

FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA  
PROGRAMA 3139  
DEPARTAMENT DE MEDICINA  
TESIS DOCTORAL

**IDENTIFICACIÓN  
DE BIOMARCADORES  
CIRCULANTES CON VALOR  
PRONÓSTICO Y PREDICTIVO  
DE RESPUESTA EN CÁNCER  
DE MAMA TRIPLE NEGATIVO**

**CARMEN SALVADOR COLOMA**

DIRECTORES:

DRA. ANA SANTABALLA BERTRÁN

PROF. ANA LLUCH HERNÁNDEZ

DR. JAIME FONT DE MORA SAÍNZ

DICEMBRE, 2018



VNIVERSITAT  
ID VALÈNCIA





VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

**Facultat de Medicina i Odontologia**  
Programa 3139 Departament de Medicina

**Identificación de biomarcadores circulantes con valor pronóstico  
y predictivo de respuesta en cáncer de mama triple negativo.**

Tesis Doctoral presentada por:  
Carmen Salvador Coloma

Directores:  
Dra. Ana Santaballa Bertrán  
Prof. Ana Lluch Hernández  
Dr. Jaime Font de Mora Saínez

Diciembre, 2018



Dra. Ana Santaballa Bertrán, Jefa de la Unidad Funcional de Mama y Tumores Ginecológicos del Hospital Universitari i Politècnic La Fe de València.

Prof. Ana Lluch Hernández, Catedrática del Departamento de Medicina de la Facultat de Medicina i Odontologia de la Universitat de València. Jefe de Servicio de Hematología y Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Dr. Jaime Font De Mora, Investigador del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia.

CERTIFICAN:

Que la presente tesis doctoral, titulada “**Identificación de biomarcadores circulantes con valor pronóstico y predictivo de respuesta en cáncer de mama triple negativo**”, que presenta Doña Carmen Salvador Coloma para optar al Grado de Doctor por la Universitat de València, ha sido realizada bajo su dirección en el departamento de Medicina de la Facultat de Medicina dentro del programa de doctorado 3139 así como en el Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia, y que se encuentra finalizada y lista para su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firman la presente en Valencia, a 17 de Diciembre de 2018.

Fdo.: Dra. Ana Santaballa Bertrán

Fdo.: Prof. Ana Lluch Hernández

Fdo.: Dr. Jaime Font de Mora Saínez.



## **AGRADECIMIENTOS**

Para poder alcanzar una meta inicialmente hay que definirla y posteriormente caminar hasta ella. Una vez alcanzada, es posible parar y mirar hacia atrás, observando la multitud de personas que han contribuido a que ese objetivo se convierta en realidad. Inicialmente me gustaría dar las gracias a mis directores de tesis:

A la Dra. Ana Santaballa, complicado explicar con palabras lo que siento y difícil escribir algo que no sepas. Gracias por haberme motivado desde el principio, por enseñarme que lo más importante son los pacientes y que pese a todas las dificultades hemos de seguir adelante. Gracias por haberme enseñado todo lo que sé en cáncer de mama y sobre todo por estar ahí siempre que lo he necesitado.

Al Dr. Jaime Font de Mora por ayudarme desde el inicio, enseñándome desde cero todos los secretos del laboratorio. Por creer en mis posibilidades y por motivarme continuamente.

A la Dra. Ana LLuch por ser todo un referente en la patología, por amar a las pacientes por encima de todo, por ser una investigadora incansable y enseñarnos todo lo que sabes.

Agradecer también al Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, por haberme ofrecido la oportunidad de implicarme en la investigación básica.

A todos los miembros de la Unidad de Mama del Hospital La Fe. Desde enfermería, secretaria, auxiliares, médicos (oncólogos, cirujanos, radiólogos y patólogos) y residentes, gracias. Gracias por ayudarme y por implicaros desde el inicio en el proyecto. Mención especial requiere Concha, nuestra enfermera de la Unidad, sin tu ayuda el proyecto no podría haberse llevado a cabo. Y Ana García por esas tardes desinteresadas e interminables, incluso en verano, enseñándome a mirar con otros ojos toda esa infinidad de tinciones.

Por supuesto, gracias a todo el Servicio de Oncología Médica del Hospital La Fe por impulsarme desde el principio y por vuestros ánimos incansables. Y gracias a Óscar, mi co-r, por todo, por estar siempre ahí, porque aunque estés lejos siempre serás una parte muy importante para mí.

No puedo olvidarme de la parte más importante del proyecto, las pacientes. Gracias a todas y cada una de vosotras por vuestra ilusión y comprensión, y por vuestro esfuerzo y ganas de mejorar. A todas y cada una de vosotras está dedicado, con mucho cariño, el proyecto. Y en este apartado, no puedo dejar de mencionar al Dr. Ripoll, nuestro cirujano de la Unidad de Mama, gracias por tú interés y por presentarnos a "AMACMA". A ellas, no puedo más que agradecerles su implicación con la patología y darles las gracias por su afán de contribuir con la investigación, financiado prácticamente todo el proyecto. Gracias, sin vosotras no habría sido posible. También debo mencionar a Cabesan y a la compañía Carraclas por su participación en el proyecto.

Dar las gracias a las integrantes del laboratorio a Elena, Sandra, Amanda y Carol. Muchísimas gracias por apoyarme en todo desde el principio, más que compañeras, amigas.

Para finalizar dar las gracias a mi familia: a mis padres, a mi hermano, a mis abuelos y tíos. Muchas gracias por vuestro apoyo incondicional, por estar ahí en los buenos y malos momentos. Gracias por ser luchadores incansables y enseñarme a serlo, gracias por creer en mí. No tengo líneas suficientes para agradecer todo lo que me habéis dado. Y por supuesto a David, muchísimas gracias por ser el mejor compañero de viaje que podría tener, por comprenderme, por ayudarme y por estar siempre a mi lado, porque nada sin ti tendría sentido.

***Gracias a todos.***



## **BECAS OTORGADAS**

Agradecer al Instituto de Investigación Sanitaria La Fe por haberme otorgado el contrato de investigación que ha permitido el desarrollo del proyecto.



*"Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto, y pensar lo que nadie más ha pensado".*

Albert Szent-Györgyi (1893-1986).  
Premio Nobel de Medicina en 1937.



## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>29</b>
1. Epidemiología del cáncer de mama.....	29
2. Historia natural del cáncer de mama. ....	31
3. Clasificación del cáncer de mama. ....	38
3.1. Luminal A.....	40
3.2. Luminal B.....	41
3.3. HER2.....	41
3.4. Tipo normal. ....	42
3.5. Tipo basal. ....	42
3.6. Expresión baja en claudina. ....	43
4. Cáncer de mama triple negativo. ....	44
4.1. Cáncer de mama triple negativo asociado a mutación de BRCA. ....	48
5. Clasificación molecular del cáncer de mama triple negativo. ....	50
5.1. Subtipos moleculares del cáncer de mama triple negativo. ....	53
6. Tratamiento sistémico del cáncer de mama triple negativo con enfermedad local o localmente avanzada. ....	59
6.1. Quimioterapia adyuvante en el cáncer de mama triple negativo. ....	59
6.2. Quimioterapia neoadyuvante en el cáncer de mama triple negativo. ....	60
7. Valoración de la respuesta patológica a la quimioterapia neoadyuvante.....	64

7.1. Respuesta patológica a la quimioterapia neoadyuvante en función de los subtipos moleculares en el cáncer de mama triple negativo.....	68
8. Biomarcadores. ....	72
8.1. Micro-ARNs en exosomas. ....	73
8.2. Metabolómica. ....	78
8.3. Proteómica. ....	81
8.4. Microambiente tumoral y sistema inmune. ....	82
<b>2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>93</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>97</b>
1. Diseño del estudio. ....	97
2. Población de estudio. ....	97
3. Número de sujetos.....	97
4. Criterios de selección. ....	98
5. Evaluación inicial y seguimiento de las pacientes. ....	99
6. Método de obtención de la muestra. ....	103
7. Micro-ARN en exosomas. ....	104
7.1. Procedimiento de extracción de miARN.....	105
8. <i>Arrays</i> de miARN .....	108
9. Citometría de flujo. ....	109
9.1. Técnica de detección de células T reguladoras en sangre periférica mediante citometría de flujo. ....	110

9.2. Técnica de detección de células inmunosupresoras de origen mieloide en sangre periférica mediante citometría de flujo.....	112
9.3. Descripción del equipo de citometría. ....	114
9.4. Análisis citometría de flujo.....	114
10. Metabolómica basada en espectrometría de masas.....	123
10.1. Preparación de la muestra.....	123
10.2. Cromatografía líquida de ultra-rendimiento-ionización por <i>electrospray</i> con espectrometría de masas en tándem (UPLC-ESI-MS/MS).....	126
11. Análisis histológico. Tinciones. ....	126
11.1. Preparación de los tejidos para estudio histológico. ....	127
11.1.A. Desparafinado. ....	127
11.1.B. Hidratación.....	127
11.2. Histopatología.....	128
11.2.A. Hematoxilina-eosina. ....	128
11.2.B. Receptores de estrógenos, progesterona y HER2. ....	128
11.2.C. Inmunohistoquímica. ....	128
11.3. Valoración de los resultados histopatológicos.....	129
12. Extracción de ARN de parafina.....	132
12.1. Purificación de ARN a partir de cortes de tejido FFPE.....	132
13. Hibridación de <i>arrays</i> de ARN de parafina. ....	134
14. Proteómica. ....	135
15. Cultivo celular. ....	137

15.1. Medios de cultivo.....	138
15.2. Mantenimiento de células. ....	138
15.3. Inactivación del Suero Bovino Fetal.....	139
15.4. Tratamiento con Tripsina-EDTA.....	139
16. Co-cultivo con línea de cáncer de mama triple negativo y células inmunosupresoras mieloides primarias.....	139
16.1. Realización de ficoll.....	139
16.2. Realización de tinción de células inmunosupresoras de origen mieloides.....	141
16.3. Separación de las células células inmunosupresoras de origen mieloides mediante <i>sorter</i> . ....	141
16.4. Co-Cultivo línea cáncer de mama triple negativo y células inmunosupresoras de origen mieloides.....	141
17. Cultivo celular con fármacos. ....	142
18. Análisis estadístico.....	143
19. Análisis funcional de miARN.....	144
20. Página web.....	144
21. Aspectos éticos.....	145
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>149</b>
1. Características de las pacientes.....	149
2. Valoración de la respuesta. ....	151
3. Comparación del perfil de expresión de micro-ARN en exosomas en función de la respuesta. ....	155



4. Metabólica.....	161
5. Tinciones sobre tejido.....	165
5.1. Tinción de TILs.....	165
5.2. Tinciones de CD4 y CD8.....	168
5.3. Tinción de CD163.....	170
5.4. Tinción de IDO1 y FOXP3.....	173
6. Citometría.....	179
7. Expresión de genes.....	186
7.1. Análisis de las muestras por PAM 50.....	188
7.2. Análisis de los subtipos de Lehmann.....	188
8. Proteómica.....	191
9. Cultivos con fármacos.....	192
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>205</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>217</b>
<b>7. ANEXO I.....</b>	<b>221</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>225</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Subtipos de cáncer de mama en la práctica clínica habitual.

**Tabla 2.** Distribución de los subtipos de CMTN.

**Tabla 3.** Evolución de los subtipos de CMTN.

**Tabla 4.** Estudios de QT neoadyuvante en CMTN con la correlación de su tasa de RCp.

**Tabla 5.** Estudios de QT neoadyuvante más agente dirigido en CMTN y la correlación con la tasa de RCp.

**Tabla 6.** Los miARN más frecuentemente alterados en cáncer.

**Tabla 7.** Variables clínicas recogidas en el estudio.

**Tabla 8.** Inmunofenotipo de las células inmunosupresoras.

**Tabla 9.** Anticuerpos monoclonales de las células Treg (Becton Dickinson).

**Tabla 10.** Anticuerpos monoclonales de las MDSCs.

**Tabla 11.** Características clínico-patológicas de las pacientes.

**Tabla 12.** Características clínico-patológicas y la distribución de los grupos en función de la respuesta global.

**Tabla 13.** Micro-ARN seleccionados y procesos a los que afectan.

**Tabla 14.** Distribución de CD163 tanto en el nicho tumoral como en estroma.

**Tabla 15.** Correspondencia de las 8 pacientes clasificadas como luminales en los subtipos de Lehmann con la clasificación de PAM50.

**Tabla 15.** Tipos de CMTN según Lehmann.

**Tabla 16.** Correlación entre ABCC11 y AR.



## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Capacidades adquiridas en el desarrollo de la célula tumoral

**Figura 2.** Invasión de tejidos y metástasis

**Figura 3.** Circuitos celulares que se reprograman en las células tumorales

**Figura 4.** Concordancia del 75% entre el tipo basal y el triple negativo.

**Figura 5.** Respuesta completa patológica y relación con la supervivencia libre de progresión en función del subtipo histológico de cáncer de mama.

**Figura 6.** Probabilidad de respuesta con la QT estándar según los subtipos moleculares. Vías metabólicas afectadas y tratamientos propuesto.

**Figura 7.** Vía metabólica del triptófano.

**Figura 8.** Tipos de MDSCs y funciones.

**Figura 9.** Procedimiento de extracción de miARN.

**Figura 10.** Proceso de preparación del análisis de citometría.

**Figura 11.** Proceso de selección de las células Treg por expresión de CD127.

**Figura 12.** Proceso de selección de las células Treg por expresión conjunta de CD127 y FOXP3.

**Figura 13.** Proceso de selección de las células Treg por expresión únicamente de FOXP3

**Figura 14.** Gráficas de citometría de flujo mostrando los diferentes subtipos de células inmunosupresoras de origen mieloide (MDSCs) de sangre periférica y el porcentaje que representan sobre la celularidad total.

**Figura 15.** Gráficas de citometría de flujo mostrando los dos subtipos de células inmunosupresoras de origen mieloide de sangre periférica, el porcentaje que representan sobre la celularidad total y el orden de marcadores realizado para la selección de las mismas

**Figura 16.** Metabolitos analizados y número de muestras con concentraciones superiores al límite de cuantificación.

**Figura 17.** Procedimiento de purificación de ARN de tejido FFPE.

**Figura 18.** Procedimiento de obtención de datos de proteómica.

**Figura 19.** Intensidad de señal del anticuerpo en el mapa de *arrays*.

**Figura 20.** Ficoll.

**Figura 21.** Mecanismos de acción de la enzalutamida. AR: receptor de andrógenos.

**Figura 22.** Algoritmo de selección de pacientes.

**Figura 23.** Variaciones de la expresión de Ki67 antes y después de QT según la categoría de respuesta.

**Figura 24.** Perfil de expresión de miARN en exosomas de pacientes con cáncer de mama local o localmente avanzado en función del grado de respuesta 1 o 5.

**Figura 25.** Niveles de miARN en exosomas entre los pacientes sin respuesta y los pacientes con respuesta completa.

**Figura 26.** Estudio funcional de miARN donde se observan las cuatro vías implicadas, todas ellas relacionadas con la inmunidad, los genes implicados y sus miARN.

**Figura 27.** Distribución de probabilidad de respuesta a la QT neoadyuvante en función del nivel de 5 metabolitos en plasma.

**Figura 28.** Infiltrado linfocitario estromal.

**Figura 29.** Relación del infiltrado linfocitario con la respuesta global (mama y axila de las pacientes).

- Figura 30.** Tinción de CD4 con infiltración sobre el 50%.
- Figura 31.** Tinción de CD8 con infiltración sobre el 60%.
- Figura 32.** Grado de respuesta global (mama y axila) en función de la ratio CD4/CD8.
- Figura 33.** Tinciones de CD163.
- Figura 34.** Tinción de FOXP3.
- Figura 35.** Relación de IDO1 con la respuesta.
- Figura 36.** Relación de IDO1 con afectación ganglionar. A más porcentaje de IDO1 mayor afectación ganglionar.
- Figura 37.** Relación entre el triptófano en plasma y la expresión de IDO1 en tumor.
- Figura 38.** Relación entre el nivel de e-MDSCs y el grado de respuesta global de las pacientes
- Figura 39.** Paciente con mala respuesta a la QT neoadyuvante. Análisis de MDSCs previo al inicio de la QT neoadyuvante.
- Figura 40.** Paciente con mala respuesta a la QT neoadyuvante. Análisis de MDSCs al finalizar la QT neoadyuvante.
- Figura 41.** Paciente con buena respuesta a la QT neoadyuvante. Análisis de MDSCs previo al inicio de la QT neoadyuvante.
- Figura 42.** Paciente con buena respuesta a la QT neoadyuvante. Análisis de MDSCs al finalizar la QT neoadyuvante.
- Figura 43.** Correlación de e-MDSCs (o tempranas) con la expresión de IDO1 en inmunohistoquímica.
- Figura 44.** Mapa de calor de expresión de genes.
- Figura 45.** Validación *in silico* de la expresión de KDM6A
- Figura 46.** Distribución de subtipos intrínsecos según PAM50.
- Figura 47.** Distribución de las pacientes analizadas según los subtipos de Lehmann.

**Figura 48.** Proteómica. Mapa de calor de las pacientes con respuesta 1 frente a las pacientes con respuesta 5.

**Figura 49.** Correlación entre el receptor de andrógenos y ABCC11.

**Figura 50.** Correlación entre el transportador multidroga ABCC11 y AR (receptor de andrógeno) en diversas cohortes de tumores y de líneas celulares.

**Figura 51.** Línea MDA-MB231 combinación de montelukast con enzalutamida.

**Figura 52.** Línea MDA-MB-453 combinación de montelukast con enzalutamida

**Figura 53.** Fotos de los cultivos celulares.



## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS

AC	Antraciclinas y ciclofosfamida
AcMos	Anticuerpos monoclonales
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico Complementario
AR	Receptor de Andr6geno
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AUC	Área bajo la curva
BLIS	Inmuno Suprimido de tipo Basal
BLIA	Inmuno Activado de tipo Basal
BL	Tipo basal
BL1	Subtipo basal tipo 1
BL2	Subtipo basal tipo 2
BSA	Albúmina de suero bovino
CBDA	Carboplatino
CCR	Cáncer Colorectal
CD	Grupo de diferenciación
CH <sub>3</sub> CN	Acetonitrilo
CMF	Ciclofosfamida, Metotrexate y 5-Fluorouracilo
CMTN	Cáncer de mama triple negativo
CSS	Hojas de Estilo en Cascada
CTCAE	Criterios comunes de toxicidad
CTLA-4	Proteína 4 asociada a los linfocitos T citot6xicos
e-MDSCs	Células tempranas inmunosupresoras de origen mieloide

EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFR	Factor de crecimiento epidérmico
EMT	Transición epitelio-mesénquima
FISH	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente
FMD	Quinurenina formamidasa
FFPE	Tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina
FOXA1	Proteína <i>Forkhead</i> box A1 o Factor nuclear 3- $\alpha$ del hepatocito
FOXP3nu	Factor nuclear transcripcional FOXP3
GEICAM	Grupo Español de Investigación en Cáncer de Mama
GF	Factores de crecimiento
GO	Ontología de Genes
GSEA	Análisis enriquecido de un conjunto de genes
HCOOH	Ácido fórmico
HER2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
HR	Cociente de riesgo
HTML	Lenguaje de documentos para hipertexto
IC95%	Intervalo de confianza al 95%
IDO	Indolamina 2,3-dioxigenasa
IGFR	Receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1
IHQ	Inmunohistoquímica
I	Inhibidor
IDO	Indolamina 2, 3-dioxigenasa

IL	Interleucina
IM	Inmunomodulador
IMC	Índice de masa corporal
ISO	Organización Internacional de Normalización
KATS	Quinurenina aminotransferasa
Ki67	Índice de proliferación
KMO	Quinurenina hidroxilasa
KYNU	Quinureninasa
LAG-3	Gen de activación de linfocitos 3
LAR	Receptor de andrógenos luminal
Lin	Linaje
LLC	Leucemia linfática crónica
M	Mesenquimal
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MDSC	Células inmunosupresoras de origen mieloide
miARN	Micro ácido ribonucleico
Mo-MDSCs	Células monocíticas inmunosupresoras de origen mieloide
MSL	Mesenquimal de tipo troncal
Nab-paclitaxel	Nanopartículas de albúmina unidas a paclitaxel
NCI	<i>Instituto Nacional del Cáncer</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
OSNA	Amplificación de ácidos nucleicos en un solo paso
OR	Razón de probabilidades
PARP	Poli-ADP ribosa polimerasa
PBS	Tampón fosfato salino

PD-1	Proteína de muerte celular programada 1
PD-L1	Ligando 1 de muerte programada
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PHP	Preprocesador de hipertexto
PI3K	Fosfatidil-insositol 3 quinasa
PMN-MDSCs	Células polimorfonucleares inmunosupresoras de origen mieloide
PS	<i>Performance Status</i>
QPRT	Ácido quinolínico fosforibosil transferasa
QT	Quimioterapia
R	Coefficiente r
RB	Retinoblastoma
RCp	Respuesta completa patológica
RE	Receptor de estrógenos
RM	Resonancia magnética
RP	Receptor de progesterona
SG	Supervivencia global
SLP	Supervivencia libre de progresión
TAMs	Macrófagos asociados a tumor
T-DM1	Trastuzumab emtansine
TDO	Triptófano-2-3-dioxigenasa
TGFβ	Factor de crecimiento transformante β
TILs	Linfocitos infiltrantes de tumor
Tregs (células)	Células T reguladoras
UPLC-ESI-MS/MS	Cromatografía líquida de ultra-rendimiento-ionización por <i>electrospray</i> con espectrometría de masas en tándem
μL	Microlitros

XBP

3HAO

Tampón de unión

3-hidroxiantranilato-3, 4-dioxigenasa





# 1. INTRODUCCIÓN





## **INTRODUCCIÓN**

### **1. Epidemiología del cáncer de mama.**

El cáncer constituye una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, con aproximadamente 14 millones de casos nuevos en el mundo (últimos casos que se encuentran disponibles, todos ellos estimados por los proyectos GLOBOCAN, EUCAN y OMS). Las previsiones indican que probablemente el número de casos aumente en las dos próximas décadas a 22 millones de nuevos casos anuales (1).

En 2015 la incidencia en España fue de 247.771 (148.827 en varones y 98.944 en mujeres). Los tumores más frecuentes en conjunto para ambos sexos fueron el cáncer colorrectal (41.441 casos), la próstata (33.370 casos), el pulmón (28.347 casos), la mama (27.747 casos) y la vejiga (21.093 casos). Si diferenciamos por sexo: en varones predominaron la próstata (33.370 casos), el colorrectal (24.764 casos), el pulmón (22.430), la vejiga (17.439) y el estómago (5.150 casos). En mujeres predominó el cáncer de mama (27.747), seguido del colorrectal (16.677), cuerpo uterino (6.160), pulmón (5.917) y vejiga (3.654) (2).

En lo relativo a la supervivencia, España presenta datos similares al resto de países de nuestro entorno, siendo un 53% a los 5 años. En nuestro país, la mortalidad por cáncer para el año 2014 fue de 106.039 fallecimientos (65.019 casos en varones y 41.020 en mujeres). Para la población general los tumores que más defunciones produjeron fueron el cáncer de pulmón (21.220 muertes) y el cáncer colorrectal (15.449 muertes), seguidos a una gran distancia del cáncer de páncreas (6.278 muertes), cáncer de mama (6.213 muertes) y de próstata (5.855 muertes). Si diferenciamos por sexo, los cánceres de mayor mortalidad

en hombres fueron el cáncer de pulmón (17.173 fallecimientos), el cáncer de colon (6.951 muertes), próstata (5.855 muertes), vejiga (3.894 muertes), hígado (3.389 muertes), estómago (3.328 muertes) y el páncreas (3.193 fallecimientos). En las mujeres entre los cánceres de mayor mortalidad destacaron el cáncer de mama (6.213 fallecimientos), el de colon (4.827 muertes), pulmón (4.047 fallecimientos), páncreas (3.085 muertes), estómago (2.194 muertes), útero (2.185 muertes) y ovario (2.152 muertes) (3).

