



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

**TIPIFICACIÓN DE BIOMARCADORES EPIGENÉTICOS EN PACIENTES
CON CÁNCER DE MAMA LOCALMENTE AVANZADO COMO FACTORES
PRONÓSTICOS DE LA EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD Y
PREDICTIVOS DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON
QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE**

Tesis doctoral presentada por

Vanesa Quiroga García

para optar al grado de **Doctora**, por la Universidad Autónoma de Barcelona

Doctoranda

Directora

Directora

Directora

Tutor

Vanesa Quiroga
García

Mireia Margelí
Vilà

Eva M^a Castellà
Fernández

Anna Martínez
Cardús

Manuel Monreal
Bosch

Barcelona, 2019

Tipificación de biomarcadores epigenéticos en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado como factores pronósticos de la evolución de la enfermedad y predictivos de respuesta al tratamiento con quimioterapia neoadyuvante

Este trabajo se ha realizado en el Servicio de Oncología médica del ICO (Institut Català d'Oncologia) Badalona conjuntamente con el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, el IDIBELL (Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge) y el IGTP (Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol), bajo la dirección de las Dras. Mireia Margelí Vila, Eva María Castellà Fernández y Anna Martínez Cardús y el tutor Manuel Monreal Bosch.

Agradecimientos

A mis Directoras de tesis por su apoyo y ayuda durante toda la elaboración del trabajo. A la Dra. Mireia Margelí quien fue la primera en confiar e impulsar este proyecto. A la Dra. Eva María Castellà por todas las horas de docencia y compañía en el laboratorio de anatomía patológica y, a la Dra. Anna Martínez por su optimismo y ayuda ante las dificultades que surgieron durante el proyecto.

A mi Tutor de tesis, el Dr. Manuel Monreal, por su soporte y disponibilidad.

Al equipo de la Dra. Eva Martínez-Balibrea del IGTP: a la Dra. Cristina Queralt y Sara Cabrero por la colaboración en el análisis epigenético, por su rapidez y disponibilidad en todo momento.

Al equipo del Dr. Esteller de IDIBELL, por su colaboración con el análisis epigenético. En especial al Dr. Sebastián Morán, por su soporte en el análisis bioinformático y bioestadístico.

Al servicio de Anatomía Patológica y Banco de Tumores y Tejidos del HUGTiP. En especial a Laia Pérez, por su paciencia y colaboración en la selección de las muestras.

A mis compañeros del Servicio de Oncología médica y a mi jefe, el Dr. Mesía por su confianza.

A todas las personas, que son muchas y no se han nombrado, que han colaborado de forma directa o indirecta en que este proyecto pudiera ser posible.

Y en especial a todas las pacientes, porque sin ellas no se podría haber realizado este trabajo.

Barcelona, 2019

Tipificación de biomarcadores epigenéticos en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado como factores pronósticos de la evolución de la enfermedad y predictivos de respuesta al tratamiento con quimioterapia neoadyuvante

Abreviaturas

AA: Ácido araquidónico

AC: Adriamicina y ciclofosfamida

ACADL: Acyl-CoA Dehydrogenase Long Chain

ADAM23: Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 23

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AJCC: The American Joint Committee on Cancer

AKT/PI3K: fosfoinositida-3-quinasa-proteína quinasa B / Akt

APC: Adenomatous polyposis coli

AR: Receptores de andrógeno

ARN: Ácido ribonucleico

ASCO-CAP: American Society of Clinical Oncology-College of American Pathologists

ASCO: The American Society of Clinical Oncology

ATOH8: Atonal BHLH Transcription Factor 8

BAG: Biopsia con aguja gruesa

BC: Beta carotenos

BCI: Breast Cancer Index

BHA: Bisfenol A

BL-TNBC: Triple negativo breast cancer –basal

BRCA: Breast Cancer Type susceptibility protein

CDH1: Cadherina 1

CDH13: Cadherina 13

CDK: Quinasa dependiente de ciclinas

CEA: Antígeno carcinoembrionario

CHD1: Helicasa con cromodominio de unión a ADN 1

CHEK2: Serina/treonina proteína quinasa CHK2

CI: Intervalo de confianza

CISH: Hibridación “in situ” con Cromógeno

CKI: inhibidor de la quinasa dependientes de ciclina

CMF: Ciclofosfamida, metrotexate, fluorouracilo

CMF: Ciclofosfamida, Metrotexate, Fluorouracilo

Cola terminal C: C-Terminal, carboxilo terminal, carboxi-terminal, extremo COOH terminal

Cola terminal N: N-Terminal, amino-terminal, NH₂-terminal, extremo amina

CpG: islas de Citosina(C) y Guanina (G) enlazadas por fosfatos (p)

CPS-EG score: Pretreatment clinical stage and post-treatment pathologic stage (CPS score); estrogen receptor status and tumor grade (CSP+EG score).

CSC: Células madre de cáncer

CSS: Cancer Specific Survival

CTCs: Células tumorales circulantes

DEC: Dominio extracelular

DNMT: ADN metiltransferasas

DSC3: Desmocolina-3

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

EMT: Transición epitelio mesénquima

EP: EndoPredict

ESMO: European Society of Medical Oncology

ETS1: Protein C-ets-1

FAM198B: Family With Sequence Similarity 198 Member B

FDA: Food and drug administration

FISH: Hibridación "in situ" con Fluorescente

G1: Fase G1 del ciclo celular o Gap 1

G2: Fase G2 del ciclo celular o Gap 2

GATA3: Trans-acting T-cell-specific transcription factor GATA-3

GGI: Genome grade index

GSTP1: Glutathione S- Transferase Pi

GSTP1: Glutathione S-transferase P

GSTP1: Glutathione S-Transferase Pi 1

Gy: Gray

HATs: Acetil transferasas de histonas

HDAC: Desacetilasas de histona

HER1: Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 1

HER2: Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2

HER2e-TNBC: Triple negativo breast cancer HER2-enriched

HLH: Helix-Loop-Helix protein family

HOXB2: Homeobox B2

HR: Hazard ratio

HSD17B4: Hydroxysteroid 17- Beta Dehydrogenase 4

Hsp: Heat shock proteins

I-TNBC: Triple negativo asociado al sistema inmune

IA: Inhibidores de la aromatasa

ICO: Institut Català d'Oncologia

ID1: Inhibitor of DNA Binding 1

IHQ: inmunohistoquímica

IIR: Inverted terminal repeated
KDR: Activador tirosin quinasa de VEGFR-2
KDR: Kinasa insert domain receptor
Ki67: Proliferation marker protein Ki-67
LA-TNBC: Triple negativo breast cancer luminal / apocrino
M: Fase de Mitosis
M: Referente a la afectación a distancia (Metástasis)
MAP2K4: Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 4
MAP3K1: Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1
MBD1: Methyl-CpG Binding Domain Protein 1
MBPs: Metil-CpG proteínas de unión
MeCP2: methyl CpG binding protein 2
MGI: Molecular Grade Index
miRNA: microRNA
ML-TNBC: Triple negativo breast cancer- mesenquimal
mTOR: Diana de rapamicina en células de mamífero
N: Número de pacientes
N: Referente a la afectación ganglionar (Node)
NF- κ B: Factor nuclear – κ B
OR: Overall response
p16INK4A: Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina ,denominado CDKN2A o p16
p21waf1: Inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 1, denominado p21
p27Kip1: Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1B
PAAF: Punción con aguja fina
PCDHB12: Protocadherin Beta 12
PCR: Polymerasa chain reaction
PIK3CA: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
PPP1R14A: Protein Phosphatase 1 Regulatory Inhibitor Subunit 14^a
PTEN: Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
RASSF1: Ras Association Domain Family Member 1
RE: Receptores de estrógeno
RECK: Reversion Inducing Cysteine Rich Protein
ROR: Riesgo de recurrencia según PAM50
RP: Receptores de progesterona
RR: Riesgo relativo
RS: Recurrence score
RT-CPR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

SAM: S-adenosinmetionina

SEAP: Sociedad Española de Anatomía Patológica

SEER: Surveillance, Epidemiology, and End Results

SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica

SFRP: Secreted Frizzled-related proteins

SFRP2: Secreted Frizzled Related Protein 2

SG: Supervivencia global

SLP: Supervivencia libre de progresión (o tiempo a la progresión)

T: Referente al Tumor (TNM)

TCGA: The Cancer Genome Atlas

TDM1: trastuzumab-emtansina

TEL: Translocation-Ets-leukemia virus

TMA: Tissue microarray

TN: Triple negativo

TNBC: Triple negativo breast cancer

TP53: Proteína tumoral 53

TTP: Tiempo a la progresión

TTP: Tiempo a la progresión (o supervivencia libre de progresión)

UAP1L1: UDP-N- Acetylglucosamine Pyrophosphorylase 1 Like 1

UFM: Unidad funcional de mama

UGT3A1: UDP Glycosyltransferase Family 3 Member A1

UTR: Untranslated region o untranslated tráiler

VEGFR-2: Factor de crecimiento vascular endotelial

Wnt: Protein wnt

YES: Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Yes

Índice

AGRADECIMIENTOS	3
ABREVIATURAS	5
ÍNDICE	9
1 RESUMEN	13
2 ABSTRACT	15
3 INTRODUCCIÓN GENERAL	17
3.1 Incidencia y mortalidad	17
3.2 Factores de riesgo	17
3.2.1 Factores familiares	17
3.2.2 Factores hormonales	18
3.2.3 Dieta y estilo de vida	19
3.2.4 Lesiones benignas de la mama	19
3.2.5 Densidad mamaria	19
3.2.6 Factores medioambientales	20
3.3 Diagnóstico y estadificación	20
3.3.1 Diagnóstico histológico	20
3.3.2 Diagnóstico patológico	20
3.3.3 Estadificación	20
3.4 Factores pronósticos y predictivos en cáncer de mama	23
3.4.1 Factores epidemiológicos	23
3.4.2 Factores patológicos	24
3.4.3 Papel de los receptores de estrógeno, progesterona y HER2	25
3.4.4 Marcadores de proliferación	26
3.4.5 Expresión génica y subtipos intrínsecos de cáncer de mama	27
3.4.6 Firmas genómicas y sus plataformas	29
3.5 Tratamiento	31
3.5.1 Cirugía	31
3.5.2 Radioterapia	33
3.5.3 Tratamiento sistémico	33
4 INTRODUCCIÓN ESPECÍFICA	37
4.1 Tratamiento neoadyuvante en cáncer de mama	37
4.1.1 Generalidades	37
4.1.2 Respuesta completa patológica	38
4.1.3 Neoadyuvancia y subtipo molecular de cáncer de mama	40
4.1.3.1 Neoadyuvancia en cáncer de mama Triple Negativo	41
4.1.3.2 Neoadyuvancia en tumores HER2-positivos	42
4.1.3.3 Neoadyuvancia en tumores RH-positivo/HER2-negativo	43
5 EPIGENÉTICA Y CÁNCER DE MAMA	43
5.1 Introducción	43
5.1.1 Factores ambientales y alteraciones epigenéticas en la incidencia de cáncer de mama	45
5.2 Principales mecanismos epigenéticos	46

5.2.1	Metilación del ADN.....	46
5.2.1.1	Metilación del ADN y cáncer de mama.....	47
5.2.2	Modificación de las histonas.....	49
5.2.2.1	Modificaciones de histonas y cáncer de mama.....	49
5.2.3	Silenciamiento mediado por RNA no codificantes.....	51
5.3	Epigenética y subtipos de cáncer de mama.....	51
5.3.1	Tumores luminales.....	52
5.3.2	Tumores triple negativos.....	53
5.3.3	Tumores HER2.....	54
6	OBJETIVOS.....	57
6.1	Hipótesis de trabajo.....	57
6.2	Objetivos.....	57
7	PACIENTES Y MÉTODOS.....	59
7.1	Pacientes.....	59
7.1.1	Inclusión de pacientes y base de datos clínicos.....	59
7.1.2	Recolección de muestras humanas.....	60
7.2	Métodos.....	60
7.2.1	Confección de tissue microarray.....	60
7.2.2	Análisis inmunohistoquímico.....	61
7.2.3	Análisis de HER2 mediante FISH.....	62
7.2.4	Análisis epigenético.....	62
7.2.4.1	<i>Análisis de perfiles epigenéticos por tecnología microarray.....</i>	<i>63</i>
7.2.4.2	<i>Pirosecuenciación.....</i>	<i>64</i>
7.3	Análisis estadístico.....	64
8	RESULTADOS.....	67
8.1	Resultado para el global de pacientes.....	67
8.1.1	Características de las pacientes.....	67
8.1.2	Respuesta patológica del global de las pacientes.....	72
8.1.3	Respuesta completa patológica y subtipos moleculares.....	73
8.1.4	Supervivencia libre de progresión y supervivencia global.....	74
8.1.5	TTP y SG en función de subtipo molecular.....	75
8.1.6	TTP y SG en función de subtipo molecular y obtención de respuesta completa patológica.....	77
8.1.7	Análisis univariante y multivariante: TTP y SG.....	80
8.2	Resultados Estudio Epigenético.....	85
8.2.1	Análisis de perfiles epigenéticos por tecnología de microarray.....	85
8.2.1.1	Cohorte “discovery” ICO.....	85
8.2.1.2	Cohorte "discovery" TCGA procedente de datos públicos.....	85
8.2.1.3	Identificación de biomarcadores de respuesta a taxanos.....	88
8.2.1.4	Identificación de biomarcadores de respuesta a antraciclinas.....	92
8.2.1.5	Relación entre diferencias de metilación y respuesta en ambos tratamientos en la cohorte TCGA.....	97
8.2.2	Análisis de validación de biomarcadores seleccionados por técnicas de pirosecuenciación.....	98
8.2.3	Correlación de los biomarcadores epigenéticos candidatos con la respuesta a la terapia y otros parámetros clínicos.....	99
8.2.3.1	Análisis de resultados para el gen <i>ID1</i>	99
8.2.3.2	Análisis de resultados para el gen <i>HOXB2</i>	106

8.2.3.3	Análisis de resultados para el gen <i>ATOH8</i>	111
8.2.3.4	Análisis exploratorio de los datos del TCGA para el global de la muestra BRCA .	114
9	DISCUSIÓN	119
9.1	Discusión resultados generales	119
9.1.1	Objetivo secundario 1: Analizar las características basales de las pacientes: determinar las características clínicas y patológicas	119
9.1.2	Objetivo secundario 2: Análisis de la respuesta patológica tras el tratamiento neoadyuvante.....	121
9.1.3	Objetivo secundario 3: Obtención de resultados de supervivencia libre de enfermedad y de supervivencia global.....	122
9.1.4	Objetivo secundario 4: Clasificar las muestras según los subtipos del cáncer de mama utilizando técnicas inmunohistoquímicas (RE, RP, HER2 y ki 67) y correlacionarlos con la respuesta patológica, supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global.....	124
9.2	Discusión resultados análisis epigenético.....	126
9.2.1	Objetivo principal: Determinación de biomarcadores epigenéticos mediante tecnología de microarray de metilación de ADN en la muestra seleccionada y correlacionarlos con las características clínico-patológicas, la respuesta y la supervivencia de las pacientes.....	126
9.2.2	Resultados <i>ID1</i>	127
9.2.3	Resultados <i>HOXB2</i>	130
9.2.4	Resultados <i>ATOH8</i>	132
9.3	Discusión global.....	134
10	CONCLUSIONES	137
	Referente a los objetivos secundarios:	137
	Referente al objetivo principal:.....	137
11	LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURA	139
12	FORTALEZAS	141
13	DEBILIDADES	143
14	ANEXOS	145
14.1	Descriptivo de las CpG seleccionadas.....	145
14.2	Análisis ontológico de los genes seleccionados de la cohorte “discovery” del TCGA	146
14.3	Descripción de la elaboración de los <i>primers</i> , puesta a punto <i>PCR</i> y resultados gel de agarosa.	148
14.4	Tablas del estado de metilación de los genes seleccionados.....	154
14.5	Regulación de la expresión del inhibidor de diferenciación (ID) y su función en la biología del cáncer.....	157
14.6	Financiación.....	157
15	BIBLIOGRAFÍA	159

Tipificación de biomarcadores epigenéticos en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado como factores pronósticos de la evolución de la enfermedad y predictivos de respuesta al tratamiento con quimioterapia neoadyuvante

1 Resumen

Introducción: El cáncer de mama es el cáncer más frecuente en el sexo femenino; y a pesar del incremento de la supervivencia de las pacientes en los últimos años; continúa habiendo un porcentaje no desdeñable de mortalidad por esta causa. Por este motivo, existe una necesidad de continuar investigando con el fin de mejorar esta supervivencia. Además de las alteraciones genéticas, las alteraciones epigenéticas tienen un papel importante en el desarrollo del cáncer. Se postula que determinadas alteraciones epigenéticas podrían diferir entre los distintos subtipos de cáncer de mama y que podrían actuar como factores pronósticos y/o predictivos de respuesta al tratamiento quimioterápico. Asimismo la potencial reversibilidad de las alteraciones epigenéticas, a diferencia de las genéticas, justifica el creciente interés en el conocimiento de las mismas, para poder determinar biomarcadores y posibles nuevas dianas terapéuticas para un diagnóstico y tratamiento de precisión.

Metodología: Se analizaron de forma retrospectiva 138 pacientes atendidas en el Servicio de Oncología Médica del Institut Català d'Oncologia de Badalona, entre los años 2003 y 2012, y tratadas con quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclinas y taxanos. Se determinaron las características clínicas y patológicas (mediante confección de *tissue microarrays* y técnicas inmunohistoquímicas y FISH) y se clasificaron a las pacientes según los subtipos de cáncer de mama. Se registró la respuesta completa patológica, la supervivencia libre de progresión y supervivencia global y se correlacionaron los parámetros clínico-patológicos con la respuesta y la supervivencia, así como los biomarcadores epigenéticos identificados. En el análisis epigenético, se seleccionó una cohorte "discovery" utilizando datos públicos del "The Cancer Genome Atlas": a partir de la cohorte BRCA se seleccionaron 28 casos para los que se disponían datos de metilación (microarrays de metilación de ADN) y mediante herramientas de bioinformática se determinaron 3 genes candidatos. Estos biomarcadores se validaron en nuestra "cohorte ICO de validación" mediante técnicas de pirosecuenciación, correlacionando los resultados obtenidos con las características clínico-patológicas, la respuesta y la supervivencia de las pacientes.

Resultados: La obtención de respuesta completa patológica se asoció a una mayor supervivencia libre de progresión; mientras que la persistencia de gran volumen tumoral en la mama (ypT4), la persistencia de enfermedad ganglionar, así como la presencia de enfermedad residual grado III, se relacionaron con una peor supervivencia. La negatividad de los receptores hormonales, el grado histológico alto y el índice de proliferación elevado fueron los factores clínicos con mayor correlación con la obtención de respuesta completa patológica. Se seleccionaron 3 biomarcadores: *ID1*, que se mostró diferentemente metilado entre los diversos subtipos de cáncer de mama, asociándose la hipometilación con subtipos de mayor agresividad (triple negativo). La hipometilación de *HOXB2*, se detectó mayormente en subtipos luminales, asociándose a una menor tasa de respuesta y a una peor supervivencia. La combinación de ambos marcadores, *ID1* metilado y *HOXB2* no metilado, un subgrupo de pacientes luminales de peor pronóstico. La hipometilación de *ATOH8* se correlacionó

con tumores de mayor agresividad (triple negativo), pero se relacionó con una mayor tasa de respuestas completas patológicas y una tendencia a una mayor supervivencia libre de enfermedad.

Conclusiones: Pese a la no disponibilidad de acceso a una clasificación molecular del cáncer de mama basada en firmas genéticas, la evaluación de las características clínico-patológicas previo al tratamiento neoadyuvante y en la enfermedad residual, continúa siendo una herramienta imprescindible para la correcta toma de decisiones terapéuticas. Se ha podido demostrar la utilidad de las plataformas epigenéticas con finalidad de seleccionar biomarcadores en cáncer. Aunque se requiere una validación en una cohorte más amplia y prospectiva, *ID1*, *HOXB2* y *ATOH8* se postulan como biomarcadores epigenéticos de predicción de respuesta a quimioterapia y pronóstico en cáncer de mama.

Palabras clave: Cáncer de mama, Epigenética, biomarcadores

2 Abstract

Introduction: Breast cancer is the most common cancer in females; and despite the increase in the patients' survival in the last years, there is a non-negligible percentage of mortality due to this cause. For this reason, there is a need to continue researching in order to improve patients' survival. In addition to genetic alterations, epigenetic alterations play an important role in the development of cancer. It is postulated that certain epigenetic alterations could differ between the different subtypes of breast cancer and that they could act as prognostic and/or predictive factors of response to chemotherapy. Likewise, the potential reversibility of epigenetic alterations, unlike genetic ones, justifies the growing interest in their knowledge, to be able to determine biomarkers and possible new therapeutic targets for a precision diagnosis and treatment.

Methodology: We retrospectively analysed 138 patients from 2003 to 2012 treated with neoadjuvant chemotherapy based on anthracyclines and taxanes, in the Medical Oncology Department of the Institut Català d'Oncologia in Badalona. We determined the clinical and pathological characteristics (by the elaboration of tissue microarrays, immunohistochemical techniques and FISH), and patients were classified according to breast cancer subtypes. The pathological complete response, progression-free survival and overall survival were recorded and the clinical-pathological parameters were correlated with the response and survival, as well as the epigenetic biomarkers. In the epigenetic analysis, a "discovery" cohort was selected through public data from "The Cancer Genome Atlas": from the BRCA cohort, 28 cases were chosen, for those with available methylation data (by DNA methylation microarrays) and three candidate genes were selected, using bioinformatics tools. These biomarkers were validated in our "ICO cohort of validation" by pyrosequencing techniques, correlating the results obtained with the clinical-pathological characteristics, the response and the patients' survival.

Results: Obtaining pathological complete response was associated with a longer progression-free survival whereas the persistence of large tumor volume in the breast (ypT4), the persistence of lymph node disease, as well as the presence of grade III residual disease, were associated with worse survival. The negativity of the hormonal receptors, the high histological grade and the high proliferation index were the clinical factors with the highest correlation with obtaining a pathological complete response. Three biomarkers were selected: *ID1* that was differently methylated among the breast cancer subtypes, associating the hypomethylation with more aggressive subtypes (triple negative). Hypomethylation of *HOXB2*, was mostly detected in luminal subtypes, associated with a lower response rate and worse survival. The combination of both biomarkers, methylated *ID1* and unmethylated *HOXB2*, defined a subgroup of luminal patients with worse prognosis. The hypomethylation of *ATOH8* was correlated with more aggressive tumors subtypes (triple negative), but it was related to a higher rate of pathological complete responses and a tendency to greater disease-free survival.

Conclusions: Despite the lack of availability of access to a molecular classification of breast cancer based on genetic signatures, the evaluation of clinical-pathological characteristics prior to neoadjuvant treatment and in the residual disease remains an essential tool for the correct choice of therapeutic decisions. It has been possible to demonstrate the usefulness of epigenetic platforms to select biomarkers in cancer. Although a validation in a larger and prospective cohort is required, *ID1*, *HOXB2* and *ATOH8* are postulated as epigenetic biomarkers for predicting response to chemotherapy and prognosis in breast cancer.

Key words: Breast cancer, Epigenetic, Biomarkers

3 Introducción General

3.1 Incidencia y mortalidad

El cáncer de mama supone un problema de salud a nivel mundial por ser el cáncer más frecuente en el sexo femenino diagnosticándose más de un millón de casos al año (1,67 millones; 11.9%). En España supone el 29 % de todos los cánceres, con una mortalidad del 15,5% con respecto al resto, por lo que sigue siendo la principal causa de muerte por cáncer en el sexo femenino en nuestra área. La incidencia del cáncer de mama ha incrementado en los últimos años; este cambio se ha relacionado con diferentes factores como son los cambios en los hábitos reproductivos, la introducción de la mamografía de cribado, la tendencia a la obesidad, la terapia hormonal sustitutiva y el uso de contraceptivos (1). En Cataluña en el año 2016 se detectaron 4534 nuevos casos de cáncer de mama, y 982 paciente murieron por esta causa; siendo la incidencia y la mortalidad de 67,5 y 12,1 cada 100000 respectivamente. La supervivencia a los 5 años es del 84,7%.

A nivel mundial la mortalidad por cáncer de mama es la quinta causa en la población general (522.000 muertes, 6.4%) debido a su mejor pronóstico. Existe sin embargo, un descenso progresivo de mortalidad por cáncer de mama desde 1990, que se ha atribuido a la detección y diagnóstico temprano así como a la aplicación de nuevos tratamientos adyuvantes. El incremento de la incidencia y el descenso en la mortalidad han incrementando la prevalencia del cáncer de mama hasta un 40,8% a los 5 años respecto al resto de cánceres en el año 2012 (2).

3.2 Factores de riesgo

Existen múltiples factores de riesgo que se han asociado con el desarrollo del cáncer de mama, pero la mayoría de ellos influyen de manera minoritaria en una paciente en concreto; hasta en un 50% de las pacientes diagnosticadas no se encuentra un factor de riesgo asociado más allá de la edad y el sexo femenino. La edad es un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama, incrementado su riesgo con la edad de las pacientes.

3.2.1 Factores familiares

La historia familiar de cáncer de mama es un factor de riesgo para desarrollar la enfermedad, pero sólo entre un 5 y un 10% de los casos tienen una predisposición hereditaria a desarrollar cáncer de mama. Las mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 se asocian de forma significativa a un incremento del riesgo de cáncer de mama y ovario. Estos genes tienen una herencia autosómica dominante, con una penetrancia variable. En un metaanálisis realizado el riesgo acumulativo de desarrollar cáncer de mama, en pacientes portadoras de la mutación, a una edad de 70 años fue de 57% en el caso de BRCA1 y del 40% en BRCA2 (3). Dichas mutaciones no sólo se asocian a cáncer de mama y ovario, también se ha visto que tienen una asociación con otro tipo de cánceres, como

cáncer de mama en el varón, cáncer de próstata y cáncer de trompa de Falopio. Asimismo los portadores de BRCA2 tienen también un mayor riesgo de melanoma y cáncer gástrico.

Las pacientes portadoras de mutación de BRCA1 tienen una mayor incidencia de desarrollar cáncer de mama triple negativo, y a ser tumores de mayor grado histológico con respecto a los tumores esporádicos. Sin embargo en las pacientes portadoras de mutación en BRCA2 el tipo de cáncer no difiere del esporádico en la población no portadora de mutaciones.

Existen otras mutaciones a parte de las mencionadas en los genes de BRCA, con menos prevalencia y penetrancia, como son TP53 y PTEN, que representan <1% de los cánceres de mama hereditarios (4). Las pacientes con síndrome de Li Fraumeni (mutaciones en TP53) tienen más tendencia a tumores con sobreexpresión de HER2 (5). Mutaciones específicas en el CHEK2 también se han asociado a cáncer de mama familiar pero en un porcentaje mucho menor (6); podría ser de utilidad realizar el screening de estas alteraciones en pacientes que tienen una asociación familiar significativa, pero que no pueden explicarse por mutaciones en los genes de BRCA1 y 2. Las nuevas técnicas de secuenciación (*next-generation sequencing*) realizan secuenciaciones de paneles de genes de alta y moderada penetrancia, siendo probable su utilización de una forma más accesible en un futuro, pudiendo cambiar la forma de realizar el screening genético a nuestras pacientes.

3.2.2 Factores hormonales

Los estrógenos endógenos parecen estar relacionados con el desarrollo de cáncer de mama; en concreto el tiempo de exposición a ellos durante la vida de la mujer (7). La menarquia precoz, la nuliparidad o la edad tardía del primer embarazo y la menopausia tardía, en relación a lo mencionado previamente, se relacionan con un incremento del riesgo de desarrollar cáncer de mama. Está demostrado que la deprivación prematura de estrógenos reduce el riesgo; como en el caso de la menopausia iatrogénica o la ooforectomía en pacientes pre menopáusicas (8).

La relación entre el embarazo y el riesgo de cáncer de mama es más compleja. Las mujeres que llevan a término su primer embarazo con edades después de los 30 años presentan un riesgo entre 2 y 5 veces superior a desarrollar cáncer de mama en comparación con las pacientes que tienen un hijo a término con edades entorno a los 18 años (7, 9). La nuliparidad incrementa el riesgo de desarrollo de cáncer de mama en comparación con las mujeres que tienen hijos. La lactancia materna disminuye el riesgo, sobretodo cuando se realiza en periodos prolongados.

El uso combinado de estrógenos y progestágeno como tratamiento hormonal sustitutivo incrementa el riesgo de cáncer de mama con una hazard ratio (HR) de 1.24 ($p < 0.001$) en comparación con placebo (10). Asimismo un estudio realizado en mujeres tratadas con terapia hormonal sustitutiva demostró una asociación con el tratamiento con un riesgo relativo de desarrollar cáncer de mama de 1.66 ($p < 0.001$) y de riesgo de muerte por cáncer de 1.22 ($p = 0.05$) (11).

3.2.3 Dieta y estilo de vida

El cáncer de mama se produce como resultado de las interacciones entre genes y dieta. En cuanto a la dieta, sólo el alcohol es reconocido por estar más consistentemente asociado con el riesgo de cáncer de mama de una forma lineal (12); así como la disminución de la ingesta de ácido fólico, tiamina y β -caroteno puede aumentar el riesgo, en relación directa con el consumo de alcohol.

Respecto a la dieta, numerosos estudios observacionales sugieren que las dietas con alto contenido en grasas se asocian con mayores tasas de cáncer de mama (13, 14); sin embargo un meta-análisis de ocho estudios epidemiológicos prospectivos no identificó una asociación entre la ingesta de grasa y el riesgo de cáncer de mama en mujeres adultas (11).

Los estudios realizados para evaluar el papel de la fruta/verdura, carne, así como patrones de la dieta y ejercicio y el riesgo de cáncer de mama, conducen a resultados inconsistentes (15, 16) por lo que se requieren de estudios que den respuesta a estas cuestiones.

La obesidad es otro factor de riesgo conocido para el desarrollo de cáncer de mama en pacientes postmenopáusicas; así como el aumento de la mortalidad por cáncer de mama. Las mujeres con un índice de masa corporal de ≥ 31.1 tienen 2,5 veces más riesgo de desarrollar cáncer de mama que aquellas con un índice de masa corporal de ≤ 22.6 (17). El peso juega un papel importante pero complejo en el riesgo de cáncer de mama.

3.2.4 Lesiones benignas de la mama

Las lesiones benignas de la mama se clasifican como proliferativas y no proliferativas; las segundas no se relacionan con un incremento de riesgo de cáncer de mama, pero las proliferativas se ha visto que a pesar de no presentar atipia, se correlacionan con un incremento de riesgo del desarrollo de cáncer de mama (RR = 1.5 - 2.0). En los casos en los que además se asocia atipia, el riesgo incrementa (RR= 4 - 5) (18). Asimismo existe una interacción entre atipia e historia familiar de cáncer de mama en un familiar de primer grado (19). Este subgrupo de pacientes tiene un riesgo 11 veces superior que las mujeres con lesiones benignas mamarias no proliferativas; con un riesgo absoluto de desarrollar cáncer de mama del 20% a los 15 años comparado con el 8% en mujeres con hiperplasia con atipia sin historia familiar de cáncer de mama.

3.2.5 Densidad mamaria

La densidad mamaria es conocida como factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama, a su vez una elevada densidad mamaria dificulta la detección precoz de lesiones malignas. La densidad mamaria viene determinada de forma genética y puede presentar variaciones en la menopausia. Se ha descrito un incremento en la probabilidad de desarrollo de cáncer de mama 4,7 veces superior en pacientes con una densidad mamaria $>75\%$ vs aquellas con densidad mamaria $>10\%$ (20).

3.2.6 Factores medioambientales

La exposición a radiaciones ionizantes incrementa el riesgo de desarrollo de cáncer de mama, sobretodo cuando se produce en edades tempranas. Se ha observado en pacientes expuestas a múltiples exploraciones mediante radiografía (rayos-X), en mujeres que han recibido irradiación de forma terapéutica por otras causas (por ejemplo en linfoma de Hodgking) y en supervivientes expuestos a bombas atómicas. Asimismo cuanto menor es la edad de exposición parece existir un mayor riesgo (21). Estudios realizados no han demostrado que exista un mayor riesgo por la exposición a campos electromagnéticos, ni por la exposición a pesticidas.

3.3 Diagnóstico y estadificación

3.3.1 Diagnóstico histológico

Ante cualquier sospecha clínica, mamográfica o en otra técnica de imagen, se debe realizar una confirmación histológica para descartar malignidad. Las técnicas disponibles para el diagnóstico de lesiones en la mama incluyen la punción con aguja fina (PAF), biopsia con aguja gruesa (BAG) y biopsia excisional. Las técnicas con biopsia son preferibles (PAF y BAG) por ser más coste-eficaces y además evitan el posible defecto estético de una cirugía.

3.3.2 Diagnóstico patológico

La anatomía patológica tiene un papel fundamental en el diagnóstico de cáncer de mama, no sólo para una correcta clasificación histológica; sino también para la determinación de factores pronósticos y predictivos de respuesta; alguno de ellos son considerados factores clásicos y otros están orientados a una mejor selección de las terapias individualizadas.

La clasificación histológica más utilizada es la del “The World Health Organization”(22) basada en el patrón de crecimiento y las características citológicas de las células tumorales invasivas. El tipo histológico más frecuente de cáncer de mama es el carcinoma ductal infiltrante, representando hasta un 70-80% de los casos, seguido del carcinoma lobulillar infiltrante que representa un 10% de los casos.

3.3.3 Estadificación

La última actualización del sistema de estadificación del cáncer de mama fue en el año 2017. El sistema “The American Joint Committee on Cancer (AJCC)” es a la vez clínico y patológico y se basa en el sistema de TNM, en el que la “T” hace referencia al tumor; la “N” a los ganglios; y la “M” a las metástasis (23) (Tabla 1).

El sistema de estadificación de la AJCC proporciona una estrategia para agrupar a los pacientes en función del pronóstico. Sin embargo, aunque la clasificación del TNM sigue siendo importante, actualmente ha sido superada por el rápido desarrollo de las clasificaciones moleculares de cáncer de

mama. Estas clasificaciones son más precisas a la hora de definir diferentes subgrupos, con diferentes pronósticos y diferentes respuestas a los tratamientos específicos para cáncer de mama. Estos tests de diagnóstico multigen se han ido incorporando de forma progresiva en la práctica diaria habitual en muchos centros como parte de las herramientas para la toma de decisiones en pacientes con cáncer de mama invasivo; y es por este motivo que en la octava edición de la AJCC se incorporan los resultados de la plataforma genética Oncotype® como una herramienta más para poder clasificar y estadificar a las pacientes.

Tabla 1: TNM y Estadios

Tumor Primario (T)	
Tx	No se puede evaluar el tumor primario
T0	No existe prueba de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ: CDIS (Carcinoma Ductal in situ); CLIS (Carcinoma lobulillar in situ)
Tis (Paget)	Enfermedad de Paget del pezón sin carcinoma asociado (Nota: la enfermedad de Paget con carcinoma asociado se clasifica de acuerdo con el tamaño del tumor)
T1	El tumor mide ≤ 20 mm en su mayor dimensión
T1mi	El tumor mide ≤ 1 mm en su mayor dimensión
T1a	El tumor mide > 1 mm pero ≤ 5 mm en su mayor dimensión
T1b	El tumor mide > 5 mm pero ≤ 10 mm en su mayor dimensión
T1c	El tumor mide > 10 mm pero ≤ 20 mm en su mayor dimensión
T2	El tumor mide > 20 mm pero ≤ 50 mm en su mayor dimensión
T3	El tumor mide > 50 mm en su mayor dimensión
T4	El tumor mide cualquier tamaño con extensión directa a la pared pectoral o a la piel (ulceración o nódulos cutáneos)
T4a	Extensión a la pared torácica que no solo incluye adherencia o invasión a los músculos pectorales
T4b	Ulceración o nódulos satélites ipsilaterales o edema (incluyendo la piel de naranja) la cual no satisface el criterio de carcinoma inflamatorio
T4c	Ambos, T4a y T4b
T4d	Carcinoma inflamatorio

Ganglios linfáticos regionales (N). Estadio clínico	
Nx	No se puede evaluar el ganglio linfático regional (p.ej., se extirpó previamente)
N0	No hay metástasis regional a los ganglios linfáticos
N1	Metástasis en grado ipsilateral movable I, II ganglio linfático axilar o axilares
N2	Metástasis en grado ipsilateral I, II ganglios linfáticos axilares que están clínicamente fijos o apelmazados ó Metástasis en ganglios mamaros ipsilaterales internos detectados clínicamente en ausencia de metástasis a ganglio linfático axilar clínicamente manifiesta
N2a	Metástasis en ganglios axilares ipsilaterales fijos entre si o a otras estructuras
N2b	Metástasis solamente en ganglios mamaros internos ipsilaterales detectados clínicamente en ausencia de metástasis clínicamente manifiesta en ganglios axilares
N3	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) infraclaviculares ipsilaterales ó Metástasis en ganglio(s) linfático(s) mamaros ipsilaterale(s) interno(s) clínicamente detectado(s) a con metástasis manifiesta en ganglios linfáticos axilares ó Metástasis en ganglio(s) linfático(s) supraclaviculare(s) ipsilaterale(s) con implicación axilar o mamaria interna de ganglios linfáticos o sin esta
N3a	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) infraclaviculares ipsilaterales y axilares
N3b	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) mamaros internos ipsilaterales y ganglio(s) linfático(s) axilares
N3c	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) ipsilaterales supraclaviculares

Ganglios linfáticos regionales (N) patológicos

pNx	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales (p.ej., extirpación previa o no se extirpó para un estudio patológico)
pN0	No se identificó metástasis en ganglios linfáticos regionales por medios histológicos
pN0(i-)	No afectación histológica, inmunohistoquímica negativa
pN0(i+)	No afectación histológica, inmunohistoquímica positiva, pero sin acúmulos celulares mayores a 0.2 mm
pN0(mol-)	Histológicamente no hay metástasis a ganglio linfático regional, hallazgos moleculares negativo (RT-PCR)
pN0(mol+)	Hallazgos moleculares positivos (RT-PCR), pero no se localizó metástasis a ganglio linfático regional alguno mediante histología o inmunohistoquímica
pN1mi	Micrometástasis (>0,2 mm o >200 células pero ninguna >2,0 mm)
pN1	Metástasis en 1 a 3 ganglios axilares y/o metástasis microscópicas en ganglios de la cadena mamaria interna detectadas por biopsia de ganglio centinela pero no clínicamente aparentes
pN1a	Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos axilares, al menos una metástasis >2,0 mm
pN1b	Metástasis en ganglios mamarios internos con micrometástasis o macrometástasis detectada mediante biopsia de ganglio linfático centinela pero sin detección clínica
pN1c	Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos axilares y ganglios linfáticos mamarios internos con micrometástasis o macrometástasis localizado mediante biopsia de ganglio linfático pero sin detección clínica
pN2	Metástasis in 4-9 ganglios linfáticos axilares o en ganglios de la cadena mamaria interna ipsilateral clínicamente aparentes en ausencia de metástasis ganglionares axilares
pN2a	Metástasis en 4-9 ganglios linfáticos axilares (al menos un depósito tumoral >2 mm)
pN2b	Metástasis en ganglios linfáticos mamarios internos detectados clínicamente en ausencia de metástasis a ganglio linfático axilar
pN3	Metástasis en ≥10 ganglios linfáticos axilares; o en ganglios infraclaviculares; o en ganglios de la cadena mamaria ipsilateral clínicamente aparentes en presencia de afectación de 1 o más ganglios axilares ipsilaterales; o en más de 3 ganglios axilares con afectación microscópica de ganglios de la cadena mamaria interna ipsilateral no clínicamente aparentes; o metástasis en ganglios supraclaviculares ipsilaterales
pN3a	Metástasis en ≥10 ganglios linfáticos axilares (por lo menos un depósito tumoral >2,0 mm) o metástasis a los ganglios infraclaviculares ipsilaterales
pN3b	Metástasis en >3 ganglios linfáticos axilares y ganglios mamarios internos detectados clínicamente en presencia de metástasis a ganglio linfático axilar de ≥1 ganglio linfático axilar positivo; o metástasis en >3 ganglios linfáticos axilares y ganglios linfáticos internos mamarios con micrometástasis o macrometástasis localizada mediante biopsia de ganglio linfático centinela pero sin detección clínica
pN3c	Metástasis en ganglios linfáticos ipsilaterales supraclaviculares

Metástasis a distancia (M)

M0	No hay prueba clínica o radiográfica de metástasis a distancia
cM0(i+)	No hay prueba clínica o radiográfica de metástasis a distancia, pero si detección de depósitos células tumorales moleculares o microscópicas en la sangre circulante, médula ósea u otros tejidos ganglionares no regionales que tienen ≤0.2 mm en pacientes sin signos o síntomas de metástasis
M1	Hay metástasis a distancia según lo determinan medios clínicos o radiográficos clásicos o se comprueba por medios histológicos que tiene >0.2 mm

Estadios

Estadio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0
IB	T0	N1mi	M0
	T1a	N1mi	M0
IIA	T0	N1b	M0
	T1a	N1b	M0
IIB	T2	N0	M0
	T2	N1	M0
IIIA	T3	N0	M0
	T0	N2	M0

	T1a	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

3.4 Factores pronósticos y predictivos en cáncer de mama

Un factor pronóstico es aquel capaz de proporcionar información prospectiva de la evolución del paciente, para así poder guiar las decisiones terapéuticas. Por otro lado, un factor predictivo es aquel que proporciona información sobre la probabilidad de respuesta a una modalidad terapéutica. A pesar de que ambos tipos de factores pueden clasificarse de forma independiente, en cáncer de mama determinados factores pueden ser a la vez pronósticos y predictivos (como por ejemplo la sobreexpresión del factor de crecimiento HER2).

A continuación se explicarán los diferentes tipos de factores pronósticos y predictivos de respuesta más importantes en cáncer de mama.

3.4.1 Factores epidemiológicos

Los factores pronóstico relacionados con las características de las pacientes son básicamente la edad y la raza.

Tanto una edad muy joven como una edad muy avanzada son factor de peor pronóstico en cáncer de mama (24); sin embargo existen diferencias en el impacto de la edad en función de los diferentes subtipos de cáncer de mama; como por ejemplo no habiendo diferencias en el caso de las pacientes con amplificación de HER2 tratadas con trastuzumab. Las pacientes menores de 35 años presentan peor pronóstico, con una supervivencia global a los 5 años del 74,7% vs el 83,8-88,3% en pacientes con edad comprendida entre los 35 y 69 años (25). Generalmente estas pacientes presentan al diagnóstico enfermedad más localmente avanzada, no presentan expresión de receptores hormonales y el grado tumoral es más elevado. Tras ajustar la mortalidad por estadio, características del tumor y tratamientos recibidos, sigue evidenciándose un exceso de mortalidad en este subgrupo de pacientes, sugiriendo una biología más agresiva de estos tumores.

Asimismo diversos estudios han demostrado que las pacientes con edad superior a los 65 años presentan un incremento en la mortalidad por cáncer de mama, que en parte se ha atribuido a estadios más avanzados al diagnóstico, mayor comorbilidades y discrepancia en los tratamientos adyuvantes recibidos (26, 27).

Diversos estudios han observado un peor pronóstico en pacientes diagnosticadas de cáncer de mama Afro-Americanas vs pacientes de raza blanca. No parece que este hecho esté únicamente relacionado

con el estadio más avanzado al diagnóstico de estas pacientes, ni al nivel socio-cultural; sino que también podía contribuir una diferente biología molecular.

3.4.2 Factores patológicos

Los factores patológicos pronósticos más importantes son:

El estadio patológico sigue considerándose uno de los factores pronósticos más importantes. En la clasificación se tiene en cuenta el tamaño tumoral, la afectación ganglionar y la diseminación a distancia; siendo las tasas de supervivencia de las pacientes a los 5 años del 95%, 70%, 52%, 48% y 18% para las pacientes con estadios I, IIA, IIB, IIIA, IIIB y IV respectivamente.

El tamaño tumoral es un factor pronóstico reconocido para el cáncer de mama. En una cohorte de 24.740 pacientes las tasas de supervivencia a los 5 años fueron del 91% para tumores menores a 2cm; de 80% entre 2 y 5cm y del 63% para tumores mayores de 5cm (28). Generalmente el tamaño tumoral se correlaciona con la afectación ganglionar, pero ambos factores son independientes.

La afectación ganglionar es un factor independiente de mal pronóstico; incluso en tumores de pequeño tamaño. La supervivencia a los 5 años en pacientes con afectación ganglionar vs aquellas sin afectación ganglionar fue del 85% vs 99% respectivamente. Asimismo, la supervivencia a los 5 años fue del 96, 86 y 66% en pacientes sin afectación ganglionar, con 1 a 3 ganglios afectados y con más de cuatro ganglios afectados respectivamente (28). La afectación ganglionar con macrometástasis está bien establecida como factor pronóstico, mientras que es menos claro el papel de la afectación con micrometástasis (<2mm) o el de células tumorales aisladas. Sin embargo diversos estudios sugieren que la afectación ganglionar pN1mic tiene un peor pronóstico que las pacientes sin afectación ganglionar; pero que las células tumorales aisladas no tienen un factor pronóstico (29, 30).

Determinados subtipos de cáncer de mama confieren un mejor pronóstico, como es el caso del tubular, papilar, mucinoso medular y adenoide quístico. El carcinoma lobulillar infiltrante presenta una biología y comportamiento diferente del carcinoma ductal infiltrante; asimismo presenta un pronóstico diferente que parece variar con el tiempo. Un estudio con un seguimiento a 13 años observó un 16% de reducción de riesgo de recaída durante los primeros seis años de seguimiento; sin embargo transcurridos 6 años el riesgo era 54% más elevado comparado con el carcinoma ductal infiltrante (31).

El grado histológico tiene un valor pronóstico, pero existen diferencias en la interpretación de los resultados, pues existe variabilidad interobservador.

La presencia de invasión linfovascular parece ser un factor de mal pronóstico, sobretodo en tumores de alto grado histológico. Los primeros estudios realizados observaban un mayor riesgo de recidiva y una peor supervivencia en pacientes con invasión vículo-linfática; pero cabe destacar que eran pacientes que no habían recibido quimioterapia adyuvante. Posteriormente se vio asociación entre la presencia de invasión angiolinfática con otros factores pronósticos (tamaño tumoral, grado histológico, afectación ganglionar, histología ductal, receptor de estrógeno negativo) (32).

3.4.3 Papel de los receptores de estrógeno, progesterona y HER2

Expresión de receptores hormonales: Los receptores hormonales de estrógeno (RE) y progesterona (RP) se han asociado a un mejor pronóstico, al menos a corto plazo.

Los datos de los estudios sugieren que la supervivencia global (SG), el tiempo a la progresión, y el tiempo a fallo de tratamiento están relacionados positivamente con los niveles de expresión de receptores de estrógeno y de progesterona (33). Sin embargo, mientras que la tasa de recurrencia anual en tumores con receptores hormonales positivos es menor durante los 5 primeros años tras el inicio del tratamiento, estudios sugieren que puede incrementarse con periodos de seguimiento más largo. En un estudio con alrededor de 4000 pacientes con RE positivos presentaron un menor riesgo de recurrencia durante los primeros cinco años tras el inicio del tratamiento, comparado con los pacientes sin expresión de RE (9,9 vs 11,5%). Sin embargo transcurridos 5 años los pacientes con expresión de RE presentaron un incremento del riesgo de recurrencia anual; de los 5 a los 10 años: 5,4 vs 3,3%; de los 10 a los 15 años: 2,9 vs 1,3%; de los 15 a los 20 años: 2,8 vs 1,2% (34). Asimismo la presencia de expresión de RE es un factor predictivo de respuesta a tratamiento con hormonoterapia independientemente de otros factores, como son el tamaño, la afectación ganglionar, etc.

El estado de los receptores hormonales también se ha relacionado con la localización de las metástasis. Los tumores con expresión de RE se han asociado con mayor probabilidad a presentar metástasis en hueso y tejidos blandos; por el contrario los tumores sin expresión de RE metastatizan con mayor frecuencia en sistema nervioso central e hígado (localizaciones asociadas a peor supervivencia) (35).

Asimismo los tumores con RE positivos suelen presentar histologías más diferenciadas, suelen asociarse con menos mutaciones, pérdidas o amplificaciones de genes de cáncer de mama, como es p53 (36), expresión de HER2 (37), o expresión de HER1 (EGFR), todos ellos se han asociado a peor pronóstico.

La expresión de RP es un factor pronóstico independiente. La baja expresión de RP se ha asociado con peor pronóstico. Los tumores con RE positivos y RP negativos se asocian a subtipos más agresivos de cáncer de mama (Luminal B) (38). El significado pronóstico de los RP parece incrementar a los 6 años de seguimiento de las pacientes.

La sobreexpresión de HER2 por inmunohistoquímica y/o la amplificación del gen HER2 son factor pronóstico y predictivo de respuesta al tratamiento con terapia biológica (anti HER2) y a quimioterapia (como por ejemplo a antraciclinas). Es un factor de mal pronóstico, sobretodo en los casos no tratados con quimioterapia y terapia anti HER2. La determinación de la expresión de HER2 es imprescindible para seleccionar un tratamiento dirigido en pacientes con cáncer de mama; puesto que en ausencia de tratamiento sistémico, la sobreexpresión de HER2 confiere un mal pronóstico tanto en pacientes con afectación ganglionar como sin ella (39, 40). Asimismo, parece ser pronóstico incluso en tumores de pequeño tamaño (≤ 1 cm).

3.4.4 Marcadores de proliferación

El porcentaje de proliferación celular en el cáncer de mama es un factor pronóstico. Hay diferentes métodos para determinar la proliferación, pero el más frecuentemente utilizado es la determinación de ki67 mediante inmunohistoquímica.

La relación entre ki67 y el pronóstico de cáncer de mama está bien establecido, a pesar de la heterogeneidad que existe en los diferentes ensayos en cuanto al método utilizado de determinación. Dos metanálisis han evaluado el valor de ki67 como factor pronóstico independiente en cáncer de mama precoz. Uno de estos estudios (41) evaluó a más de 12,000 pacientes reportando que el ki67 elevado se correlacionó con un riesgo mayor de recaída tanto en pacientes con afectación ganglionar (HR 1.59, 95% CI 1.35-1.87), como en las que no lo presentaban (HR 2.32, 95% CI 1.83-2.92); y peor supervivencia en pacientes con y sin afectación ganglionar (HR de muerte 2.33, 95% CI 1.83-2.95; HR 2.54, 95% CI 1.65-3.91 respectivamente).

A pesar de todos estos resultados el uso de ki67 como pronóstico en la práctica clínica es controvertido por la heterogeneidad en su determinación y sobretodo en el punto de corte utilizado; por lo que no se utiliza como factor pronóstico según las recomendaciones de las guías de “ The American Society of Clinical Oncology “ (ASCO). Otra recomendación actual es la de utilizar la combinación del resultado del ki67 con otros factores como son la expresión de RE, RP y de HER2. Otros factores de proliferación son los relacionados con el sistema de activación del plasminógeno. El activador del plasminógeno (uPA) es una serín-proteasa con un papel importante en la invasión y en la metástasis. A pesar de los resultados sobre el papel pronóstico de estos marcadores (42), existe una limitación por la metodología que precisa su determinación, puesto que los análisis realizados han sido mediante técnicas de ELISA y en tejido en fresco.

El rol de las mutaciones en p53 y su valor pronóstico en cáncer de mama ha sido evaluado en múltiples estudios. Las mutaciones somáticas en el gen supresor de tumor p53(TP53) se han encontrado en un 20-30% de los cánceres de mama (43). Las mutaciones en la línea germinal son más raras y se han asociado a síndromes hereditarios de cáncer de mama. El valor predictivo de las alteraciones somáticas de TP53 es incierto, pero los datos que disponemos sugieren tienen un peor pronóstico, comparado con las pacientes que no las presentan, independientemente del tamaño tumoral, estado ganglionar y expresión de receptores hormonales. En un estudio con alrededor de 1800 pacientes a les que se analizaron las alteraciones en TP53, se vio que el riesgo relativo de muerte por cáncer de mama a los 10 años era dos veces superior en las pacientes con mutaciones en TP53 (44). No todos los estudios han encontrado esta asociación, si bien cabe exponer que en alguno de ellos se determinaba como valor subrogado de TP53 a p53. La determinación por inmunohistoquímica de p53 presenta unas tasas de hasta un 33% de falsos positivos y de un 30% de falsos negativos, cuando se compara con la determinación de TP53 por secuenciación (45).

El dominio extracelular (DEC) de HER2, medido en suero, ha sido evaluado como factor pronóstico y predictivo de respuesta en cáncer de mama. Los resultados no son concluyentes, ni se ha podido

correlacionar con el estado del HER2 del tumor primario, por lo que no se puede considerar un factor pronóstico.

El valor pronóstico de las células tumorales circulantes y/o diseminadas ha sido evaluado en cáncer de mama precoz. Diversos estudios han evaluado el papel de las células tumorales diseminadas (cuantificadas por biopsia de médula ósea; presencia de micrometástasis en médula ósea) como valor de mal pronóstico en paciente con cáncer de mama, otorgando una peor supervivencia a estas pacientes (46-48). En alguno de estos estudios se ha observado que la presencia de micrometástasis en médula ósea se relacionaba con características del tumor de peor pronóstico como son el tamaño tumoral, el grado histológico y el estado ganglionar, sin demostrar que se tratase de un factor independiente de mal pronóstico. Del global de las pacientes a las que se detectó la presencia de micrometástasis en médula ósea, sólo entre un 30 y un 50% desarrolló metástasis a distancia en los siguientes 5-10 años. Actualmente no se recomienda la determinación de micrometástasis en médula ósea en la práctica clínica a pesar de que la presencia de las mismas parece predecir un peor pronóstico; así como no existe evidencia suficiente para modificar o decidir un tratamiento adyuvante. La presencia de células tumorales circulantes (CTCs) determinadas en sangre periférica se ha asociado a peor pronóstico en pacientes con cáncer de mama precoz en diversos estudios (49, 50). En uno de estos estudios se analizó a 2026 pacientes la detección de CTCs antes de recibir quimioterapia adyuvante y tras finalizar el tratamiento (n= 1492). Se detectaron CTCs en un 22% de los casos, y con un seguimiento de 35 meses se observó que la presencia de CTCs fue factor pronóstico independiente de supervivencia libre de progresión (HR 2.11, 95% CI 1.49-2.99) y supervivencia global (HR 2.18, 95% CI 1.32-3.59). Cabe destacar que en los estudios realizados las pacientes a las que se determinaba CTCs eran de alto riesgo y se les había indicado tratamiento con quimioterapia. Tampoco se recomienda su determinación en la práctica clínica.

3.4.5 Expresión génica y subtipos intrínsecos de cáncer de mama

La heterogeneidad celular y molecular del cáncer de mama y el gran número de genes implicados en el control del crecimiento, la muerte y la diferenciación celular, ponen de manifiesto la importancia del estudio de las múltiples alteraciones genéticas implicadas en el desarrollo y evolución del cáncer de mama. Con las nuevas tecnologías, los perfiles de expresión génica permiten el estudio simultáneo del funcionamiento (o expresión) de cientos de genes del cáncer de mama. De esta manera se han podido identificar diferentes subtipos de cáncer de mama, con diferente comportamiento y pronóstico (51-55). Las lista de los genes que diferencian estos subtipos incluyen básicamente agrupaciones o “clusters” de genes relacionados con la expresión de RE, de factor de crecimiento epidérmico (HER2) y genes de proliferación celular entre otros.

Los diferentes subtipos y características que los definen son:

Subtipos Luminales: Luminal A y Luminal B que se caracterizan por expresar genes relacionados con el epitelio luminal normal de las células del tejido mamario; es típica la presencia de expresión de

citoqueratinas 8 y 18. Es el subtipo más frecuente, y se caracterizan por la expresión de RE, RP y genes relacionados con la activación de RE. Los subtipos Luminal A y B presentan diferentes características moleculares y pronósticas entre sí:

El subtipo luminal A representa alrededor del 40% de todos los cánceres de mama y es el de mejor pronóstico; presenta una alta expresión de genes relacionados con el RE, baja expresión de genes relacionados con HER2, y baja expresión de genes de proliferación celular.

El subtipo Luminal B es el menos frecuente, representando un 20%. A pesar de presentar expresión de genes de RE, su expresión es baja; la expresión de genes de HER2 es variable, y presentan una alta expresión de genes relacionados con la proliferación celular. Los tumores Luminal B tienen un peor pronóstico que los Luminal A.

El subtipo HER2-enriched representa un 10-15% de todos los cánceres de mama y se caracteriza por la sobreexpresión de genes de HER2 y de proliferación celular y por presentar una baja expresión de “clusters” basales y luminales. Es por este motivo que suelen ser negativos para RE/ RP y positivos para HER2. Sin embargo el subtipo HER2-enriched no es sinónimo de tumores clínicamente definidos como HER2 (por sobreexpresión o amplificación de HER2) y viceversa. Hasta un 30% de los tumores HER2-enriched son clínicamente HER2 negativos.

