	sp Q12931 TRAP1_HUMAN;
7	0,000827	0,142	0,689	1,285	sp Q92522 H1X_HUMAN;
8	0,0013019	0,18	1,262	1,871	sp Q01082 SPTB2_HUMAN;
9	0,0013466	0,18	0,838	1,76	sp P55795 HNRH2_HUMAN; sp P52597 HNRPF_HUMAN;sp P31943  HNRH1_HUMAN;
10	0,0016436	0,191	1,302	1,697	sp P38646 GRP75_HUMAN;
11	0,0017466	0,191	0,69	1,21	sp P16403 H12_HUMAN; sp P22492 H1T_HUMAN;sp P16402 H1 3_HUMAN; sp Q02539 H11_HUMAN;
12	0,0019854	0,192	0,863	1,893	sp Q8N257 H2B3B_HUMAN; sp Q6DN03 H2B2C_HUMAN;
13	0,0020735	0,192	0,787	1,847	sp P51608 MECP2_HUMAN;
14	0,0036046	0,31	0,789	1,59	sp P98179 RBM3_HUMAN;
15	0,0047713	0,322	0,735	1,246	sp P16401 H15_HUMAN;
16	0,0050095	0,322	1,316	1,342	sp O75323 NIPS2_HUMAN;
17	0,0050886	0,322	0,778	1,524	sp Q13151 ROA0_HUMAN;
18	0,0052312	0,322	1,395	1,196	sp P36957 ODO2_HUMAN;
19	0,005341	0,322	0,776	1,418	sp O75367 H2AY_HUMAN;
20	0,0053512	0,322	0,83	1,696	sp P35754 GLRX1_HUMAN;
21	0,0056807	0,324	0,847	2,466	sp Q8WU39 MZB1_HUMAN;
22	0,0061962	0,324	0,768	1,277	sp Q9UKM9 RALY_HUMAN;
23	0,0062543	0,324	0,861	2,343	sp Q9Y5P6 GMPPB_HUMAN;
24	0,0066871	0,324	1,306	1,579	sp Q13011 ECH1_HUMAN;
25	0,006735	0,324	1,226	1,85	sp O43776 SYNC_HUMAN;
26	0,0094255	0,399	1,275	1,461	sp P55084 ECHB_HUMAN;
27	0,0094698	0,399	1,266	1,488	sp O95831 AIFM1_HUMAN;
28	0,0095317	0,399	0,887	2,806	sp Q9NYL4 FKB11_HUMAN;
29	0,009621	0,399	0,732	1,215	sp Q07666 KHDR1_HUMAN;

### 2.3.- Identificación de un predictor de recaída basado en expresión de proteínas

Las 29 proteínas que se identificaron como asociadas a riesgo de recaída tumoral se utilizaron para construir un predictor proteico de recaída, empleando el software BRB Array Tools<sup>136</sup> en nuestra población de 125 muestras. El algoritmo de predicción se define como la suma de los pesos ( $w_i$ ) y la expresión ( $x_i$ ) de los genes o, en este caso, de las proteínas significativas. La expresión es el logaritmo de la intensidad normalizada. Este predictor, que separa a la población en un grupo de bajo riesgo y otro de alto riesgo de recaída (p-valor = 0,0002, HR= 6,519, 20-80), se basa en la expresión de dos proteínas: NIPSNAP1 y RBM3, siendo la fórmula

del predictor  $\sum_i w_i x_i - 4.264$ , clasificándose una muestra en el grupo de alto riesgo cuando el índice pronóstico es mayor de -0,584.



Proteína	p-valor	Peso
<b>NIPSNAP1</b>	2,02e-05	0,6095
<b>RBM3</b>	0,0041	-0,3024

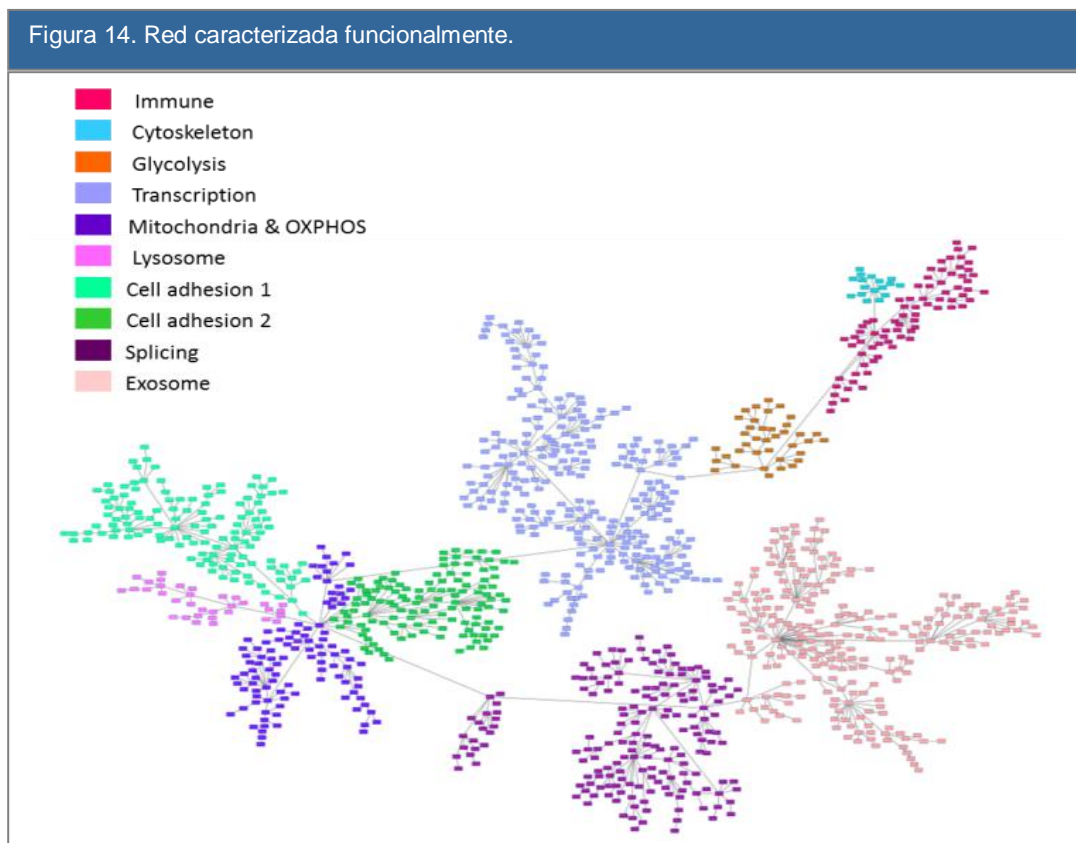
Tabla 9. Características de las proteínas identificadas en el predictor pronóstico (adaptado de *UniProt Knowledgebase*).

Gen	Nombre de la proteína	Uniprot ID	Función molecular	Localización subcelular
<b>NIPSNAP1</b>	Protein NipSnap homolog 1	Q9BPW8	- Unión a neurotransmisores	Mitocondria
<b>RBM3</b>	RNA-binding protein 3	P98179	- Unión ARNm 3'-UTR. - Unión poli(U) ARN. - Unión ribosomal de subunidades grandes - Unión a ARN. - Enlace de ARNr de subunidad ribosomal pequeña. - Actividad represora de traducción.	Núcleo

Se realizó un análisis univariante en el que tres variables (tamaño tumoral, afectación ganglionar y predictor proteico) se asociaron de forma significativa a riesgo de recaída ( $p < 0,05$ ). En base a estos resultados se realizó un análisis multivariante en el que las tres variables mantuvieron su significación estadística (tamaño tumoral: HR 1,59;  $p = 0,007$ . Afectación ganglionar: HR 1,47;  $p = 0,003$ . Predictor proteico: HR 5,19;  $p = 0,006$ ).

#### 2.4.- Análisis Funcional de los datos de proteómica.

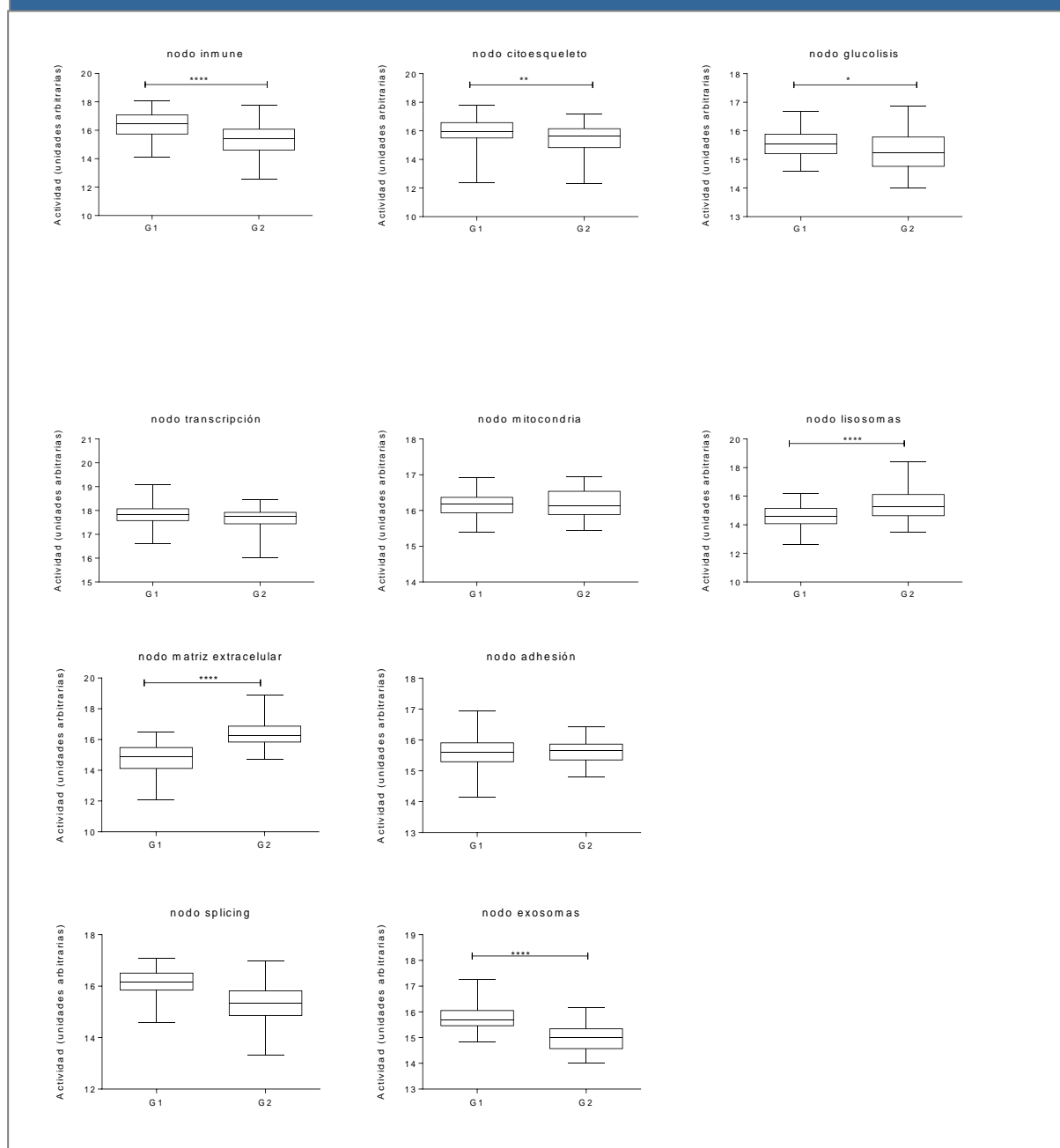
Se construyó un modelo gráfico probabilístico (MGP) con las 1.206 proteínas identificadas. Se obtuvo una red dividida en 10 nodos funcionales (Figura 14), uno de ellos con dos funciones principales pero relacionadas entre sí (mitocondria y OXPPOS).