Si nos centramos en el cáncer de mama, en 2012 se diagnosticaron a nivel mundial 1.676.500 cánceres de mama, siendo por tanto un 25% de todos los cánceres en mujeres. En Europa la proporción fue ligeramente mayor, llegando al 28,5%, mientras que en España presentó una situación intermedia del nivel Europeo (4, 5). En España la incidencia estandarizada por la edad es de 85 casos cada 100000 mujeres (4). En las últimas tres décadas, la incidencia por cáncer de mama presenta una tendencia ascendente con un incremento del 2-3% anual. Este aumento se encuentra justificado por cambios producidos en los hábitos de vida como la nuliparidad, la edad tardía del embarazo y otros como el envejecimiento de la población, el estatus menopáusico y los antecedentes familiares (6, 7). Existen medidas preventivas y estrategias de diagnóstico precoz que son necesarias para disminuir la carga de enfermedad. Sin embargo, estas estrategias difieren entre los países y en ocasiones dentro del mismo país (8, 9). En este sentido es importante identificar los grupos de mayor riesgo para tratar de adecuar las estrategias de prevención. Sin embargo, a pesar de todo el esfuerzo realizado para el diagnóstico precoz y la mejora existente en los tratamientos en la enfermedad localizada, en estadios avanzados

continúa siendo una enfermedad incurable con una supervivencia global del 25% a los 5 años (10). La mortalidad por cáncer de mama se estima en un 18% de toda la mortalidad por cáncer (11). En el año 2012 el cáncer de mama fue la primera causa de mortalidad por cáncer en mujeres en España con 6.213 fallecimientos (12).

## **2. Historia natural del cáncer de mama.**

El cáncer de mama es un importante problema social, sanitario y económico, puesto que es el tumor maligno más incidente y prevalente en mujeres, tanto en España como a nivel mundial. En las últimas décadas se han desarrollado numerosos descubrimientos en la biología tumoral. El cáncer es un crecimiento celular incontrolado. Para que una célula epitelial adquiera características tumorales debe acumular multitud de modificaciones que conducen a la célula a desarrollar un fenotipo más agresivo y en ocasiones inmortal (13). Muchas líneas de investigación revelan que la tumorigénesis en humanos es la consecuencia de la ganancia de sucesivas alteraciones genéticas que transforman la célula normal en tumoral (14). Se han descrito alteraciones esenciales en la fisiología celular que colectivamente producen un crecimiento maligno (figura 1): autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales inhibitorias, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, inducción de la angiogénesis, invasión de tejidos y metástasis (14). Estos cambios fisiológicos son nuevas capacidades distintivas que la célula adquiere durante el desarrollo tumoral (15):

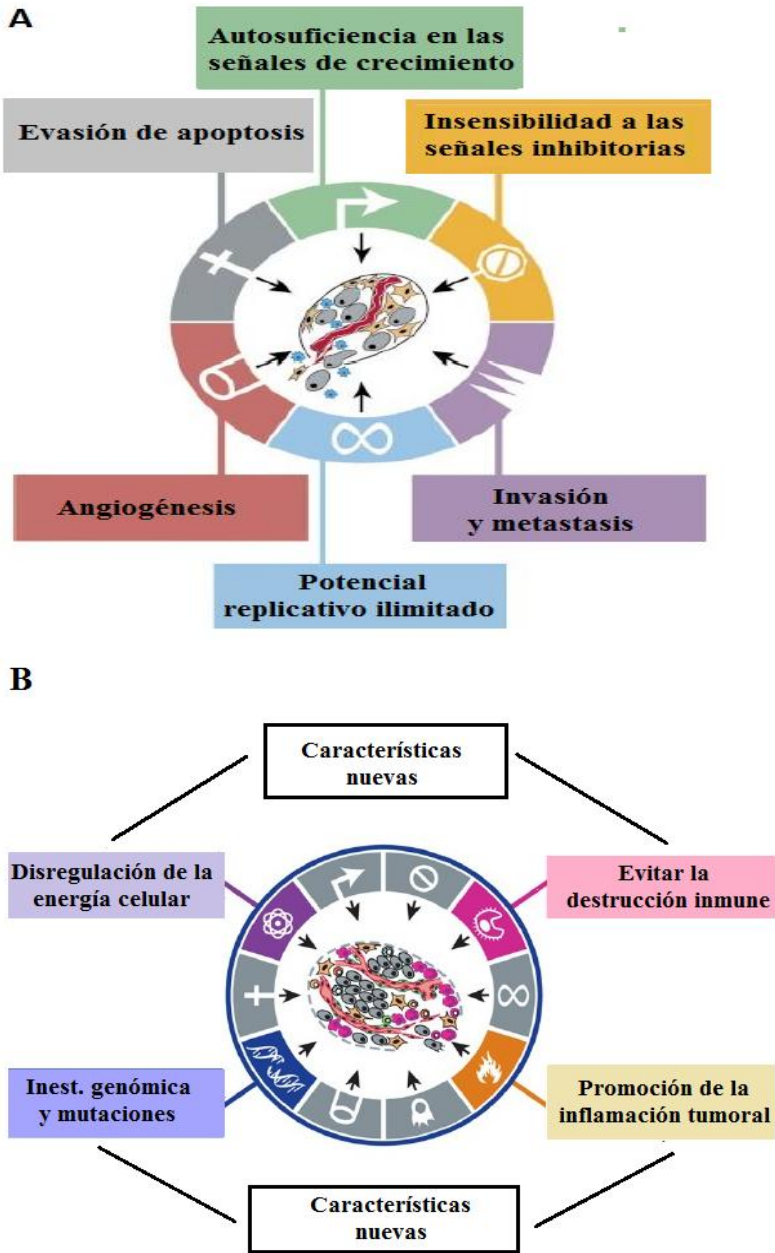


Figura 1. Alteraciones adquiridas durante la evolución de la célula tumoral. A. Primeras seis capacidades distintivas descritas como alteraciones

adquiridas por la célula normal para convertirse en tumoral. **B.** Capacidades descritas una década más tarde que también pueden ser adquiridas por la célula tumoral. Imágenes tomadas de los artículos de Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg (14, 15).

- Autosuficiencia en las señales de crecimiento: Las células epiteliales normales precisan de señales mitogénicas para dividirse. Estas señales se transmiten por receptores transmembrana a los que se unen diferentes ligandos. Sin embargo, esta característica se encuentra claramente alterada en las células tumorales. Las células cancerosas son capaces de producir sus propios factores que de una forma auto y paracrina aumentan la proliferación y reducen su dependencia del microambiente tumoral (14, 16-19).

- Insensibilidad a las señales inhibitorias de la proliferación: En los tejidos normales existen muchas señales que mantienen la quiescencia celular y se encargan de mantener la homeostasis de los tejidos. Las células tumorales son capaces de evadir o inactivar estas señales para continuar proliferando (14, 15, 20).

- Evasión de la apoptosis: La muerte celular programada o apoptosis tiene una relevante función durante el desarrollo embrionario y sirve de control natural para impedir la supervivencia de células dañadas y el desarrollo de enfermedades como el cáncer (21). La apoptosis se activa tanto de manera endógena como exógena dependiente del sistema inmune en respuesta al estrés fisiológico que las células experimentan durante el tratamiento o durante la tumorigénesis. Sin embargo, se ha observado que los tumores que progresan a alto grado o presentan

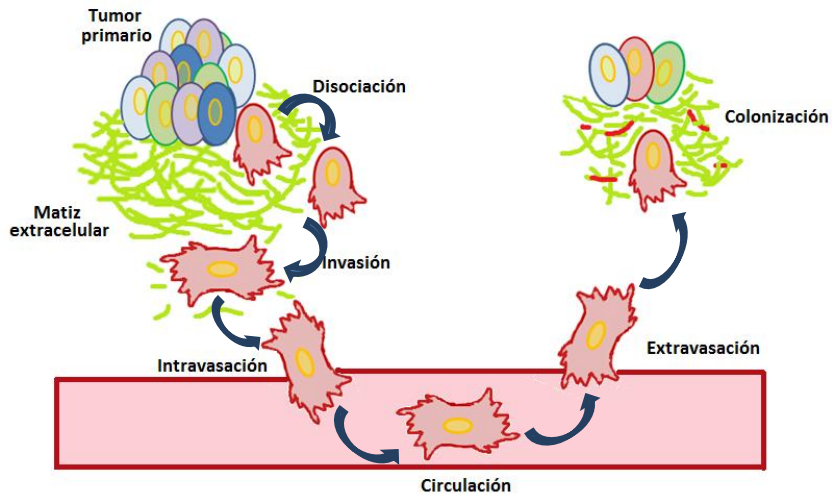
resistencia a los tratamientos tienen atenuada la apoptosis (21). Existen múltiples alteraciones descritas en la vía de la apoptosis que juegan un papel importante en el desarrollo tumoral como es la pérdida de la función del gen supresor tumoral TP53 (22).

- Potencial ilimitado de proliferación: Una de las características más importantes del cáncer es su capacidad para mantener activa la proliferación (14, 15). Las células tumorales presentan una capacidad ilimitada de proliferación que les otorga la facultad de ser inmortales y les permite generar tumores macroscópicamente visibles (15). Esto contrasta con la capacidad mitótica de las células normales dado que éstas únicamente presentan un número limitado de ciclos divisorios. En la célula sana, la senescencia y la apoptosis celular son barreras defensivas para evitar la acumulación de errores y la división ilimitada que pudieran dar lugar al desarrollo de un tumor. Sin embargo, en las células cancerosas este mecanismo se encuentra, alterado.

- Inducción de la angiogénesis: Al igual que los tejidos normales, las células tumorales precisan de oxígeno y nutrientes para sobrevivir. La neovascularización asociada al tumor se genera por el proceso de angiogénesis. Este proceso se encuentra casi siempre activado durante la progresión tumoral (15, 23).

- Invasión de tejidos y metástasis: La movilidad de las células tumorales contribuye a la aparición de metástasis. Este proceso se realiza en varios pasos: ruptura de la membrana basal, escape del tumor primario, migración a vasos sanguíneos y linfáticos, intravasación y extravasación y colonización de órganos distantes (figura 2). La capacidad de migrar

hacia entornos favorables es un comportamiento celular fundamental y evolutivamente conservado de organismos unicelulares a humanos (24).



**Figura 2. Invasión de tejidos y metástasis.** La célula cancerosa sufre un proceso por el que se disocia, invade el tejido llegando a los vasos se introduce dentro de los vasos sanguíneos, circula en ellos, se extravasa y coloniza un nuevo tejido. Modificado de Albritton *et al.* (25)

En la última década se han descrito 4 nuevas características intrínsecas de los tumores: la inestabilidad genómica y mutación, la alteración del metabolismo energético celular, la inflamación y la capacidad de la célula tumoral de evitar la reacción inmune del organismo (figura 1B).

- Inestabilidad genómica y mutación: La evolución progresiva de la célula tumoral mediante la ganancia de nuevas alteraciones genéticas y epigenéticas que le confieren ventajas frente al resto de células de su entorno se debe a fenómenos de inestabilidad genómica que dan lugar a

grandes reordenamientos de los genes y de sus secuencias reguladoras así como a mutaciones puntuales y cambios epigenéticos que alteran la expresión de genes y la actividad biológica de las proteínas resultantes (15, 26).

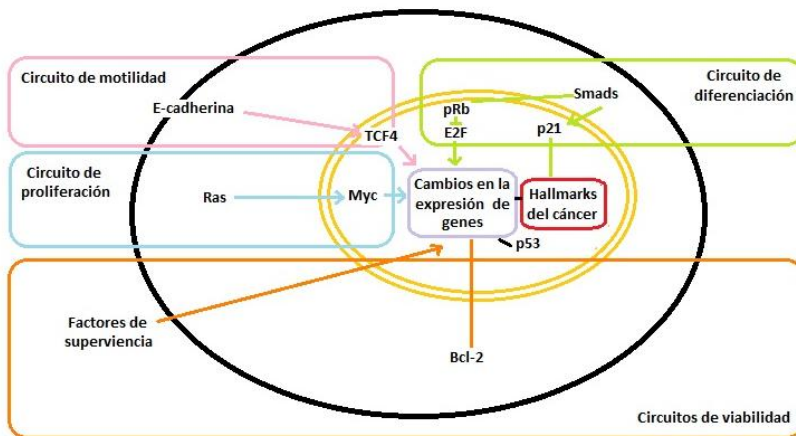
- La inflamación: En los últimos años se le ha comenzado a dar más importancia al microambiente tumoral. Se ha visto que no todos los tumores presentaban el mismo tipo de células a su alrededor ni en la misma cantidad. Se ha visto que muchos tumores presentan infiltración por el sistema inmunitario, tanto de la inmunidad innata como de la adquirida (27-29). Esta infiltración inmunológica está cobrando importancia y se ha observado que puede tener un significado pronóstico en los tumores (30-32).

- Alteración del metabolismo energético celular: La proliferación celular de forma crónica e incontrolada, como ocurre en la mayoría de tumores, precisa un reajuste del metabolismo celular que permita el suministro de energía a toda la actividad presente. En las condiciones normales, las células utilizan la glucosa que pasará a piruvato a través de la vía de la glucólisis en el citosol y posteriormente pasará a dióxido de carbono en la mitocondria. Sin embargo, en la célula tumoral se produce la mayoría de veces una situación de anaerobia, por lo que la glucólisis es favorecida y se envía poco piruvato a las mitocondrias que consumen oxígeno, se produce "glucólisis anaerobia" y la limitación en la producción de energía, por lo que la célula tumoral requiere de mayor consumo de glucosa para mantener la producción de energía (15, 33).



- Evasión de la destrucción inmune: El sistema inmune se encarga de reconocer y eliminar la gran mayoría de células tumorales (34, 35). Según esta teoría, los tumores sólidos que se desarrollan, han logrado camuflarse a la detección del sistema inmune, evitando así ser destruidos (15).

Todos estos procesos nos dan una idea de la complejidad que supone el desarrollo tumoral y como se van afectando y adaptando los diversos mecanismos celulares (figura 3). En los últimos años se ha visto que esta complejidad puede ser aún mayor afectando al microambiente tumoral como veremos más adelante.



**Figura 3. Vías de señalización celulares que se reprograman en las células tumorales.** Se trata de los mecanismos moleculares más frecuentemente alterados en las células tumorales. Adaptado de Hanahan and Weinberg (15).

El cáncer de mama es un grupo de enfermedades biológicas molecularmente muy heterogéneas que se originan en el tejido mamario. El cáncer de mama puede originarse en cualquier área de la mama.

Existen diversos tipos de cáncer de mama clasificados en función de su agresividad (36, 37). Existen paralelismos notables entre el desarrollo normal de la glándula mamaria y la progresión del cáncer de mama a nivel molecular (38, 39). El desarrollo de la glándula mamaria y de las células madre de la mama está regulado por varias vías de señalización como el receptor de estrógenos, receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) y la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina. Estas vías de señales controlan la proliferación de las células madre, la diferenciación, motilidad y muerte celular (36, 40-42). Además, los últimos estudios indican que los cambios epigenéticos y los ácidos ribonucleicos (ARN) no codificantes pueden desempeñar un importante papel en el desarrollo del cáncer de mama, contribuyendo a la heterogeneidad, metástasis y agresividad especialmente en el cáncer de mama triple negativo (CMTN) (36, 43).

### **3. Clasificación del cáncer de mama.**

El cáncer de mama es un grupo heterogéneo de enfermedades que tienen diferentes características moleculares con diferentes comportamientos biológicos, pronóstico y distinta respuesta a los tratamientos (44). Históricamente el cáncer de mama se ha clasificado en función de criterios anatómo-patológicos donde se incluyen: el índice de proliferación (Ki67), el grado histológico, la expresión de los receptores hormonales (receptores de estrógenos y progesterona) y la amplificación del gen HER2. En función de estos criterios se ha clasificado el cáncer de mama en luminal A, luminal B, HER2 positivo y triple negativo (tabla 1) (45).

**Tabla 1. Subtipos de cáncer de mama en la práctica clínica habitual (45).**

Subtipo histológico	Ki67	RE	RP	Her2
<b>Luminal A</b>	Bajo (<14%)	+	+/-	-
<b>Luminal B</b>	Alto (>14%)	+	+/-	-
<b>Her2</b>	Alto	-	-	+
<b>Triple negativo</b>	Alto	-	-	-

RE: receptor de estrógenos, RP: receptores de progesterona, Ki67: índice de proliferación.

En la última década se han identificado, mediante estudios de expresión génica, diferentes subtipos de cáncer de mama. Inicialmente *Perou* y *colaboradores* identificaron cuatro subtipos intrínsecos de cáncer de mama (tipo basal (BL), HER2-enriquecido, luminal y normal) (46). Estudios sucesivos estratificaron el subtipo luminal en A y B, y descubrieron que este sistema de clasificación tenía significado pronóstico (47). Desde entonces se ha identificado seis subtipos de cáncer de mama: Luminal A, Luminal B, HER2-enriquecido, BL, de expresión baja en Claudina y de tipo normal (48). Estos subtipos presentan una diferente incidencia, respuesta al tratamiento y supervivencia, lo cual nos ayudará a seleccionar mejor a las pacientes (49-54).

Diversos autores han demostrado que puede obtenerse una aproximación a los subtipos intrínsecos con el análisis patológico. Para intentar clasificar los tumores que se corresponden con los subtipos intrínsecos de *Perou* mediante inmunohistoquímica, se utiliza la expresión de receptores hormonales, HER2, grado y en algunos casos

citoqueratinas 5 y 6, Ki67 y factor de crecimiento epidérmico (EGFR), existiendo cierta confusión con los luminales B y la no subdivisión de los de tipo BL (45, 47, 55, 56).

### **3.1. Luminal A.**

El cáncer de mama luminal A es el subtipo histológico más común, representa aproximadamente el 40-50% de todos los subtipos de cáncer de mama (57). Este subtipo presenta una expresión génica similar al epitelio mamario normal. Se caracteriza por presentar a nivel inmunohistoquímico expresión de los receptores de estrógenos y progesterona, citoqueratinas 8/18, presenta un Ki67 bajo (y por tanto una baja proliferación celular) y bajo grado histológico. Además, este subtipo presenta expresión de genes transcritos por el receptor de estrógeno como XBP1, GATA3 y TFF3 (52, 57, 58).

El subtipo luminal A define un subtipo de pacientes candidatas a recibir tratamiento hormonal con menor incidencias de recaídas y una mayor supervivencia en la enfermedad metastásica. Multitud de estudios han determinado que este subtipo de pacientes presenta mayor supervivencia libre de progresión y supervivencia global (59, 60). Las pacientes luminales A tienen un índice diferente de recidivas, el 70% de las pacientes se encuentran vivas a los 10 años y la tasa de recaídas se encuentra alrededor del 28% a los 15 años, siendo muy inferior al resto de subtipos (61). El tratamiento de estas pacientes es principalmente el tratamiento hormonal tanto en enfermedad precoz como avanzada y presentan menor sensibilidad a los tratamientos citotóxicos.

### **3.2. Luminal B.**

El cáncer de mama luminal B constituye aproximadamente el 10-20% de todos los subtipos de cáncer de mama. Presentan un grado histológico mayor y un Ki67 más alto con mayor índice mitótico. Por tanto, son tumores más agresivos y presentan un peor pronóstico. Aunque también presentan cierto grado de quimioresistencia, tiene mayor respuesta al tratamiento de quimioterapia (QT) que el subtipo luminal A. Sin embargo, los luminales B tienen menor sensibilidad que los luminales A al tratamiento hormonal (62). En las pacientes luminales B el porcentaje libre de enfermedad a los 10 años es del 55% y la tasa de recaídas se encuentra alrededor del 43% a los 15 años (58).

### **3.3. HER2.**

El subtipo HER2 positivo representa entre el 10-15% de todos los subtipos de cáncer de mama. Es uno de los subtipos menos frecuentes, pero es altamente agresivo. La mayoría de los tumores HER2 presentan amplificación de este gen, lo que produce una sobreexpresión de la proteína HER2 (50). Se caracterizan por tener un alto grado proliferativo (Ki67 elevado), lo que les confiere una mejor respuesta al tratamiento de quimioterapia, pero un pronóstico peor que los subtipos luminales A y B, así como mucha más agresividad. La supervivencia a 10 años en este subtipo cae hasta el 51% (45). Sin embargo, en las últimas décadas el pronóstico de estas pacientes ha mejorado gracias a la aparición de nuevos tratamientos dirigidos como el trastuzumab, lapatinib, pertuzumab y trastuzumab emtansine (T-DM1) tanto en enfermedad localizada como en enfermedad metastásica (63-69).

A nivel molecular los tumores HER2 enriquecidos se caracterizan por una elevada expresión de HER2 y otros genes del amplicón 17q como GRB7. También se caracteriza por un nivel de baja o intermedia expresión de genes luminales como ESR1 y PGR, y baja expresión de genes del subtipo basal como FOXC1 (70). Aunque la mayoría de los tumores HER2 enriquecidos presentan el receptor hormonal negativo por inmunohistoquímica, el 30% son típicamente receptor hormonal positivo (71).

### **3.4. Tipo normal.**

Este subtipo supone un 5% de todos los cánceres de mama. Se cree que realmente no son un subtipo de cáncer de mama sino que es una biopsia contaminada por tejido mamario sano. Se han agrupado en la clasificación molecular junto con el tejido mamario sano (57).

### **3.5. Tipo basal.**

El subtipo BL representa aproximadamente el 10-15% de todos los subtipos de cáncer de mama. Presentan un alto grado proliferativo (Ki67 muy elevado), alto índice mitótico y abundante necrosis. Generalmente se presentan en pacientes jóvenes, con mayor frecuencia de afectación ganglionar, son hormono-resistentes y presentan muy mal pronóstico (72).

Expresan citoqueratinas 5, 6 y 17, laminina, vimentina, P-cadherina, EGFR, CD44, FABP7 y múltiples mutaciones en TP53. Existen varios genes que definen este subtipo como la queratina 14 e ID4, así como multitud de genes asociados a la proliferación como FOXM1 (73). Este subtipo también presenta alta inestabilidad cromosómica y mutaciones

en BRCA. Además, se caracteriza por la ausencia de expresión de HER2 y de los receptores hormonales (receptores de estrógenos y de progesterona). Debido a la ausencia de expresión de ambos receptores hormonales y de HER2 el tipo BL se trata en la práctica clínica como equivalente al triple negativo. Desgraciadamente, no son sinónimos sino que existe una discordancia de aproximadamente el 30% entre ambos grupos, dado que en la práctica clínica habitual la clasificación que se realiza es por inmunohistoquímica y no por una plataforma genómica (73, 74).

### **3.6. Expresión baja en claudina.**

En 2007 se identificó un nuevo subtipo que representa entre el 12-14% de todos los subtipos de cáncer de mama (75). Comparte muchas características del subtipo BL en lo que se refiere a la expresión génica. Se caracteriza por baja expresión de HER2, de genes luminales, claudinas 3, 4, 7, cingulina y E-cadherina (76). Este subtipo tumoral suele ser de alto grado histológico y suele presentar una diferenciación de tipo medular o anaplásico. Tiene mal pronóstico dado que sobreexpresa genes ligados con la transición epitelio-mesénquima y con la diferenciación mesenquimal. Tiene una sensibilidad intermedia a la quimioterapia, entre el subtipo basal y el luminal (76). Por tanto, dado que es negativo para receptores de estrógenos, progesterona y HER2, podría considerarse triple negativo. Sin embargo, el subtipo de expresión baja en claudina no concuerda al 100% con el triple negativo, pudiendo presentar expresión positiva de receptores hormonales un 20% de los tumores con expresión baja de claudina (77).