El subtipo RE-Negativo representa a un subgrupo muy heterogéneo denominado clínicamente triple negativo (TN), por la falta de expresión de RE/RP y de HER2, a pesar de que no todos los tumores basal like son triple negativos y viceversa. El subtipo basal like es el más ampliamente estudiado y se caracteriza por alta expresión de genes de proliferación, citoqueratinas basales y pérdida de expresión de genes relacionados con el control del ciclo celular, características que le confieren un peor pronóstico. Representan el subgrupo más frecuente dentro de los tumores RE-negativos (entre un 50-75%) y un 10-15% de todo el global de cánceres de mama. Se han definido diferentes subtipos dentro de la enfermedad triple negativa; el número es variable en función del análisis genético realizado. Una de las clasificaciones más ampliamente utilizada los clasifica en 5 subtipos: 1) Triple negativo (TNBC) de tipo basal (BL-TNBC), caracterizado predominantemente por deficiencia en la reparación del ADN pero también expresión de la vía del factor de crecimiento; 2) TNBC de tipo mesenquimal (ML-TNBC), con características de transición epitelial a mesenquimal (EMT) y células madre de cáncer (CSC); 3) TNBC asociado al sistema inmune (I-TNBC); 4) TNBC luminal / apocrino (LA-TNBC), con sobreexpresión del receptor de andrógenos (AR); y 5) TNBC HER2-enriched (HER2e-TNBC) (56). Actualmente se encuentran en desarrollo moléculas específicas para cada uno de los subgrupos descritos, teniendo en cuenta las potenciales dianas terapéuticas en función de las alteraciones moleculares que presentan.

El perfil mutacional en el cáncer de mama difiere del subtipo molecular. En el caso del subtipo luminal A se ha visto que presenta unas tasas de mutaciones más bajas que el resto, aunque el espectro de las mismas es más heterogéneo. Las mutaciones más frecuentes en este subtipo son en PIK3CA (45%), seguidas de MAP3K1, GATA3, TP53, CDH1 y MAP2K4. Los tumores Luminal B presentan

con mayor frecuencia mutaciones en TP53 y PI3CA (ambas en un 29%). Los tumores HER2-enriched presentan también una alta tasa de mutaciones en TP53 (hasta un 72%) y en PIK3CA (39%). Los tumores Basal-like tiene una frecuencia de mutaciones en TP53 de hasta el 80%; habiéndose descrito una alta similitud con las mutaciones halladas en el carcinoma seroso de ovario.

En la práctica clínica habitual, por motivos técnicos y económicos, en la mayoría de instituciones no se dispone de las técnicas de secuenciación génica para poder clasificar a los tumores en función del subtipo. Se han realizado diversos estudios con el fin de poder clasificar con técnicas inmunohistoquímicas de la forma más precisa a los diferentes subtipos de cáncer de mama, para poder ser una herramienta en la práctica diaria. De esa forma se ha aceptado una definición subrogada para los subtipos intrínsecos de cáncer de mama, en función del análisis inmunohistoquímico, de acuerdo con el Consenso de St. Gallen 2015 (57) y por las recomendaciones de la Guía de Práctica clínica de la ESMO (58) (Tabla 2).

Tabla 2. Subtipos subrogados de cáncer de mama

Subtipo intrínseco	Definición subrogada clínico-patológica	Aclaraciones
Luminal A	<p>“Luminal A-like”</p> <p>RE positivo HER2 negativo Ki67 bajo* RP alto** (bajo riesgo por firma genética, si es posible)</p>	<p>* Para el valor de Ki-67 las puntuaciones deben ser interpretadas en función de los valores de cada laboratorio local (p.ej.: si el laboratorio dispone de una mediana de Ki-67 en la enfermedad de receptor positivo de 20%, valores de 30% o mayor podrían considerarse claramente alta; los de 10% o menos claramente baja)</p> <p>** El valor de corte sugerido es de 20%</p>
Luminal B	<p>“Luminal B-like (HER2 negativo)”</p> <p>RE positivo HER2 negativo Ki67 alto* ó RP bajo** (alto riesgo por firma genética, si es posible)</p> <p>“Luminal B-like (HER2 positivo)”</p> <p>RE positivo HER2 positivo Cualquier valor ki67 / RP</p>	
HER2	<p>“HER2 positivo (no luminal)”</p> <p>HER2 positivo RE y RP ausentes</p>	
Basal-like	<p>“Triple negativo”</p> <p>RE y RP ausentes HER2 negativo</p>	<p>Existe alrededor de un 80% de solapamiento entre el subtipo “triple negativo” y “basal like”, pero “triple negativo” también incluye algunos subtipos histológicos especiales como medular y el carcinoma adenóide quístico con bajo riesgo de recurrencia</p>

3.4.6 Firmas genómicas y sus plataformas

El importante desarrollo en los últimos años de las técnicas de la genómica (estudio del ADN) y la transcriptómica (estudio del ARN), así como de la habilidad de poder estudiar a la vez miles de genes

ha permitido definir perfiles genético con valor pronóstico en cáncer de mama. Algunos de ellos ya han sido validados para su uso en la práctica clínica habitual. A pesar de su valor y utilidad, no deben sustituir a los factores pronósticos clínico-patológicos clásicos, sino que deben utilizarse conjuntamente y de forma complementaria.

Las plataformas o firmas genéticas apoyados por las recomendaciones de ASCO para su uso en la práctica clínica son los siguientes:

Recurrence score (RS): Oncotype Dx 21-genes Recurrence Score es la plataforma pronóstica más validada, identificando pacientes que puedan obtener mayor o menos beneficio de recibir quimioterapia adyuvante. RS ha sido validado tanto como una herramienta predictiva como pronóstica.

Su indicación actual es para mujeres con cáncer de mama sin afectación ganglionar, RE positivo, HER2 negativo las cuales van a recibir hormonoterapia durante al menos 5 años. La evidencia de su uso en pacientes con afectación ganglionar es limitado, a la espera de los resultados del estudio (RxPONDER) para pacientes con pN1.

El RS se calcula mediante una fórmula matemática que incluye el análisis de 16 genes (junto con 5 genes denominados de referencia) con el fin de obtener una predicción de la recaída a distancia a los 10 años, a pesar de la terapia hormonal adyuvante. La suma de este cálculo se conoce como el RS; habiéndose definido puntos de corte de RS para clasificar a las pacientes en bajo, alto y riesgo intermedio (59-62).

EndoPredict (EP): este test genético utiliza el análisis de ARN, mediante PCR (Polimerasa chain reaction), de 11 genes (3 de ellos genes de referencia). La validación de EP se realizó en las muestras de pacientes de dos grandes estudio fase III (ABCSG-6 and ABCSG-8) (63) siendo un factor pronóstico independiente. PS parece poder identificar a pacientes con RE positivo y HER2 negativo con muy bajo riesgo de recaída tratadas sin quimioterapia (64).

Breast Cancer Index (BCI): surge de la combinación de dos perfiles, la ratio de expresión de *HOXB13-to-IL17BR* (H:I ratio) y de *Molecular Grade Index* (MGI). Utiliza análisis de microarrays; en pacientes con RE positivo tratadas con tamoxifeno (65). Comparado con los factores pronósticos clásicos (edad, tamaño tumoral, grado histológico, estado ganglionar), la ratio H:I fue significativamente un factor de mal pronóstico independiente (OR: 7.3, 95% CI 2.1-26). Estudios posteriores han validado BCI como factor predictivo de respuesta a la terapia endocrina, así como pronóstico(66).

PAM50 risk of recurrence score: es un test de 50 genes (por Prosigna®), que caracteriza al tumor según el subtipo intrínseco de cáncer de mama. Con los resultados del PAM50 se genera un riesgo de recurrencia (ROR), que clasifica a los tumores con RE positivos en bajo, medio y alto riesgo de recurrencia. El ROR demostró un valor pronóstico en pacientes sin afectación ganglionar (67), habiéndose confirmado su utilidad clínica en varios estudios (68, 69). Se realizó un análisis retrospectivo del estudio ATAC, comparando la habilidad de poder estratificar a las pacientes con RE positivo y ganglio negativo en subgrupos de riesgo según ROR y RS. ROR clasificó a más pacientes en el grupo de alto riesgo y menos en el de riesgo intermedio que RS.

Existen otras firmas genéticas, pero que no han sido validadas en la medida de RS, PAM50, EndoPredict, y BCI; por lo que su recomendación es más limitada. Algunas de las cuales son:

Amsterdam 70-gene profile: es una de las primeras firmas genéticas comercializadas (Mammaprint®). A diferencia de Oncotype DX®, puede dar información pronóstica en pacientes independientemente de los RE, y para aquellas con sobreexpresión de HER2. Se utiliza un modelo matemático que clasifica a las pacientes en dos subgrupos: alto o bajo riesgo. En un estudio de validación con un seguimiento de 10 años, la firma genética fue superior como factor predictivo de supervivencia específica por cáncer vs los factores clásicos, en pacientes con afectación ganglionar (de 1 a 3 ganglios), con un HR 7.17(95% CI 1.81-28,43; p=0.005)(70). En base a estos resultados se realizó el estudio fase III MINDACT, que incluye pacientes sin afectación ganglionar o con pN1, y las clasificaba en tres grupos: a) pacientes de bajo riesgo por firma genética y por factores clínico-patológicos, que recibirán hormonoterapia; b) pacientes de alto riesgo por ambas formas de evaluación, que recibirán quimioterapia y c) pacientes en las que existía una discordancia, las cuales se aleatorizaron a decidir el tratamiento en función de Mammaprint® o en función de las características clínico-patológicas clásicas. En este subgrupo de pacientes clasificadas de alto riesgo según factores clínicos, pero de bajo riesgo por firma genética y que no se trataron con quimioterapia las tasas de supervivencia libre de metástasis fueron 1,5% menores que aquellas tratadas con quimioterapia. La SG a 5 años para este subgrupo de pacientes fue del 94,7% (71).

Genome grade index (GGI): es una firma genética que incluye 97 genes que distinguen entre tumores con grado histológico I y III (72). Posteriores validaciones se han realizado en paciente tratadas o no con tamoxifeno con RE positivo, mostrando de que GGI era un factor pronóstico independiente de los factores clásico clínico-patológicos; asimismo se comparó con los resultados de RS en el mismo grupo de pacientes, con resultados similares (73).

3.5 Tratamiento

El tratamiento del cáncer de mama debe ser multidisciplinar. Dentro de las terapias del cáncer de mama se incluyen: cirugía, radioterapia, quimioterapia, hormonoterapia y tratamiento biológico.

La decisión del tratamiento óptimo y la secuencia del mismo se basará en las características clínico – patológicas y en la mayoría de centros la decisión se tomará tras valoración por un equipo de expertos (comité multidisciplinar). A continuación se describen las diferentes opciones terapéuticas en el cáncer de mama localizado:

3.5.1 Cirugía

El tratamiento local sigue siendo una parte muy importante del tratamiento del cáncer de mama. El abordaje quirúrgico debe incluir el tumor de la mama y la axila. Antiguamente la cirugía suponían un defecto estético y unas secuelas considerables en las pacientes con cáncer de mama; pues de forma generalizada se realizaba mastectomía radical y vaciamiento axilar ganglionar. Con el paso del tiempo

se ha observado que cirugías menos agresivas junto con radioterapia ofrecían los mismo resultados que la mastectomía en control loco-regional y supervivencia y con la ventaja de poder mantener la estética de la paciente. Dos estudios (NSABP B-06, Milan I)(74, 75) con un seguimiento de 20 años, avalan la opción de una cirugía conservadora frente a una mastectomía con resultados equivalentes en supervivencia.

La mastectomía es la opción terapéutica de elección para a aquellas pacientes en la que la cirugía conservadora esté contraindicada, o en situaciones en las que la paciente elija esta opción. Debe de ofrecerse siempre que sea posible la opción de una reconstrucción, ya sea inmediata o diferida. No se ha demostrado que la reconstrucción inmediata afecte negativamente en los resultados de supervivencia, ni retrase el inicio de los tratamientos sistémicos, además tiene la ventaja de que se evita una nueva cirugía mayor a la paciente, y reduce la morbilidad psicológica que produce la pérdida de una mama.

Respecto a la cirugía de la axila se ha demostrado que cirugías más conservadoras, sobretodo en aquellas pacientes sin ganglios clínicamente afectos ofrecía los mismo resultados, con menor morbilidad. En pacientes con una axila clínicamente negativa, la opción de la biopsia de ganglio centinela se considera la opción terapéutica. En el caso de que el ganglio centinela presente micrometástasis o bien sea negativo se acepta no realizar el vaciamiento axilar, pues está demostrado resultados equivalentes en supervivencia frente a realizar un vaciamiento axilar en estos casos (76). En pacientes con axila clínicamente negativa que van a recibir tratamiento con quimioterapia neoadyuvante, la opción de realizar la biopsia de ganglio cantinela tras la quimioterapia ha demostrado en un metaanálisis de 27 estudios y más de 2000 pacientes (77), tasas de falsos negativos de un 10%, similar a la realización de la biopsia del ganglio centinela previa al tratamiento sistémico. Ofreciendo la posibilidad de un *downstaging* y pudiendo evitar la realización de un vaciamiento axilar. En aquellos casos con afectación ganglionar y que van a recibir quimioterapia neoadyuvante, existen actualmente estudios en marcha con la finalidad de determinar cuál es la mejor estrategia del manejo de la axila en estas paciente.

En aquellos casos en los que al diagnóstico sean tumores cT3 o multicéntricos, el vaciamiento axilar ganglionar se sigue considerando un estándar.

Respecto a las pacientes con afectación axilar que van a ser tratadas con cirugía de inicio, se considera la el vaciamiento axilar como la mejor estrategia terapéutica. Los resultados del estudio prospectivo ACOSOG Z0011 (78) que comparaba el vaciamiento axilar vs la no realización del mismo en pacientes seleccionadas que presentaban no más de tres ganglios centinelas afectos, no demostró diferencias en las tasas de recaída local ni en supervivencia con un seguimiento a más de 9 años ($p=0.13$), siendo las tasas de recaída a nivel axilar a 10 años de 0.5% vs 1.5% en el brazo del vaciamiento vs biopsia del ganglio centinela respectivamente ($p=0,28$) (79). Actualmente sigue siendo debatido el manejo de la axila en pacientes tratadas con cirugía conservadora, que posteriormente recibirán radioterapia y que presentan una biopsia de ganglio centinela positivo. Si bien es cierto que no debería

de realizarse un vaciamiento axilar a todas estas las pacientes; es por esto que poder seleccionar correctamente a este subgrupo, valorar cuales son los factores de riesgo, así como la necesidad de irradiar las cadenas ganglionares son objetivos de estudios en marcha.

3.5.2 Radioterapia

Diversos estudios han demostrado que la radioterapia administrada de forma complementaria a la cirugía de la mama reduce el riesgo de recaída locoregional y aumenta la supervivencia de las pacientes (80-82). La finalidad de la radioterapia complementaria es reducir el porcentaje de recaídas locales, ganglionares y aumentar la supervivencia de las pacientes.

Cuando esté indicada la quimioterapia, es recomendable que la radioterapia se administre antes de los siete meses del primer tratamiento. En el caso en que no esté indicada la quimioterapia, no debería demorarse el inicio de la radioterapia más de dos meses desde la cirugía.

La radioterapia complementaria de la mama está indicada siempre que se realice un tratamiento conservador, siendo la dosis clásica de 50Gy (Gray) con un fraccionamiento de 2Gy. En casos seleccionados se ha observado unos resultados similares al tratar a las paciente con radioterapia hipofraccionada (83, 84) (fraccionamientos de 2,67Gy/ día por 5 días a la semana durante tres semanas, con un total de 40.05Gy en 15 fracciones).

La sobreimpresión del lecho quirúrgico de 16Gy está indicada en pacientes menores de 60 años, sin factores de riesgo sobreañadidos. La dosis aumenta a 20Gy cuando los márgenes están afectados.

La irradiación de las cadenas ganglionares niveles I y II está indicada cuando existe afectación extensa de la grasa axilar o no se ha realizado disección axilar o ésta es incompleta (<10 ganglios). La dosis estándar es 50Gy (fracciones de 2Gy). La indicación de radioterapia en cadenas ganglionares III y supraclavicular es cuando existe afectación de cuatro o más ganglios afectados; en pacientes con afectación de 1 a 3 ganglios con otros factores de riesgo; en casos en los que no se ha realizado un vaciamiento axilar ganglionar, con biopsia de ganglio centinela positivo y factores de riesgo (<50 años, grado III, receptores hormonales negativos). En el caso de afectación de cadena mamaria interna, ésta debe de irradiarse.

En pacientes seleccionadas tras una cirugía conservadora pueden utilizarse técnicas de irradiación parcial de la mama, como por ejemplo son la braquiterapia o la radioterapia intraoperatoria.

3.5.3 Tratamiento sistémico

El objetivo principal del tratamiento sistémico es reducir el riesgo de recaídas, tratando de eliminar le enfermedad oculta (micrometástasis) presente en el diagnóstico. El racional del tratamiento sistémico en el cáncer de mama, se basa en la hipótesis de que existe una diseminación de células por el cuerpo en el momento del diagnóstico. Los resultados de aplicar la terapia sistémica ha validado esta hipótesis, con la consiguiente reducción de la mortalidad de las pacientes con cáncer de mama a lo largo de los años (85).

Existen básicamente tres modalidades de tratamiento sistémico: 1) hormonoterapia con tamoxifeno, inhibidores de la aromatasas, en combinación o no con supresión ovárica; 2) quimioterapia; y 3) terapia biológica.

Existen diferentes opciones de tratamiento sistémico: neoadyuvancia, cuando éste se administra previo a un tratamiento radical, que generalmente es la cirugía; adyuvante, cuando se administra tras una cirugía y en tercer lugar el tratamiento sistémico para la enfermedad diseminada.

Dentro del tratamiento con hormonoterapia, tamoxifeno ha sido el estándar para el tratamiento hormonal adyuvante. Un metaanálisis realizado con un seguimiento >15 años y con más de 80.000 pacientes, demostró que tamoxifeno administrado durante 5 años reducía un 41% el riesgo anual de recaída (HR=0.59) y un 34% de reducción anual de mortalidad (HR=0.66) en pacientes con cáncer de mama y RE positivo: estos resultados fueron independientes de otros factores clínico-patológicos (86). Periodos menos prolongados de tratamiento con tamoxifeno han demostrado su utilidad, pero han sido inferiores al de 5 años.

Recientemente se han publicado los resultados de dos estudios fase III que evaluaban el papel de extender el tratamiento más allá de los 5 años. El estudio ATLAS con más de 12.000 pacientes aleatorizadas a recibir 5 años vs 10 años de tamoxifeno, demostró una disminución en la recurrencia ($p=0,002$) y en la mortalidad por cáncer de mama ($p=0,01$), pero con un incremento del cáncer de endometrio (87). En el estudio aTTOM también en pacientes tratadas con 10 años de tamoxifeno mostró una disminución en el riesgo de recurrencia del 15% vs las pacientes tratadas con 5 años (28% vs 32%; $p=0,003$), con una disminución de la mortalidad, pero no estadísticamente significativa (21% vs 24%; $p=0,06$), con un incremento de cáncer de endometrio ($p=0,0001$) y mortalidad por éste (1,1% vs 0,5%; $p=0,02$).

Múltiples estudios han evaluado el papel de los inhibidores de la aromatasas (IA) en el tratamiento adyuvante del cáncer de mama en pacientes con RE positivos. El objetivo de la mayoría era evaluar si añadir IA aportaba un mayor beneficio a tamoxifeno 5 años en pacientes postmenopáusicas con RE positivo. Su papel se ha evaluado en diferentes escenarios: como tratamiento primario en lugar de tamoxifeno (88, 89); en secuencia tras 2-3 años de tamoxifeno (90, 91) o como terapia extendida tras 5 años de tamoxifeno (92-94). Todos ellos han demostrado un modesto incremento de la supervivencia libre de progresión a favor del brazo con el IA. No se ha demostrado una diferencia a favor de un tipo u otro de IA (esteroideos vs no esteroideos). La duración del tratamiento con un IA o la mejor secuencia con tamoxifeno no está clara, por lo que las guías recomiendan añadir un IA a lo largo del tratamiento adyuvante a las pacientes postmenopáusicas.

El papel de los inhibidores de la aromatasas y de la ablación ovárica en pacientes premenopáusicas había permanecido en duda, hasta que recientemente han sido publicados los primeros resultados de dos estudios (SOFT y TEXT) (95, 96). En el estudio TEXT se comparó exemestano + triptorelina respecto a tamoxifeno + triptorelina en pacientes que podían o no haber recibido quimioterapia. El

Estudio SOFT comparó exemestano + ablación ovárica respecto a tamoxifeno + ablación ovárica y respecto a tamoxifeno en pacientes que habían recibido quimioterapia neo o adyuvante. El análisis de la combinación de ambos estudios con un seguimiento de 68 meses (comparando exemestano + ablación ovárica vs tamoxifeno), obtuvo unos resultados para la SLP a los 5 años que fue superior en el brazo de exemestano + ablación ovárica (91,1% vs 87,3%; HR 0,72; 95%CI, 0,6-0,97). No se encontraron diferencias en SG a los 5 años. Por el contrario a estos resultados en el análisis exclusivo del estudio SOFT, no se encontraron diferencias en la SLP a un seguimiento de 67 meses entre el subgrupo de tamoxifeno + ablación vs tamoxifeno (86,6% vs 84,7%; p= 0,1; respectivamente), pero si se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el subgrupo de pacientes < 35años.

Dentro del apartado de hormonoterapia cabe mencionar el papel de los inhibidores de kinasa dependientes de ciclinas (CDK). Los estudios publicados hasta la fecha con inhibidores de CDK en combinación con hormonoterapia en enfermedad metastásica han mostrado resultados a favor de la combinación vs la hormonoterapia en monoterapia (97, 98), doblando las tasas de supervivencia libre de enfermedad y beneficio en supervivencia global. Estos resultados han favorecido que actualmente se encuentren en desarrollo diversas moléculas inhibitoras de CDK no sólo en el escenario de la enfermedad diseminada, sino en adyuvancia y neoadyuvancia.

Asimismo la combinación con hormonoterapia con inhibidor de mTOR (everolimus) han mostrado beneficio en supervivencia libre de progresión vs la hormonoterapia en monoterapia (99). Diversos fármacos cuyo mecanismo de acción es la inhibición de vía de mTOR/AKT/PI3K están en desarrollo, en combinación con hormonoterapia, en el contexto de la enfermedad localizada.

Por otro lado tenemos el papel de la quimioterapia. La administración de varios ciclos de poliquimioterapia adyuvante en pacientes con cáncer de mama ha demostrado ser una estrategia eficaz para disminuir el riesgo de recurrencia y aumentar la supervivencia de las pacientes con cáncer de mama.

Los estudios iniciales incluían únicamente a pacientes de alto riesgo de recaída, con afectación ganglionar, pero posteriormente se observó, al incorporar a pacientes de relativo menor riesgo, sin afectación ganglionar, que también obtenían un beneficio en supervivencia al ser tratadas (100). Asimismo el beneficio obtenido fue independiente de la edad, los receptores de estrógeno y de si las pacientes habían o no recibido hormonoterapia adyuvante. El beneficio parecía ser mayor con múltiples ciclos de tratamiento (entre cuatro y ocho); así como con los regímenes que contenían taxanos y antraciclinas frente al esquema clásico de CMF (ciclofosfamida, metrotexate, fluorouracilo). Por tanto se recomienda la administración de múltiples ciclos de poliquimioterapia que contengan antraciclinas y taxanos en pacientes con afectación ganglionar y en pacientes de alto riesgo sin ganglios afectados (101).

El beneficio de los taxanos frente a esquemas que únicamente contenían antraciclinas ha sido demostrado en varios estudios. Con un beneficio en tiempo a la progresión y supervivencia para aquellas pacientes con afectación ganglionar (102). Se han realizado estudios comparando diferentes

taxanos (docetaxel vs paclitaxel) y diferentes esquemas (semanal, cada dos o cada tres semanas), con perfiles de toxicidad diferentes; pero siendo el esquema de taxol semanal la opción con mejores resultados y mejor tolerada (103).

Se han comparado esquemas concomitantes o secuenciales de antraciclinas y taxanos, sin mostrar un beneficio en ninguno de ellos, pero si una mayor toxicidad en los esquemas de concomitancia, por lo que el “gold standard” es quimioterapia con antraciclinas secuencial a taxanos.

Se han realizado estudios con el objetivo de valorar el beneficio de añadir gemcitabina y capecitabina a los esquemas de quimioterapia adyuvante, sin demostrar beneficio (104).

Los estudios realizados han demostrado el beneficio de la quimioterapia adyuvante independientemente del tamaño (105), la afectación ganglionar, del estado de receptores hormonales, de la edad y del estado de menopausia

El estado de los receptores hormonales es un factor predictivo de beneficio de quimioterapia adyuvante; siendo los tumores que más se benefician aquellos que no expresan receptores hormonales.

Otro factor predictivo del beneficio de añadir tratamiento con quimioterapia es el estado de expresión de HER2. Los estudios que demostraban un mayor beneficio a la quimioterapia en este subgrupo de pacientes se realizaron antes de la incorporación de trastuzumab adyuvante. En el apartado siguiente se darán más detalles al respecto.

Las firma genéticas mencionadas previamente ayudan a seleccionar a las pacientes que se van a beneficiar de recibir un tratamiento con quimioterapia concomitante a la hormonoterapia; por lo que son una herramienta útil en determinadas ocasiones.

Otras herramientas que nos pueden ayudar a seleccionar a pacientes para recibir quimioterapia es como por ejemplo *Adjumat!*. Se trata de una plataforma online, que nos da información relativa sobre el beneficio añadido de administrar quimioterapia al tratamiento hormonal analizando características clínico-patológicas. Una limitación de esta herramienta es que no tiene en cuenta los perfiles moleculares intrínsecos, ni el beneficio de trastuzumab en pacientes HER2+.

Finalmente debemos mencionar las terapias biológicas, puesto que en los últimos años han representado un avance muy importante en el tratamiento de las paciente con cáncer de mama. La sobreexpresión de HER2 en pacientes con cáncer de mama se había asociado históricamente a un peor pronóstico. En el año 2005 se publicaron los resultados de varios estudios (106, 107) (108) en los que al adición de trastuzumab a la quimioterapia estándar producía un aumento significativo en la supervivencia libre de progresión y en la supervivencia global de las pacientes, con una reducción del riesgo de hasta un 50%, independientemente del estadiage y del estado de receptores hormonales. Fue a partir de entonces cuando se incorporó trastuzumab como tratamiento estándar junto a la quimioterapia en pacientes con sobreexpresión de HER2.

La duración recomendada de tratamiento con trastuzumab se considera un año. Su eficacia se ha demostrado tanto en combinación con la quimioterapia, como de forma secuencial, aunque esta última parece menos eficaz. Los fármacos utilizados en los estudios publicados son antraciclinas y taxanos, siendo una opción válida en pacientes con una contraindicación a las antraciclinas el esquema con Carboplatino/docetaxel/ trastuzumab. A pesar de que en la mayoría de estudios las poblaciones analizadas eran de alto riesgo (afectación ganglionar y tamaño tumoral elevado), parece existir también un beneficio en tumores pequeños, como se evaluó en estudios retrospectivos (109) y en un estudio Fase II prospectivo (110), dada la agresividad de los mismos. Con estos resultados se considera recomendable administrar trastuzumab en tumores con tamaño a partir de 5mm.

Existen otras moléculas cuya diana es también HER2, como son los inhibidores de la tirosin quinasa; el ejemplo más conocido y ampliamente utilizado es lapatinib, cuyo uso actualmente se ciñe al contexto de la enfermedad metastásica. Y otros anticuepros monoclonales como son pertuzumab y TDM1 (conjugado de anticuerpo y fármaco: trastuzumab-emtansina), cuyo uso se ha incorporado recientemente en la enfermedad localizada y que mencionaremos con más detalle en el apartado de la introducción específica.

4 Introducción Específica

4.1 Tratamiento neoadyuvante en cáncer de mama

4.1.1 Generalidades

El tratamiento neoadyuvante hace referencia al tratamiento sistémico administrado previo a un tratamiento local, como es el caso de la cirugía. Dentro de las posibles estrategias de tratamiento neoadyuvante en cáncer de mama se encuentra la hormonoterapia y la quimioterapia (concomitante a una terapia antiHER2 en tumores HER2 positivos); esta última es la más extensamente utilizada.

Los principales objetivos clásicos del tratamiento neoadyuvante son: reducir el tamaño tumoral (*downstaging*), facilitando una cirugía posterior; mejorar los resultados estéticos; y en casos seleccionados reducir el riesgo de linfedema al evitar el vaciamiento axilar ganglionar (111, 112).

Un papel fundamental del tratamiento neoadyuvante es que permite evaluar la respuesta y eficacia del tratamiento administrado. La presencia o ausencia de enfermedad residual es un importante factor pronóstico de riesgo de recurrencia, sobretodo en tumores triple negativos y en tumores con sobreexpresión de HER2. Es por este motivo que actualmente la terapia neoadyuvante es la estrategia de elección en estos subtipos. La definición de respuesta completa patológica (RCp) más ampliamente aceptada requiere de la ausencia de enfermedad residual invasiva en la mama y en la axila (ypT0N0/ypTisN0).

Se había postulado que el hecho de administrar el tratamiento sistémico de forma más precoz en pacientes de alto riesgo de recaída, como es el caso de la quimioterapia neoadyuvante, podría mejorar

el pronóstico de las pacientes; pero en estudios aleatorizados y metaanálisis se observó equivalencias en la mortalidad de las pacientes tratadas con quimioterapia neoadyuvante o adyuvante (113, 114) sin aumentar la supervivencia libre de enfermedad ni la supervivencia global. En un metaanálisis (115) con más de 5500 pacientes incluidas en 14 estudios se observó una reducción de la necesidad de mastectomía (HR 0,71, 95% CI 0,67-0,75) pero una equivalencia en SG (HR 0,98; 95% CI 0,89-1,09) y SLP (HR 0,97; 95% CI 0,89-1,07). Sobre los resultados obtenidos de estos estudios cabe mencionar que no se realizó una selección de las pacientes en función del subtipo molecular del cáncer de mama y que algunas pacientes no recibieron terapia biológica. Es por este motivo, y tras los resultados de la posible implicación de la respuesta completa patológica en la supervivencia en determinados subtipos de cáncer de mama, que la estrategia neoadyuvante siga siendo de elección en algunos casos, como se expone en el apartado siguiente.

El tratamiento neoadyuvante ofrece la oportunidad de hacer un seguimiento radiológico, obtener muestras de sangre y de tejido tumoral durante el proceso previo a la cirugía, con el fin de poder identificar biomarcadores predictivos de respuesta y pronósticos.

Actualmente la selección de pacientes candidatas a quimioterapia neoadyuvante se ha ampliado, no sólo a aquellas cuyo objetivo es realizar una cirugía más conservadora, sino en función de subtipos moleculares específicos. En aquellas pacientes con enfermedad localmente avanzada con estadios IIB (cT3) a IIIC se considera la quimioterapia neoadyuvancia la primera opción terapéutica, independientemente del subtipo molecular. En los casos con estadios más precoces (I y II) la quimioterapia neoadyuvante es una opción cuando la cirugía conservadora no se puede realizar debido a una elevada ratio de tumor/ mama. Asimismo en caso de tumores con subtipo más agresivo, como es caso del triple negativo o el HER2, la quimioterapia neoadyuvante debe considerarse como primera maniobra terapéutica, puesto que son tumores que alcanzan tasas de respuesta completa patológica más altas (116) y parece existir una asociación entre la tasa de respuesta completa patológica en estos subgrupos con una mayor supervivencia. Asimismo en estos casos el hecho de administrar la quimioterapia de forma neoadyuvante nos facilita poder observar el comportamiento del tumor en relación a la sensibilidad a los tratamientos recibidos y disponer de un mayor conocimiento sobre su comportamiento y agresividad; pudiendo seleccionar a pacientes para determinados tratamientos adyuvantes posteriores.

Por el contrario el beneficio de la quimioterapia neoadyuvante en pacientes con estadios precoces con receptores hormonales positivos y sin sobreexpresión de HER2 es más dudoso.

4.1.2 Respuesta completa patológica

El objetivo inicial del tratamiento neoadyuvante era disminuir el volumen tumoral para facilitar una posterior cirugía más conservadora, que junto con la radioterapia aseguraban un buen control locorregional de la enfermedad. Los primeros estudios realizados con quimioterapia neoadyuvante en enfermedad localmente avanzada demostraron un aumento del control local y sugerían que podría

haber una aumento en la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global. Así como el hecho de que la desaparición de enfermedad macroscópica podría predecir una mayor supervivencia (117, 118).

En el estudio NSABP B18, no se pudo demostrar que administrar quimioterapia adyuvante fuera superior a administrarla de forma adyuvante. Uno de los objetivos secundarios de este estudio era evaluar la respuesta del tumor primario al tratamiento neoadyuvante y correlacionarla con la SLP y la SG. Se evaluó tanto el impacto de la respuesta clínica como de la respuesta completa patológica. Los resultados en función de la obtención de una respuesta clínica fueron superiores en el grupo que obtuvo respuesta completa clínica vs respuesta parcial vs aquellas pacientes sin respuesta, con una SLP a los 5 años del 75,9%, 63,5% y 60,3% respectivamente ($p=0,0014$). En el caso de obtención de una respuesta completa patológica (ypT0/is) la SLP a los 5 años fue mejor para el subgrupo que alcanzó una RCp vs aquellas que permanecieron con enfermedad residual invasiva (83,6% vs 71,7%, $p=0,0001$) sugiriendo que la RCp podría ser una marcador surrogado de beneficio a largo plazo.

Siguiendo en esta línea, en el estudio prospectivo NSABP B-27 (119) diseñado para demostrar que la obtención de la RCp (ypT0/is) podría ser un endpoint surrogado para SLP y SG, se demostró un aumento de la RCp al añadir docetaxel a la adriamicina/ciclofosfamida (13,7 vs 26% $p<0,001$). Las pacientes que obtenían RCp(ypT0/is) presentaron mejores resultados de supervivencia, independientemente del esquema utilizado. Sin embargo, en este estudio la RCp no se correlacionó con la supervivencia a largo plazo.

A pesar del fallo de los resultados del estudio B-27, se siguió investigando sobre el posible beneficio de la RCp tras quimioterapia neoadyuvante. Y en estudios posteriores con quimioterapia neoadyuvante se mantenía como objetivo la obtención de una RCp.

Asimismo diversos grupos internacionales trabajaron para buscar la mejor definición de la respuesta completa patológica. Se observó que incluir la enfermedad residual in situ dentro de la definición de la RCp no parecía repercutir de manera desfavorable en la SLP ni en la SG (120); es por este motivo que la definición más ampliamente aceptada de RCp sea la ausencia de enfermedad invasiva en la mama y en la axila (ypT0/is ypN0). Determinados grupos sólo aceptan la ausencia de enfermedad residual (ypT0ypN0) como definición de RCp, como por ejemplo es el caso del Grupo Alemán (GBG y AGO), basados en un estudio retrospectivo en que se observó un impacto negativo en la supervivencia por la presencia de enfermedad in situ residual.

Con el fin de entender mejor los diferentes endpoints de la neoadyuvancia y poder valorar la aprobación de fármacos por la FDA (Food and Drug Administration), se creó un grupo de trabajo (Collaborative Trials in Neoadjuvant Breast Cancer-CTNeoBC). Los primeros resultados se obtuvieron del análisis de más de 12.000 pacientes, incluidas en 12 estudios de quimioterapia neoadyuvancia que tenían como objetivo determinar la RCp. Los objetivos principales de CTNeoBC fueron: a) determinar la asociación en la RCp y la SLP y SG; b) correlacionar la definición de la RCp con los resultados a largo plazo; c) correlacionar los diferentes subtipos de cáncer de mama y su

relación con la RCp y los resultados de supervivencia; d) determinar si la RCp podría ser un sustituto de la SLP y la SG. Los resultados se publicaron en el año 2014 (121). La ausencia de tumor tanto en la mama como en los ganglios linfáticos (ypT0ypN0 o ypT0/is ypN0) se asoció más con una mejoría en el tiempo libre de evento (ypT0 ypN0 HR 0,44 IC 95% 0,39-0,51; ypT0/is ypN0 HR 0,48 IC 0,43-0,54) y con la supervivencia global (HR 0,36 IC 0,30-0,44; HR 0,36 IC 0,31-0,42) que la ausencia de enfermedad sólo en la mama. En el análisis del estudio utilizaron la definición de RCp como ypT0/is ypN0. Se observó que la asociación entre la RCp y los resultados de supervivencia fueron mayores en los pacientes con cáncer de mama triple negativo (SLP: HR 0,24 IC del 95% 0,18-0,33; SG: RH 0,16 IC 0,11-0,25) y en aquellos con tumores HER2 positivos/RH negativos que recibieron trastuzumab (SLP: HR 0,15 IC 0,09-0,27; OS: HR 0,08 IC 0,03-0,22). Con estos resultados se concluye que las pacientes que alcanzan una respuesta patológica completa definida como ypT0ypN0 o ypT0/is ypN0 tienen una mayor supervivencia; pero el valor pronóstico es mayor en subtipos tumorales agresivos. Sin embargo para el análisis del global de pacientes no se pudo validar la RCp como un endpoint sustituto de incremento de SLP o SG.

La presentación reciente de un metaanálisis de estudios de quimioterapia neoadyuvante que incluía a más de 18.000 pacientes, se observó que alcanzar una respuesta completa patológica reducía de forma estadísticamente significativa el riesgo de recurrencia y la mortalidad en determinados subtipos de cáncer de mama. La tasa de RCp para el global de las pacientes fue del 21,5%; para este subgrupo de pacientes la odds ratio de recurrencia fue de 0,33 (IC 0,29-0,39; $p < 0,001$) y de 0,8 para mortalidad (IC 0,21-0,36; $p < 0,001$). Las tasas de RCp en función de los subtipos moleculares fue la siguiente: 8,3% para HR+, 70,3% para HER2+ y 38,7% para triple negativo. En los tres subgrupos analizados se observó beneficio al obtener una RCp.

4.1.3 Neoadyuvancia y subtipo molecular de cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea; habiéndose descrito cuatro grandes subgrupos mediante perfiles moleculares. En la práctica habitual es mediante técnicas inmunohistoquímicas que se determinan estos subtipos (ver apartado perfiles moleculares). Los diferentes subtipos de cáncer de mama presentan diferente pronóstico y comportamiento, así como diferente respuesta a los tratamientos, como es en el caso de la quimioterapia neoadyuvante.

Las tasas de RCp obtenidas tras un tratamiento neoadyuvante difieren entre los diferentes subtipos; en el caso del subtipo luminal A se obtiene las tasas más bajas, entrono al 10%; en el caso de los subtipos más agresivos estas tasas aumentan hasta incluso un 65-80% para los tumores HER2+/RH- y hasta un 45-60% en caso de enfermedad triple negativa según diferentes estudios y esquemas de tratamiento. A continuación se resumen los diferentes tratamientos neoadyuvantes según los diferentes subtipos de cáncer de mama:

4.1.3.1 Neoadyuvancia en cáncer de mama Triple Negativo

Se han observado diferencias en la supervivencia de las pacientes con cáncer de mama triple negativo en función de si habían obtenido o no una respuesta completa patológica. Es por este motivo que el objetivo de la quimioterapia neoadyuvante en este subgrupo de pacientes es la obtención de una RCp. Los esquemas de quimioterapia basados en antraciclinas y taxanos siguen siendo el estándar en estas pacientes. En el de cáncer de mama triple negativo se obtienen una cifras elevadas de RCp, pero no debemos olvidar que la enfermedad triple negativa es una enfermedad heterogénea en la que se han descrito diferentes subtipos (122). Se ha observado que las tasas de respuesta entre estos subtipos es variable; en el caso del subtipo basal 1 se obtiene la mayor tasas de RCp, siendo el más quimiosensible; en el caso del subtipo receptor de andrógeno positivo las tasas alcanzan únicamente un 10%.

El papel de los platinos en neoadyuvancia ha sido evaluado en diversos estudio Fase II (123, 124) , sugiriendo que la incorporación de esquemas con platinos incrementan las tasas de RCp. Recientemente se han publicado los resultados de dos estudios fase II, el primero de ellos el GeparSixto (125), que incluía también pacientes con sobreexpresión de HER2, en el que el beneficio de añadir carboplatino sólo se obtuvo en las pacientes triple negativas, alcanzando unas tasas de RCp de 36,9% vs 53,2% en el brazo de carboplatino (odds ratio 1.33; p=0.107). Resultados del estudio GeparXisto para el subgrupo de pacientes portadoras de la mutación de BRCA1/2 mostraron un beneficio de añadir carboplatino, sin observarse beneficio en la supervivencia.

El segundo estudio es el CALGB 40603 (Alliance) (126) en el que se observó un aumento de las tasas de RCp en la mama tanto al añadir bevazizumab como carboplatino; pero sólo se obtuvo beneficio en la mama y en la axila al añadir carboplatino (54% vs 41%; p=0,0029).

En el estudio fase III GeparSepto se observó un incremento de un 9% en las tasas de RCp al sustituir nabpaclitaxel por paclitaxel (38% vs 29%; p=0.00065); el beneficio se obtuvo en todos los subgrupos, pero el las pacientes triple negativas este beneficio se dobló (127).

En un metaanálisis reciente que incluía estos estudios, se ha observado que existe un beneficio en obtención de RCp en las pacientes triple negativas tratadas con carboplatino, estadísticamente significativo a expensas de una mayor toxicidad hematológica (128).

Estudios fase II con inhibidores de PARP dieron resultados prometedores, motivo por el que se desarrollaron varios estudios fase III en combinación con quimioterapia. En el estudio BrighTNess se observó un beneficio en la obtención de RCp al añadir carboplatino al esquema neoadyuvante, pero no al añadir velaparib (129).

En general, se considera que las pacientes con subtipo triple negativo deberían de recibir quimioterapia neoadyuvante. El objetivo de este tratamiento sigue siendo incrementar las tasas de RCp, dado que cuando se alcanza, las pacientes tienen mejor pronóstico. Para aquellas pacientes que no han alcanzado una RCp existen estudios en marcha para valorar ofrecer tratamientos adyuvantes. En un análisis de subgrupos para las pacientes triple negativas, se ha objetivado un beneficio en

supervivencia en el estudio fase III (CREATE-X) al añadir 6-8 ciclos de capecitabina adyuvante a las pacientes que no alcanzaban RCp (130).

4.1.3.2 Neoadyuvancia en tumores HER2-positivos

El pronóstico de las pacientes HER2+ ha cambiado considerablemente desde la introducción de trastuzumab al tratamiento primario, sobretodo para aquellas pacientes que alcanzan una RCp (131). En el estudio NOAH (132) se observó un mayor beneficio en la supervivencia libre de evento para el subgrupo de pacientes que alcanzó una RCp (HR 0,29; 95% IC 0,11-0,78).

Añadir un doble bloqueo antiHER2 al taxano en el tratamiento con quimioterapia neoadyuvante, ha supuesto un incremento de hasta un 20% en las tasas de RCp. En el estudio NeoALTTO, el doble bloqueo antiHER2 se realizó con lapatinib (133). Los beneficios a largo plazo del estudio NeoALTTO y los resultados del estudio ALTTO (en adyuvancia) fallaron en demostrar un incremento en la supervivencia libre de progresión o la supervivencia global al añadir lapatinib. En el estudio fase III NSABP-41 al añadir lapatinib a trastuzumab la tasa de RCp fue superior pero no estadísticamente significativa (134).

En el estudio fase II Neosphere el fármaco utilizado en combinación con trastuzumab fue pertuzumab. Los resultados a un seguimiento de 5 años mostraron una SLP a los 5 años superponible entre los diferentes grupos de tratamiento; pero el mayor beneficio se obtuvo para aquellas pacientes que alcanzaban RCp, siendo del 85% para aquellas con RCp vs 76% para las que no (HR 0,54; 95%IC 0,29-1,00) (135).

En el estudio fase II Tryphanena las tasas de RCp obtenidas con la combinación de trastuzumab y pertuzumab fueron de hasta un 62% (136).

En todos los estudios realizados con quimioterapia neoadyuvante en pacientes con HER2+ se ha observado que las tasas de RCp fueron inferiores en aquellas pacientes que además sobreexpresaban RH. Es por este motivo que se están realizando estudios que combinan terapia antiHER2 con hormonoterapia.

A pesar del tratamiento con quimioterapia y fármacos antiHER2, un gran volumen de pacientes no obtienen RCp, de ahí el interés en conocer los posibles mecanismos de resistencia, para el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas. Se ha postulado como mecanismo de resistencia la presencia de mutaciones en PI3K (137). En todos los análisis realizados se ha observado una menor RCp para aquellas pacientes portadoras de mutaciones en PI3K, independientemente del tratamiento antiHER2 recibido, postulando la posibilidad de tratar a estas pacientes con fármacos diana de la vía de PI3K. Otra estrategia estudiada en el ensayo fase III KATHERINE ha sido realizar adyuvancia con TDM1 en aquellas pacientes que no han obtenido una RCp. Los resultados han mostrado una supervivencia libre de enfermedad invasiva significativamente mayor en el grupo T-DM1 vs el grupo de trastuzumab (HR 0.50, CI 95%, 0.39 a 0.64, P <0.001) (138).

4.1.3.3 Neoadyuvancia en tumores RH-positivo/HER2-negativo

En el subgrupo de pacientes con RH+/HER2- no parece tener una importante relevancia obtener una RCp, puesto que no se ha demostrado que existe relación con la supervivencia; este hecho se ha explicado en parte por los tratamientos posteriores adyuvantes que recibirán estas pacientes (hormonoterapia). Sin embargo el tratamiento con quimioterapia neoadyuvante sigue siendo la primera opción terapéutica para muchas de estas pacientes.

Dentro de los tumores Luminales sin sobreexpresión de HER2, la selección de las pacientes candidatas a quimioterapia neoadyuvante se basa en la agresividad de la enfermedad. Los subtipos más agresivos (luminal B), definidos como aquellos con un índice de proliferación elevado (ki67) y/o un grado histológico alto o aquellos con enfermedad localmente avanzada, tienden a tratarse con quimioterapia neoadyuvante, mientras que en los subtipos menos agresivos (luminal A) se opta por un tratamiento quirúrgico de inicio o bien también se puede plantear la posibilidad de iniciar tratamiento neoadyuvante, pero en este caso con hormonoterapia, dada la escasa respuesta / beneficio a la quimioterapia de estos tumores.

Este subgrupo de pacientes representa a la gran mayoría de todos los cánceres de mama, y a pesar de los tratamientos adyuvantes recibidos, las pacientes luminales que no responden al tratamiento tienen un mal pronóstico. El pronóstico de estas pacientes puede calcularse mediante una versión actualizada del CPS-EG score (139); en pacientes con un score superior o igual a 3 se ha estimado una supervivencia libre de progresión a los 3 años del 75%, independientemente del tratamiento adyuvante estándar. Actualmente están en curso ensayos con nuevos fármacos (como inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas) con el objetivo de incrementar la supervivencia de estas pacientes con mal pronóstico.

5 Epigenética y cáncer de mama

5.1 Introducción

El cáncer es una enfermedad heterogénea causada por múltiples mecanismos. La mayoría de investigaciones realizadas en cáncer han sido basadas en alteraciones genéticas. Sin embargo, las alteraciones epigenéticas se han presentado recientemente como factores clave para el desarrollo e incluso para el pronóstico del cáncer, gracias al mayor conocimiento de los mecanismos de expresión génica (140).

El término epigenética hace referencia a los cambios heredables en la expresión génica que se producen sin causar ningún cambio en la secuencia del ADN. La epigenética proporciona información sobre el efecto de la organización de la cromatina en la regulación transcripcional (141).

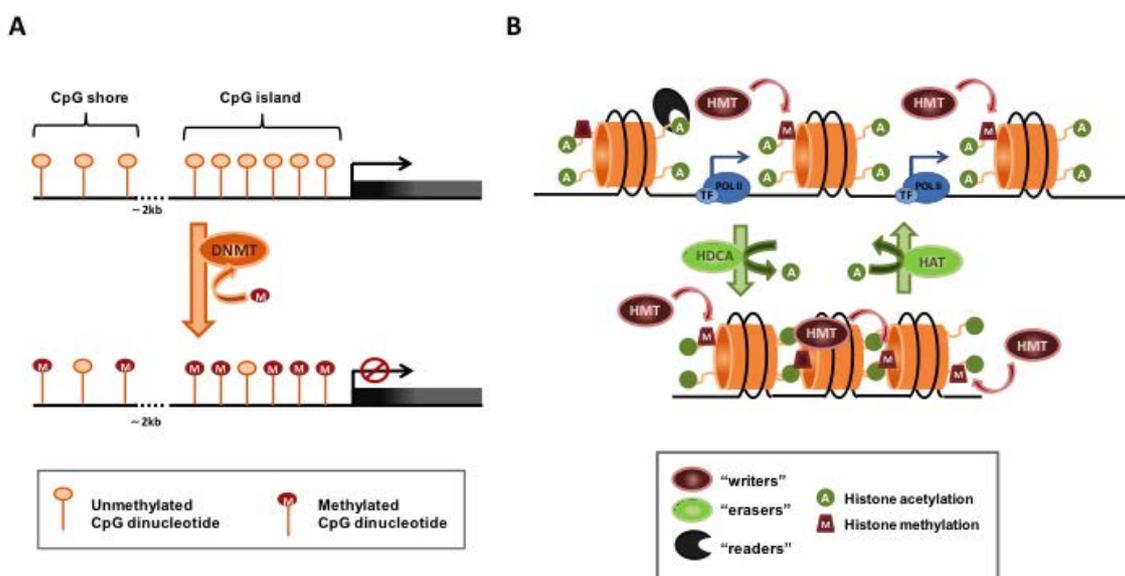
El nucleosoma es la subunidad estructural de los cromosomas y comprende 147 pares de bases de ADN envueltas alrededor de un octámero de núcleo de histona; y está compuesto de dos partes: una parte altamente estructurada denominada dominio central y las partes no estructuradas de las

terminales N y C que se extienden desde el núcleo del nucleosoma. Las colas terminales amino histonas están sujetas a muchas modificaciones post-transcripcionales.

Los mecanismos epigenéticos principales son la metilación del ADN, las modificaciones de las histonas (o cromatina) (Figura 1); y se ha considerado también por algunos autores como mecanismo epigenético el silenciamiento génico mediado por ARN. La metilación del ADN, el mecanismo más ampliamente estudiado, es una modificación covalente que tiene lugar en la posición 5' de los anillos de citosina en el dinucleótido CpG; se han descrito nuevos mecanismos como la metilación en adeninas y la hidroximetilación (142). Las modificaciones de las histonas son modificaciones covalentes post-traduccionales en las colas N-terminales en el centro de las histonas. Las moléculas de ARN no codificantes pequeñas pueden alterar los estados de expresión génica dirigiendo ARNm para la degradación o previniendo su traducción, motivo por el que para algunos autores se considera también un mecanismo epigenético (143).

El desarrollo del cáncer de mama es inducido por el acumulo de alteraciones en reguladores de genes, los cuales causan alteración en el crecimiento y la expansión de las células. Sumándose a las alteraciones genéticas, las alteraciones epigenéticas, de acuerdo a numerosos estudios, juegan un papel importante en la tumorigénesis del cáncer de mama (144, 145).

Figura 1. Mecanismos epigenéticos que regulan la expresión de genes: A) La metilación de las citosinas del ADN en las zonas del promotor causa el silenciamiento de la expresión génica; B) Las modificaciones de las histonas regulan el estado de condensación de la cromatina y, en consecuencia, la transcripción del ADN. (Cortesía: Pinyol R., Martínez-Cardus A., Esteller M., Llovet JM. Genomics and Epigenomics. Handbook of Translational Medicine. Ed Universitat de Barcelona 2016).



5.1.1 Factores ambientales y alteraciones epigenéticas en la incidencia de cáncer de mama

Los cánceres vinculados a modificaciones epigenéticas, como es el cáncer de mama, pueden estar influenciados por factores ambientales, dietéticos, fármacos, pesticidas y contaminantes inorgánicos. Centrándonos en la dieta, numerosos estudios sugieren que la metilación del ADN puede estar influenciada por la dieta. Un ejemplo es el caso de la metionina y el folato, pues se ha observado que dietas bajas en metionina y folato o altas en antagonistas del grupo metilo (como por ejemplo el etanol, que reduce la absorción de folatos) dan lugar a patrones aberrantes de metilación del ADN, incluyendo hipometilación global y metilación de sitios CpG normalmente no metilados. En este sentido, en un metaanálisis publicado se concluye que dietas altas en folatos podrían reducir el riesgo de cáncer de mama (146). Debido a que el etanol inhibe la absorción de folatos en el intestino e interfiere con la liberación hepática del mismo, se ha sugerido que el principal mecanismo carcinogénico de la ingesta de alcohol podría ser la interferencia con la regulación epigenética a través de la interrupción del metabolismo de los folatos (147). En cáncer de mama se ha observado un incremento del riesgo del mismo en relación a la elevada ingesta de alcohol.

Se ha reportado también una correlación positiva significativa para el bajo consumo de metionina con el estado de metilación de tumores ER α positivos; así como un alto consumo de etanol con ER α no metilado. Estos hallazgos sugieren que las dietas con deficiencia de metilo pueden dar lugar a la hipometilación de los genes ER α y, por tanto, dar lugar a tumores ER α positivos.

Los betacarotenos (BC) parecen tener una función proangiogénica. Al igual que el ácido araquidónico (AA) (ácido omega-6 presente en aceites vegetales) pueden promover la angiogénesis aumentando la expresión del activador tirosin quinasa de VEGFR-2 (KDR), al hipometilar la región promotora de éste. En estudios preclínicos se ha observado que la incubación de células endoteliales con determinadas concentraciones de BC y de AA produce una hipometilación global de ADN de las células y en especial del KDR, proteína importante en la quimiotaxis, la diferenciación y la angiogénesis (148).

Ciertas sustancias químicas y aditivos alimentarios ejercen una actividad estrogénica que secundariamente produce una estimulación del crecimiento celular (149). Un ejemplo es el bisfenol A (BHA), uno de los antioxidantes más ampliamente utilizado en la industria alimentaria. Se considera un estrógeno ambiental pues ejerce funciones similares a los estrógenos, de forma competitiva, pero además, mediante mecanismos epigenéticos. Estudios preclínicos han demostrado que BHA indujo una disminución en la expresión génica de ER α en un tiempo dependiente de exposición al mismo. Determinados metales pesados, como el aluminio y el cadmio; ambos son considerados “metalestrogénos”. El aluminio es considerado un carcinógeno por efectuar un mecanismo similar al de los estrógenos; se une a los RE y desencadena la expresión de genes al igual que la acción producida por los estrógenos. Algunos estudios postulan que las sales de aluminio utilizadas en

antitranspirantes podrían incrementar el riesgo de desarrollo de cáncer de mama. El cadmio se ha relacionado con un incremento del cáncer de mama por un mecanismo que parece estar en relación a la activación de la expresión de determinadas proteínas (*heat shock proteins*: Hsp 22 and Hsp 27) mediante mecanismos epigenéticos que implican la respuesta de RE a estas proteínas.

En el caso de otros metales, como el arsénico, níquel, selenio y cromo se ha observado que actúan sobre las mismas enzimas reguladoras que se ha demostrado previamente están implicadas en el desarrollo de cáncer de mama; pero a pesar de estos hallazgos no se ha demostrado que desempeñen un papel en estos tumores de forma directa.

Por el contrario existen sustancias presentes en la dieta que parecen presentar un efecto preventivo para el desarrollo del cáncer de mama (150). Se ha demostrado que las enzimas implicadas en la metilación del ADN y en las modificaciones de las histonas se alteran en varios tipos de cáncer, dando como resultado patrones anormales de metilación y/o acetilación. Muchos fármacos contra el cáncer actúan alterando la actividad y la expresión de estas enzimas. Curiosamente, algunos componentes de los alimentos naturales tienen acciones similares sobre estas enzimas y, por tanto, podrían producir efectos anticancerígenos. En el caso específico del cáncer de mama, se han observado estas acciones en el té (verde y negro), la genisteína (presente en la soja), la curcumina, isotiocianato de fenilo (berro), licopeno (tomate), resveratrol (uva roja), quercetina (alcaparras), indol-3-carbinol (brócoli), y compuestos organo-silíceos (ajo) entre otros.

5.2 Principales mecanismos epigenéticos

5.2.1 Metilación del ADN

La metilación del ADN es una modificación química covalente, que se produce con la adición de un grupo metilo (CH₃) de S-adenosinmetionina (SAM) en los residuos de citosina del ADN (140). Las ADN metiltransferasas (DNMT) son las enzimas principales en la metilación del ADN. Se encargan de introducir tanto grupos metilo *de novo* como en ADN semi-metilado. La familia de las proteínas DNMTs es muy amplia, habiéndose descrito múltiples proteínas en mamíferos (DNMT1, DNMT1b, DNMT1o, DNMT2, DNMT3A, etc), pero sólo tres de ellas tienen realmente una actividad catalítica metiltransferasa (DNMT1, DNMT3B, DNMT3L). Las DNMT se componen de dos partes: el dominio catalítico C-terminal, que es el responsable de la unión del cofactor y de la catálisis; y la parte reguladora N-terminal que es importante para la diferenciación del ADN metilado y hemimetilado (151).