A continuación, calculamos las actividades de cada uno de los diez nodos de la red, como el promedio de la expresión de las proteínas que tienen que ver con la

función asignada a cada nodo<sup>132,133,138</sup>. Al comparar los dos grupos obtenidos mediante HCL, se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) en los procesos de glucólisis, respuesta inmune, matriz extracelular, exosomas, lisosomas y citoesqueleto. La Figura 15 recoge la representación gráfica, mediante gráficos de cajas, de las diferencias en las actividades de los nodos funcionales objetivadas entre ambos grupos moleculares.

Figura 15. Actividades de los nodos para cada uno de los grupos definidos en el HCL.



\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

Finalmente se analizaron los patrones de expresión de proteínas en función de que se hubiera producido o no la recaída tumoral. Como muestra la Figura 16, tampoco se observaron diferencias en la red por nodos entre recaída o no recaída. Sin embargo, es interesante destacar que, como recoge la Figura 17, la mayoría de las 29 proteínas relacionadas de forma significativa con la recaída, se localizan en el nodo relacionado con la traducción.

Figura 16. Modelo gráfico probabilístico usando los datos de expresión de proteínas, según recaída o no recaída.

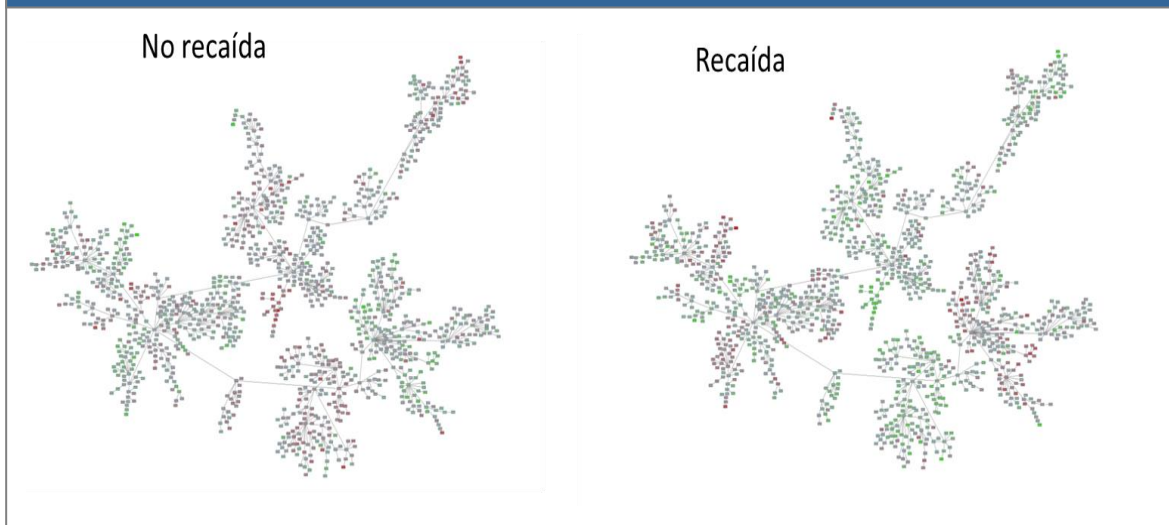
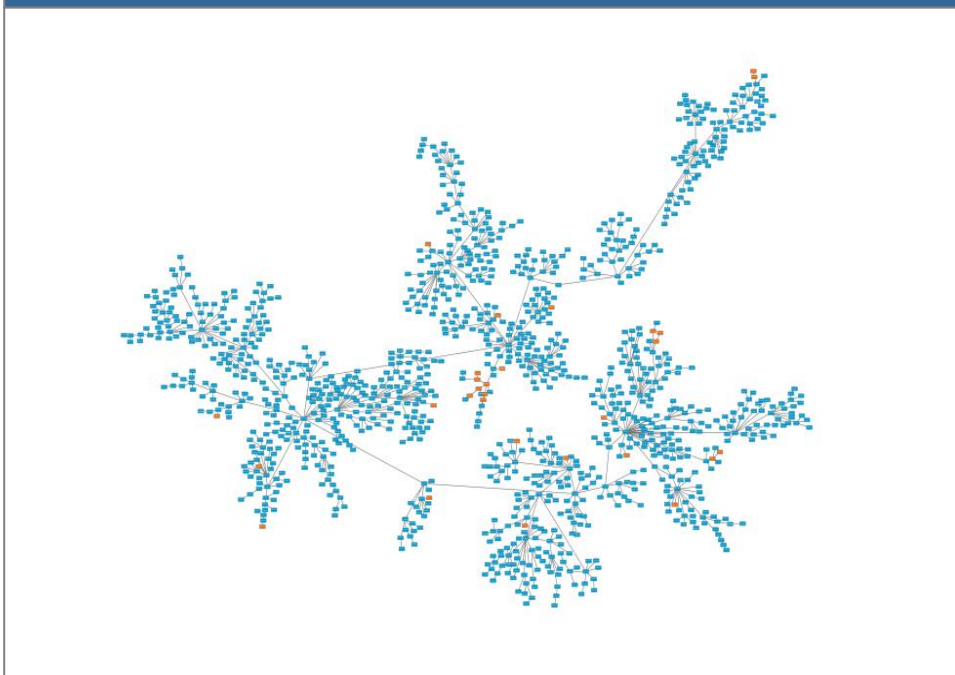


Figura 17. Modelo gráfico probabilístico usando los datos de expresión de proteínas. En naranja las 29 proteínas relacionadas con recaída tumoral.



## 2.5.- Análisis de proteínas asociadas con recaídas tardías

Se realizó un análisis de las proteínas asociadas a recaídas tardías (aquellas transcurridas al menos 90 meses después de la cirugía del tumor primario). Para ello se tomó como grupo control a las pacientes con seguimiento mayor de 90 meses que no experimentaron recaída ( $n = 40$ ). Cuatro pacientes presentaron recaídas tardías (99, 99, 107 y 135 meses). En la tabla 10 pueden verse las características clínico-patológicas de ambos grupos. Las cuatro pacientes que experimentaron recaída tardía habían recibido quimioterapia adyuvante (dos con antraciclinas y taxanos, una con antraciclinas exclusivamente y una con CMF). Todas menos una de las pacientes de las pacientes del grupo control recibieron quimioterapia tras la cirugía.

Tabla 10. Características clínicas de las pacientes con seguimiento mayor de 90 meses.			
	Recaída ( $n = 4$ )	No recaída ( $n = 40$ )	
<b>Grado</b>			
Grado 1	1 (25,0%)	0	$p < 0,01$
Grado 2	2 (50,0%)	4 (10,0%)	
Grado 3	1 (25,0%)	36 (90,0%)	
<b>Tamaño tumoral (T)</b>			
T1	0	13 (32,5%)	$p = 0,010$
T2	3 (75,0%)	26 (65,0%)	
T3	0	1 (2,5%)	
T4	1 (25,0%)	0	
<b>Afectación ganglionar</b>			
Ganglios negativos	1 (25,0%)	27 (67,5%)	$p = 0,065$
Ganglios positivos	3 (75,0%)	13 (32,5%)	
<b>Estadio</b>			
Estadio I	0	11 (27,5%)	$p = 0,03$
Estadio II	2 (50,0%)	26 (65,0%)	
Estadio III	2 (50,0%)	3 (7,5%)	
<b>Edad al diagnóstico</b>			
Edad $\leq 40$ años	2 (50,0%)	4 (10,0%)	$p = 0,026$
Edad $> 40$ años	2 (50,0%)	36 (90,0%)	

La tabla 11 recoge las proteínas asociadas, de forma significativa ( $p < 0,01$ ), a recaída tumoral en mujeres que no habían presentado recaída en los primeros 90 meses de seguimiento.

Una mayor expresión de la proteína PTBP1 (*Polypyrimidine Tract Binding Protein 1*), se asoció a no recaída, en comparación con las pacientes que presentaban re-

caída tardía (HR 0,739). Por el contrario, una mayor expresión de las inmunoglobulinas IGKC (*Immunoglobulin Kappa Constant*) e IGHG (*Immunoglobulin Heavy Constant Gamma 1*), al igual que de la proteína DBNL (*Drebrin-like Protein*) se asociaron a tumores que experimentaron recaída tardía en comparación con los que no presentaron recaída a lo largo del seguimiento.

Tabla 11. Proteínas relacionadas con la aparición de recaídas tardías (> 90 meses).

orden	p-valor paramétrico	FDR	Hazard Ratio	DE de log de las intensidades	UniqueID
1	0,0078755	0,953	0,739	2,447	sp P26599 PTBP1_HUMAN;sp Q9UKA9 PTBP2_HUMAN;sp O95758 PTBP3_HUMAN;
2	0,0086452	0,953	2,128	2,969	sp P01834 IGKC_HUMAN;
3	0,0090484	0,953	2,284	2,858	sp P01857 IGHG1_HUMAN;sp P01861 IGHG4_HUMAN;sp P01859 IGHG2_HUMAN;
4	0,0092329	0,953	2,287	1,325	sp Q9UJU6 DBNL_HUMAN;

# DISCUSIÓN

---



El cáncer de mama constituye el tumor más frecuente diagnosticado en mujeres en nuestro medio, con un aumento progresivo del número de casos diagnosticados en los últimos años. A pesar de que el cribado mamográfico y las nuevas terapias han permitido un aumento de la supervivencia de las mujeres diagnosticadas de cáncer de mama, un número no desdeñable de ellas va a presentar recaída tumoral tras la cirugía y va a fallecer como consecuencia de ello.

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea que abarca un amplio espectro de entidades con características biológicas diferentes, que se asocian a distinto comportamiento clínico y pronóstico. Tradicionalmente las decisiones sobre el tratamiento del cáncer de mama se basaban en las características histológicas del tumor (fundamentalmente la expresión o no de receptores hormonales y receptor HER2) y su estadificación basada en la clasificación TNM. Sin embargo, en las dos últimas décadas el conocimiento de las características moleculares del cáncer de mama nos ha permitido identificar pacientes con mayor o menor riesgo de recaída, lo que nos ha ayudado a la toma de decisiones.