#### **4. Cáncer de mama triple negativo.**

El término CMTN es un término aceptado históricamente para los tumores con muy baja o ausencia de expresión de receptores hormonales y HER2. Un 15% de las pacientes presentan un subtipo triple negativo. Este fenotipo reúne a un subgrupo de enfermedades con un comportamiento biológico diferente y con una epidemiología no claramente precisada (78-80).

El desarrollo de terapias dirigidas contra dianas moleculares que se encuentran en la célula tumoral ha cambiado la historia natural de algunos subtipos de cáncer de mama como los luminales o HER2. Sin embargo, hasta la fecha no existen tratamientos dirigidos contra el CMTN, siendo la quimioterapia el único tratamiento aprobado en estas pacientes.

Actualmente, el CMTN se define de forma estándar mediante técnicas de inmunohistoquímica en las que los tumores presentan un alto grado histológico y de proliferación, necrosis, una expresión  $\leq 1\%$  de receptores hormonales (estrógenos y progesterona) y HER2 negativo o muy moderadamente positivo (una cruz por inmunohistoquímica, si es dos cruces entonces la FISH debe ser negativa, es decir HER2 no amplificado) (81, 82). Muchos de los principios básicos de diagnóstico y manejo del CMTN son similares a otros subtipos, en general, muchos aspectos como factores de riesgo, características patológicas y moleculares, historia natural y sensibilidad a la QT son únicas y específicas del CMTN.



Se trata de un subtipo tumoral con un comportamiento más agresivo que el resto, de peor pronóstico y que habitualmente se presenta en mujeres jóvenes, generalmente menores de 40 años (80). Algunos estudios han demostrado que las mujeres menores de 40 años presentan un riesgo dos veces superior a las mujeres mayores de 50 años (83). Como diferencias en factores de riesgo respecto al resto de subtipos destaca la mutación de BRCA, principalmente de BRCA1, presente en un 20% de las pacientes con CMTN, a diferencia del resto de cánceres de mama cuya incidencia es inferior al 6% (84). Por ello, las pacientes con CMTN deben ser remitidas para su valoración por la Unidad de Consejo Genético. Se ha visto que las pacientes afro-americanas presentan más riesgo que el resto de la población de sufrir este tipo tumoral (85). Otros factores hormonales como el estatus premenopáusico, la edad temprana en la menarquia, el uso de anticonceptivos orales, terapia hormonal sustitutiva o la multiparidad pueden incrementar el riesgo, aunque en ocasiones estas características se encuentran entremezcladas en los estudios (86-88).

El pronóstico de estas pacientes es, generalmente, infausto aunque se diagnostiquen en estadios localizados, sin más opciones de tratamiento más allá de la quimioterapia. Este subtipo de cáncer de mama presenta peor pronóstico respecto al resto de subtipos tumorales (89, 90). En un estudio de 2012 con 12902 pacientes observaron que las pacientes con CMTN presentaban una supervivencia específica mucho peor, con un cociente de riesgo (HR) de 2,99 y un intervalo de confianza del 95% (IC95%) entre 2,59-3,45. Una peor supervivencia global HR: 2,72, IC95%: 2,39-3,10 y un drástico incremento de la tasa de muerte en los dos años tras el diagnóstico con un HR: 6,10, IC95%: 4,81-7,74 (90).

Sin embargo, el riesgo de recurrencia a largo plazo en estas pacientes es menor que en el resto de subtipos neoplásicos. En una serie retrospectiva de 783 pacientes con CMTN estadios I, II y III que se encontraban libres de recaída a los 5 años, el intervalo libre de recurrencia a los 10 y 15 años fue del 91 y 83 respectivamente (91). En otro estudio prospectivo de pacientes con estadios I a III la tasa de recidivas para las pacientes con CMTN disminuyó aproximadamente hasta cero tras el 6 año (92).

Es ampliamente aceptado que los malos resultados obtenidos con el tratamiento se vinculan a la heterogeneidad del CMTN (93, 94). Esta diversidad se debe no sólo a los diferentes subtipos moleculares sino también a la importante prevalencia de diversos subtipos histopatológicos como el adenoide quístico (90-100%), medular (95%), metaplásico (90%) y apocrino (40-60%) (95).

El tipo basal fue descubierto hace más de una década con la primera generación de *microarrays* de expresión (46). Este subtipo se correlaciona con la expresión de citoqueratinas 5/6, 14, y 17, P-cadherina, TP53, y EGFR (96). Estos tumores se llaman habitualmente CMTN debido a que la mayoría son negativos para receptores hormonales y HER2. Este tipo tumoral presenta un perfil de expresión génica similar a la membrana basal mioepitelial del tejido mamario normal (46, 93). Sin embargo, el 75% de los CMTN son de subtipo BL, comprendiendo el otro 25% el resto de subtipos. Este 25% de CMTN que no son BL, aunque no expresan receptores hormonales ni HER2 por inmunohistoquímica, no presentan las características de expresión génica del subtipo basal (figura 4) (37, 93, 97).



**Figura 4. Concordancia del 75% entre el subtipo BL y el triple negativo.**

Existe un 25% de los tumores triple negativos que por *arrays* de expresión de genes no son BL y viceversa. Adaptado de Hubalek *et al* (93).

Con el desarrollo de la secuenciación de alto rendimiento se intenta caracterizar cada vez mejor los tipos de CMTN basándose en su perfil mutacional somático, tratando de encontrar posibles dianas terapéuticas. La secuenciación del exoma del ADN genómico de pacientes con CMTN no seleccionados en el momento del diagnóstico ha mostrado una amplia variabilidad en el genoma, con casos que muestran baja clonalidad (menos mutaciones somáticas a frecuencias alélicas más altas) y otros que muestran evidencia clonal más evolucionada (múltiples mutaciones somáticas a frecuencias alélicas más bajas) (98). Aunque la relación no es exacta, los CMTN de tipo BL presentan una evolución clonal más extensa comparada con los CMTN no BL.

Diversos estudios han refinado la subclasificación del CMTN, como el estudio realizado en la red de investigación del atlas del genoma del cáncer (*Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network*), revelando que la pérdida y ganancia de funciones más frecuentes en CMTN afecta a genes asociados a las vías de reparación de daño al ADN (incluyendo

la pérdida de función de TP53, retinoblastoma 1 (RB1) y BRCA1) y la vía de señalización de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K), que se encuentra mutada en un 9% de los CMTN (37, 99). Los CMTN tienen una alta tasa de mutaciones en TP53 (60-75%) (100, 101), sin embargo, un 12% de los CMTN no presentan mutaciones somáticas en genes promotores del cáncer lo que nos indica que el CMTN es mutacionalmente muy heterogéneo desde su comienzo (98).

Las mutaciones somáticas de TP53, PIK3CA y PTEN se han identificado como alteraciones genéticas clonalmente dominantes en una importante proporción de tumores, pero su frecuencia clonal es inconsistente entre los CMTN, sugiriendo variaciones en los eventos que desarrollan la carcinogénesis (98).

#### **4.1. Cáncer de mama triple negativo asociado a mutación de BRCA.**

Los pacientes con mutación de BRCA1 desarrollan tumores con características similares al CMTN esporádico subtipo BL, incluyendo el alto grado proliferativo, receptores hormonales negativos, HER2 negativos y alta frecuencia de mutaciones en TP53. Ambos subtipos se agrupan en el mismo perfil de expresión génica (102). Las características del perfil de pacientes con mutación en BRCA incluyen el fenotipo basal (asociado al fenotipo BRCA1 pero no BRCA2), este incluye receptor de estrógenos negativo, amplificación de c-MYC, expresión de EGFR, mutación de TP53, pérdida de RAD51, inestabilidad genómica y sensibilidad a los agentes que afectan al ADN (103).

La respuesta al daño del ADN es la reacción celular a lesiones citotóxicas exógenas y endógenas que pueden producir roturas de cadenas simples de ADN y roturas de doble cadena de ADN. Si el proceso de reparación no se ejecuta correctamente, las lesiones del ADN producen mutaciones y aberraciones cromosómicas que alteran el comportamiento celular y conducen al cáncer y a la progresión del tumor independientemente del estado mutacional de BRCA. Se ha observado en el subtipo BL de CMTN la pérdida frecuente de otros genes implicados en la reparación por recombinación homóloga dependiente de BRCA1, por tanto, lo más probable es que presente características similares a los que tienen BRCA1 mutado (93, 104).

En los últimos años, los datos existentes de los ensayos clínicos sugieren que la presencia de mutaciones en línea germinal como BRCA1 y BRCA2 o alteraciones en esta vía de reparación puede tener implicaciones clínicas importantes (105).

Varios estudios han demostrado que la deficiencia de recombinación homóloga sensibiliza el tumor a agentes que dañan al ADN, como los compuestos de platino, o a los inhibidores de PARP (poli-ADP-ribosa polimerasa) (106-108). En el estudio TNT, pacientes con cáncer de mama metastásico o localmente avanzado triple negativo o con mutaciones en línea germinal BRCA1 o BRCA2, fueron aleatorizadas a ser tratadas con carboplatino o docetaxel. No se observó superioridad de ningún tratamiento en pacientes con CMTN no seleccionadas. Sin embargo, en las pacientes con mutaciones en línea germinal BRCA1 o BRCA2 el carboplatino se asoció a una mayor respuesta (109). Más recientemente el estudio OlympiAD, que aleatorizaba pacientes con

cáncer de mama metastásico con mutaciones en BRCA1 o BRCA2 y HER2 negativo, a recibir olaparib frente a la QT elegida por el investigador, demostró que los pacientes que recibían olaparib se beneficiaban de forma estadísticamente significativa (110). En base a los resultados del estudio OlympiAD, este fármaco fue aprobado recientemente por la Administración de Drogas y Alimentos de los EE. UU. (FDA) para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico HER2 negativo y BRCA mutado resistentes al tratamiento quimioterapéutico (110, 111). Resultados similares se han obtenido en el estudio EMBRACA con talazoparib, otro inhibidor de PARP, para el mismo tipo de población (112).

### **5. Clasificación molecular del cáncer de mama triple negativo.**

El primer intento realizado para diferenciar los subtipos de CMTN se realizó con muestras de 14 bases de datos donde los investigadores valoraron la relación entre los subtipos intrínsecos de PAM50 y subtipos moleculares de CMTN. Las muestras de CMTN fueron clasificadas mediante PAM50 como BL (80,6%), de tipo normal (14,6%), luminal B (3,5%), luminal A (1,1%) y HER2 (0,2%) (46, 113, 114).

Tras la clasificación de PAM50 se han realizado múltiples esfuerzos para la creación de perfiles genómicos que han llevado al reconocimiento de seis subtipos moleculares de CMTN (115). Estos subtipos se han desarrollado analizando el perfil de expresión de genes de 587 casos de CMTN. Los 6 subtipos descritos fueron: dos tipos de BL, BL1 y BL2, un inmunomodulador (IM), un mesenquimal (M), un mesenquimal de tipo troncal (MSL) y LAR (115), (tabla 2).

**Tabla 2. Distribución de los subtipos de CMTN (37, 99, 115).**

Subtipo molecular CMTN	Porcentaje	Alteraciones
<b>Tipo basal 1</b>	18%	Daño en el ADN, ciclo celular
<b>Tipo basal 2</b>	13%	TP63, EGFR, MET
<b>Inmuno-modulador</b>	21%	Señalización inmune
<b>Mesenquimal</b>	19%	EMT, Wnt, TGF $\beta$ , IG1FR, Notch, proliferación celular.
<b>Mesenquimal de tipo troncal</b>	8%	EMT, Wnt, TGF $\beta$ , MAPK, RAC, PIK3CA, PDGF
<b>Receptor de andrógenos luminal</b>	11%	Señalización AR, FOXA1 y HER4
<b>No clasificado</b>	10%	-

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico, EMT: Transición epitelio-mesénquima, TGF $\beta$ : Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$ , MAPK: Proteína Quinasas Activadas por Mitógenos, PI3K: Fosfatidilinositol 3 quinasa, PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas AR: Receptor de andrógenos, FOXA1: *Forkhead Box A1* o Factor nuclear 3- $\alpha$  del hepatocito (HNF-3A).

Esta clasificación se ha ido modificando en los últimos años debido a la necesidad de identificar subtipos realmente relevantes para la clínica. Utilizando un perfil de ARN y ADN se consiguió subclasificar los subtipos de CMTN en 4 tipos molecularmente estables: LAR, M, de tipo basal inmunosuprimido (BLIS) y de tipo basal inmunoactivado (BLIA) (116-118). Debido a la alta complejidad y a la variedad histológica de las muestras, Lehmann y colaboradores refinaron su estudio mediante microdissección y captura con láser, observando que los previamente descritos como IM y MSL eran artefactos del infiltrado tumoral y de las

células estromales asociadas al tumor, respectivamente. Por este motivo modificaron su clasificación inicial de 6 subtipos en solo 4: BL1, BL2, M y LAR (118) (tabla 3).

**Tabla 3. Evolución de los subtipos de CMTN (93).**

CMTN 6 subtipos (Lehmann) (115)	CMTN 4 subtipos (Lehmann) (118)	CMTN 4 subtipos (Burstein) (116)
Tipo basal 1	Tipo basal 1	Tipo basal inmuno suprimido
Tipo basal 2	Tipo basal 2	_____
Inmunomodulador	_____	Tipo basal inmuno acitvado
Mesenquimal	Mesenquimal	Mesenquimal
Mesenquimal de tipo troncal	_____	_____
Receptor de andrógenos luminal	Receptor de andrógenos luminal	Receptor de andrógenos luminal

La alternativa clasificación de Burstein y colaboradores fue propuesta debido a que los subtipos BL1 y BL2 propuestos por Lehmann no eran realmente diferenciables utilizando el agrupamiento jerárquico del conjunto de datos público de CMTN (105, 116, 118).



## **5.1. Subtipos moleculares del cáncer de mama triple negativo.**

### **- Tipo basal (BL1 y BL2).**

El subtipo BL1 representa el 18% de todos los CMTN y se encuentra caracterizado por una elevada expresión de genes relacionados con el ciclo celular y con las vías de reparación del daño del ADN (tabla 2). Las vías de proliferación en este subtipo están acompañadas de un importante aumento de las vías de respuesta al daño en el ADN como son ATR y BRCA. La naturaleza proliferativa de BL1 se apoyó adicionalmente por la observación de una alta expresión de ARNm de Ki67 y tinción nuclear de Ki67 mediante inmunohistoquímica (>70%) (93, 115).

El subtipo BL2 representa el 13% de todos los CMTN y se caracteriza por la exacerbada regulación de las vías de señalización de factores de crecimiento, (EGF, FCN, NGF, MET, Wnt/ $\beta$ -catenin, IGF1R), así como los genes involucrados en la glucólisis y gluconeogénesis. Así pues, este subtipo es el único enriquecido en receptores de factores de crecimiento (tabla 2) (115).

El subtipo BLIS, de la clasificación Burstein, presenta una regulación negativa de las células B, células T, células T citolíticas y de la vía de las citoquinas. Por tanto, presenta un peor pronóstico y una menor expresión de moléculas que controlan la presentación de antígeno, la diferenciación de la inmunidad celular y la comunicación de la inmunidad innata y adaptativa. Además, este clúster expresa múltiples factores de transcripción de la familia SOX (115, 116). El subtipo BLIA es más parecido al subtipo IM (tabla 3) (93, 105, 115, 116).

De todo esto se puede deducir que el subtipo BL1 de CMTN tiene una mayor sensibilidad a las estrategias dirigidas a las vías de reparación del ADN, tales como la QT basada en platino y los inhibidores de PARP. Por otro lado, el subtipo BL2 debería responder mejor a pequeñas moléculas de inhibidores de las vías del crecimiento (105). Los tumores BL1 tienen una tasa del 52% de respuesta patológica completa a la QT neoadyuvante con antraciclinas y taxanos, mientras que la respuesta de los tumores BL2 es prácticamente nula. Esto nos indica que BL1 y BL2 son dos subtipos molecularmente diferentes por lo que no es de extrañar que respondan de forma tan diferente al tratamiento (119, 120).

La mayoría de las líneas celulares con mutaciones conocidas en BRCA1 y BRCA2 tiene patrones de expresión génica que se correlacionan con el subtipo BL, lo que concuerda con la idea actual de que los tumores con mutaciones de BRCA presentan un fenotipo basal (121).

#### **- Subtipo Inmunomodulador (IM).**

Este subtipo tumoral muestra una expresión de genes involucrados en las vías de señalización inmune (tabla 2), aunque realmente no está claro si esto representa un verdadero perfil de expresión génica de las células tumorales o si es un reflejo de que el tumor tiene un importante infiltrado inmune (105, 113). El subtipo IM, a pesar de su alto grado histológico, se asocia con un pronóstico favorable (93).

En la clasificación desarrollada por Burstein, el subtipo BLIA muestra un incremento de la regulación inmune. El subtipo BLIA sobreexpresa la proteína 4 asociada a los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4,) que junto con otros genes relacionados con la inmunidad tiene mejor pronóstico

(105, 116). Además, presenta importante expresión de los genes STAT (116). Dada la importante similitud en perfiles de expresión genética de IM y BLIA, es posible que exista una superposición entre ambos subtipos. Por tanto, ambos subtipos serían sensibles a tratamientos de inmunoterapia (105). En un estudio fase Ib con pembrolizumab en pacientes con CMTN avanzado se observó una tasa de respuesta global del 18.5%. Este estudio seleccionó a las pacientes en función de la positividad del ligando 1 de muerte programada (PD-L1) y no en función de los datos de expresión de genes (122). Hasta el momento no existen datos si los subtipos IM o BLIA presentan mejor respuesta que el resto de subtipos moleculares.

**- Subtipos mesenquimal (M) y mesenquimal de tipo troncal (MSL).**

Ambos subtipos presentan estimulación de las vías implicadas en la transición epitelio-mesenquima (EMT) (105). El subtipo M presenta un importante enriquecimiento de los componentes y vías asociadas a la motilidad celular, interacción con receptores extracelulares y vías de diferenciación celular. El subtipo MSL presenta un incremento en la activación de vías similares al subtipo M, sin embargo, el MSL es el único que expresa genes asociados a células madre, a vías de algunos factores de crecimiento (EGFR, PDGF), quinasas de señalización (PIK3CA, ERK1/2), transportadores ABC y angiogénesis (tabla 2) (105). Además, MSL presenta una expresión limitada de claudina 4, 5 y 7, más parecido al tipo de expresión baja de claudina descrito previamente (123). Estos subtipos presentan alto grado de alteraciones en la vía de PI3K/AKT/mTOR, y expresan genes normalmente exclusivos de osteocitos (OGN) y adipocitos (ADIPOQ, PLIN1) (116, 124).

Como en el resto de subtipos de CMTN, no existen técnicas estandarizadas y fácilmente reproducibles para el diagnóstico, lo que dificulta aún más la selección de pacientes. El cáncer de mama metaplásico se puede diagnosticar de forma adecuada por el patólogo (125) y entre un 10-30% de los CMTN clasificados como mesenquimales por las plataformas génicas correspondían a tumores metaplásicos (123, 126). Los CMTN metaplásicos se consideran refractarios al tratamiento de QT y se ha visto que presentan expresión de genes de EMT y de células madre, además de importantes alteraciones en la vía de PIK3CA/AKT/mTOR y angiogenesis (127, 128). Dadas las características de los CMTN metaplásicos se podrían considerar un subgrupo de respuesta en los CMTN mesenquimales (105). Un estudio fase I con doxorubicina liposomian, bevacizumab e inhibidores de mTOR (tensirolimus o everolimus) en pacientes con tumores metaplásicos, mostró una tasa de respuestas completas de 21% y de respuestas completas duraderas del 8%. Es importante señalar que el 74% de las pacientes incluidas presentaban alteraciones en puntos activadores de la vía PIK3CA/AKT/mTOR y la respuesta fue mayor de forma significativa en las pacientes que presentaban estas alteraciones (129).

La activación de la vía de MET se encuentra asociada con la EMT y progresión tumoral, pero hasta la actualidad no ha demostrado buenos resultados en la práctica clínica (130). Sin embargo, la vía de NOTCH, que se encuentra implicada en la supervivencia de las células madre, podría presentar cierta sensibilidad a la inhibición de esta vía en el subtipo MSL. Un estudio fase I con un inhibidor de NOTCH en combinación con docetaxel en pacientes no seleccionados con CMTN

avanzado mostró entre un 16 y 44% de respuesta parcial y enfermedad estable, respectivamente (131).

**- Receptor de andrógenos luminal.**

Este subtipo tumoral constituye el 11% de los subtipos moleculares de CMTN y es el que presenta las mayores diferencias respecto al resto de subtipos. Se trata de un subtipo receptor de estrógenos negativo pero con un importante enriquecimiento en las vías reguladas hormonalmente, incluyendo la síntesis de esteroides, metabolismo de la porfirina y metabolismo androgénico/estrogénico (93). Este subtipo tiene activadas la señalización a través del receptor de andrógenos, de prolactina, HER4, y del receptor de estrógenos, a pesar de que la tinción inmunohistoquímica para el receptor de estrógenos  $\alpha$  es negativa. El perfil de expresión de genes muestra expresión de ESR1 (gen codificante para el receptor de estrógenos  $\alpha$ ), y otros genes reguladores de los estrógenos (GATA3, FOXA, XBP1, PGR). Este tipo de CMTN, aunque es receptor de estrógenos negativo, ha demostrado activación a nivel molecular de este receptor. Esto puede ser debido a que el 1% de las células de este tumor expresan niveles bajos de la proteína del receptor de estrógenos, definiéndolo como receptor de estrógenos negativo en el análisis inmunohistoquímico (93, 116). Otras posibilidades son que sobreexpresen el receptor de estrógenos  $\beta$  o coactivadores transcripcionales de los receptores de estrógenos como NCOA3. El ARNm del receptor de andrógenos se encuentra muy expresado en este subtipo con una clara diferencia respecto al resto de subtipos de CMTN. Como consecuencia, este subtipo expresa múltiples genes de la vía del receptor de estrógenos y de sus coactivadores. La expresión de este receptor a nivel inmunohistoquímico es diez veces

más alto respecto al resto de subtipos y se ha intentado utilizar en diversos ensayos clínicos (132-134). Todo ello parece indicar que el CMTN tipo LAR se encuentra dirigido por el receptor de andrógenos. Estos resultados explicarían por qué este tipo tumoral responde pobremente al tratamiento de quimioterapia (120). Todas estas observaciones sugieren que este subtipo podría responder al tratamiento antiestrogénico tradicional o al tratamiento antiandrógeno (116). En un estudio fase II con bicalutamida en pacientes con CMTN metastásicos, con receptor de andrógenos positivo, receptor de estrógenos y progesterona negativo el beneficio clínico a las 24 semanas (definido como porcentaje de pacientes con respuesta completa, respuesta parcial o estabilidad de enfermedad a las 24 semanas) fue de un 19% y la mediana de supervivencia libre de progresión (SLP) fue de 12 semanas (134). En otro estudio fase II con enzalutamida, el análisis interino en pacientes con características similares al previo mostraba a las 24 semanas un beneficio clínico de 29% y una SLP de 14 semanas (132). Es importante remarcar que los pacientes que demostraron un perfil génico LAR por plataforma génica presentaron mayor beneficio clínico de la enzalutamida, sugiriendo que el perfil de expresión génica debería utilizarse para identificar este subtipo tumoral, hecho que ayudaría a beneficiar más a estas pacientes (132).