La metilación del ADN es un mecanismo asociado con la integridad genómica y la expresión génica. Antiguamente se suponía cómo un mecanismo únicamente responsable de la supresión génica, que resultaba del silenciamiento transcripcional, sin embargo, estudios más recientes en este campo han podido aclarar que la metilación del ADN juega también un papel importante en la activación transcripcional (152).

Estas descritas unas regiones con un alto contenido en CpG, llamadas islas de CpG, que se encuentran localizadas en los promotores del 60% de los genes codificadores de proteínas en el genoma humano y, a grandes rasgos, asociadas con la regulación génica. Las islas CpG son definidas como regiones de más de 200 bases con un contenido de G + C de al menos 50% de CpG (141). No obstante, las islas CpG también se encuentran en otras zonas del gen, como en el cuerpo del gen región 3'UTR (Untranslated región), etc., con funciones potencialmente ligadas a la estabilidad génica en la transcripción. Además los sitios CpG no sólo se encuentran en las islas, sino que pueden estar agrupadas en otras regiones que flanquean las islas (shely, shore, etc.). La metilación en las islas CpG fue la primera evidencia de un cambio epigenético aberrante en los cánceres. Aunque la mayoría de las islas CpG en los promotores no están metiladas en células sanas, se hipermetilan en células cancerosas, reprimiendo la transcripción de genes supresores de tumores. Por otro lado, tal y como se ha comentado previamente, los sitios CpG pueden hipometilarse y secundariamente dar lugar a la activación transcripcional de genes reprimidos como oncogenes y retrotransposones (elemento móvil del ADN que se transpone utilizando un intermediario de ARN; los transposones pueden insertarse en un gen funcional, en exones, en intrones o en el ADN que flanquea los genes, pudiendo causar la inhibición, destrucción o alteración de la actividad de dichos genes) (151). Este fenómeno se da de forma global en cánceres y tiene lugar mayoritariamente en regiones génicas no-promotoras.

Existe otra familia de proteínas, llamada metil-CpG proteínas de unión (MBPs) cuya función es reconocer regiones de ADN metilado en islas CpG y se unen específicamente a estas regiones con su dominio de unión a metil-CpG. Las MBPs establecen una conexión entre la metilación del ADN y las enzimas de modificación de las histonas asociadas con la represión transcripcional; y juegan un papel importante también en la regulación genética mediada por metilación. La familia de MBPs comprende cinco miembros (MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 y MBD4). Estas proteínas están relacionadas con la hipermetilación de los promotores de genes supresores de tumores en las islas CpG y su silenciamiento (151, 153).

5.2.1.1 Metilación del ADN y cáncer de mama

La metilación aberrante del ADN juega un papel importante en el desarrollo del cáncer de mama. Se han reportado hipometilaciones del ADN como mecanismos implicados en cáncer de mama, pero lo más ampliamente estudiado y detectado ha sido la hipermetilación de ADN en promotores de genes supresores, dando lugar a su silenciamiento y la progresión carcinogénica.

Es por este motivo que recientemente numerosos estudios se han centrado en profundizar en el conocimiento de estos genes hipermetilados en cáncer de mama. El estudio de los mismo se basa sobretodo en genes que juegan un papel importante en la carcinogénesis (regulación del ciclo celular, apoptosis, invasión de tejidos, capacidad de metastatizar, angiogénesis y señalización hormonal en el caso de cáncer de mama hormonodependiente) (154). Parece existir una relación entre la

hipermetilación de estos genes y el estadio, así como con su pronóstico. Asimismo se postula la posibilidad de que pudieran ser también biomarcadores diagnósticos.

En un estudio realizado en muestras de tumores de mama, se encontró una hipermetilación de genes supresores tumorales como P16 y de genes de reparación del ADN (*GSTP1*, *CHD1* y *BRCA1*); relacionados con la capacidad de invasión y metástasis (145). Muchos otros genes han sido estudiados (*ADAM23*; *Wnt*; la familia de *SFRP*; *DSC3*, etc), en todos los casos observando una asociación entre su hipermetilación y la progresión tumoral.

Se ha estudiado asimismo el perfil de metilación entre diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama, hallando diferencias entre ellos (154). Encontraron que los tumores basal-like, luminal A y luminal B presentaban diferentes perfiles de metilación del ADN, mientras que el perfil era similar entre los subtipos HER2 enriched y normal-like. Los tumores luminal B presentaban con mayor frecuencia hipermetilación en genes como *RASSF1* y *GSTP1*; mientras que era mucho menor en los tumores basal-like. Incluso en tumores con mutaciones de *BRCA1* y *BRCA2* se observó que la carga de metilación difería entre ambos, siendo significativamente mayor en los tumores portadores de mutación de *BRCA2*.

En tumores hormonodependientes, se ha observado una correlación entre la hipermetilación del gen *RASSF1A* y la expresión de receptores (los tumores RE positivos tenían más frecuentemente metilado este gen, que los tumores RE negativos) (155).

En otro estudio realizado se observó que existía una mayor frecuencia en la metilación en el loci 40CpG en tumores RE+/RP+; y dentro de este subgrupo los pacientes que estaban metilados tenían un mejor pronóstico que los no metilados (156). La presencia de hipermetilación en otros genes (*RECK*, *SFRP2*, *ITR*, *UGT3A1*, *ACADL* and *UAP1L1*) ha sido también observada, asociándose a una peor supervivencia en este subgrupo de pacientes (157).

Diversos estudios han demostrado que la presencia de hipermetilación en el promotor de los genes supresores da lugar principalmente a una regulación negativa de la expresión de estos genes. La hipermetilación del ADN de las islas CpG promotoras implica el desarrollo, la progresión y la aparición de metástasis, al inhibir la expresión genes supresores de tumores.

Existen otras zonas potencialmente metilables, cercanas a las islas de CpG, pero que presentan una menor densidad de CpG (shores, shelves; en castellano definidas como orillas CpG) que también están implicadas en el desarrollo del cáncer de mama.

La presencia de hipometilación global del ADN es frecuente en tumores. Respecto al tejido sano mamario, se ha observado que el tejido tumoral presenta hasta en un 50% de los casos, un contenido reducido de 5-metilcitosina. (158). En líneas celulares de cáncer de mama se ha observado que la hipometilación se distribuye de forma global por el ADN, mientras que la hipermetilación suele centrarse en las regiones ricas en CpG, principalmente en el promotor. Además la hipometilación parece ser mucho más frecuente que la hipermetilación, habiéndose descrito ser hasta tres y cinco veces superior.

Un ejemplo de existencia de hipometilación en cáncer de mama es el encontrado en el gen de la P-Cadherina. Se ha observado que existe una metilación del gen *P-Cadherina* en todas las células epiteliales de mama, pero por el contrario hasta un 43% de los tumores de mama presentan hipometilación de la misma (159).

Por otro lado, en un estudio realizado en casos de cáncer de mama familiar, se realizó una secuenciación del todo el ADN y de su metilación, con el objetivo de encontrar perfiles de metilación diferentes en función del estado mutacional (*BRCA1*, *BRCA2* y pacientes sin mutación de *BRCA1/2*). A pesar de no encontrar una correlación entre el genoma en su totalidad, sí que se observó que para aproximadamente la expresión de unos 800 genes existía una correlación inversa con la metilación (160).

Globalmente, la metilación del ADN se postula como una posible herramienta para poder mejorar la clasificación actual molecular del cáncer de mama, que a su vez supondría también una mejora en las opciones de tratamiento en el futuro y el diagnóstico y/o pronóstico del cáncer de mama.

5.2.2 Modificación de las histonas

Las modificaciones de las histonas es otro de los mecanismos principales epigenéticos que se basan en de las modificaciones postraduccionales que se producen en las colas N-terminales de las histonas (reguladoras de la estructura de la cromatina y la expresión génica). Dichas modificaciones pueden producirse por diversos mecanismos (acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, etc), y cada una constituye una marca particular que afecta a la estructura de la cromatina (143).

La cromatina puede encontrarse en dos estados de condensación: 1) heterocromatina, o cromatina cerrada, en la que los genes están transcripcionalmente silentes; 2) eucromatina, o cromatina abierta, en las que los genes están activos transcripcionalmente.

El mecanismo de modificación de histona más ampliamente estudiado es la acetilación; la cual cataliza la transferencia del grupo acetilo de acetil-CoA al grupo amino de lisina de la histona. Lo que producen estas modificaciones es una alteración en la carga electrostática de las histonas, neutralizando las cargas positivas induciendo a que la cromatina adopte una estructura de eucromatina. La acetilación de las histonas se produce por la acción de las enzimas acetil transferasas de histonas (HATs); los grupos acetilos se eliminan por las enzimas desacetilasas de histona (HDAC) lo que conduce la inactivación y el silenciamiento de los genes. Además de modificar las proteínas de histonas, los HATs catalizan la acetilación de proteínas no histona, como por ejemplo GATA1, E2F1, PRB y TP53, todas ellas con papel importante en el cáncer de mama.

5.2.2.1 Modificaciones de histonas y cáncer de mama

Las investigaciones sobre modificaciones de histonas en cáncer de mama son más recientes y menos conocidas que la metilación del ADN. Las modificaciones de histonas postranscripcionales tienen un papel importante en la tumorigénesis del cáncer de mama, habiéndose descrito relación con la

agresividad e incluso el pronóstico. Asimismo podrían ser un potencial objetivo terapéutico. El conocimiento acerca de los patrones de modificación de las histonas en el cáncer de mama es limitado, a pesar de que existen un aumento del número de investigaciones al respecto.

En un estudio realizado en 880 casos de tumores primarios de cáncer de mama, se investigó la frecuencia de modificaciones globales de histonas mediante tecnología de microarrays e inmunohistoquímica; se evaluaron los niveles relativos de acetilación de lisina, metilación de lisina y metilación de arginina. Según los resultados de dicho estudio, parecía haber unos niveles de marcas de histona inversamente proporcionales al grado tumoral; así como para determinadas marcas de histona (H4R3me2, H3K9ac y H4K16ac) en tumores de mayor tamaño. Por el contrario los niveles de marcas de histonas (H4R3me2 y H3K9ac) eran más elevados cuando la afectación ganglionar era menor. Asimismo los niveles de modificación de las histonas fueron mayores en los receptores hormonales (RE, RP y RA), llegando a la conclusión de que la reducción de los niveles de detección de estas marcas en las histonas podría estar relacionada con características de peor pronóstico en cáncer de mama (161).

Algunos estudios realizados en tejido mamario han observado variaciones en las modificaciones de histona entre el tejido mamario normal, el carcinoma in situ y el carcinoma invasivo. Se observó que había una disminución de la acetilación de determinadas histonas (ac-H4, ac-H4K12, ac-tubulina, HDAC1, HDAC2 y HDAC6) en el carcinoma in situ y el carcinoma invasivo en comparación con el epitelio mamario normal. En el caso de los niveles de ac-H4 y ac-H4K12 disminuyeron de forma muy significativa en el carcinoma ductal in situ en comparación con el epitelio normal (162).

La profundización en la investigación de las modificaciones de las histonas en cáncer de mama está incrementando, debido no sólo a que pueden ser factores pronóstico, sino como una potencial diana terapéutica, motivo por el que se están en desarrollo fármacos inhibidores de la HDAC. Los inhibidores de HDAC (HDACi) tienen potencial como agentes terapéuticos contra el cáncer, pudiéndose clasificar en 4 subgrupos en función del mecanismo de acción específico.

Uno de los HDACi estudiados en cáncer de mama es el vorinostato (inhibidor de HDAC I y II) (163). En diversos estudios se ha observado que suprime el crecimiento de las líneas celulares de cáncer de mama RE- α positivo y negativo al estimular la detención del ciclo celular G1, G2 / M (Fase de Mitosis) y la apoptosis. Asimismo se ha visto que su actividad es mayor en las células tumorales que en las células sanas normales. Uno de los posibles efectos de vorinostato es la modulación de RE, por lo que se postula que podría revertirse la resistencia hormonal en cáncer de mama.

Otros estudios pivotaes preclínicos con HDACi (vorinostato, panobinostato, y entinostato) han mostrado que ejercen un efecto antiproliferativo en las células de cáncer de mama triple negativo, y que a su vez controlan el crecimiento tumoral mediante múltiples mecanismos de acción (apoptosis y la regulación de la transición epitelial a mesenimal) (164).

La actividad de los HDACi como agente único es más limitada, habiéndose descrito una sinergia cuando se combinan otros agentes anticancerosos (165-167), motivo por lo que están en desarrollo estudios en combinación con otros fármacos (hormonoterapia, quimioterapia, terapias diana e inmunoterapia) tanto en cáncer de mama como en otros tumores.

5.2.3 Silenciamiento mediado por RNA no codificantes

Los miRNA (microRNA) son moléculas pequeñas de ARN no codificante que regulan epigenéticamente la expresión génica al unirse a la región 3'(UTR) de ARNm; inhibiendo la traducción. Se ha observado una alteración en el patrón de expresión de los miRNA en células tumorales en comparación con células normales. A pesar que actualmente se han identificado más de 2500 miRNAs en los seres humanos, la funcionalidad de la mayoría de ellos aún no se ha descubierto. Un miRNA puede interactuar con múltiples (> 100) genes diana y un gen puede ser controlado por múltiples miRNAs, motivo por el que aún dificulta más su conocimiento.

Se han estudiado firmas de expresión génica de miRNA en cáncer de mama, observando un descenso en determinados miRNA (como por ejemplo miARN-10b, miRNA-125b y miRNA-145) y un incremento en otros (miARN-21 y miARN-155) en comparación con tejido sano, sugiriendo que éstos actúan como supresores tumorales o como oncogenes respectivamente (168).

Diversos estudios han demostrado el importante papel de los miRNA en el desarrollo del cáncer, al incluirse alteraciones de este tipo en múltiples vías esenciales en el cáncer de mama (YES, ETS1, TEL, AKT3, FGFR2; MAPK, PTEN, etc). Es debido a esta posible función reguladora que actualmente estén en desarrollo estudios basados en el mayor conocimiento de estos miRNA, con objetivo de valorar potenciales dianas terapéuticas. Un ejemplo es el de los inhibidores de miRNA basados en oligonucleótidos anti-miRNA, que actualmente se encuentran en desarrollo.

5.3 Epigenética y subtipos de cáncer de mama

Con el objetivo de poder mejorar la clasificación molecular actual del cáncer de mama, se han realizado múltiples estudios cuyo objetivo era observar patrones de alteraciones epigenéticas que pudieran distinguir entre los diferentes subtipos de cáncer de mama. El mecanismo epigenético analizado en la mayoría de ellos fue la metilación del ADN.

Varios estudios utilizaron un panel de 807 genes relacionados con cáncer para intentar clasificar por subtipos a los pacientes con cáncer de mama mediante el análisis de su metilación del ADN. Tres estudios apoyan que hay una diferencia en el perfil epigenético de cáncer de mama en comparación con su respectivo patrón de expresión génica (que es el que actualmente define el subtipo molecular) (154, 169). Asimismo también se identificaron perfiles de metilación específicos de subtipos para los cánceres de mama de tipo basal, luminal A y HER2.

Un estudio reciente clasificó en dos subtipos epigenéticos el cáncer de mama en función de su perfil de metilación del ADN (Epi-LumB y Epi-Basal), en base a los resultados en los que el cáncer de

mama luminal B mostró presencia de metilación del promotor de la isla CpG, mientras que los tumores de tipo basal mostraban eventos de hipometilación en cuerpos génicos. En ambos casos dichos perfiles se asociaron con parámetros clínicos desfavorables y con una peor supervivencia.

A pesar de los múltiples estudios y resultados obtenidos, existe todavía un gran desconocimiento sobre la epigenética y el cáncer de mama; sin que podamos por el momento utilizar estas alteraciones para poder clasificar a los distintos subtipos de cáncer de mama. Sin embargo cada vez se están describiendo más diferencias epigenéticas entre los distintos subgrupos que pueden ayudar en un futuro al desarrollo de dianas terapéuticas específicas.

5.3.1 Tumores luminales

Debido a que los cánceres de mama dependientes de hormonas representan la mayoría de los casos, el mayor conocimiento de la resistencia intrínseca o adquirida a las terapias endocrinas sigue siendo un reto importante. Investigaciones considerables se siguen centrando en una mayor comprensión de los mecanismos de resistencia a la hormonoterapia, en la identificación de biomarcadores y en la definición de dianas moleculares alternativas para terapias que eviten vías de resistencia. Recientes teorías sobre los mecanismos de resistencia postulan como posible causa las modificaciones epigenéticas, que podrían caracterizar la carcinogénesis del cáncer de mama y sus modificaciones durante su evolución. Un ejemplo es el estudio de las alteraciones epigenéticas en los tumores luminales (170).

Muchos tumores HER2+ y todos los tumores triples negativos se caracterizan por la falta de expresión de receptores de estrógeno. Se han postulado como posibles mecanismos de regulación de la expresión de RE la metilación del ADN y acetilación de histonas del gen promotor de RE. En líneas celulares de cáncer de mama sin expresión de RE tratadas con DNMT y / o HDAC se observó que presentaban una re-expresión de RE y que eran sensibles a la hormonoterapia (171).

Se postula que las terapias con DNMT y / o HDAC podrían reactivar la expresión de RE, y de esa manera sensibilizar a terapias endocrinas. Además se ha observado un sinergismo al combinar ambas terapias en modelos preclínicos y clínicos (172).

Los niveles de RE en contexto del cáncer de mama también se encuentran regulados postranscripcionalmente, mediante miRNA. Se han descrito múltiples miRNA (miARN-22, miARN-206 y miRNA-221/222, etc) (168, 173), relacionados con la regulación de la expresión de RE, que podrían ser un objetivo terapéutico.

Los tumores con RE+ y RP- tienen peor pronóstico que aquellos con RE/RP+. A pesar de que ambos (RE y RP) juegan un papel importante en la regulación de la acción de los estrógenos, la progesterona y su receptor tienen un papel diferente en cáncer de mama. Los receptores de progesterona no sólo se regulan mediante los estrógenos, sino que existen otras vías de regulación (PI3K/AKT/mTOR, PTEN, etc). Algunos estudios han observado la asociación entre la pérdida de expresión de RP y la presencia de metilación en el promotor. En tumores con RE/RP- la inactivación

de HDAC produce una reactivación de ambos (RE y RP). La presencia de metilación en el promotor de RP es mayor en tumores con RP negativo que en aquellos con RP positivo (174); además se ha observado metilación del promotor de RP en tumores hormonoresistentes. En un estudio se observó que esta metilación se asociaba a una mayor expresión de HER2; esta relación sugiere el papel de la metilación en el desarrollo del subgrupo de tumores luminal B caracterizada por la positividad de RE, con baja o nula expresión de PR y sobreexpresión de HER2.

5.3.2 Tumores triple negativos

El cáncer de mama triple negativo se sigue considerando como uno de los subtipos más agresivos. Actualmente, a parte de la cirugía y de la radioterapia, sólo se dispone de quimioterapia para el tratamiento de los mismos. Es por este motivo que se esté realizando un esfuerzo en busca de nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas, con la finalidad de mejorar el pronóstico de las pacientes. Asimismo el hecho de que la enfermedad triple negativa sea tan heterogénea dificulta aún más poder seleccionar las mejores dianas para cada subtipo específico.

Un acercamiento para el desarrollo de posibles nuevos biomarcadores en cáncer de mama triple negativo es el estudio de las alteraciones epigenéticas de estos tumores.

Recientemente se han publicado los datos de un estudio en el que se realizaba un análisis de la metilación del ADN del todo el genoma, utilizando datos del “*The Cancer Genome Atlas*” (TCGA). Se identificaron tres subgrupos con pronóstico diferente (malo, intermedio y bueno), y utilizaron esta clasificación como firma epigenética. Los pacientes que presentaban niveles bajos de metilación de ADN tumoral tenían mejor pronóstico, seguido de los que presentaban niveles altos de metilación y por último, los pacientes cuyos tumores tenían unos niveles intermedios, cuyo pronóstico fue peor (175). Asimismo encontraron una firma epigenética que diferenciaba a los tumores triple negativo del resto.

Uno de los genes más ampliamente estudiados en los pacientes triple negativos, ha sido *BRCA*. En el caso específico de *BRCA1*, un estudio publicado identificó la presencia de metilación en el promotor del gen; observando una mayor respuesta a los fármacos inhibidores de PARP en líneas celulares (176). Asimismo otro estudio observó que la presencia de metilación en genes implicados en la reparación del ADN mediante la recombinación homóloga (*BRCA1* y *RNF8*) fue significativamente mayor en los tumores triple negativos que en los luminales (177). Al mismo tiempo, la metilación de *BRCA1* fue mayor en pacientes con respuesta patológica completa que en pacientes que no respondieron a la quimioterapia neoadyuvante.

Varios estudios han descrito que la presencia de metilación en *BRCA1* podría ser un factor pronóstico y predictivo de respuesta al tratamiento en pacientes triple negativas. En uno de estos estudios la supervivencia global de las pacientes con presencia de mutación de *BRCA1* fue inferior a las que no presentaban la mutación (36% vs 77%) (178). Contrariamente a estos resultados, en otro estudio se observó que la presencia de metilación en *BRCA1* en pacientes tratadas con quimioterapia adyuvante

basada en antraciclinas se asociaba a un incremento en la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global a los 10 años (SLP 78% vs 55%; SG 89% vs 69%) (179). Otro trabajo realizado mostró que la metilación de *BRCA1* sólo se asociaba con la supervivencia libre de enfermedad en los tumores triple negativos y no en el resto de subtipos de cáncer de mama ($p=0,0009$ vs $p=0,322$) (180).

También se han estudiado las alteraciones epigenéticas mediadas por miRNAs. Son múltiples los estudios que han revelado varios miRNA que se dirigen específicamente a los tres receptores ausentes en el cáncer de mama triple negativo (RE, RP y HER2); así como para el gen de susceptibilidad al cáncer de mama (*BRCA1*), más frecuentemente asociado a enfermedad triple negativa. Un estudio reciente identificó una firma de cuatro miRNAs (miR-374b-5p, miR-218-5p, miR-126-3p, miR-27b-3p) que parecía estar asociada a un mejor pronóstico en cáncer de mama triple negativo (181). A pesar de los múltiples estudios realizados existe una inconsistencia sobre los efectos de estos miRNAs sobre diversos aspectos de la biología del cáncer de mama triple negativo y del cáncer en general. Por lo que sigue habiendo una necesidad importante de profundizar en el conocimiento de las alteraciones epigenéticas y el cáncer.

En conclusión, por lo que respecta a los tumores triples negativos, la mayoría de biomarcadores epigenéticos que se han identificado son mediante el estudio microRNA y de la metilación. Todavía hay una falta de concordancia entre estos estudios que limita la comprensión del papel que juegan estas alteraciones en la regulación, el desarrollo y la progresión de estos tumores.

5.3.3 Tumores HER2

El estudio de las alteraciones epigenéticas específicas para el subgrupo de cáncer de mama con sobreexpresión de HER2 ha sido mucho menor que para los tumores luminales o triple negativos.

En un estudio realizado en el que se generaron perfiles de metilación del ADN de 143 tumores de mama, se encontraron diferencias significativas en la expresión de HER-2-positivos y la metilación del ADN de cinco genes (182). Para tres de estos cinco genes (*HSD17B4*; *CDH13* que codifica para el receptor de progesterona, y H-cadherina) se confirmó una mayor prevalencia de metilación del ADN en cánceres HER-2-positivos vs el resto de tumores que no expresaban HER2. Asimismo se observó que la metilación del ADN no sólo estaba presente en las células tumorales sino también en la fracción de estroma tumoral; sugiriendo que estas alteraciones en el estroma podrían contribuir a las características biológicas del cáncer de mama con sobreexpresión de HER2.

Asimismo se observó una diferencia en la metilación de genes implicados en el cáncer de mama (*RASSF1*, *GSTP1* y *APC*) en función del subtipo molecular. La metilación de los mismo fue significativamente menor en los tumores con RE y HER2 negativos que aquellos con RE y HER2 positivos.

En general se ha observado una heterogeneidad en los resultados en la metilación del ADN del cáncer de mama HER2 positivo, sugiriendo que la amplificación de HER2 no tiene una fuerte influencia por los patrones de metilación del ADN.

Tipificación de biomarcadores epigenéticos en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado como factores pronósticos de la evolución de la enfermedad y predictivos de respuesta al tratamiento con quimioterapia neoadyuvante

6 Objetivos

6.1 Hipótesis de trabajo

Las hipótesis de trabajo utilizadas para el desarrollo de los objetivos fueron:

1. Las alteraciones epigenéticas son imprescindibles, junto con las alteraciones genéticas para el desarrollo del cáncer de mama.
2. Existen diferentes subtipos de cáncer de mama, los cuales presentan diferentes alteraciones genéticas y epigenéticas.
3. Determinadas alteraciones epigenéticas son factores pronósticos y predictivos de respuesta al tratamiento con quimioterapia.
4. Las alteraciones epigenéticas se modifican con el tratamiento quimioterápico.

6.2 Objetivos

Los objetivos de nuestro trabajo, basándonos en las hipótesis previamente mencionadas fueron:

Objetivo principal:

Determinación de biomarcadores epigenéticos mediante tecnología de microarray de metilación de ADN en la muestra seleccionada y correlacionarlos con las características clínico-patológicas, la respuesta y la supervivencia de las pacientes.

Objetivos secundarios:

1. Analizar las características basales de las pacientes: determinar las características clínicas y patológicas.
2. Análisis de la respuesta patológica tras quimioterapia neoadyuvante.
3. Obtención de resultados de supervivencia libre de enfermedad y de supervivencia global.
4. Clasificar las muestras según los subtipos del cáncer de mama utilizando técnicas inmunohistoquímicas (RE, RP, HER2 y ki67) y correlacionarlos con la respuesta patológica, supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global.

Tipificación de biomarcadores epigenéticos en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado como factores pronósticos de la evolución de la enfermedad y predictivos de respuesta al tratamiento con quimioterapia neoadyuvante

7 Pacientes y Métodos

7.1 Pacientes

Se seleccionaron las pacientes tratadas con quimioterapia neoadyuvante basada en esquema de antraciclinas y taxanos en el servicio de Oncología Médica del Institut Català d'Oncologia, del Hospital Germans Trias i Pujol en el periodo comprendido entre los años 2003 y 2012. La selección de las pacientes, la recogida de datos clínicos y muestras de tejido se realizó de forma retrospectiva.

7.1.1 Inclusión de pacientes y base de datos clínicos

La selección de las pacientes en la base de datos clínicos se basaba en los siguientes criterios:

- Consentimiento informado para los tejidos recogidos en fecha posterior a la entrada en vigor de la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica. Para aquellas muestras previas a 2007, se realizó un esfuerzo razonable para la obtención del consentimiento informado, que se obtuvo en la mayoría de los casos.
- Pacientes de sexo femenino diagnosticadas de cáncer de mama, confirmado histológicamente, estadios II-III tratadas con quimioterapia neoadyuvante de acuerdo con la Unidad Funcional de Mama del centro con esquemas basados en antraciclinas y taxanos y en caso de sobreexpresión de HER2 conocido, se trataban con Trastuzumab.
- Edad mayor o igual a 18 años
- Disponibilidad de tejido tumoral incluido en parafina.

Se seleccionaron para el estudio 138 pacientes que cumplían estas características. Las pacientes habían recibido tratamiento con quimioterapia neoadyuvante, tras una confirmación histológica y tras ser evaluadas en la Unidad Funcional de mama (UFM) del centro. El esquema más utilizado fue: AC (Adriamicina y Ciclofosfamida) por 4 ciclos seguido de Docetaxel por 4 ciclos.

Tras completar el tratamiento con quimioterapia se evaluó la respuesta clínica y radiológica en base a los criterios RECIST. Posteriormente se sometieron a cirugía, pudiendo ser una mastectomía o tumorectomía con o sin vaciamiento axilar ganglionar, según se hubiera decidido en la UFM.

Se evaluó la respuesta patológica de todas las pacientes, considerando como respuesta patológica completa ypTisN0 o ypT0N0.

Tras la cirugía, las pacientes con indicación para recibir radioterapia según criterios clínico-patológicos establecidos en el centro, recibían radioterapia local y en cadenas ganglionares según el protocolo de tratamiento del servicio de Oncología radioterápica del Institut Català d'Oncologia (ICO-Badalona). En casos seleccionados que en su momento se consideraron de riesgo elevado de recaída por falta de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante y por persistencia de enfermedad ganglionar se administró quimioterapia adyuvante siendo el esquema CMF (Ciclofosfamida, Metroteate y Fluorouracilo) por 4 ciclos.

Las pacientes que sobreexpresaban HER2 recibían Trastuzumab hasta completar un año; excepto en los casos previos a la aprobación del mismo. Las pacientes que sobreexpresaban receptores hormonales (RE y /o RP) completaban 5 años de tratamiento hormonal con Tamoxifeno o inhibidores de la aromataasa en función del estado hormonal de la paciente previo al inicio de la quimioterapia; y de acuerdo al protocolo vigente del centro en el momento del tratamiento.

Se definieron los diferentes subgrupos de cáncer de mama, Luminal A, Luminal B, Triple negativo y HER2 positivo de acuerdo con la clasificación inmunohistoquímica en función de los resultados de los RE, RP, HER2 y ki67 basándonos en las guías de Sant Gallen (58). Se definió como Luminal A: RH+/HER2-/ki67 <14% y/o grado I/RP>20%; Luminal B: RH+/HER2-/ki67>14% y/o Grado III y /o RP< 20%; Luminal B-HER2+: RH+/HER2+; Triple negativo: RH-/HER2-; HER2-enriched: RH-/HER2+.

Se evaluó en todas las pacientes la supervivencia libre de progresión (SLP), o Tiempo a la progresión (TTP) definidas como el tiempo transcurrido entre el diagnóstico y la recaída o el último control y la supervivencia global (SG) definida como el tiempo entre el diagnóstico y la muerte de la paciente por cualquier causa o fecha de último control. Asimismo se correlacionaron estos valores con los diferentes subtipos moleculares y con las características clínico-patológicas.

7.1.2 Recolección de muestras humanas

La recogida de muestras se realizó de forma retrospectiva, procedentes de biopsia o PAAF inicial y de la pieza quirúrgica (Biobanco).

Se seleccionó y delimitó la parte del tejido tumoral para realizar el estudio inmunohistoquímico y epigenético en el servicio de Anatomía Patológica del mismo centro.

7.2 Métodos

7.2.1 Confeción de tissue microarray

Para la validación de biomarcadores a nivel de expresión de proteína en el tejido tumoral se confeccionaron *tissue micro arrays (TMA)*. Previo a la realización de los TMA, las laminillas de estos bloques teñidas con hematoxilina-eosina fueron revisadas por dos patólogos para identificar las áreas de tumor invasivo.

El procedimiento utilizado para realizar TMA es el siguiente: se obtienen 3 cilindros de 0,6 mm de diámetro de cada bloque de tejido parafinado mediante una TMA workstation MTA-1 (Beecher Instruments). Para el análisis por inmunohistoquímica, secciones de 5 micras se desparafinizan, hidratan, sumergen en tampón citrato y se autoclavan. Las secciones se incuban con los anticuerpos

primarios correspondientes durante 22 horas a temperatura ambiente y después de diversos lavados, se incuban con los anticuerpos secundarios y con peróxido de hidrógeno antes de añadir el complejo peroxidasa avidina-biotina. Posteriormente para cada biomarcador específico se mide el porcentaje de células teñidas y se valorara como positivas o negativas o según un rango de porcentaje de positividad en cada caso, según esté establecido para cada uno.

Se realizaron 7 TMAS, con muestras de las biopsias tomadas antes de quimioterapia y con muestras de las biopsias tras la cirugía que no hubieran obtenido una respuesta completa patológica.

Sobre el material de TMA se realizó el análisis inmunohistoquímico para la determinación de RE, RP, HER2, ki 67 y grado histológico.

Todas las cores fueron evaluadas para cada uno de los tumores. Cada core fue puntuada individualmente por dos lectores diferentes, y se compararon los resultados, discutiendo los casos con discordancia y llegando a un acuerdo antes de dar el resultado definitivo.

7.2.2 Análisis inmunohistoquímico

La determinación del estado de HER2 fue realizada siguiendo los criterios establecidos por la SEAP (Sociedad Española de Anatomía Patológica) y SEOM (Sociedad Española de Oncología Médica) para la interpretación del Herceptest (183), hasta el 2007 se utilizaron las recomendaciones de las guías de la FDA a partir de esa fecha se utilizaron las guías de ASCO-CAP (184). La inmunoreacción se consideró negativo (0) en ausencia de tinción de membrana o tinción en menos del 10% de las células; negativo(1+) en caso de tinción de membrana débil e incompleta en más del 10% de las células; borderline (2+) en caso de tinción completa, débil o moderada, en más del 10% de las células o tinción completa e intensa en 10-30% de las células; positivo (3+) en caso de tinción de membrana completa e intensa en más del 30% de las células.

La inmunohistoquímica del resto de anticuerpos (RE, RP, Ki67) fue realizada conjuntamente, utilizando el sistema automatizado de Ventana Benchmarch immunostainer con el kitt ultraview universal. Los reactivos utilizados fueron: REstrogenos-1/40, clona 6F11 de Leica para la estudio de los RE; RProgesterona-1/40, clona 312 de Leica para los RP; HER-2 pre diluido, clona anti Her-2/NEU(4B5) de Ventana para HER2.

La valoración de los resultados fue la siguiente, en función de cada biomarcador analizado:

Los RE y RP fueron considerados positivos sólo si la positividad nuclear estaba presente en más de un 5% de las células neoplásicas. El valor del resultado se daba en función del porcentaje de expresión de los mismo, variando entre 0 y 100% para cada uno de ellos.

Ki67 fue puntuado como el porcentaje de células con positividad nuclear por inmunohistoquímica. Se contabilizaron un mínimo de 200 células totales para su determinación. El valor del resultado se dio en porcentaje, siendo >30% cuando era superior a este valor; menor al 10% cuando era menor a éste y para los valores comprendidos entre 10 y 30% se especificó el valor porcentual correspondiente. Se revisó el resultado por dos observadores y la determinación se realizó en todas las cores de las que se disponía material.

El grado histológico se determinó utilizando los criterios clásicos de Nottingham (185). El método se basa en la asignación de una puntuación (1 a 3) a cada una de las siguientes características tumorales: formación de túbulos, pleomorfismo nuclear y número de mitosis. Una vez sumadas las puntuaciones establecidas para cada característica tumoral, el carcinoma se considera: grado 1 (bien diferenciado), puntuación 3-5, grado 2 (moderadamente diferenciado), puntuación 6-7 y grado 3 (pobremente diferenciado) puntuación 8-9.

7.2.3 Análisis de HER2 mediante FISH

En los casos en que se objetivó inmunopositividad para HER2 (2+,3+) se realizó la técnica de CISH o FISH (Hibridación “in situ” con Cromógeno o Fluorescente respectivamente) para evaluar el número de copias del gen de HER2 en el núcleo celular para determinar su amplificación. Se siguieron los criterios de las guías FDA hasta el año 2007 y a partir de esta fecha en adelante las guías ASCO-CAP-2007 (183, 184) al igual que para la determinación de la IHQ. Se interpretó como: No amplificado: ratio de señales del gen HER2 frente a señales del cromosoma 17 menor de 1,8. Amplificado: ratio de señales del gen HER2 frente a señales del cromosoma 17 mayor de 2,2. Borderline: ratio de señales del gen HER2 frente a señales del cromosoma 17 entre 1,8 y 2,2. Polisomía: número de señales del centrómero 17 por núcleo ≥ 3 . Monosimía: número de señales del centrómero 17 por núcleo $< 1,5$. Y no interpretable si ocurría al menos una de las siguientes circunstancias: no hubiera presencia de señales de una u otra sonda en al menos 20 células; si estas señales eran débiles o inexistentes en más del 25% de las células; si no era posible valorar como mínimo dos áreas diferentes de carcinoma infiltrante o si los controles no mostraban el resultado esperado.

7.2.4 Análisis epigenético

El tejido obtenido de las biopsias se fijó en formol por imbibición y se montó en un bloque de parafina, del cual mediante un microtómo, se realizaron cortes de 4 micras de grosor, que se adhirieron a un portaobjetos. Estos portaobjetos, con las secciones de tejido adheridas se tiñeron, en este caso con hematoxilina-eosina, para poder distinguir y visualizar los tipos celulares y realizar una correcta selección de la zona tumoral. Junto con el patólogo se revisaron todas las laminillas y se seleccionó la parte más representativa del tumor para posterior extracción del ADN.

Previa a la extracción del ADN se desparafinaron las muestras, siguiendo el procedimiento habitual basado en diferentes baños de xilol, principalmente para quitar la parafina, y baños de etanol a diferentes porcentajes para hidratar las muestras. Aunque el procedimiento fue muy similar, se modificó ligeramente al desparafinar las muestras procedentes de los resto de TMA ya introducidas en un *eppendorf*.

Para la extracción del ADN, se recuperaron las áreas macrodisecionadas en un *eppendorf* con 200 μ l de tampón de digestión, se incubaron durante al menos 16 horas a 60°C para que la proteinasa K, que contiene el tampón, digiriera el tejido y liberase el ADN celular. A continuación se añadieron 10 μ l más de proteinasa K, para acabar de digerir el tejido, y se procedió a la extracción del ADN con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. El ADN obtenido se suspendió en 40 μ l de agua destilada.

7.2.4.1 Análisis de perfiles epigenéticos por tecnología microarray

Para determinar los perfiles de metilación del ADN de las muestras del estudio, se recurrió a la tecnología de microarrays de metilación de Illumina conocida como Infinium HumanMethylation450K. El procesamiento de las muestras se realizó siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante (<http://www.illumina.com>). Brevemente, esta tecnología es capaz de interrogar más de 450.000 (450K) posiciones CpG, distribuidas por todo el genoma, cubriendo un 99% de los genes descritos en la base de datos RefSeq. Con esta tecnología se estudian sitios de metilación situados no sólo en islas, sino en orillas y aisladas, tanto en zonas promotoras como en zonas exónicas e intrónicas en el cuerpo del gen (186, 187). Para el control de calidad del material genético procedente del tejido parafinado, se usó un kit comercial (Infinium HD FFPE QC Assay, Illumina) el cual permite mediante la realización de una RT-PCR, determinar la idoneidad o no de una muestra para su posterior hibridación en el microarray. Una vez procesadas las muestras, los datos obtenidos fueron sometidos a un proceso de normalización de las intensidades de fluorescencia, con la finalidad de hacer comparables los datos procedentes de todas las muestras del estudio. Posteriormente, las intensidades normalizadas fueron transformadas en niveles de metilación (valor β) utilizando el paquete estadístico R (v2.3.0).

Los datos obtenidos de todas las muestras se sometieron a los controles de calidad, consistentes en la comprobación de los controles internos incluidos por el fabricante en el microarray que permiten la monitorización de todas las etapas del procesamiento del microarray. Asimismo, también se comprobó que para todas y cada una de las muestras los valores de metilación de más del 90% de las CpGs tuviesen un p-valor asociado inferior a 0.01, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para identificar los genes candidatos se compararon 2 grupos de pacientes: respondedoras (con respuesta patológica completa al tratamiento) vs no respondedoras (con enfermedad estable o progresión como mejor respuesta). Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) con la finalidad de

determinar las posiciones CpG diferencialmente metiladas entre ambas condiciones. Se consideraron como estadísticamente significativas aquellas CpGs para las cuales el test de ANOVA resultaba en un p-valor inferior a 0.05, así como una diferencia absoluta de metilación entre grupos superior al 25%. Se utilizaron los siguientes criterios de selección para discriminar los genes candidatos más relevantes: se consideraron solamente aquellos genes que tuvieran más de una posición CpG seleccionada por ANOVA, y que estas estuvieran en la zona promotora, para poder correlacionar el nivel de metilación con la expresión de ARN.

7.2.4.2 Pirosecuenciación

El diseño de los *primers* necesarios para la pirosecuenciación se realizó utilizando el software PyroMark Assay Design (v2.0.1.15, Qiagen).

Los ensayos de pirosecuenciación se aplicaron para validar los biomarcadores derivados de los datos de microarrays de metilación de ADN del TCGA. Brevemente, la conversión con bisulfito se llevó a cabo mediante el kit EZ DNA methylation (Zymo Research). Se obtuvo la secuencia genómica (300pb upstream y downstream) de las CpGs a analizar por pirosecuenciación del USCS Genome Browser (GRCh37/hg19). El set de *primers* fue diseñado con un programa específico (PyroMark Assay Design v2.0.1.15, QIAGEN), para llevar a cabo la PCR de amplificación. El listado de los *primers* diseñados se detallará en el apartado de resultados y anexos. El análisis y la cuantificación de la metilación de ADN se realizaron en el pirosecuenciador PyroMark Q96 System version 2.0.6 (QIAGEN), con los controles apropiados.

7.3 Análisis estadístico

Las variables cuantitativas fueron representadas mediante los valores de mediana y sus rangos; las variables cualitativas fueron expresadas mediante los valores de sus frecuencias absolutas y en porcentajes. Se utilizó la prueba estadística de Chi-Cuadrado para identificar si había relación de dependencia estadísticamente significativa entre las variables que miden si hay respuesta completa patológica (definida como yp^{T0N0} y yp^{Tis0N0}) y las variables cuya influencia se ha querido evaluar sobre éstas. El tiempo a la progresión ($T^{*}TTP / SLP$) fue calculado desde el diagnóstico hasta la progresión de la enfermedad, muerte o fin de seguimiento. La Supervivencia Global (SG) fue estimada desde el diagnóstico hasta la muerte por cualquier causa. Tanto el $T^{*}TTP/SLP$ como la SG fueron calculados utilizando la estimación por Kaplan-Meier. Se realizó análisis univariante mediante modelización de Cox para estudiar las diferencias tanto en $T^{*}TTP/SLP$ como en SG según las diferentes categorías de las variables seleccionadas.

El análisis en función de las diferentes variables se realizó utilizando la estimación de Kaplan-Meier y el Long Rank para objetivar diferencias entre los grupos con intervalo de confianza del 95%; para la comparación de las curvas de supervivencia (SG y $T^{*}TTP/SLP$). Se consideró significación estadística

cuando había un valor de $p < 0,05$. El análisis estadístico fue realizado utilizando el programa IBM SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 24.00 para Windows.

Para el estudio del efecto de los biomarcadores epigenéticos candidatos sobre las variables clínicas de la cohorte, se usó el paquete estadístico SPSS. El análisis de supervivencia se llevó a cabo mediante curvas Kaplan Meier y el test Log-Rank, considerando un p-valor inferior a 0,05 como estadísticamente significativo. Además se valoró el efecto de las covariables clínicas con el análisis multivariado mediante Regresión de Cox. La correlación entre el estatus de metilación y la respuesta al tratamiento, así como con el resto de parámetros clínicos, se estableció mediante la función F-Fisher y chi-cuadrado, usando tablas de contingencia.

Tipificación de biomarcadores epigenéticos en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado como factores pronósticos de la evolución de la enfermedad y predictivos de respuesta al tratamiento con quimioterapia neoadyuvante

8 Resultados

8.1 Resultado para el global de pacientes

8.1.1 Características de las pacientes

Las características de las 138 pacientes incluidas se muestran en la Tabla 3. La mediana de edad fue de 48 años (rango 24-68). 89 pacientes (64,5%) eran postmenopáusicas en el momento de su inclusión en el estudio.

En cuanto a los subtipos histológicos, el más frecuente fue el carcinoma ductal infiltrante descrito en los tumores de 122 pacientes (88,41%), seguido del carcinoma lobulillar infiltrante que presentaban los tumores de 8 pacientes (5,8%); hubo un caso (0,72%) de carcinoma infiltrante metaplásico y 7 (5%) casos en los que no se pudo distinguir entre ductal o lobulillar infiltrante.

Los receptores de estrógenos fueron positivos en 90 pacientes (65,2%) y negativos en 48 (34,7%). Los receptores de progesterona fueron positivos en 71 casos (51,5%) y negativos en 67 (48,5%). La expresión de HER2 fue negativa en 114 (82,65%) de los casos y positiva en el resto.

El grado histológico previo al tratamiento fue I en 4 pacientes (2,9%), II en 71 pacientes (51,45%), III en 30 pacientes (21,74%), y no se pudo determinar en los restantes 33 casos (23,91%).

El estadio clínico previo al tratamiento fue cIIA en 28 pacientes (20,29%), cIIB en 27 (19,57%), cIIIA en 54 (39,13%), cIIIB en 26 (18,84%) y cIIIC en 3 pacientes (2,17%). Según el tamaño tumoral, la mayoría de pacientes (59 casos; 42,75%) se clasificaron como cT2, 55 pacientes (39,86%) se clasificaron como cT3; 19 pacientes (13,76%) como cT4 y sólo 5 pacientes fueron cT1 (3,62%). La mayoría de las pacientes presentaba afectación ganglionar (71,74%); siendo evaluadas como cN1 75 pacientes (54,35%), como cN2 21 pacientes (15,22%) y sólo 3 pacientes (2,17%) se clasificaron como cN3.

Se evaluó el subtipo molecular al diagnóstico de acuerdo con el estado de los RE, RP, HER2, el grado histológico y ki67 y se clasificaron según los criterios definidos en el apartado de material y métodos. 44 pacientes (31,88%) fueron evaluadas como triple negativo; 8 pacientes (5,8%) como HER2 positivo enriched; 26 pacientes (18,84%) como luminal A; 37 pacientes (26,81%) como luminal B-HER2 negativo; 16 pacientes (11,59%) como luminal B-HER2 positivo. En 7 casos (5,07%) no se pudo distinguir entre luminal A y luminal B.

La determinación de la E-Cadherina sólo se pudo realizar en 74 pacientes; siendo 0 en 10 casos (13,51%) y 1 en 64 (86,49%)

Todas las pacientes recibieron quimioterapia neoadyuvante basada en esquemas con antraciclinas y taxanos. El esquema más utilizado fue adriamicina/ ciclofosfamida x 4 ciclos seguido de docetaxel x

4 ciclos, que fue recibido por 118 pacientes (85,5%); el resto de pacientes recibieron otro tipo de esquema terapéutico: 11 pacientes (8%) recibieron paclitaxel/trastuzumab x 12 semanas seguido de FECH (Fluorouracilo/epirrubicina/ciclofosfamida/trastuzumab) x 4 ciclos; 4(2,9%) pacientes adriamicina/ ciclofosfamida x 4 ciclos seguido de docetaxel / trastuzumab x 4 ciclos; 3(2,17%) pacientes recibieron adriamicina/ ciclofosfamida x 4 ciclos seguido de paclitaxel x 12 semanas; 1(0,72%) paciente recibió doxorubicina liposomal/ciclofosfamida x 4 ciclos seguido de docetaxel x 4 ciclos y 1 (0,72%) paciente recibió doxorubicina liposomal x 4 ciclos seguido de docetaxel/trastuzumab x 4 ciclos. El 89,63% de las pacientes recibió 8 ciclos de tratamiento; el resto de paciente no los completó por toxicidad relacionada con la medicación. Las pacientes que expresaban HER2 (24 pacientes, 17,4% del total) recibieron trastuzumab junto al esquema de antraciclinas y taxanos (el 87,5% de las pacientes HER2+) exceptuando 3 casos que fueron diagnosticadas en el año 2003 y no recibieron el fármaco biológico.

Tras la quimioterapia neoadyuvante 70 pacientes (50,72%) se intervinieron mediante una mastectomía con vaciamiento axilar ganglionar, 63 (47,10%) pacientes mediante tumorectomía y vaciamiento axilar ganglionar y 3 pacientes (2,17%) mediante tumorectomía sin vaciamiento axilar ganglionar por tener una biopsia de ganglio centinela previo al inicio de tratamiento negativa. Recibieron radioterapia adyuvante en mama, pared torácica y/o cadenas ganglionares 131 pacientes (94,93%), según indicaciones del servicio de oncología radioterápica. Todas las pacientes que presentaron expresión de receptores hormonales recibieron hormonoterapia adyuvante (63,77%).

El estadio patológico fue yp0 en 29 (21,01%) pacientes, ypIA en 28 (20,29%), ypIIA en 25 (18,12%); ypIIB en 6 (4,35%), ypIIIA en 34 (24,64%); ypIIIB en 4 (2,90%) y ypIIIC en 12 (8,70%) pacientes. Tras la quimioterapia neoadyuvante 70 pacientes (50,72%) presentaban afectación ganglionar, 63 pacientes (45,65%) no tenían afectación ganglionar y en 3 casos (2,17%) se desconocía el estado ganglionar tras la quimioterapia puesto que no se realizó vaciamiento axilar. Según el tamaño tumoral tras la quimioterapia neoadyuvante se clasificaron como ypT0 26 (18,84%) pacientes, como ypTis 8 (5,80%); como ypT1 60 (43,48%), como ypT2 24 (17,39%), como ypT3 18 (13,04%) y como ypT4 a 2 (1,45%) pacientes. La distribución según la afectación ganglionar fue: 63 pacientes (45,65%) ypN0; 39 (28,26%) ypN1; 21 (15,22%) ypN2; 12(8,70%) ypN3 y 3 (2,17%) ypNx.

Tras la cirugía, 72 pacientes (52,18%) no recibieron quimioterapia ni trastuzumab adyuvante y 66 pacientes (47,82%) recibieron tratamiento adyuvante; del global de estas 66 pacientes: 21 (31,9%) recibieron Trastuzumab; 44 (66,6%) recibieron CMF (ciclofosfamida, metrotexate y fluorouracilo) y una paciente (1,5%) otro esquema de tratamiento.

Se analizó el grado histológico postcirugía. Sólo se pudo determinar en 81 (58,7%) casos; siendo grado I en 8 (5,80%), grado II en 46 (33,33%) y grado III en 27 (19,57%). En el resto de casos no se pudo determinar (41,30%).

Se clasificaron a las pacientes en función del subtipo molecular (Tabla 3). En 7 pacientes sólo se pudo determinar que pertenecían al grupo de Luminal, pero no se pudo discernir entre Luminal A o B por falta de información patológica; estas pacientes no se incluyeron en los siguientes análisis. Asimismo una paciente clasificada como triple negativa tampoco se incluyó por insuficiente seguimiento para realizar el análisis (Figura 2).

Figura 2. Gráfico descriptivo subtipo molecular

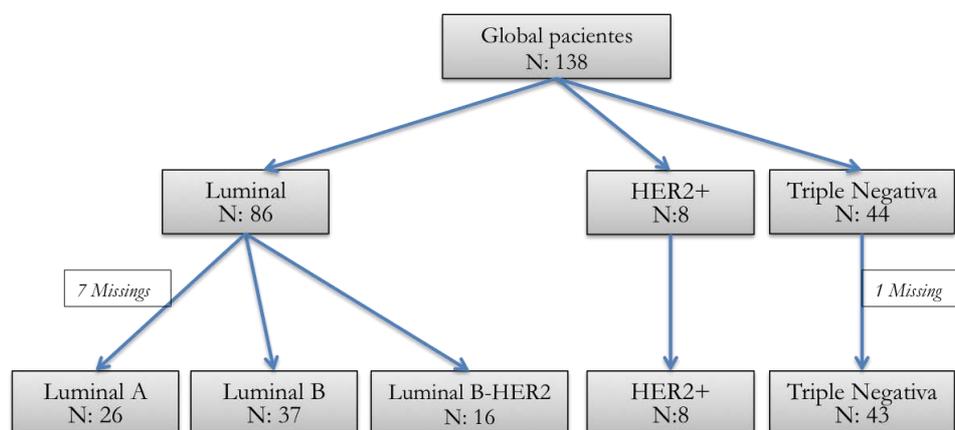


Tabla 3: Característica del global de las pacientes

Características Global pacientes	N: 138	N	%
Edad (mediana)		48 (rango 24-68)	
Estado menopausia			
Premenopáusica		89	64,49%
Postmenopáusica		49	35,51%
Tipo Histológico			
Carcinoma		7	5,07%
Carcinoma metaplásico infiltrante		1	0,72%
CDI (Carcinoma ductal infiltrante)		122	88,41%
CLI (Carcinoma lobulillar infiltrante)		8	5,80%
Receptor Estrógeno (RE)			
Negativo (0-4%)		48	34,70%
Positivo (5-100%)		90	65,20%
Receptor Progesterona (RP)			
Negativo (0-4%)		67	48,50%
Positivo (5-100%)		71	51,50%
HER2			
Positivo		24	17,40%
Negativo		114	82,60%

Grado Histológico(pre tratamiento)		
Desconocido	33	23,91%
I	4	2,90%
II	71	51,45%
III	30	21,74%
Tamaño Tumoral (clínico)		
cT1	5	3,62%
cT2	59	42,75%
cT3	55	39,86%
cT4	19	13,76%
Estado ganglionar (clínico)		
cN0	39	28,26%
cN1	75	54,35%
cN2	21	15,22%
cN3	3	2,17%
Estadio Clínico		
cIIA	28	20,29%
cIIB	27	19,57%
cIIIA	54	39,13%
cIIIB	26	18,84%
cIIIC	3	2,17%
Subtipo Histológico		
HER2+	8	5,80%
Luminal A	26	18,84%
Luminal B	37	26,81%
Luminal B-HER2	16	11,59%
Luminal	7	5,07%
Triple Negativa	44	31,88%
Esquema de quimioterapia		
AC/ D	118	85,5%
Otros (antraciclinas y taxanos)	20	14,5%
Tipo de cirugía		
Mastectomía y vaciamiento axilar	70	50,72%
Tumorectomía y vaciamiento axilar	65	47,10%
Tumorectomía sin vaciamiento axilar	3	2,17%
Tamaño tumoral (patológico)		
ypT0	26	18,84%
ypTis	8	5,80%
ypT1	60	43,48%
ypT2	24	17,39%
ypT3	18	13,04%
ypT4	2	1,45%
Estado ganglionar (patológico)		
ypN0	63	45,65%
ypN1	39	28,26%

ypN2	21	15,22%
ypN3	12	8,70%
ypNx	3	2,17%
Estadio patológico		
yp0	29	21,01%
ypIA	28	20,29%
ypIIA	25	18,12%
ypIIB	6	4,35%
ypIIIA	34	24,64%
ypIIIB	4	2,90%
ypIIIC	12	8,70%
Radioterapia adyuvante		
No	7	5,07%
Sí	131	94,93%
Hormonoterapia adyuvante		
No	50	36,23%
Sí	88	63,77%
Tratamiento adyuvante		
No	72	52,18%
Sí	66	47,82%
trastuzumab	21	31,9%
CMF	44	66,6%
otros	1	1,5%
Grado histológico post tratamiento		
Desconocido	57	41,30%
I	8	5,80%
II	46	33,33%
III	27	19,57%

Se realizó un análisis para evaluar el cambio de expresión de los RE, RP y HER2 en la biopsia pre cirugía vs en la biopsia de la cirugía. De las 66 pacientes que se disponía de la información del estado de RE tanto pre-cirugía como post-cirugía, 3 (4,5%) cambiaron de negativo a positivo, 4 (6,1%) cambiaron de positivo a negativo mientras que los 59 restantes (89,4%) no presentaron cambios en su expresión. Siendo la conversión un 10.6%.

En relación al RP, de las 69 pacientes que tenían informado el estado de RP pre y post cirugía, 3 (4,3%) cambiaron de negativo a positivo, 16 (23,2%) cambiaron de positivo a negativo mientras que los 50 restantes (72,4%) permanecieron sin cambios; con una conversión del 27,5%.

Finalmente se analizó el cambio del estado de HER2. De las 59 pacientes que tenían información pre y post, 2 (3,4%) cambiaron de positivo a negativo y las 57(96,6%) pacientes restantes no presentaron cambios de expresión; no identificándose ningún cambio de negativo a positivo.

8.1.2 Respuesta patológica del global de las pacientes

La Tabla 4 se muestran los resultados de la respuesta completa patológica (RCp) en función de diversas variables. Asimismo se muestran los resultados tanto definiendo la respuesta completa patológica como ypT0N0 y como ypT0/isN0.

En el global de las pacientes (N: 138), la respuesta completa patológica definida como ypT0N0 se obtuvo en 22 pacientes (15,9%) y si se definía como ypT0/isN0 en 30 pacientes (21,7%).

En función de la edad, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en la respuesta completa patológica entre los diferentes subgrupos ($p=0,582$). Los subgrupos de edad analizados fueron: pacientes < 35 años, entre 35 y 39; entre 40 y 49; entre 50 y 59 y en pacientes mayores de 60 años.

Según el tamaño tumoral (definido por cT) no se encontraron diferencias en la obtención de respuesta completa patológica. Tampoco hubo diferencias en función de la afectación ganglionar (cN).