A pesar de que el CMTN supone sólo un pequeño porcentaje de todos los casos de cáncer de mama diagnosticados, se asocia a un curso clínico agresivo y una elevada tasa de recaídas tumorales. Esto hace que la mayoría de las pacientes diagnosticadas de CMTN reciban quimioterapia adyuvante tras la cirugía, lo que probablemente supone un sobretratamiento de algunas de ellas. Identificar los tumores con características moleculares que se asocien a bajo riesgo de recaída podría permitir evitar tratamientos y pruebas radiológicas innecesarias en este subgrupo de pacientes. Por otra parte, la biología molecular nos puede ayudar a seleccionar a las mujeres con tumores de alto riesgo de recaída, que se podrían beneficiar de nuevas estrategias terapéuticas y de un seguimiento más estrecho. Los estudios iniciales que analizaban los perfiles de expresión génica en cáncer de mama demostraron la existencia de cuatro subtipos moleculares fundamentales: luminal A, luminal B, HER2-enriched y basal<sup>19</sup>. Estos primeros estudios incluían a la gran mayoría de los CMTN dentro del subtipo basal.

Con el paso de los años hemos aprendido que no sólo el cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, si no que el propio CMTN incluye una variedad de en-

tidades distintas, como muestra su variable comportamiento clínico y su diferente perfil de expresión de genes. Estudios recientes han mostrado esta variabilidad, subdividiendo el CMTN en varios subtipos moleculares, con distinto pronóstico y distinta respuesta a la quimioterapia<sup>114,116,117,118,119</sup>. Como ya se comentó previamente, la clasificación molecular más aceptada en la actualidad es la publicada por Lehmann y cols. en la que se describen 4 subtipos de CMTN (TNBCtype-4: BL1, BL2, M y LAR)<sup>116</sup>, con distinto pronóstico y distinta quimiosensibilidad, siendo los subtipos LAR y BL2 los que mostraban menor respuesta a tratamiento<sup>119</sup>. En el caso de los tumores luminales, las firmas genómicas comercializadas en los últimos años (Oncotype DX, MammaPrint, PAM50 y Endopredict) nos han ayudado a identificar a aquellas mujeres que presentan un riesgo de recaída bajo y que, por tanto, no se van a beneficiar del uso de quimioterapia adyuvante. Sin embargo, a día de hoy, no disponemos de ningún biomarcador pronóstico ni predictivo a nivel genómico en CMTN que sea aplicable en la práctica clínica diaria, por lo que tratamos de la misma forma a todas las pacientes, aun sabiendo que estamos sobrettratando a un número no desdeñable de ellas, y que otras tantas recaerán a pesar de recibir la quimioterapia adyuvante estándar.

## **1.- ANÁLISIS DE CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA MUESTRA A ESTUDIO**

---

En el presente estudio se analizan las características clínicas y moleculares de una población de mujeres con CMTN estadios I-III tratadas con resección quirúrgica radical, seguida o no de quimioterapia adyuvante, en dos centros de la Comunidad Autónoma de Madrid. La mayoría de las pacientes incluidas en esta serie presentaban tumores grado 3 (82%), tamaño mayor de 2 cm (64%) y casi la mitad mostraban afectación axilar al diagnóstico, características similares a otras series publicadas en pacientes con CMTN<sup>64,122,139</sup>. Este subtipo de cáncer de mama aparece habitualmente en mujeres más jóvenes que los tumores que expresan receptores hormonales. En nuestra serie el 32% de las pacientes era menor 50 años al diagnóstico (30% en el estudio de Campone y cols., 37% en el Bauer y cols.)<sup>122,139</sup>. Por el contrario, sólo el 5% eran  $\geq 80$  años (6,7% en el estudio de

Bauer y cols.)<sup>139</sup>. Entre los factores clínicos analizados en nuestra serie, solo el estadio tumoral al diagnóstico se correlacionó con el pronóstico.

El 45% de las pacientes de nuestra serie presentaron recaída tumoral (local y/o a distancia) a lo largo del seguimiento. La tasa de recaídas locales fue de 8% (10/125), frente a un 37% de recaídas a distancia (46/125). En una publicación similar, en la que se analizaron 83 pacientes con CMTN tratadas con antraciclinas en adyuvancia, la tasa de recaídas a distancia fue del 34%<sup>122</sup>. Dent y cols.<sup>64</sup> publicaron una descripción del patrón de recaída tumoral de 180 mujeres con CMTN diagnosticadas entre 1987 y 1997. De ellas, el 34% presentaron recaída a distancia, con una mediana de tiempo a la recaída de 2,6 años, y el 13% mostraron recaída local (mediana de tiempo 2,8 años).

Múltiples estudios sugieren que el CMTN presenta un patrón de recaída a distancia diferente del de los tumores que expresan receptores hormonales<sup>60,61,62,64,140</sup>, con mayor tendencia a la aparición de metástasis viscerales, especialmente a nivel de SNC y pulmón. Los resultados de nuestra muestra son superponibles a los obtenidos en dichos estudios, siendo el SNC (metástasis cerebrales y/o meníngeas) la localización más frecuente de primera recaída (n = 12; 10% de las pacientes incluidas en la muestra), seguida del pulmón (n = 10; 8%). Sólo 3 mujeres presentaron metástasis óseas como primera localización metastásica.

En definitiva, nuestra serie presenta similares características a las de otras series publicadas y, en consecuencia, se puede considerar representativa de la población de pacientes con CMTN.

Sin embargo, este estudio presenta una serie de limitaciones relacionadas con la selección de la muestra. Al tratarse de un estudio retrospectivo, no fue posible recoger algunos de los datos clínicos (ejemplo: esquema de quimioterapia de algunas pacientes o lugar de primera recaída), por no estar disponible esta información en la historia clínica. Decidimos utilizar una serie de muestras antiguas, con pacientes diagnosticadas entre 1997 y 2004, con la intención de que el estudio tuviera un tiempo de seguimiento suficientemente largo para evaluar la presencia de recaídas tumorales a largo plazo. Sin embargo, esto ha hecho que la población a estudio fuera tratada con esquemas de quimioterapia distintos a los considerados estándar en el momento actual. En la actualidad, la mayoría de guías clínicas

aconsejan administrar quimioterapia adyuvante en mujeres con CMTN y tamaño tumoral > 0,5 cm y/o afectación ganglionar<sup>83</sup>, siendo la poliquimioterapia basada en antraciclinas y taxanos el esquema habitualmente recomendado<sup>141</sup>. Sólo el 25% de las pacientes de nuestra serie recibieron esta combinación de quimioterapia, e incluso, algunas de las pacientes no recibieron quimioterapia adyuvante, lo que nos plantea la duda de si los resultados de nuestro estudio habrían sido diferentes si todas las pacientes hubieran recibido antraciclinas y taxanos. Como se comentó previamente, la tasa de recaídas fue significativamente mayor en pacientes que recibieron antraciclinas y taxanos (58%) que aquellas que recibieron CMF (18%), lo que probablemente se explica por el hecho de que las pacientes que recibieron este último esquema presentaban menor estadio al diagnóstico. La mayoría de pacientes con estadio III (16 de 29) recibió la combinación de antraciclinas y taxanos, mientras que sólo lo hizo una de las mujeres con estadio I (de las 30 restantes en este estadio, 11 recibieron CMF y 17 antraciclinas). Por otra parte, el hecho de que menos del 20% de las pacientes de nuestra serie que recibieron quimioterapia adyuvante con CMF recayeran, justifica que se realicen estudios como el nuestro con el fin de identificar a ese subgrupo de pacientes con CMTN en el que podría evitarse el uso de antraciclinas, y su consabida toxicidad, e incluso el uso de quimioterapia adyuvante.

Elegimos la recaída como variable principal del estudio, en lugar de la SG, ya que lo que se planteaba era encontrar un predictor pronóstico de recaída que permitiera, entre otras cosas, identificar pacientes con bajo riesgo de recaída que pudieran ser candidatas a tratamientos adyuvantes menos tóxicos.

## 2.- ANÁLISIS DEL PROTEOMA DE LA MUESTRA A ESTUDIO

---

La proteómica aporta ventajas respecto a la genómica en la medida en que refleja de mejor manera las funciones de los genes, ya que la mayoría de los procesos biológicos están mediados por proteínas. En los últimos años se está realizando un esfuerzo creciente para identificar firmas proteómicas, con valor pronóstico y/o predictivo, que sean aplicables en la práctica clínica<sup>121</sup>. Hasta ahora, la proteómica basada en espectrometría de masas ha sido la tecnología más utilizada a nivel clí-

nico con el fin de establecer estos posibles marcadores pronósticos, así como para identificar posibles dianas terapéuticas. Pero, a pesar de estos esfuerzos y del rápido desarrollo de la proteómica clínica, hasta la fecha se han identificado pocos biomarcadores tumorales, y la tecnología utilizada todavía presenta dificultades para su aplicación rutinaria en la práctica clínica diaria. Por ello, decidimos usar una técnica novedosa (SWATH-MS), que nos permitiera obtener resultados fiables y, a la vez, fuera más fácil de aplicar a la práctica clínica. La principal ventaja de SWATH-MS, respecto a las técnicas convencionales, es que soporta análisis cuantitativos de péptidos que cubren miles de proteínas con una elevada consistencia y exactitud. Se ha sugerido que sería una técnica ideal para estudios que incluyan un gran número de muestras y que requieran información precisa y reproducible. Serían ejemplos de este tipo de análisis los estudios de biomarcadores, estudios de asociación genética, o investigación básica exploratoria<sup>125</sup>.

## **2.1.- Análisis de los resultados de los experimentos de proteómica**

---

Los resultados de cuantificación de proteínas obtenidos mediante SWATH-MS, nos permitieron realizar un agrupamiento jerárquico (HCL), en el que se estableció una clasificación no supervisada en dos grupos de muestras tumorales (con 76 y 49 casos respectivamente) según la expresión de proteínas. El principal objetivo de aplicar técnicas de HCL es el de agrupar aquellos genes / proteínas cuyos valores de expresión se comportan de manera similar en las condiciones empleadas en los experimentos. Se trata de una primera fase en los procesos de minería de datos, en la que se busca mostrar la estructura y distribución de los datos moleculares, y para ello no suele existir información predefinida que sirva de guía (por ello se denominan agrupamientos “no supervisados”). Se trata, por tanto, de una herramienta utilizada para describir una muestra a nivel molecular, pero su objetivo no es encontrar diferencias de comportamiento clínico ni supervivencia entre los grupos establecidos por HCL, aunque en ocasiones sí se encuentren. En el caso de nuestro estudio, aunque no se encontraron diferencias significativas en supervivencia libre de recaída entre los dos grupos establecidos por el HCL, hay que reseñar que es muy difícil que los grupos moleculares identificados de esta forma puedan mostrar tasas de recaída / supervivencia significativamente distintas, salvo

que ocurra como en el caso de los tumores luminales o que sobreexpresan HER2, en los que existe esta asociación pronóstica porque tienen una terapia dirigida contra una proteína que mejora su pronóstico.

A continuación se realizó un análisis de expresión diferencial mediante SAM, en base a los dos grupos predefinidos mediante el HCL, en el que se establecieron 439 proteínas diferencialmente expresadas entre ambos grupos, la mayoría de las cuales estaban relacionadas con membrana, adhesión, traducción, glucólisis y mitocondria.

Se revisó la base de datos *Genomics of Drug Sensitivity in Cancer*, con el fin de evaluar posibles dianas terapéuticas asociadas a estas proteínas. A pesar de que no se encontraron dianas terapéuticas, al menos conocidas a día de hoy, relacionadas con ninguna de las proteínas identificadas, hay que reconocer la dificultad de encontrar dianas terapéuticas tanto con estudios proteómicos como con estudios de genes.