## **6. Tratamiento sistémico del cáncer de mama triple negativo con enfermedad local o localmente avanzada.**

Desde el inicio de la enfermedad, el cáncer de mama se debe considerar como una enfermedad sistémica (135). Se ha observado la presencia de micrometástasis en las fases más iniciales del tumor, lo que justifica la utilización de tratamientos complementarios, como la quimioterapia y/o radioterapia, para disminuir el riesgo de recidiva y muerte, tratando de obtener una potencial curación de la enfermedad (136). Para ello se pueden utilizar dos estrategias de tratamiento: la QT adyuvante y QT neoadyuvante.

### **6.1. Quimioterapia adyuvante en el cáncer de mama triple negativo.**

Este tipo de tratamiento se administra a las pacientes después de reseca completamente el tumor con la cirugía y previo al tratamiento de radioterapia. En 1995 se publicó el estudio de QT adyuvante con el esquema de quimioterapia ciclofosfamida, metotrexate y 5-fluorouracilo (CMF). Este tratamiento demostró ventajas en supervivencia global (SG) en las mujeres tratadas con QT frente a las que no recibieron tratamiento (RR=0,76, IC 95%: 0,60-0,97; p=0,03) (137). Posteriormente, el estudio NSABP-B15 demostró la equivalencia entre cuatro ciclos de antraciclinas y ciclofosfamida (AC) y seis ciclos de CMF en pacientes con afectación axilar (138). Posteriormente, tras el auge de las antraciclinas aparecieron los taxanos. El estudio CALGB 9344 comparaba en pacientes con afectación axilar cuatro ciclos de AC frente cuatro ciclos de AC seguido de un total de cuatro ciclos de paclitaxel. Este estudio mostró un aumento en SLP del 77 al 80% con la adición del paclitaxel, sin embargo no tuvo repercusión en SG (139). Posteriormente, los estudios del Grupo Español de Investigación en

Cáncer de Mama (GEICAM) 9906 y 9805 confirmaron el beneficio de los taxanos en SLP en pacientes con y sin afectación axilar respectivamente, pero sin afectación en SG (140, 141). Por todo ello, se considera el tratamiento estándar de QT adyuvante la administración concomitante o secuencial de antraciclinas y taxanos.

## **6.2. Quimioterapia neoadyuvante en el cáncer de mama triple negativo.**

La QT neoadyuvante es el tratamiento sistémico que se suele administrar a las pacientes previo al tratamiento quirúrgico del cáncer de mama. Los objetivos de este tratamiento consisten en tratar de convertir tumores irreseables en resecables, incrementar la tasa de cirugías conservadoras, la búsqueda de factores predictivos y pronósticos, aumentar la tasa de respuestas completas patológicas (RCp), obtener información *in vivo* de la respuesta a los tratamientos e incrementar la SLP y SG (142).

Históricamente, el uso de la QT neoadyuvante se reservaba para tumores localmente avanzados donde las técnicas locales como la cirugía no eran capaces de controlar de forma local la enfermedad. Sin embargo, el tratamiento del cáncer de mama ha ido evolucionando y se ha ido modificando las indicaciones de esta modalidad. En la actualidad se utiliza para estadios clínicos III o estadios IIA y IIB seleccionados (con tumores grandes) con el objetivo de incrementar la posibilidad de cirugía conservadora en la mama (143-145). Y más recientemente se ha comenzado a indicar en CMTN y HER2 con un tamaño mayor o igual a 2 cm o con afectación axilar tratando de alcanzar una RCp (143).



Aunque no se ha podido demostrar la superioridad de la QT neoadyuvante frente a la QT adyuvante en términos de supervivencia, la utilización de esta estrategia tiene importantes beneficios. Ha permitido incrementar la tasa de cirugía conservadora, con un mejor resultado estético para las pacientes; permite testar *in vivo* la respuesta a los agentes de QT. Por ello, la QT neoadyuvante se ha convertido en el escenario perfecto para la búsqueda de factores pronósticos y predictivos de respuesta a los tratamientos como es el caso de nuestro estudio. Además, nos proporciona un significado pronóstico con la respuesta a la QT neoadyuvante.

Los primeros estudios realizados fueron muy heterogéneos (pacientes con diferentes tipos de cáncer de mama, estadios, esquemas de tratamiento, etc.) y no aleatorizados. Por tanto, es complicado realizar comparaciones entre ellos y establecer conclusiones. Lo que sí se observó en ellos es que las pacientes que se sometían a este tratamiento presentaban una mayor tasa de cirugía conservadora sin disminución de la supervivencia. Y se evidenció que las pacientes que alcanzaban una RCp presentaban una mayor supervivencia y por tanto, un mejor pronóstico a largo plazo (146, 147). Esto impulsó el desarrollo de nuevos estudios con diseños más adecuados. Uno de ellos fue el estudio NSABP B-18, estudio aleatorizado que incluyó 1523 pacientes a recibir QT neoadyuvante o adyuvante. El objetivo primario del estudio fue SLP, por lo que se considera un estudio negativo dado que no alcanzó su objetivo primario. Sin embargo, se observó que la QT neoadyuvante facilitaba mayor número de cirugías conservadoras y que las pacientes menores de 50 años se beneficiaban más que las pacientes mayores de

50 años de este tratamiento (144). Similares resultados obtuvo el estudio EORTC10902, sin beneficio en SLP (148).

Finalmente, tras el análisis de varios estudios se decidió modificar el objetivo principal de estos ensayos clínicos pasando a considerar la RCp su objetivo primario, considerando la RCp un marcador subrogado de supervivencia y eficacia, como se explicará más adelante (149). Sin embargo, el problema surgió posteriormente con las distintas definiciones de RCp que, también, dificultan la comparación entre los estudios.

En el CMTN la QT es el tratamiento más importante, dado que no se conocen dianas terapéuticas efectivas y probadas en la actualidad. Sin embargo, la RCp a la QT neoadyuvante de este subtipo tumoral se encuentra muy lejos de ser adecuada. Los estudios muestran que con el tratamiento estándar (AC seguido de taxanos) las pacientes presentan una tasa de RCp entorno al 28-36%, lo que nos indica que alrededor de un 66-72% de las pacientes no alcanzará el principal objetivo de nuestro tratamiento (150, 151). Para ello se han intentado desarrollar otras estrategias de tratamiento. En la tabla 4 se resumen los principales estudios de neoadyuvancia en CMTN (152).

**Tabla 4. Estudios de QT neoadyuvante en CMTN con la correlación de su tasa de RCp.** Adaptada de Omarini *et al.* (152).

Estudio	Tipo de estudio	N	Tratamiento	RCp	% RCp
<b>Antraciclina / taxanos</b>					
Liedtke <i>et al.</i> (153)	Prospectivo	255	Taxanos + Antraciclinas + ciclof.+ 5-FU	ypT0/is ypN0	28
Von Minckwitz <i>et al.</i> (151)	Análisis combinado	742	Antraciclinas + Taxanos	ypT0/is ypN0	34
Von Minckwitz <i>et al.</i> (150)	Análisis combinado	911	Antraciclinas + Taxanos	ypT0/is ypN0	35.8
<b>CBDA</b>					
Sikov <i>et al.</i> (154)	Fase II	12	Paclitaxel+ carboplatino	ypT0/is ypN0	67
Chen <i>et al.</i> (155)	Fase II	17	Paclitaxel+ carboplatino	ypT0/is ypN0	33.3
Roy <i>et al.</i> (156)	Fase II	9	Docetaxel+ carboplatino	ypT0 ypN0	44
Chang <i>et al.</i> (157)	Fase II	11	Docetaxel+ carboplatino	ypT0/is ypN0	55
Campos Gómez <i>et al.</i> (158)	Fase II	35	Doxorrubicina +ciclof. → Docetaxel+ carboplatino	ypT0/is ypN0	50
Von Minckwitz <i>et al.</i> Estudio GeparSixto (159)	Fase III	158	Paclitaxel+ doxorubicina liposomal + bevacizumab + carboplatino	ypT0 ypN0	53.2
<b>Nab-paclitaxel</b>					
Untch <i>et al.</i> (160)	Fase III	139	Nab-paclitaxel → epirubicina + ciclof.	ypT0 ypN0	48
Gianni <i>et al.</i> (161)	Fase III	219	Nab-paclitaxel + antraciclina	ypT0/is ypN0	41.3

Gluz <i>et al.</i> (162)	Fase II	61	Nab- paclitaxel + carboplatino	ypT0/is ypN0	49.2
Kuwayama <i>et al.</i> (163)	Fase II	54	Nab- paclitaxel + antraciclina + ciclof.+ 5-FU	ypT0/is ypN0	30
<b>Eribulina</b>					
Kaklamani <i>et al.</i> (164)	Fase II	30	Carboplatino+ eribulina	ypT0/is ypN0	43

RCp: respuesta completa patológica, Nab-paclitaxel: Nanopartículas de albúmina unidas a paclitaxel, Ciclof.: ciclofosfamida, CBDA: carboplatino, CMTN: cáncer de mama triple negativo.

Según las guías internacionales, el momento del tratamiento en el CMTN (adyuvante frente a neoadyuvante) no tiene efecto sobre el resultado a largo plazo en cuanto a supervivencia. Las estrategias utilizadas en la adyuvancia pueden utilizarse en la neoadyuvancia (152, 165). No obstante, la QT neoadyuvante es la primera opción en los casos de CMTN operable, sobre todo en los casos localmente avanzados.

## **7. Valoración de la respuesta patológica a la quimioterapia neoadyuvante.**

La valoración de la respuesta a la QT neoadyuvante ha sido muy heterogénea entre los estudios, lo que ha dificultado la comparación entre ellos. El principal problema ha sido la definición de RCp. Sin embargo, el conseguir una adecuada definición de RCp es realmente importante, dado que se ha identificado como un marcador subrogado de supervivencia y se está utilizando en la mayoría de ensayos clínicos con QT neoadyuvante (150, 153, 166-168).

Existen múltiples clasificaciones que se han desarrollado en los últimos años. Algunas de ellas (Chevalier, Sataloff y Miller & Payne) (169, 170) se caracterizan por la descripción de varios grados de respuesta en función de la respuesta al tratamiento y de la presencia de tumor infiltrante viable tanto en la mama como en la axila. Además, la definición de RCp definitiva consiste en la ausencia de enfermedad infiltrante en mama y axila, ésta última definición es la que se considera habitualmente en la práctica clínica habitual (166). La presencia o ausencia de carcinoma intraductal no modifica el pronóstico de las pacientes (168).

No existe un consenso claro sobre la definición de RCp, no existiendo un acuerdo sobre si la necesidad de valorar la respuesta ganglionar o si es necesario incluir la presencia de carcinoma no infiltrante. Por ello, existen distintas clasificaciones lo que suma mucha confusión al problema como son:

- **Feldman (1986):** Ausencia macroscópica del tumor a la inspección macroscópica de la mastectomía y axila sin tener en cuenta los hallazgos posteriores al microscopio (166).

- **Schnitt (1992):** No existe evidencia de carcinoma invasivo ni en la mama ni en la axila (171).

- **Chevallier (1993):** Se comienza a graduar la respuesta (172):

- Grado 1: desaparición macroscópica y microscópica del tumor.

- Grado 2: presencia de carcinoma *in situ* en la mama. No evidencia de carcinoma invasivo ni en la mama ni en la axila.
  - Grado 3: presencia de carcinoma invasivo con alteración estromal (fibrosis o esclerosis).
  - Grado 4: presencia de carcinoma invasivo intacto.
- **Sataloff (1995):** Mantiene los grados pero diferencia entre la respuesta en la mama y en la axila (173).

*Localización en la mama:*

A: desaparición casi total del tumor.

B: >50%.

C: <50%.

D: ausencia de efecto del tratamiento.

*Localización de la axila:*

A: evidencia de efecto terapéutico y ausencia de metástasis.

B: ausencia metástasis en los ganglios.

C: evidencia de efecto del tratamiento, pero con ganglios metastásicos.

D: enfermedad metastásica.

- **Ogston (2003): Modificación de de Miller and Payne (170):**

- Grado 1: ausencia de cambios en células tumorales individuales.

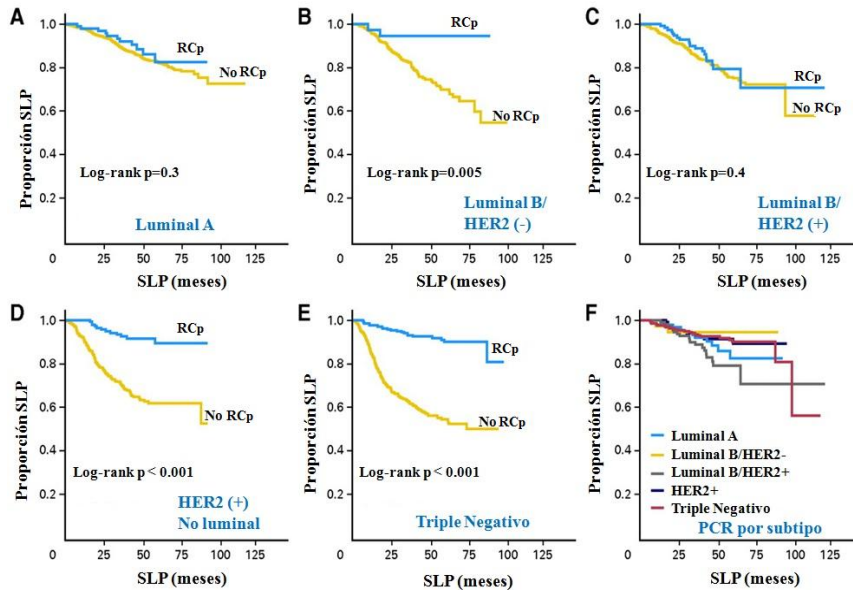
- Grado 2: pequeña disminución en células tumorales (hasta 30% de reducción).

- Grado 3: reducción de células tumorales entre el 30-90%.

- Grado 4: marcado efecto del tratamiento con reducción de células tumorales (reducción en un 90% de células malignas).

- Grado 5: ausencia de células malignas en el tumor primario. Solamente presencia de fibrosis. Puede existir carcinoma *in situ*.

Han sido muchos los estudios que han confirmado el valor pronóstico de la RCp. El grupo alemán realizó un meta-análisis de 7 estudios de QT neoadyuvante confirmando el valor pronóstico de la RCp en neoplasias de alto riesgo: carcinomas de alto grado, receptores hormonales negativos, subtipo triple negativo y HER2; pero no en tumores luminales A y HER2 con receptores hormonales positivos (figura 5). Para la realización del estudio valoraron la respuesta tanto en la mama como en la axila (150, 151). En 2014 se publicó un nuevo meta-análisis de 12 ensayos clínicos aleatorizados que incluyó un total de 11955 pacientes. El estudio confirmó los resultados del estudio previo y volvía a poner en relevancia el valor pronóstico de la RCP como subgrupo de SLP (ypT0 ypN0: HR: 0,44, IC 95%: 0,39-0,51; ypT0/is ypN0: HR: 0,48, IC 95%: 0,43-0,54) y SG (ypT0 ypN0: HR: 0,36, IC 95% 0,30-0,44; ypT0/is ypN0: HR: 0,36, IC 95%: 0,31-0,42, principalmente si se tenía en cuenta la respuesta en mama y axila respecto a si se tomaba únicamente en consideración la mama (168). Por tanto, el estudio indicaba que la definición más adecuada de RCp era la ausencia de tumor infiltrante en la mama y en axila. Además, en este meta-análisis, al igual que en el alemán, identificaron que determinados subtipos histológicos como el CMTN se correlacionaban mejor entre RCp y supervivencia (SLP: HR: 0,24, IC 95%: 0,18-0,33; SG: HR: 0,16, IC 95%: 0,11-0,25) y también en tumores HER2 positivos, receptores hormonales negativos (SLP: HR: 0,15, IC 95% IC 95%: 0,09-0,27; SG: HR: 0,08, IC 95%: 0,03-0,22) (168).



**Figura 5. Respuesta completa patológica y relación con la supervivencia libre de progresión en función del subtipo histológico de cáncer de mama.** Imagen tomada de von Minckwitz *et al.* (151). SLP: supervivencia libre de progresión, RCp: respuesta completa patológica.

### 7.1. Respuesta patológica a la quimioterapia neoadyuvante en función de los subtipos moleculares en el cáncer de mama triple negativo.

A pesar de los diferentes avances en el tratamiento del cáncer de mama y de las diferentes opciones que se han investigado, todavía no existen tratamientos dirigidos adecuados para el CMTN en neoadyuvancia (tabla 5). El tratamiento estándar continúa siendo antraciclinas y ciclofosfamida con taxanos (165).

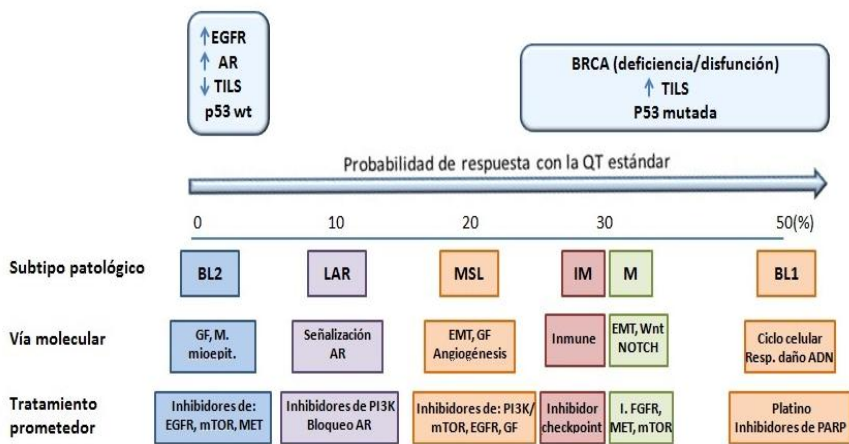


**Tabla 5. Estudios de QT neoadyuvante más agente dirigido en CMTN y la correlación con la tasa de RCp.** Adaptada de Omarini *et al.* (152).

Estudio	Tipo de estudio	Tratamiento	Definición de RCp	% RCp
<b>Bevacizumab</b>				
Mrózek <i>et al.</i> (174)	Fase II	Nab-paclitaxel+cbda+beva	ypT0 ypN0	50
Guarneri <i>et al.</i> (175)	Fase II	Paclitaxel+cbda + beva	ypT0/is ypN0	50
Nahleh <i>et al.</i> (176)	Fase II	Nab-paclitaxel+ beva→ adriamicina + ciclof.	ypT0/is ypN0	59
Sikov <i>et al.</i> (177)	Fase II	Paclitaxel→ doxorubicina + ciclof. + beva	ypT0/is (valora la mama)	59
Earl <i>et al.</i> (178)	Fase III	Beva+docetaxel → epirubicina+ciclof.	ypT0/is ypN0	45
Kim <i>et al.</i> (179)	Fase II	Cbda+docetaxel + beva	ypT0/is ypN0	42
Gerber <i>et al.</i> (180)	Fase III	Epirubicina+Ciclof. →docetaxel + beva.	ypT0 ypN0	39
<b>Inhibidores de PARP</b>				
Telli <i>et al.</i> (181)	Fase II	Gemcitabina+cbda + niperib	ypT0/is ypN0	36
Rugo <i>et al.</i> (182)	Fase II	Velparib+cbda → doxorubicina + ciclof.	ypT0 ypN0	51
<b>Inmunoterapia</b>				
Schmid <i>et al.</i> (183)	Fase IB	Pembrolizumab+ nab-paclitaxel → pembrolizumab + doxorubicina+ Ciclof.±cbda	ypT0/is ypN0	85
Nanda <i>et al.</i> (184)	Fase II	Paclitaxel+ pembrolizumab→ doxorubicin+ciclof	ypT0/is ypN0	71

RCp: respuesta completa patológica, Nab-paclitaxel: nanopartículas de albúminas unidas a paclitaxel, cbda: carboplatino, ciclof: ciclofosfamida, beva: bevacizumab, CMTN: cáncer de mama triple negativo.

Por ello, es importante entender las características y el comportamiento clínico del CMTN para tratar de desarrollar tratamientos más efectivos. La identificación de dianas moleculares es esencial para el desarrollo de nuevas estrategias. Con este objetivo, debemos fijarnos en los subtipos moleculares descritos en función de su expresión génica. Cada una de estas subclases muestra una distinta RCp a la QT neoadyuvante estándar (figura 6) (119, 152).



**Figura 6. Probabilidad de respuesta con la QT estándar según los subtipos moleculares. Vías metabólicas afectadas y tratamientos propuestos.** Adaptada de Omarini *et al.* (152). GF: Factores de crecimiento, M. mioepitel: marcadores mioepiteliales, AR: receptor de andrógenos, EMT: Transición epitelio-mesenquima, I: inhibidor. Resp: respuesta.

Varios estudios han analizado la respuesta de los subtipos moleculares a la QT neoadyuvante. En 2013 se realizó un análisis retrospectivo de 130 pacientes con CMTN clasificadas según los subtipos de Lehmann. El estudio mostraba por primera vez que los subtipos moleculares de CMTN podrían servir como predictor independiente de la RCp tras la QT neoadyuvante estándar ( $p=0,022$ ). La RCp global fue del 28% y se observaron diferencias claramente significativas. El subtipo BL1 alcanzó la tasa más alta de RCp (52%), mientras que BL2, LAR y MSL presentaron las más bajas (0,10 y 23%, respectivamente) (120). Un estudio más reciente que valoró la respuesta en función de los subtipos moleculares, clasificó el CMTN mediante PAM50 y los cuatro últimos subtipos moleculares descritos (BL1, BL2, LAR, M): La clasificación mediante PAM50 en tumores basales y no basales no presentó diferencias en RCp. La subclasificación en 4 tipos moleculares tampoco dio diferencias significativas en RCp. La incidencia de RCp para los subtipos moleculares mostró tendencias similares a los estudios previos con BL1 presentando la mayor respuesta y, BL2 y LAR una RCp más baja. Al comparar BL1 con el resto de subtipos, sí se encontró diferencia estadísticamente significativa en RCp (49 frente a 31%;  $p = 0,0441$ ) (118).

Este estudio valoró a su vez la SLP en la misma cohorte para determinar si las diferencias de respuestas a la QT neoadyuvante según cada subtipo tenían impacto en la supervivencia. A pesar de tener mejor RCp (34% frente 11%), los pacientes con CMTN presentaron significativamente peor SLP que los no CMTN. Sin embargo, las pacientes con CMTN que respondieron a la QT y alcanzaron RCp, tenían mejor SLP respecto a las que no lo alcanzaron, con un 95% de

supervivencia a los 7 años frente a una mediana de supervivencia de 2,7 años. Mientras que no existieron diferencias en SLP entre BL y no BL ( $p=0,41$ ; clasificados por PAM50), la clasificación molecular tuvo casi significancia ( $p=0.09$ ). Los pacientes BL2 presentaron peor pronóstico, con una mediana de supervivencia de 2,4 años frente a la de todos los CMTN que fue mayor a 7 años. Por el contrario, BL1 tiene la RCp más alta de todos los subtipos (49%) y se asoció con la mejor SLP (72% de las pacientes libres de enfermedad a los 7 años de seguimiento) (118). El subtipo LAR podría considerarse una excepción al resto, pese a que presentó pobre RCp, presentó una SG mejor, probablemente por su biología más parecida al subtipo luminal que al CMTN (120).