Al analizar la RCp obtenida en función de los diferentes tipos histológicos observamos que no hubo diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, las pacientes con histología de carcinoma lobulillar infiltrante, que representaban un 5,8% del total de las pacientes, en ningún caso obtuvieron una respuesta completa patológica (en ninguna de las dos definiciones: ypT0N0/ypT0isN0).

Se observaron diferencias en las respuestas obtenidas en función del grado histológico ($p=0,031$ en ypT0N0; y $p=0,02$ en ypTis0N0). Para los tumores con un grado III, el porcentaje de RCp fue del 30% tanto definida como ypT0N0 como ypTis0N0. Por el contrario en ningún caso de los tumores con bajo grado histológico (grado I) se obtuvo una RCp. Los resultados para el subgrupo de tumores de grado II fue más variables, siendo un 8,5% cuando se define ypT0N0 y del 12,7% para ypTis0N0. En el subgrupo de pacientes con grado II, se hizo una división en función del ki67, siendo las tasas de RCp(ypT0N0) del 4,4% cuando ki67 era <30% vs del 15,4% cuando ki67 era ≥ 30 (no siendo estas diferencias estadísticamente significativas; $p=0,11$).

La RCp fue diferente, de forma estadísticamente significativa, en función de la expresión de los receptores hormonales ($p<0,001$). El subgrupo de pacientes sin expresión de receptores de estrógeno representó el mayor volumen de pacientes que obtuvo una RCp; 38,6% en el caso de ypT0N0 y de un 50% cuando se definió la RCp como ypTis0N0. Para las pacientes con expresión de RE los resultados fueron inferiores; siendo de 5,9% en la definición de ypT0N0 y de un 9,4% en ypTis0N0. Resultados similares se obtuvieron con la expresión de receptores de progesterona ($p>0,001$), en el

que las pacientes sin expresión de RP obtuvieron unas mayores tasas de RCp (32,3% ypT0N0 y 41,9% ypTis0N0). Si existía expresión de RP los resultados disminuían a un 3% en el caso de ypT0N0 y 6% en ypTis0N0.

El función de la expresión de HER2, para la obtención de RCp definida como ypT0N0, no se observaron diferencias ($p=0,915$), siendo del 16,7% en el caso de existir sobreexpresión de HER2 y del 15,8% en el caso de no haberla. Por el contrario al definir ypTis0N0 las tasas de RCp en las pacientes con sobreexpresión de HER2 fueron del 37,5% vs 18,4% en pacientes sin sobreexpresión de HER2 ($p=0,039$).

En función de Ki67 también hubo diferencias en las tasas de RCp. Las pacientes con un $ki67 \leq 15\%$ sólo obtuvieron ypT0N0 un 5,3%; por el contrario si el $ki67 \geq 30\%$ la tasa de RCp fue del 33% ($p=0,004$); la tasa de RCp en pacientes con $ki67$ entre 16 y 29 fue del 7,1%. Los resultados con una RCp definida como ypTis0N0 fueron del 13,2% en el caso de $ki67 \leq 15\%$; del 33,3% si era $\geq 30\%$ y para el subgrupo con un $ki67$ entre 16 y 29% fue del 7,1% ($p=0,05$).

8.1.3 Respuesta completa patológica y subtipos moleculares

En la Tabla 4 se muestra la correlación entre la RCp y los diferentes subtipos moleculares. Cuando se define RCp como ypT0N0 los resultados obtenidos fueron: de un 25% en el subgrupo HER2+; 3,8% en Luminal A; 2,7% en Luminal B; 12,5 % en Luminal B-HER2 y del 36,4% en pacientes Triple Negativas ($p<0,001$).

Los resultados al definir la RCp como ypTis0N0 fueron: 62,5% en HER2+; 7,7% en Luminal A; 2,7% en Luminal B; 25% en Luminal B-HER2 y del 40,9% en pacientes Triple negativas ($p<0,001$). Es decir, la RCp evaluada tanto como ypT0N0 como ypTis0N0 fue estadísticamente significativa superior para los subgrupos triple negativo y HER 2.

Tabla 4. Respuesta Completa Patológica Global de pacientes

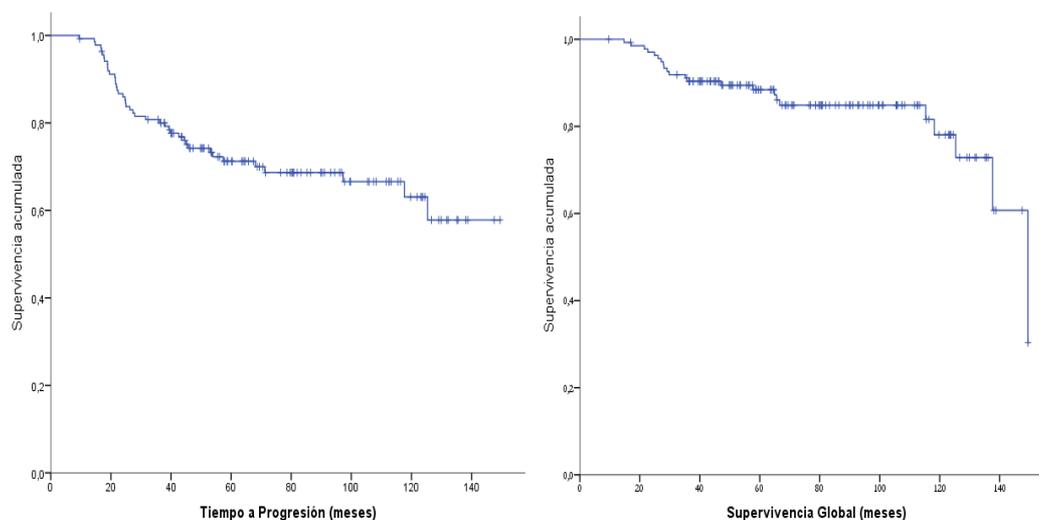
	Pacientes				ypT0 N0		p	ypT0/is N0				p		
	N	%	Si	%	No	%		Si	%	No	%			
Global pacientes	138	100	22	15,9	116	84,1		30	21,7	108	78,3			
Edad, años							0,582							0,262
< 35	10	7,2	3	30,0	7	70,0		3	10,0	7	90,0			
35 - 39	13	9,4	2	15,4	11	84,6		2	6,7	11	93,3			
40 - 49	59	42,8	9	15,3	50	84,7		17	56,7	42	43,3			
50 - 59	38	27,5	4	10,5	34	89,5		4	13,3	34	86,7			
>=60	18	13,0	4	22,2	14	77,8		4	13,3	14	86,7			
Tamaño(cT)							0,305							0,313
cT1	5	3,6	0	0,0	5	100,0		0	0,0	5	100,0			
cT2	59	42,8	13	22,0	46	78,0		16	53,3	43	46,7			

cT3	55	39,9	6	10,9	49	89,1	9	30,0	46	70,0
cT4	19	13,8	3	15,8	16	84,2	5	16,7	14	83,3
Estado ganglionar							0,480			0,569
cN0	39	28,3	9	23,1	30	76,9	11	36,7	28	63,3
cN1	75	54,3	10	13,3	65	86,7	15	50,0	60	50,0
cN2	21	15,2	3	14,3	18	85,7	4	13,3	17	86,7
cN3	3	2,2	0	0,0	3	100,0	0	0,0	3	100,0
Tipo histológico							0,444			0,378
Carcinoma	21	15,2	5	23,8	16	76,2	6	20,0	15	80,0
C. Metaplásico	1	0,7	0	0,0	1	100,0	0	0,0	1	100,0
CDI	108	78,3	17	15,7	91	84,3	24	80,0	84	20,0
CLI	8	5,8	0	0,0	8	100,0	0	0,0	8	100,0
Grado histológico							0,031			0,020
I	4	2,9	0	0,0	4	100,0	0	0,0	4	100,0
II	71	51,4	6	8,5	65	91,5	9	12,7	62	87,3
III	30	21,7	9	30,0	21	70,0	9	30,0	21	70,0
missing	33	23,9	7	21,2	26	78,8	12	36,4	21	63,6
Estado RE							< 0,001			< 0,001
0% - 4%	44	31,9	17	38,6	27	61,4	22	50	22	50
5% - 100%	85	61,6	5	5,9	80	94,1	8	9,4	77	90,6
missing	9	6,5	0	0,0	9	100,0	0	0,0	9	100,0
Estado RP							< 0,001			< 0,001
0% - 4%	62	44,9	20	32,3	42	67,7	26	41,9	36	58,1
5% - 100%	67	48,6	2	3,0	65	97,0	4	6	63	94
missing	9	6,5	0	0,0	9	100,0	0	0,0	9	100,0
Estado HER2							0,915			0,039
Positivo	24	17,4	4	16,7	20	83,3	9	37,5	15	62,5
Negativo	114	82,6	18	15,8	96	84,2	21	18,4	93	81,6
Subtipo molecular							< 0,001			< 0,001
HER2+	8	5,8	2	25,0	6	75,0	5	62,5	3	37,5
Luminal A	26	18,8	1	3,8	25	96,2	2	7,7	24	92,3
Luminal B	37	26,8	1	2,7	36	97,3	1	2,7	36	97,3
Luminal B-HER2	16	11,6	2	12,5	14	87,5	4	25	12	75
Triple Negativa	44	31,9	16	36,4	28	63,6	18	40,9	26	59,1
missing	7	5,1	0	0,0	7	100,0	0	0,0	7	100,0
Ki 67 pre							0,004			0,050
<= 15	38	27,5	2	5,3	36	94,7	5	13,2	33	86,8
> 15 y < 30	14	10,1	1	7,1	13	92,9	1	7,1	13	92,9
>= 30	30	21,7	10	33,3	20	66,7	10	33,3	20	66,7
missing	56	40,6	9	16,1	47	83,9	14	25	42	75

8.1.4 Supervivencia libre de progresión y supervivencia global

Se estimó el tiempo a la progresión (TTP) o supervivencia libre de progresión (SLP) y la supervivencia global (SG) para un total de 137 pacientes. La media del TTP en el global de las pacientes fue de 109,3 meses (95% IC: 99,3-119,3); no alcanzándose la mediana. La mediana de la SG fue de 149,4 meses (95% IC: 132,3-166,5). La media de la SG fue de 127,8 meses (95% IC: 119,7-135,8) (Figura 3). La probabilidad de supervivencia a los 5 años para el global de las pacientes fue del 88,4%.

Figura 3. Resultados de TTP y SG para el global de las pacientes. Análisis de Kaplan-Meier

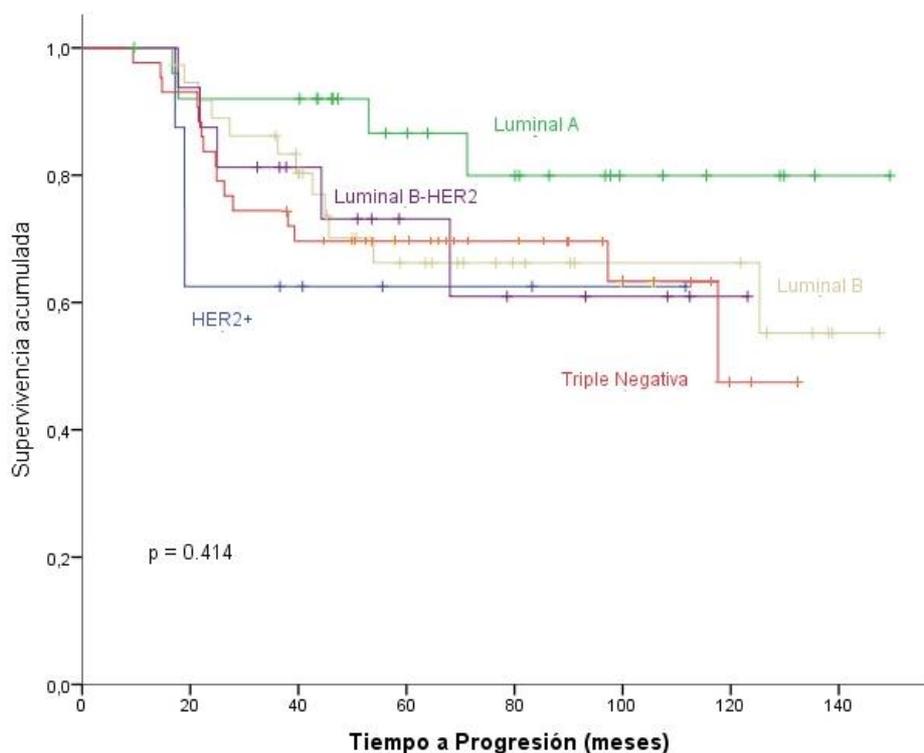


8.1.5 TTP y SG en función de subtipo molecular

Se realizó la estimación del TTP y la SG en función de los diferentes subtipos moleculares. Para un total de 130 pacientes.

Los resultados del TTP se muestran en la Figura 4. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,414$) al realizar el análisis conjunto de todos los subgrupos. Sin embargo aunque no estadísticamente significativas, existen diferencias: la media del TTP en el subgrupo Luminal fue de 128,44 meses (95% IC: 109,8-147,1) superior que en el resto de subgrupos; en Luminal B de 107,1 meses (95% IC: 88,6-125,5); en el Luminal B-HER2+ de 91 meses (95% IC: 68-113,8); en el Triple negativo de 94,7 meses (95% IC: 79,6-110) y en el HER2 76,6 meses (95% IC: 45,3-108) siendo éste el valor inferior entre los diferentes subgrupos moleculares. Únicamente se alcanzó la mediana de tiempo a la progresión para el subtipo triple negativo, siendo de 117,6 meses.

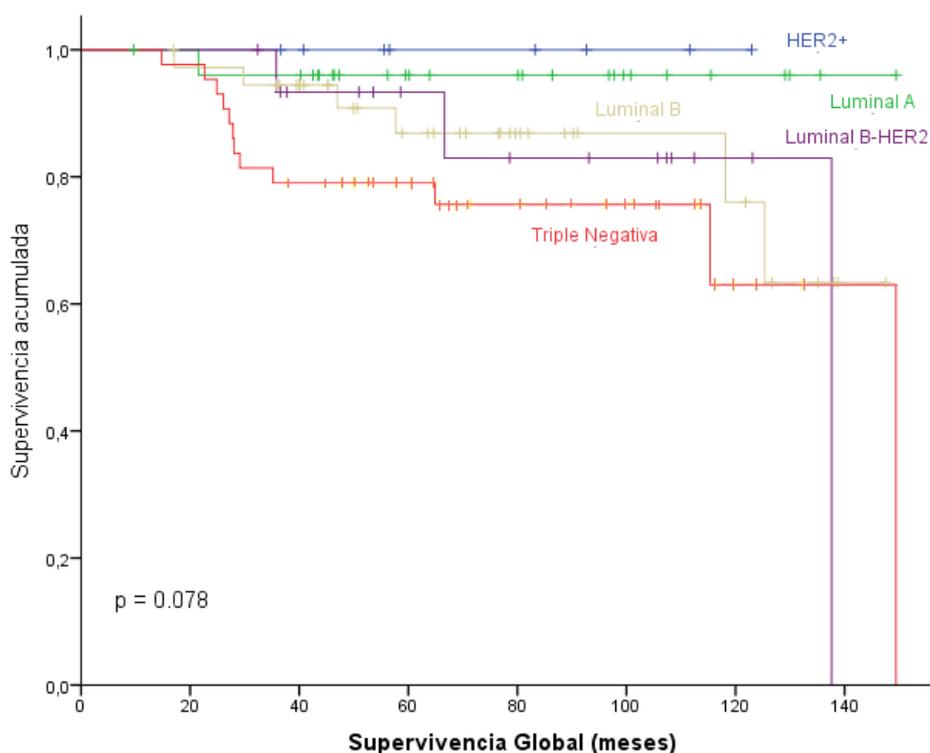
Figura 4. Resultados de TTP y SG en función de subtipo molecular. Análisis de Kaplan-Meier



Respecto a la SG no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,078$) (Figura 5)). A pesar de no ser estadísticamente significativas, sí se detectaron diferencias en cuando a las diferentes subtipos moleculares: siendo inferior en el triple negativo (mediana de SG de 116 meses (95% IC: 99-133,8); seguido de Luminal B-HER2+: de 123,4 meses (95% IC: 101,4-145,5); en el Luminal B de 127,4 meses (95% IC:113,3-141,5) y de 144,3 meses (95% IC: 134,5-154,2) para el subtipo Luminal A. Se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el subtipo Luminal A vs triple negativo ($p= 0,019$), no hubo diferencias entre el resto de subtipos.

El cálculo de la SG para el subtipo HER2 no se pudo calcular dado que no hubo ningún evento (ninguna paciente había fallecido) en el momento de realizar el análisis de los datos. La mediana del tiempo de seguimiento de estas pacientes desde el diagnóstico hasta la fecha del último control o pérdida de seguimiento fue de 70 meses, con un intervalo de 37 a 123 meses; y la media de seguimiento de las mismas fue de 75 meses.

Figura 5. Resultado de SG en función de subtipo molecular. Análisis de Kaplan-Meier.



8.1.6 TTP y SG en función de subtipo molecular y obtención de respuesta completa patológica

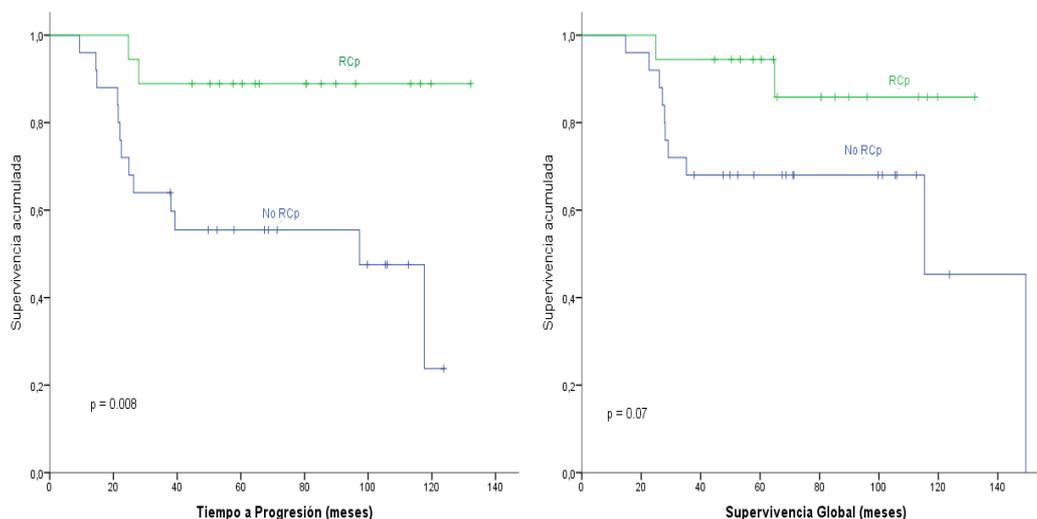
Se estimó el TTP y la SG en función de la obtención de respuesta completa patológica (definida como pT0/isN0) para cada uno de los subtipos moleculares:

Se clasificaron como HER2 a 8 pacientes. Se estimó el TTP sin observarse diferencias estadísticamente significativas ($p=0,722$) en función de si las pacientes habían o no obtenido una respuesta completa patológica; siendo la media estimada del TTP de 80,7 meses (95% IC: 31,3-130,1) vs 57,1 meses (95% IC: 29,2-85,2) respectivamente. En ningún caso se alcanzó la mediana. No se pudo realizar el cálculo estadístico para la SG por no haber eventos en ninguna de las series.

Se realizó el análisis para el subgrupo de pacientes triple negativas (N=43). El TTP en este subgrupo de pacientes TN, fue estadísticamente significativo a favor de las pacientes que obtenían una RCp ($p=0,008$). La media del TTP para las pacientes con RCp fue de 120 meses (95% IC: 105-135,8) vs 75 meses (95% IC: 56,5-94,5) para el subgrupo sin RCp. La mediana únicamente se alcanzó en el subgrupo sin RCp siendo 97,2 meses (95% IC:42,4-152) (Figura 6). Se objetivaron diferencias, no estadísticamente significativas, en relación a la SG en función de la RCp ($p=0,07$); siendo la mediana de la SG de 120,5 meses (95% IC: 105,2-135,7) para el subgrupo con respuesta completa patológica

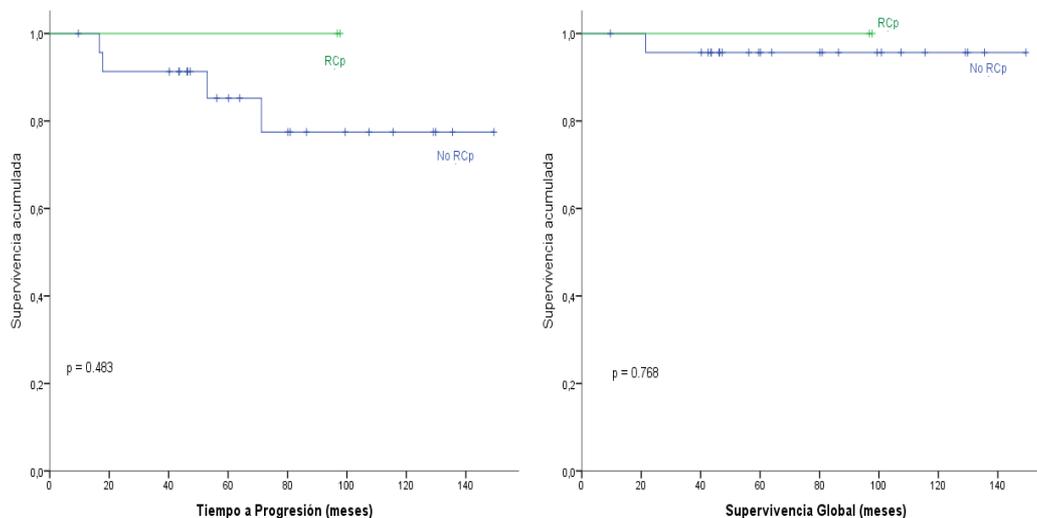
vs 102,3 meses (95% IC: 77,1-127,5) para las pacientes que no obtuvieron RCp. Sólo se alcanzó la mediana en el subgrupo que no obtuvo RCp, siendo de 115 meses (95% IC: 51-179,6) (Figura 6).

Figura 6. TTP y SG en función de RCp, subtipo Triple negativo. Kaplan-Meier.



En el subgrupo de pacientes con subtipo Luminal A (N=26), no se observaron diferencias en TTP ($p=0,483$); ninguna de las pacientes con RCp ($n=2$) tuvo una recaída; 4 pacientes presentaron recaída de las 24 que no obtuvieron RCp. Tampoco se observaron diferencias en la SG ($p=0,768$) en función de si las pacientes habían obtenido o no una RCp. En el momento de analizar los datos sólo una paciente Luminal A había fallecido y ésta no había obtenido una RCp (Figura 7).

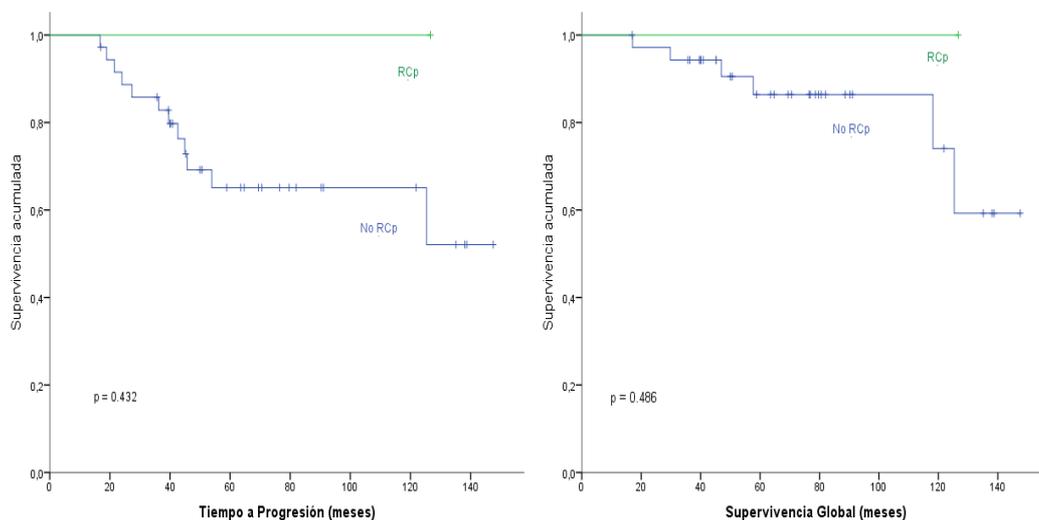
Figura 7. TTP y SG en función de RCp, subtipo Luminal A. Kaplan-Meier.



El subgrupo de pacientes Luminal B (N=37), a pesar de haber diferencias, éstas no fueron estadísticamente significativas, tanto en TTP ($p=0,432$) como en la SG en función de la RCp

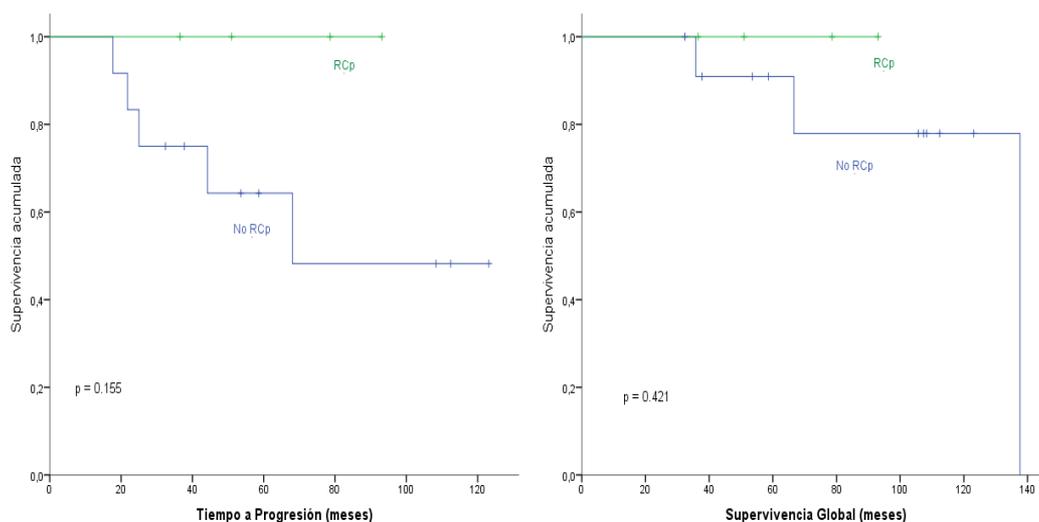
($p=0,486$) (Figura 8). En el subgrupo de pacientes que no obtuvieron RCp (N=36) hubo 6 muertes, mientras que la única paciente que presentó RCp permanecía viva en el momento del análisis de los datos.

Figura 8. Kaplan-Meier. TTP y SG en función de RCp, subtipo Luminal B



El subgrupo de pacientes LuminalB-HER2+ (N=16), a pesar de haber diferencias, éstas no fueron estadísticamente significativas en TTP ($p=0,155$) ni en SG ($p=0,421$) en función de la obtención de RCp (Figura 9). Obtuvieron RCp 4 pacientes, todas ellas permanecían vivas en el momento de la revisión de los datos.

Figura 9. TTP y SG en función de RCp, subtipo Luminal B-HER2. Kaplan-Meier.

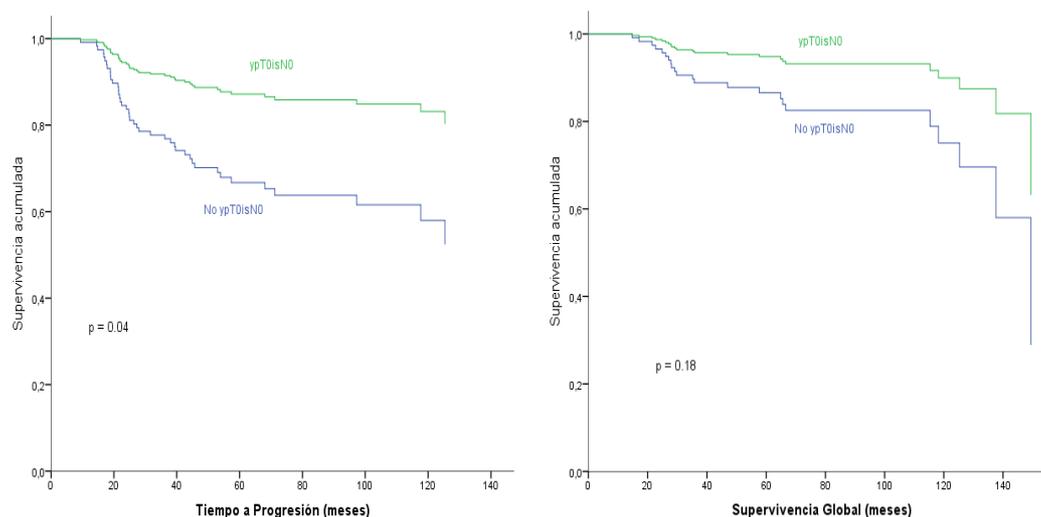


8.1.7 Análisis univariante y multivariante: TTP y SG

Se realizó un análisis univariante para diferentes características en función de la SG y el TTP. En la Tabla 5 se describen los resultados obtenidos. El análisis multivariante no mostró diferencias estadísticamente significativas para el cálculo del TTP y la SG.

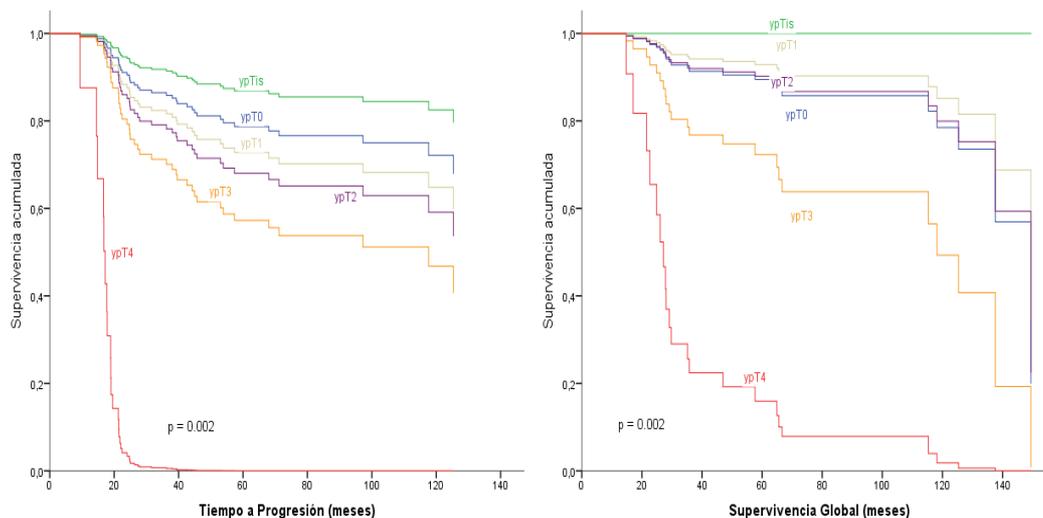
Se valoró el TTP en función de la respuesta patológica obtenida (ver resultados Tabla 5). El TTP se asoció significativamente con los resultados de RCp en cualquiera de sus dos definiciones (ypT0N0 y ypTisN0) vs el resto de estadios patológicos ($p=0,04$); sin embargo no hubo diferencias en la SG para el global de las pacientes ($p=0,18$). En el resto de agrupaciones realizadas (ypT0N0, ypTisN0, ypT0isN+, ypT1-4N0/+) las diferencias no fueron estadísticamente significativas, ni en el TTP ($p=0,084$) ni en SG ($p=0,46$) (Figura 10 y Tabla 5).

Figura 10. TTP y SG en función de tipo de respuesta patológica. Análisis estadístico Cox.



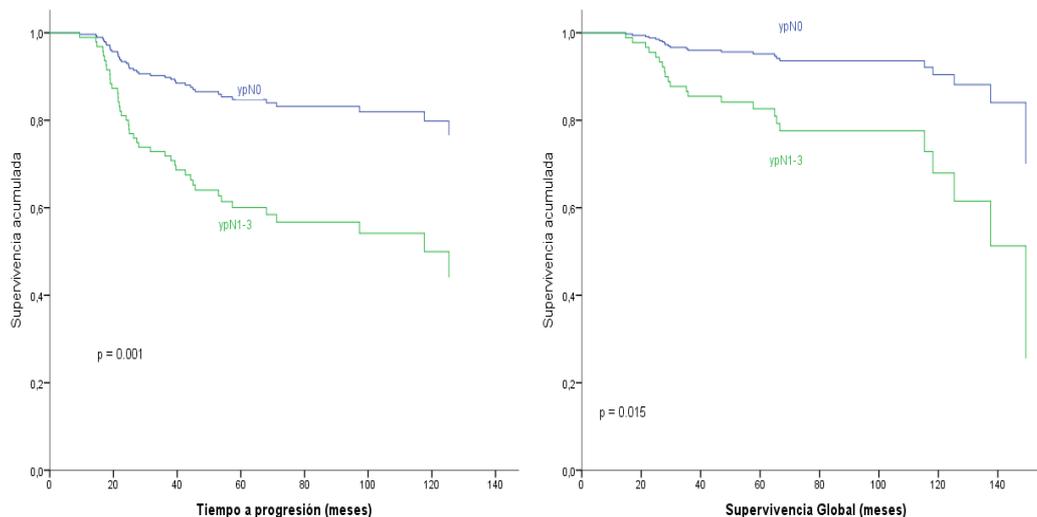
En función del tamaño residual tras la quimioterapia neoadyuvante (ypT) se observaron diferencias estadísticamente significativas en el TTP ($p=0,002$) y en SG ($p=0,002$). Estas diferencias fueron a expensas de la categoría ypT4 con una TTP ($p<0,001$) y SG ($p<0,001$) (Figura 11, Tabla 5).

Figura 11. TTP y SG en función de ypT. Análisis estadístico de Cox.



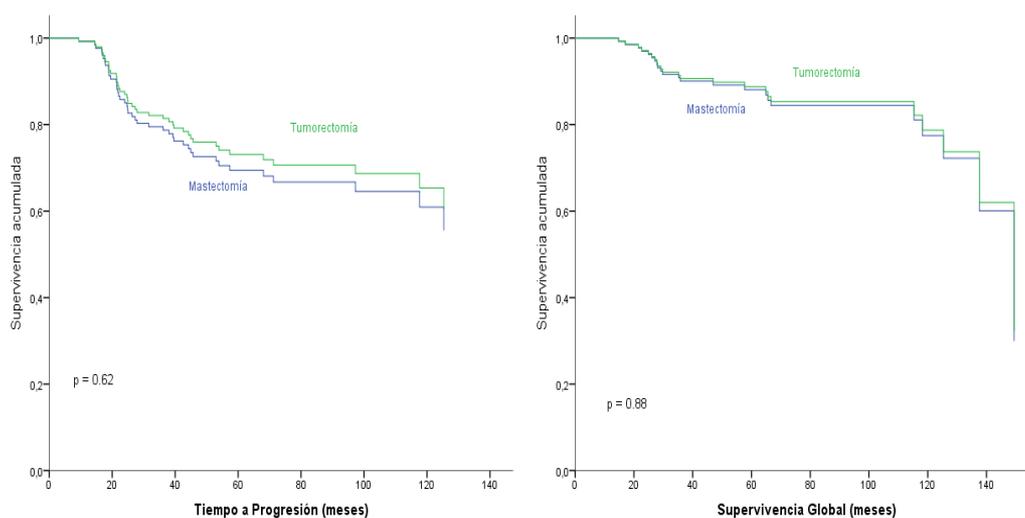
Evaluamos los resultados de TTP y SG en función de la enfermedad residual tras quimioterapia, ya fuera en la mama o a nivel ganglionar. En función de la afectación ganglionar residual (ypN0) se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar las pacientes que obtuvieron una respuesta completa ganglionar ypN0 vs el resto (ypN1-3), tanto en TTP ($p < 0,001$) como en SG ($p = 0,015$) (Figura 12 y Tabla 5).

Figura 12. TTP y SG en función de ypN. Análisis estadístico de Cox.



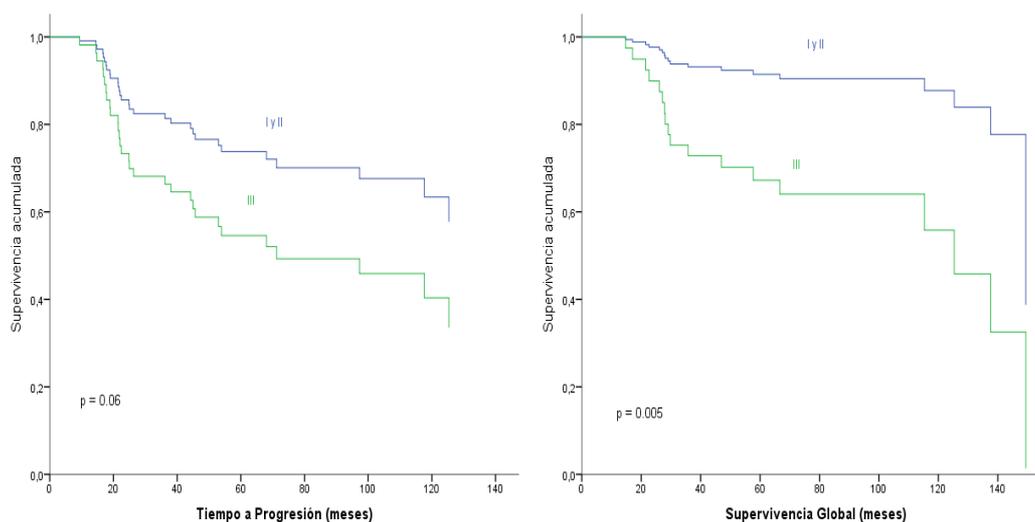
No hubo diferencias en función del tipo de cirugía realizada (mastectomía vs tumorectomía), cuando se evaluó el TTP ($p = 0,62$) ni para la SG ($p = 0,88$) (Figura 13 Tabla 5).

Figura 13. TTP y SG en función de tipo de cirugía. Análisis estadístico de Cox.



Se pudo determinar el grado histológico post quimioterapia neoadyuvante en 81(58,7%) pacientes. Aquellos tumores con grado I y II tras la quimioterapia presentaron una SG estadísticamente significativa superior a los tumores con grado III postquimioterapia ($p=0,005$); y una clara tendencia a un mayor TTP ($p=0,06$) (Figura 14 y Tabla 5).

Figura 14. TTP y SG en función de grado histológico post-cirugía. Análisis estadístico de Cox



En función del ki67 determinado en la enfermedad residual (N=56), las diferencias en TTP ($p=0,20$) y en SG ($p=0,14$) no fueron estadísticamente significativas. Se realizó el punto de corte del ki 67 en 30% (Figura 15 y Tabla 5).

Figura 15. TTP y SG en función de ki67 post quirúrgico. Análisis estadístico de Cox.

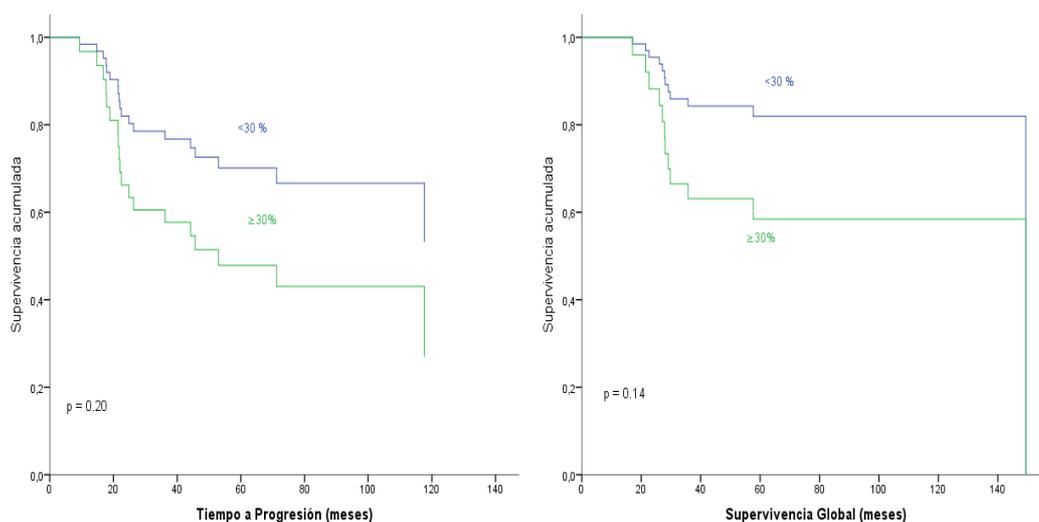


Tabla 5. Análisis Univariante de TTP y SG. Análisis estadístico Cox.

	Pacientes		Tiempo a Progresión (TTP)				Supervivencia Global (SG)				
	N	%	N	HR	95% CI	p	N	HR	95% CI	p	
RCp	138					0,084				0,46	
ypT0N0	22	15,9	3	1			2	1			
ypTisN0	8	5,8	1	1,03	0,11	9,90	0	0,00	0,00	0,99	
ypT0isN+	4	2,9	3	7,00	1,40	34,90	2	4,95	0,70	35,24	0,11
ypT1-4N0+	104	75,4	36	2,83	0,87	9,20	20	1,94	0,45	8,39	0,38
RCp						0,04				0,18	
ypTis0N0	30	21,7	4	1			2	1			
Resto	108	78,3	39	2,95	1,05	8,27	22	2,71	0,63	11,64	0,18
ypT						0,002				0,002	
ypT0	26	18,8	6	1			4	1			
ypTis	8	5,8	1	0,59	0,07	4,89	0	0,00	0,00	0,98	
ypT1	60	43,5	19	1,33	0,53	3,35	9	0,66	0,19	2,32	0,52
ypT2	24	17,4	8	1,61	0,56	4,64	3	0,93	0,21	4,18	0,92
ypT3	18	13,0	7	2,33	0,78	6,94	6	2,92	0,82	10,41	0,10
ypT4	2	1,4	2	34,04	5,91	196,01	2	16,52	2,92	93,37	<0,001
ypN						0,011				0,194	
ypN0	62	44,9	10	1			4	1			
ypN1	39	28,3	20	3,77	1,75	8,13	11	3,90	1,20	12,62	0,02
ypN2	21	15,2	5	1,72	0,59	5,04	4	3,46	0,86	13,90	0,08
ypN3	12	8,7	7	3,52	1,34	9,25	4	3,86	0,94	15,89	0,06
ypNx	4	2,9	1	2,14	0,27	16,79	1	5,46	0,60	49,65	0,13
ypN						0,001				0,015	
ypN0	62	44,9	10	1			4	1			

Tipificación de biomarcadores epigenéticos en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado como factores pronósticos de la evolución de la enfermedad y predictivos de respuesta al tratamiento con quimioterapia neoadyuvante

ypN1-3	76	55,1	33	3,08	1,51	6,26	0,001	20	3,85	1,29	11,43	0,015
Cirugía							0,62					0,88
Mastectomía	70	50,7	23	1				13	1			
Tumorectomía	68	49,3	20	0,86	0,47	1,58	0,62	11	0,94	0,40	2,20	0,88
Grado post	81						0,06					0,005
I y II	54	66,7	15	1				6	1			
III	27	33,3	15	1,99	0,97	4,08	0,06	12	4,45	1,56	12,72	0,005
Ki67 post	56						0,20					0,14
< 30 %	49	87,5	15	1				9	1			
>= 30%	7	12,5	4	2,08	0,68	6,32	0,20	3	2,69	0,71	10,17	0,14

8.2 Resultados Estudio Epigenético

8.2.1 Análisis de perfiles epigenéticos por tecnología de microarray

Para realizar el análisis de perfiles epigenéticos mediante tecnología de microarrays, partimos de dos cohortes. La primera era una cohorte de pacientes de cáncer de mama seleccionadas a partir de las 138 incluidas en nuestro estudio, triple negativas, con las características que se detallan en el siguiente apartado (1.2.1.1), y denominada cohorte “discovery” ICO. La segunda estaba formada por pacientes seleccionadas de la cohorte BRCA (“Breast Cancer”) del TCGA (“The Cancer Genome Atlas”), denominada cohorte “discovery” TCGA.

8.2.1.1 Cohorte “discovery” ICO

Se seleccionó el subgrupo de pacientes triple negativas (N=44), para realizar el análisis de perfiles epigenéticos por tecnología microarray, que formarían la cohorte “discovery” ICO.

Se dividió a estas pacientes en dos subgrupos, en función de si habían obtenido o no RCp (definida como ypT0/isN0). Dieciocho (40,9%) pacientes obtuvieron RCp y 26 (59,1%) no obtuvieron una RCp. Dentro del subgrupo que no habían obtenido RCp, se seleccionó a aquellas que, como mejor respuesta, habían obtenido una enfermedad estable o una progresión de la enfermedad tras el tratamiento con quimioterapia neoadyuvante.

Tras realizar la extracción de ADN, se detectó que el material obtenido era de calidad insuficiente para poder realizar la generación de los perfiles de metilación de ADN por tecnología de microarray; motivo por el que se prosiguió únicamente con la cohorte “discovery” TCGA, como se detalla en el siguiente apartado.

Sin embargo, teniendo en cuenta la calidad insuficiente del material genético extraído de la cohorte ICO, ésta se utilizó y se incluyó como cohorte de validación para el análisis por pirosecuenciación, una técnica dirigida para el análisis de la metilación del ADN de genes particulares, que no requiere de tanto material ni de tanta calidad como la tecnología microarray. Mediante esta técnica, fueron validados los biomarcadores epigenéticos seleccionados del análisis de microarrays de metilación de ADN, previamente realizado en la cohorte “discovery” TCGA.

8.2.1.2 Cohorte "discovery" TCGA procedente de datos públicos

Ante la falta de calidad para poder realizar el análisis de microarray de la cohorte "discovery" ICO, se decidió utilizar como set "discovery" los datos de metilación procedentes de una cohorte de cáncer de mama procedente de datos públicos. Se utilizó un set de pacientes de la cohorte de cáncer de mama "BRCA" del repositorio "The Cancer Genome Atlas" (TCGA; www.cancergenome.nih.gov),

de la que se dispone de datos moleculares, tanto genómicos como epigenómicos, así como de información clínica asociada, con características similares a las de la base de datos de la cohorte ICO.

Los criterios de selección para las muestras de TCGA fueron los siguientes:

- 1) Se seleccionaron grupos de pacientes homogéneos; pacientes diagnosticadas de cáncer de mama localizado tratadas con antraciclinas y/o taxanos de forma neoadyuvante.
- 2) Se dividieron a las pacientes en dos grupos, en función de la obtención de respuesta completa patológica; denominado grupo CR (Complete Response) o no respuesta (estabilización o progresión), denominado NR (No Response), descartando las respuestas parciales para realizar un análisis comparativo de grupos extremos.

Las muestras de las pacientes seleccionadas se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6. Muestras seleccionadas de la cohorte BRCA del TCGA para el análisis de biomarcadores

Sample Name	Project	Site Primary	Type	Treatment	Treatment Response
TCGA-A2-A3XS-01A	BRCA	Breast	Infiltrating Ductal Carcinoma	Anthracyclines	CR
TCGA-A2-A3XW-01A	BRCA	Breast	Infiltrating Ductal Carcinoma	Anthracyclines	CR
TCGA-A2-A3XX-01A	BRCA	Breast	Infiltrating Ductal Carcinoma	Anthracyclines	CR
TCGA-A2-A3XY-01A	BRCA	Breast	Infiltrating Ductal Carcinoma	Anthracyclines	CR
TCGA-A2-A0CR-01A	BRCA	Breast	Infiltrating Lobular Carcinoma	Anthracyclines	CR
TCGA-A2-A0EP-01A	BRCA	Breast	Infiltrating Lobular Carcinoma	Anthracyclines	CR
TCGA-A7-A4SA-01A	BRCA	Breast	Infiltrating Lobular Carcinoma	Anthracyclines	CR
TCGA-AC-A2QH-01A	BRCA	Breast	Metaplastic Carcinoma	Anthracyclines	CR
TCGA-E9-A1N6-01A	BRCA	Breast	Infiltrating Ductal Carcinoma	Anthracyclines	NR
TCGA-D8-A3Z6-01A	BRCA	Breast	Infiltrating Lobular Carcinoma	Anthracyclines	NR
TCGA-GM-A3NW-01A	BRCA	Breast	Infiltrating Lobular Carcinoma	Anthracyclines	NR
TCGA-MS-A51U-01A	BRCA	Breast	Infiltrating Lobular Carcinoma	Anthracyclines	NR
TCGA-AC-A2QJ-01A	BRCA	Breast	Metaplastic Carcinoma	Anthracyclines	NR
TCGA-BH-A0C3-01A	BRCA	Breast	Mixed Histology	Anthracyclines	NR
TCGA-A7-A4SD-01A	BRCA	Breast	Infiltrating Ductal Carcinoma	Taxanes	CR
TCGA-A7-A5ZW-01A	BRCA	Breast	Infiltrating Ductal Carcinoma	Taxanes	CR
TCGA-E9-A227-01A	BRCA	Breast	Infiltrating Ductal Carcinoma	Taxanes	CR
TCGA-GM-A2DB-01A	BRCA	Breast	Infiltrating Ductal Carcinoma	Taxanes	CR
TCGA-GM-A2DI-01A	BRCA	Breast	Infiltrating Ductal Carcinoma	Taxanes	CR
TCGA-OL-A66P-01A	BRCA	Breast	Infiltrating Ductal Carcinoma	Taxanes	CR
TCGA-OL-A6VO-01A	BRCA	Breast	Infiltrating Ductal Carcinoma	Taxanes	CR
TCGA-A7-A4SB-01A	BRCA	Breast	Infiltrating Lobular Carcinoma	Taxanes	CR
TCGA-A8-A08O-01A	BRCA	Breast	Infiltrating Ductal Carcinoma	Taxanes	NR
TCGA-EW-A1OY-01A	BRCA	Breast	Infiltrating Ductal Carcinoma	Taxanes	NR
TCGA-EW-A1P3-01A	BRCA	Breast	Infiltrating Ductal Carcinoma	Taxanes	NR
TCGA-EW-A2FR-01A	BRCA	Breast	Infiltrating Ductal Carcinoma	Taxanes	NR
TCGA-LD-A74U-01A	BRCA	Breast	Infiltrating Ductal Carcinoma	Taxanes	NR
TCGA-LD-A7W5-01A	BRCA	Breast	Metaplastic Carcinoma	Taxanes	NR

Una vez seleccionadas las muestras, se les realizó el control de calidad, con la finalidad de confirmar que las muestras habían estado correctamente hibridadas y eran de suficiente calidad según los controles internos definidos. Asimismo, que no presentaran ningún sesgo debido a la metodología. Tal y cómo se muestra en la Figura 16 y Figura 17, las muestras pasaron el control de calidad y no presentaron sesgos; por lo que se consideraron resultados fiables para poder proceder con el análisis de las mismas.

Figura 16. Gráfico representativo del control interno de calidad de la hibridación. Todas las muestras superaron el control de calidad (círculos negros). Los ejes representan la intensidad de los fluorocromos para la condición de metilado y no metilado en escala logarítmica.

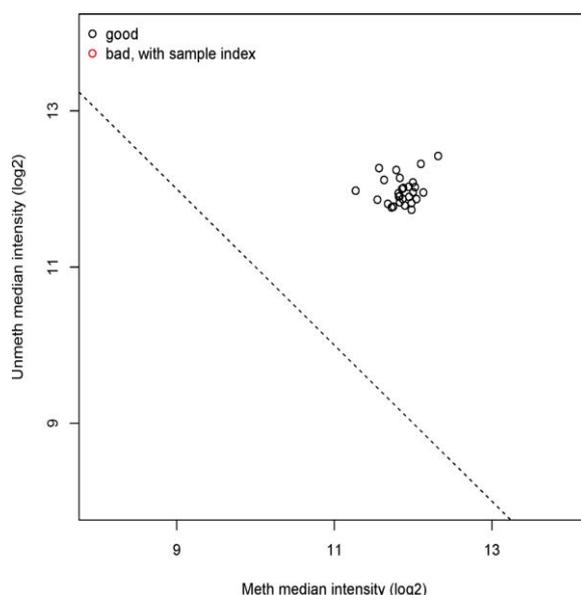
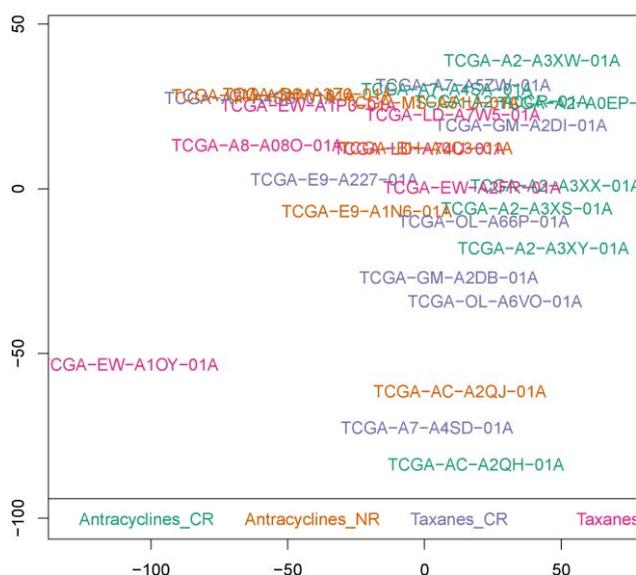


Figura 17. Gráfico del Escalamiento multidimensional (MDS: “Scaling plot multidimensional”). Se verifica que no hay un sesgo en ninguno de los grupos de muestras. El escalamiento multidimensional reduce los ejes del array (500.000) y los simplifica a dos ejes: componente 1 y componente 2. Se demuestra que no hay sesgo de distribución entre los diferentes grupos. Cada muestra se representa en un color diferente.



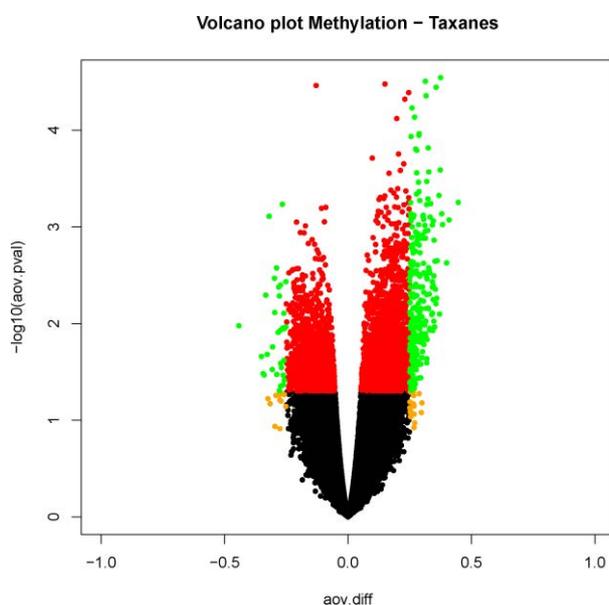
8.2.1.3 Identificación de biomarcadores de respuesta a taxanos

El primer análisis se realizó con las muestras de la cohorte “discovery” TCGA, considerando pacientes tratadas con taxanos como quimioterapia neoadyuvante: 6 muestras eran de pacientes que no habían respondido al tratamiento (NR); se detectaron varias muestras de pacientes que habían obtenido RCp (CR), pero finalmente se seleccionaron de forma aleatoria 8 muestras, con la finalidad de tener dos grupos con una cantidad balanceada de pacientes en ambos grupos para poder ser comparados.

Para seleccionar las posiciones CpG relacionadas con la respuesta a taxanos, se tuvieron en cuenta las siguientes premisas (Figura 18):

- Posiciones CpG diferencialmente metiladas entre el grupo de pacientes con RCp (CR) y el grupo de no respondedoras a taxanos, con significación estadística según función ANOVA ($\text{aov.pval} \leq 0,05$); y que además fueran biológicamente relevantes, con una diferencia de valores de metilación entre los grupos de al menos el 25% ($\text{aov.dif} \geq 25\%$).
- Sólo se tuvieron en cuenta posiciones CpG localizadas en la zona promotoras de genes, para poder ser posteriormente relacionadas con la expresión génica.
- Selección de genes cuya metilación afectara directamente a la expresión de los mismos. Esta selección tenía a la vez la finalidad de poder validar con posterioridad la expresión de los mismos mediante técnicas de inmunohistoquímica, con el fin de detectar la expresión de proteína.