## 2.2.- Predictor pronóstico basado en expresión de proteínas

---

El principal objetivo de nuestro estudio era establecer un predictor molecular, basado en el análisis de expresión de proteínas de una población de CMTN, ya que en esta subpoblación de cáncer de mama las características histológicas no nos ayudan a la toma de decisiones sobre la elección del tratamiento adyuvante, y no hay firmas genómicas disponibles para su uso en la práctica clínica. Algunos estudios recientes han propuesto firmas proteicas, que combinan varias proteínas relacionadas con la recaída tumoral, con el fin de establecer grupos pronósticos en CMTN<sup>121,122,123</sup>, con resultados muy prometedores pero sin aplicabilidad en la clínica por el momento.

De las 1.206 identificadas inicialmente, se encontraron 29 proteínas relacionadas de forma significativa con la recaída tumoral. El análisis de estas 29 proteínas nos permitió crear un predictor pronóstico de riesgo de recaída basado en 2 proteínas (RBM3 y NIPSNAP1), en el que RBM3 se asociaba a menor riesgo de recaída tumoral (peso -0,3024) y NIPSNAP1 a peor pronóstico (peso 0,6095).

*RNA-binding motif protein 3* (RBM3) es un miembro de la familia de proteínas de unión a ARN inducibles por frío (*cold-shock proteins*), que regula diversos aspectos del metabolismo del ARNm y que tiene efectos pleitorópicos en el estrés celular y la oncogénesis<sup>142</sup>. La proteína RBM3 raramente está sobreexpresada en los tejidos normales, pero sí se encuentra sobreexpresada en varios tumores sólidos y, en estudios recientes, sus niveles de expresión parecen estar relacionados con el pronóstico tumoral así como con la sensibilidad a ciertos citostáticos. Así, niveles elevados de RBM3 han mostrado ser un factor pronóstico independiente de mayor SLE y/o SG en cáncer de mama<sup>143,144</sup>, ovario<sup>145</sup>, estómago<sup>146</sup>, colon<sup>147,148</sup>, próstata<sup>149</sup> y melanoma<sup>150</sup>. Por otra parte, la elevada expresión de RBM3 parece asociarse a mayor sensibilidad a oxaliplatino en cáncer colorrectal metastático<sup>148</sup>, y mayor sensibilidad a cisplatino en cáncer de ovario<sup>151</sup>.

Un estudio recientemente publicado<sup>144</sup>, evalúa de forma retrospectiva la expresión de RBM3 mediante IHQ, en 361 muestras de cáncer de mama, de las que sólo 55 (15%) correspondían a CMTN. Con una mediana de seguimiento superior a 9 años, la expresión nuclear elevada de la proteína RBM3 se asoció a mejor SLE (HR 0,20; IC 95% 0,11-0,35;  $p < 0,001$ ) y mejor SG (HR 0,25; IC 0,12-0,45;  $p < 0,001$ ). Esta expresión elevada de RBM3 fue significativamente más frecuente en los subtipos con receptores hormonales positivos (75%), que en los HER2-positivos con receptores hormonales negativos (46%) y en los triple negativos (35%). Otro estudio similar realizado en mujeres con cáncer de mama demostró que la expresión elevada de RBM3, determinada mediante IHQ, se asoció a mayor SG (aunque los resultados sólo fueron significativos en la población con receptores hormonales positivos)<sup>143</sup>.

A pesar del reciente interés en el estudio de RBM3, su papel en la progresión tumoral no está todavía claramente definido, aunque podría estar relacionado con la reparación de ADN. Estudios *in vitro* muestran una correlación negativa entre RBM3 y Chk1/Chk2 (proteínas implicadas en la respuesta al daño de ADN), lo que podría explicar la mayor sensibilidad a platino de los tumores con elevada expresión de RBM3<sup>148</sup>. Nuestros resultados, acordes con los de otros estudios publicados en cáncer de mama y otros tumores sólidos, justifican la realización un estudio prospectivo que evalúe la expresión de RBM3 como marcador pronóstico, así como su posible papel predictivo de respuesta a platino. El uso cada vez más acep-



tado del carboplatino en CMTN, asociado a los esquemas tradicionales con antraciclinas y taxanos, hace que sea de especial importancia identificar a las pacientes que se van a beneficiar de este fármaco con el fin de evitar toxicidad innecesaria a pacientes resistentes. Los hallazgos del *The Cancer Genome Atlas (TCGA)*, en el que se comprobó una similitud molecular entre los carcinomas de mama *basal-like* y los carcinomas serosos de ovario, también justificarían evaluar este valor predictivo de respuesta a platino en CMTN, que se observó en el estudio de Ehlén y cols. en cáncer de ovario<sup>151</sup>.

Por otra parte, todavía hay problemas que solventar en relación con la determinación de expresión de RBM3 en tejido tumoral. No está definido cuál es el mejor método para analizar la proteína, los estudios que evalúan su expresión mediante IHQ utilizan distintos puntos de corte y, a día de hoy, todavía desconocemos si hay diferencias de expresión de RBM3 en el tumor primario en comparación con las metástasis.

NIPSNAP1 es una proteína ampliamente expresada en sistema nervioso central, hígado y riñón, cuya función no está claramente definida<sup>152,153</sup>. NIPSNAP1 sólo se expresa en las neuronas, y se ha asociado a diversas enfermedades neuronales como la epilepsia, la enfermedad de Alzheimer y la fenilcetonuria, e incluso parece tener un papel en la transmisión del dolor. Su asociación con el cáncer no está clara. Sin embargo, el hecho de que en nuestro estudio la expresión de NIPSNAP1 se asocie a peor pronóstico en pacientes con CMTN, una población con elevado riesgo de recaída tumoral a nivel de SNC, nos hace plantearnos la posibilidad de explorar esta asociación en futuros estudios.

No obstante, hay que reseñar que las proteínas incluidas en los predictores pronósticos, en este caso RBM3 y NIPSNAP1, no tienen por qué estar relacionadas con la patogénesis del tumor, ya que el predictor establece asociaciones estadísticas que no tienen que ser necesariamente causales.

En todo caso, el predictor pronóstico establecido en nuestro estudio precisaría validación independiente, de forma prospectiva, previa a su posible uso en la práctica clínica.



### 2.3.- Análisis funcional de la expresión de proteínas

---

Con el objetivo de explorar las relaciones entre proteínas en nuestra muestra de CMTN, creamos un modelo probabilístico a partir los datos de las 1.206 proteínas identificadas. Esto nos permitió crear una representación gráfica en la que se definieron diez nodos funcionales. Una vez establecida la actividad de cada nodo, comprobamos que existían diferencias entre los dos grupos que habíamos establecido previamente, en los procesos de glucolisis, inmune, matriz extracelular, exosomas, lisosomas y citoesqueleto.

En este sentido, las diferencias observadas en el nodo inmune nos hacen plantearnos la posibilidad de evaluar en futuros estudios de inmunoterapia la posible asociación de estas proteínas con respuesta a dichos tratamientos. Aunque, como comentamos previamente, ninguna de las proteínas identificada en nuestro estudio tiene una diana terapéutica conocida, podría evaluarse su papel como posible marcador predictivo de respuesta. En el caso del cáncer de mama, los resultados obtenidos con inmunoterapia no han sido tan positivos como los obtenidos en otros tumores, aunque parece que el subtipo de CMTN es el que mejores resultados obtiene con estos tratamientos<sup>154</sup>. Encontrar un biomarcador que nos ayudara a seleccionar a las pacientes que sí se van a beneficiar sería fundamental.

Por otra parte, también es de reseñar que se observaron diferencias significativas en el nodo de glucolisis entre los dos grupos, que también se encontraron en el SAM, cosa que no ocurrió con el resto de las funciones. Esta aproximación funcional, basada en modelos gráficos probabilísticos, nos ofrece información complementaria a los análisis convencionales.

### 2.4.- Análisis de proteínas relacionadas con recaídas tardías

---

Varios estudios muestran que la gran mayoría de las recaídas tumorales en CMTN ocurren en los primeros 5 años desde el diagnóstico. Sin embargo, las recaídas tardías, aunque poco frecuentes, ocurren (en nuestra serie 4 de las pacientes recayeron después del octavo año) y probablemente en algunos de los estudios están infraestimadas debido a su seguimiento corto<sup>63,70,140</sup>. En una publicación re-

ciente del *MD Anderson Cancer Center*<sup>155</sup> se revisaron, de forma retrospectiva, 873 mujeres con CMTN que no habían recaído en los primeros 5 años tras la cirugía. A diferencia de la serie de Dent y cols. en la que no se objetivaron recaídas a partir de los 8 años<sup>64</sup>, en este estudio se objetivaron 22 recaídas tardías, 16 a distancia (50% en pulmón/pleura, 36% en ganglios a distancia, 27% en hueso y 14% en SNC) y 6 locorreccionales. Sólo cuatro pacientes de nuestra serie presentaron recaídas tardías (más de 8 años desde el diagnóstico): una localizada en pulmón, una en pleura, una en hueso y una en varias localizaciones de forma simultánea. Estos resultados fueron comparables a los observados en el estudio del *MD Anderson Cancer Center*.

Nos planteamos que sería interesante conocer las características moleculares de esta subpoblación en concreto, ya que su comportamiento clínico claramente es distinto al del resto de CMTN, lo que podría indicar que necesitan un seguimiento y un tratamiento distinto. En nuestro análisis, cuatro proteínas (PTBP1, DBNL, IGHG1 y IGKC), se asociaron de forma significativa con recaídas tardías (más de 90 meses después del diagnóstico). No obstante, una limitación importante de este análisis es el pequeño tamaño muestral, ya que se compararon los resultados de 4 pacientes con recaídas tardías frente a 40 pacientes que no experimentaron recaída tras 90 meses de seguimiento. Aún así, sería interesante realizar estudios moleculares que incluyan un mayor número de pacientes con recaídas tardías de CMTN.

DBNL es una proteína de unión a actina, que ha sido relacionada con la endocitosis y la respuesta inmune<sup>156,157</sup>, aunque por el momento no conocemos ninguna implicación de DBNL en la progresión tumoral.

La PTBP1 (*polypyrimidine tract binding protein*) es una proteína implicada en el control del metabolismo del ARN, cuyo papel en la transformación maligna y la proliferación tumoral cada vez se considera más importante. Varios estudios han mostrado que la expresión elevada de PTBP1 se asocia a mayor agresividad tumoral y peor pronóstico en cáncer de mama<sup>158,159,160</sup>, ovario<sup>161</sup> y gliomas<sup>162</sup>. En nuestra población con CMTN, la elevada expresión de PTBP1 en mujeres sin recaída a los 90 meses, se asoció a menor riesgo de recaída tardía (HR =0,739).