A pesar de todos los avances realizados hasta el momento en este subtipo tumoral, la quimioterapia con antraciclinas y taxanos sigue siendo el tratamiento estándar de todos los subtipos de CMTN.

## **8. Biomarcadores.**

En la actualidad no existen claros biomarcadores útiles en la práctica clínica habitual que sean predictivos de respuesta al tratamiento antes de empezar la quimioterapia neoadyuvante. Por todo ello, la búsqueda de biomarcadores en este ámbito es un campo de investigación en auge.

En la práctica clínica habitual se utilizan algunos biomarcadores clásicos como: el Ki67, los receptores de estrógenos, progesterona y HER2. Estos biomarcadores clásicos nos ayudan a diferenciar los subtipos tumorales de cáncer de mama (luminal A, B, HER2 y triple negativo) y orientan a los oncólogos en el momento de seleccionar los tratamientos. Sin embargo, estos marcadores no son suficientes para

clasificar adecuadamente los distintos subtipos que subyacen dentro del CMTN.

El análisis de la expresión de genes en el cáncer de mama, incluyendo los niveles de metilación del ADN y biomarcadores circulantes de ADN, han sido ampliamente incorporados en múltiples estudios (185, 186). Menos conocidos son los factores epigenéticos como los micro-ARNs (miARNs), el sistema inmunitario, células tumorales circulantes, ácidos nucleicos circulantes y metabolitos, entre otros integrantes del microambiente tumoral y el papel que pueden presentar en el pronóstico, selección y tratamiento de las pacientes con cáncer de mama (187-189). Una mayor comprensión de los factores pronósticos y predictivos sería útil para planificar y desarrollar estudios más dirigidos (190, 191).

### **8.1. Micro-ARNs en exosomas.**

Actualmente se cree que el 98% del genoma humano se transcribe en moléculas de ARN que pierden su capacidad codificante y se denominan ARN no codificante (192). Los miARNs son pequeñas moléculas de ARN monocatenario no codificantes con una longitud entre 21 y 25 nucleótidos. Estos se transcriben a partir de secuencias de ADN cromosómico. Sin embargo, no son traducidas a proteínas. Tienen la capacidad de regular la expresión transcripcional de otros genes mediante la interferencia de uno o más ARN mensajeros (ARNm) (193). Se ha observado que cada miARN puede afectar a más de 100 transcripciones diferentes y regular su expresión. Más del 60% de los genes codificadores de proteínas humanas están regulados por miARNs (194, 195). Por ello, su presencia, es muy importante como reguladores

clave en muchos procesos biológicos como la diferenciación celular y desarrollo, proliferación, adquisición, diferenciación y mantenimiento de un fenotipo, así como la apoptosis y el metabolismo (196). Con todo ello, se ha observado que los miARN intervienen en múltiples enfermedades, entre ellas el cáncer (197).

Los miARNs intervienen en la tumorigénesis y progresión tumoral puesto que controlan post-transcripcionalmente la expresión génica (epigenética) y regulan la proliferación celular, la diferenciación, invasión, migración, angiogénesis y apoptosis (198). La alteración de determinados miARNs se ha asociado con la carcinogénesis, unos actúan en forma de oncogenes y otros como supresores tumorales (199). La primera evidencia de que un miARN podía estar implicado en cáncer fue descrito en la leucemia linfocítica crónica (200) y a partir de ahí se han descrito en múltiples tumores (201). Los miARN más frecuentemente alterados en cáncer se encuentran descritos en la tabla 6.

**Tabla 6. Los miARN más frecuentemente alterados en cáncer.**Adaptada de Acunzo *et al.* (201)

miARN	Función	Tumor
<b>mir-21</b> (202-204)	Oncogén	Cáncer de mama, glioblastoma, cáncer de páncreas, CCR, hepatocarcinoma.
<b>mir-155</b> (205, 206)	Oncogén	Linfoma difuso de células grandes B, cáncer de páncreas, LLC.
<b>mir-17-92</b> (agrupación) (207-209)	Oncogén	Linfomas, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de colon, leucemia aguda megacarioblástica y promielocítica.
<b>mir-146a</b> (210, 211)	Supresor tumoral	Tumores hematológicos
<b>mir-34a</b> (212-215)	Supresor tumoral	Cáncer de mama, tumores hepáticos, cáncer de colon, cáncer de páncreas.

miR: micro-ARN, CCR: cáncer colorectal, LLC: leucemia linfocítica crónica.

La expresión aberrante de miARNs en el cáncer es un hecho conocido; sin embargo, se desconocen en gran medida los mecanismos moleculares que llevan a su expresión anómala (197, 216). En los últimos años, se ha observado que existen diferentes perfiles de miARN con diferencias significativas entre las células tumorales y las células normales, sugiriendo que tienen un importante potencial como

biomarcadores (201, 217). Además, dado que se encuentran de forma estable en muchos fluidos corporales, pueden ser una herramienta de detección no invasiva (218).

En comparación con los miARNs celulares que se degradan rápidamente en el entorno extracelular, los miARN extracelulares tienen una marcada estabilidad (202). Uno de los últimos mecanismos descritos para esta estabilidad es la encapsulación en vesículas como cuerpos apoptóticos, microvesículas y exosomas (219-221).

Los exosomas son un grupo de vesículas pequeñas extracelulares con una doble capa lipídica de origen endosómico. Estas vesículas contienen diferentes componentes intracelulares, como proteínas, ADN, lípidos, mRNA y ARN no codificante (218). Se encuentran en la sangre o en el microambiente extracelular entre las células tumorales y las no tumorales, dado que se liberan casi por todos los tipos de células en los distintos fluidos biológicos, protegiendo el contenido intravesicular de su degradación (197). Los exosomas juegan un importante papel, no sólo en la comunicación celular a través del intercambio entre las células donantes y receptoras (222), sino también en muchos procesos celulares como la coagulación, la presentación de antígenos, el metabolismo y la facilitación de la respuesta inmune (223).

Desde el descubrimiento de que los miARN en exosomas podrían asociarse a procesos funcionales, se ha ido incrementando la evidencia de su importancia en procesos fisiológicos, así como en procesos patológicos como el cáncer. Las células tumorales, al igual que las células normales, secretan exosomas que contienen las mismas



alteraciones en ARN, ADN y proteínas que en las células de origen (224-226). Los miARN en exosomas derivados de tumor pueden inducir varios procesos de transformación maligna, como la angiogénesis, un elemento esencial del tumor (227). Se cree que también tienen papel en la proliferación celular (228) y en la migración, invasión y metástasis. Por ejemplo, el miR-105 en exosomas derivados de la línea celular precancerosa MCF-10A y en la de cáncer de mama MDA-MB-23, estimula la metástasis al pulmón y al cerebro (229). Además, se ha observado en cáncer de mama que el miR-122 promueve en el nicho premetastásico las metástasis mediante la reprogramación del metabolismo de la glucosa. Por tanto, la inhibición de este miARN disminuye la incidencia de metástasis al restaurar el metabolismo de la glucosa en órganos como el cerebro y los pulmones (230).

La expresión anormal de miARNs en tejido de CMTN está relacionado con quimioresistencia y puede ser una forma en la que este subtipo tumoral evada la QT y, como resultado, se produzca una recaída temprana y una peor evolución (231-233). Alterar la expresión de determinados miARNs puede ser una potencial estrategia terapéutica para mejorar las respuestas al tratamiento y consecuentemente el pronóstico (197).

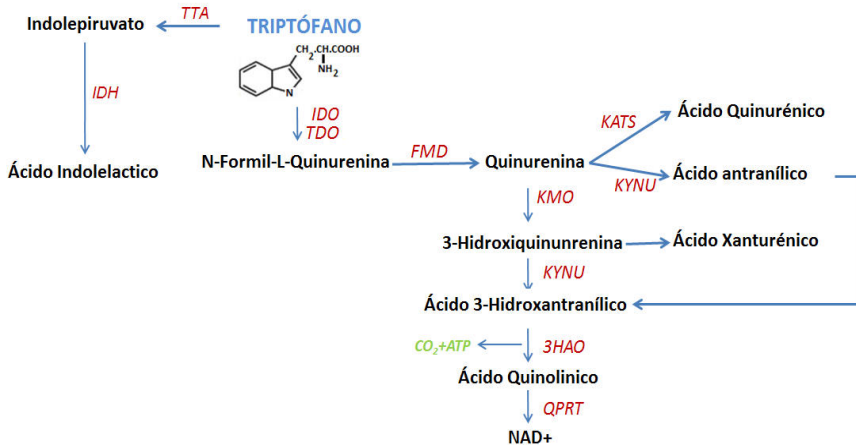
Debido a la presencia de exosomas en varios fluidos corporales y la estabilidad de los miARN en exosomas, se están comenzando a dilucidar una nueva clase de biomarcadores para un diagnóstico temprano y mínimamente invasivo (227).

## **8.2. Metabolómica.**

La metabolómica, definida como un estudio sistemático del metabolismo, es una nueva línea de investigación emergente en los últimos años (15). La metabolómica ha demostrado ser una herramienta importante para la identificación de nuevos biomarcadores para el tratamiento específico, la evaluación del tratamiento y la predicción de la supervivencia del cáncer (234-236). Múltiples estudios en cáncer de mama han identificado metabolitos en suero como potenciales biomarcadores que pueden predecir la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante. Las concentraciones de cuatro metabolitos, tres por resonancia magnética (treonina, isoleucina y glutamina) y uno en biopsia líquida (ácido linoleico) fueron significativamente distintos al comparar la respuesta a la quimioterapia (237). Además, se ha visto que la disminución de los niveles de arginina puede correlacionarse con el incremento del número de células Tregs con actividad arginasa intrínseca, lo cual indica un peor pronóstico. Y junto con la L-arginina, las enzimas catabolizadoras de triptófano (IDO) y enzimas que regulan los niveles extracelulares de adenosina (como la ecto-nucleotidasa CD39 y CD73) pueden contribuir significativamente a la inhibición de la respuesta inmune contra la célula tumoral (238, 239).

La actividad y expresión aberrante de la enzima triptófano-2-3-dioxigenasa (TDO) catabolizadora del triptófano hepático en las líneas celulares de CMTN favorece el crecimiento independiente de ligando y en un estadio tardío, la metástasis a través de un mecanismo autocrino (240). Además, parece claro que la quinurenina (subproducto del catabolismo del triptófano) presenta un efecto paracrino supresor en las células inmunes (241). Muchos estudios se han focalizado en la enzima

IDO, que se encarga del catabolismo del triptófano en quinurenina (figura 7).



**Figura 7. Vía metabólica del triptófano.** IDO: Indolamina 2, 3-dioxigenasa, TDO: triptófano 2, 3-dioxigenasa, FMD: quinurenina formamidasa, KMO: quinurenina hidroxilasa, KYNU: quinureninasa, 3HAO: 3-hidroxiantranilato-3, 4-dioxigenasa, QPRT: ácido quinolínico fosforibosil transferasa, KATS: quinurenina aminotransferasa, TTA: triptófano aminotransferasa, IDH: isocitrato deshidrogenasa.

Se ha observado que IDO se correlaciona con mal pronóstico y un incremento de la densidad de microvesículas en el cáncer de mama (242, 243). Además, se ha observado que esta enzima tiene un papel en la inmunoterapia del cáncer y en la regulación de la angiogénesis tumoral (242).

La enzima IDO permite que los tumores evadan el sistema inmune (242). Una variedad de tumores, incluido el cáncer de mama,

sobreexpresan IDO, tanto en células neoplásicas como en células asociadas a tumores (por ejemplo, células dendríticas, células estromales y células endoteliales). IDO puede suprimir las células T efectoras al reducir el triptófano disponible en el entorno y generar catabolitos derivados del triptófano. IDO también puede afectar la tolerancia sistémica activando las células Tregs circulantes. La mayoría de los estudios han demostrado que la elevada expresión de IDO en el endotelio o en los tejidos tumorales se correlaciona con un pronóstico significativamente peor en los pacientes (244, 245). Por lo tanto, el bloqueo o la ablación de la vía inmune inhibidora de IDO puede ser una importante estrategia de inmunoterapia contra el cáncer, y varios inhibidores de IDO se encuentran actualmente en ensayos clínicos.

Estudios con cultivos celulares revelaron que la quinurenina aumentó la muerte de células primarias T CD8 humanas y los medios condicionados de células de CMTN independientes de ligando suprimieron la función de células primarias T CD8 humanas de una manera IDO-dependiente, sugiriendo un mecanismo de evasión inmune, favorecido durante la metástasis (243). Se ha valorado en múltiples tumores cambios en los niveles sanguíneos de triptófano y quinurenina, observando que un nivel más bajo de triptófano en suero indica peor pronóstico, mostrando su potencial como biomarcador (246-248).

### **8.3. Proteómica.**

Menos conocida es la expresión de proteínas libres que pudieran liberarse como consecuencia de la interacción entre células tumorales entre sí con su microambiente, regulando otros tejidos a distancia, actuando como soporte en la señalización intercelular y como reacción al proceso tumoral (249). Las interacciones epitelio-estroma desempeñan un papel relevante en el desarrollo y mantenimiento de la glándula mamaria. Sin embargo, durante la tumorigénesis, el estroma aumenta el crecimiento y la progresión a carcinoma (250). El tipo de célula predominante en el estroma es el fibroblasto, que sintetiza, organiza y mantiene una red de glicoproteínas y proteoglicanos conocidos como la matriz extracelular (MEC) (251, 252). Los fibroblastos asociados al carcinoma muestran un fenotipo activado, con un mayor potencial proliferativo y migratorio. Sin embargo, el papel que desempeñan estas modificaciones del estroma para el desarrollo tumoral y los mecanismos que subyacen no son del todo conocidos. En relación con la MEC se ha estudiado el papel de las proteínas transmembrana sindecan que interactúan con una amplia variedad de proteínas. Estas proteínas tienen un papel en el crecimiento celular, la adhesión, la migración y la morfogénesis. Sindecan-1 (SDC1) se encuentra aberrantemente expresado por los fibroblastos y participa en el crecimiento del carcinoma de mama (253). Aunque su papel no es claramente conocido, interactúa con los componentes de MEC (251).

Recientemente se han evaluado 6 quinasas con valor pronóstico independiente. Las quinasas dividen a las pacientes con CMTN en dos patrones: uno sin quinasas hiperactivas que se asocia con una tasa > 90% libre de recaída, y el otro que muestra  $\geq 1$  quinasa hiperactiva y se asocia

con un riesgo de recaída hasta 9,5 veces mayor. Los regímenes farmacológicos diseñados basados en estas 6 quinasas muestran actividad antitumoral prometedora en líneas celulares de CMTN y en xenoinjertos derivados de pacientes (254).

La proteína S100A14 también se ha evaluado como un biomarcador en CMTN, correlacionándose la expresión de S100A14 con las variables clínicas. Los resultados revelan un impacto en la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global: niveles altos de expresión de S100A14 se correlacionaron con un peor pronóstico, principalmente los del subgrupo de tipo basal. El análisis multivariante reveló que S100A14 es un factor pronóstico independiente y una nueva potencial diana terapéutica en pacientes CMTN (255).

Por tanto, la expresión anormal de determinadas proteínas se está comenzando a relacionar con quimioresistencia, pudiendo ser una forma de evadir la quimioterapia, lo que resulta en recaída temprana y en peor evolución (231). Por otra parte, alterar su expresión o su actividad biológica puede ser una potencial estrategia terapéutica para mejorar la respuesta y el pronóstico (254, 255).

#### **8.4. Microambiente tumoral y sistema inmune.**

Los tumores malignos evitan su destrucción por el sistema inmune, favoreciendo fenómenos inflamatorios ligados a la progresión tumoral (15). Se han descrito tres características inmunológicas mediante las que el cáncer evade la acción del sistema inmune (27):

- Capacidad de evitar el reconocimiento inmunológico.

- Capacidad de prosperar en un ambiente de inflamación crónica.
- Capacidad de suprimir la reacción inmunológica.

Aunque la base del tratamiento en CMTN continúa siendo la quimioterapia, los importantes avances en la inmunoterapia del cáncer de los últimos años apuntan a prometedores fármacos que actúan sobre puntos de control inmunológico (256). Sin embargo, existen distintos mecanismos que pueden disminuir la eficacia de estos tratamientos; algunos de ellos pueden sugerir nuevas dianas terapéuticas.

Una de las bases de la inmunología tumoral y de la vigilancia inmunológica del cáncer es que las células cancerosas expresan antígenos que las diferencian de sus homólogos no transformados. Los estudios moleculares muestran claramente que estos antígenos son a menudo productos de genes mutados, genes normales expresados aberrantemente, o genes que codifican proteínas virales. Existe una correlación estricta entre la inestabilidad genética y la evasión del sistema inmune en el cáncer de mama (257). La heterogeneidad de mutaciones en el cáncer de mama se asocia con nuevos genes y antígenos. Se cree que la frecuencia de mutaciones somáticas o carga mutacional está relacionada con la inmunogenicidad del cáncer de mama. De hecho, se ha visto que los subtipos moleculares como el triple negativo, HER2 positivo o el luminal B contienen una alta carga mutacional y son bastante inmunogénicos (257).

Actualmente, se están investigando múltiples tratamientos de inmunoterapia en cáncer de mama que van desde vacunas, anticuerpos monoclonales para eliminar células tumorales o aproximaciones

dirigidas a inhibir o destruir mediadores moleculares o celulares de la inmunosupresión inducida por el tumor como las células Tregs, linfocito T citotóxico asociado a CTLA-4 o proteína de muerte celular programada 1 (PD-1).

Los tumores desarrollan múltiples mecanismos de evasión inmune a medida que progresan. Con una mayor comprensión de la vigilancia inmune del tumor, la inmunoterapia se ha convertido en una estrategia de tratamiento prometedora para el cáncer de mama, por tratarse de una neoplasia inmunológicamente silenciosa. Las causas de que este tumor sea menos inmunitario que otras neoplasias se deriva de mecanismos que disminuyen el reconocimiento inmunológico y otros que promueven una importante inmunosupresión (34). Son los mecanismos de evasión inmune en los cánceres de mama los que están mal definidos. Por lo tanto, una caracterización adicional es fundamental para el desarrollo de mejores terapias.

El microambiente tumoral representa un punto clave en la regulación de la respuesta inmune en el cáncer de mama. Las células tumorales inducen un microambiente inmunosupresor que favorece el desarrollo de mecanismos para evadir el sistema inmune como la expresión del coestimulador del inhibidor del receptor inmune (por ejemplo, PD-1, linfocito T citotóxico asociado a CTLA-4, gen de activación de linfocitos 3 (LAG-3) y la presencia de factores inmunosupresores (IDO, interleucina 10 y TGF- $\beta$ ). El microambiente tumoral también se ve afectado por el infiltrado de células inmunosupresoras como los macrófagos asociados a tumor (TAMs), las células supresoras de origen mieloide (MDSCs) y las células Tregs. Los TAMs se han descrito en



distinto tipo de tumores sólidos, incluido el cáncer de mama. Varios estudios han mostrado una correlación entre un peor pronóstico del cáncer de mama y el número de TAMs (258). Después de llegar a los tejidos, los macrófagos sufren una activación dependiendo del microambiente. Generalmente se dividen en macrófagos M1 y macrófagos M2. Los M1 son los "clásicamente activados" y juegan un papel importante en la protección contra patógenos intracelulares y las células tumorales. Los M2 generalmente promueven el crecimiento tumoral y la metástasis (259). Las células Tregs y MDSCs también parecen contribuir a la diseminación tumoral y a la metástasis (34, 260).

Las células Tregs, se caracterizan por un fenotipo CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> y expresan el represor transcripcional FOXP3, necesario para su desarrollo. Estas células juegan un papel importante en la limitación de la proliferación y producción de citoquinas por linfocitos T efectores. Los niveles de células Tregs están elevados en sangre periférica de pacientes con cáncer y contribuyen a eludir la acción del sistema inmunitario mediante la supresión de células T específicas de antígeno tumoral endógeno (261).

La quimioterapia disminuye el infiltrado de FOXP3, mientras que los niveles de CD3<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se mantienen invariables. Además, la respuesta patológica completa a la quimioterapia neoadyuvante se correlacionan con el descenso del número de células FOXP3<sup>+</sup>, mientras que permanecen invariables en las pacientes no respondedoras. En un estudio preliminar se ha visto que el aumento de células Tregs en sangre periférica se correlaciona con el potencial metastásico del tumor y por

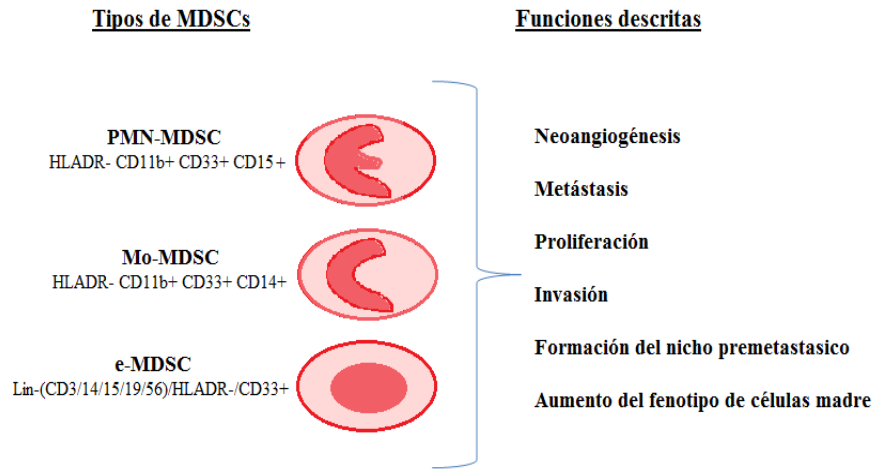
tanto, con un peor pronóstico (262). Estos resultados sugieren que las células Tregs son responsables de la inmunosupresión en cáncer de mama. Por lo tanto, el recuento de células Tregs circulantes puede ser valioso para evaluar el pronóstico de la enfermedad.

Los cánceres de mama de alto riesgo (caracterizados por la ausencia de los receptores de estrógenos y progesterona, el alto grado tumoral y/o afectación ganglionar) se han relacionado típicamente con la presencia elevada de CD3+, CD8+ y FOXP3+ en los infiltrados de células T al diagnóstico (263). En algunos artículos se ha visto correlación entre el alto número de linfocitos T CD8+ y linfocitos B CD20+ como factor independiente predictivo de supervivencia (264, 265). Por otra parte, el alto número de linfocitos Tregs FOXP3+ se ha asociado con una baja supervivencia libre de progresión (266). Por el contrario, recientemente se comprobó que el aumento de linfocitos T CD8+ (linfocitos T citotóxicos) sobre células Tregs FOXP3+ se asociaba con una respuesta completa patológica a la quimioterapia neoadyuvante en cáncer de mama (263) y con un aumento de la SLP y supervivencia global (SG) (267).

Las células supresoras de origen mieloide (MDSC) juegan un papel importante en la progresión tumoral. Se caracterizan por un fenotipo Lin<sup>-bajo</sup> HLADR- CD11b+ CD33+. Se han descrito varios subtipos de MDSCs, algunos artículos mencionan hasta 7 subtipos distintos. Sin embargo, no se encuentran claramente definidos, salvo tres de ellos que son las MDSCs monocíticas (Mo-MDSC) con fenotipo HLADR- CD11b+ CD33+ CD14+, las MDSCs polimorfonucleares o granulocíticas (PMN-MDSCs) con fenotipo HLADR- CD11b+ CD33+

CD15+ y las MDSCs tempranas (e-MDSCs) con fenotipo Lin-(CD3/14/15/19/56)/HLADR- /CD33+ (268, 269).