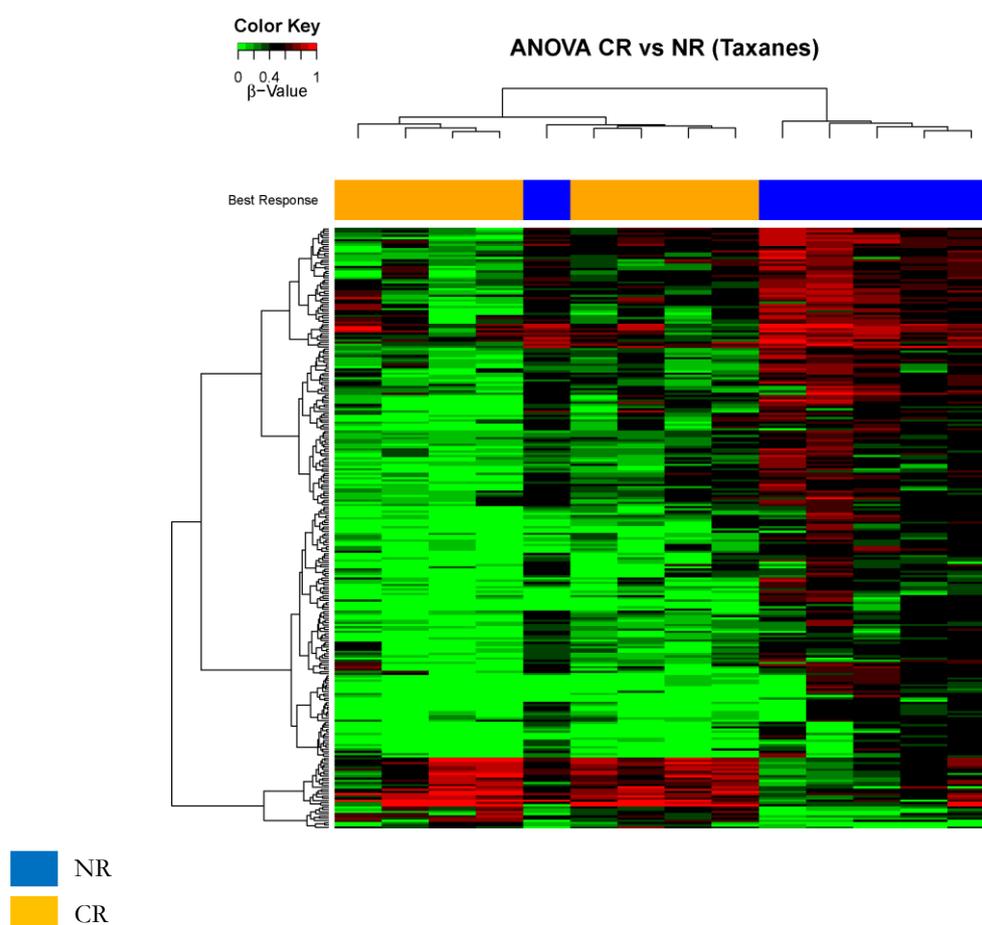
Figura 18. Resultado del análisis de varianza (ANOVA) para el grupo de pacientes tratadas con taxanos. Los puntos de color verde representan las 270 CpGs seleccionadas, por ser estadísticamente significativas ($\text{aov.pval} \leq 0,05$) y ser biológicamente relevantes ($\text{aov.dif} \geq 25\%$). Los puntos de color rojo representan las CpGs cuyas diferencias entre CR y NR eran estadísticamente significativas ($\text{aov.pval} \leq 0,05$), pero no eran biológicamente relevantes ($\text{aov.dif} < 25\%$). Los puntos de color negro representan las islas CpGs que no eran estadísticamente significativas ($\text{aov.pval} > 0,05$) y tampoco eran biológicamente relevantes ($\text{aov.dif} < 25\%$). Los puntos de color naranja representan las CpGs que no eran estadísticamente significativas ($\text{aov.pval} > 0,05$), pero que hubieran podido ser biológicamente relevantes ($\text{aov.dif} \geq 25\%$).



En la Figura 18 se observa la distribución de las posiciones CpGs analizadas, según el p-valor derivado de la función ANOVA y las diferencias de metilación entre grupos de pacientes (CR vs NR). Las CpGs de color rojo, negro y naranja son aquellas que no cumplen los criterios de selección. Las de color verde son aquellas CpGs que en el análisis de ANOVA cumplen los dos criterios: son estadísticamente significativos ($aov.pval \leq 0,05$); y que además eran biológicamente relevantes; con una diferencia entre los grupos de respondedoras y no respondedoras significativo ($aov.dif \geq 25\%$).

Se determinaron 270 posiciones CpGs que cumplían los criterios, la representación de las cuales se muestra en el *heatmap* de la Figura 19. En Anexo 1 se detallan una muestra de las CpGs seleccionadas.

Figura 19. *Heatmap* representativo de las posiciones CpG situadas en zonas promotoras con diferencias de metilación estadísticamente significativas y con relevancia biológica ($aov.pval \leq 0,05$ y $aov.dif \geq 25\%$), ordenadas por "hierarchical clustering". El nivel de metilación se representa en una gradación de colores, siendo el verde hipometilación y el rojo hipermetilación. Subgrupo de pacientes cohorte TCGA tratadas con taxanos



Las 270 CpGs seleccionadas previamente, se encuentran en zonas promotoras y son capaces de discriminar entre los dos subgrupos de muestras: respondedoras (CR) y no respondedoras (NR), como se aprecia en la Figura 19. Existe una muestra no respondedora (representada en azul), entre las respondedoras (representadas en naranja), que no se han distribuido exactamente; pero se

considera que el porcentaje es mínimo y que la distribución de las muestras es representativa. Las muestras CpGs metiladas se representan en color rojo, y las no metiladas en color verde.

Se realizó el análisis ontológico de los genes en los que se encuentran las 270 posiciones CpGs seleccionadas, con el fin de valorar las vías implicadas en la eficacia del tratamiento con taxanos. Los cambios de metilación estaban básicamente relacionados con genes que intervienen en procesos biológicos; componentes celulares (complejo de unión al factor de crecimiento de la insulina); funciones moleculares (actividad del factor e transcripción, unión al ADN, factor de crecimiento vinculante, actividad reguladora de la transcripción, etc.) y vías de señalización (transición epitelio mesénquima, señalización de carcinoma de células basales, pluripotencia células madre embrionarias de mamífero, etc.) como se muestra en el Anexo 2.

Posteriormente se procedió a seleccionar un set de genes como candidatos para ser posteriormente analizados en la cohorte de validación (cohorte ICO) por técnicas de pirosecuenciación.

Se consideraron aquellos genes que a) incluyeran al menos dos posiciones CpGs diferencialmente metiladas ($\text{aov.pval} \leq 0,05$ y $\text{aov.dif} \geq 25\%$) en la zona promotora; b) que los valores de metilación en las CpGs se correlacionaran negativamente con los valores de expresión de ARN, extraídos del análisis por RNAseq disponibles en el portal TCGA (correlación metilación-expresión mediante el test de Pearson, con $\text{p-valor} < 0,05$), puesto que la metilación regula la expresión de ARN; y c), que las diferencias de expresión entre el grupo CR y NR fueran también estadísticamente significativas (T-test; $\text{p-valor} \leq 0,05$).

Los tres genes que mejor cumplían estos criterios y que, por tanto, se consideraron candidatos a ser biomarcadores fueron los genes que codifican para: Atonal BHLH Transcription Factor 8 (ATOH8) (Figura 20) Inhibitor of DNA Binding 1 (ID1) (Figura 21) y la molécula CD74 (CD74) (Figura 8).

En el caso del gen *ATOH8*, se seleccionaron dos posiciones CpGs (cg24399924 y cg01472882) que cumplían las características previamente mencionadas (Figura 20). Otras dos posiciones CpGs seleccionadas fueron cg09923107 y cg00494337 que se encontraban en el gen *ID1*, ambas cumpliendo los criterios de selección previamente descritos, tal y cómo se aprecia en la Figura 21.

Figura 20. Representación gráfica de los resultados para *ATOH8*. En el panel izquierdo se representa la correlación de los niveles de metilación (eje X) y de expresión (eje Y) para las posiciones CpG seleccionadas. El coeficiente de correlación se representa como R. En el panel central se muestra los niveles de expresión en función de los dos grupos (CR y NR). En el panel de la izquierda se representan los niveles de metilación según los grupos de estudio (CR y NR).

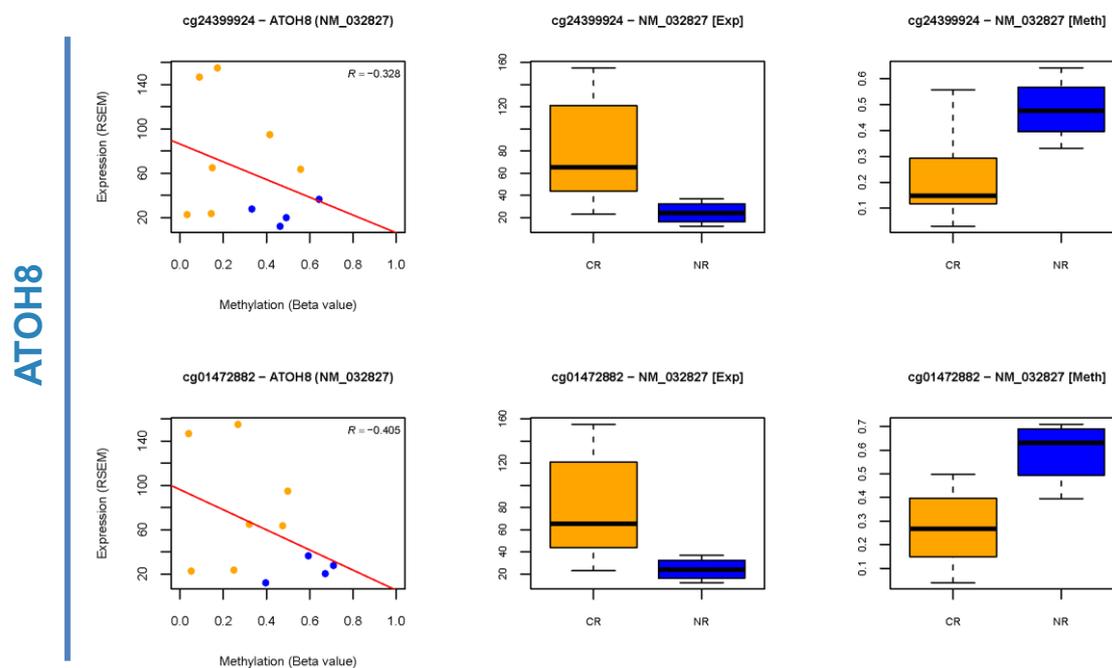
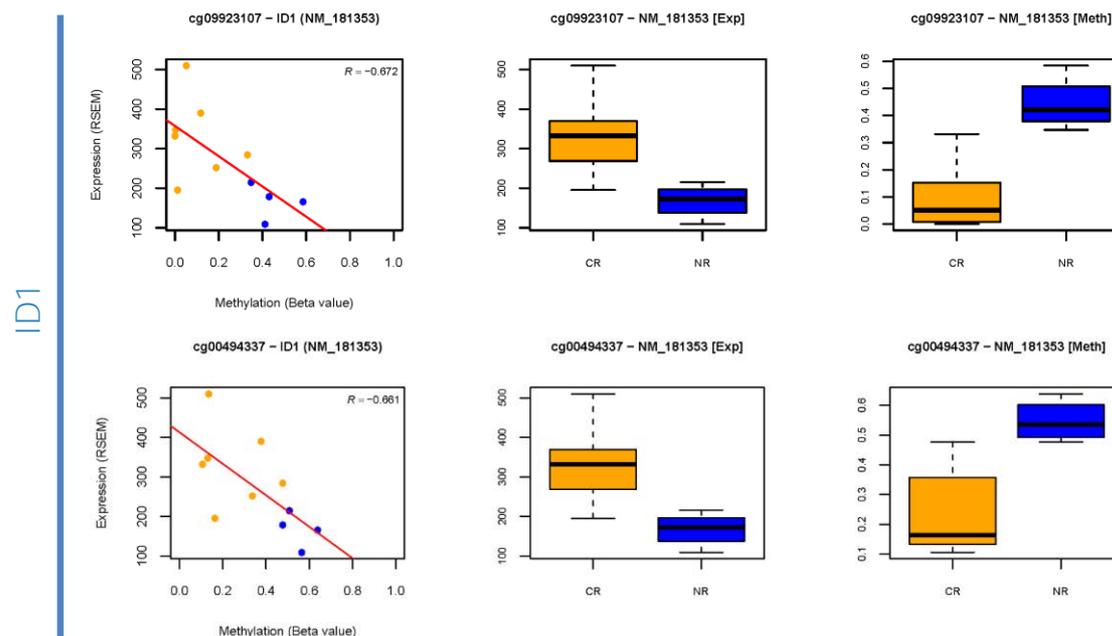
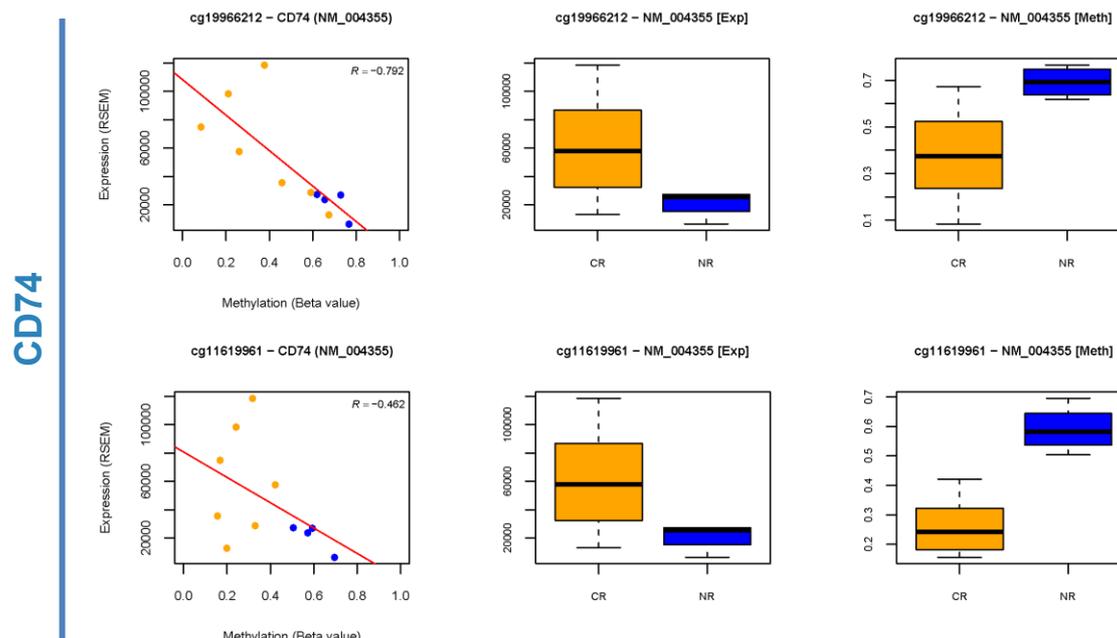


Figura 21. Representación gráfica de los resultados para *ID1*. En el panel izquierdo se representa la correlación de los niveles de metilación (eje X) y de expresión (eje Y) para las posiciones CpG seleccionadas. El coeficiente de correlación se representa como R. En el panel central se muestra los niveles de expresión en función de los dos grupos (CR y NR). En el panel de la izquierda se representan los niveles de metilación según los grupos de estudio (CR y NR).



Finalmente el tercer gen seleccionado fue *CD74*, cuyas posiciones CpGs que cumplían los requisitos mencionados fueron cg19966212 y cg11619961 (Figura 22).

Figura 22. Representación gráfica de los resultados para *CD74*. En el panel izquierdo se representa la correlación de los niveles de metilación (eje X) y de expresión (eje Y) para las posiciones CpG seleccionadas. El coeficiente de correlación se representa como R. En el panel central se muestra los niveles de expresión en función de los dos grupos (CR y NR). En el panel de la izquierda se representan los niveles de metilación según los grupos de estudio (CR y NR).



8.2.1.4 Identificación de biomarcadores de respuesta a antraciclinas

Siguiendo en la misma línea, y teniendo en cuenta las mismas premisas, se realizó la selección de genes candidatos para muestras de pacientes tratadas con antraciclinas de la cohorte “discovery” TCGA.

El resultado del análisis de varianza (ANOVA) para seleccionar las posiciones CpGs que mostraran diferencias de metilación estadísticamente significativas entre el grupo de respondedoras (CR) y de no respondedoras (NR) se muestra representado en la Figura 23. Se seleccionaron 701 CpGs diferencialmente metiladas, que presentaban diferencias estadísticamente significativas ($aov.pval \leq 0,05$) y que éstas eran biológicamente relevantes (diferencias de valores de metilación entre grupos al menos del 25%; $aov.dif \geq 25\%$). En el Anexo 1 se detalla como ejemplo una muestra de las CpG seleccionadas para los taxanos; en el caso de las antraciclinas se utilizó la misma metodología. En la Figura 24, se aprecia la distribución por *hierarchical clustering* entre las pacientes del grupo CR y NR, según el estado de metilación (color verde hipometilación y color rojo hipermetilación de un grupo respecto del otro) de las posiciones CpGs en zona promotora seleccionadas.

Figura 23. Volcano plot. Representativo del resultado del análisis de varianza (ANOVA) para el grupo de pacientes de la cohorte "Discovery" TCGA tratadas con antraciclinas. Los puntos de color verde representan las 701 CpGs seleccionadas, por ser estadísticamente significativas ($aov.pval \leq 0,05$) y ser biológicamente relevantes ($aov.dif \geq 25\%$). Los puntos de color rojo representan las CpGs cuyas diferencias entre CR y NR eran estadísticamente significativas ($aov.pval \leq 0,05$), pero no eran biológicamente relevantes ($aov.dif < 25\%$). Los puntos de color negro representan las islas CpGs que no eran estadísticamente significativas ($aov.pval > 0,05$) y tampoco eran biológicamente relevantes ($aov.dif < 25\%$). Los puntos de color naranja representan las CpGs que no eran estadísticamente significativas ($aov.pval > 0,05$), aunque hubieran podido ser biológicamente relevantes ($aov.dif \geq 25\%$).

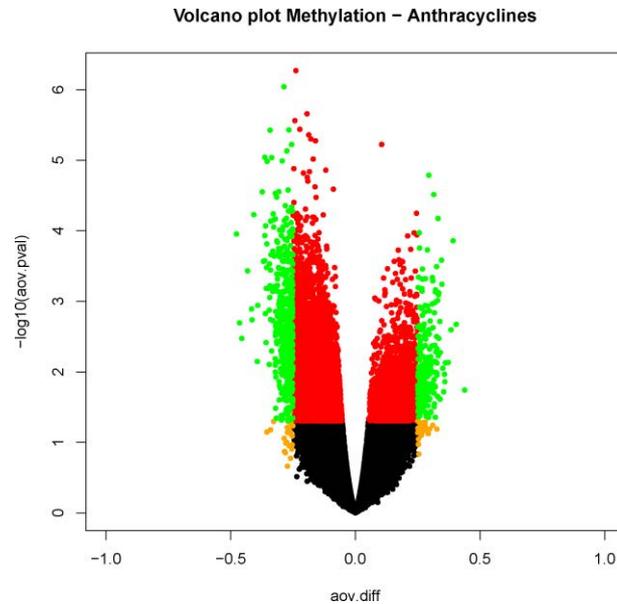
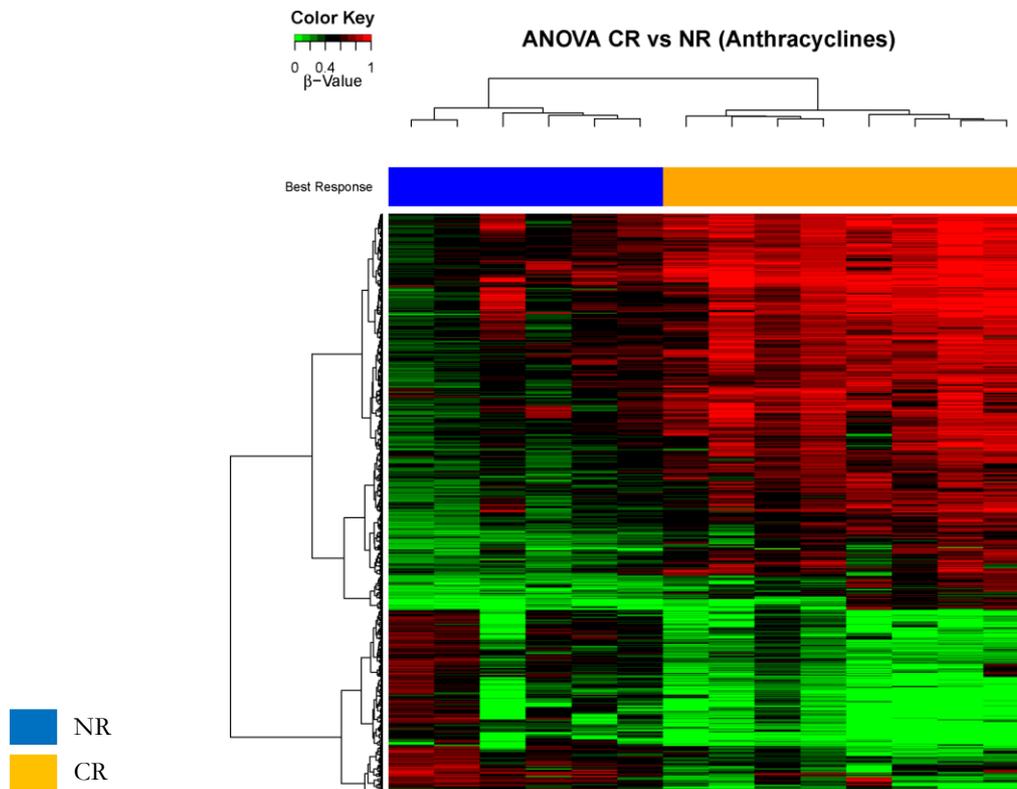


Figura 24. *Heatmap* representativo de posiciones CpG con diferencias de metilación estadísticamente significativas en la zona promotora ($aov.pval \leq 0.05$ y $aov.dif \geq 25\%$), ordenadas por "hierarchical clustering". El nivel de metilación se representa en una gradación de colores, siendo el verde hipometilación y el rojo hipermetilación. Subgrupo de pacientes tratadas con antraciclinas



Asimismo, se realizó el análisis por ontología génica teniendo en cuenta los genes que contienen las CpGs seleccionadas, para determinar la relación de la respuesta a antraciclinas con las diferentes vías celulares Anexo 3. Los cambios de metilación estaban básicamente relacionados con genes que intervienen en procesos biológicos (adhesión celular, regulación del metabolismo, regulación de la glicólisis, etc.); componentes celulares (complejo de unión al factor de crecimiento de la insulina, complejo de ribonucleico, sinapsis, etc.); funciones moleculares (unión de la tubulina, unión de los iones de calcio, etc.) y vías de señalización (señales de crecimiento hormono-dependientes o señalización PAK, relacionada con la resistencia adquirida a los inhibidores de BRAF y MEK)

Siguiendo los criterios de selección descritos en el caso de la respuesta a taxanos, se seleccionaron 9 posiciones CpG, que correspondían a 4 genes candidatos a ser biomarcadores: Homeobox B2 (*HOXB2*) (Figura 25); Protein Phosphatase 1 Regulatory Inhibitor Subunit 14^a (*PPP1R14A*) (Figura 26); Family With Sequence Similarity 198 Member B (*FAM198B*) (Figura 27); Protocadherin Beta 12 (*PCDHB12*) (Figura 28); En el primer caso, tres CpGs: cg26841048, cg22777724 y cg24170465 se encontraban en el promotor de *HOXB2* (Figura 25) y cumplían con las características previamente descritas.

El segundo gen es el *PP1R14A*; y se seleccionaron las islas CpGs cg22557662 y cg02571816 (Figura 26).

El tercer gen seleccionado es el *FAM198B*; siendo las posiciones cg03450635 y cg24170465 las que cumplían los criterios (Figura 27)

Por último, para el cuarto gen seleccionado (*PCDHB12*), las posiciones CpG que cumplían con los requisitos establecidos previamente fueron cg15548198 y cg17007628 (Figura 28).

Figura 25. Representación gráfica de los resultados para *HOXB2*. En el panel izquierdo se representa la correlación de los niveles de metilación (eje X) y de expresión (eje Y) para las posiciones CpG seleccionadas. El coeficiente de correlación se representa como R. En el panel central se muestra los niveles de expresión en función de los dos grupos (CR y NR). En el panel de la izquierda se representan los niveles de metilación según los grupos de estudio (CR y NR).

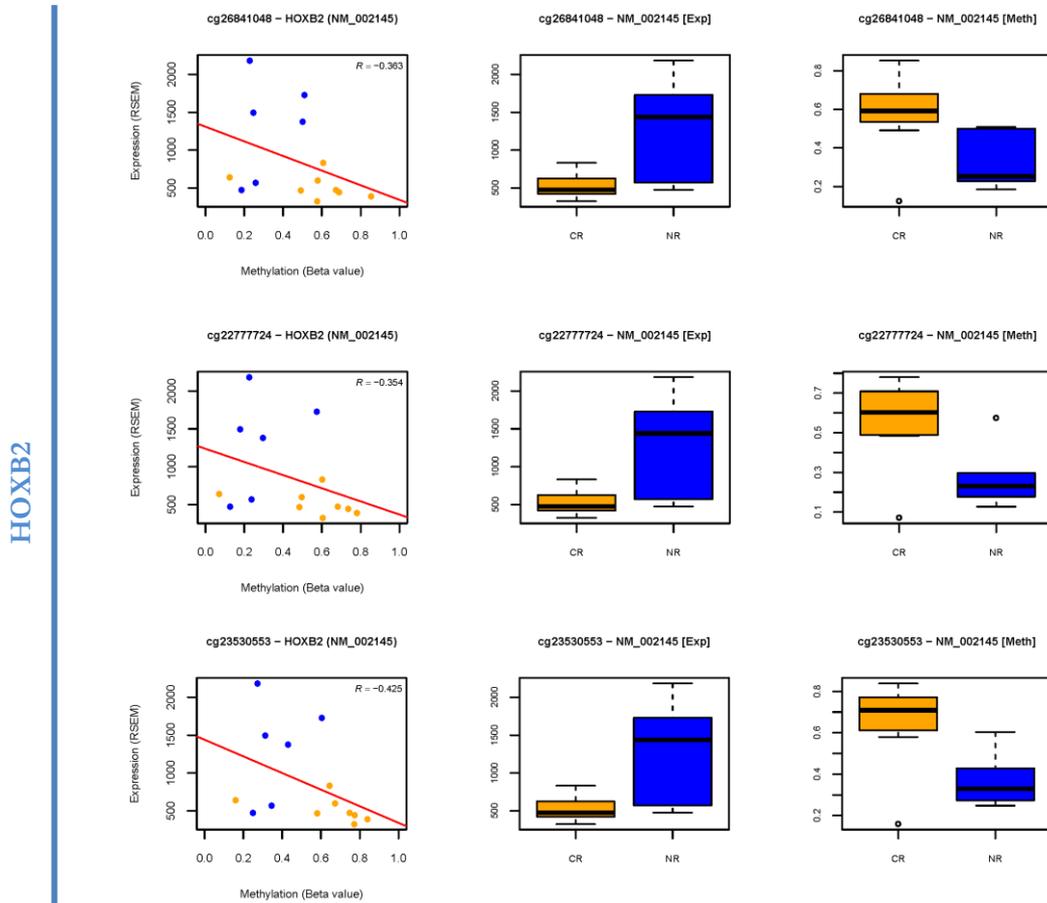


Figura 26. Representación gráfica de los resultados para *PPP1R14A*. En el panel izquierdo se representa la correlación de los niveles de metilación (eje X) y de expresión (eje Y) para las posiciones CpG seleccionadas. El coeficiente de correlación se representa como R. En el panel central se muestra los niveles de expresión en función de los dos grupos (CR y NR). En el panel de la izquierda se representan los niveles de metilación según los grupos de estudio (CR y NR).

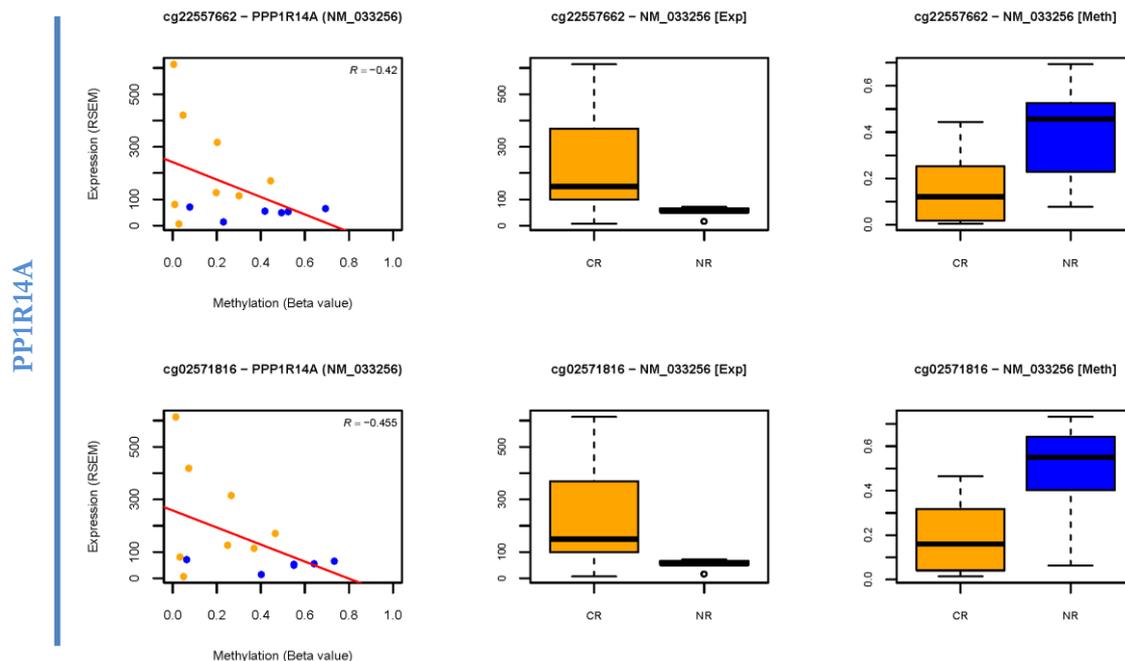


Figura 27. Representación gráfica de los resultados para *FAM198B*. En el panel izquierdo se representa la correlación de los niveles de metilación (eje X) y de expresión (eje Y) para las posiciones CpG seleccionadas. El coeficiente de correlación se representa como R. En el panel central se muestra los niveles de expresión en función de los dos grupos (CR y NR). En el panel de la izquierda se representan los niveles de metilación según los grupos de estudio (CR y NR).

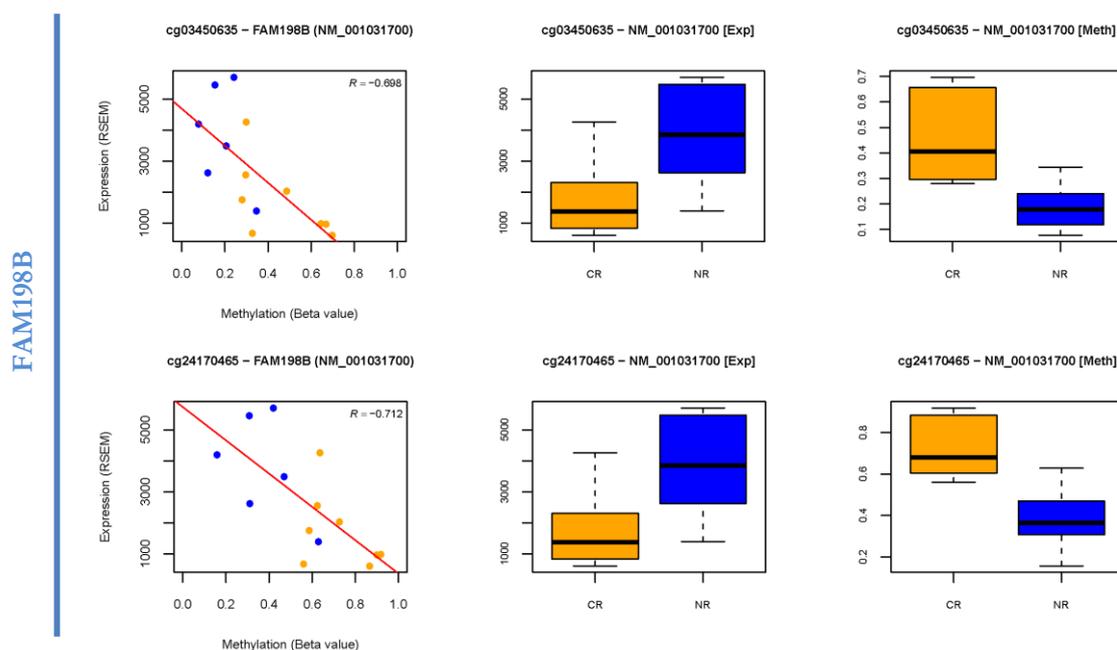
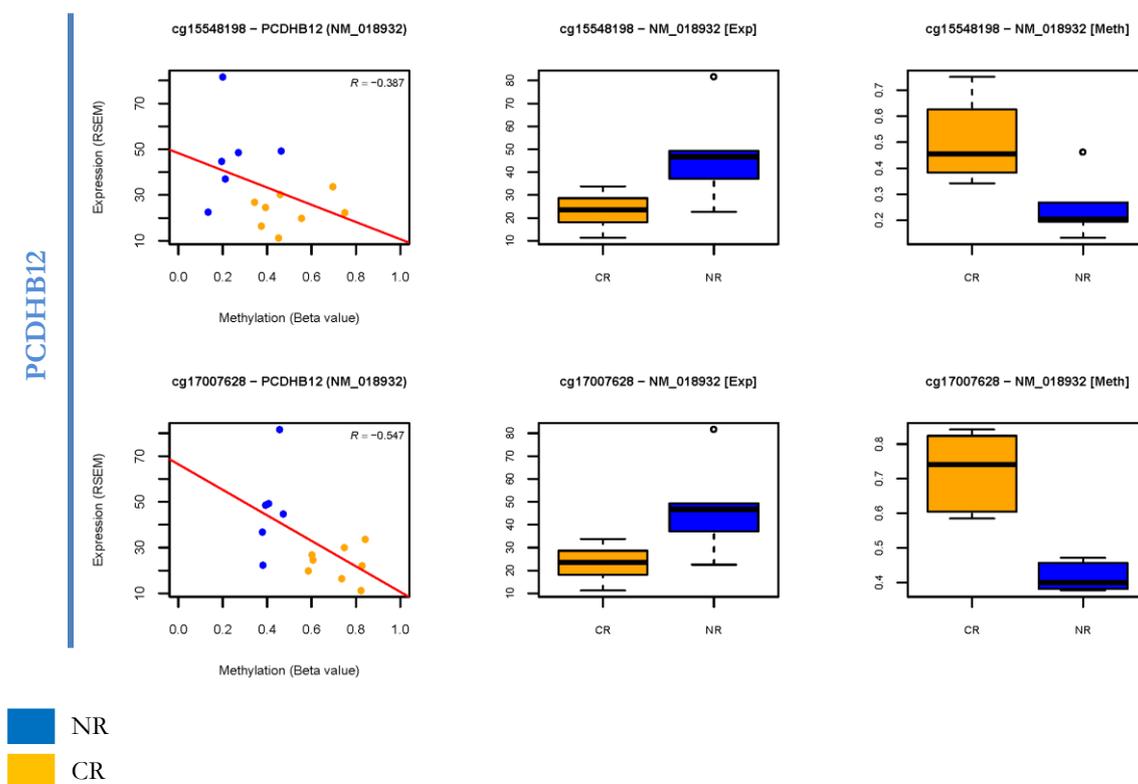


Figura 28. Representación gráfica de los resultados para *PCDHB12*. En el panel izquierdo se representa la correlación de los niveles de metilación (eje X) y de expresión (eje Y) para las posiciones CpG seleccionadas. El coeficiente de correlación se representa como R. En el panel central se muestra los niveles de expresión en función de los dos grupos (CR y NR). En el panel de la izquierda se representan los niveles de metilación según los grupos de estudio (CR y NR).

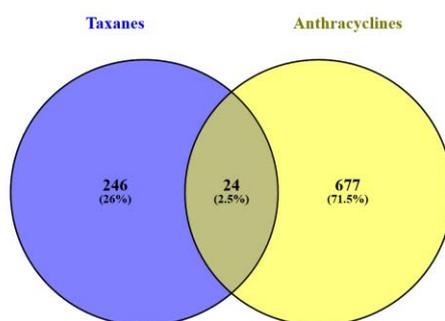


8.2.1.5 Relación entre diferencias de metilación y respuesta en ambos tratamientos en la cohorte TCGA

Se evaluó el solapamiento entre las CpGs seleccionadas para los dos subgrupos de pacientes (tratadas con antraciclinas vs tratadas con taxanos) Figura 29. Para ello, se utilizaron las CpGs previamente seleccionadas, y se observó que había 24 (2,5%) CpGs comunes para ambos grupos; de éstas una CpG (cg01472882) formaba parte de uno de los genes seleccionados (*ATOH8*).

A pesar del hallazgo de las CpGs comunes, no se realizó el análisis de las mismas puesto que no cumplían con los requisitos de selección que se habían predeterminado previamente.

Figura 29. Overlap CpGs. Subgrupo de pacientes cohorte “Discovery” TCGA tratadas con antraciclinas y taxanos



8.2.2 Análisis de validación de biomarcadores seleccionados por técnicas de pirosecuenciación

Una vez seleccionados los genes candidatos, tal y como se especifica en el apartado anterior, se prosiguió con la elaboración de los cebadores o *primers*, para realizar la pirosecuenciación en las muestras seleccionadas de la cohorte “discovery” ICO Badalona, utilizada finalmente como cohorte de validación.

Se diseñaron dos *primers* para cada uno de los genes, con el fin de obtener el amplicón de secuenciación mediante amplificación por PCR. También se diseñó para cada gen, un *primer* de secuenciación para la determinación del estado de metilación por pirosecuenciación. En el Anexo 4 se detalla la descripción de la elaboración de los *primers* y la puesta a punto de las PCR.

Tras la puesta a punto de los *primers* y la PCR, se consiguió de forma efectiva disponer de resultados de pirosecuenciación para los genes *ATOH8*, *ID1* y *HOXB2*.

En el caso del gen *CD74*, se consiguió amplificación de la banda en muestras de ADN de alta calidad (controles basados en líneas celulares), pero no se consiguió amplificación en las muestras de tejido parafinado. Este resultado puede explicarse porque el diseño de *primers* de este gen daba lugar a un amplicón de un gran tamaño (246 pares de bases) para ser usado en ADN procedente de muestras parafinadas, donde el material estaba muy degradado y fragmentado. Por tanto, la amplificación no se podía llevar a cabo en estas muestras. No se pudieron diseñar *primers* específicos para obtener amplicones más cortos. Por tanto para el gen *CD74* no se disponen de resultados de pirosecuenciación.

En el caso del gen *FAM198B* no se podrá disponer de los resultados de pirosecuenciación, pues no se pudo amplificar la banda. Se realizaron pruebas con diferentes condiciones de PCR (T_m °C: 59, 57 hasta 54) sin éxito. Asimismo para los genes *PP1R14A* y *PCDHB12* se consiguió realizar la amplificación pero de forma inespecífica, obteniendo un perfil de bandas en el que no se podía discriminar la banda específica. Por este motivo, no pudieron ser evaluados.

En el Anexo 4 se muestra un ejemplo de los resultados del gel de agarosa para la realización del análisis de la amplificación de las bandas.

8.2.3 Correlación de los biomarcadores epigenéticos candidatos con la respuesta a la terapia y otros parámetros clínicos

Con la finalidad de poder hacer una división de las pacientes en función del estado (porcentaje) de metilación (metiladas vs no metiladas), se estableció un punto de corte para la metilación de cada gen seleccionado, basado en criterios estadístico de división por percentiles.

8.2.3.1 Análisis de resultados para el gen *ID1*

Finalmente, las muestras de la cohorte ICO que se pudieron analizar para el gen *ID1* fueron 59. A continuación (Tabla 7) se detallan las características clínicas de estas muestras.

Tabla 7. Características clínico-patológicas de las muestras seleccionadas para el análisis de pirosecuenciación de *ID1*.

Características clínico-patológicas	N: 59	N	%
Edad (mediana)		48 (rango 24-67)	
Subtipo Histológico			
Carcinoma		8	13,5%
CDI (Carcinoma ductal infiltrante)		49	83%
CLI (Carcinoma lobulillar infiltrante)		2	3,5%
Receptor Estrógeno (RE)			
Negativo (0-4%)		34	57,6%
Positivo (5-100%)		25	42,4%
Receptor Progesterona (RP)			
Negativo (0-4%)		34	57,6%
Positivo (5-100%)		25	42,4%
HER2			
Positivo		9	15,2%
Negativo		50	84,8%
Grado Histológico(pre tratamiento)			
Desconocido		6	10%
I		3	5%
II		36	71%
III		14	24%
Tamaño Tumoral (clínico)			
cT1		1	1,7%
cT2		23	39%
cT3		27	45,7%
cT4		8	13,6%
Estado ganglionar (clínico)			
cN0		18	30,5%
cN1		32	54,2%
cN2		8	13,5%
cN3		1	1,8%
Estadio Clínico			
cIIA		11	18,6%

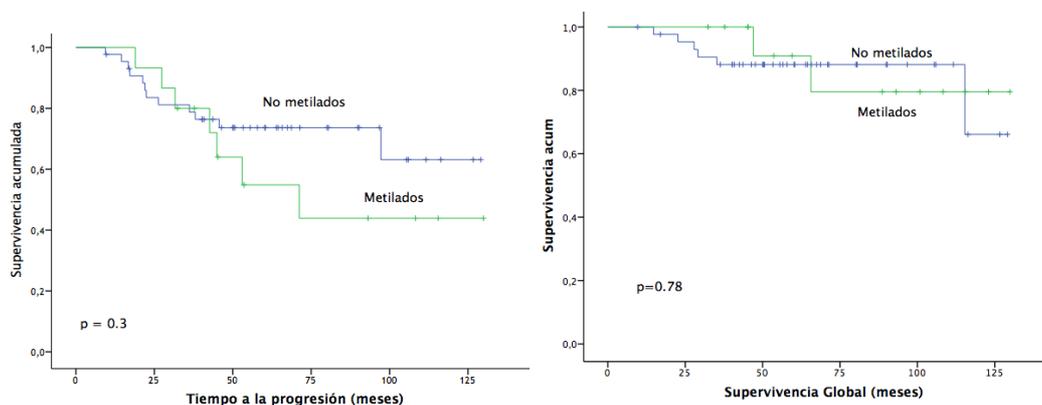
cIIB	9	15,2%
cIIIA	26	44%
cIIIB	12	20,3%
cIIIC	1	1,9%
Subtipo Histológico		
HER2+ enriched	4	6,8%
Luminal A	14	23,7%
Luminal B	13	22%
Luminal B-HER2	5	8,5%
Luminal	1	1,7%
Triple Negativa	22	37,3%
Ki 67 pre tratamiento		
Ki67 <= 15	21	35,6%
Ki67 16-29	9	15,2%
Ki67 >= 30	18	30,5%
Desconocido	11	18,7%

En el caso de *ID1*, para dicotomizar a las pacientes entre *ID1* metiladas y no metiladas se consideró como punto de corte el cuartil 75, correspondiendo este punto a un valor de porcentaje de metilación del 38,5% (ver Anexo 5). Por debajo de este valor se consideró baja metilación (no metiladas), N= 44 y por encima, alto porcentaje de metilación (metiladas), N= 15. Se consideró que un 38,5% de metilación era un porcentaje suficiente para correlacionar con una relevancia biológica a nivel de expresión de proteína.

Se calculó el tiempo a la progresión para el global de las pacientes en función del estado de metilación, no siendo las diferencias estadísticamente significativas ($p=0,3$), pero había una tendencia a mejor supervivencia en las pacientes no metiladas, siendo la SLP de 98 meses para el subgrupo de no metiladas vs 82 meses para las metiladas (Figura 30).

Los resultados de SG no mostraron diferencias entre ambos subgrupos ($p=0,78$).

Figura 30. Resultado de curvas Kaplan-Meier para Tiempo a la Progresión (SLP) y Supervivencia Global (SG) en meses según el estado de metilación del gen *ID1*, para el global de pacientes de la cohorte ICO analizadas. El p-valor fue calculado mediante la función log-rango.



Al estratificar esta población en los subtipos de cáncer de mama (Luminal, HER2 y triple negativa) se observó una distribución diferenciada (estadísticamente significativa) entre estos y el estado de metilación. Se realizó la división de las pacientes en función del estado de metilación del gen ID1 y el subtipo molecular con los siguientes resultados:

Para el subtipo Luminal (Luminal A, Luminal B y Luminal B-HER2), se observó una tendencia de una mayor SLP en el subgrupo de no metiladas (N=19): media de SLP de 110 meses vs 86 meses para las metiladas, (N= 14); $p=0,19$. En el caso de la Supervivencia Global, no se obtuvieron diferencias significativas, a pesar de haber una tendencia a una SG superior en el caso de las pacientes no metiladas (Figura 31).

Cuando en el subgrupo de lumbales no tenemos en cuenta las pacientes Luminal B-HER2, la tendencia es mayor (con una $p= 0,06$), siendo la media de SLP de 101 meses vs 40 meses (no metiladas, N=19; vs metiladas, N=8) (Figura 32).

Figura 31. Resultado de curvas de supervivencia Kaplan-Meier de Tiempo a la Progresión y supervivencia Global (meses) en el subtipo Luminal (Luminal A, Luminal B y Luminal B-HER2), según el estado de metilación de ID1. P-valor calculado mediante la función log-rango.

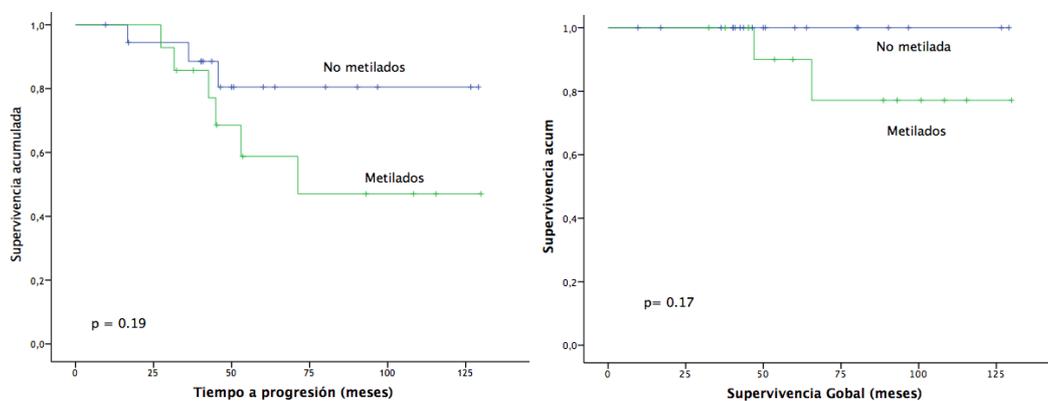
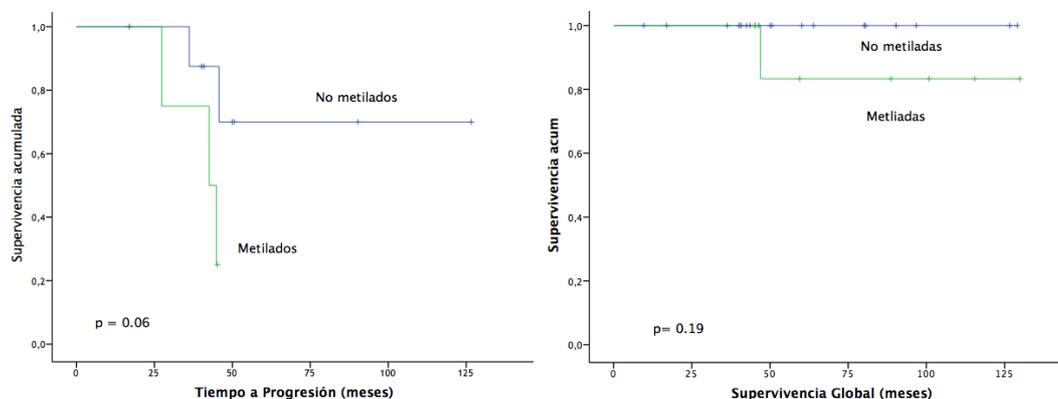


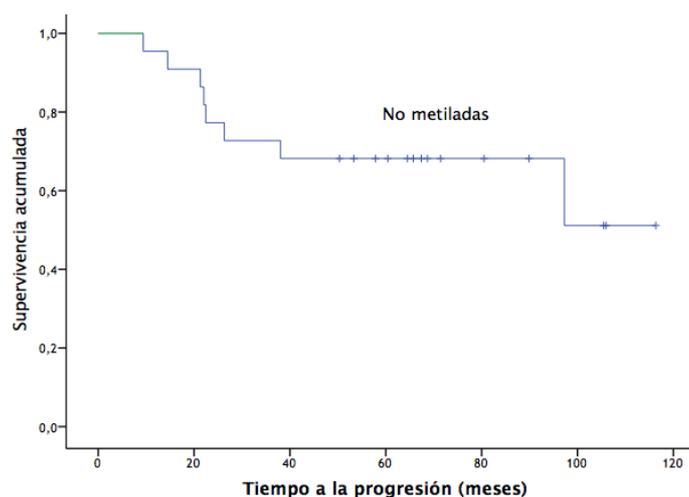
Figura 32. Resultado de curvas de supervivencia Kaplan-Meier de Tiempo a la Progresión y Supervivencia Global (meses), en el subtipo Luminal (Luminal A y Luminal B), según el estado de metilación de *ID1*. P-valor calculado mediante la función log-rango.



En el caso de las pacientes HER2 positivas (definidas como aquellas con receptores hormonales negativos), no se obtuvieron diferencias entre ambos subgrupos de metilación, ya que no pudo ser valorable el resultado por el tamaño muestral (N=4).

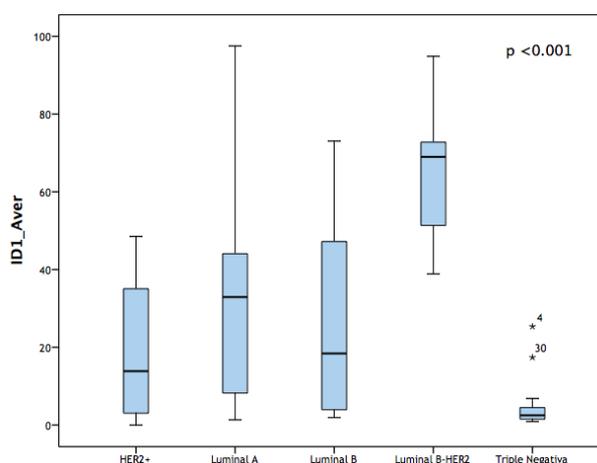
En el subgrupo de pacientes triple negativas, resultó que todas las pacientes (N=22) se clasificaron como no metiladas (Figura 33) con una media de SLP de 83 meses y una mediana SG de 115 meses.

Figura 33. Resultado de curvas de supervivencia Kaplan-Meier de Tiempo a la Progresión (meses) en el subtipo Triple Negativo según el estado de metilación de *ID1*. P-valor no se pudo calcular mediante la función log-rango debido a la no existencia de uno de los brazos a comparar (todos los casos eran no metilados).



Al realizar la comparativa entre los niveles de metilación, de forma no dicotómica (teniendo en cuenta el porcentaje de metilación), y los diferentes subtipos de cáncer de mama en la cohorte ICO, observamos que los tumores triples negativos presentan niveles muy bajos de metilación del gen *ID1*, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) (Figura 34), comparado con el resto de subgrupos.

Figura 34. Distribución del estado de metilación de *ID1* en función de subtipo de cáncer de mama (P-valor obtenido mediante la función de ANOVA). En el eje Y se muestra el porcentaje de metilación del gen *ID1*.



Se realizaron diferentes agrupaciones comparando los diferentes subtipos luminales y HER2 con el subtipo triple negativo, manteniéndose las diferencias estadísticamente significativas (Figura 35): se clasificaron los subtipos en Luminal, HER2 y triple negativa, manteniendo las diferencias, siendo los luminales los que presentaban un perfil de metilación más variable (Figura 36)

Figura 35. Estado de metilación de *ID1* en función de subtipo de cáncer de mama: Luminal A, Luminal B, HER2 y Triple negativo (función de ANOVA). En el eje Y se muestra el porcentaje de metilación del gen *ID1*.

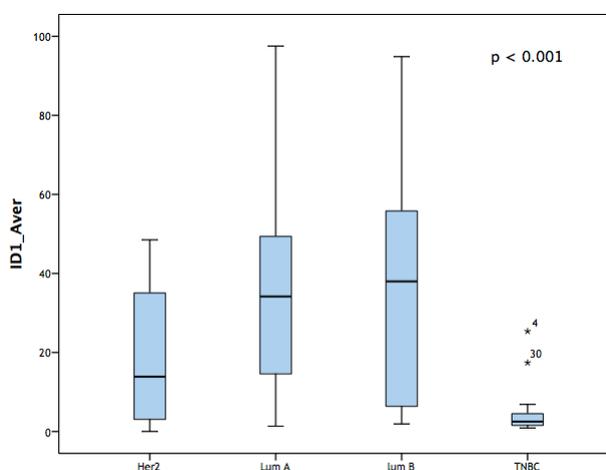
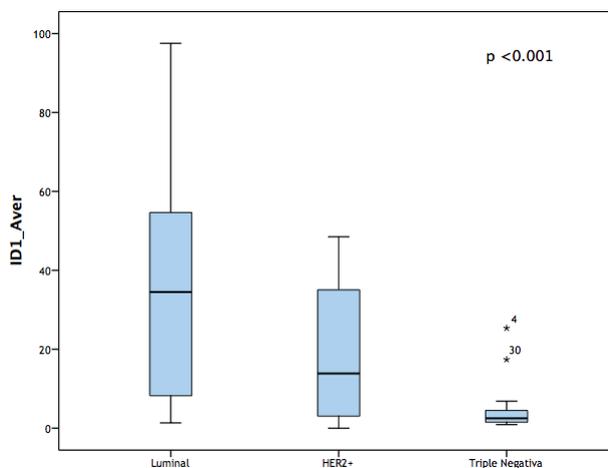
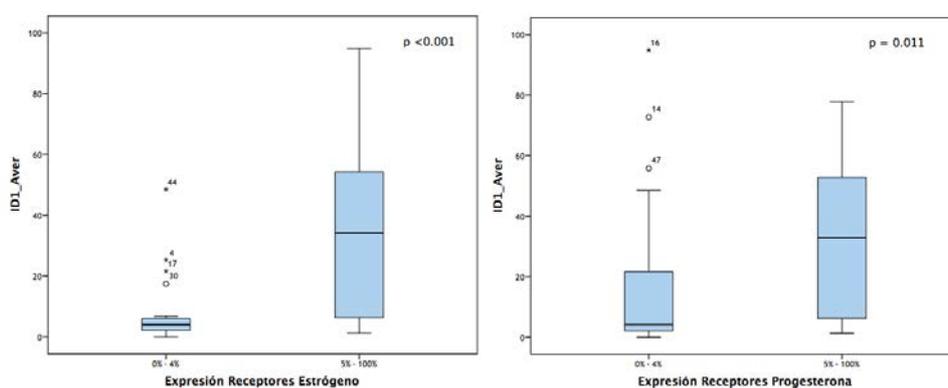


Figura 36. Estado de metilación de *ID1* en función de subtipo de cáncer de mama: Luminal, HER2 y Triple negativo (función de ANOVA). En el eje Y se muestra el porcentaje de metilación del gen *ID1*.



En consonancia con los resultados previos, en el que el subtipo triple negativo presenta muy bajos niveles de metilación de *ID1* (considerados en el grupo de no metilados), al realizar el análisis entre el nivel de la metilación en función de la expresión dicotomizada de receptores de estrógeno, se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$) entre las pacientes con RE + vs aquellas sin expresión (grupo que correlaciona positivamente con los casos triple negativos). Estas diferencias se disminuyen pero siguen siendo significativas cuando la dicotomización se basa en la expresión de receptores de progesterona (Figura 37).

Figura 37. Estado de metilación de *ID1* en función de expresión de receptores de Estrógeno y Progesterona (P-valor calculado mediante la prueba T de Student). En el eje Y se muestra el porcentaje de metilación del gen *ID1*.



En el caso concreto de la obtención de RCp no observamos diferencias estadísticamente significativas para el global de las pacientes en función del estado de metilación de *ID1* ($p = 0,4$).

Se realizó un análisis de asociación entre co-variables clínico-patológicas (mediante la función de Chi-cuadrado o Fisher dependiendo de las características de la tabla de contingencia) en función del estado de metilación de *ID1* tal y como se muestra en la Tabla 8. Se observaron asociaciones estadísticamente significativas del estado de metilación de *ID1* con los subtipos moleculares ($p < 0,001$); con el estado de receptor de estrógeno ($p = 0,02$) y con el estado de HER2 ($p = 0,002$); sino se observó asociación con el resto de características analizadas.

Tabla 8. Análisis de asociación entre co-variables clínico-patológicas en función del estado de metilación de *ID1* (P-valor calculado por función Chi-cuadrado o Fisher dependiendo de las características de la tabla de contingencia).