Wang y cols. analizaron la expresión de PTBP1 en 137 pacientes diagnosticadas de carcinoma de mama. La expresión elevada de PTBP1 fue significativamente más frecuente en pacientes con ganglios positivos, HER2 positivo y estadio tumoral más avanzado, aunque hay que señalar que no analizó específicamente la expresión de PTBP1 en la subpoblación con CMTN. Este estudio mostró que la supresión de PTBP1 se asocia a una menor capacidad de crecimiento, invasión y migración de las células tumorales, que parece mediada por la vía de señalización PTEN/Akt<sup>158</sup>. Esto sugiere un posible valor de PTBP1 como valor biomarcador pronóstico, pero también como posible diana terapéutica.

Recientemente Orozco y cols<sup>163</sup> mostraron que los CMTN con elevada expresión de PTBP1 presentan un perfil de infiltración inmunitaria compatible con evasión inmune, sugiriendo un posible papel de la inmunoterapia en estas pacientes. Este mismo grupo demostró que la elevada expresión de PTBP1 en pacientes con CMTN se asoció a una menor supervivencia libre de recaída y menor supervivencia global<sup>163,164</sup>.

Es evidente que la respuesta inmunitaria a nivel del microambiente tumoral juega un papel crucial en la progresión tumoral. En los últimos años ha surgido un interés creciente en la investigación de la respuesta inmune y su posible papel en el tratamiento del cáncer, lo que ha llevado a la aprobación de nuevos fármacos que han impactado de forma muy positiva en la supervivencia de los pacientes oncológicos. Hasta la fecha, la mayor parte de esta investigación se ha centrado en el papel de la inmunidad celular, mediada por linfocitos T, en el pronóstico y tratamiento del cáncer. El receptor 1 de muerte celular programada (PD-1) es un receptor de control inmunitario que se expresa fundamentalmente en los linfocitos T activados, y limita la función de los linfocitos T efectores. El ligando 1 de muerte celular programada (PD-L1), es una molécula inhibidora de los linfocitos T, que se expresa en las células tumorales y en las células inmunes. La unión de PD-L1 a PD-1 es un importante mecanismo de evasión tumoral del sistema inmunitario, lo que ha llevado a utilizar anticuerpos dirigidos contra PD-1 y PD-L1 con buenos resultados. También en relación con la inmunidad celular se ha comprobado que la presencia de TILs se asocia a mejor pronóstico y mayor respuesta a quimioterapia en cáncer de mama, especialmente en CMTN y tumores HER2 positivos<sup>72,79</sup>.

Recientemente varios estudios han investigado el papel de la inmunidad humoral en el desarrollo tumoral, demostrando la importancia de la infiltración por células B y células plasmáticas en el pronóstico de distintos tumores<sup>165</sup> incluido el cáncer de mama<sup>166,167,168</sup>. Ya en el año 2012, Schmitz y cols. publicaron un interesante estudio en el que demostraron que el gen de la Inmunoglobulina cadena  $\kappa$  (IGKC) se asociaba con un mejor pronóstico en todos los subtipos de cáncer de mama, incluido el subtipo con CMTN (HR 0,81; IC 95% 0,69-0,95). Este estudio también mostró una mayor tasa de RCp tras quimioterapia neoadyuvante en pacientes con cáncer de mama y receptores hormonales negativos que expresaban IGKC, lo que apoya el efecto antitumoral de la quimioterapia mediado por la respuesta inmune además de su conocido efecto citotóxico. Yeong y cols.<sup>168</sup> han evaluado el papel de un panel de genes relacionados con células B/células plasmáticas en 269 muestras de CMTN con el fin de buscar un posible biomarcador pronóstico. Tres proteínas (IGKC, IGHM y IGHG1) se asociaron de forma significativa a mayor SLE, incluso tras ajustar por factores clínicos (edad, tamaño tumoral, grado y afectación ganglionar). Por otra parte, la expresión de IGHG1 se asoció además a mayor SG en esta población.

Parece, por tanto, que genes relacionados con la inmunidad celular como IGHG1 e IGKC podrían ser utilizados como biomarcadores pronósticos, y probablemente predictivos de respuesta a quimioterapia preoperatoria, en cáncer de mama. En este sentido, el análisis de la expresión de sus proteínas en tejido tumoral fijado en parafina parece más factible en la práctica clínica diaria<sup>165</sup>.

Esta nueva información sobre la importancia de la respuesta humoral en el CMTN no sólo abre un camino a su aplicación como marcador pronóstico y predictivo de respuesta a quimioterapia en la clínica, si no como posible diana terapéutica, como ha ocurrido en el caso de la inmunidad celular y los resultados recientes que muestran un beneficio en SG del uso de Atezolizumab, un anticuerpo anti-PDL1, en un subgrupo de pacientes con CMTN que sobreexpresan PD-L1<sup>166</sup>.

## 2.5.- Evaluación de resultados de la técnica SWATH-MS

---

Nuestro estudio analiza una nueva técnica para estudio del proteoma en una muestra amplia de carcinomas de mama triple negativos. Lo más innovador del estudio es el uso de SWATH, que demostró ser una técnica robusta, con la que sólo se descartaron dos muestras por pobre calidad de la medición.

Sin embargo, el estudio muestra una serie de limitaciones relacionadas con la técnica empleada. El número de proteínas que identificamos mediante esta técnica fue inferior a lo que inicialmente esperábamos, e inferior a lo que habitualmente obtenemos con otras técnicas y, es posible que esto nos haya hecho perder información útil. Por otra parte, el análisis simultáneo de la expresión génica y de proteínas en una misma muestra, aporta una información mucho mayor que la de cada una de dichas medidas por separado. Nuestro estudio carece de esta validación de los resultados obtenidos con proteómica con datos de expresión génica, lo que limita su utilidad clínica. Sería especialmente interesante correlacionar los datos obtenidos del estudio de proteínas con los subtipos descritos por autores como Lehmann a nivel genómico. En este sentido, las pacientes con recaídas tardías nos parecen un grupo especialmente interesante para el análisis conjunto de genes y proteínas. Resultados publicados previamente<sup>119</sup> muestran que las pacientes con subtipo LAR presentaban recaídas tardías, en tanto que los subtipos BL1 y BL2 suelen recaer precozmente. Este subtipo LAR se correlaciona, en su mayoría, con tumores luminales cuando se analizan por PAM50. Podría ser interesante analizar si las pacientes de nuestro estudio que recayeron después del octavo año del diagnóstico se corresponden con tumores luminales y si las 4 proteínas identificadas como asociadas a recaída tardía se asocian a dichos subtipos luminales.

SWATH-MS es una técnica con una elevada precisión y reproducibilidad, y una mayor facilidad para adquisición de datos que otras técnicas clásicas como la monitorización de reacción selectiva (*Selected Reaction Monitoring, SRM*) o monitorización de reacciones paralelas (*Parallel Reaction Monitoring, PRM*). Sin embargo, su sensibilidad es inferior a la de estas aproximaciones, y el análisis de datos más complejo, por lo que en el futuro estos inconvenientes deberían mejorarse para que su uso se pueda generalizar.

# CONCLUSIONES

---

1. La muestra empleada en este estudio presenta unas características clínicas y un patrón de recaída tumoral similar a lo descrito en otras series, por lo que es una representación adecuada de la población de cáncer de mama triple negativo.
2. La espectrometría de masas SWATH es una técnica fiable y robusta que permite obtener datos de expresión de proteínas en tejido FFPE.
3. Los patrones de expresión de proteínas establecen dos claros grupos de tumores con diferencias a nivel molecular, aunque sin diferencias en la supervivencia.
4. El análisis de los datos obtenidos mediante experimentos de proteómica nos han permitido crear un predictor pronóstico de recaída tumoral, en una población con CMTN, basado en la expresión de 2 proteínas (RBM3 y NIPSNAP 1).
5. Nuestro estudio confirma la asociación de RBM3 con bajo riesgo de recaída objetivada en otros estudios de pacientes con cáncer de mama.
6. La utilización de modelos gráficos probabilísticos no dirigidos permite estudiar diferencias a nivel de procesos biológicos entre distintos tipos de carcinomas de mama triple negativos.
7. Estos modelos gráficos probabilísticos no dirigidos sugieren que la actividad de varios procesos (glucólisis, respuesta inmune, matriz extracelular, exosomas, lisosomas y citoesqueleto) es diferente entre los distintos grupos de cáncer de mama triple negativo identificados en este trabajo.

# BIBLIOGRAFÍA

---



1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC.
2. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Estimates of global cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer* 2013;132(5):1133-45.
3. Allemani C, Weir HK, Carreira H et al. Global surveillance of cancer survival 1995–2009: analysis of individual data for 25,676,887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *Lancet* 2015; 385:977-1010.
4. Bosetti C, Bertuccio P, Malvezzi M, Levi F, Chatenoud L, Negri E, La Vecchia C. Cancer mortality in Europe, 2005-2009, and an overview of trends since 1980. *Ann Oncol.* 2013;24(10):2657-71.
5. INEbase. Defunciones según la causa de muerte para el año 2016. Resultados nacionales. [último acceso el 16/01/18]. <http://www.ine.es/jaxiT3/Tabla.htm?t=7947>
6. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. Breast cancer—epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ.* 2000;321(7261): 624–628.
7. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012;62(1): 10-29.
8. Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J Clin Oncol.* 2007;25(11):1329-33.
9. Sidransky D, Tokino T, Helzlsouer K, Zehnbauer B, Rausch G, Shelton B, et al. Inherited p53 gene mutations in breast cancer. *Cancer Res.* 1992; 52(10):2984-6.
10. Hobert JA, Eng C. PTEN hamartoma tumor syndrome: An overview. *Genet Med.* 2009;11(10):687-94.
11. Pharoah PD, Guilford P, Caldas C; International Gastric Cancer Linkage Consortium. Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology.* 2011;121(6):1348-53.
12. Hearle N, Schumacher V, Menko FH, Olschwang S, Boardman LA, Gille JJ, et al. Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. *Clin Cancer Res.* 2006;12(10):3209-15.

13. Pierobon M, Frankenfeld CL. Obesity as a risk factor for triple-negative breast cancers: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;137(1):307-14.
14. Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rutgers E, et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 2005; 26 (Supplement 5): v8–v30.
15. Hammond ME, Hayes DF, Wolff AC, Mangu PB, Temin S. American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Oncol Pract.* 2010;6(4):195-7.
16. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2013; 31: 3997–4013.
17. Parise CA, Bauer KR, Brown MM, Caggiano V. Breast cancer subtypes as defined by the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) among women with invasive breast cancer in California, 1999-2004. *Breast J.* 2009;15(6):593-602.
18. AJCC (American Joint Committee on Cancer). *Cancer Staging Manual, 8th edition.* Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, et al. (Eds), Springer-Verlag, New York 2017.
19. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406:747–752.
20. Sorlie T, Perou C, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10869 –10874.
21. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010;12(5):R68.
22. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol.* 2011;5(1):5-23.