Estas células alteran la respuesta inmunitaria frente al tumor, frenando la acción de los linfocitos CD8+ efectores y la respuesta citotóxica mediada por las células T citolíticas (30, 270). En condiciones normales, las células hematopoyéticas de la médula ósea se diferencian en macrófagos o granulocitos (271). En el contexto del cáncer, el microentorno tumoral libera mediadores (TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL-6, G-CSF, GM-CSF, PGE2, VEGF, SCF, Flt3) que estimulan la diferenciación de las células mieloides inmaduras a MDSCs y quimiocinas (CXCL12, CXCL5, CCL2) que inducen la migración de las MDSCs al tumor (272, 273). Las MDSCs pueden ejercer su actividad inmunosupresora mediante la producción de gran cantidad de arginasa 1 (ARG-1) y óxido nítrico, estimulando la producción de especies reactivas de oxígeno, liberando factores que estimulan la conversión y expansión de Tregs (274). Además, las MDSCs inducen angiogénesis, invasión, proliferación y favorecen la aparición de metástasis, preparando el nicho premetastásico mediante la alteración de la matriz extracelular, entre otros mecanismos (figura 8) (275-278).



**Figura 8. Tipos de MDSCs y funciones.** PMN-MDSCs: MDSCs polimorfonucleares, Mo-MDSCs: MDSCs monocíticas, e-MDSCs: MDSCs tempranas.

En este microambiente tumoral las MDSCs juegan un papel primordial y la regulación epigenética de estas células mediante miARNs puede revelar alternativas terapéuticas más eficaces. Esta regulación epigenética de las MDSCs puede contrarrestar el crecimiento tumoral y la metástasis (279). Varios estudios recientes muestran que los pacientes con presencia elevada de MDSCs en el tumor presentan peor supervivencia y tiene relevancia pronóstica en varios tipos de cáncer (280-282). Con el reclutamiento de estas células inmunosupresoras el microambiente tumoral limita la efectividad de la respuesta inmune.

Mientras el potencial teórico de la modulación inmune en el tratamiento del cáncer de mama es un tema de máxima actualidad, los mecanismos moleculares de esta modulación son desconocidos. Por lo

tanto, es necesario incrementar los conocimientos en este campo y realizar correlaciones clínico-patológicas entre la progresión tumoral y los fenotipos de MDSCs, Tregs y sus niveles en el tumor y sangre periférica. Todo esto va a permitir mejorar nuestro conocimiento sobre la compleja correlación entre el microambiente tumoral y las células del cáncer para mejorar nuestra aproximación al tratamiento de las pacientes con cáncer de mama.

Hasta el momento, los marcadores predictivos en este subtipo no han conseguido dar información segura sobre la evolución del CMTN. En los últimos años se ha abierto un amplio campo de investigación sobre biomarcadores en cáncer. Estos perfiles aún no han sido validados y la mayoría se refieren a tejido tumoral, no a biomarcadores circulantes. Sin embargo, estos marcadores han sido detectados también en suero y son prometedores marcadores circulantes con potencial valor pronóstico y predictivo (237, 283).





## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**





## **2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

En base al conocimiento actual de los cánceres de mama triple negativos (CMTN), nuestra **hipótesis de trabajo** es que existen biomarcadores circulantes, todavía pobremente estudiados, que están implicados, solos o en combinación, en la patogenia de algunos de los subtipos de CMTN. Estos biomarcadores otorgarían características específicas que definirían nuevos subtipos dentro de la heterogeneidad de estos tumores. Estudios en tejido tumoral proporcionan información valiosa, pero no reflejan los cambios inducidos por la evolución de la enfermedad o los tratamientos administrados. Por tanto, el conocimiento de los mismos proporcionaría información relevante en diferentes momentos evolutivos, permitiendo adecuar la terapia y mejorar el pronóstico.

El **objetivo fundamental** de este proyecto es encontrar en el diagnóstico biomarcadores circulantes en sangre predictores de respuesta. Una importante ventaja de estos biomarcadores circulantes es su obtención mínimamente invasiva, además de identificar tempranamente los pacientes que se beneficiarán de regímenes más específicos, incrementando la tasa de respuesta y disminuyendo la toxicidad de tratamientos innecesarios. Finalmente, el estudio en cultivos celulares de estos biomarcadores podrá definir futuras dianas terapéuticas.

Los **objetivos específicos** de este proyecto son:

1- Identificar biomarcadores circulantes en plasma (miARNs en exosomas, proteínas libres, células inmunes (células Tregs circulantes e *in situ*, macrófagos asociados a tumor (TAMs) y otras células mieloides

(granulocitos, monocitos y metabolitos) en pacientes con CMTN, como método que permita predecir el pronóstico y la respuesta al tratamiento.

2- Correlacionar los perfiles de expresión de miARNs, células inmunes y metabolitos en muestras prospectivas de plasma al diagnóstico con la infiltración leucocitaria en el tumor (TILs) y con la clasificación CMTN de Lehmann (mediante *arrays* de expresión estudiados con el algoritmo en <http://cbc.mc.vanderbilt.edu/tnbc/>). Valorar la correlación existente entre la inmunohistoquímica y el resultado obtenido mediante PAM50.

3- Validar la expresión de genes con el pronóstico en una cohorte *in silico* ya recogida en bases de datos de R2 (<http://r2.amc.nl>).

4- Valorar las alteraciones de expresión génica que producen las MDSCs sobre cultivo de CMTN.

5- Identificación del sinergismo entre fármacos.



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **1. Diseño del estudio.**

Estudio prospectivo, observacional no intervencionista, descriptivo y analítico de marcadores pronósticos y predictivos de respuesta al tratamiento neoadyuvante en pacientes con CMTN.

#### **2. Población de estudio.**

Pacientes con CMTN, inicial o localmente avanzado, que no habían recibido tratamiento sistémico y que eran candidatas a tratamiento neoadyuvante con QT.

Para la inclusión en el estudio, las pacientes fueron clasificadas como triple negativo mediante inmunohistoquímica (IHQ) cuando cumplían los siguientes criterios:

- Receptores de estrógenos y progesterona negativo (<1% de núcleos positivos por IHQ).
- HER2 expresión negativa (mediante HercepTest o validado con IHQ; tinción 0 - 1 cruz o falta de amplificación de HER2 (por hibridación *in situ* fluorescente)

#### **3. Número de sujetos.**

Se estudiaron las muestras de biopsias de tejido tumoral y muestras sanguíneas (plasma y sangre) de 37 pacientes con CMTN candidatas a QT neoadyuvante previo al inicio de la QT. El número total de pacientes fue calculado por simulación de Monte Carlo.

Las pacientes fueron incluidas desde la Unidad Funcional de Patología de Mama del Hospital Universitari i Politècnic La Fe entre los años

2016-2018. Inicialmente, se estimó que el número de pacientes con nuevo diagnóstico de CM sería de 160/pacientes al año, entre las cuales el CMTN presenta una incidencia del 15%. Teniendo en cuenta que alguna paciente no sería candidata a tratamiento neoadyuvante, consideramos que en un año y medio podríamos alcanzar la cifra estimada de pacientes.

#### **4. Criterios de selección.**

La selección de pacientes que fueron incluidas en el estudio se realizó de forma exhaustiva. Se valoraron individualmente las pacientes, se les realizó anamnesis, exploración física, revisión de las muestras obtenidas y depositadas en el biobanco y seguimiento clínico para poder recoger aquellas variables que pudieran influenciar en los resultados analíticos del estudio.

#### **Criterios de inclusión:**

- 1- Consentimiento informado firmado para inclusión de muestras biológicas en biobanco y en el cual se autorice a la extracción de muestras de sangre periférica para los posteriores análisis moleculares. Y consentimiento informado específico del estudio.
- 2- Pacientes mayores de 18 años.
- 3- Estado funcional 0-1.
- 4- Diagnóstico de CMTN, inicial o localmente avanzado (no metastásico), documentado histológicamente y con estudio de extensión completo.
- 5- Pacientes candidatas a QT neoadyuvante.
- 6- No haber iniciado ningún tratamiento sistémico de QT previo a la extracción analítica y de tejido.

- 7- No haber sido intervenidas previo al inicio del tratamiento de QT.
- 8- Posibilidad de tomar muestras de sangre periférica (al menos 3 ml) y de extracción de tejido.
- 9- Pacientes con capacidad de adherirse a los requerimientos del estudio y del seguimiento.

**Criterios de exclusión:**

- 1- Tratamiento quimioterápico previo o cirugía previa.
- 2- Pacientes con enfermedad metastásica.
- 3- Pacientes incapaces de comprender lo redactado en el consentimiento informado o con circunstancias que imposibiliten una adhesión adecuada al protocolo, a criterio del Investigador.

**5. Evaluación inicial y seguimiento de las pacientes.**

Se realizó una evaluación basal de las pacientes y una anamnesis donde se recogieron las variables clínicas relevantes del estudio (tabla 7) y se comprobó que las pacientes cumplían todos los criterios de inclusión y exclusión del estudio.

**Tabla 7. Variables clínicas recogidas en el estudio.**

Variables clínicas	
<b>Características del paciente</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Edad.</li> <li>- Estado funcional (<i>Eastern Cooperative Group, Performance Status</i>)</li> <li>- Variables socio-demográficas.</li> <li>- Medicación concomitante.</li> <li>- Comorbilidad.</li> <li>- Peso, altura, IMC y superficie corporal</li> </ul>
<b>Variabes analíticas</b>	- Analítica basal (alteraciones relevantes).
<b>Datos anatomía patológica</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Afectación ganglionar, tamaño, grado.</li> <li>- Índice proliferación Ki-67</li> </ul>
<b>Protocolo quimioterapia</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Esquema recibido</li> <li>- N° ciclos recibidos</li> <li>- Retrasos y reducciones de dosis</li> </ul>
<b>Toxicidad</b>	La evaluación de la toxicidad en general se graduó siguiendo los criterios de National Cancer Institute (NCI) Common Toxicity Criteria (CTCAE), versión 4.0.
<b>Resultados</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tasa de respuesta patológica.</li> <li>- Comparación con el informe de la biopsia.</li> <li>- Grado de infraestadificación. Valoración del grado de respuesta (Sistema de <i>Miller &amp; Payne</i>)</li> </ul>

Previo al inicio de la quimioterapia neoadyuvante se midió el tamaño tumoral previo mediante técnicas de imagen (mamografía, ecografía y en algunas pacientes resonancia mamaria).



La indicación de quimioterapia neoadyuvante se realizó siguiendo el protocolo asistencial de la Unidad de Mama del Hospital La Fe. El esquema de quimioterapia administrado se eligió a criterio del investigador, de acuerdo con las características de las pacientes, entre dos opciones:

**Opción uno: consta de 2 fases secuenciales:**

- Fase 1: 4 ciclos de adriamicina ( $60\text{mg}/\text{m}^2$ ) y ciclofosfámido ( $600\text{mg}/\text{m}^2$ ) administrados cada 21 días. La adriamicina podrá cambiarse por su forma liposomal si es necesario para evitar cardiotoxicidad.
- Fase 2: 12 ciclos semanales de paclitaxel a dosis de  $80\text{mg}/\text{m}^2$  o en su defecto 4 ciclos de docetaxel  $100\text{mg}/\text{m}^2$  cada 21 días.
- El orden de ambas fases podría invertirse a criterio del investigador.

**Opción dos: consta de 2 fases secuenciales:**

- Fase 1: Igual que la fase 1 de la opción primera.
- Fase 2: 12 ciclos semanales de paclitaxel a dosis de  $80\text{mg}/\text{m}^2$  asociando carboplatino (área bajo la curva (AUC) 2).

El seguimiento de las pacientes se realizó según el protocolo asistencial. Al inicio de cada ciclo de tratamiento se valoró la evolución del tamaño tumoral mediante exploración física para descartar progresión durante el mismo. Al finalizar la QT neoadyuvante se valoró cada paciente en función de las exploraciones solicitadas inicialmente. Para valorar la respuesta del tumor al tratamiento neoadyuvante, se solicitó resonancia magnética (RM) mamaria previo al inicio y RM mamaria y ecografía al

final del tratamiento. Si únicamente se solicitó mamografía y ecografía mamaria, nuevamente se solicitó al final estas dos.

Tras finalizar la quimioterapia neoadyuvante, las pacientes se remitieron a cirugía donde se les realizó la cirugía indicada en cada caso según el tamaño (mastectomía o tumorectomía) y afectación axilar (biopsia del ganglio centinela (técnica de OSNA) y/o linfadenectomía). Si la paciente presentaba progresión tumoral durante el tratamiento, se suspendió la quimioterapia neoadyuvante y se remitió a cirugía. Estas últimas son a las que más atención hemos prestado dado que son las de peor pronóstico y las que hemos intentado detectar respecto al resto.

Tras la cirugía, las pacientes que precisaban radioterapia fueron remitidas para administrar el tratamiento en función de las características de cada tumor.

Al finalizar todas las etapas de tratamiento, las pacientes pasaron a la fase de seguimiento, que se realizó según el protocolo asistencial de la Unidad de Mama del centro. Inicialmente, las visitas fueron cada 3 meses con analítica, que posteriormente se espaciaron cada 6 meses y finalmente anuales. La mamografía se realizó anualmente. Si existía algún signo de sospecha de recidiva en ese momento, se solicitó la prueba indicada según la sospecha clínica.

## **6. Método de obtención de la muestra.**

Es necesario conocer el momento de obtención de la muestra (sangre y tejido) por si fue previa o posterior al tratamiento neoadyuvante, dato que podría haber interferido en las determinaciones llevadas a cabo. De todas las pacientes, el tejido obtenido fue de la biopsia por aguja gruesa al diagnóstico, realizada en el Servicio de Radiología. Tras la extracción del tejido tumoral, según el protocolo de nuestro centro, se colocó la muestra en formol y se llevó al Servicio de Anatomía Patológica para su inclusión en parafina, diagnóstico del tumor y estratificación tumoral por el Patólogo especializado en cáncer de mama.

Tras el diagnóstico de CMTN, se realizaba extracción de sangre total. Concomitantemente a las biopsias, las muestras de sangre periférica se recogieron en tubos de suero (4 ml) para analizar proteínas circulantes y en tubos tratados con EDTA para recoger plasma (12 ml) para aislar exosomas y analizar su contenido en miARN. Las consideraciones a tener en cuenta en la toma de muestras fueron:

- Para el suero (tubos Vacutainer color rojo) se esperó 1 hora a temperatura ambiente hasta que la sangre estuvo totalmente coagulada y se centrifugó a 3000xg durante 20 min para separar el suero del coagulo.
  
- Para el plasma (tubos Vacutainer color morado, llevan EDTA) se centrifugó a 3000xg durante 20 min para eliminar la celularidad.

- Tras la extracción se anotó la fecha y hora de la toma de muestra, parámetros críticos para determinar la calidad de las muestras. La muestra se envió con premura al Biobanco La Fe.

- El suero y el plasma se guardaron en alícuotas de 1 ml cada una y se almacenaron a -80°C

Previo al procesado de plasma, se extrajeron 100 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) de la muestra de sangre periférica para su tratamiento en fresco y realización de citometría de flujo (ver la descripción de la técnica en el apartado de citometría).

Todas las muestras se extrajeron antes del inicio del tratamiento. Todas las pacientes fueron informadas adecuadamente y firmaron, previo a la extracción de las muestras, el consentimiento informado del Biobanco del Hospital La Fe que cumple con la normativa vigente.

### **7. Micro-ARN en exosomas.**

Para la detección en plasma de los miARN en exosomas se utilizó el exoRNeasy Serum/Plasma kits (Qiagen), diseñados para una rápida purificación del ARN total de las vesículas, incluyendo el ARNm y ARN no codificante.

Estos kits utilizan una membrana que presenta una especial afinidad para aislar los exosomas y otras vesículas del plasma. Tras la purificación de los exosomas, una combinación de fenol-guanidina (QIAzol) permite eluir de las columnas y lisar las vesículas que contienen ARN. El QIAzol desnaturaliza las proteínas complejas y

RNAsas. Posteriormente, la adición del cloroformo al lisado permite que este se separe en una fase acuosa y una fase orgánica mediante centrifugación, quedando la mayoría de proteínas desnaturalizadas y el ADN cromosómico en la interfase. Las particiones de ARN se quedaron en la parte acuosa superior. La parte acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se añadió etanol para precipitar el ARN. La suspensión con el ARN precipitado se añadió a la columna RNeasy MiniElute, donde al centrifugar el ARN quedó retenido en la membrana de la columna. El fenol y otros contaminantes se eluyeron tras la centrifugación. Tras dos lavados con etanol al 70% en agua, el ARN purificado se eluyó de la columna con 15-30 µl de agua libre de RNasa.

### **7.1. Procedimiento de extracción de miARN (figura 9):**

Se utilizaron para todas las pacientes el plasma procesado y congelado previamente en el Biobanco del Hospital La Fe. Se aisló 1 ml de plasma de cada paciente para realizar el protocolo:

1. El tampón XBP incluido en el lote, se utilizó para unir el plasma filtrado a la columna, permitiendo la unión de los exosomas. Por cada volumen de tampón XBP se añadió un volumen de plasma. Se mezcló todo invirtiendo el tubo falcon 5 veces.
2. Se añadió la mezcla (plasma/tampón XBP) en la columna exoEasy y se centrifugó 1 minuto a 500xg. Se eliminó el líquido que había pasado la membrana y se colocó la columna nuevamente en el mismo tubo.

3. Se añadieron 10 ml XWP y se centrifugó durante 5 minutos a 5000xg para lavar la columna y eliminar el tampón residual. Se eliminó nuevamente el fluido del fondo del tubo colector.

4. Se cambió la columna a un nuevo tubo colector.

5. Se añadieron 700 µL de QIAzol a la membrana. Se centrifugó durante 5 minutos a 5000xg para recoger el lisado y transferirlo a un eppendorf de 2 ml.

6. Se agitó brevemente el lisado y se incubó a temperatura ambiente (15-25°C) durante 5 minutos. Este paso permitía la disociación entre las nucleoproteínas complejas.

7. Se añadió 90 µL de cloroformo en el eppendorf que contenía el lisado y agitó durante 15 segundos

8. Se incubó a temperatura ambiente (15-25°C) durante 2-3 minutos.

9. Centrifugó 15 minutos a 12000xg a 4°C. Tras centrifugar la muestra se separó en 3 fases: una superior, fase acuosa que contiene el ARN; una más delgada, una interfase blanca; y una inferior, una fase orgánica. El volumen de la fase acuosa fue de aproximadamente 400 µL.

10. Se transfirió la fase superior acuosa en un nuevo eppendorf. Se añadieron 2 volúmenes de etanol al 100% (por ejemplo 400 µL de fase acuosa y 800 µL de etanol) y se mezclaron con la pipeta.

11. Se pipetearon 700  $\mu\text{L}$  de muestra, en la columna RNeasy MiniElute y se centrifugó a  $\geq 8000xg$  durante 15 segundos a temperatura ambiente (15-25°C). Se eliminó el precipitado.

12. Se repitió el paso anterior con la muestra sobrante.

13. Se añadieron 700  $\mu\text{L}$  del tampón RWT a la columna RNeasy MiniElute. Se centrifugó 15 segundos a  $\geq 8000xg$ . Se eliminó el precipitado.

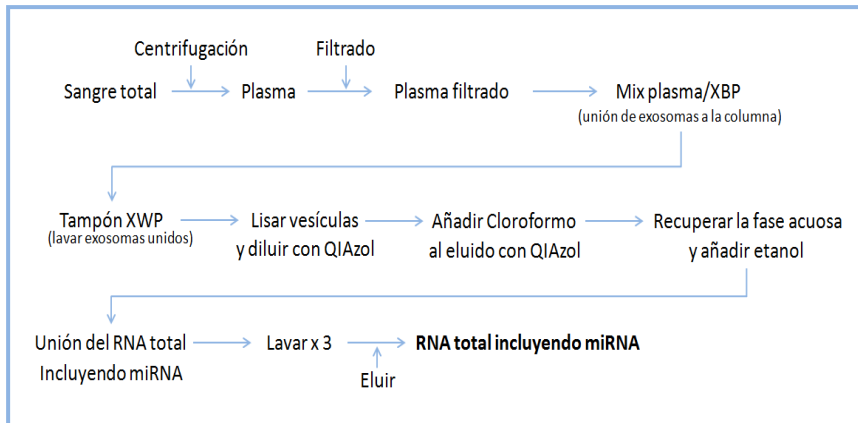
14. Se añadieron 500  $\mu\text{L}$  del tampón RPE a la columna RNeasy MiniElute. Se centrifugaron 15 segundos a  $\geq 8000xg$ . Se eliminó el precipitado.

15. Se añadieron 500  $\mu\text{L}$  del tampón RPE a la columna RNeasy MiniElute. Se centrifugaron 2 minutos a  $\geq 8000xg$ . Se eliminó el precipitado y se cambió el eppendorf.

16. Se centrifugó a máxima velocidad durante 5 minutos para secar la membrana. Se eliminó el precipitado. Es importante secar la membrana de la columna para evitar que el etanol residual pueda interferir en su posterior solubilización.

17. Se cambió el eppendorf y se añadieron 14  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNasa directamente en el centro de la membrana. Se centrifugó 1 minuto a máxima velocidad para diluir el ARN, que resultó en 12  $\mu\text{L}$  de ARN eluido.

18. Finalmente el eluido fue congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior hibridación.



**Figura 9. Procedimiento de extracción de miARN.**

## 8. Arrays de miARN

Las muestras de ARN se analizaron con miARN 3.0 para obtener el perfil de expresión de miARN y otros ARN no codificantes. 50 nanogramos del total de ARN se añadieron a la mezcla denominada Flash Tag miARN (Genisphere). El GeneChip® Scanner 3000 7G System y los reactivos de Affymetrix se utilizaron para hibridar, lavar, teñir y escanear los *arrays*. La consola de expresión del software libre de Affymetrix se utilizó como control de calidad y la sonda como evaluación de valores normalizados. Todo este proceso se llevó a cabo en la Unidad de Genómica del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, tratando de mantener las normas de calidad de la Organización Internacional de Normalización (ISO), para que los resultados fueran completamente fiables.



### 9. Citometría de flujo.

La citometría de flujo permite la caracterización e identificación multiparamétrica de células individuales en función de la expresión antigénica, la viabilidad o el ciclo celular, así como la detección de células marcadas con moléculas fluorescentes. Para identificar y cuantificar las células inmunosupresoras (células Tregs y MDSCs) se decidió realizar citometría de flujo. El inmunofenotipo seleccionado se encuentra descrito en la tabla 8.

**Tabla 8. Inmunofenotipo de las células inmunosupresoras.**

Tipo celular	Inmunofenotipo
<b>Célula T reguladora</b>	CD3+ CD4+ CD25+alto FOXP3nuclear+
<b>Célula T reguladora (circulante) inactivada (natural)</b>	CD3+ CD4+ CD25+ alto CD127+débil CD45RA+
<b>Célula T reguladora (circulante) activada (inducible)</b>	CD3+ CD4+ CD25+ alto CD127+débil CD45RA-
<b>Células inmunosupresoras de origen mieloide (MDSCs)</b>	Lin <sup>-bajo</sup> HLADR- CD11b+ CD33+
<b>Monocíticas MDSCs</b>	HLADR- CD11b+ CD33+ CD14+
<b>Granulocíticas MDSCs</b>	HLADR- CD11b+ CD33+ CD15+
<b>Tempranas o <i>early</i> MDSCs</b>	Lin-(CD3/14/15/19/56)/ HLADR- /CD33+

CD: grupo de diferenciación, Lin: linaje, HLADR: antígenos leucocitarios humanos, MDSCs: Células inmunosupresoras de origen mieloide.