	Pacientes		Estado metilación				p
	N	%	Metilado	%	No Metilado	%	
Global pacientes	59	100	15	25,4	44	74,6	
Tamaño	59	100					0,71
cT1	1	1,7	0	0,0	1	2,3	
cT2	23	39	7	46,7	16	36,4	
cT3	27	45,8	7	46,7	20	45,5	
cT4	8	13,6	1	6,7	7	15,9	
Estado ganglionar	59	100					0,36
cN0	18	30,5	5	33,3	13	29,5	
cN1	32	54,2	7	46,7	25	56,8	
cN2	8	13,6	2	13,3	6	13,6	
cN3	1	1,7	1	6,7	0	0	
Grado histológico	53	89,8					0,29
I, II	39	73,6	11	84,6	28	70	
III	14	26,4	2	15,4	12	30	
Estado RE	57	96,6					0,02
0% - 4%	33	57,9	1	7,1	20	46,5	
5% - 100%	24	42,1	13	92,9	23	53,5	
Estado RP	57	96,6					0,53
0% - 4%	33	57,9	5	35,7	28	65,1	
5% - 100%	24	42,1	9	64,3	15	34,9	
Estado HER2	59	100					0,002
Positivo	9	15,3	6	40	3	6,8	
Negativo	50	84,7	9	60	41	93,2	
Subtipo molecular	58	98,3	14	24,1	44	14	< 0,001
HER2+	4	6,9	1	7,1	3	6,8	
Luminal A	14	24,1	4	28,6	10	22,7	
Luminal B	13	22,4	4	28,6	9	20,5	
Luminal B-HER2	5	8,6	5	35,7	0	0	
Triple Negativa	22	37,9	0	0	22	37,9	
Ki 67 pre	48	81,3					0,58

<= 15	21	43,8	4	40	17	44,7
> 15 y < 30	9	18,8	3	30	6	15,8
>= 30	18	37,5	3	30	15	39,5

8.2.3.2 Análisis de resultados para el gen *HOXB2*

El análisis de *HOXB2* únicamente se pudo realizar en 40 muestras por acabarse el material viable para realizar el análisis, y porque en algunas muestras no se pudieron obtener los resultados de pirosecuenciación. Las características de las pacientes se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Características clínico-patológicas de las muestras seleccionadas para el análisis de pirosecuenciación de *HOXB2*.

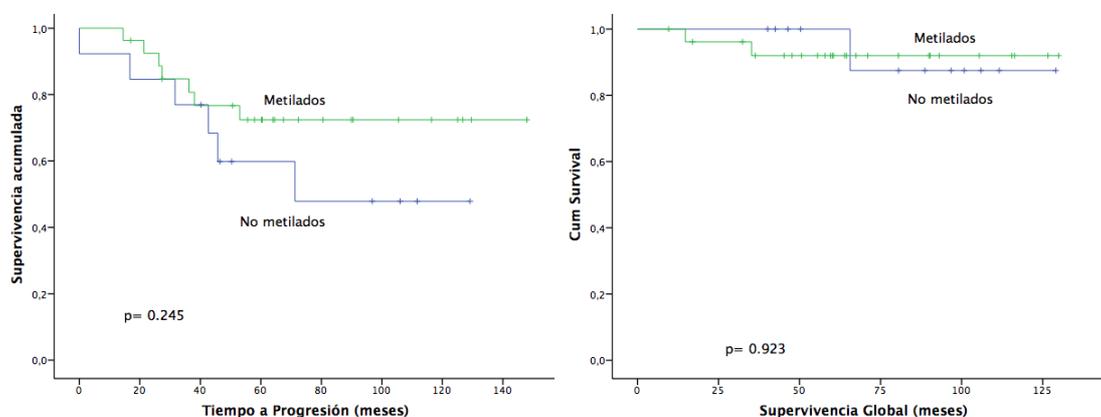
Características clínico-patológicas N: 40	N	%
Edad (mediana)	48 (rango 29-67)	
Subtipo Histológico		%
Carcinoma	5	12,5%
CDI (Carcinoma ductal infiltrante)	35	47,5%
Receptor Estrógeno (RE)		
Negativo (0-4%)	17	42,5%
Positivo (5-100%)	23	57,5%
Receptor Progesterona (RP)		
Negativo (0-4%)	25	62,5%
Positivo (5-100%)	15	37,7%
HER2		
Positivo	4	12,5%
Negativo	35	87,5%
Grado Histológico(pre tratamiento)		
Desconocido	3	7,5%
I	3	7,5%
II	23	57,5%
III	11	27,5%
Tamaño Tumoral (clínico)		
cT1	0	0%
cT2	19	47,5%
cT3	17	42,5%
cT4	4	10%
Estado ganglionar (clínico)		
cN0	13	32,5%
cN1	20	50%
cN2	5	12,5%
cN3	2	5%
Estadio Clínico		

cIIA	9	22,5%
cIIB	6	15%
cIIIA	16	40%
cIIIB	7	17,5%
cIIIC	2	5%
Subtipo Histológico		
HER2+ enriched	2	5%
Luminal A	11	27,5%
Luminal B	19	47,5%
Luminal B-HER2	2	5%
Luminal	1	2,5%
Triple Negativa	15	37,5%
Ki 67 pre tratamiento		
Ki67 <= 15	14	35%
Ki67 16-29	6	15%
Ki67 >= 30	12	30%
Desconocido	8	20%

En el caso de *HOXB2*, para dicotomizar a las pacientes de la cohorte ICO en metiladas y no metiladas se consideró como punto de corte el tercil 33, correspondiendo este punto a un valor de porcentaje de metilación del 34,24% (ver Anexo 6). Por debajo de este valor se consideró baja metilación (no metiladas), N= 13 y por encima, alto porcentaje de metilación (metiladas), N= 27.

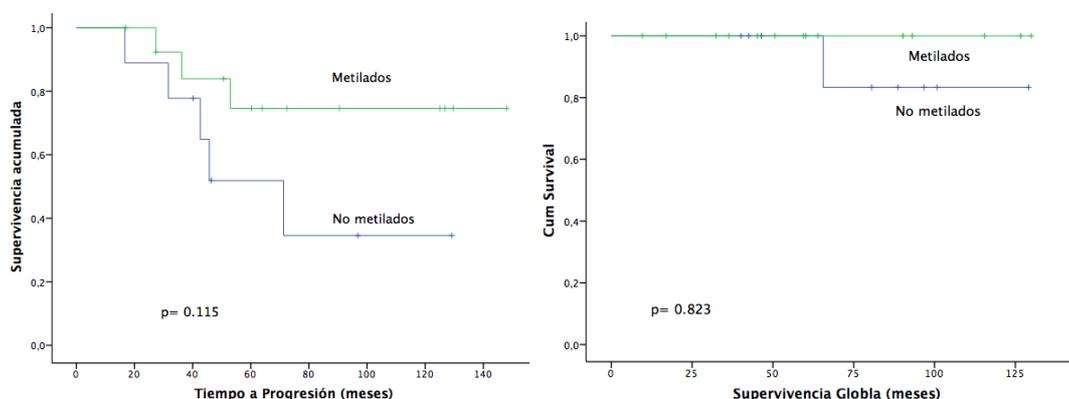
Se calculó la SLP en función del estado de metilación de *HOXB2*. Las pacientes con elevada metilación de *HOXB2* presentaban una SLP superior a las pacientes con baja metilación, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p= 0,24$) (Figura 38). Los resultados de SG no mostraron diferencias entre ambos subgrupos ($p= 0,923$).

Figura 38. Resultado de curvas Kaplan-Meier para Tiempo a la Progresión (SLP) y Supervivencia Global (SG) en meses según el estado de metilación del gen *HOXB2*, para el global de pacientes de la cohorte ICO analizadas. El p-valor fue calculado mediante la función log-rango.



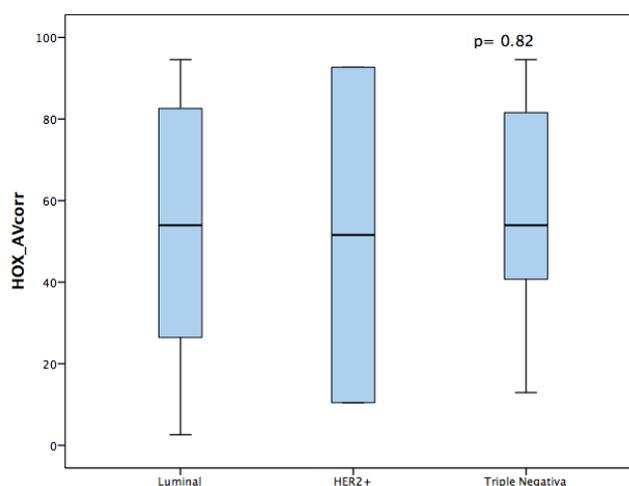
La SLP en función del estado de metilación de *HOXB2* y el subtipo molecular no mostró diferencias estadísticamente significativas, pero sí una tendencia a una mejor supervivencia libre de enfermedad para el subgrupo de pacientes luminales (N=23): metiladas (N=14) vs no metiladas (N= 9) (log-rango; $p=0,115$)(Figura 39); En el subgrupo de pacientes triple negativos, sólo 3 casos presentaban *HOXB2* no metilado y las diferencias con el grupo de metiladas en relación a la SLP no fueron estadísticamente significativas ($p=0,853$). El análisis para las pacientes HER2 no se realizó por la poca representatividad de la muestra (N= 2).

Figura 39. Resultado de curvas de supervivencia Kaplan-Meier de Tiempo a la Progresión y Supervivencia Global (meses), en el subtipo Luminal, según el estado de metilación de *HOXB2*. P-valor calculado mediante la función log-rango.



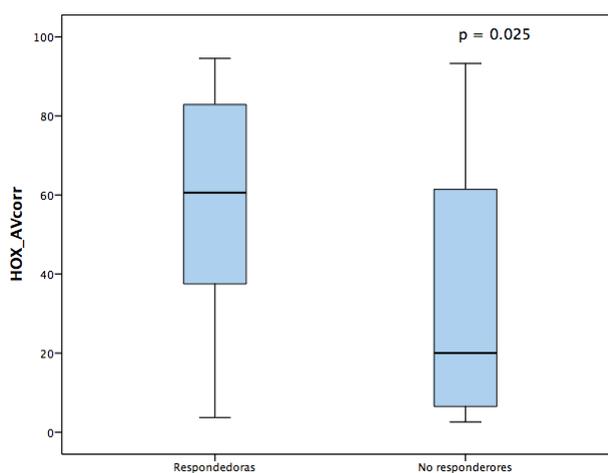
En relación al estado de metilación (porcentaje de metilación de *HOXB2*) en función del subtipo molecular (23 Luminales, 2 HER2 y 15 Triple Negativas), no se observaron diferencias entre los diferentes subtipos en relación al nivel de metilación (Figura 40).

Figura 40. Nivel de metilación de *HOXB2* en función de subtipo molecular de cáncer de mama: Luminal, HER2 y Triple negativo (P-valor calculado mediante función de ANOVA). En el eje de las Y se muestra el porcentaje de metilación del gen *HOXB2*.



En el análisis del impacto de la metilación de *HOXB2* en la obtención de respuesta, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,025$), entre el grupo de pacientes con respuesta (respuesta parcial y respuesta completa) vs el grupo de pacientes sin respuesta (enfermedad estable o progresión)(Figura 41). Estas diferencias no se observaron al analizar la respuesta completa patológica.

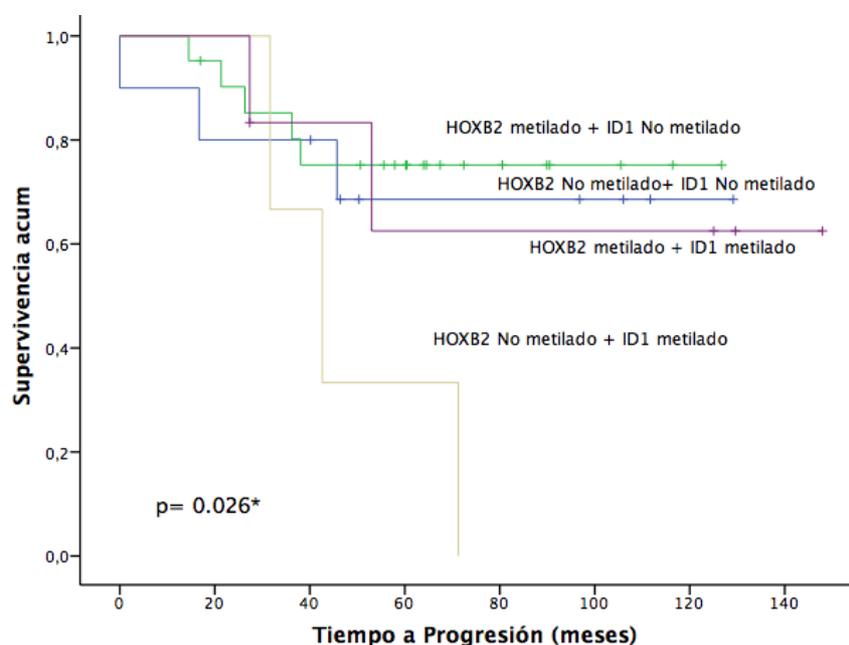
Figura 41. Estado de metilación de *HOXB2* en función de subgrupo de pacientes respondedoras y no respondedoras (P-valor calculado mediante función de ANOVA). En el eje de las Y se muestra el porcentaje de metilación del gen *HOXB2*.

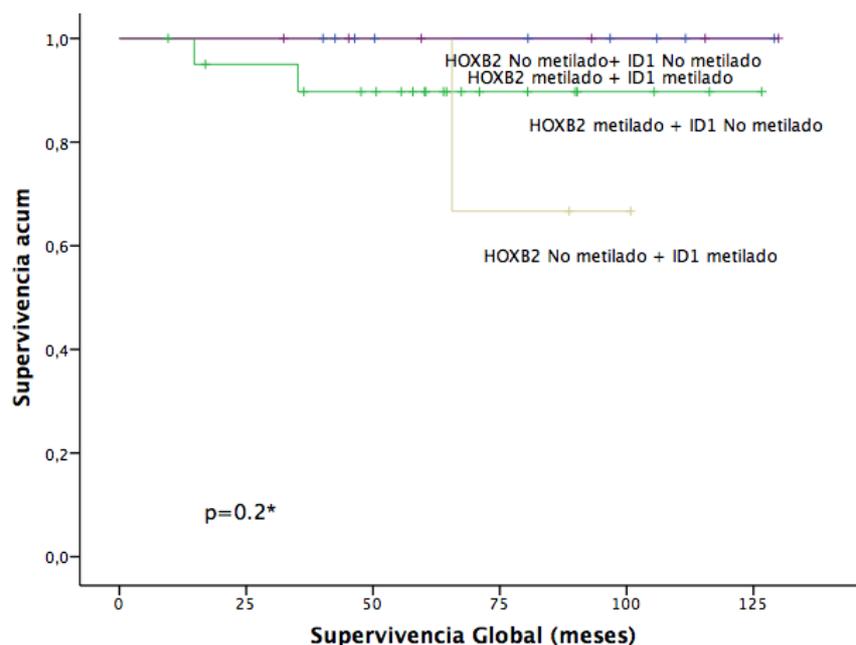


Asimismo, se realizó un análisis de asociación entre las diferentes co-variables clínico-patológicas, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre ellas y el estado de metilación de *HOXB2*, salvo en el caso de la co-variable respuesta que, como anteriormente se menciona (Figura 41), demostró una asociación con el estado de metilación mediante el test de Fisher (P valor < 0,05).

Tras disponer de la información de ambos genes (*ID1* y *HOXB2*) se realizó un análisis de la combinación del estado de metilación de *ID1* y de *HOXB2* para valorar si existía sinergia entre ambos en la predicción de SLP y SG (N= 40). *ID1* fue seleccionado a partir de las muestras del TCGA BRCA de pacientes tratadas con taxanos, y *HOXB2* fue seleccionado de la cohorte de BRCA del TCGA tratadas con antraciclínas. Los resultados del análisis de la combinación de ambos genes mostraron que para el subgrupo de pacientes con estado de *ID1* metilado y *HOXB2* no metilado la SLP era inferior al resto de subgrupos, de forma estadísticamente significativa ($p=0,026$) (Figura 42). El análisis de Supervivencia Global, no mostró diferencias estadísticamente significativas, aunque se mantiene la tendencia para el subgrupo de pacientes con *ID1* metilado y *HOXB2* no metilado con un peor pronóstico. Estos resultados fueron independientes del resto de variables y subtipo molecular. El subgrupo de mal pronóstico (*ID1* metilado y *HOXB2* no metilado) estaba formado por 3 pacientes luminales; resultado interesante, puesto que podría seleccionar un subgrupo de pacientes luminales de peor pronóstico.

Figura 42. Representación de curvas kapla-meier de Supervivencia Libre de Progresión y Supervivencia Global (meses), en función de la combinación de *ID1* y *HOXB2*, según el estado de metilación de ambos genes. *El resultado de la *p* hace referencia al análisis de SLP y SG de la comparativa entre el grupo de pacientes con estado de *ID1* metilado+ *HOXB2* no metilado vs el resto.





8.2.3.3 Análisis de resultados para el gen *ATOH8*

El análisis de *ATOH8* se realizó en 23 muestras, puesto que para el resto de muestras quedaba poco material disponible o de poca calidad para realizar el análisis de pirosecuenciación. Las características de las pacientes se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Características clínico-patológicas de las muestras seleccionadas para el análisis de pirosecuenciación de *ATOH8*.

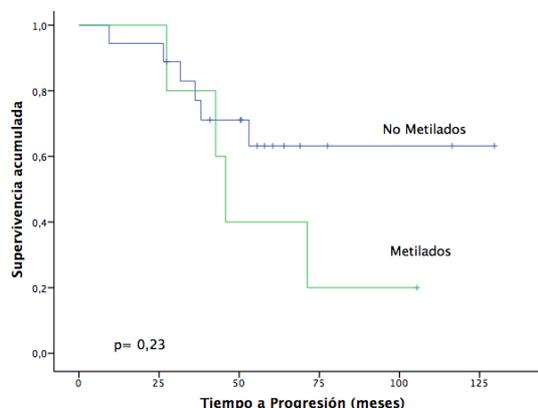
Características clínico-patológicas N: 23	N	%
Edad (mediana)	49 (rango 29-67)	
Subtipo Histológico		%
Carcinoma	3	13%
CDI (Carcinoma ductal infiltrante)	20	87%
Receptor Estrógeno (RE)		
Negativo (0-4%)	11	47,8%
Positivo (5-100%)	12	54,2%
Receptor Progesterona (RP)		
Negativo (0-4%)	14	61%
Positivo (5-100%)	9	39%
HER2		
Positivo	2	8,7%
Negativo	21	91,3%
Grado Histológico(pre tratamiento)		
Desconocido	1	4,3%
I	0	0%

II	18	78,2%
III	4	17,5%
Tamaño Tumoral (clínico)		
cT1	0	0%
cT2	11	37,9%
cT3	7	30,4%
cT4	5	21,7%
Estado ganglionar (clínico)		
cN0	4	17,4%
cN1	15	65,2%
cN2	3	13%
cN3	1	4,4%
Estadio Clínico		
cIIA	3	13%
cIIB	3	13%
cIIIA	10	43,5%
cIIIB	6	26,1%
cIIIC	1	4,4%
Subtipo Histológico		
HER2+ enriched	1	4,4%
Luminal A	4	17,4%
Luminal B	6	26%
Luminal B-HER2	1	4,4%
Luminal	1	4,4%
Triple Negativa	10	43,4%
Ki 67 pre tratamiento		
Ki67 <= 15	6	26%
Ki67 16-29	4	17,4%
Ki67 >= 30	8	34,8%
Desconocido	5	21,8%

Para el gen *ATOH8* se consideró como punto de corte para dicotomizar a las pacientes de la cohorte ICO entre metiladas y no metiladas, el percentil 75, correspondiente a un porcentaje de metilación del 46% (ver Anexo 7). Teniendo en cuenta este punto de corte, se consideraron no metiladas a 18 pacientes y metiladas a 5.

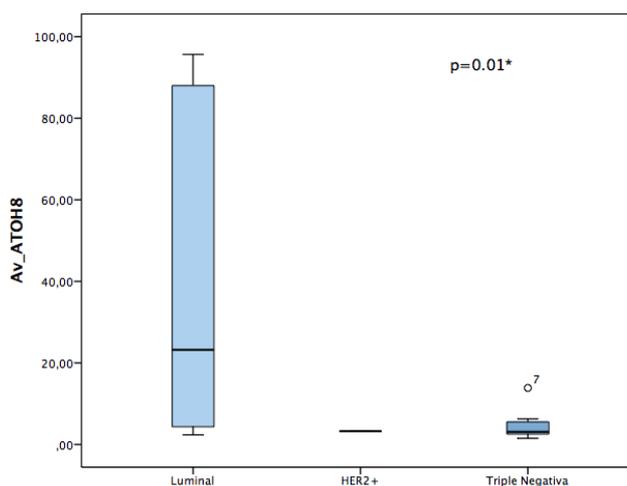
La Supervivencia libre de enfermedad fue calculada para el total de las pacientes (N=23). Se observó una tendencia no estadísticamente significativa ($p=0,23$) a ser ésta superior para el subgrupo de pacientes no metiladas (N=18), vs las metiladas (N=5)(Figura 43). No se observaron diferencias en la SG de las pacientes en función del estado de metilación ($p=0,335$).

Figura 43. Resultado de curvas Kaplan-Meier para Tiempo a la Progresión (SLP) en meses según el estado de metilación del gen *ATOH8* para el global de pacientes de la cohorte ICO analizadas. El p-valor fue calculado mediante la función log-rango.



Se realizó el análisis de SLP dividiendo la población por subtipo molecular, observando la misma tendencia; incremento de la SLP para el subgrupo de pacientes no metiladas (N=8) vs metiladas (N=4) no estadísticamente significativo, sólo para el subgrupo Luminal. Para las pacientes HER2 no se realizó el análisis por haber sólo un caso y para las pacientes triple negativas no se pudo evaluar la diferencia entre ambos subgrupos puesto que todas las pacientes se clasificaron como no metiladas (N=10). Se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,01$) entre los valores de metilación de las pacientes triple negativas vs las Luminales, tal y como se muestra en la Figura 44.

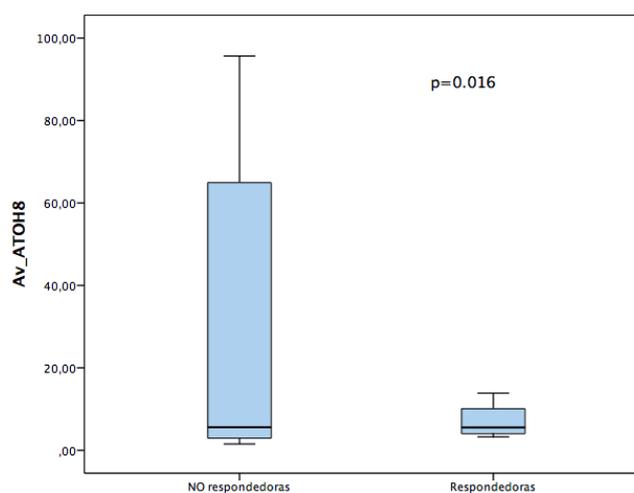
Figura 44. Nivel de metilación de *ATOH8* en función de subtipo molecular (de cáncer de mama: Luminal, HER2 y Triple negativo (P-valor calculado mediante función de ANOVA). * El valor de la p hace referencia al resultado del T-Test para las pacientes Luminales vs Triple Negativas. En el eje de las Y se muestra el porcentaje de metilación del gen *HOXB2*.



La obtención de respuesta completa patológica fue superior ($p=0,016$) en las pacientes no metiladas (N=19) vs las metiladas (N=4) (Figura 45). Estos resultados se correlacionan con los obtenidos en la cohorte BRCA del TCGA para seleccionar los genes candidatos. En la Figura 20 se muestra la

selección de *ATOH8* y las diferencias estadísticamente significativas entre el subgrupo de CR vs NR y el estado de metilación de *ATOH8*.

Figura 45. Estado de metilación de *ATOH8* según la obtención de respuesta completa patológica (respondedoras) o no (no respondedoras) para el global de las pacientes (N=23) (P-valor calculado mediante función de ANOVA). En el eje de las Y se muestra el porcentaje de metilación del gen *HOXB2*.



El análisis de asociación entre el estado de metilación y el resto de variables clínico-patológicas no mostró diferencias significativas.

Al igual que en el apartado previo, en que se realizó el análisis de supervivencia conjunto para los genes *ID1* y *HOXB2*, en función del estado de metilación de los mismos, se realizó el mismo análisis de supervivencia añadiendo el gen actual (*ATOH8*), para el total de pacientes que se disponía muestra (N=23) sin poder obtener resultados concluyentes de correlación entre ellos, debido al aumento de subgrupos de combinaciones y el pequeño tamaño muestral.

8.2.3.4 Análisis exploratorio de los datos del TCGA para el global de la muestra BRCA

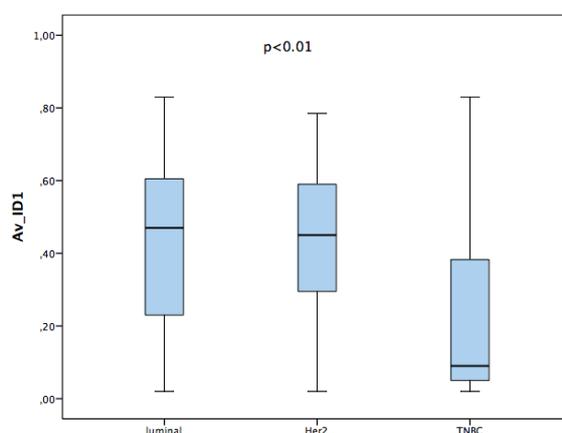
Con el fin de poder valorar y comparar cómo se comportaban los biomarcadores, seleccionados en nuestra serie, en el global de la cohorte BRCA, se realizó una exploración del papel de *ID1*, *HOXB2* y *ATOH8*, obteniendo la información necesaria para realizar el análisis *in silico* mediante la plataforma wanderer (www.maplab.imppc.org).

Cabe hacer mención de dos puntos importantes que pueden influir en los resultados del análisis exploratorio; en primer lugar el punto de corte del estado de metilación usado en los análisis de supervivencia, utilizando el mismo valor que se utilizó para dicotomizar el nivel de metilación en nuestra cohorte de validación, para así poder realizar una exploración comparable a nuestros datos. Por otro lado la muestra de la cohorte BRCA es heterogénea en lo que hace referencia a los

tratamientos y esquemas, a diferencia de la nuestra que es una muestra homogénea seleccionada, y esto puede influenciar en la distorsión de los resultados. Teniendo en cuenta lo mencionado previamente, a continuación se detalla el resultado de los mismos:

En el análisis de *ID1* en la cohorte TCGA, el estado de metilación se mostró diferenciado, en las dos CpGs seleccionadas para el gen, entre los subtipos de cáncer de mama ($p < 0,01$), de la misma manera que observamos en nuestros resultados, con un menor porcentaje de metilación para los tumores triple negativos (Figura 46).

Figura 46. Nivel de metilación de *ID1* para el global de la cohorte de BRCA del TCGA, en función de subtipo molecular (de cáncer de mama: Luminal, HER2 y Triple negativo (P-valor calculado mediante función de ANOVA). Se considera un p-valor inferior a 0,05 como estadísticamente significativo



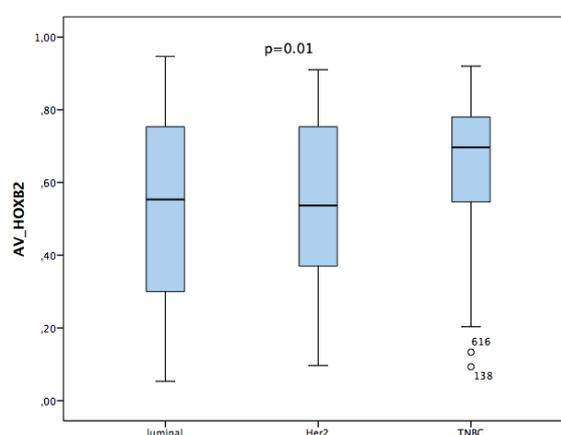
Al explorar en la cohorte BRCA del TCGA la influencia de la metilación de *ID1* en la supervivencia (CSS: Cancer Specific Survival), no se observaron diferencias en el global de las pacientes. Sin embargo, al analizar estos resultados para el subgrupo triple negativo, existía una tendencia a una mayor supervivencia para las pacientes no metiladas. Es importante remarcar que para nuestra muestra de validación, no hubo ninguna paciente triple negativa clasificada como metilada a diferencia de la cohorte global del TCGA, en la que sí había pacientes, aunque muy pocas ($N = 40$) clasificadas teniendo en cuenta el punto de corte de metilación en nuestra cohorte. Este hecho podría explicarse porque el punto de corte seleccionado para dicotomizar a las pacientes en nuestro estudio se determinó en base a las muestras seleccionadas, que no eran todas las del TCGA, y por otro lado, recordar que no existe un punto de corte estándar establecido para diferenciar el estado de metilación de estos genes.

Para *HOXB2*, en el análisis exploratorio del TCGA, observamos que las pacientes triple negativas tenían valores de metilación ligeramente superiores al resto, hecho que no pudimos observar en nuestra cohorte ICO de validación. Para el análisis de supervivencia CSS, utilizando como punto de

corte el mismo valor que en nuestra cohorte validación, no se observaron diferencias en función del estado de metilación ($p=0,8$). En nuestra cohorte a pesar de haber una tendencia a una mayor SLP en las pacientes con mayor metilación, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

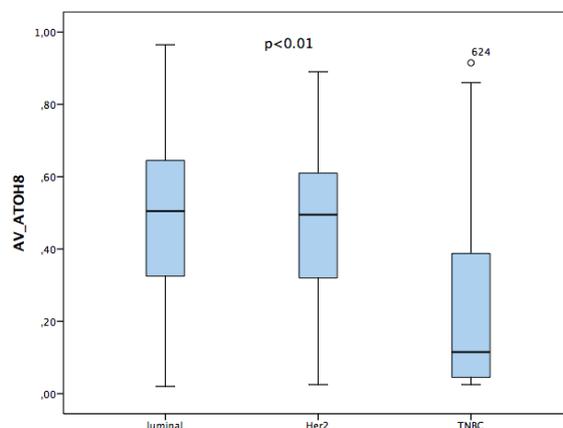
No se pudo explorar el papel de nuestros genes en relación a la respuesta, puesto que la muestra global del BRCA estaba formada por una población heterogénea, en la que muchas pacientes habían recibido tratamiento adyuvante, pero no neoadyuvante, y por tanto no se disponía de la información en relación a la respuesta.

Figura 47. Nivel de metilación de *HOXB2* para el global de la cohorte de BRCA del TCGA, en función de subtipo molecular de cáncer de mama: Luminal, HER2 y Triple negativo (P-valor calculado mediante función de ANOVA, estadísticamente significativo cuando era inferior a 0,05).



Finalmente, para el análisis exploratorio de *ATOH8*, y con el fin de validar los hallazgos obtenidos en nuestra cohorte de validación, se observó de nuevo que las pacientes con tumores triple negativos presentaban niveles más bajos de metilación de *ATOH8* que el resto de subtipos ($p<0,01$) (Figura 48).

Figura 48. Nivel de metilación de *ATOH8* para el global de la cohorte de BRCA del TCGA, en función de subtipo molecular de cáncer de mama: Luminal, HER2 y Triple negativo (P-valor calculado mediante función de ANOVA, considerando un p-valor inferior a 0,05 como estadísticamente significativo).



El análisis de supervivencia en función del estado de metilación de *ATOH8*, y utilizando el punto de corte usado para el análisis en nuestra cohorte de validación, no mostró diferencias estadísticamente significativas a pesar de ser discretamente superior en el grupo de pacientes no metiladas, corroborando nuestros resultados.

De forma similar al realizado en nuestra cohorte de validación, combinando el estado de metilación de *ID1* y *HOXB2*, se realizó el análisis de supervivencia para la combinación de los tres genes en función del estado de metilación de cada uno de ellos, ya que en este caso el tamaño de la muestra era suficiente para obtener una N óptima en cada uno de los brazos a comparar. Teniendo en cuenta la heterogeneidad de pacientes y tratamientos en la cohorte BRCA, no pudimos observar diferencias estadísticamente significativas en este análisis, a diferencia de lo observado en la cohorte ICO en relación a la combinación *ID1* metilado y *HOXB2* no metilado como grupo de peor pronóstico al tratamiento con taxanos y antraciclinas.

Tipificación de biomarcadores epigenéticos en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado como factores pronósticos de la evolución de la enfermedad y predictivos de respuesta al tratamiento con quimioterapia neoadyuvante

9 Discusión

9.1 Discusión resultados generales

En resumen, se trata de una serie de 138 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama predominantemente con estadio III, tratadas con quimioterapia neoadyuvante basada en esquemas de antraciclinas y taxanos.

9.1.1 Objetivo secundario 1: Analizar las características basales de las pacientes: determinar las características clínicas y patológicas

Se trata de una serie con una mediana de edad de 48 años que es inferior a los 61 años, donde se sitúa la mediana de edad de diagnóstico de cáncer de mama en nuestro medio (SEER 18 2007-2011). Podemos justificar este hecho por diversos motivos: a) el 50% de las pacientes presentaban subtipos triple negativo y HER2 positivo, entre los que la edad al diagnóstico descrita es más temprana (188); b) las pacientes añosas y especialmente en el periodo de tiempo incluido en nuestro estudio (2003-2013) eran frecuentemente excluidas de los esquemas de quimioterapia neoadyuvante; así en los estudios de quimioterapia neoadyuvante la mediana de edad se sitúa entorno a los 49-50 años (189). Esta baja mediana de edad justifica que el 64,5% de las pacientes incluidas en nuestro estudio fueran premenopáusicas.

El subtipo histológico más frecuente fue, como era de esperar por ser el más frecuente en cáncer de mama, el carcinoma ductal infiltrante. En nuestra serie se incluyeron 8 (5,8%) pacientes con carcinoma lobulillar infiltrante, en las que se optó por el tratamiento neoadyuvante por el volumen de enfermedad al diagnóstico y por disponer de una cirugía oncoplástica menos evolucionada en ese momento. Posiblemente en la actualidad la primera opción terapéutica para estas paciente con carcinoma lobulillar no hubiera sido la quimioterapia neoadyuvante, pues se conoce que las tasas de RCp y el beneficio de la quimioterapia en este subtipo es limitado (190) y además se dispone de técnicas de cirugía oncoplástica excelentes.

La mayoría de pacientes (65,2%) fueron receptor hormonal positivo, puesto que los tumores luminales representan la mayoría de subtipos de cáncer de mama (54). El porcentaje de positividad de los RE fue superior en relación a los RP (65,2% vs 51,5%). El estado de HER2 fue negativo en la mayoría de los casos (82,65%), en relación a las tasas de sobreexpresión de HER2 descritas en la literatura (191).

El cambio del estado de RH y HER2 pre y post-tratamiento neoadyuvante es un fenómeno descrito en la literatura, y que puede tener implicaciones en el tratamiento adyuvante; por ello, quisimos

describirlo en nuestra serie. En el caso del estado de HER2, es en el que se han descrito menos cambios, en especial, cuando la determinación se realiza mediante FISH (192). Nuestros resultados también van en esta dirección, ya que sólo un 3,4% de las pacientes presentaron un cambio en el estado de HER2, produciéndose en todos ellos la negativización de la sobreexpresión HER2 en la pieza quirúrgica, tras recibir quimioterapia basada en antraciclina, taxanos y trastuzumab.

En el caso de la conversión de los RH, se ha descrito en la literatura una discordancia de entorno al 8-33% (192); hallándose diferencias entre RE y RP (2,5-17% vs 5,9-51,7% respectivamente). Nuestros resultados van en la línea de lo esperado, habiendo una discordancia en RE del 10,5% y en el caso del RP 27,5%. Esta mayor discordancia en el RP fue a cambio de una mayor negativización de la expresión del mismo, tal y como en la literatura se describe. De todos estos resultados, podemos concluir, que aunque poco frecuente, puede existir un cambio en el estado de RH y HER2; por ello, es importante testar su estado en la enfermedad residual, pudiendo tener implicaciones pronósticas y en la estrategia terapéutica (193).

Respecto a la cirugía tras la quimioterapia neoadyuvante, aproximadamente la mitad de las pacientes recibieron una cirugía conservadora de la mama y la otra mitad se trató mediante una mastectomía. Si bien el rango de cirugías conservadoras fue inferior al descrito en series previas tras quimioterapia neoadyuvante (60-67% de los casos) (194); hemos de considerar el alto porcentaje de pacientes con enfermedad localmente avanzada incluida (60% estadio III). Con respecto a la cirugía axilar tras la quimioterapia, alrededor del 98% de pacientes se trataron mediante un vaciamiento axilar ganglionar, ya que era el protocolo habitual del centro en el momento en el que se desarrolló el estudio. Por otra parte, el 71,7% de las pacientes presentaban afectación ganglionar al diagnóstico. Así, sólo un porcentaje muy pequeño (2,17%) se pudo beneficiar de la aplicación de la biopsia selectiva del ganglio centinela previo y /o posterior a la quimioterapia neoadyuvante; recordemos que se trata de una serie de pacientes tratadas entre los años 2003 y 2013.

Aunque bajo, un porcentaje de pacientes presentaban tumores poco agresivos; definiendo la agresividad en función del grado histológico (grado I en 2,9% de pacientes) y del ki 67 (< al 15% en 27,5%). Este hecho podría explicarse porque hemos incluido pacientes tratadas desde el año 2003, en el que no se tenía en consideración el grado histológico y el índice de proliferación celular para decidir la actitud terapéutica. En la mayoría de las pacientes, la determinación del grado histológico y del índice de proliferación celular se determinó a posteriori, en el momento de realizar este estudio. Actualmente, donde el conocimiento de la biología tumoral ha aumentado su peso en la toma de las decisiones terapéuticas, estas paciente no hubieran sido seleccionadas para recibir quimioterapia neoadyuvante; habiéndose optado por una cirugía y posterior un tratamiento con hormonoterapia exclusiva en la mayoría de ellas.

9.1.2 Objetivo secundario 2: Análisis de la respuesta patológica tras el tratamiento neoadyuvante

Al analizar los resultados de la respuesta completa patológica en el global de las pacientes se obtuvieron tasas de alrededor del 21%, similar a las obtenidas en otros estudios en pacientes tratadas con antraciclinas y taxanos (20-30% en función de las series)(195).

Al analizar la respuesta completa patológica se tomaron dos definiciones de la misma, como se expone en la metodología, teniendo en cuenta o no el carcinoma in situ residual (ypTis/0N0 y ypT0N0).

En el análisis univariante de la RCp en función de diferentes características clínico-patológicas cabe destacar que la RCp no se relacionó con la edad, ni con el tamaño, ni con la afectación ganglionar. Estos resultados subrayan la importancia de los factores biológicos, como la definición de los diferentes subtipos de cáncer de mama, por encima de los factores pronósticos clásicos para predecir el potencial beneficio de la quimioterapia neoadyuvante, como veremos más adelante.

Respecto al subtipo histológico, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, pero hemos de tener en cuenta que el número de pacientes con histología diferente al ductal infiltrante era muy pequeño. En el caso de las pacientes con histología de carcinoma lobulillar infiltrante (8 pacientes), observamos que ninguna de ellas obtuvo una RCp, en relación al poco beneficio que obtienen estas pacientes de la quimioterapia neoadyuvante, y de la quimioterapia en general previamente ya mencionado y descrito en la literatura.

La expresión de receptores hormonales (tanto los RE como los RP) sí fueron un factor predictivo de respuesta; correlacionándose de forma estadísticamente significativa con la RCp. Las pacientes con expresión de receptores hormonales presentaron tasas más bajas de RCp vs aquellas que no lo expresaban. Conocemos que el RE es el factor predictivo de respuesta más frecuente observado en la literatura (33).

El estado de HER2 se considera también un factor predictivo de respuesta en aquellas pacientes tratadas con quimioterapia y terapia anti-HER2. En nuestra serie, 3 pacientes HER2+ no recibieron tratamiento con trastuzumab en ninguno de los escenarios (ni en neoadyuvancia ni tras la cirugía). Este hecho se justifica porque en el año en que fueron tratadas, este fármaco no estaba aprobado. De todas las pacientes con sobreexpresión de HER2 (N=24), 8 pacientes no recibieron trastuzumab en neoadyuvancia (2 pacientes HER2+enriched y 6 LuminalB-HER2), aunque 5 de ellas (2 HER2+enriched y 3 Luminal B-HER2) sí lo recibieron tras la cirugía como tratamiento adyuvante. Posiblemente, esto justifica la obtención de una tasa de RCp (37,5% para el global de pacientes

HER2+ y 62,5% para las pacientes HER2+/RH-) ligeramente inferior a la esperada (de hasta un 70%). El hecho de que la mayoría de ellas finalmente sí recibieran el fármaco justifica los resultados de supervivencia que se comentarán en el siguiente apartado; ya que la no administración de trastuzumab en estas pacientes se ha asociado con un peor pronóstico. Asimismo a pesar de recibir tratamiento con trastuzumab, ninguna de nuestras pacientes recibió un tratamiento de combinación con trastuzumab y pertuzumab (doble bloqueo anti-HER2) junto con quimioterapia, considerado en la actualidad como el tratamiento estándar en neoadyuvancia para el subtipo HER2 positivo, al incrementar las tasas de respuesta completa patológica (135, 196); pues no era el tratamiento vigente en el momento del estudio.

El grado histológico se correlacionó también con la RCp, no obteniéndose ninguna RCp para las pacientes con grado I. El mayor beneficio se obtuvo para aquellas pacientes con tumores más agresivos (grado III), alcanzado RCp del 30%; siendo la mayoría pacientes triple negativas. El grado histológico elevado (grado III) está más relacionado con tumores triple negativos y/o HER2 positivos, siendo subtipos que obtienen mayores beneficios y tasas de RCp tras la quimioterapia neoadyuvante. Por otra parte, la obtención de RCp en estos dos subtipos de enfermedad se considera un surrogado de la supervivencia (121).

Al igual que en el caso del grado histológico, el índice de proliferación celular (ki 67), también se correlacionó con la RCp, siendo superiores en el caso de que la determinación de ki 67 fuera > al 30%, datos esperables en base a la literatura (197, 198).

9.1.3 Objetivo secundario 3: Obtención de resultados de supervivencia libre de enfermedad y de supervivencia global

La mediana del tiempo a la progresión no se alcanzó, siendo la media de 109,3 meses y la mediana de la supervivencia global fue de 149,4 meses. Teniendo en cuenta que se trata de una serie de pacientes que en su mayoría se clasificaron como estadio III; estos resultados están en la línea de los descritos en el SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results).

La supervivencia global a los 5 años en la población general diagnosticada de cáncer de mama es de 89,5% según los datos del SEER Cancer Statistic Review (2007-2013). Esta cifra disminuye en cuanto el estadio de las pacientes es mayor, siendo en el caso del estadio III, que era el gran volumen de nuestras pacientes, del 72%. En nuestro caso la supervivencia global a los 5 años fue del 88,4%, superior a la esperada teniendo en cuenta el estadio de las pacientes (aproximadamente un 60% eran estadio III, 40% estadio II y no había ningún estadio I). Este hecho podría explicarse por la mayor

homogeneidad en cuanto al tratamiento de la muestra analizada en nuestro estudio, y por la inclusión de un 40% de estadíos II.

Se realizó un análisis univariante y multivariante en función de la SLP y SG y el resto de características clínico-patológicas. Para el análisis multivariante no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos, motivo que podría explicarse por el tamaño muestral reducido y el número de variables analizado.

En el análisis univariante cabe destacar:

a) Se observó que la RCp se asoció de forma estadísticamente significativa con el SLP para cualquiera de las dos definiciones analizadas (ypT0N0 y ypTisN0); pero sin embargo esta asociación no fue estadísticamente significativa en el caso de la SG. Este hecho podría explicarse por el gran volumen de pacientes luminales de nuestra serie, en las que el rango de RCp es más bajo, y no existe una correlación tan clara del impacto de la RCp en el pronóstico de las pacientes, hecho probablemente condicionado por los tratamiento recibidos (hormonoterapia adyuvante).

Nuestros resultados no varían en función de la definición de RCp como ha sido descrito en la literatura. El hecho de incluir el carcinoma ductal in situ como única enfermedad residual en la definición de RCp tras quimioterapia neoadyuvante no parece afectar negativamente en el pronóstico de las pacientes (120); por este motivo incluimos ambas definiciones en nuestro análisis.

b) En relación con el tamaño y la afectación ganglionar residual tras la quimioterapia neoadyuvante, observamos que tanto la persistencia de gran volumen a nivel de la mama (ypT4), como la persistencia de enfermedad ganglionar (vs la ausencia de la misma), se relacionaron de forma estadísticamente significativa con la SLP y la SG. En este caso el análisis se realizó para el global de las pacientes, independientemente del subtipo biológico, motivo por el se confirma que determinados factores clásicos, siguen teniendo un papel pronóstico (117, 118) y deben tenerse presentes en la toma de decisiones, junto con la clasificación molecular.

c) El tipo de cirugía tras la quimioterapia neoadyuvante (mastectomía vs cirugía conservadora), no presentó ningún impacto en la SLP ni en la SG, confirmándose la igualdad en la eficacia de realizar una cirugía conservadora vs una mastectomía (74, 75).

d) La relación entre ki67 y el pronóstico de cáncer de mama está bien establecido (41). Asimismo la persistencia de un elevado valor de ki67 tras la quimioterapia neoadyuvante se ha relacionado con un peor pronóstico para estas pacientes (199). En nuestra serie no se observó correlación entre el valor de ki67 determinado en el enfermedad residual y la SLP o la SG. El valor de ki67 post tratamiento sólo se pudo realizar en 56 pacientes. Sin embargo el grado histológico evaluado en el tumor residual

tras quimioterapia, sí se relacionó con un peor pronóstico, apreciándose que la persistencia de un grado histológico elevado (grado III) tras la quimioterapia neoadyuvante, determinado en 81 pacientes, se asoció a una peor SG. Estos datos ponen de manifiesto la importancia de analizar la enfermedad residual, no sólo para conocer la respuesta al tratamiento y la posible conversión de los receptores, sino para optimizar estrategias terapéuticas adaptadas a la enfermedad residual, con objetivo final de poder incrementar la supervivencia de éstas pacientes; así como para el diseño de ensayos clínicos para las pacientes de mayor riesgo.

9.1.4 Objetivo secundario 4: Clasificar las muestras según los subtipos del cáncer de mama utilizando técnicas inmunohistoquímicas (RE, RP, HER2 y ki 67) y correlacionarlos con la respuesta patológica, supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global

En nuestra serie, se clasificaron a las pacientes en diferentes subtipos de cáncer de mama según las características histológicas mediante técnicas de IHQ, tal y como se describe en la metodología, en ausencia de una clasificación biológica, hecho que puede limitar los resultados obtenidos.

La mayoría de pacientes fue clasificada como luminal (62,3%) incluyendo las pacientes luminal B-HER2+, seguido de triple negativa (31,8%) y en menor proporción del HER2 enriched que sólo representó el 5,8% del global de las pacientes. Estos datos reflejan las proporciones descritas en el cáncer de mama para la población general, confirmando que el subtipo Luminal es el más frecuente, y representa en torno al 60% (con mayor frecuencia el subtipo Luminal A), seguido de la enfermedad triple negativa (20-25%) y en último lugar los tumores HER2 enriched que representan el 10-15% del total de cáncer de mama. Llama la atención en nuestra serie, que hasta un 26% de las pacientes fue clasificada como Luminal A. Estas pacientes actualmente no hubieran recibido quimioterapia neoadyuvante dada la información de que disponemos del poco beneficio de la misma; tal y como refleja la baja tasa de RCp obtenida en estas pacientes en nuestra experiencia y por el contrario los excelentes resultados en supervivencia. Tal y como hemos expuesto, la clasificación por subtipos molecular se realizó en el momento de hacer este estudio en la mayoría de las pacientes, y no en el momento de seleccionar el tratamiento. Asimismo esta clasificación se realizó mediante técnicas de inmunohistoquímica y no basándonos en perfiles de expresión génica.

La SLP (o TTP) y la SG se calculó en función de los diferentes subtipos de cáncer de mama. A pesar de no obtener diferencias estadísticamente significativas en la SLP, hemos de recalcar, que sólo se alcanzó la mediana en el subtipo Triple negativo. Quizás un tamaño muestral más grande y un seguimiento mayor podrían hacer que las diferencias observadas alcanzaran el valor estadístico, ya

que la SLP fue superior en el subgrupo Luminal, seguido del triple negativo y del subgrupo HER2 enriched.

Los datos de la SG fueron estadísticamente significativos al comparar el subtipo Luminal A con el triple negativo; para el resto de subtipos las diferencias halladas no fueron estadísticamente significativas; siendo el triple negativo el de peor pronóstico, seguido del Luminal B-HER2, Luminal B y por último y con mejores resultados en supervivencia, el subtipo luminal A, que por definición es el de mejor pronóstico. Para el subgrupo HER2 enriched, no se pudo calcular la SG, puesto que no hubo ningún evento durante el seguimiento de estas pacientes; lo cual está en consonancia con los excelentes resultados de estos pacientes cuando reciben tratamiento biológico. Estos resultados están en la línea de otras series publicadas, si bien el reducido número de pacientes con sobreexpresión de HER2 y RH negativo limita los resultados del trabajo.

La correlación en la obtención de una RCp con la SLP y SG fue calculada para cada uno de los diferentes subtipos de cáncer de mama. En el único subgrupo que se observó una diferencia estadísticamente significativa entre las pacientes que obtenían una RCp vs las que no, fue para el subtipo Triple negativo. En el caso de la enfermedad HER2 enriched en nuestra serie fue poco representativa (5,8%), motivo por el que no podemos obtener conclusiones al respecto. La obtención de una RCp para determinados subtipos de cáncer de mama más agresivos, como son el triple negativo y la enfermedad HER2+, se ha relacionado con un mejor pronóstico (121), por lo que el objetivo actual en la estrategia terapéutica para estos subgrupos es incrementar la obtención de las tasas de respuesta completa patológica. Diversos estudios en marcha evalúan el papel de la combinación con diferentes agentes (inmunoterapia, fármacos dianas, etc) con esta finalidad así como para determinar biomarcadores que nos ayuden a seleccionar mejor a las pacientes que puedan obtener un mayor beneficio a los tratamientos administrados.

9.2 Discusión resultados análisis epigenético

9.2.1 Objetivo principal: Determinación de biomarcadores epigenéticos mediante tecnología de microarray de metilación de ADN en la muestra seleccionada y correlacionarlos con las características clínico-patológicas, la respuesta y la supervivencia de las pacientes.

El planteamiento inicial de nuestro estudio era la determinación de biomarcadores epigenéticos mediante técnicas de microarray en nuestra propia serie de casos; sin embargo, esta técnica no se pudo realizar en la cohorte “ICO”, tal y cómo se detalla en el apartado de resultados epigenéticos, dado que, tras realizar la extracción de ADN procedente de muestras de tejido parafinado, se detectó que la calidad del material obtenido fue insuficiente para poder realizar la generación de los perfiles de metilación de ADN por tecnología de microarray. Por ese motivo se prosiguió únicamente con la cohorte “discovery” TCGA, y preservando las muestras de la cohorte ICO para un posterior análisis de validación mediante técnicas de pirosecuenciación, pues los requerimientos de cantidad y calidad del ADN son menores, siendo una técnica más ajustada a las condiciones del material genético procedente de tejido incluido en parafina. El estado del material incluido en parafina depende en gran medida del tiempo transcurrido entre la extracción de la muestra y su preservación en un bloque; siendo el proceso de inclusión en formaldehído y posterior en parafina muy importante en este proceso. Este hecho, y los años transcurridos desde su preservación pueden condicionar el estado del ADN; que ya sólo por el método habitual de preservación suele estar muy fragmentado. El motivo inicial de elección de la técnica de microarrays Illumina fue porque ésta se puede realizar en tejido parafinado obteniendo los mismos resultados de eficacia que cuando se utiliza tejido congelado, siempre y cuando se consiga suficiente calidad del material a analizar (200).

Debido a la falta de calidad en nuestra cohorte y teniendo en cuenta la creciente disponibilidad de datos públicos a los que podemos acceder *in silico*, decidimos utilizar como cohorte Discovery los datos procedentes del TCGA, de contrastada calidad (51). Destacar la importancia de herramientas como la bioinformática y los estudios *in silico* en la investigación traslacional del cáncer, dado que facilitan el acceso a fuentes de información con gran cantidad de datos y muestras. Una de las limitaciones de usar repositorios de datos públicos, es la dificultad de encontrar una población homogénea, con las características exactas que representen la población del estudio problema. En nuestra cohorte ICO inicial, las pacientes fueron tratadas con la combinación de taxanos y antraciclinas. En la cohorte TCGA, los casos seleccionados como cohorte “Discovery” habían sido tratadas con taxanos o con antraciclinas, pero ninguna con ambos fármacos. Aunque esta característica difiere de las que nos habíamos planteado al inicio del estudio con la cohorte ICO, nos da la ventaja de poder encontrar biomarcadores individuales de respuesta a cada fármaco, sin la

interferencia del otro tratamiento, teniendo la oportunidad de comprobar su valía como biomarcadores de respuesta a la combinación de ambas terapias, en una cohorte de la práctica clínica real donde se administran en combinación.

En el análisis de pirosecuenciación, tras la puesta a punto de los primers y la PCR, únicamente se consiguió de forma efectiva disponer de resultados para los genes: *ATOH8*, *ID1*, *HOXB2*. Los motivos por los que no se pudieron obtener los resultados con los otros genes fueron varios: un diseño de los *primers* no adecuado por el tipo de muestra (degradada), que impedía realizarlo mediante otras vías, como por ejemplo en el caso de *CD74* y *FAM198B*; imposibilidad de conseguir especificidad al obtener únicamente una banda de amplificación en la zona de interés (en el caso de *PCDHB12* y *PPP1R14A*); desgaste de la muestra o empeoramiento de la calidad de algunas de ellas a lo largo del análisis de los diferentes genes, ejemplo de este hecho es que se obtuvieron resultado para todas las muestras en el análisis de *ID1*, pero el número fue inferior al realizar el análisis de *HOXB2* y mucho menor para *ATOH8* (realizados por este orden cronológico); el diseño de *ID1* demostró ser el más idóneo, consiguiendo así las mejores tasas de éxitos en el análisis. Estos hechos ponen de manifiesto la importancia de la generación de estudios prospectivos, y de la inclusión de muestras de calidad con fin investigacional que sean procesadas y almacenadas adecuadamente en un biobanco,

A continuación se realiza la discusión para cada uno de los biomarcadores seleccionados, con las características clínico patológicas de las muestras analizadas en la cohorte de validación:

9.2.2 Resultados *ID1*

La familia de proteínas *Inhibitor of DNA Binding 1 (ID)* está compuesta por cuatro miembros (*ID1*, *ID2*, *ID3* e *ID4*) que pertenecen a la familia de factores de transcripción HLH (Helix-Loop-Helix), reguladores cruciales en una amplia gama de procesos del desarrollo celular: regulan la homeostasis de las células madre y la diferenciación a los diversos tipos celulares (neuronal, hematopoyéticas, embrionarias)(201) y, coordinan la interacción de la célula con el medio extracelular (202). Recientemente se ha demostrado que en muchos procesos cancerosos, las células retienen estas funciones para promover la proliferación y la auto-regulación, y así facilitar la señalización del microentorno del tumor (203).

Las proteínas ID están implicadas en la regulación de procesos cruciales en el desarrollo tumoral, los “cancer hallmarks”, como la proliferación, la senescencia celular y la supervivencia (204). Los niveles aberrantes de proteínas ID se han asociado con la regulación positiva de una serie de factores de proliferación y pro-supervivencia; como las ciclinas D1 y E, PI3K–AKT y el factor nuclear- κ B (NF-

κ B), así como la inhibición de los inhibidores de la quinasa dependientes de ciclina (CKI) p16INK4A, p21waf1, p27Kip1 y pRb51 (205). En el Anexo 8 se detalla una figura con la regulación de las proteínas ID y su función en la biología del cáncer (203).

En nuestro estudio apreciamos una diferencia de metilación del gen *ID1* en las muestras de la cohorte ICO, en función del subtipo de cáncer de mama. En el caso de las pacientes triple negativas, todas se agruparon en el rango de baja metilación de *ID1*, hecho que se traduciría en una alta expresión de ID1, comparado con el resto de subtipos, con niveles de metilación más altos. Este fenómeno fue corroborado al realizar la exploración de la asociación entre niveles de metilación de *ID1* y subtipos en la cohorte BRCA del TCGA, dando más robustez a nuestros resultados. Los tumores triple negativos por definición son tumores agresivos, con alta proliferación celular, pero a su vez, en general, con alta sensibilidad a la quimioterapia, hecho que encajaría con los resultados reportados en la bibliografía de la relación de expresión de ID1 con mayor proliferación tumoral, y nuestros propios resultados que muestran una asociación entre la baja metilación del gen con una mayor sensibilidad a taxanos en la cohorte discovery.