23. Cancer Genome Atlas Network. *Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. Nature* 2012;490(7418):61-70.
24. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnant M, Piccart-Gebhart M et al. *Tailoring therapies-improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. Ann Oncol* 2015;26(8):1533-46.
25. Van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, et al. *A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. N Engl J Med.* 2002;347(25):1999-2009.
26. Cardoso F, Van't Veer LJ, Bogaerts J, Slaets L, Viale G, Delaloge S, et al. *70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer. N Engl J Med.* 2016;375(8):717-29.
27. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, et al: *A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. N Engl J Med* 2004;351:2817-26.
28. Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, et al. *Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. J Clin Oncol.* 2006;24(23):3726-34.
29. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, et al. *Prospective Validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. N Engl J Med.* 2015;373(21):2005-14.
30. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, et al. *Adjuvant Chemotherapy Guided by a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. N Engl J Med.* 2018;379(2):111-21.
31. Dowsett, M et al., *Comparison of PAM50 Risk of Recurrence Score With Oncotype DX and IHC4 for Predicting Risk of Distant Recurrence After Endocrine Therapy, J Clin Oncol* 2013; 31:2783-90.
32. Gnant M, Filipits M, Greil R, Stoeger H, Rudas M, et al. *Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: using the PAM50 Risk of Recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial treated with adjuvant endocrine therapy alone. Ann Oncol.* 2014;25(2):339-45.

33. Filipits M, Rudas M, Jakesz R, Dubsy P, Fitzal F, Singer CF, et al: EP Investigators. A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors. *Clin Cancer Res*. 2011;17:6012-20.
34. Martin M, Brase JC, Calvo L, Krappmann K, Ruiz-Borrego M, Fisch K, et al: Clinical validation of the EndoPredict test in node-positive, chemotherapy-treated ER1/HER2- breast cancer patients: Results from the GEICAM 9906 trial. *Breast Cancer Res*. 2014;16:R38.
35. Sgroi DC, Carney E, Zarrella E, Steffel L, Binns SN, Finkelstein DM, et al. Prediction of late disease recurrence and extended adjuvant letrozole benefit by the HOXB13/IL17BR biomarker. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(14):1036–42.
36. Sgroi DC, Sestak I, Cuzick J, Zhang Y, Schnabel CA, Schroeder B, et al. Prediction of late distant recurrence in patients with oestrogen-receptor-positive breast cancer: a prospective comparison of the breast-cancer index (BCI) assay, 21-gene recurrence score, and IHC4 in the TransATAC study population. *Lancet Oncol*. 2013;14(11): 1067-76.
37. Zhang Y, Schnabel CA, Schroeder BE, et al. Breast cancer index identifies early-stage estrogen receptor-positive breast cancer patients at risk for early- and late-distant recurrence. *Clin Cancer Res* 2013;19:4196-4205.
38. Cobain EF, Hayes DF. Indications for prognostic gene expression profiling in early breast cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2015;16:23.
39. Harris LN, Ismaila N, McShane LM, Andre F, Collyar DE, Gonzalez-Angulo AM, et al. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol*. 2016;34(10):1134-50.
40. Krop I, Ismaila N, Andre F, Bast RC, Barlow W, Collyar DE, et al. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol*. 2007;35(24): 2838-47.
41. Albain KS, Barlow WE, Shak S, Hortobagyi GN, Livingston RB, et al. Prognostic and predictive value of the 21-gene recurrence score assay in postmeno-

- pausal women with node-positive, oestrogen-receptor-positive breast cancer on chemotherapy: a retrospective analysis of a randomised trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(1):55-65
42. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Peto R, Davies C, Godwin J, Gray R, Pan HC, Clarke M, et al. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet.* 2012;379(9814):432.
  43. Henderson IC, Berry DA, Demetri GD, Cirincione CT, Goldstein LJ, et al. Improved outcomes from adding sequential Paclitaxel but not from escalating Doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer. *J Clin Oncol.* 2003;21(6):976-83.
  44. Martin M, Pienkowski T, Mackey J, Pawlicki M, Guastalla JP, et al; Breast Cancer International Research Group 001 Investigators. Adjuvant docetaxel for node-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2005;352(22):2302-13.
  45. Roché H, Fumoleau P, Spielmann M, Canon JL, Delozier T, et al. Sequential adjuvant epirubicin-based and docetaxel chemotherapy for node-positive breast cancer patients: the FNCLCC PACS 01 Trial. *J Clin Oncol.* 2006; 24(36):5664.
  46. Martín M, Seguí MA, Antón A, Ruiz A, Ramos M, et al; GEICAM 9805 Investigators. Adjuvant docetaxel for high-risk, node-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2010;363(23):2200-10.
  47. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, Darby S, et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet.* 2011; 378(9793):771.
  48. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Dowsett M, Forbes JF, Bradley R, Ingle J, Aihara T, Bliss J, et al. Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: patient-level meta-analysis of the randomised trials. *Lancet.* 2015;386(10001):1341.

49. Mieog JS, van der Hage JA, van de Velde CJ. Preoperative chemotherapy for women with operable breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007 Apr 18;(2): CD005002.
50. Carey LA, Winer EP. Defining success in neoadjuvant breast cancer trials. *Lancet.* 2014;384(9938):115-6.
51. Prowell TM, Pazdur R. Pathological complete response and accelerated drug approval in early breast cancer. *N Engl J Med.* 2012;366(26):2438-41.
52. Curigliano G, Burstein HJ, P Winer E, Gnant M, Dubsy P, Loibl S, et al; St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early. De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017. *Ann Oncol.* 2017;28(8):1700-12.
53. Lehmann BD, Pietenpol JA. Identification and use of biomarkers in treatment strategies for triple-negative breast cancer subtypes. *J Pathol* 2014;232: 142e50.
54. Prat A, Adamo B, Cheang MC, Anders CK, Carey LA, Perou CM. Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *Oncologist.* 2013;18(2):123-33.
55. Cheang M, Martin M, Nielsen T, Prat A, Rodriguez-Lescure A, Ruiz A, et al. Quantitative hormone receptors, triple-negative breast cancer (TNBC), and molecular subtypes: A collaborative effort of the BIG-NCINABCG. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2012;a1008.
56. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10(16):5367-74.
57. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer.* 2007;109(1):25-32.
58. Tan DS, Marchió C, Jones RL, Savage K, Smith IE, Dowsett M, Reis-Filho JS. Triple negative breast cancer: molecular profiling and prognostic impact in adjuvant anthracycline-treated patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;111(1): 27-44.



59. Smid M, Wang Y, Zhang Y, Sieuwerts AM, Yu J, Klijn JG, et al. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res.* 2008;68(9):3108-14.
60. Harrell JC, Prat A, Parker JS, Fan C, He X, Carey L, et al. Genomic analysis identifies unique signatures predictive of brain, lung, and liver relapse. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;132(2):523-35.
61. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MC, Voduc D, Speers CH, et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol.* 2010;28(20):3271-7.
62. Rodríguez-Pinilla SM, Sarrió D, Honrado E, Hardisson D, Calero F, Benitez J, Palacios J. Prognostic significance of basal-like phenotype and fascin expression in node-negative invasive breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2006;12(5):1533-9.
63. Lin NU, Vanderplas A, Hughes ME, Theriault RL, Edge SB, Wong YN, et al. Clinicopathologic features, patterns of recurrence, and survival among women with triple-negative breast cancer in the National Comprehensive Cancer Network. *Cancer.* 2012 Nov 15;118(22):5463-72.
64. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res.* 2007;13(15 Pt 1):4429-34.
65. Kim K., Lee E., Lee J. Korea Breast Cancer Society. Clinicopathologic Signature of TNBC Patients with Good Prognosis. *Cancer Res* 2009;69(24 Suppl): Abstract nr 4065.
66. Pogoda K, Niwinska A, Murawska M, Olszewski W, Nowecki Z. The outcome of special histologic types of triple-negative breast cancer (TNBC). *J Clin Oncol.* 2014 (suppl; abstr 1122).
67. Huober J, Gelber S, Goldhirsch A, et al. Prognosis of medullary breast cancer: analysis of 13 International Breast Cancer Study Group (IBCSG) trials. *Ann Oncol* 2012;23:2843-51.
68. Kulkarni N, Pezzi CM, Greif JM, et al. Rare breast cancer: 933 adenoid cystic carcinomas from the National Cancer Data Base. *Ann Surg Oncol* 2013;20: 2236-41.

69. Anders CK, Fan C, Parker JS et al. Breast carcinomas arising at a young age: Unique biology or a surrogate for aggressive intrinsic subtypes? *J Clin Oncol* 2011;29:e18–e20.
70. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(8):1275-81.
71. Tischkowitz M, Brunet JS, Bégin LR, Huntsman DG, Cheang MC, Akslen LA, et al. Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. *BMC Cancer*. 2007;7:134.
72. Loi S, Sirtaine N, Piette F, Salgado R, Viale G, Van Eeno F, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol*. 2013;31:860-7.
73. Loi S, Michiels S, Salgado R, Sirtaine N, Jose V, Fumagalli D, et al. Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. *Ann Oncol*. 2014;25(8):1544-50.
74. Adams S, Gray RJ, Demaria S, Goldstein L, Perez EA, Shulman LN, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. *J Clin Oncol*. 2014;32(27):2959-66.
75. Pruneri G, Vingiani A, Bagnardi V, Rotmensz N, De Rose A, Palazzo A, et al. Clinical validity of tumor-infiltrating lymphocytes analysis in patients with triple-negative breast cancer. *Ann Oncol*. 2016;27(2):249-56.
76. Dieci MV, Criscitiello C, Goubar A, Viale G, Conte P, Guarneri V, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Ann Oncol*. 2014;25(3):611-8.
77. Issa-Nummer Y, Darb-Esfahani S, Loibl S et al. Prospective validation of immunological infiltrate for prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in HER2-negative breast cancer-s substudy of the neoadjuvant GeparQuinto trial. *PLoS One* 2013; 8(12): e79775.



78. Denkert C, von Minckwitz G, Brase JC, Sinn BV, Gade S, Kronenwett R, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers. *J Clin Oncol*. 2015;33(9):983-91.
79. Salgado R, Denkert C, Campbell C, Savas P, Nuciforo P, Aura C, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Associations With Pathological Complete Response and Event-Free Survival in HER2-Positive Early-Stage Breast Cancer Treated With Lapatinib and Trastuzumab: A Secondary Analysis of the NeoALTTO Trial. *JAMA Oncol*. 2015;1(4):448-54.
80. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, Komor M, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:105-113.
81. Simon RM, Paik S, Hayes DF: Use of archived specimens in evaluation of prognostic and predictive biomarkers. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101:1446-52.
82. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al.; International TILs Working Group 2014. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol*. 2015;26(2):259-71.
83. National Comprehensive Cancer Network. *NCCN Clinical Practice guidelines in Oncology: Breast Cancer*. Version 1.2018. disponible en: [www.nccn.org](http://www.nccn.org)
84. Martín M, Rodríguez-Lescure A, Ruiz A, Alba E, Calvo L, Ruiz-Borrego M, et al. Molecular predictors of efficacy of adjuvant weekly paclitaxel in early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;123(1):149.
85. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet*. 2014;384(9938):164-72.
86. Montagna E, Bagnardi V, Rotmensz N, Viale G, Pruneri G, Veronesi P, et al. Pathological complete response after preoperative systemic therapy and outcome: relevance of clinical and biologic baseline features. *Breast Cancer Res Treat*. 2010; 124(3):689-99.
87. Gluz O, Nitz U, Liedtke C, et al. Comparison of 12 weeks neoadjuvant nab-paclitaxel combined with carboplatinum vs. gemcitabine in triple-negative