Se realizó una extracción de sangre previa al inicio de quimioterapia. El análisis se realizó con sangre fresca, recogida en tubos de hemograma que contenían EDTA. La sangre se procesó en menos de 4 horas.

### **9.1. Técnica de detección de células T reguladoras en sangre periférica mediante citometría de flujo.**

Previo al inicio del protocolo, se prepararon las soluciones de trabajo. La solución A (que se utilizó para fijar) constaba de 250  $\mu\text{L}$  del tampón A + 2250  $\mu\text{L}$  de agua destilada (por muestra). La solución C (que se utilizó para permeabilizar la célula) constaba de 490  $\mu\text{L}$  de la solución A (anteriormente preparada) + 10  $\mu\text{L}$  del tampón B (por muestra). También se necesitó añadir al tampón fosfato salino (PBS) 0,2% de albúmina de suero bovino (BSA).

Tras la preparación de las soluciones se inició el procesamiento de la muestra. Se prepararon las células mononucleares de sangre periférica diluyendo con PBS + 0,2% BSA hasta alcanzar una concentración de  $1 \cdot 10^7$  células/mL. Por ejemplo: 6,0 mil/ $\text{mm}^3$  (en el hemograma, extraído en el mismo momento que se realiza la extracción a la paciente para la citometría) = 6.000 células/ $\text{mm}^3 \rightarrow 6.000.000$  células/mL. Por ejemplo: 20.000.000 células/mL  $\rightarrow$  dilución  $\frac{1}{2} \rightarrow 100 \mu\text{L}$  células + 100  $\mu\text{L}$  PBS+BSA.

Para la caracterización de las células Tregs se utilizó una combinación de seis anticuerpos monoclonales (AcMos) conjugados con fluorocromo (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA). Se pipeteó en un tubo de citometría el volumen adecuado de los AcMos de superficie según se enumera en la tabla 9; en este paso no se debe añadir el AcMo

FOXP3nuclear-PE pues requiere de fijación y de permeabilización de las células para abrir poros y permitir el acceso de los AcMos al núcleo en donde se expresa FOXP3.

**Tabla 9. Anticuerpos monoclonales de las células Tregs (Becton Dickinson).**

<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>PerCPCy5.5</b>	<b>PECy7</b>	<b>APC</b>	<b>APCH7</b>
CD4	FOXP3nu	CD3	CD127	CD25	CD45RA
20 µL	20 µL	5 µL	5 µL	20 µL	5 µL

FOXP3nu: factor nuclear transcripcional FOXP3, CD: grupo de diferenciación.

Se añadieron 100 µL de la suspensión de células por tubo, se agitó en el vórtex y se incubó 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se añadieron 2 mL de PBS + 0,2% BSA, se centrifugó a 500xg durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante por decantación.

Para fijar las células, se resuspendió suavemente el botón celular en el volumen residual, se añadió 2 mL de la solución A, se agitó en vórtex y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se centrifugó a 500xg durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante utilizando la pipeta automática. Para lavar las células, se resuspendió el botón celular en 2 mL de PBS + 0,2% BSA y se centrifugó a 500xg durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante por decantación.

Para permeabilizar las células, se resuspendió suavemente el botón celular en el volumen residual, se añadieron 500 µL de la solución C, se agitó en vórtex y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente en

oscuridad. Para lavar las células, se resuspendió el botón celular en 2 mL de PBS + 0,2% BSA y se centrifugó a 500xg durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante por decantación. Se resuspendió el botón celular en 2 mL de PBS + 0,2% BSA y se centrifugó a 500xg durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante por decantación.

Para realizar el marcaje del factor nuclear transcripcional FOXP3 (FOXP3nu) se añadieron 20 µL del AcMo FOXP3-PE (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA), se resuspendió el botón celular suavemente y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Para lavar las células, se resuspendió el botón celular en 2 mL de PBS + 0,2% BSA y se centrifugó a 500xg durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante por decantación y se resuspendió en 500 µL de PBS + 0,2% BSA. Tras todo este proceso las células se adquirieron inmediatamente en el citómetro de flujo FACSCanto-II. En todas las pacientes se trató de adquirir entre 15.000 y 25.000 linfocitos CD4+ utilizando el BD FACSDiva software.

## **9.2. Técnica de detección de células inmunosupresoras de origen mieloide en sangre periférica mediante citometría de flujo.**

Para la caracterización de las MDSCs se utilizó una combinación de cinco AcMos conjugados con fluorocromo (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA). Estos AcMos se añadieron según el orden y las cantidades de la tabla 10.

**Tabla 10. Anticuerpos monoclonales de las MDSCs (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA).**

FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
CD33	CD11b	HLADR	-	CD15	CD14
10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	-	10 $\mu$ L	5 $\mu$ L

CD: grupo de diferenciación, HLADR: antígenos leucocitarios humanos.

Tras añadir los AcMos por orden, se añadieron 100  $\mu$ L de la muestra de sangre periférica, se agitó brevemente en vórtex y se incubó la muestra durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 2 mL de solución hemolizante FACSLysing Solution (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA), se agitó en vórtex y se incubó la muestra durante 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugó 5 minutos a 500xg, se decantó y resuspendió el botón celular en 2 mL de PBS + 0,2% BSA, se centrifugó 5 minutos a 500xg, se retiró el sobrenadante con pipeta y se resuspendió el botón celular en 0,5 mL de PBS + 0,2% BSA. Tras todo este proceso se adquirieron los tubos en el citómetro de flujo o se almacenaban a 4°C durante un tiempo máximo de 1 hora. Al igual que con las células Tregs para la adquisición de las MDSCs se utilizó el citómetro FACSCanto-II. En todas las pacientes se trató de adquirir un mínimo de 200.000 MDSCs utilizando el BD FACSDiva software.

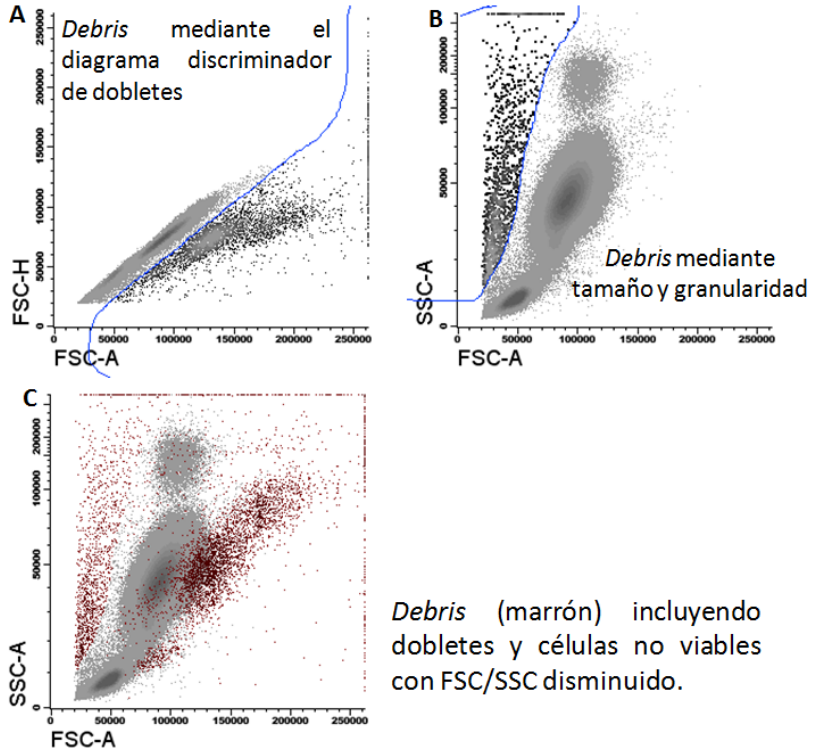
### **9.3. Descripción del equipo de citometría.**

Se utilizó el citómetro del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe. Se trata de un Citómetro de Flujo analizador BD FACSCanto™-II equipado con 3 fuentes de emisión (3 láseres) con longitudes de onda de 405 nm, 488 nm y 635 nm. Esto hace que se puedan analizar simultáneamente hasta 10 parámetros en partículas y/o células individuales.

El programa FACSDiva™ de adquisición y análisis de ficheros del citómetro BD FACSCanto™-II opera con el sistema Windows. Posibilita realizar la calibración y la compensación del equipo, tanto sin conexión como con conexión a internet, para diferentes aplicaciones. Asimismo, permite el análisis subsiguiente de los datos obtenidos mediante citometría.

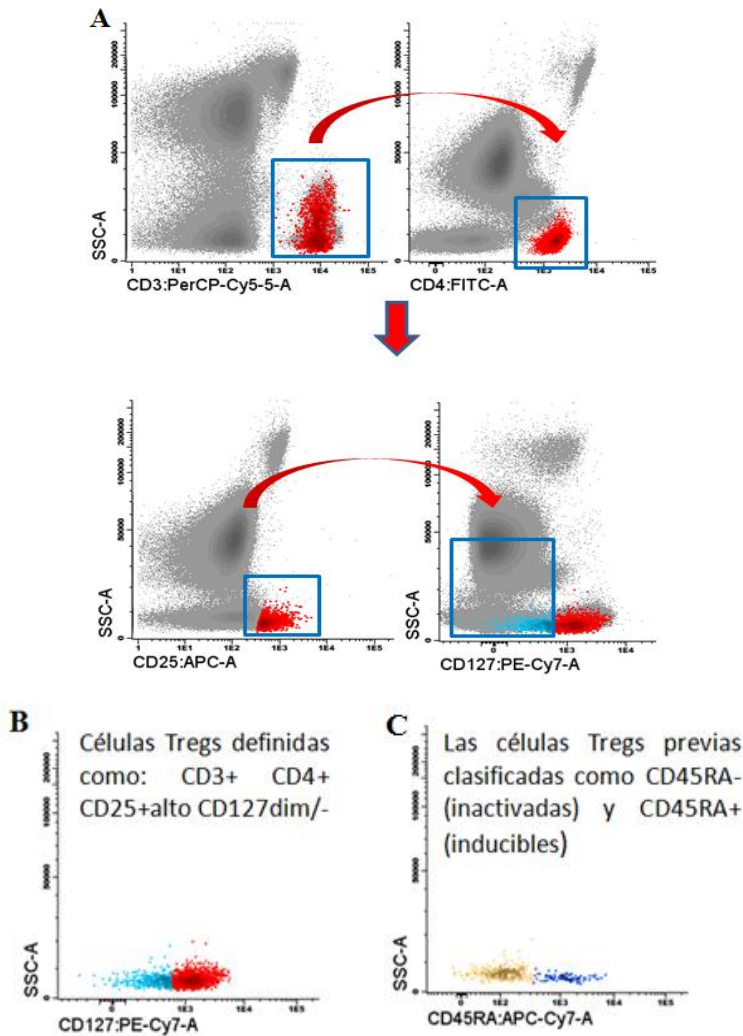
### **9.4. Análisis citometría de flujo.**

Las muestras adquiridas se analizaron con el programa Infinicyt™ (Cytognos, Salamanca, España). El proceso de selección de las células Tregs se realizó utilizando diversos AcMos, combinados de diferentes formas según se describe en la literatura (257, 284-286). Los distintos procesos de selección de las células Tregs se detallan en las figuras 10-13.



**Figura 10. Proceso de preparación del análisis de citometría. A.** Eliminación de los dobletes mediante el diagrama discriminador de dobletes. **B.** Eliminación de los desechos celulares celular mediante el ajuste por tamaño y granularidad. **C.** Diagrama donde se muestra la totalidad de dobletes y células no viables (desechos celulares en marrón) que van a ser eliminados del análisis.

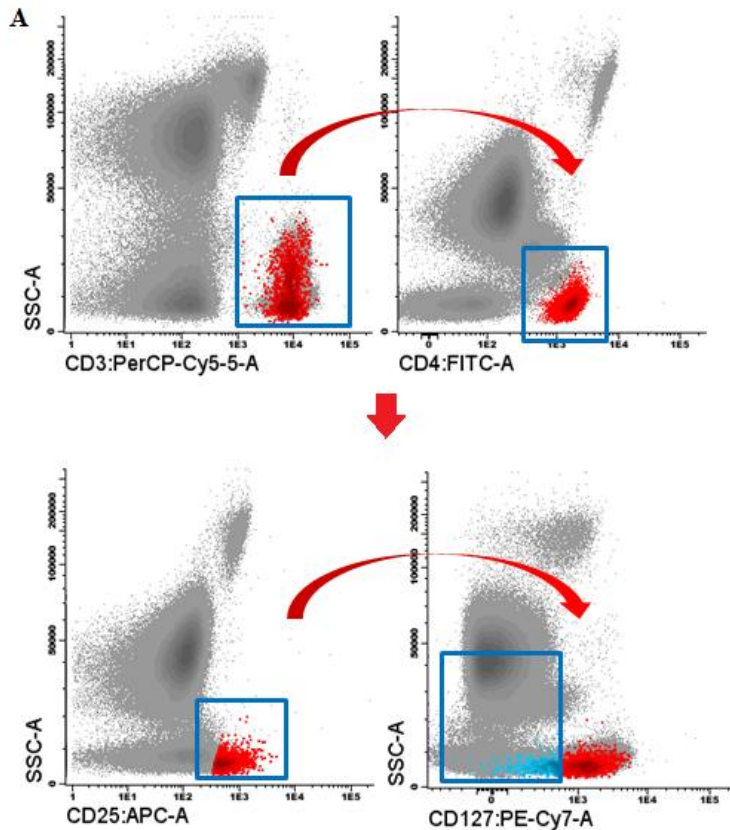
*Identificación de biomarcadores en CMTN*

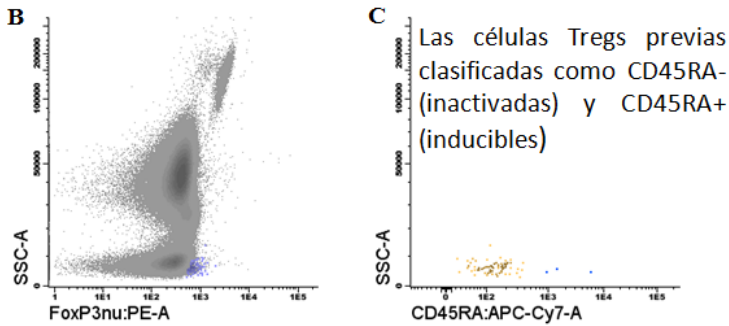


Población	Eventos	Total(%)	Parcial(%)
Eventos	361995	100	NA
Tregs CD3+ CD4+ CD25+alto CD127+dim/-	409	0,113	18,61
Tregs Cd127+dim/-CD45RA+	98	0,0271	23,96
Tregs Cd127+dim/-CD45RA-	311	0,0859	76,04



**Figura 11. Proceso de selección de las células Tregs según la expresión de CD127.** **A.** Proceso general de selección de las células Tregs, se selecciona inicialmente las células CD3 positivas, luego las CD4 positivas dentro de estas las CD 25 positivo-alto, finalmente valoramos la expresión de CD127. **B.** Después del marcaje anterior, seleccionamos las CD127 negativas (azul claro). **C.** Las células Tregs previas se clasificaron como CD45RA negativas, correspondientes a las células Tregs inactivadas (amarillo) y las CD45RA positivas, correspondientes a las células Tregs inducibles (azul oscuro).

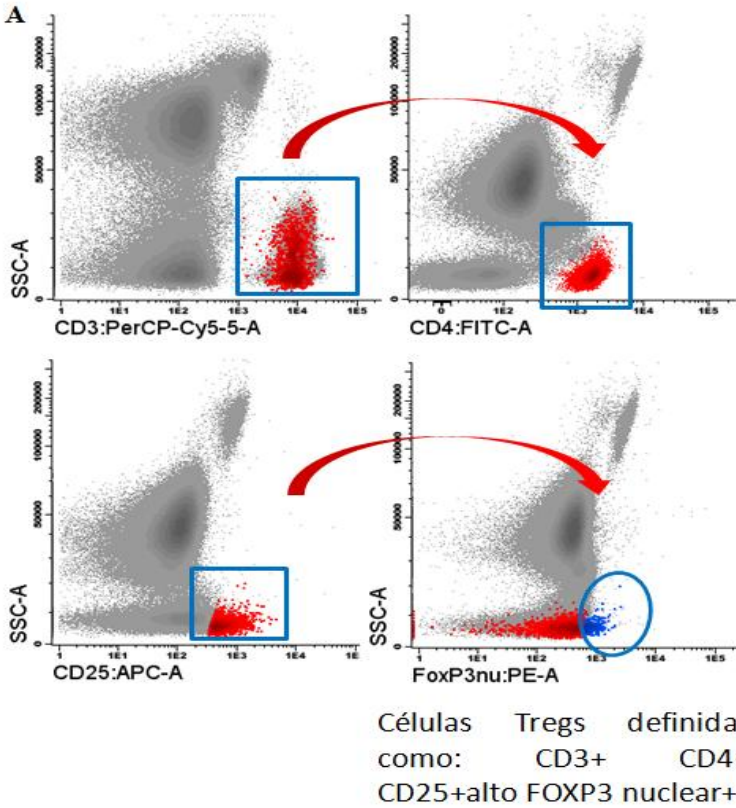




Células Tregs definidas como: CD3+ CD4+ CD25+alto CD127dim/- FOXP3 nuclear +

Población	Eventos	Total(%)	Parcial(%)
Eventos	361995	100	NA
Tregs CD3+ CD4+ CD25+alto CD127+dim /- FoxP3+	72	0,0199	3,28
Tregs Cd127+dim/-CD45RA+	3	0,0008	4,17
Tregs Cd127+dim/-CD45RA-	69	0,0191	95,83

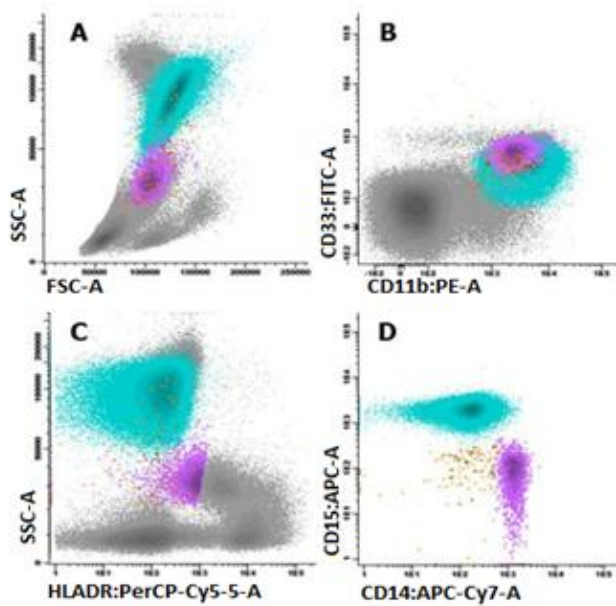
**Figura 12. Proceso de selección de las células Tregs por expresión conjunta de CD127 y FOXP3 nuclear.** A. Proceso general de selección de las células Tregs, se seleccionaron inicialmente las células CD3 positivas, luego las CD4 positivas y dentro de éstas las CD 25 positivo-alto. Finalmente se seleccionaron las CD127 negativas (azul claro). B. Tras la selección previa, se seleccionaron las células Tregs que eran FOXP3 positivas. C. Las células Tregs previas fueron clasificadas como CD45RA negativas, que corresponden a las células Tregs inactivadas (amarillo) y las CD45RA positivas, que son las células Tregs inducibles (azul oscuro).



Población	Eventos	Total(%)	Parcial(%)
Eventos	361995	100	NA
Tregs CD3+ CD4+ CD25+alto CD127+dim/- FoxP3+	281	0,0776	12,78

**Figura 13. Proceso de selección de las células Tregs por expresión únicamente de FOXP3.** A. Proceso general de selección de las células Tregs por expresión únicamente de FOXP3, se seleccionaron inicialmente las células CD3 positivas, luego las CD4 positivas y dentro de éstas las CD 25 positivo-alto, finalmente se seleccionaron las células Tregs que eran FOXP3 positivas (azul oscuro).

Además de las células Tregs, se trató de identificar tres subtipos de MDSCs: MDSCs-tempranas (e-MDSCs), MDSCs-monocíticas (Mo-MDSCs), y MDSCs-polimorfonucleares (PMN-MDSCs). El inmunofenotipo de las e-MDSCs es  $CD33^{+}CD11b^{+}HLA-DR^{bajo/-}CD14^{-}CD15^{-}$ ; Mo-MDSCs es  $CD33^{+}CD11b^{+}HLA-DR^{bajo/-}CD14^{+}CD15^{-}$ , mientras que el de las PMN-MDSCs es  $CD33^{+}CD11b^{+}HLA-DR^{bajo/-}CD14^{-}CD15^{+}$ . Esta selección de marcaje se refleja en la figura 14.

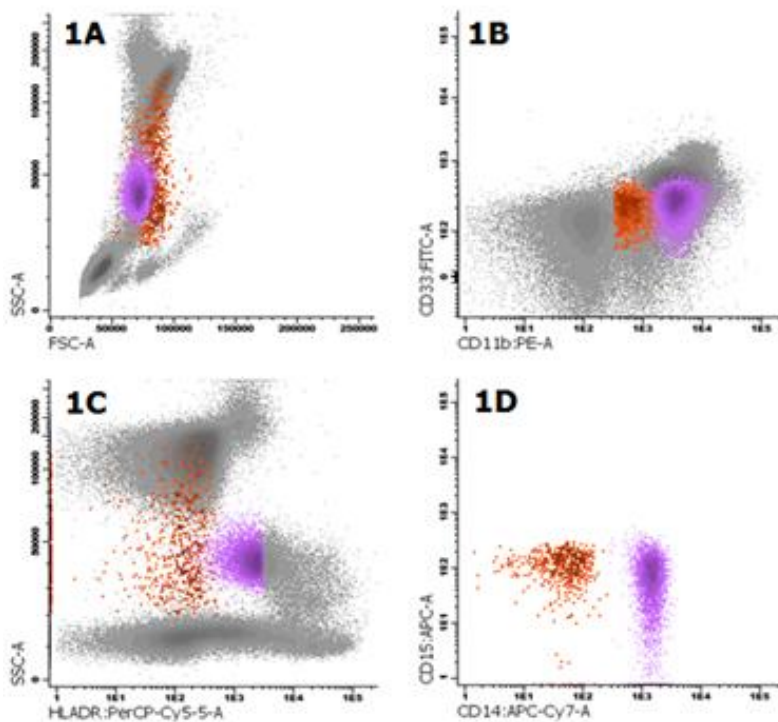


Población	MDSCs (%)
e-MDSCs	0,03
Mo-MDSCs	0,64
PMN-MDSCs	44,41

Figura 14. Gráficas de citometría de flujo mostrando los diferentes subtipos de células inmunosupresoras de origen mieloide (MDSCs) de

**sangre periférica y el porcentaje que representan sobre la celularidad total.** **A.** Distribución de las MDSCs en FSC (tamaño) y SSC (granularidad). **B y C.** Los marcadores comunes a todas las MDSCs son CD33+ CD11b+ y HLA-DR negativo o positivo bajo. **D.** MDSCs-tempranas (en color naranja), también conocidas como early-MDSCs, son negativas para CD14 y CD15; las MDSCs-monocíticas (Mo- MDSCs) (en color morado) con CD14+ y CD15 negativas; y las polimorfonucleares-MDSCs (PMN-MDSCs) (en color azul) son CD14 negativas y CD15+.