De hecho, estudios en tumores de próstata han demostrado que los pacientes que presentaban una sobreexpresión de ID1 tras ser tratados con docetaxel neoadyuvante, se relacionaban con un menor tiempo a la recaída local y una mayor supervivencia. Los niveles elevados de ID1 se asociaban también a tumores más agresivos, pero a la vez a una mayor respuesta a determinados fármacos, como los taxanos, no sucediendo lo mismo cuando los tumores eran tratados con otros fármacos, como por ejemplo la mitomicina C (206). En pacientes con cáncer de pulmón tratados con quimioterapia adyuvante con cisplatino y paclitaxel se observó que niveles elevados de ID1, correspondiente a una baja metilación, estaban significativamente asociados a una mayor supervivencia global. En el análisis clínico, se observó que el tamaño promedio del tumor era mayor en los pacientes con alta expresión de ID1, posicionándose como un posible factor pronóstico negativo (207).

Teniendo en cuenta esto y nuestros resultados, nuestra hipótesis se centraría en que la baja metilación de *ID1* (sobreexpresión) se asociaría con tumores de agresividad mayor, que acostumbran a tener peor pronóstico, como son los tumores triple negativos de mama, pero a su vez confiere mayor sensibilidad a la quimioterapia basada en taxanos. Esto coincidiría con el resultado de bajos niveles de metilación de *ID1* en el subtipo triple negativo de nuestro estudio. Para el resto de subtipos de cáncer de mama, no podemos obtener una conclusión firme, puesto que los tumores luminales presentaban heterogeneidad de niveles de metilación del gen y, en el caso de la enfermedad HER2, el número de pacientes analizadas fue muy reducido.

En nuestro estudio, en relación a los resultados de supervivencia se observó una tendencia a una mayor SLP para el subgrupo de pacientes con baja metilación (no metilados) de *ID1*. Esta tendencia se mantiene al hacer el análisis en función de los diferentes subtipos moleculares; siendo en el subtipo luminal mayores las diferencias obtenidas en supervivencia a favor de las pacientes con baja metilación (no metiladas) de *ID1*. Esta tendencia se observó de forma evidente transcurridos los primeros 4-5 años de seguimiento; que corresponden aproximadamente con el periodo de tratamiento hormonal adyuvante. Conocer mejor las características de estas pacientes y el estado de metilación de *ID1* podría ayudarnos a seleccionar a un subgrupo de pacientes de peor pronóstico; y plantear alternativas terapéuticas con intención de mejorar la supervivencia.

En relación a la obtención de respuesta, en nuestra serie de validación no se observan diferencias en función del estado de metilación de *ID1*, al contrario de lo obtenido en la cohorte Discovery: cuando analizamos los resultados de las muestras BRCA del TCGA seleccionadas, observamos que los niveles de metilación de *ID1* diferían entre grupos de respuesta a taxanos de forma estadísticamente significativa. Una posible explicación a que no encontráramos diferencias en nuestra cohorte sería porque los datos eran más homogéneos, y por tanto es más dificultoso observar diferencias, ya que sólo estarían relacionadas con el efecto de la metilación en el tratamiento, reduciendo los factores distorsionantes que pueden venir dados por una población no tan bien caracterizada. Otra posible explicación es que nuestra serie fue tratada con antraciclinas y taxanos, e *ID1* podría tener un papel diferencial para estas dos familias de fármacos, diluyendo así su papel como predictor de respuesta a taxanos.

En el marco de la búsqueda de mecanismos moleculares y objetivos terapéuticos emergentes para el tratamiento del cáncer de mama, *ID1* e *ID3* se posicionan dentro de la lista de genes relacionados con el desarrollo de metástasis del cáncer de mama triple negativo (208). Por tanto, parece que existe una clara asociación entre *ID1* y el subtipo de cáncer de mama triple negativo; abriendo un campo de investigación para conocer realmente qué papel juega en la biología del cáncer de mama este biomarcador y qué relación tiene con la sensibilidad a las diferentes drogas.

Los hallazgos obtenidos en relación al estado de metilación de gen *ID1*, nos podrían ayudar a conocer mejor la biología de un tumor tan heterogéneo como es el cáncer de mama; así como poder diferenciar un subgrupo dentro de éste, que pudiera relacionarse con una mayor sensibilidad a determinados fármacos.

9.2.3 Resultados *HOXB2*

La familia de los genes *HOX*, es un subgrupo de la superfamilia Homeobox, que codifica factores de transcripción y cuyas funciones son cruciales en el desarrollo; regulando numerosos procesos que incluyen la apoptosis, señalización celular, diferenciación y angiogénesis. Se han descrito alteraciones en la expresión de estos genes relacionadas con el desarrollo anormal y la malignidad de las células; por lo que se postula que la expresión alterada de los mismos podría tener un papel importante tanto en la oncogénesis como en la supresión tumoral, según el contexto determinado (209). Es por este motivo, que el gen *HOXB2* podría ser importante en el diagnóstico y el tratamiento del cáncer. A pesar de estos hallazgos, el conocimiento de su papel en el proceso carcinogénico (cómo se regula la expresión de los mismos y cómo estos pueden regular otros factores) es parcialmente conocido.

HOXB2 ha sido valorado como un factor regulador negativo de la proliferación celular (210) en estudios *in vitro*, actuando como gen supresor tumoral. No obstante, y tal y como hemos comentado previamente, los genes *HOX* pueden tener un papel dual, pudiendo ser genes supresores, así como oncogenes. Está descrita una expresión anormalmente elevada de los genes de la familia de *HOX* en tumores de pulmón no célula pequeña (211), así como en melanoma y en otros tumores primarios, postulándose que los genes *HOX* podrían activar vías que suprimen la apoptosis en células cancerosas.

Dentro de los mecanismos descritos de regulación de la expresión de los genes *HOX*, uno de ellos es la desregulación epigenética (por metilación o por modificación de las histonas) que da lugar al silenciamiento de la expresión del gen (209). Este mecanismo es más evidente en los tejidos en los cuales los genes *HOX* funcionan en la supresión de tumores.

Focalizándonos en *HOXB2*, en la mayoría de estudios la sobreexpresión de este gen se ha asociado a una mayor malignidad y peor pronóstico, como es el caso del cáncer de páncreas, cuello de útero y pulmón (212). Estos resultados van en la línea de lo que hemos obtenido en nuestra cohorte de validación, en la que la SLP fue inferior en el subgrupo de pacientes con baja metilación de *HOXB2*, siendo los que tienen mayor expresión del gen. Estas diferencias se observaron principalmente en el subgrupo luminal, no pudiéndose reproducir para el resto de subtipos (HER2 y triple negativo) posiblemente por el bajo poder estadístico por el tamaño muestral y el número reducido de eventos. Específicamente en cáncer de mama, se han descrito diversos genes de la familia *HOX* (*HOXB7* y *HOXB13*) que se muestran sobreexpresados, confiriendo una mayor agresividad y mayor riesgo de recaída (65, 213).

En la bibliografía también se ha observado un incremento de la expresión de *HOXB2* en tumores con receptores de estrógeno positivos, a diferencia de los tumores triple negativos (214). Este

resultado es concordante con nuestros hallazgos, en los que las pacientes con tumores triple negativo, en un 80%, presentaban alta metilación de *HOXB2*, a diferencia del subgrupo de pacientes luminales (60%), asociándose el silenciamiento del gen con tumores de más agresividad, como son los triple negativos. En nuestro estudio, *HOXB2* se mostraría como un gen supresor tumoral que, al ser silenciado, podría dar lugar a fenotipos más agresivos.

De forma interesante, en nuestro análisis hemos observado una diferencia entre el estado de metilación de *HOXB2* y la obtención de respuesta clínica, con mayor metilación en las pacientes respondedoras al tratamiento vs las no respondedoras (mayor frecuencia de no metilación). Estos resultados corroboran los observados en nuestra cohorte Discovery, donde la metilación de *HOXB2* se relacionaba con una peor respuesta. Sin embargo, cuando valoramos específicamente la respuesta completa patológica en nuestra serie en relación al estado de metilación de *HOXB2*, no se mantienen estas diferencias. Una posible explicación de que en nuestra serie no se mantengan las diferencias cuando sólo tenemos en cuenta la respuesta completa patológica podría ser porque en la base del TCGA se incluyen como respuesta tanto la clínica como la patológica, así como diferentes definiciones de respuesta completa patológica, lo que hace más amplio el abanico de pacientes que se pueden clasificar como respondedoras, siendo en algunos casos respuesta completa patológica, pero no en todos. La obtención de una respuesta completa patológica en determinados subtipos de cáncer de mama (triple negativo y HER2 positivo) se ha correlacionado con una mayor supervivencia, de ahí la importancia de desarrollar estrategias y conocer biomarcadores que nos ayuden a predecir aquellos pacientes más adecuados para conseguir una mayor respuesta.

Tras disponer de la información de ambos genes (*ID1* y *HOXB2*) se realizó un análisis de la combinación del estado de metilación de *ID1* y de *HOXB2* en 40 pacientes para valorar si existía sinergia entre ambos como potenciales biomarcadores de predicción de respuesta al tratamiento. Como recordatorio de los resultados previos, *ID1* fue seleccionado a partir de las muestras del TCGA BRCA de pacientes tratadas con taxanos, y *HOXB2* fue seleccionado de la cohorte de BRCA del TCGA tratadas con antraciclinas. Los resultados del análisis de la combinación de ambos en nuestra serie mostraron que para el subgrupo de pacientes con estado de *ID1* metilado y *HOXB2* no metilado la SLP era inferior al resto de subgrupos, de forma estadísticamente significativa y resultado independiente del resto de variables. El subgrupo de mal pronóstico (*ID1* metilado y *HOXB2* no metilado) estaba formado por 3 pacientes luminales. Con estos resultados, se define un subgrupo de pacientes luminales de muy mal pronóstico en relación al resto. Revisando los resultados obtenidos de ambos genes por separado, los pacientes con *ID1* metilado tenían peor pronóstico y en el caso de *HOXB2* el subgrupo con peor pronóstico era para aquellos pacientes sin metilación del gen; por tanto podría ser lógico pensar que la combinación de estos dos factores determinaría un grupo de peor pronóstico, tal y como se ha demostrado al realizar el análisis combinado, sugiriendo que podrían

tener un papel sinérgico. La posible relevancia de estos datos para la selección de un subgrupo de pacientes luminales de peor pronóstico debería validarse en otras series retrospectivas y de forma prospectiva.

Con respecto a la SG en el análisis de la combinación de los dos genes no se observan diferencias entre subgrupos, a pesar de que se mantuvieron los peores resultados para el subgrupo definido de mal pronóstico (*ID1* metilado y *HOXB2* no metilado). Hemos de tener presente que la SG no debe considerarse como un correcto marcador de respuesta, dado que se ve influenciado por los tratamientos posteriores que reciben las pacientes, y asimismo posiblemente no se haya realizado un seguimiento suficientemente largo para observar diferencias en la SG.

Poder conocer mejor la regulación epigenética de la expresión de los genes *HOX* colaboraría a explicar de manera similar los mecanismos de la oncogénesis y también sugeriría el posible uso complementario adecuado de terapias modificadoras epigenéticas como la DnA metiltransferasa (DnMT) e inhibidores de la histona desacetilasa (HDAC).

9.2.4 Resultados *ATOH8*

ATOH8 es un factor de transcripción de la familia hélice-bucle-hélice básica (bHLH), que participa en la embriogénesis y el desarrollo de diversos tejidos (215). Varios estudios han demostrado que *ATOH8* está involucrada en la progresión de tumores malignos (216). Al igual que sucede con otros genes, la función de *ATOH8* es controvertida, pudiendo tener un papel dual (función de gen supresor y oncogen). En este sentido, la expresión de ARNm de *ATOH8* se ha visto disminuida en diversos tumores (nasofaríngeo, vejiga y carcinoma hepatocelular); pero a su vez, se ha visto elevada en otros tipos de cáncer, como el de próstata, glioblastoma y cáncer de mama, considerándose en este caso un oncogen (217). En una publicación reciente, se ha observado que una elevada expresión de *ATOH8* en pacientes con cáncer colorrectal se relacionaba con niveles más elevados del antígeno carcinoembrionario (CEA), dando lugar a una peor supervivencia global (218). De forma contradictoria, en hepatocarcinoma, se ha descrito el papel de *ATOH8* como gen supresor de tumores, siendo su baja expresión relacionada con quimiorresistencia y una peor supervivencia global (219).

En nuestro estudio, a pesar que el análisis de pironecuenciación sólo pudo realizarse en 23 muestras por el escaso material disponible, se pudieron reproducir los resultados observados en la cohorte discovery TCGA en relación a la respuesta al tratamiento, como se detalla más adelante.

Al comparar los diferentes subtipos, se observó una diferencia estadísticamente significativa de los valores de metilación de *ATOH8*, siendo todas las pacientes triple negativas, clasificadas dentro del

subgrupo de baja metilación. Este hecho y teniendo en cuenta su potencial papel oncogénico descrito en cáncer de mama, mencionado previamente, podría ser explicado porque la alta expresión de *ATOH8* podría conferir mayor agresividad al tumor (como es el caso de los tumores triple negativos).

Por otro lado, a pesar de disponer de esta característica de agresividad, las pacientes no metiladas mostraron una tendencia a tener una mejor SLP. Este resultado podría explicarse por el efecto de la expresión del gen en mayor sensibilidad al tratamiento con quimioterapia basada en taxanos; como se demuestra al analizar el estado de metilación y la obtención de respuesta al tratamiento, tanto en la cohorte Discovery como en la de validación. En esta última, se observaron diferencias estadísticamente significativas en relación a la obtención de respuesta completa patológica en el subgrupo de paciente no metiladas (N=19), que en su mayoría eran triple negativas, vs las metiladas. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos en la cohorte discovery TCGA. Asimismo, sabemos que la obtención de respuesta completa patológica en la enfermedad triple negativa se traslada a una mayor supervivencia, que es la tendencia que hemos observado en nuestro set. A pesar de que la N de este análisis es muy reducida y que la interpretación de los mismos debe realizarse con cautela, los resultados van en la línea de la literatura y validan los resultados observados en el análisis con la cohorte de TCGA.

Para el resto de variables clínico-patológicas no se obtuvo una correlación en función del estado de metilación de *ATOH8*. Asimismo, al combinar el estado de metilación de *ATOH8* con el de los otros dos genes candidatos (*ID1* y *HOXB2*) no se encontraron diferencias en relación a la SLP ni con otras características clínico-patológicas. Se tiene que tener en cuenta que únicamente se pudo realizar el análisis en las 23 muestras de las que se disponían los resultados de *ATOH8*, por lo que el número de brazos para las combinaciones (16 brazos), era demasiado extenso para la población analizada, quedando para cada brazo con N muy pequeñas, por lo que no podemos obtener resultados concluyentes de la posible utilidad de la combinación como set de biomarcadores conjuntos.

Finalmente, y con el fin de poder conocer con más precisión el efecto biológico de la metilación de los genes analizados, éste se debería correlacionar con la expresión de las proteínas para las cuales codifican. Para los tres biomarcadores seleccionados (*ID1*, *HOXB2* y *ATOH8*) esta determinación se puede realizar mediante técnicas de inmunohistoquímica. La metilación del promotor es un mecanismo que puede regular la expresión de los genes, pero existen muchos otros, como son las mutaciones, deleciones, etc. que podrían justificar la expresión o no del gen independientemente del estado de metilación. Por tanto, para poder completar el análisis y confirmar que la metilación de los genes está afectando directamente a la expresión de las proteínas, está previsto realizar la determinación de la expresión de proteínas en los tejidos de las pacientes incluidas en la cohorte

validación ICO, para las que disponemos de los datos de metilación, mediante técnicas de inmunohistoquímica. La elección de la detección mediante técnicas de inmunohistoquímica está basada en que se trata de una técnica accesible en la práctica clínica diaria, y por tanto esto favorecería una futura implementación de los biomarcadores seleccionados como factores pronósticos asociados a diferentes subtipos y a la respuesta a determinados tratamientos. De todas formas, a pesar de valorar la determinación de la expresión de las proteínas, y que ésta se correlacione con el estado de metilación, debemos tener en consideración que la metilación del gen regula la expresión, pero no la funcionalidad de la proteína.

9.3 Discusión global

De forma general y para resumir el trabajo presentado, nuestros objetivos fueron evaluar el impacto de los parámetros clínico-patológicos en el diagnóstico y manejo del cáncer de mama, en la era de la clasificación molecular con el uso de plataformas génicas, así como identificar nuevos biomarcadores para optimizar la terapia personalizada de las pacientes candidatas a recibir neoadyuvancia. Para esto, se optó por los biomarcadores epigenéticos, ya que tienen un papel importante en el desarrollo carcinogénico y su naturaleza reversible los hace candidatos interesantes para la detección de nuevas estrategias terapéuticas.

Para poder desarrollar nuestros objetivos, partimos de una muestra seleccionada de pacientes con cáncer de mama, que englobaba todos los subtipos caracterizados mediante técnicas de inmunohistoquímica y FISH, tratadas en nuestro centro con quimioterapia neoadyuvante basada en la combinación de antraciclinas y taxanos.

Inicialmente se realizó un análisis retrospectivo de las características clínico-patológicas de la muestra y se correlacionaron estos resultados con la supervivencia y otras variables clínico-patológicas. Ante los resultados obtenidos, y pese a la no disponibilidad de acceso a una clasificación molecular del cáncer de mama basada en firmas genéticas, la evaluación de las características clínico-patológicas previo al tratamiento neoadyuvante y en la enfermedad residual, continúa siendo una herramienta imprescindible para la correcta toma de decisiones terapéuticas y la optimización del tratamiento oncológico.

Posteriormente se prosiguió con la búsqueda y determinación de biomarcadores epigenéticos. La intención inicial del proyecto de tesis fue realizarlo mediante técnicas de microarray en nuestra propia serie, pero en el momento de realizar el análisis se detectó que la calidad de las muestras era insuficiente para poder realizarlo. En este momento se tuvo que reorientar el trabajo para poder obtener biomarcadores mediante otras técnicas que no requerían una calidad tan exigente, dirigidas al análisis de genes específicos (pirosecuenciación). Se valoró la posibilidad de utilizar bases de datos

públicos (en este caso se utilizó TCGA), para poder partir de una cohorte Discovery, con datos de metilación disponibles, y poder así validarlo posteriormente en nuestra cohorte. Finalmente se pudo realizar de esta manera pudiendo seleccionar tres biomarcadores (*ID1* y *ATOH8* para la respuesta a taxanos; *HOXB2* para la respuesta a antraciclinas), mediante técnicas de bioinformática. Éstos fueron validados por análisis de pirosecuenciación en la cohorte ICO, determinando su potencial papel en la selección de tratamiento y el pronóstico de las pacientes con cáncer de mama en estadios localizados. La identificación de estos tres biomarcadores, abre la posibilidad de continuar con la profundización del papel de estos genes, así como de las proteínas para las que codifican, en la naturaleza del cáncer de mama y su manejo personalizado. Posteriores estudios funcionales utilizando modelos pre-clínicos, podrían elucidar el papel de los genes en la tumorigénesis de los diferentes subtipos, centrándonos en el triple negativo, y los mecanismos de respuesta a los fármacos en los que intervienen. A nivel traslacional, se trata de resultados muy tempranos, con un valor limitado por el carácter retrospectivo del trabajo y el limitado número de muestras, que requieren de una validación en nuevas series retrospectivas más amplias y seleccionadas; y de confirmarse los resultados en series prospectivas para evaluar su potencial impacto en la clínica.

De toda la experiencia obtenida en esta tesis doctoral, mencionar la importancia de tres puntos claves: En primer lugar la disponibilidad de las muestras. La importancia de disponer de suficiente cantidad de material y, que sobretodo, éste sea de suficiente calidad para poder realizar cualquier tipo de análisis molecular, tanto a nivel de moléculas individuales como de alto rendimiento. En segundo lugar, la importancia del libre acceso a la información, que permiten estudios *in silico*. La información extraída de los análisis de alto rendimiento de las diferentes publicaciones debería ser compartida y estar al alcance de todos los investigadores, siempre preservando la confidencialidad de los pacientes. Gracias a las grandes bases de datos derivadas del análisis de *Big Data* (y en nuestro caso a los datos del TCGA), se pudo reorientar el proyecto y seleccionar potenciales biomarcadores epigenéticos para su posterior validación por técnicas gen-específicas.

Y en tercer lugar, la utilidad de las herramientas de bioinformática y bioestadística para poder hacer frente a toda la información de que se dispone actualmente, y poder seleccionarla correctamente en base a los criterios que se plantean en el estudio, como en este caso, que se utilizaron para filtrar los resultados y poder seleccionar las CpG de los genes que cumplieran las premisas que se definieron. Estas herramientas representan un nuevo paradigma en la investigación traslacional en cáncer, siendo ya, en algunos casos, aplicadas como herramientas diagnósticas en la práctica clínica.

Tipificación de biomarcadores epigenéticos en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado como factores pronósticos de la evolución de la enfermedad y predictivos de respuesta al tratamiento con quimioterapia neoadyuvante

10 Conclusiones

Referente a los objetivos secundarios:

Pese a la no disponibilidad de acceso a una clasificación molecular del cáncer de mama basada en firmas genéticas, la evaluación de las características clínico-patológicas previo al tratamiento neoadyuvante y en la enfermedad residual, continúa siendo una herramienta imprescindible para la correcta toma de decisiones terapéuticas y la optimización del tratamiento oncológico. En nuestro caso nos ha permitido definir: un subgrupo de pacientes compatibles con subtipo luminal A que presenta un mejor pronóstico; un subtipo triple negativo, con peor pronóstico, pero con mayores tasas de respuesta completa patológica que se correlacionan con una mayor supervivencia; y, un subtipo HER2 con altas tasas de respuesta completa patológica tras terapia antiHER2 en combinación con quimioterapia.

La obtención de respuesta completa patológica para cualquiera de las dos definiciones analizadas (ypT0N0 y ypTisN0) se asoció a una mayor supervivencia libre de progresión; mientras que la persistencia de gran volumen tumoral en la mama (ypT4), la persistencia de enfermedad ganglionar, así como la presencia de enfermedad residual grado III, se relacionaron con una peor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global, siendo la negatividad de los receptores hormonales (RE y RP), el grado histológico alto y el índice de proliferación elevado los factores clínicos con mayor correlación con la obtención de respuesta completa patológica.

Referente al objetivo principal:

A partir del análisis epigenético, se concluye que la hipometilación de *ID1* y *ATOH8* se asocia con subtipos de cáncer de mama de mayor agresividad (triple negativo). Además, la hipometilación de *ATOH8* se asocia con una mayor tasa de respuestas completas patológicas y con una tendencia a una mayor supervivencia libre de enfermedad; sugiriendo su posible papel como factor predictivo de respuesta. A su vez, la hipometilación de *HOXB2*, detectada mayormente en subtipos luminales, se asocia a una menor tasa de respuesta y a una peor supervivencia; posicionándose como un posible factor predictivo negativo y de peor pronóstico en cáncer de mama luminal. Se observa una sinergia entre el estado de metilación de *ID1* y *HOXB2*, que permite definir un subgrupo de pacientes luminales de peor pronóstico.

Se ha podido demostrar la utilidad de las plataformas epigenéticas con finalidad de seleccionar potenciales biomarcadores en cáncer de mama. Para poder llegar a la determinación de éstos, cabe

destacar la importancia de la disponibilidad de un material de buena calidad, del soporte de la información disponible de libre acceso, de las herramientas de bioinformática y sobretodo del trabajo multidisciplinar en equipo.

11 Líneas de investigación futura

Fruto de los resultados de este estudio, surge la necesidad de continuar investigando en esta línea y poder así profundizar en el conocimiento, el papel y las posibles implicaciones de estos tres potenciales biomarcadores epigenéticos en el desarrollo del cáncer de mama.

No obstante, se deberían correlacionar y validar los resultados obtenidos en una serie retrospectiva de mayor tamaño muestral, así como diseñar un estudio prospectivo para demostrar su robustez para una futura aplicación en la práctica clínica. Asimismo y de forma paralela, se comenzaría a investigar en base a las premisas obtenidas en nuestro estudio, de la siguiente manera:

Correlacionar el efecto biológico de la metilación de los genes seleccionados, mediante el estudio de la expresión de las proteínas para las cuales codifican. La expresión proteica de ID1, HOXB2 y ATOH8, podría analizarse mediante inmunohistoquímica en la misma cohorte ICO de validación. Este paso es imprescindible para poder confirmar el efecto biológico que la metilación del gen tiene finalmente en la expresión de la proteína que codifica, aunque debemos de tener en consideración que existen múltiples mecanismos que pueden afectar a esta regulación.

Búsqueda de moduladores epigenéticos: cabe destacar la importancia de la potencial reversibilidad de las alteraciones epigenéticas, motivo por el que se podrían desarrollar modelos preclínicos de cáncer de mama, en los que se realizarían ensayos funcionales basados en el estado de metilación de los tres biomarcadores seleccionados para correlacionar su acción y papel en el desarrollo del cáncer de mama y los mecanismos celulares de respuesta a los taxanos y/o antraciclinas, pudiendo así determinar nuevas dianas terapéuticas o nuevas combinaciones más óptimas.

El objetivo final del trabajo es mejorar en el conocimiento de la biología del cáncer de mama, a través del estudio de los biomarcadores determinados en esta tesis, para poder entender su potencial papel en la práctica clínica en la selección de pacientes, identificación de nuevas dianas terapéuticas, y finalmente conseguir incrementar la supervivencia.

Tipificación de biomarcadores epigenéticos en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado como factores pronósticos de la evolución de la enfermedad y predictivos de respuesta al tratamiento con quimioterapia neoadyuvante

12 Fortalezas

La recogida de toda la información en relación a las características clínico-patológicas se realizó con todo detalle y precisión. El hecho de tratarse de una serie antigua ha permitido obtener información y seguimiento suficiente para disponer de datos de supervivencia, siendo imprescindible este seguimiento a largo plazo en pacientes con cáncer de mama, para poder observar diferencias.

Los resultados obtenidos en el apartado general están completamente alineados con lo publicado en la literatura, dándoles así robustez, y creando una buena base de datos clínica para la validación de los biomarcadores seleccionados, resultado del estudio epigenético in silico

Las técnicas utilizadas, tanto en análisis bioestadístico para la selección de los biomarcadores, como en la realización del análisis epigenético (pirosecuenciación), se han basado en estándares de calidad pre-establecidos, con la finalidad de poder obtener los resultados más fiables posibles.

Y finalmente como fortaleza remarcar la capacidad de reorientar el proyecto de tesis, cuando la calidad de las muestras de la cohorte ICO no permitió realizar el análisis epigenético mediante técnicas de microarrays, se decidió utilizar una base de datos pública para realizar la selección de potenciales biomarcadores epigenéticos de respuesta a quimioterapia mediante estudios in silico, usando herramientas de bioinformática/bioestadística para poder llevarlo a cabo.

Tipificación de biomarcadores epigenéticos en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado como factores pronósticos de la evolución de la enfermedad y predictivos de respuesta al tratamiento con quimioterapia neoadyuvante

13 Debilidades

Una de las principales debilidades del proyecto es que se trata de un estudio retrospectivo, y con un número de pacientes limitado, y que, por tanto, requiere de una posterior validación prospectiva con un tamaño muestral mayor. A pesar de ello, como se comenta en el apartado de Fortalezas, la muestra seleccionada fue muy representativa de la población a estudio.

El hecho que más dificultades añadió a la elaboración del proyecto, fue el estado de calidad de las muestras. Al tratarse de muestras muy antiguas, incluidas en parafina, no se conocía el estado de degradación del material genético hasta el momento de realizar el análisis. Esto es en parte por la menor conciencia de la importancia de la conservación de las muestras en el momento que fueron incluidas, y en parte por el tiempo transcurrido, que facilita la degradación del material. Las muestras parafinadas acostumbran a conservar material de baja calidad pero las técnicas de alto rendimiento actuales están adaptadas a este tipo de muestras. No obstante, en nuestro caso, el material estaba demasiado degradado, hecho que hizo que se tuviera que reorientar el análisis y plantear el uso otras técnicas, dirigidas a un gen específico, como es la pirosecuenciación, de alta fiabilidad pero aplicables a material de muy alta degradación.

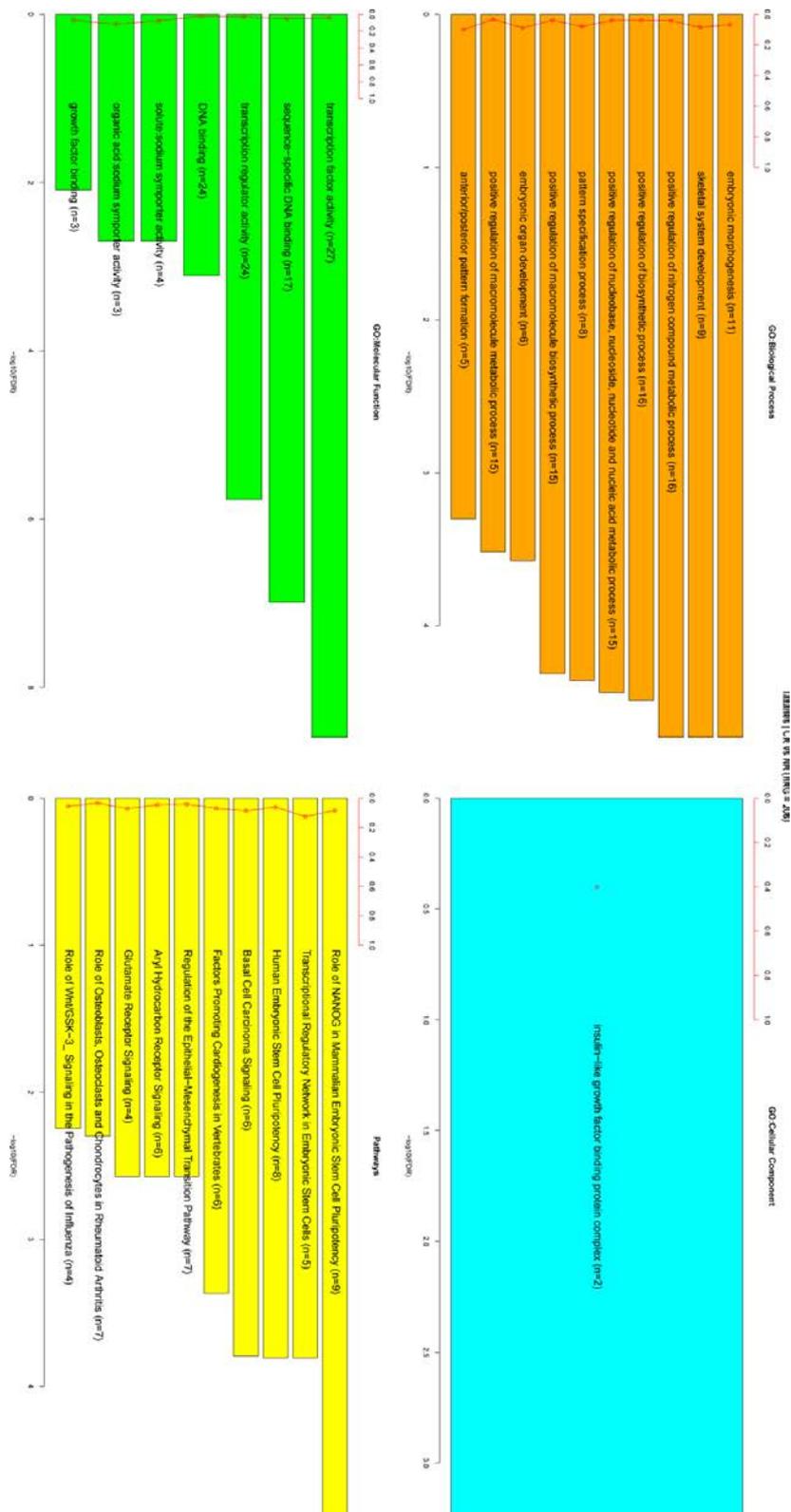
En relación a la disponibilidad de las muestras, a parte de la calidad de las mismas, en muchos casos la cantidad también fue insuficiente, o se fue agotando a medida que se realizaban las diferentes determinaciones por pirosecuenciación de los genes seleccionados en un inicio. Esto determinó la reducción del tamaño muestral y, por tanto, también la robustez de los resultados derivados del análisis de validación, viendo en ocasiones tendencias sin obtener una significación estadística.

Finalmente, y a pesar de la gran cantidad de información que se puede extraer del TCGA, hemos de recordar que los datos de ésta provienen de muy diversas fuentes, motivo que hace que pueda ser una muestra heterogénea y en ocasiones con menor similitud a la que se quiere comparar. Puede ser este uno de los motivos por los que en la cohorte de validación no hayamos podido validar la relación de *ID1* con la respuesta al tratamiento, y obtener tendencias no estadísticamente significativas en las correlaciones con la supervivencia libre de progresión en muchas ocasiones.

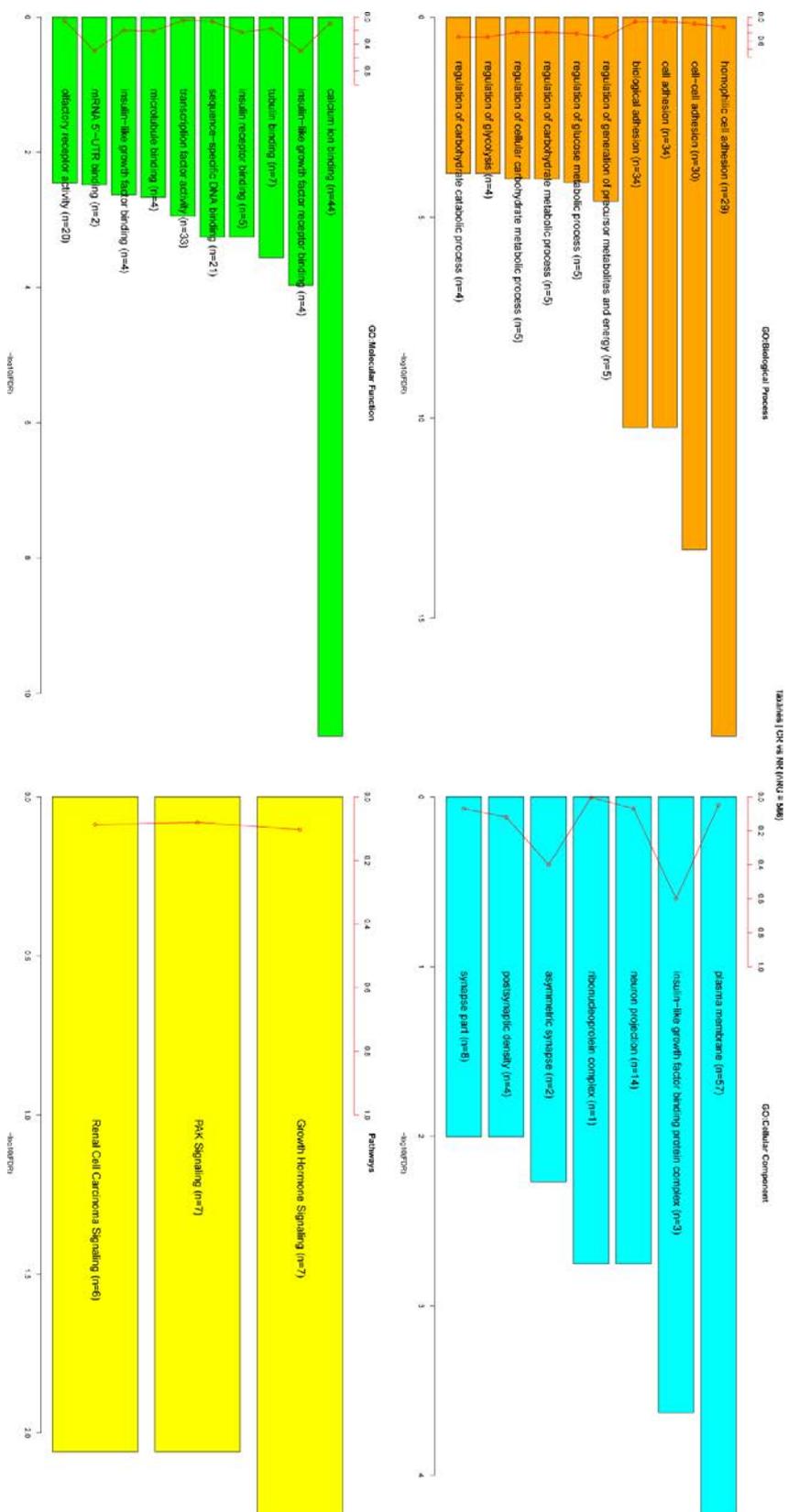
Tipificación de biomarcadores epigenéticos en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado como factores pronósticos de la evolución de la enfermedad y predictivos de respuesta al tratamiento con quimioterapia neoadyuvante

14.2 Análisis ontológico de los genes seleccionados de la cohorte “discovery” del TCGA

Anexo 2. Análisis de enriquecimiento por ontología génica. Cohorte “discovery” TCGA tratada con taxanos



Anexo 3. Análisis de enriquecimiento por ontología génica. Cohorte “discovery” TCGA tratada con antraciclinas



14.3 Descripción de la elaboración de los *primers*, puesta a punto PCR y resultados gel de agarosa.

Anexo 4. Descripción de la elaboración de los *primers* para los genes seleccionados; descriptivo de la puesta a punto de las PCR para la amplificación de los amplicones y resultados de los geles de agarosa para la amplificación de los genes seleccionados.

ATOH8

CG2439924, CG01472882

CCACAGCTACCATTGACCGACCGTTCCCTATGTGCCCTAGTGCTTTAATTCCCTCAGAGC
 AATGCTGTGACTTAGGCGTTGTTCTCCGAATTTCTCATTTCACAGATGAGTAAATCCC
 GGTITAGCAGGGCGCCTGGAGTGAGGTGACTGCGGAGGCTCGCAGACGTTAGGTC
 TGCCTAAATCCGAAGCTTCCACCCCTCCTCTGCCTCTGTGACTTGCTGCGTGACTTTGG
 AGCTTTCGGAAACTCAGTTTCCCTGTCTTAAGCCCTCTGCTCCTCTTGCTTTCCCGCTC
 CAGCAAGTGAGAGTGGACTGGGTTGCCGTGCCGGGCGGGTGTGGGTCCCGGGC
 AACTCCGAGTCTCCCCTTCCCATCGGCCCCAGCAGAAGTCCAGCTCCCGGCGT
 TTTCTGTCTCGTGGCGAGTTGGGGCGGAGGGAGCGGCGGGAAGGTGCCGGGTGG
 GCAAGGTCCGAGCTGCCGCACCGAGAGGCCCGGCAAGGCCAGGGAGAAAAGGCCCC
 GCTGTGATTTGGGGAAGGGCCGGGGGCCATAAGTCACTGTCTCGGGGCGGTTGT
 GCAGGAGCGGACTGTCTCTGGGAACATAGAAGCGCCCCGACTAGAGTAGGGGC
 GGGGAGGGAGCGCGGAGGAGGCAGGTTCTGGGCCAAGGGGATGGGGGTGGGG
 GGGAGGTAGGGAGCCCGCGGACAAAGGAGGCGGCCGCGGCCCCAGCTGTTTTGA
 AAAATGCTTCTGTTTCTTTAAAGGCGCTCGCGGCTCGGGCGGCC

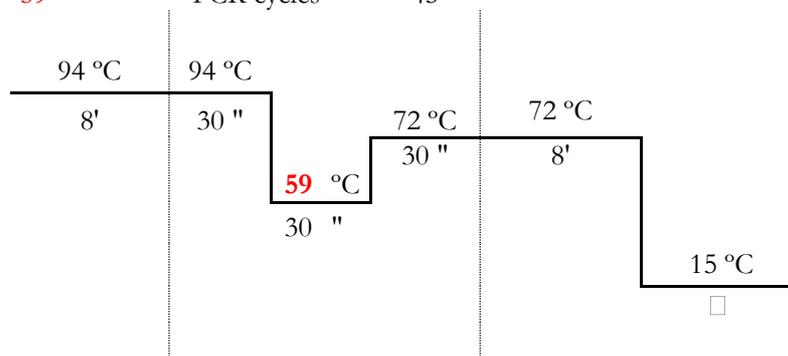
Primer Set 1			Score: 64 Quality: Medium		
Primer	Id	Sequence	Nt	Tm, °C	%GC
➔ PCR	F1	[Btm]GAGAGTGGATTGGGTTGT	18	58.5	50.0
➔ PCR	R1	AAACCTTTTCTCCCTAACCT	20	58.9	40.0
← Sequencing	S2	AAAACATAAACTTCTACTAA	20	39.6	20.0
Target Polymorphisms	Position19, Position20				
Sequence to Analyze	A A ACCRATAA AAAAAAAAAA ACTCCRAAAT TACCCRAC				

amplicón de 211 bp

Condiciones de PCR que dan amplificación de la banda:

T° m (°C) = 59

PCR cycles = 45



ID1

CG09923107, **CG00494337**

A**CG**AGCAGCAGGTA**AAACG**TGCTGCTCTA**CG**ACATGAA**CG**GCTGTTACTCA**CG**CCTCA
 AGGAGCTGGTGCCACCCTGCCCCAGA**ACCG**CAAGGTGAGCAAGGTGGAGATTCTC
 CAGCA**CG**TCAT**CG**ACTACATCAGGGACCTTCAGTTGGAGCTGAACT**CG**GAAT**CG**AA
 GTTGGAAACCC**CG**GGGG**CG**AGGGCTGC**CG**GT**CG**GGCT**CG**CTCAGCACCCCTCAA
CGGCGAGATCAG**CG**CCCTGAC**CG**G**CG**AGGTGAGATCCAGAT**CG**ACCACTAGATCA
 TCCTTATAC**CG**A**CG**GGGAA**ACCG**GAGGCCAGAGAGGG**CG**TGGG**CG**CTTGCACCACTT
CCGTCCCATCCTTG**CG**GGTACCTGGCTATG**CG**GGGGTGCCTAAGGAGCCTGGAAAA
 AG**CG**CTCC**CG**T**CG**TGCTTCTGGGGAAGGGGG**CG**TT**CG**CTG**CG**CT**CG**GAG**CG**
CGTCCCTTCCAACC**CG**CGGTCTCATTCTTCT**CG**TTTTACAGG**CG**GCATG**CG**TTCC
 TG**CG**GA**CG**AT**CG**CATCTTGTGT**CG**CTGAAG**CG**CCTCCCCAGGGAC**CG**G**CG**GACCC
 CAGCCATCCAGGGGGCAAGAGGAATTA**CG**TGCTCTGTGGGTCTCCCCAA**CGCGCC**
TCGCGGATCTGAGGGAGAACAAGAC**CG**AT**CGGCG**GCCACTG**CG**CCCTTAACTGCA
 TCCAGCCTGGGGCTGAGGCTGAGGCACTGG**CG**AGGAGAGGG**CG**CTCCTCTCTGCA
 CACCTACTAGTCACCAGAGACTTTAGGGGGTGGGATTCCACT**CG**TGTGTTTCTATTT
 TTTGAAAAGCAGACATTTAAAAAATGGTCA**CG**TTTGGTGCTTCTCAGATTTCTGAG
 GAAATTGCTTTGTATTGTATATTACAATGATCAC**CG**ACTGAAAATATTGTTTTACAAT
 AGTTCTGTGGGGCTGTTTTTTTGTATTAAACAATAATTTAGATGGTGGTAAAGTT
 GTAGTGACTTCTTGGGTTGAGGGGAGGGCCTGGGCTGGGGGTGACCCCTGACC
 CTCTTACAGCTGGTTCTGGGAGGAGAATTGGAGGGCTACATCTGGATTGTTGCTC
 TTAC**CG**GCTGAATGAGTGT**TCGG**TGCTTTAAAGTCTATTCTTCCCCACCATCC
 CTGCCATTTCCTGCTCCCCAGTGTTATAAACTAAATACTCCAGACCTCTGGGGTT
 TCTCACAGTGATCATTGGGCCATCTAGATCACCTGGGGAGGTTGTTAAAATGCAGAT
 GAACCTGCCAGGGCCCCCTCTGTATTGGGAGTATTGAGCAAGCCATTTAAGTTGGA
 GAACCTGG**CG**CTGGACCACCACTTCCTTG

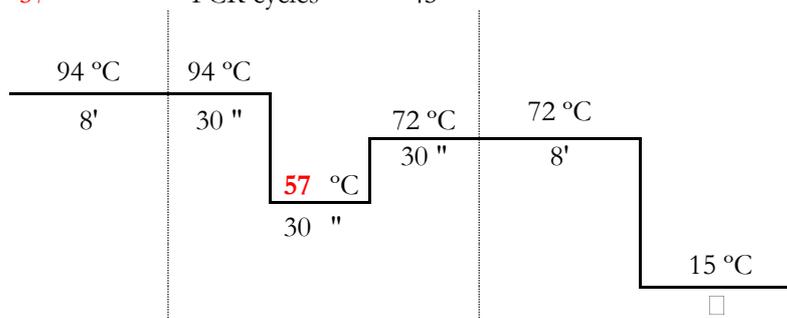
Primer Set 1			Score: 82 Quality: Medium		
Primer	Id	Sequence	Nt	Tm, °C	%GC
↳ PCR	F1	TTAGTTATTTAGGGGGTAAGAGGA	24	58.4	37.5
↶ PCR	R1	[Btm]TCAACCTCAACCCAAACTAAA	22	59.8	40.9
➡ Sequencing	S1	GGATTTGAGGGAGAATAAG	19	46.7	42.1
Target Polymorphisms	Position56, Position57, Position58, Position59				
Sequence to Analyze	ATYGATYGGY GGTTATTGYG TTTTAAATTG TATTTAGTTT GGGGT				

amplificación 135bp

Condiciones de PCR que dan amplificación de la banda:

T° m (°C) = **57**

PCR cycles = 45



CD74

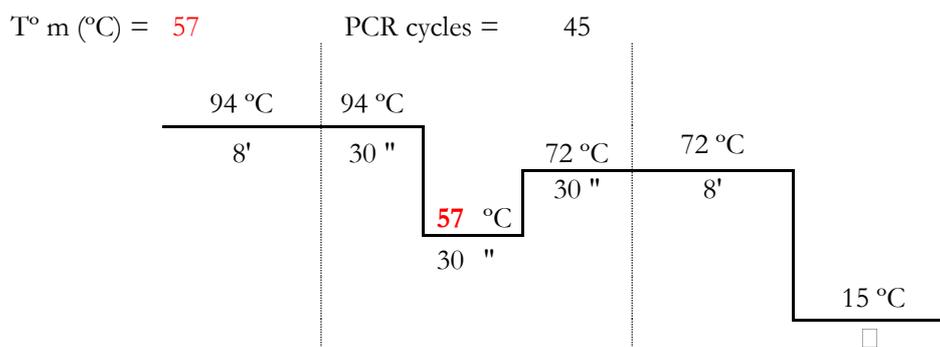
CG19966212, CG11619961

ATTGGCTGCCAGGGCCCTCATCACTTGTTCCTGGGCAGGCCCTTGGATTCATAAAGC
 CTCTTTGAATGTTTCAAGAAACAGGCCAAATGTCCACTCCCTAGACAGGAAAGCACTT
 TGAAACAGAAGACACCTTTGTTTGTCTCCCTTCTCATCCACAGATGAGTGGGTGCA
 GAAAGGGGCTGTGCACCCCTGGTGAGCTCAGACAAGTCCTCTTCTCTGGCCTCCGTT
 ATGT**CG**TCTCAAACA**CG**CAGGAGGAAGTTTGGAA**CG**A**CG**TGCAGGGGGTGAAAACATT
 TCTTTTCTTTCCCTGTTT**AG**GTCTT**AG**TTGACA**CG**CTCCCCTGGAAACAAAAGTCAA
 CTTAACAAAAGAAAAATCAGCCAAAGTTGATTAACACATGCTGTACCCATTATGCAG
 TAGAGGCCTCAGTTGAGAAGTATTTCTCTCTCAAGGCAGTGGCTTAGGGGCCCTTGC
 TTAATAGTATTTTAAACAAAGAGCC**CG**TAAGTCCCATAGAGTGACAGGACAGAGAAG
 AGGATATCTTCAGGGTTCCAAAGGGCTGGAAATGTGGGAAGGTGAATGTATGGGA
 ACAGTCAAGTCTGA

Primer Set 1			Score: 83 Quality: Medium		
Primer	Id	Sequence	Nt	Tm, °C	%GC
↘ PCR	F1	AAGGGGTTGTGTATTTTGGTGA	23	61.3	39.1
↙ PCR	R1	[Btm]CTTCTCAACTAAAACCTCTACTACATAAT A	30	58.4	30.0
→ Sequencing	S1	GTAGGAGGAAGTTTGG	16	45.6	50.0
Target Polymorphisms	Position4, Position5				
Sequence to Analyze	AYGAYGTGTA GGGGTGAAAA TATTTT TTTT T				

amplificón 246bp

Condiciones de PCR que dan amplificación de la banda. En este caso no se consiguió amplificación en el tejido parafinado.



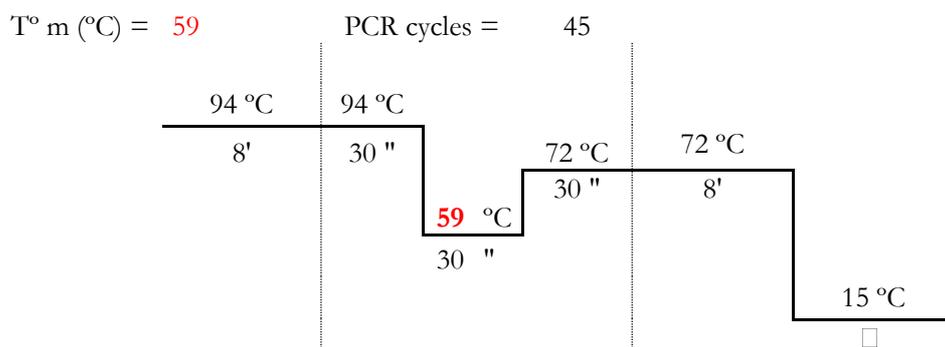
HOXB2

CG26841048, CG22777724, CG23530553

CGTATGGGGACTCTCTCTATTAACCCAGGACTCCAG**CG**AAATTACAGGGAATT**CG**T
 GGTCAC**CG**GGAC**CG**GCCTC**CG**CCAATCCTCTCAAATTCAAAATTCATGGCTTTCAATG
 GTGGGGGAGGGGGCTGCTGGGGGGGG**CG**TCAGGAGGGAGGAT**CG**GAAGGGACC
 CCCCTCTGCACCCCCC**CG**ATTTATGTAATGGAG**CG**ATTTTGGGAGGGGGAGATTT
CGGTCTCTCTTTTTTTTAAATTTGGGCCTTTATAATTTGTATATTGCTGATAAATAACA
 G**CG**TATGGGGACTCTCTCTATTAACCCAGGACTCCAG**CG**AAATTACAGGGAATT**CG**
 TGGTCA**CG**GGAC**CG**GCCTC**CG**CCAAT**CG**CT**CG**TCTGGGCCTGGTGGAAAACAGAGA

amplificación a 240bp

Condiciones de PCR que dan amplificación de la banda:



FAM198B

Cg03450635, cg024170465

TACTCACCTTACCATCTTGGC**CG**TTTCATTTGTCCTTCCACCAGTTCTGGAAAGAGAAG
 GCCTAGAAGTTCAGAAAAAAGGTAAGAAAGAGTTAATATAAATGAGGAGAAAAA
 TAGAACAGTGAGATAAGAGTACACACAGATAAGGAAAGACATTTATAGTGTGCAAT
 TGCA**CG**GTGCAACAGTTCACAAAAGGAAGT**CG**TGGATTCTCTCTGATTGGAGGTTTT
 TTGAAAAAACAGGTTAGGGATTGGCCTGGGTGGTTTG**CG**TGTCCTAGCACAAAGGC
 AGGGGCTGATGACCTTGGGGTGTCAATTAGACTATGGCAAATAGAATCAAAAGGCA
 AGAAGACAGAAAGGGGACAGGGATTTTCCTCCCACAGAGAAAGAAAGTTGTGAT
 ACTGAAGAGTGGGTAAAAGATTAGCATATGGTGTATAATCCTAAAAATACTATATTT
 TACAATGCAAAAA

Primer Set 1			Score: 77 Quality: Medium		
Primer	Id	Sequence	Nt	T _m , °C	%GC
→ PCR	F1	ATGAGGAGAAAAAATAGAATAGTGAGATA	29	59.0	27.6
← PCR	R1	[Btm]ATCATCAACCCCTACCTTATAC	23	59.1	39.1
→ Sequencing	S1	GGTGTAAATAGTTTATAAAAGGAAG	24	46.2	29.2
Target Polymorphisms	Position3				
Sequence to Analyze	TYGTGGATT T TTTTGATTG GAGGTTTT				

amplificación 196bp

No disponemos de los resultados de las condiciones óptimas para realizar la PCR, pues no se pudo amplificar la banda. Se realizaron pruebas con diferentes condiciones de PCR (T_m °C: 59, 57 hasta 54) sin éxito.

PCDHB12

Cg15548198, cg17007628

TGAATTCCTGGGAGCCAGGGATCACATCTTGTATCTGTGTTTACCACAACCTGAACAC
 ATTTGGTTGTGAGAAGAGTGGGGAAAGACACTGAATAAATGCTTTAAAACAAAATC
 ATCATCACAACCTATAAAGAATATAAAA**CG**ATTATTATGGAAGATAAAATATATTTTT
 AATTACTTCAACAGAAGGAATTATTTAAA**CG**CAATATTTATTTGCTTCTGGAGGACAT
 TTATGTAATAAAATTTAGGTAGTGTTCATCAAACCTGTGAAAATCTGTGGAGA**CGCG**

TGGTGGCGCTGCAGGATAATATCAAGAAAAAATTTACCCTGGAGGATGTTGTAGAC
 CCTGTTATCCAGTACA**CGCG**GAGAACTGGGAAGACAGAAAGAACAATCCTTTAAGG
 GAGAACCTAGAAGCCATTCAACAAGGTTAAAATCITTCAGGCTTC**CG**AGGATTTGGTA
 GACAGATCAGAGGCA**CG**TTTCCCACAAC**TC**GAAGAGG**CG**CTGAGGCAATTCTGCA
 AGAAGATTTTGGGGTTTGGAAAAGAAAGCTATGGAAAA**CG**GAGGGGCAGGCACTC
 TGCAGATAAGGCAAGTCCTGCTTTTCTTTGTTTGGCTGGGAATGTCTCAGG**CG**GGCT
 CTGAAACTGGGAAC**TT**TTTGGT**GAT**GGAGGAATTGCAGAG**CG**GGAGCTTTGTAGG
 AAATTTGG

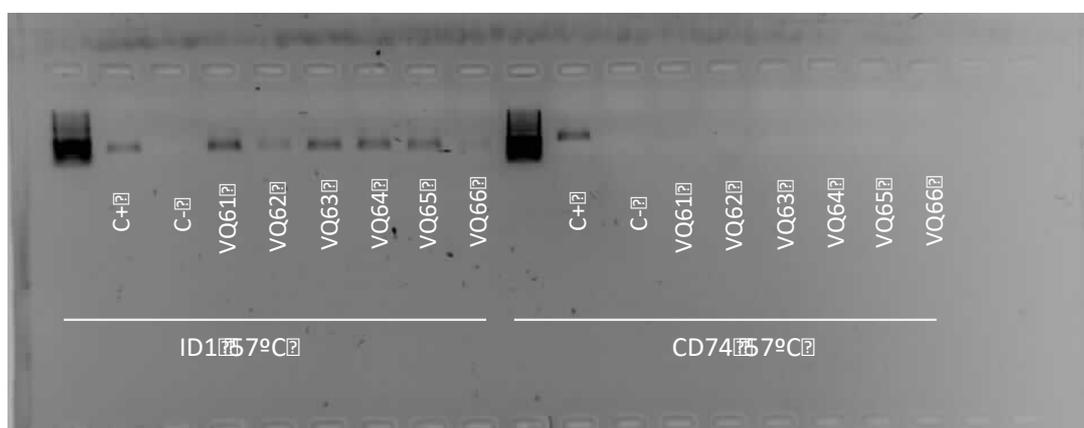
Primer Set 1			Score: 77 Quality: Medium		
Primer	Id	Sequence	Nt	Tm, °C	%GC
➡ PCR	F1	[Btm]AGGATTTGGTAGATAGATTAGAGG	24	58.8	37.5
↙ PCR	R1	CTTCTTTTCCAAAACCCCAAAATCTTC	27	61.7	37.0
← Sequencing	S1	CTTCTTACAAAATTACCTCA	20	44.4	30.0
Target Polymorphisms	Position10, Position11				
Sequence to Analyze	ACRCCTCTTC RCAATTATAA AAAAC				

amplición: 95bp

Únicamente se consiguió amplificar una banda: se obtuvieron 2 bandas en condiciones diferentes de PCR (Tm °C: 57 i 58).