- breast cancer: WSG-ADAPT TN randomized phase II trial. SABCS 2015; abstr S6-07.
88. Prat A, Fan C, Fernández A, Hoadley KA, Martinello R, Vidal M, et al. Response and survival of breast cancer intrinsic subtypes following multi-agent neoadjuvant chemotherapy. *BMC Med.* 2015;13:303.
  89. Isakoff SJ, Mayer EL, He L, Traina TA, Carey LA, Krag KJ, et al. TBCRC009: A Multicenter Phase II Clinical Trial of Platinum Monotherapy With Biomarker Assessment in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2015; 33(17):1902-9.
  90. Couch FJ, Hart SN, Sharma P, Toland AE, Wang X, Miron P, et al. Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. *J Clin Oncol.* 2015;33(4):304-11.
  91. Tutt A, Ellis P, Kilburn L, Gilett C, Pinder S, Abraham J, et al. The TNT trial: A randomized phase III trial of carboplatin (C) compared with docetaxel (D) for patients with metastatic or recurrent locally advanced triple negative or BRCA1/2 breast cancer (CRUK/07/012). 2014, San Antonio, TX: 2014 San Antonio Breast Cancer Symposium. Abstract [S3-01].
  92. Von Minckwitz G, Schneeweiss A, Loibl S, Salat C, Denkert C, Rezai M, et al. Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(7):747-56.
  93. Sikov WM, Berry DA, Perou CM, Singh B, Cirrincione CT, Tolaney SM, et al. Impact of the addition of carboplatin and/or bevacizumab to neoadjuvant once-per-week paclitaxel followed by dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide on pathologic complete response rates in stage II to III triple-negative breast cancer: CALGB 40603 (Alliance). *J Clin Oncol.* 2015;33(1):13-21.
  94. Von Minckwitz G, Loibl S, Schneeweiss A, et al. Early survival analysis of the randomized phase II trial investigating the addition of carboplatin to neoadjuvant therapy for triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto). 2015, San Antonio, TX: 2015 San Antonio Breast Cancer Symposium. Abstract S2-04.

95. Sikov WM, Berry DA, Perou CM, et al: Event-free and overall survival following neoadjuvant weekly paclitaxel and dose-dense AC +/- carboplatin and/or bevacizumab in triple-negative breast cancer: Outcomes from CALGB 40603 (Alliance). 2015 San Antonio Breast Cancer Symposium. Abstract S2-05.
96. Sharma P, López-Tarruella S, García-Saenz JA, Ward C, Connor CS, Gómez HL, et al. Efficacy of neoadjuvant carboplatin plus docetaxel in triple negative breast cancer: combined analysis of two cohorts. *Clin Cancer Res.* 2017; 23(3):649–657.
97. Masuda N, Lee SJ, Ohtani S, Im YH, Lee ES, Yokota I, et al. Adjuvant Capecitabine for Breast Cancer after Preoperative Chemotherapy. *New Eng J Med.* 2017;376(22):2147-59.
98. Robson M, Im SA, Senkus E, Xu B, Domchek SM, Masuda N, et al. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med.* 2017;377(6):523-533..
99. Telli M, Jensen KC, Vinayak S, Kurian AW, Lipson JA, Flaherty PJ, et al. Phase II Study of Gemcitabine, Carboplatin, and Iniparib As Neoadjuvant Therapy for Triple-Negative and BRCA1/2 Mutation-Associated Breast Cancer With Assessment of a Tumor-Based Measure of Genomic Instability: PrECOG 0105. *J Clin Oncol.* 2015; 33(17):1895–1901.
100. Rugo HS, Olopade OI, DeMichele A, Yau C, van 't Veer LJ, Buxton MB, et al. Adaptive Randomization of Veliparib-Carboplatin Treatment in Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2016;375(1):23-34.
101. Litton JK, Scoggins M, Hess KR, Ahrada B, Barcenas CH, et al. Neoadjuvant talazoparib (TALA) for operable breast cancer patients with a BRCA mutation (BRCA+). 2018. *J Clin Oncol.* 2018;36(suppl 15: abstr 508).
102. Budczies J, Bockmayr M, Denkert C, et al. Classical pathology and mutational load of breast cancer - integration of two worlds. *J Pathol Clin Res.* 2015; 1(4):225-238.
103. Banerji S, Cibulskis K, Rangel-Escareno C, et al. Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature.* 2012;486 (7403):405-09.
104. Lynce F, Xiu J, Obeid E, et al. Tumor mutational load in gynecological and breast cancer. *J Clin Oncol.* 2017;35(suppl 7S; abstr 44).

105. Nanda R, Chow LQ, Dees EC, Berger R, Gupta S, Geva R, et al. Pembrolizumab in Patients With Advanced Triple-Negative Breast Cancer: Phase Ib KEYNOTE-012 Study. *J Clin Oncol*. 2016;34(21):2460-7.
106. Adams S, Loi S, Toppmeyer D, Cescon DW, De Laurentiis M, Nanda R, et al. Phase 2 study of pembrolizumab as first-line therapy for PD-L1–positive metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC): Preliminary data from KEYNOTE-086 cohort B. *J Clin Oncol* 35, 2017 (suppl; abstr 1088).
107. Nanda R, Liu MC, Yau C, Asare S, Hylton N, Van't Veer L, et al. Pembrolizumab plus standard neoadjuvant therapy for high-risk breast cancer (BC): Results from I-SPY 2. *J Clin Oncol* 35, 2017 (suppl; abstr 506).
108. Traina TA, Miller K, Yardley DA, Eakle J, Schwartzberg LS, O'Shaughnessy J, et al. Enzalutamide for the Treatment of Androgen Receptor-Expressing Triple-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2018;36(9):884-90.
109. Niemeier LA, Dabbs DJ, Beriwal S, Striebel JM, Bhargava R. Androgen receptor in breast cancer: Expression in estrogen receptor-positive tumors and in estrogen receptor-negative tumors with apocrine differentiation. *Mod Pathol* 2009;23:205–212.
110. Gucaip A, Tolaney S, Isakoff SJ, et al. Phase II trial of bicalutamide in patients with androgen receptorpositive, estrogen receptor-negative metastatic Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 2013;19(19):5505-12.
111. Bardia A, Mayer IA, Diamond JR, Moroosse RL, Isakoff SJ, Starodub AN, et al. Efficacy and Safety of Anti-Trop-2 Antibody Drug Conjugate Sacituzumab Govitecan (IMMU-132) in Heavily Pretreated Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2017;35(19):2141-48.
112. Yardley DA, Weaver R, Melisko ME, Saleh MN, Arena FP, Forero A, et al. EMERGE: A Randomized Phase II Study of the Antibody-Drug Conjugate Glembatumumab Vedotin in Advanced Glycoprotein NMB-Expressing Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33(14):1609-19.
113. Kim SB, Dent R, Im SA, Espié M, Blau S, Tan AR, et al.; LOTUS investigators. Ipatasertib plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel as first-line therapy for metastatic triple-negative breast cancer (LOTUS): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2017;S1470-2045(17):30450-3.

114. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, Pietenpol JA. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* 2011; 121:2750-67.
115. Mayer IA, Abramson VG, Lehmann BD, Pietenpol JA. New strategies for triple-negative breast cancer--deciphering the heterogeneity. *Clin Cancer Res.* 2014;20 (4): 782-90.
116. Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, Estrada MV, Johnson KN, Shyr Y, et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLoS One.* 2016;11(6): e0157368.
117. Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, Covington KR, Contreras A, Fuqua SA, et al. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2015;21(7):1688-98.
118. Jézéquel P, Loussouarn D, Guérin-Charbonnel C, Campion L, Vanier A, Gouraud W, et al. Gene-expression molecular subtyping of triple-negative breast cancer tumours: importance of immune response. *Breast Cancer Res.* 2015;17:43-58.
119. Masuda H, Baggerly KA, Wang Y, Zhang Y, Gonzalez-Angulo AM, Meric-Bernstam F, et al. Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. *Clin Cancer Res.* 2013; 19(19):5533-40.
120. Ring BZ, Hout DR, Morris SW, Lawrence K, Schweitzer BL, Bailey DB, et al. Generation of an algorithm based on minimal gene sets to clinically subtype triple negative breast cancer patients. *BMC Cancer.* 2016;16:143.
121. Liu NQ, Stingl C, Look MP, Smid M, Braakman RB, De Marchi T, et al. Comparative proteome analysis revealing an 11-protein signature for aggressive triple-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(2):djt376.
122. Campone M, Valo I, Jézéquel P, Moreau M, Boissard A, Campion L, et al. Prediction of Recurrence and Survival for Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) by a Protein Signature in Tissue Samples. *Mol Cell Proteomics.* 2015; 14(11): 2936–46.

123. Gámez-Pozo A, Trilla-Fuertes L, Prado-Vázquez G, Chiva C, López-Vacas R, et al. Prediction of adjuvant chemotherapy response in triple negative breast cancer with discovery and targeted proteomics. *PLoS One*. 2017;12(6): e0178296.
124. Aebersold R, Mann M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature*. 2016;537(7620):347–55.
125. Ludwig C, Gillet L, Rosenberger G, Amon S, Collins BC, Aebersold R. Data-independent acquisition-based SWATH-MS for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol*. 2018; 14(8): e8126.
126. Gámez-Pozo A, Ferrer NI, Ciruelos E, López-Vacas R, Martínez FG, Espinosa E, Vara JÁ. Shotgun proteomics of archival triple-negative breast cancer samples. *Proteomics Clin Appl*. 2013;7(3-4):283-91.
127. Gámez-Pozo A, Sánchez-Navarro I, Calvo E, Díaz E, Miguel-Martín M, López R, et al. Protein phosphorylation analysis in archival clinical cancer samples by shotgun and targeted proteomics approaches. *Mol Biosyst*. 2011;7(8):2368-74.
128. Gillet LC, Navarro P, Tate S, Röst H, Selevsek N, Reiter L, Bonner R, Aebersold R. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol Cell Proteomics*. 2012;11(6):O111.016717.
129. Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, et al. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques*. 2003 Feb;34(2):374-8.
130. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(9):5116-21.
131. Abreu G, Edwards D, Labouriau R. High-Dimensional Graphical Model Search with the gRapHD R Package *Journal of Statistical Software* 2010. p. 1-18.
132. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*. 2009; 4(1): 44-57.



133. De Velasco G, Trilla-Fuertes L, Gamez-Pozo A, Urbanowicz M, Ruiz-Ares G, Sepúlveda JM, et al. Urothelial cancer proteomics provides both prognostic and functional information. *Sci Rep.* 2017;7(1):15819.
134. Gámez-Pozo A, Berges-Soria J, Arevalillo JM, Nanni P, López-Vacas R, Navarro H, et al. Combined label-free quantitative proteomics and microRNA expression analysis of breast cancer unravel molecular differences with clinical implications. *Cancer Res.* 2015; 2243-53.
135. Gámez-Pozo A, Trilla-Fuertes L, Berges-Soria J, Selevsek N, López-Vacas R, Díaz-Almirón M, et al. Functional proteomics outlines the complexity of breast cancer molecular subtypes. *Scientific Reports.* 2017;7(1):10100.
136. Simon R. Roadmap for developing and validating therapeutically relevant genomic classifiers. *J Clin Oncol.* 2005;23(29):7332-41.
137. Yang W, Soares J, Greninger P, Edelman EJ, Lightfoot H, Forbes S, et al. Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (GDSC): a resource for therapeutic biomarker discovery in cancer cells. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Database issue):D955-61.
138. Trilla-Fuertes L, Gámez-Pozo A, Arevalillo JM, Díaz-Almirón M, Prado-Vázquez G, Zapater-Moros A, et al. Molecular characterization of breast cancer cell response to metabolic drugs. *Oncotarget.* 2018;9(11):9645-60.
139. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer.* 2007;109(9): 1721-8.
140. Dawood S, Broglio K, Esteva FJ, Yang W, Kau SW, Islam R, et al. Survival among women with triple receptor-negative breast cancer and brain metastases. *Ann Oncol.* 2009;20(4):621-7.
141. Blum JL, Flynn PJ, Yothers G, Asmar L, Geyer CE Jr, Jacobs SA et al. Anthracyclines in Early Breast Cancer: The ABC Trials-USOR 06-090, NSABP B-46-I/USOR 07132, and NSABP B-49 (NRG Oncology). *J Clin Oncol.* 2017;35(23):2647-55.

142. Pilotte J, Kiosses W, Chan SW, Makarenkova HP, Dupont-Versteegden E, Vanderklisch PW. Morphoregulatory functions of the RNA-binding motif protein 3 in cell spreading, polarity and migration. *Sci Rep.* 2018;8(1):7367
143. Jögi A, Brennan DJ, Rydén L, Magnusson K, Fernö M, Stål O, et al. Nuclear expression of the RNA-binding protein RBM3 is associated with an improved clinical outcome in breast cancer. *Mod Pathol.* 2009;22(12):1564-74.
144. Kang SH, Cho J, Jeong H, Kwon SY. High RNA-binding Motif Protein 3 Expression Is Associated with Improved Clinical Outcomes in Invasive Breast Cancer. *J Breast Cancer.* 2018;21(3):288-296.
145. Ehlén A, Brennan DJ, Nodin B, O'Connor DP, Eberhard J, Alvarado-Kristensson M, et al. Expression of the RNA-binding protein RBM3 is associated with a favourable prognosis and cisplatin sensitivity in epithelial ovarian cancer. *J Transl Med.* 2010;8:78.
146. Ye F, Jin P, Cai X, Cai P, Cai H. High RNA-Binding Motif Protein 3 (RBM3) Expression is Independently Associated with Prolonged Overall Survival in Intestinal-Type Gastric Cancer. *Med Sci Monit.* 2017;23:6033-6041.
147. Jang HH, Lee HN, Kim SY, Hong S, Lee WS. Expression of RNA-binding Motif Protein 3 (RBM3) and Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) Is Associated with Improved Clinical Outcome in Patients with Colon Cancer. *Anticancer Res.* 2017;37(4):1779-85.
148. Siesing C, Sorbye H, Dragomir A, Pfeiffer P, Qvortrup C, Pontén F, et al. High RBM3 expression is associated with an improved survival and oxaliplatin response in patients with metastatic colorectal cancer.
149. Jonsson L, Gaber A, Ulmert D, Uhlén M, Bjartell A, Jirström K. High RBM3 expression in prostate cancer independently predicts a reduced risk of biochemical recurrence and disease progression. *Diagn Pathol.* 2011;6:91.
150. Jonsson L, Bergman J, Nodin B, Manjer J, Pontén F, Uhlén M, Jirström K. Low RBM3 protein expression correlates with tumour progression and poor prognosis in malignant melanoma: an analysis of 215 cases from the Malmö Diet and Cancer Study. *J Transl Med.* 2011;9:114
151. Ehlén Å, Nodin B, Rexhepaj E, Brändstedt J, Uhlén M, Alvarado-Kristensson M, et al. RBM3-regulated genes promote DNA integrity and affect clinical outcome in epithelial ovarian cancer. *Transl Oncol.* 2011;4(4):212-21.



152. Tummala H, Li X, Homayouni R. Interaction of a novel mitochondrial protein, 4-nitrophenylphosphatase domain and non-neuronal SNAP25-like protein homolog 1 (NIPSNAP1), with the amyloid precursor protein family. *Eur J Neurosci.* 2010;31(11):1926-34.
153. Nautiyal M, Sweatt AJ, MacKenzie JA, Mark Payne R, Szucs S, Matalon R, et al. Neuronal localization of the mitochondrial protein NIPSNAP1 in rat nervous system. *Eur J Neurosci.* 2010;32(4):560-9.
154. Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2018 Oct 20. doi: 10.1056/NEJMoa1809615.
155. Reddy SM, Barcenas CH, Sinha AK, Hsu L, Moulder SL, Tripathy D, et al. Long-term survival outcomes of triple-receptor negative breast cancer survivors who are disease free at 5 years and relationship with low hormone receptor positivity. *Br J Cancer.* 2018; 118(1):17-23.
156. Schymeinsky J, Gerstl R, Mannigel I, Niedung K, Frommhold D, Panthel K, et al. A fundamental role of mAbp1 in neutrophils: impact on beta(2) integrin-mediated phagocytosis and adhesion in vivo. *Blood.* 2009;114(19): 4209-20.
157. Hepper I, Schymeinsky J, Weckbach LT, Jakob SM, Frommhold D, Sixt M, et al. The mammalian actin-binding protein 1 is critical for spreading and intraluminal crawling of neutrophils under flow conditions. *J Immunol.* 2012;188(9): 4590-601.
158. Wang X, Li Y, Fan Y, Yu X, Mao X, Jin F. PTBP1 promotes the growth of breast cancer cells through the PTEN/Akt pathway and autophagy. *J Cell Physiol.* 2018;233(11):8930-39.
159. Wen J, Toomer KH, Chen Z, Cai X. Genome-wide analysis of alternative transcripts in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;151(2):295-307.
160. He X, Arslan AD, Ho TT, Yuan C, Stampfer MR, Beck WT. Involvement of polypyrimidine tract-binding protein (PTBP1) in maintaining breast cancer cell growth and malignant properties. *Oncogenesis.* 2014;3:e84.
161. He X, Pool M, Darcy KM, Lim SB, Auersperg N, Coon JS, Beck WT. Knock-down of polypyrimidine tract-binding protein suppresses ovarian tumor cell growth and invasiveness in vitro. *Oncogene.* 2007;26(34):4961-8.

162. Cheung HC, Hai T, Zhu W, Baggerly KA, Tsavachidis S, Krahe R, Cote GJ. Splicing factors PTBP1 and PTBP2 promote proliferation and migration of glioma cell lines. *Brain*. 2009;132(Pt 8):2277-88.
163. Orozco JI, Manughian-Peter AO, Salomon MP, O'Day S, Hoon DSB, Marzese DM. Mechanisms of immune evasion in triple-negative breast cancer patients. *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36(15 suppl): abstract 1096.
164. Bustos MA, Orozco JIJ, Salomon MP, Hoon DSB, Marzese DM. CRISPR/Cas9-guided editing of spliceosome factors enhances major histocompatibility complex proteins in triple-negative breast cancer. *Cancer Res*, 2018;78(4 Suppl):Abstract nr P1-05-02.
165. Schmidt M, Hellwig B, Hammad S, Othman A, Lohr M, Chen Z, et al. A comprehensive analysis of human gene expression profiles identifies stromal immunoglobulin kappa C as a compatible prognostic marker in human solid tumors. *Clin Cancer Res*. 2012;18(9):2695–703.
166. Schmidt M, Bohm D, von Torne C, Steiner E, Puhl A, Pilch H, et al. The humoral immune system has a key prognostic impact in node-negative breast cancer. *Cancer Res*. 2008;68(13):5405–13.
167. Chen Z, Gerhold-Ay A, Gebhard S, Boehm D, Solbach C, Lebrecht A, et al. Immunoglobulin kappa C predicts overall survival in node-negative breast cancer. *PLoS One*. 2012; 7(9):e44741.
168. Yeong J, Lim JCT, Lee B, Li H, Chia N, Ong CCH, et al. High Densities of Tumor-Associated Plasma Cells Predict Improved Prognosis in Triple Negative Breast Cancer. *Front Immunol*. 2018;9:1209.

# CLAVE DE ABREVIATURAS

---

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**AJCC:** *American Joint Committee on Cancer.*

**ARN:** Ácido ribonucleico.

**ASCO:** *American Society of Clinical Oncology.*

**BCI:** *Breast Cancer Index.*

**BL:** *Basal like.*

**CAP:** *College of American Pathologists.*

**CMF:** Ciclofosfamida, metotrexate, fluoracilo.

**CK:** Citoqueratinas.

**CMTN:** Carcinoma de mama triple negativo.

**DAVID:** Base de datos para Anotación, Visualización y Descubrimiento Integrado (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*).

**DBNL:** *Drebrin-like Protein.*

**DDA:** Adquisición Dependiente de Datos (*Data Dependent Acquisition*).

**DIA:** Adquisición Independiente de Datos (*Data Independent Acquisition*).

**EGFR:** Receptor de factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor*).

**EBCTCG:** *Early Breast Cancer trialist' Collaborative Group.*

**FDA:** *Food and Drug Administration.*

**FDR:** tasa de descubrimientos falsos (*False Discovery Rate*).

**FFPE:** Fijadas en Formol y Embebidas en Parafina (*Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded*).

**gpNMB:** Glicoproteína no metastásica B.

**HCL:** agrupamiento jerárquico (*Hierarchical Clustering*).

**HER2:** Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*).

**HR:** Hazard Ratio.

**IGHG1:** *Immunoglobulin Heavy Constant Gamma 1*.

**IGKC:** Immunoglobulin Kappa Constant.

**IHQ:** Inmunohistoquímica.

**INE:** Instituto Nacional de Estadística.

**ISH:** Hibridación *in situ*.

**KEGG:** *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, Kanehisa y Goto.

**LC:** Cromatografía Líquida.

**MS:** Espectrometría de Masas.

**NIPSNAP1:** Protein NipSnap homolog 1.

**PAAF:** Punción aspiración con aguja fina.

**PARP:** Poli-ADP ribosa polimerasa.

**PRM:** monitorización de reacciones paralelas (*Parallel Reaction Monitoring*).

**PTBP1:** *Polypyrimidine Tract Binding Protein 1*.

**RCp:** Respuesta completa patológica.

**RBM 3:** *RNA-binding motif protein 3*.

**RE:** Receptor de Estrógeno.

**RH:** Receptores Hormonales.

**RP:** Receptor de Progesterona.

**RS:** *Recurrence Score*.

**ROR:** Riesgo de Recaída (*Risk of Recurrence*).

**RT-PCR:** Proceso de transcripción inversa seguida de PCR a tiempo real.

**SAM:** Análisis de significación de *microarrays* (*Significance Analysis of Microarrays*).

**SLE:** Supervivencia Libre de Enfermedad.

**SNC:** Sistema Nervioso Central.

**SG:** Supervivencia Global.

**SRM:** monitorización de reacción selectiva (*Selected Reaction Monitoring*).

**SWATH:** *Sequential Windowed Acquisition of All Theoretical Fragment Ion Mass Spectra*.

**TAC:** Tomografía Axial Computerizada.

**TILs:** Linfocitos infiltrantes de tumores.