Resultado de los geles de amplificación para los diferentes genes seleccionados:

Ejemplo del resultado del Gel de agarosa al 2% con las bandas de amplificación para diferentes genes (*ID1*, *CD74*). C+ (control de calidad positivo); C- (control de calidad negativo); VQ junto con un número hace referencia al nombre asignado a cada una de las muestras analizadas para el análisis de pirosecuenciación; los grados centígrados hacen referencia a la temperatura que se realizó la PCR para cada uno de los genes. Se observa como en el caso de *CD74*, a pesar de que los controles de calidad son correctos (C+ y C-), no se consiguió amplificar las bandas; a diferencia de *ID1*, donde se observa una amplificación correcta de las diferentes bandas para las muestras analizadas.



14.4 Tablas del estado de metilación de los genes seleccionados.

Anexo 5. Tabla del estado de metilación de *ID1* para las diferentes muestras seleccionadas y CpG. El nivel de metilación se representa en una gradación de colores, siendo el verde hipometilación y el rojo hipermetilación. AV CGs: promedio de metilación de las 4CpGs seleccionadas. SD: Desviación estándar (nos facilita información de la existencia de dispersión o no entre la metilación de las muestras; esperando que ésta no sea mayor del 10%. En caso de ser superior a este porcentaje se han eliminado los valores extremos, con finalidad de no alterar los resultados). En color gris se representan las muestras eliminadas por presentar una DS superior a la establecida. El punto de corte para diferenciar entre metiladas y no metiladas se consideró en el cuartil 75, correspondiendo a un porcentaje de metilación del 38,5%

Muestras	Estado metilación ID1					
	CG_1	CG_2	CG_3	CG_4	AV_CGs	SD_CGs
VQ56	0,01	0,00	0,02	0,01	0,01	0,01
VQ24/VQ52	1,02	0,94	0,56	1,05	0,89	0,23
VQ20	1,37	0,77	0,73	0,84	0,93	0,30
VQ68	1,54	1,17	0,79	0,92	1,11	0,33
VQ28	2,52	2,54	0,00	0,00	1,27	1,46
VQ64/VQ71	1,28	1,24	1,53	1,30	1,34	0,13
VQ54	1,28	1,24	1,53	1,30	1,34	0,13
VQ43	1,20	1,99	1,93	0,92	1,51	0,53
VQ6	2,09	1,31	1,34	1,37	1,53	0,38
VQ45	1,66	1,81	1,31	1,65	1,61	0,21
VQ34	2,35	1,91	1,36	2,06	1,92	0,42
VQ60	4,80	1,33	1,12	1,35	2,15	1,77
VQ65	2,14	2,12	2,77	2,21	2,31	0,31
VQ31/VQ40	2,63	2,79	1,76	2,07	2,31	0,48
VQ44	1,42	1,29	3,34	3,40	2,36	1,16
VQ53	3,87	2,80	0,00	2,92	2,40	1,67
VQ58	1,71	3,35	1,06	3,81	2,48	1,31
VQ46	7,42	0,99	0,76	0,82	2,50	3,28
VQ27	4,87	2,74	2,49	2,27	3,09	1,20
VQ35	4,75	1,81		3,89	3,48	1,51
VQ62	4,33	4,10	3,50	3,77	3,93	0,36
VQ39	0,85	13,09	0,80	1,20	3,99	6,07
VQ29	4,34	4,26	3,74	3,88	4,06	0,29
VQ26	0,77	0,58	7,16	8,14	4,16	4,05
VQ33/VQ38	3,31	5,46	6,23	2,04	4,26	1,93
VQ70	4,55	2,31	5,71	6,41	4,75	1,80
VQ4/VQ57	5,60	6,59	8,21	2,80	5,80	2,27
VQ30	4,09	8,97	5,63	5,41	6,03	2,08
VQ61	6,37	6,08	4,25	7,73	6,11	1,43
VQ63	9,57	5,19	4,90	5,17	6,21	2,25
VQ2/VQ48	6,15	7,26	8,36	3,64	6,35	2,02
VQ21	9,92	1,45	6,27	9,76	6,85	3,97
VQ1/VQ19	10,42	7,85	7,67	6,94	8,22	1,52
VQ42	19,87		16,70	2,47	13,01	9,27
VQ14	23,54	3,30	21,29	21,41	17,39	9,45
VQ32	28,88	12,40		19,70	20,33	8,26
VQ59	20,98	20,86	20,74	21,15	20,93	0,18

VQ15	26,21	16,92	17,49	25,80	21,61	5,09
VQ18	22,09	20,78	29,47	29,04	25,35	4,55
VQ69	24,55	43,28	20,30	28,22	29,09	10,00
VQ10	34,89	31,96	29,68	27,76	31,07	3,07
VQ5	35,75	26,35	33,00	32,48	31,90	3,97
VQ7	35,29	34,63	33,69	33,03	34,16	1,00
VQ67	32,76	35,54	31,93	37,81	34,51	2,69
VQ22	35,75	34,81	38,97	38,83	37,09	2,13
VQ13	47,51	37,35	25,85	40,35	37,77	9,01
VQ41	44,38	43,98	45,75	42,17	44,07	1,48
VQ66	52,57	49,36	47,70	39,18	47,20	5,72
VQ36	53,99	49,89	48,00	42,10	48,50	4,94
VQ11	57,92	43,78	50,10	53,56	51,34	5,97
VQ9	56,85	49,89	55,21	54,99	54,24	3,01
VQ3	55,33	50,10	52,40	60,75	54,65	4,60
VQ49	62,32	54,89	46,12	59,88	55,80	7,16
VQ12/VQ23	59,58	59,12		59,11	59,27	0,27
VQ17	73,74	66,95	68,34	63,22	68,06	4,36
VQ51	75,92	76,02	67,49	71,69	72,78	4,06
VQ50	71,29	73,14	73,45	74,33	73,05	1,28
VQ8/VQ25	85,93	73,57	73,30	78,81	77,90	5,92
VQ37	98,75	97,51	91,24	91,88	94,85	3,84
VQ47		98,91	96,44	94,82	96,72	2,06

Anexo 6. Tabla descriptiva del estado de metilación de *HOXB2* para las diferentes muestras seleccionadas y CpG. El nivel de metilación se representa en una gradación de colores, siendo el verde hipometilación y el rojo hipermetilación. AV CGs: promedio de metilación de las 6CpGs seleccionadas. SD: Desviación estándar (nos facilita información de la existencia de dispersión o no entre la metilación de las muestras; esperando que ésta no sea mayor del 10%. En caso de ser superior a este porcentaje se han eliminado los valores extremos, con finalidad de no alterar los resultados). En color gris se representan las muestras eliminadas por presentar una DS superior a la establecida. El punto de corte para diferenciar entre metiladas y no metiladas se consideró en el tercil 33, correspondiendo a un porcentaje de metilación del 34,24%.

Muestras	Estado metilación HOXB2						AV_CGs	SD_CGs
	CG_1	CG_2	CG_3	CG_4	CG_5	CG_6		
VQ53	3,44	1,53		2,83	3,07	2,1	2,59	0,77
VQ13	2,56	1,58			5,74	5	3,72	1,97
VQ50	7,35	5,9	21,8	6,66	2,93	2,55	7,87	7,10
VQ61	6,05	9,87		15,35	9,59	11,41	10,45	3,37
VQ4/VQ57	18,58	22,08		3,4	17,02	3,57	12,93	8,81
VQ42	29,2	13,56			7,46	27,92	19,54	10,73
VQ44	29,15	33,14		25,86	14,05	16,58	23,76	8,17
VQ67	21,78	28,77	38,34	23,84	16,92	21,38	25,17	7,51
VQ3	18,08	18,58	37,36	32,04	31,92	20,33	26,39	8,36
VQ59	22,05	26,93	33,28	28,44	17,3	30,85	26,48	5,89
VQ39	28,74	31,55			26,8	31,35	29,61	2,27
VQ17	31,13	39,44	33,84	32,22	20,23	25,55	30,40	6,70
VQ64/VQ71				28,74	27,32	43,14	33,07	8,75
VQ32	30,62	34,78	39,52	40,41	30,5	33,07	34,82	4,31

VQ2/VQ48	33,77	40,45	51,75	38,53	33,78	42,92	40,20	6,73
VQ63	31,89	44,9	45,76	39,99	38,65	42,56	40,63	5,08
VQ58	37,48	48,29	49,3	37,92	25,55	46,35	40,82	9,07
VQ18	32,96	52,87	39,77	47,5	32,64	45,31	41,84	8,17
VQ54		47,74	57,33	37,25	40,69		45,75	8,87
VQ69	52,31	52,41	64,67	58,06	48,05	48,19	53,95	6,40
VQ70	52,31	52,41	64,67	58,06	48,05	48,19	53,95	6,40
VQ51		55,21	62,32	63,34	49,3	59,42	57,92	5,76
VQ5	62,33	68,79	74,15	54,46	50,4	69,56	63,28	9,30
VQ22	62,33	68,79	74,15	54,46	50,4	69,56	63,28	9,30
VQ31/VQ40	54,29	69,72	75,04	72,18			67,81	9,27
VQ30	59,21	71,93	78,42	70,97	60,2	76,51	69,54	8,11
VQ43	74,2	80,32	81,72	83,54	58,86	79,25	76,32	9,11
VQ27	78,96	83,72	84,82	73,07			80,14	5,36
VQ41		85,41		83,12	71,99	88,96	82,37	7,33
VQ8/VQ25	83,47	82,58	96,57	80,27	70,14	83,74	82,80	8,46
VQ34	81,79	83,39	91,83	83,02	67,39	90,49	82,99	8,71
VQ33/VQ38	85,6	85,23	93,43	82,14		68,54	82,99	9,09
VQ21	83,96	92,73	86,14	85,03		71,97	83,97	7,53
VQ6	89,86	93,78	95,73	91,46	74,98	78,03	87,31	8,66
VQ62		89,99	92,58	88,49		88,64	89,93	1,89
VQ15		88,94	98,28			90,87	92,70	4,93
VQ35	93,18	92,22	94,44				93,28	1,11
VQ49	96,89	89,75	98,72	86,27		96,15	93,56	5,29
VQ47	97,45	98,11	98,77	93,51	80,53	98,99	94,56	7,16
VQ29	97,45	98,11	98,77	93,51	80,53	98,99	94,56	7,16

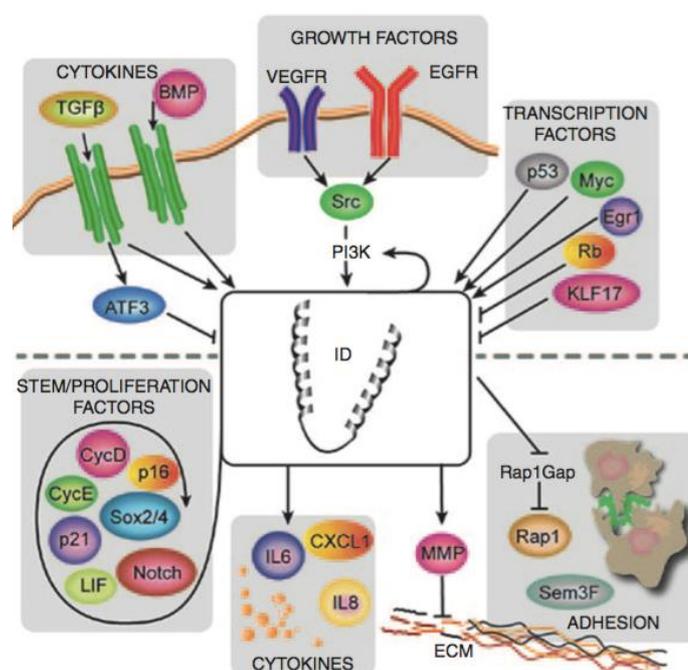
Anexo 7. Tabla descriptiva del estado de metilación de *ATOH8* para las diferentes muestras seleccionadas y CpG. El nivel de metilación se representa en una gradación de colores, siendo el verde hipometilación y el rojo hipermetilación. AV CGs: promedio de metilación de las 6CpGs seleccionadas. SD: Desviación estándar (nos facilita información de la existencia de dispersión o no entre la metilación de las muestras; esperando que ésta no sea mayor del 10%. En caso de ser superior a este porcentaje se han eliminado los valores extremos, con finalidad de no alterar los resultados). En color gris se representan las muestras eliminadas por presentar una DS superior a la establecida. El punto de corte para diferenciar entre metiladas y no metiladas se consideró en el percentil 75, correspondiendo a un porcentaje de metilación del 46%.

Muestras	Estado metilación ATOH8				
	CG_1	CG_2	CG_3	AV_CGs	SD_CGs
VQ52	1,26	1,55	1,77	1,53	0,26
VQ28	1,59	1,98	1,89	1,82	0,20
VQ62	2,13	2,59		2,36	0,33
VQ27	1,95	3,15		2,55	0,85
VQ6	2,61	2,58	3,35	2,85	0,44
VQ17	3,68	1,63	3,71	3,01	1,19
VQ40	2,75	3	3,59	3,11	0,43
VQ15	2,21	2,95	4,66	3,27	1,26
VQ38	9,17	2,72	2,45	4,78	3,80
VQ26	7,01	4,02	5,58	5,54	1,50
VQ5	5,85	3,94	6,99	5,59	1,54

VQ4	3,46		9,12	6,29	4,00
VQ41	15,84	15,2	7,99	13,01	4,36
VQ18	15,05	15,83	10,73	13,87	2,75
VQ51	14,43		24,96	19,70	7,45
VQ25	32,36	21,1		26,73	7,96
VQ2		42,5	49,23	45,87	4,76
VQ53	83,35	84,68		84,02	0,94
VQ3	91,1	95,95	88,92	91,99	3,60
VQ29	92,73	96,43	90,59	93,25	2,95
VQ49	96,84	98,14	87,41	94,13	5,86
VQ50	95,35	97,76	93,81	95,64	1,99
VQ65		97,93	94,84	96,39	2,18

14.5 Regulación de la expresión del inhibidor de diferenciación (ID) y su función en la biología del cáncer.

Anexo 8. Figura de la regulación de la expresión del inhibidor de diferenciación (ID) y su función en la biología del cáncer. Figura obtenida de *Molecular Therapy* vo. 22 no.8, 1407-1415 aug. 2014.



14.6 Financiación

Esta tesis ha sido financiada en su totalidad mediante una donación del Club Rotary Badalona y patrocinio de Celgene® específicos para este proyecto.

Tipificación de biomarcadores epigenéticos en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado como factores pronósticos de la evolución de la enfermedad y predictivos de respuesta al tratamiento con quimioterapia neoadyuvante

15 Bibliografía

1. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, et al. Cancer statistics, 2004. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2004;54(1):8-29.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2015;136(5):E359-86.
3. Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(11):1329-33.
4. Lynch HT, Kaurah P, Wirtzfeld D, Rubinstein WS, Weissman S, Lynch JF, et al. Hereditary diffuse gastric cancer: diagnosis, genetic counseling, and prophylactic total gastrectomy. *Cancer*. 2008;112(12):2655-63.
5. Masciari S, Dillon DA, Rath M, Robson M, Weitzel JN, Balmana J, et al. Breast cancer phenotype in women with TP53 germline mutations: a Li-Fraumeni syndrome consortium effort. *Breast cancer research and treatment*. 2012;133(3):1125-30.
6. Oldenburg RA, Kroeze-Jansema K, Kraan J, Morreau H, Klijn JG, Hoogerbrugge N, et al. The CHEK2*1100delC variant acts as a breast cancer risk modifier in non-BRCA1/BRCA2 multiple-case families. *Cancer research*. 2003;63(23):8153-7.
7. Bernstein L, Ross RK. Endogenous hormones and breast cancer risk. *Epidemiologic reviews*. 1993;15(1):48-65.
8. Trichopoulos D, MacMahon B, Cole P. Menopause and breast cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*. 1972;48(3):605-13.
9. Rosner B, Colditz GA, Willett WC. Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: the Nurses' Health Study. *American journal of epidemiology*. 1994;139(8):819-35.
10. Chlebowski RT, Hendrix SL, Langer RD, Stefanick ML, Gass M, Lane D, et al. Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2003;289(24):3243-53.
11. Alexander DD, Morimoto LM, Mink PJ, Lowe KA. Summary and meta-analysis of prospective studies of animal fat intake and breast cancer. *Nutrition research reviews*. 2010;23(1):169-79.
12. Singletary KW, Gapstur SM. Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2001;286(17):2143-51.
13. Chlebowski RT, Blackburn GL, Thomson CA, Nixon DW, Shapiro A, Hoy MK, et al. Dietary fat reduction and breast cancer outcome: interim efficacy results from the Women's Intervention Nutrition Study. *Journal of the National Cancer Institute*. 2006;98(24):1767-76.
14. Prentice RL, Caan B, Chlebowski RT, Patterson R, Kuller LH, Ockene JK, et al. Low-fat dietary pattern and risk of invasive breast cancer: the Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2006;295(6):629-42.
15. Pierce JP, Natarajan L, Caan BJ, Parker BA, Greenberg ER, Flatt SW, et al. Influence of a diet very high in vegetables, fruit, and fiber and low in fat on prognosis following treatment for breast cancer: the Women's Healthy Eating and Living (WHEL) randomized trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2007;298(3):289-98.
16. Pierce JP, Stefanick ML, Flatt SW, Natarajan L, Sternfeld B, Madlensky L, et al. Greater survival after breast cancer in physically active women with high vegetable-fruit intake regardless of obesity. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(17):2345-51.
17. Morimoto LM, White E, Chen Z, Chlebowski RT, Hays J, Kuller L, et al. Obesity, body size, and risk of postmenopausal breast cancer: the Women's Health Initiative (United States). *Cancer causes & control : CCC*. 2002;13(8):741-51.
18. Fitzgibbons PL, Henson DE, Hutter RV. Benign breast changes and the risk for subsequent breast cancer: an update of the 1985 consensus statement. *Cancer Committee of the College of American Pathologists. Archives of pathology & laboratory medicine*. 1998;122(12):1053-5.
19. Dupont WD, Page DL. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *The New England journal of medicine*. 1985;312(3):146-51.
20. Boyd NF, Guo H, Martin LJ, Sun L, Stone J, Fishell E, et al. Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2007;356(3):227-36.
21. Elkin EB, Klem ML, Gonzales AM, Ishill NM, Hodgson D, Ng AK, et al. Characteristics and outcomes of breast cancer in women with and without a history of radiation for Hodgkin's lymphoma: a multi-institutional, matched cohort study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(18):2466-73.

22. Lakhani SR EI, Schnitt SJ, et al. World Health Organization Classification of Tumours of the Breast, 4th ed. Lyon: IARC Press; . 2012.
23. Edge SB BD, Compton CC, et al. AJCC Cancer Staging Manual, 7th ed. New York: Springer Science + Business Media LLC.; 2010.
24. Adami HO, Malke B, Holmberg L, Persson I, Stone B. The relation between survival and age at diagnosis in breast cancer. *The New England journal of medicine*. 1986;315(9):559-63.
25. Fredholm H, Eaker S, Frisell J, Holmberg L, Fredriksson I, Lindman H. Breast cancer in young women: poor survival despite intensive treatment. *PloS one*. 2009;4(11):e7695.
26. Bastiaannet E, Liefers GJ, de Craen AJ, Kuppen PJ, van de Water W, Portielje JE, et al. Breast cancer in elderly compared to younger patients in the Netherlands: stage at diagnosis, treatment and survival in 127,805 unselected patients. *Breast cancer research and treatment*. 2010;124(3):801-7.
27. Eaker S, Dickman PW, Bergkvist L, Holmberg L, Uppsala/Orebro Breast Cancer G. Differences in management of older women influence breast cancer survival: results from a population-based database in Sweden. *PLoS medicine*. 2006;3(3):e25.
28. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer*. 1989;63(1):181-7.
29. Andersson Y, Frisell J, Sylvan M, de Boniface J, Bergkvist L. Breast cancer survival in relation to the metastatic tumor burden in axillary lymph nodes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(17):2868-73.
30. de Boer M, van Dijck JA, Bult P, Borm GF, Tjan-Heijnen VC. Breast cancer prognosis and occult lymph node metastases, isolated tumor cells, and micrometastases. *Journal of the National Cancer Institute*. 2010;102(6):410-25.
31. Pestalozzi BC, Zahrieh D, Mallon E, Gusterson BA, Price KN, Gelber RD, et al. Distinct clinical and prognostic features of infiltrating lobular carcinoma of the breast: combined results of 15 International Breast Cancer Study Group clinical trials. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(18):3006-14.
32. Ejlertsen B, Jensen MB, Rank F, Rasmussen BB, Christiansen P, Kroman N, et al. Population-based study of peritumoral lymphovascular invasion and outcome among patients with operable breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2009;101(10):729-35.
33. Pertschuk LP, Kim DS, Nayer K, Feldman JG, Eisenberg KB, Carter AC, et al. Immunocytochemical estrogen and progesterin receptor assays in breast cancer with monoclonal antibodies. Histopathologic, demographic, and biochemical correlations and relationship to endocrine response and survival. *Cancer*. 1990;66(8):1663-70.
34. Colleoni M, Sun Z, Price KN, Karlsson P, Forbes JF, Thurlimann B, et al. Annual Hazard Rates of Recurrence for Breast Cancer During 24 Years of Follow-Up: Results From the International Breast Cancer Study Group Trials I to V. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016;34(9):927-35.
35. Insa A, Lluch A, Prosper F, Marugan I, Martinez-Agullo A, Garcia-Conde J. Prognostic factors predicting survival from first recurrence in patients with metastatic breast cancer: analysis of 439 patients. *Breast cancer research and treatment*. 1999;56(1):67-78.
36. Elledge RM, Fuqua SA, Clark GM, Pujol P, Allred DC, McGuire WL. Prognostic significance of p53 gene alterations in node-negative breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 1993;26(3):225-35.
37. Ferrero-Pous M, Hacene K, Bouchet C, Le Doussal V, Tubiana-Hulin M, Spyrtos F. Relationship between c-erbB-2 and other tumor characteristics in breast cancer prognosis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000;6(12):4745-54.
38. Thakkar JP, Mehta DG. A review of an unfavorable subset of breast cancer: estrogen receptor positive progesterone receptor negative. *The oncologist*. 2011;16(3):276-85.
39. Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Ullrich A, McGuire WL. HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1989;7(8):1120-8.
40. Chia S, Norris B, Speers C, Cheang M, Gilks B, Gown AM, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 overexpression as a prognostic factor in a large tissue microarray series of node-negative breast cancers. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(35):5697-704.
41. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G, Jr., Colozza M, Mano MS, Durbecq V, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *British journal of cancer*. 2007;96(10):1504-13.
42. Foekens JA, Peters HA, Look MP, Portengen H, Schmitt M, Kramer MD, et al. The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients. *Cancer research*. 2000;60(3):636-43.

43. Petitjean A, Achatz MI, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene*. 2007;26(15):2157-65.
44. Olivier M, Langerod A, Carrieri P, Bergh J, Klaar S, Eyfjord J, et al. The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(4):1157-67.
45. Sjogren S, Inganas M, Norberg T, Lindgren A, Nordgren H, Holmberg L, et al. The p53 gene in breast cancer: prognostic value of complementary DNA sequencing versus immunohistochemistry. *Journal of the National Cancer Institute*. 1996;88(3-4):173-82.
46. Hartkopf AD, Taran FA, Wallwiener M, Hahn M, Becker S, Solomayer EF, et al. Prognostic relevance of disseminated tumour cells from the bone marrow of early stage breast cancer patients - results from a large single-centre analysis. *Eur J Cancer*. 2014;50(15):2550-9.
47. Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2005;353(8):793-802.
48. Giuliano AE, Hawes D, Ballman KV, Whitworth PW, Blumencranz PW, Reintgen DS, et al. Association of occult metastases in sentinel lymph nodes and bone marrow with survival among women with early-stage invasive breast cancer. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2011;306(4):385-93.
49. Lucci A, Hall CS, Lodhi AK, Bhattacharyya A, Anderson AE, Xiao L, et al. Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study. *The lancet oncology*. 2012;13(7):688-95.
50. Rack B, Schindlbeck C, Juckstock J, Andergassen U, Hepp P, Zwingers T, et al. Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients. *Journal of the National Cancer Institute*. 2014;106(5).
51. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012;490(7418):61-70.
52. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(14):8418-23.
53. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(19):10869-74.
54. 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(6797):747-52.
55. 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 research : BCR*. 2010;12(5):R68.
56. Le Du F, Eckhardt BL, Lim B, Litton JK, Moulder S, Meric-Bernstam F, et al. Is the future of personalized therapy in triple-negative breast cancer based on molecular subtype? *Oncotarget*. 2015;6(15):12890-908.
57. 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. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2015;26(8):1533-46.
58. 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 : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2015;26 Suppl 5:v8-30.
59. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2004;351(27):2817-26.
60. Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W, et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(23):3726-34.
61. Mamounas EP, Tang G, Fisher B, Paik S, Shak S, Costantino JP, et al. Association between the 21-gene recurrence score assay and risk of locoregional recurrence in node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer: results from NSABP B-14 and NSABP B-20. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(10):1677-83.
62. 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. *The New England journal of medicine*. 2015;373(21):2005-14.
63. Filipits M, Rudas M, Jakesz R, Dubsy P, Fitzal F, Singer CF, et al. A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional

clinical risk factors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(18):6012-20.

64. Dubsy P, Brase JC, Jakesz R, Rudas M, Singer CF, Greil R, et al. The EndoPredict score provides prognostic information on late distant metastases in ER+/HER2- breast cancer patients. *British journal of cancer*. 2013;109(12):2959-64.

65. Ma XJ, Wang Z, Ryan PD, Isakoff SJ, Barmettler A, Fuller A, et al. A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer cell*. 2004;5(6):607-16.

66. 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. *The lancet oncology*. 2013;14(11):1067-76.

67. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(8):1160-7.

68. Nielsen TO, Parker JS, Leung S, Voduc D, Ebbert M, Vickery T, et al. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(21):5222-32.

69. Dowsett M, Sestak I, Lopez-Knowles E, Sidhu K, Dunbier AK, Cowens JW, et al. Comparison of PAM50 risk of recurrence score with oncotype DX and IHC4 for predicting risk of distant recurrence after endocrine therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(22):2783-90.

70. Mook S, Schmidt MK, Viale G, Pruneri G, Eekhout I, Floore A, et al. The 70-gene prognosis-signature predicts disease outcome in breast cancer patients with 1-3 positive lymph nodes in an independent validation study. *Breast cancer research and treatment*. 2009;116(2):295-302.

71. 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. *The New England journal of medicine*. 2016;375(8):717-29.

72. Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, Harris A, Fox S, Smeds J, et al. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *Journal of the National Cancer Institute*. 2006;98(4):262-72.

73. Loi S, Haibe-Kains B, Desmedt C, Lallemand F, Tutt AM, Gillet C, et al. Definition of clinically distinct molecular subtypes in estrogen receptor-positive breast carcinomas through genomic grade. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(10):1239-46.

74. Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, et al. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2002;347(16):1233-41.

75. Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccozzi R, Luini A, et al. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2002;347(16):1227-32.

76. Galimberti V, Cole BF, Zurrada S, Viale G, Luini A, Veronesi P, et al. Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel-node micrometastases (IBCSG 23-01): a phase 3 randomised controlled trial. *The lancet oncology*. 2013;14(4):297-305.

77. van Deurzen CH, Vriens BE, Tjan-Heijnen VC, van der Wall E, Albrechts M, van Hilligersberg R, et al. Accuracy of sentinel node biopsy after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients: a systematic review. *Eur J Cancer*. 2009;45(18):3124-30.

78. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, Beitsch PD, Whitworth PW, Blumencranz PW, et al. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2011;305(6):569-75.

79. Giuliano AE, Ballman K, McCall L, Beitsch P, Whitworth PW, Blumencranz P, et al. Locoregional Recurrence After Sentinel Lymph Node Dissection With or Without Axillary Dissection in Patients With Sentinel Lymph Node Metastases: Long-term Follow-up From the American College of Surgeons Oncology Group (Alliance) ACOSOG Z0011 Randomized Trial. *Annals of surgery*. 2016;264(3):413-20.

80. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G, Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, et al. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet*. 2011;378(9804):1707-16.

81. Clarke M, Collins R, Darby S, Davies C, Elphinstone P, Evans V, et al. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005;366(9503):2087-106.

82. Antonini N, Jones H, Horiot JC, Poortmans P, Struikmans H, Van den Bogaert W, et al. Effect of age and radiation dose on local control after breast conserving treatment: EORTC trial 22881-10882. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2007;82(3):265-71.
83. Haviland JS, Owen JR, Dewar JA, Agrawal RK, Barrett J, Barrett-Lee PJ, et al. The UK Standardisation of Breast Radiotherapy (START) trials of radiotherapy hypofractionation for treatment of early breast cancer: 10-year follow-up results of two randomised controlled trials. *The lancet oncology*. 2013;14(11):1086-94.
84. Whelan TJ, Pignol JP, Levine MN, Julian JA, MacKenzie R, Parpia S, et al. Long-term results of hypofractionated radiation therapy for breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2010;362(6):513-20.
85. Berry DA, Cronin KA, Plevritis SK, Fryback DG, Clarke L, Zelen M, et al. Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2005;353(17):1784-92.
86. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005;365(9472):1687-717.
87. Davies C, Pan H, Godwin J, Gray R, Arriagada R, Raina V, et al. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet*. 2013;381(9869):805-16.
88. Howell A, Cuzick J, Baum M, Buzdar A, Dowsett M, Forbes JF, et al. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet*. 2005;365(9453):60-2.
89. Breast International Group 1-98 Collaborative G, Thurlimann B, Keshaviah A, Coates AS, Mouridsen H, Mauriac L, et al. A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2005;353(26):2747-57.
90. Coombes RC, Hall E, Gibson LJ, Paridaens R, Jassem J, Delozier T, et al. A randomized trial of exemestane after two to three years of tamoxifen therapy in postmenopausal women with primary breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2004;350(11):1081-92.
91. Jakesz R, Jonat W, Gnant M, Mittlboeck M, Greil R, Tausch C, et al. Switching of postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer to anastrozole after 2 years' adjuvant tamoxifen: combined results of ABCSG trial 8 and ARNO 95 trial. *Lancet*. 2005;366(9484):455-62.
92. Goss PE, Ingle JN, Martino S, Robert NJ, Muss HB, Piccart MJ, et al. Randomized trial of letrozole following tamoxifen as extended adjuvant therapy in receptor-positive breast cancer: updated findings from NCIC CTG MA.17. *Journal of the National Cancer Institute*. 2005;97(17):1262-71.
93. Goss PE, Ingle JN, Martino S, Robert NJ, Muss HB, Piccart MJ, et al. A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2003;349(19):1793-802.
94. Group BIGC, Mouridsen H, Giobbie-Hurder A, Goldhirsch A, Thurlimann B, Paridaens R, et al. Letrozole therapy alone or in sequence with tamoxifen in women with breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2009;361(8):766-76.
95. Francis PA, Regan MM, Fleming GF, Lang I, Ciruelos E, Bellet M, et al. Adjuvant ovarian suppression in premenopausal breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2015;372(5):436-46.
96. Pagani O, Regan MM, Walley BA, Fleming GF, Colleoni M, Lang I, et al. Adjuvant exemestane with ovarian suppression in premenopausal breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2014;371(2):107-18.
97. Cristofanilli M, Turner NC, Bondarenko I, Ro J, Im SA, Masuda N, et al. Fulvestrant plus palbociclib versus fulvestrant plus placebo for treatment of hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that progressed on previous endocrine therapy (PALOMA-3): final analysis of the multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *The lancet oncology*. 2016;17(4):425-39.
98. Finn RS, Crown JP, Lang I, Boer K, Bondarenko IM, Kulyk SO, et al. The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study. *The lancet oncology*. 2015;16(1):25-35.
99. Baselga J, Campone M, Piccart M, Burris HA, 3rd, Rugo HS, Sahmoud T, et al. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2012;366(6):520-9.
100. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G, Peto R, Davies C, Godwin J, Gray R, Pan HC, 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):432-44.

101. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thurlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2013;24(9):2206-23.
102. Henderson IC, Berry DA, Demetri GD, Cirincione CT, Goldstein LJ, Martino S, 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2003;21(6):976-83.
103. Sparano JA, Wang M, Martino S, Jones V, Perez EA, Saphner T, et al. Weekly paclitaxel in the adjuvant treatment of breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2008;358(16):1663-71.
104. Swain SM, Tang G, Geyer CE, Jr., Rastogi P, Atkins JN, Donnellan PP, et al. Definitive results of a phase III adjuvant trial comparing three chemotherapy regimens in women with operable, node-positive breast cancer: the NSABP B-38 trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(26):3197-204.
105. Fisher B, Dignam J, Tan-Chiu E, Anderson S, Fisher ER, Wittliff JL, et al. Prognosis and treatment of patients with breast tumors of one centimeter or less and negative axillary lymph nodes. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001;93(2):112-20.
106. Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, Alanko T, Kataja V, Asola R, et al. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2006;354(8):809-20.
107. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2005;353(16):1659-72.
108. Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Press M, et al. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2011;365(14):1273-83.
109. McArthur HL, Mahoney KM, Morris PG, Patil S, Jacks LM, Howard J, et al. Adjuvant trastuzumab with chemotherapy is effective in women with small, node-negative, HER2-positive breast cancer. *Cancer*. 2011;117(24):5461-8.
110. Tolanev SM, Barry WT, Dang CT, Yardley DA, Moy B, Marcom PK, et al. Adjuvant paclitaxel and trastuzumab for node-negative, HER2-positive breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2015;372(2):134-41.
111. Mamtani A, Barrio AV, King TA, Van Zee KJ, Plitas G, Pilewskie M, et al. How Often Does Neoadjuvant Chemotherapy Avoid Axillary Dissection in Patients With Histologically Confirmed Nodal Metastases? Results of a Prospective Study. *Annals of surgical oncology*. 2016;23(11):3467-74.
112. Gralow JR, Burstein HJ, Wood W, Hortobagyi GN, Gianni L, von Minckwitz G, et al. Preoperative therapy in invasive breast cancer: pathologic assessment and systemic therapy issues in operable disease. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(5):814-9.
113. Scholl SM, Fourquet A, Asselain B, Pierga JY, Vilcoq JR, Durand JC, et al. Neoadjuvant versus adjuvant chemotherapy in premenopausal patients with tumours considered too large for breast conserving surgery: preliminary results of a randomised trial: S6. *Eur J Cancer*. 1994;30A(5):645-52.
114. Mauri D, Pavlidis N, Ioannidis JP. Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute*. 2005;97(3):188-94.
115. Mieog JS, van der Hage JA, van de Velde CJ. Preoperative chemotherapy for women with operable breast cancer. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2007(2):CD005002.
116. von Minckwitz G, Untch M, Blohmer JU, Costa SD, Eidtmann H, Fasching PA, et al. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(15):1796-804.
117. Hennessy BT, Hortobagyi GN, Rouzier R, Kuerer H, Sneige N, Buzdar AU, et al. Outcome after pathologic complete eradication of cytologically proven breast cancer axillary node metastases following primary chemotherapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(36):9304-11.
118. Rouzier R, Extra JM, Klijanienko J, Falcou MC, Asselain B, Vincent-Salomon A, et al. Incidence and prognostic significance of complete axillary downstaging after primary chemotherapy in breast cancer patients with T1 to T3 tumors and cytologically proven axillary metastatic lymph nodes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2002;20(5):1304-10.
119. Bear HD, Anderson S, Brown A, Smith R, Mamounas EP, Fisher B, et al. The effect on tumor response of adding sequential preoperative docetaxel to preoperative doxorubicin and cyclophosphamide: preliminary results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2003;21(22):4165-74.

120. Mazouni C, Peintinger F, Wan-Kau S, Andre F, Gonzalez-Angulo AM, Symmans WF, et al. Residual ductal carcinoma in situ in patients with complete eradication of invasive breast cancer after neoadjuvant chemotherapy does not adversely affect patient outcome. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(19):2650-5.
121. 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.
122. Lehmann BD, Pietenpol JA. Identification and use of biomarkers in treatment strategies for triple-negative breast cancer subtypes. *The Journal of pathology*. 2014;232(2):142-50.
123. Valero V. Carboplatin for early triple-negative breast cancer? *The lancet oncology*. 2014;15(7):676-8.
124. Petrelli F, Coinu A, Borgonovo K, Cabiddu M, Ghilardi M, Lonati V, et al. The value of platinum agents as neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancers: a systematic review and meta-analysis. *Breast cancer research and treatment*. 2014;144(2):223-32.
125. 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. *The lancet oncology*. 2014;15(7):747-56.
126. 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). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(1):13-21.
127. Untch M, Jackisch C, Schneeweiss A, Conrad B, Aktas B, Denkert C, et al. Nab-paclitaxel versus solvent-based paclitaxel in neoadjuvant chemotherapy for early breast cancer (GeparSepto-GBG 69): a randomised, phase 3 trial. *The lancet oncology*. 2016;17(3):345-56.
128. Poggio F, Bruzzone M, Ceppi M, Ponde NF, La Valle G, Del Mastro L, et al. Platinum-based neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2018;29(7):1497-508.
129. Loibl S, O'Shaughnessy J, Untch M, Sikov WM, Rugo HS, McKee MD, et al. Addition of the PARP inhibitor veliparib plus carboplatin or carboplatin alone to standard neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer (BrighTNess): a randomised, phase 3 trial. *The lancet oncology*. 2018;19(4):497-509.
130. Zujewski JA, Rubinstein L. CREATE-X a role for capecitabine in early-stage breast cancer: an analysis of available data. *NPJ Breast Cancer*. 2017;3:27.
131. Untch M, Fasching PA, Konecny GE, Hasmuller S, Lebeau A, Kreienberg R, et al. Pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy plus trastuzumab predicts favorable survival in human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer: results from the TECHNO trial of the AGO and GBG study groups. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(25):3351-7.
132. Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, Lluch A, Tjulandin S, Zambetti M, et al. Neoadjuvant and adjuvant trastuzumab in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (NOAH): follow-up of a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *The lancet oncology*. 2014;15(6):640-7.
133. Baselga J, Bradbury I, Eidtmann H, Di Cosimo S, de Azambuja E, Aura C, et al. Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet*. 2012;379(9816):633-40.
134. Robidoux A, Tang G, Rastogi P, Geyer CE, Jr., Azar CA, Atkins JN, et al. Lapatinib as a component of neoadjuvant therapy for HER2-positive operable breast cancer (NSABP protocol B-41): an open-label, randomised phase 3 trial. *The lancet oncology*. 2013;14(12):1183-92.
135. Gianni L, Pienkowski T, Im YH, Tseng LM, Liu MC, Lluch A, et al. 5-year analysis of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in patients with locally advanced, inflammatory, or early-stage HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a multicentre, open-label, phase 2 randomised trial. *The lancet oncology*. 2016;17(6):791-800.
136. Schneeweiss A, Chia S, Hickish T, Harvey V, Eniu A, Hegg R, et al. Pertuzumab plus trastuzumab in combination with standard neoadjuvant anthracycline-containing and anthracycline-free chemotherapy regimens in patients with HER2-positive early breast cancer: a randomized phase II cardiac safety study (TRYPHAENA). *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2013;24(9):2278-84.
137. Loibl S, von Minckwitz G, Schneeweiss A, Paepke S, Lehmann A, Rezai M, et al. PIK3CA mutations are associated with lower rates of pathologic complete response to anti-human epidermal growth factor receptor 2 (her2) therapy in primary HER2-overexpressing breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(29):3212-20.

138. von Minckwitz G, Huang CS, Mano MS, Loibl S, Mamounas EP, Untch M, et al. Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. *The New England journal of medicine*. 2019;380(7):617-28.
139. Mittendorf EA, Jeruss JS, Tucker SL, Kolli A, Newman LA, Gonzalez-Angulo AM, et al. Validation of a novel staging system for disease-specific survival in patients with breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(15):1956-62.
140. Dworkin AM, Huang TH, Toland AE. Epigenetic alterations in the breast: Implications for breast cancer detection, prognosis and treatment. *Seminars in cancer biology*. 2009;19(3):165-71.
141. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nature biotechnology*. 2010;28(10):1057-68.
142. Heyn H, Esteller M. An Adenine Code for DNA: A Second Life for N6-Methyladenine. *Cell*. 2015;161(4):710-3.
143. Cortez CC, Jones PA. Chromatin, cancer and drug therapies. *Mutation research*. 2008;647(1-2):44-51.
144. Dagdemir A, Durif J, Ngollo M, Bignon YJ, Bernard-Gallon D. Histone lysine trimethylation or acetylation can be modulated by phytoestrogen, estrogen or anti-HDAC in breast cancer cell lines. *Epigenomics*. 2013;5(1):51-63.
145. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer research*. 2001;61(8):3225-9.
146. Chen P, Li C, Li X, Li J, Chu R, Wang H. Higher dietary folate intake reduces the breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *British journal of cancer*. 2014;110(9):2327-38.
147. Christensen BC, Kelsey KT, Zheng S, Houseman EA, Marsit CJ, Wrensch MR, et al. Breast cancer DNA methylation profiles are associated with tumor size and alcohol and folate intake. *PLoS genetics*. 2010;6(7):e1001043.
148. Dembinska-Kiec A, Polus A, Kiec-Wilk B, Grzybowska J, Mikolajczyk M, Hartwich J, et al. Proangiogenic activity of beta-carotene is coupled with the activation of endothelial cell chemotaxis. *Biochimica et biophysica acta*. 2005;1740(2):222-39.
149. Okubo T, Kano I. [Studies on estrogenic activities of food additives with human breast cancer MCF-7 cells and mechanism of estrogenicity by BHA and OPP]. *Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. 2003;123(6):443-52.
150. Meeran SM, Ahmed A, Tollefsbol TO. Epigenetic targets of bioactive dietary components for cancer prevention and therapy. *Clinical epigenetics*. 2010;1(3-4):101-16.
151. Khan SI, Aumsuwan P, Khan IA, Walker LA, Dasmahapatra AK. Epigenetic events associated with breast cancer and their prevention by dietary components targeting the epigenome. *Chemical research in toxicology*. 2012;25(1):61-73.
152. Herceg Z, Vaissiere T. Epigenetic mechanisms and cancer: an interface between the environment and the genome. *Epigenetics*. 2011;6(7):804-19.
153. Wajed SA, Laird PW, DeMeester TR. DNA methylation: an alternative pathway to cancer. *Annals of surgery*. 2001;234(1):10-20.
154. Holm K, Hegardt C, Staaf J, Vallon-Christersson J, Jonsson G, Olsson H, et al. Molecular subtypes of breast cancer are associated with characteristic DNA methylation patterns. *Breast cancer research : BCR*. 2010;12(3):R36.
155. Kajabova V, Smolkova B, Zmetakova I, Sebova K, Krivulcik T, Bella V, et al. RASSF1A Promoter Methylation Levels Positively Correlate with Estrogen Receptor Expression in Breast Cancer Patients. *Translational oncology*. 2013;6(3):297-304.
156. Fang F, Turcan S, Rimmer A, Kaufman A, Giri D, Morris LG, et al. Breast cancer methylomes establish an epigenomic foundation for metastasis. *Science translational medicine*. 2011;3(75):75ra25.
157. Hill VK, Ricketts C, Bieche I, Vacher S, Gentle D, Lewis C, et al. Genome-wide DNA methylation profiling of CpG islands in breast cancer identifies novel genes associated with tumorigenicity. *Cancer research*. 2011;71(8):2988-99.
158. Dagdemir A, Durif J, Ngollo M, Bignon YJ, Bernard-Gallon D. Breast cancer: mechanisms involved in action of phytoestrogens and epigenetic changes. *In vivo*. 2013;27(1):1-9.
159. Paredes J, Albergaria A, Oliveira JT, Jeronimo C, Milanezi F, Schmitt FC. P-cadherin overexpression is an indicator of clinical outcome in invasive breast carcinomas and is associated with CDH3 promoter hypomethylation. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(16):5869-77.
160. Flanagan JM, Cocciardi S, Waddell N, Johnstone CN, Marsh A, Henderson S, et al. DNA methylome of familial breast cancer identifies distinct profiles defined by mutation status. *American journal of human genetics*. 2010;86(3):420-33.

161. Elsheikh SE, Green AR, Rakha EA, Powe DG, Ahmed RA, Collins HM, et al. Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome. *Cancer research*. 2009;69(9):3802-9.
162. Suzuki J, Chen YY, Scott GK, Devries S, Chin K, Benz CC, et al. Protein acetylation and histone deacetylase expression associated with malignant breast cancer progression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(9):3163-71.
163. Huang L, Pardee AB. Suberoylanilide hydroxamic acid as a potential therapeutic agent for human breast cancer treatment. *Molecular medicine*. 2000;6(10):849-66.
164. Fedele P, Orlando L, Cinieri S. Targeting triple negative breast cancer with histone deacetylase inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs*. 2017;26(11):1199-206.
165. Damaskos C, Garpis N, Valsami S, Kontos M, Spartalis E, Kalampokas T, et al. Histone Deacetylase Inhibitors: An Attractive Therapeutic Strategy Against Breast Cancer. *Anticancer research*. 2017;37(1):35-46.
166. Chen L, Jin T, Zhu K, Piao Y, Quan T, Quan C, et al. PI3K/mTOR dual inhibitor BEZ235 and histone deacetylase inhibitor Trichostatin A synergistically exert anti-tumor activity in breast cancer. *Oncotarget*. 2017;8(7):11937-49.
167. Connolly RM, Rudek MA, Piekarz R. Entinostat: a promising treatment option for patients with advanced breast cancer. *Future oncology*. 2017;13(13):1137-48.
168. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer research*. 2005;65(16):7065-70.
169. Bediaga NG, Acha-Sagredo A, Guerra I, Viguri A, Albaina C, Ruiz Diaz I, et al. DNA methylation epigenotypes in breast cancer molecular subtypes. *Breast cancer research : BCR*. 2010;12(5):R77.
170. Abdel-Hafiz HA, Horwitz KB. Role of epigenetic modifications in luminal breast cancer. *Epigenomics*. 2015;7(5):847-62.
171. Lustberg MB, Ramaswamy B. Epigenetic Therapy in Breast Cancer. *Current breast cancer reports*. 2011;3(1):34-43.
172. Yardley DA, Ismail-Khan RR, Melichar B, Lichinitser M, Munster PN, Klein PM, et al. Randomized phase II, double-blind, placebo-controlled study of exemestane with or without entinostat in postmenopausal women with locally recurrent or metastatic estrogen receptor-positive breast cancer progressing on treatment with a nonsteroidal aromatase inhibitor. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(17):2128-35.
173. Xiong J, Yu D, Wei N, Fu H, Cai T, Huang Y, et al. An estrogen receptor alpha suppressor, microRNA-22, is downregulated in estrogen receptor alpha-positive human breast cancer cell lines and clinical samples. *The FEBS journal*. 2010;277(7):1684-94.
174. Pathiraja TN, Shetty PB, Jelinek J, He R, Hartmaier R, Margossian AL, et al. Progesterone receptor isoform-specific promoter methylation: association of PRA promoter methylation with worse outcome in breast cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(12):4177-86.
175. Stirzaker C, Zotenko E, Song JZ, Qu W, Nair SS, Locke WJ, et al. Methylome sequencing in triple-negative breast cancer reveals distinct methylation clusters with prognostic value. *Nature communications*. 2015;6:5899.
176. Veeck J, Ropero S, Setien F, Gonzalez-Suarez E, Osorio A, Benitez J, et al. BRCA1 CpG island hypermethylation predicts sensitivity to poly(adenosine diphosphate)-ribose polymerase inhibitors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(29):e563-4; author reply e5-6.
177. Watanabe Y, Maeda I, Oikawa R, Wu W, Tsuchiya K, Miyoshi Y, et al. Aberrant DNA methylation status of DNA repair genes in breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 2013;18(12):1120-30.
178. Sharma P, Stecklein SR, Kimler BF, Sethi G, Petroff BK, Phillips TA, et al. The prognostic value of BRCA1 promoter methylation in early stage triple negative breast cancer. *Journal of cancer therapeutics & research*. 2014;3(2):1-11.
179. Xu Y, Diao L, Chen Y, Liu Y, Wang C, Ouyang T, et al. Promoter methylation of BRCA1 in triple-negative breast cancer predicts sensitivity to adjuvant chemotherapy. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2013;24(6):1498-505.
180. Ignatov T, Poehlmann A, Ignatov A, Schinlauer A, Costa SD, Roessner A, et al. BRCA1 promoter methylation is a marker of better response to anthracycline-based therapy in sporadic TNBC. *Breast cancer research and treatment*. 2013;141(2):205-12.
181. Liu Y, Cai Q, Bao PP, Su Y, Cai H, Wu J, et al. Tumor tissue microRNA expression in association with triple-negative breast cancer outcomes. *Breast cancer research and treatment*. 2015;152(1):183-91.

182. Fiegl H, Millinger S, Goebel G, Muller-Holzner E, Marth C, Laird PW, et al. Breast cancer DNA methylation profiles in cancer cells and tumor stroma: association with HER-2/neu status in primary breast cancer. *Cancer research*. 2006;66(1):29-33.
183. Albanell J, Andreu X, Calasanz MJ, Concha A, Corominas JM, Garcia-Caballero T, et al. Guidelines for HER2 testing in breast cancer: a national consensus of the Spanish Society of Pathology (SEAP) and the Spanish Society of Medical Oncology (SEOM). *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*. 2009;11(6):363-75.
184. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(1):118-45.
185. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991;19(5):403-10.
186. Sandoval J, Heyn H, Moran S, Serra-Musach J, Pujana MA, Bibikova M, et al. Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. *Epigenetics*. 2011;6(6):692-702.
187. Moran S, Arribas C, Esteller M. Validation of a DNA methylation microarray for 850,000 CpG sites of the human genome enriched in enhancer sequences. *Epigenomics*. 2016;8(3):389-99.
188. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2010;363(20):1938-48.
189. Gianni L, Pienkowski T, Im YH, Roman L, Tseng LM, Liu MC, et al. Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *The lancet oncology*. 2012;13(1):25-32.
190. Joh JE, Esposito NN, Kiluk JV, Laronga C, Khakpour N, Soliman H, et al. Pathologic tumor response of invasive lobular carcinoma to neo-adjuvant chemotherapy. *The breast journal*. 2012;18(6):569-74.
191. Owens MA, Horten BC, Da Silva MM. HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. *Clinical breast cancer*. 2004;5(1):63-9.
192. van de Ven S, Smit VT, Dekker TJ, Nortier JW, Kroep JR. Discordances in ER, PR and HER2 receptors after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Cancer treatment reviews*. 2011;37(6):422-30.
193. Yang L, Zhong X, Pu T, Qiu Y, Ye F, Bu H. Clinical significance and prognostic value of receptor conversion in hormone receptor positive breast cancers after neoadjuvant chemotherapy. *World J Surg Oncol*. 2018;16(1):51.
194. von Minckwitz G, Kummel S, Vogel P, Hanusch C, Eidtmann H, Hilfrich J, et al. Intensified neoadjuvant chemotherapy in early-responding breast cancer: phase III randomized GeparTrio study. *Journal of the National Cancer Institute*. 2008;100(8):552-62.
195. Gianni L, Baselga J, Eiermann W, Guillem Porta V, Semiglazov V, Lluch A, et al. Feasibility and tolerability of sequential doxorubicin/paclitaxel followed by cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil and its effects on tumor response as preoperative therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(24 Pt 1):8715-21.
196. Schneeweiss A, Chia S, Hickish T, Harvey V, Eniu A, Waldron-Lynch M, et al. Long-term efficacy analysis of the randomised, phase II TRYPHAENA cardiac safety study: Evaluating pertuzumab and trastuzumab plus standard neoadjuvant anthracycline-containing and anthracycline-free chemotherapy regimens in patients with HER2-positive early breast cancer. *Eur J Cancer*. 2018;89:27-35.
197. Penault-Llorca F, Andre F, Sagan C, Lacroix-Triki M, Denoux Y, Verrielle V, et al. Ki67 expression and docetaxel efficacy in patients with estrogen receptor-positive breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(17):2809-15.
198. Chang J, Ormerod M, Powles TJ, Allred DC, Ashley SE, Dowsett M. Apoptosis and proliferation as predictors of chemotherapy response in patients with breast carcinoma. *Cancer*. 2000;89(11):2145-52.
199. von Minckwitz G, Schmitt WD, Loibl S, Muller BM, Blohmer JU, Sinn BV, et al. Ki67 measured after neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013;19(16):4521-31.
200. Moran S, Vizoso M, Martinez-Cardus A, Gomez A, Matias-Guiu X, Chiavenna SM, et al. Validation of DNA methylation profiling in formalin-fixed paraffin-embedded samples using the Infinium HumanMethylation450 Microarray. *Epigenetics*. 2014;9(6):829-33.
201. Romero-Lanman EE, Pavlovic S, Amlani B, Chin Y, Benzra R. Id1 maintains embryonic stem cell self-renewal by up-regulation of Nanog and repression of Brachyury expression. *Stem Cells Dev*. 2012;21(3):384-93.

202. Niola F, Zhao X, Singh D, Castano A, Sullivan R, Lauria M, et al. Id proteins synchronize stemness and anchorage to the niche of neural stem cells. *Nat Cell Biol.* 2012;14(5):477-87.
203. Nair R, Teo WS, Mittal V, Swarbrick A. ID proteins regulate diverse aspects of cancer progression and provide novel therapeutic opportunities. *Mol Ther.* 2014;22(8):1407-15.
204. Perk J, Iavarone A, Benezra R. Id family of helix-loop-helix proteins in cancer. *Nature reviews Cancer.* 2005;5(8):603-14.
205. Swarbrick A, Akerfeldt MC, Lee CS, Sergio CM, Caldon CE, Hunter LJ, et al. Regulation of cyclin expression and cell cycle progression in breast epithelial cells by the helix-loop-helix protein Id1. *Oncogene.* 2005;24(3):381-9.
206. Geng H, Rademacher BL, Pittsenbarger J, Huang CY, Harvey CT, Lafortune MC, et al. ID1 enhances docetaxel cytotoxicity in prostate cancer cells through inhibition of p21. *Cancer research.* 2010;70(8):3239-48.
207. Cheng YJ, Lee YC, Chiu WC, Tsai JW, Su YH, Hung AC, et al. High Id1 expression, a generally negative prognostic factor, paradoxically predicts a favorable prognosis for adjuvant paclitaxel plus cisplatin therapy in surgically treated lung cancer patients. *Oncotarget.* 2014;5(22):11564-75.
208. Neophytou C, Boutsikos P, Papageorgis P. Molecular Mechanisms and Emerging Therapeutic Targets of Triple-Negative Breast Cancer Metastasis. *Front Oncol.* 2018;8:31.
209. Shah N, Sukumar S. The Hox genes and their roles in oncogenesis. *Nature reviews Cancer.* 2010;10(5):361-71.
210. Boimel PJ, Cruz C, Segall JE. A functional in vivo screen for regulators of tumor progression identifies HOXB2 as a regulator of tumor growth in breast cancer. *Genomics.* 2011;98(3):164-72.
211. Plowright L, Harrington KJ, Pandha HS, Morgan R. HOX transcription factors are potential therapeutic targets in non-small-cell lung cancer (targeting HOX genes in lung cancer). *British journal of cancer.* 2009;100(3):470-5.
212. Inamura K, Togashi Y, Okui M, Ninomiya H, Hiramatsu M, Satoh Y, et al. HOXB2 as a novel prognostic indicator for stage I lung adenocarcinomas. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer.* 2007;2(9):802-7.
213. Wu X, Chen H, Parker B, Rubin E, Zhu T, Lee JS, et al. HOXB7, a homeodomain protein, is overexpressed in breast cancer and confers epithelial-mesenchymal transition. *Cancer research.* 2006;66(19):9527-34.
214. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer cell.* 2006;10(6):515-27.
215. Fang F, Wasserman SM, Torres-Vazquez J, Weinstein B, Cao F, Li Z, et al. The role of Hath6, a newly identified shear-stress-responsive transcription factor, in endothelial cell differentiation and function. *Journal of cell science.* 2014;127(Pt 7):1428-40.
216. Zaravinos A, Lambrou GI, Boulalas I, Delakas D, Spandidos DA. Identification of common differentially expressed genes in urinary bladder cancer. *PloS one.* 2011;6(4):e18135.
217. Freire P, Vilela M, Deus H, Kim YW, Koul D, Colman H, et al. Exploratory analysis of the copy number alterations in glioblastoma multiforme. *PloS one.* 2008;3(12):e4076.
218. Ye M, He Y, Lin H, Yang S, Zhou Y, Zhou L, et al. High expression of atonal homolog 8 predicts a poor clinical outcome in patients with colorectal cancer and contributes to tumor progression. *Oncology reports.* 2017;37(5):2955-63.
219. Song Y, Pan G, Chen L, Ma S, Zeng T, Man Chan TH, et al. Loss of ATOH8 Increases Stem Cell Features of Hepatocellular Carcinoma Cells. *Gastroenterology.* 2015;149(4):1068-81 e5.