Una de las limitaciones que se encontraron durante la realización de esta técnica fue la existencia de una bibliografía escasa, confusa, en ocasiones contradictoria y, en muchos casos, con las técnicas de realización mal descritas. En el momento del análisis y realizando una revisión nuevamente de los artículos observamos que la fracción de PMN-MDSCs que habíamos aislado no podíamos diferenciarla adecuadamente de la fracción de neutrófilos totales. Esto es debido a que es necesario realizar un ficoll previo a la técnica de marcaje con los anticuerpos. El ficoll permite crear una densidad de gradiente mediante la centrifugación para aislar células mononucleares provenientes de sangre periférica. Esto permite quitar las polimorfonucleares y quedarse con las mononucleadas que son polimorfonucleares pero por ser MDSCs tienen una flotabilidad alterada. Por todo ello, nos vimos obligados a retirar de nuestro análisis la fracción de PMN-MDSCs que inicialmente habíamos planificado analizar, siendo el análisis definitivo únicamente de las fracciones de e-MDSCs y Mo-MDSCs (figura 15).



Población	MDSCs (%)
e-MDSCs	0,3367
Mo-MDSCs	3,6052

Figura 15. Gráficas de citometría de flujo mostrando los dos subtipos de células inmunosupresoras de origen mieloide (MDSCs) de sangre periférica. El porcentaje indicado es sobre la celularidad total.

## **10. Metabolómica basada en espectrometría de masas.**

El estudio se realizó en la Unidad de metabolómica, Unidad Analítica del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe. Se utilizó la cromatografía líquida de ultra rendimiento con ionización por *electrospray* acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-ESI-MS/MS) (287). Se utilizó un análisis comprensivo con alto grado de confianza del perfil metabolómico de las muestras de plasma y un análisis cuantitativo del amplio espectro de metabolitos, especialmente de la vía del triptófano.

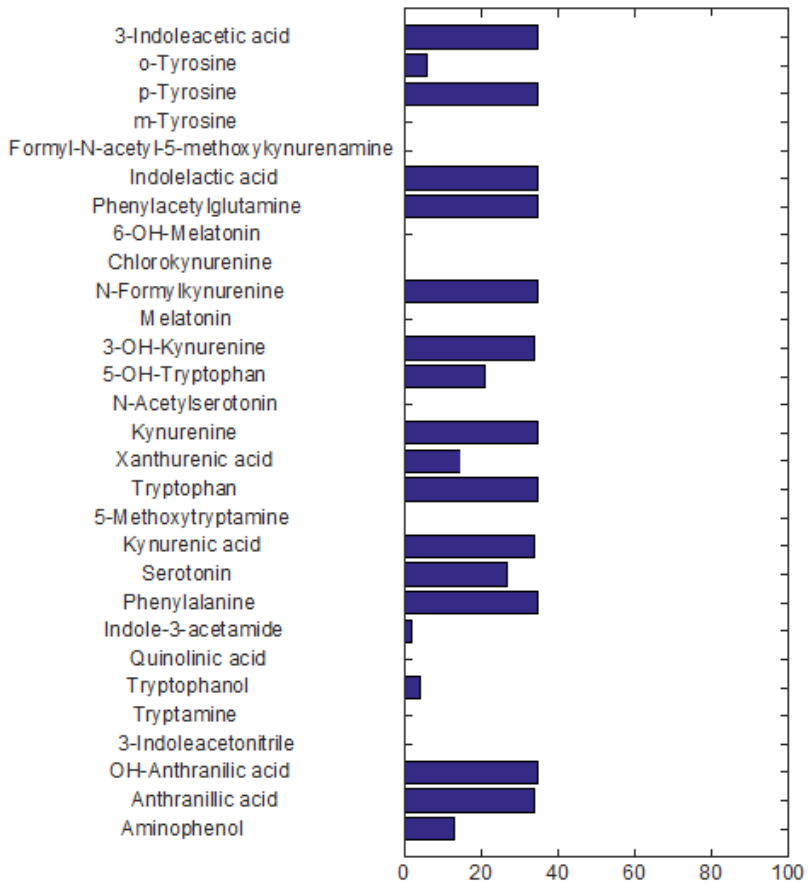
### **10.1. Preparación de la muestra.**

Para la cuantificación de 29 metabolitos del triptófano, o-tirosina, p-tirosina, m-tirosina, fenilacetilglutamina y fenilalanina se utilizó la UPLC-ESI-MS/MS (figura 16). Las muestras de plasma, previamente almacenadas a -80 °C, se descongelaron en hielo. Una vez descongeladas, 50 µL se introdujeron en eppendorfs y se les añadió 150 µL de acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) frío para producir la precipitación de las proteínas. Posteriormente, las muestras se agitaron durante 10 segundos y luego se centrifugaron a 13000xg durante 10 minutos a 4°C. Tras este proceso, se transfirieron 100 µL del sobrenadante a nuevos tubos y se evaporó en el concentrador acoplado a vacío Thermo SPD121P SpeedVac (Waltham, MA USA). Se reconstituyeron los residuos en 25 µL de solución CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (2:98) (0.1% v/v ácido fórmico HCOOH).

Después, un total de 20 µL de sobrenadante se volvió a centrifugar a 13000xg durante un total de 10 minutos a 4°C. Un total de 2 µL del sobrenadante previo se transfirieron a una placa de 96 pocillos para el análisis, se añadieron 38 µL de la solución CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (2:98) (0.1%

v/v ácido fórmico (HCOOH)) y 40  $\mu$ L de una solución interna estándar. Esta muestra se preparó para asegurarse que los metabolitos que típicamente presentan concentraciones más altas, como el triptófano, se posicionan dentro del rango del método analítico. Se preparó una segunda muestra mezclando 20  $\mu$ L de los sobrenadantes previos y 40  $\mu$ L de la solución interna estándar. Ésta última solución incluía hidroxitriptófano-D4, 4-cloroquinurenina- $^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}$ , L-quinurenina-indole-D5-3-acetamida, 6-hidroximelatonina-D4, PAGN-D5, serotonina-D4, fenilalanina-D5, ácido kynurenico-D5, fenilalanina-D5, triptófano-D5, triptamina-D4, ácido xanturénico-D4 (en una concentración de 1000 nM cada uno) en  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  (2:98)(0.1% v/v HCOOH)(287).





**Figura 16. Metabolitos analizados y número de muestras con concentraciones superiores al límite de cuantificación.**

## **10.2. Cromatografía líquida de ultra-rendimiento-ionización por *electrospray* con espectrometría de masas en tándem (UPLC-ESI-MS/MS).**

Las muestras se analizaron utilizando la columna Acquity HSS T3 C18 (100 x 2.1 mm, 1.8  $\mu$ m). Las fases móviles fueron agua (0.1% v/v HCOOH) (fase A) y (0.1% v/v HCOOH) CH<sub>3</sub>CN (fase B). El gradiente de la elución fue el siguiente: la fase B se llevó a cabo al 2% de 0 a 0.5 minutos. Después, se incrementó la fase B de forma lineal hasta el 45% durante los siguientes 5 minutos. Luego se incrementó hasta el 90% en 0.2 minutos seguido por una fase de retorno a las condiciones iniciales entre 5.7 y 6 minutos, lo que se mantuvo durante 1.5 minutos más para reequilibrar la columna. El volumen de inyección, la temperatura de la columna y la tasa de flujo se establecieron a 3  $\mu$ L, 55°C y 550  $\mu$ L/minuto, respectivamente. La temperatura del inyector automático se estableció a 6°C durante el análisis de las muestras. La ionización con *electrospray* se realizó con los siguientes parámetros: cono 25 V, fuente de temperatura 120°C, capilaridad 2.9 kV, temperatura de desolvatación 395°C, cono de nitrógeno y la tasa de flujo del gas de desolvatación fue entre 150 y 800 L/h.

## **11. Análisis histológico. Tinciones.**

Previo al inicio del tratamiento de quimioterapia se realizó a cada paciente la extracción de una muestra de tejido mediante biopsia con aguja gruesa. Estas muestras se fijaron con una solución de formalina al 10% para posteriormente incluirlas en parafina.

Las tinciones seleccionadas para la realización del estudio fueron: hematoxilina-eosina, receptores de estrógenos y progesterona, HER2 (si

presentaba positividad 2 cruces se realizaba FISH), Ki67, FOXP3, indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO1), CD4, CD8, CD163 y TILs. Para lograr unos buenos resultados y comprobar que la técnica había sido la adecuada, se tuvo en cuenta que el tejido llegara en buenas condiciones, adecuada fijación y procesamiento de la muestra, la realización de controles positivos y negativos de los AcMos antes de iniciar las determinaciones inmunohistoquímicas.

### **11.1. Preparación de los tejidos para estudio histológico.**

Una vez el tejido se encontraba perfectamente incluido en el bloque de parafina, se realizaron cortes de 4 micras y se colocaron en porta-objetos para realizar los estudios histológicos propuestos. Este proceso se realizó con ayuda de los técnicos del Servicio de Anatomía Patológica.

#### **11.1.A. Desparafinado.**

Las muestras se calentaron a 60°C durante 1 hora en cubetas, temperatura a la que la parafina se vuelve líquida.

#### **11.1.B. Hidratación.**

Las muestras se introdujeron tres veces en Xilol durante 5 minutos (el xileno va a permitir disolver los restos de parafina). Finalmente, las muestras se hidrataron en orden decreciente de concentración de alcohol, desde 100% de alcohol hasta el tampón PBS, un total de 5 minutos en cada cubeta.

## **11.2. Histopatología.**

Una vez se ha realizado el procedimiento anterior las muestras estaban preparadas para iniciar el procedimiento de tinción.

### **11.2.A. Hematoxilina-eosina.**

La tinción con hematoxilina-eosina se realizó de manera automática en un sistema de agilent Dako Omnis. Para finalizar, el corte de tejido se deshidrató en dos baños con etanol al 96 % un total de 5 minutos y con etanol 100% en dos cubetas un total de 5 minutos en cada una, y se pasó por tres cubetas de xilol un total de 5 minutos en cada cubeta. La tinción hematoxilina-eosina es esencial para realizar el estudio histológico inicial, permitiendo evaluar el tipo de tumor, la diferenciación del tumor y la presencia de TILs.

### **11.2.B. Receptores de estrógenos, progesterona y HER2.**

Estas técnicas se realizaron según el protocolo estándar del Servicio de Anatomía Patológica con objeto de evitar errores y de asegurar un diagnóstico adecuado a cada paciente. Tras la tinción inmunohistoquímica, la valoración inicial fue realizada por el Patólogo referente en cáncer de mama del hospital. Posteriormente, se revisaron los casos de CMTN que entraron en el proyecto.

### **11.2.C. Inmunohistoquímica.**

La expresión de proteínas incluidas en el proyecto se realizó mediante tinciones de inmunohistoquímica. Para lo cual, se utilizaron los anticuerpos primarios específicos de las proteína en estudio: Ki67 (FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Ki67 Antigen, Clon MIB1, referencia: IR626, DAKO), FOXP3 (AcMo de conejo, clon SP97,

referencia: MAD-000536QD, MASTER DIAGNÓSTICA), CD4 (AcMo de ratón, clon 4B12, referencia: IR649 ,DAKO), CD8 (AcMo de ratón, clonC8/144B, referencia: GA623, DAKO), CD163 (AcMo de ratón, clon 10D6, referencia: PA 0090, LEICANOVOCASTRA), IDO1 (AcMo de conejo, clon: policlonal, referencia: HAPA023149, SIGMA). Estas tinciones se realizaron igualmente con la tinción automática que permite el sistema de agilent Dako Omnis. Se introdujeron los portaobjetos y se tiñó con la tinción específica según el protocolo de DAKO.

### **11.3. Valoración de los resultados histopatológicos.**

El diagnóstico anatómo-patológico de CMTN se realizó por un patólogo experto en cáncer de mama. Todos los resultados fueron valorados por dos patólogos y por mí, según los siguientes criterios:

- Grado de diferenciación (%): Fue determinado con las muestras de hematoxilina-eosina. Se realizó con la valoración de los núcleos celulares, número de mitosis y morfología de las glándulas. Se dividen en: Grado 1 (bien diferenciados), Grado 2 (moderadamente diferenciados), Grado 3 (poco diferenciados).

- Grado de proliferación celular (%): Fue determinado mediante el número de mitosis y la expresión de Ki67 en los núcleos celulares. Este parámetro fue considerado como una variable continua y el resultado se ha dado en porcentaje desde 1% hasta 90%.

- Receptor de estrógenos (%): Se contabilizaron un total de 200 células y se cuantificó el porcentaje de núcleos teñidos. Se consideró negativo aquellas pacientes con menos de un 1% de tinción nuclear positiva. El resto de pacientes no entraron en el estudio.

- Receptores de progesterona (%): Se contabilizaron un total de 200 células y se cuantificó el porcentaje de núcleos teñidos. Se consideró negativo aquellas pacientes con menos de un 1% de tinción nuclear positiva. El resto de pacientes no entraron en el estudio.

- HER2: Las células marcadas por el anticuerpo HER2 presentaron un patrón de tinción limitado a la membrana plasmática. Se consideraron 4 grupos en función de la intensidad y de la extensión: 0: sin positividad o positividad < 10% de las células; 1+: tinción débil o apenas perceptible en > 10% de las células; 2+: positividad débil a moderada de > 10% de las células; 3+: positividad intensa completa o en la membrana de > 10% de las células. Únicamente las pacientes con HER2 3+ fueron descartadas para el estudio. Los casos 0 y 1+ se consideraron como negativos y se incluyeron si cumplían el resto de criterios del estudio. Los casos 2+ fueron clasificados como equívocos para la expresión de HER2 y se solicitó una técnica de FISH, para confirmar o descartar la positividad. La técnica FISH permite ver la amplificación del gen HER2. Su resultado puede ser positivo (gen HER2 amplificado) o negativo (gen HER2 no amplificado).

- TILs: Se valoró el infiltrado linfocitario estromal. Se cuantificó como una variable continua según las recomendaciones del Grupo de Trabajo Internacional de TILs (288).

- FOXP3 (%): Se valoró el infiltrado linfocitario intratumoral. Se cuantificó como una variable continua.

- IDO1: Se valoró el infiltrado linfocitario intratumoral. Se cuantificó como una variable continua. Además, en IDO1 se utilizó el H-score basado en el porcentaje de células neoplásicas teñidas ( $P_i$ ) y la intensidad de la tinción ( $i$ ), y se calculó de acuerdo con la fórmula  $H\text{-score} = \sum (i \times P_i)$ , donde  $i = 0, 1, 2, 3$  y  $P_i$  varía de 0-100%. Por tanto, el rango de H-score es de 0-300%.

- CD4: Se utilizó para teñir los linfocitos T cooperadores. Se valoró el infiltrado linfocitario intratumoral. Se cuantificó como una variable continua.

- CD8: Se utilizó para teñir los linfocitos T citotóxicos. Se valoró el infiltrado linfocitario intratumoral. Se cuantificó como una variable continua.

- CD163: Se utilizó para teñir los macrófagos M2. Se valoró el tanto el nicho tumoral como en el estroma (como dos variables independientes). Ambas se cuantificaron como variables continuas.

## **12. Extracción de ARN de parafina.**

Tras la valoración del tejido mediante un corte de hematoxilina-eosina, el patólogo marcó la región conteniendo celularidad tumoral y de ella se realizó un cilindro. Ese cilindro tumoral se sometió a la extracción de ARN de parafina.

Se utilizó el kit RNeasy DSP de tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) (QIAGEN). Este kit está diseñado para la purificación de ARN total a partir de FFPE. Debido a las condiciones de fijación del formaldehído los ácidos nucleicos de los tejidos incluidos en FFPE se fragmentan y se modifican químicamente. Por ello, los ácidos nucleicos de las muestras de FFPE suelen tener un peso molecular inferior a las muestras en fresco. La modificación del formaldehído no puede detectarse en controles de calidad habituales como el análisis de laboratorio en un chip o la electroforesis en gel. Sin embargo, el kit RNeasy DSP FFPE se ha adecuado para invertir las modificaciones mediante formaldehído asumiendo una degradación parcial del ARN

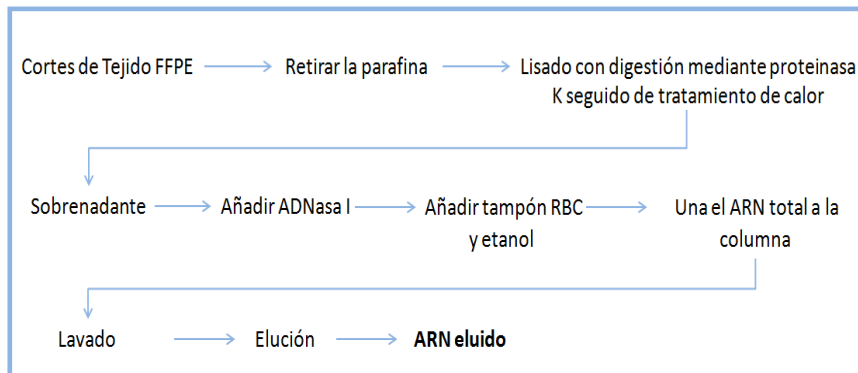
### **12.1. Purificación de ARN a partir de cortes de tejido FFPE (figura 17).**

Se remarcó con punzón la región de la parafina conteniendo tejido tumoral y se cortó a unas 5-20  $\mu\text{m}$  de espesor. Se colocaron los cortes en tubos eppendorf. Luego se añadieron 160  $\mu\text{L}$  de solución de desparafinado, se agitó en un vórtex durante 10 segundos y se centrifugó brevemente (la muestra se depositó en el fondo). Seguidamente, se incubó a 56°C durante 3 minutos y luego se esperó unos 5 minutos a temperatura ambiente para que se enfriaran. Se



añadieron 150  $\mu\text{L}$  de tampón PKD y se mezcló en vórtex durante 3 segundos. Se centrifugó 1 minuto a 11000xg y se añadió 10  $\mu\text{L}$  de proteinasa K a la fase transparente (la que se encuentra más baja) y se mezcló mediante pipeteo (no mezclar fases separadas). Se incubó a 56°C un total de 15 minutos a 1100 rpm y luego a 80°C unos 15 minutos a 1100 rpm (el paso del calentamiento a 80°C es realmente fundamental para la inversión de los entrecruzamientos de formaldehído y para un rendimiento adecuado de extracción del ARN sin excesiva fragmentación). Se centrifugó y transfirió 145  $\mu\text{L}$  de la fase incolora a un tubo eppendorf. Se incubó sobre hielo durante 3 minutos. Posteriormente, se centrifugó durante 15 minutos a 16000xg. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se añadió el tampón de ADNasa (el equivalente a un décimo del volumen total de la muestra) y 10  $\mu\text{L}$  de solución matriz de ADNasa I, se mezcló y centrifugó. Se incubó a 37 °C durante 15 minutos, se añadió 350  $\mu\text{L}$  de tampón RLT conteniendo 0,1% de  $\beta$ -mercaptoetanol por cada 100  $\mu\text{L}$  de muestra, se agitó en el vórtex durante 3 segundos y se centrifugó brevemente. Se añadió 250  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto por cada 100  $\mu\text{L}$  de muestra, se mezcló bien mediante pipeteo, se transfirió 700  $\mu\text{L}$  de la muestra a la columna RNeasy MinElute colocada en un eppendorf y se centrifugó durante 15 segundos a  $\geq 8.000\times g$ . Se eliminó el eppendorf con el fluido residual, se colocó la columna en un nuevo eppendorf y se repitió la centrifugación con el resto de muestra. Se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de tampón RPE a la columna para lavar el ARN retenido en la membrana y se centrifugó 15 segundos a  $\geq 8.000\times g$ . Se eliminó el eppendorf con el fluido residual y se colocó la columna en uno nuevo. Se repitió el lavado, se eliminó el eppendorf con el fluido residual y se colocó la columna en uno nuevo. Se abrió la tapa de la columna y se centrifugó a

máxima velocidad durante 5 minutos (para secar la membrana y eliminar cualquier traza de etanol que impediría la posterior solubilización del ARN), igual que anteriormente se retiró el eppendorf con el fluido. Se colocó la columna en un nuevo tubo, se añadió 15-30  $\mu\text{L}$  de agua sin ARNasas en el centro de la membrana y se centrifugó durante 1 minuto a máxima velocidad. El volumen eluido se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante unas dos semanas. Finalmente, se remitieron las muestras al laboratorio de Genómica para realizar la hibridación de *arrays* de ARN.



**Figura 17. Procedimiento de purificación de ARN de tejido FFPE.**

### **13. Hibridación de *arrays* de ARN de parafina.**

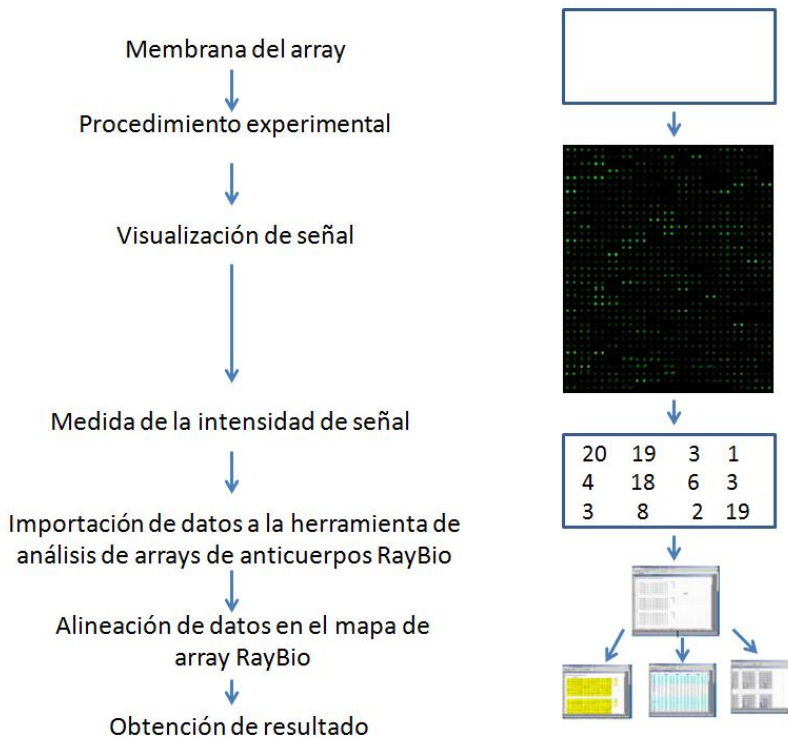
El ARN total aislado de parafina se utilizó para hibridar el kit de Clariom S Pico Assay human (Affymetrix). Esta hibridación, al igual que la de los miARN, se llevó a cabo en la Unidad de Genómica del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, tratando de mantener las normas de calidad de la Organización Internacional de Normalización (ISO), para que los resultados fueran completamente fiables. A partir de la expresión de genes determinada se evaluaron los subtipos de CMTN

de Lehmann de las pacientes de nuestra serie (<http://cbc.mc.vanderbilt.edu/tnbc/>) (114, 115).

Además, a partir de los resultados de estos *arrays* de expresión, se utilizaron 50 genes para la clasificación PAM50 (ACTR3B, ANLN, BAG1, BCL2, BIRC5, BLVRA, CCNB1, CCNE1, CDC20, CDC6, CDCA1, CDH3, CENPF, CEP55, CXXC5, EGFR, HER2, ESR1, EXO1, FGFR4, FOXA1, FOXC1, GPR160, GRB7, KIF2C, KNTC2, KRT14, KRT17, KRT5, MAPT, MDM2, MELK, MIA, MKI67, MLPH, MMP11, MYBL2, MYC, NAT1, ORC6L, PGR, PHGDH, PTTG1, RRM2, SFRP1, SLC39A6, TMEM45B, TYMS, UBE2C, UBE2T). Se perfiló la expresión génica de las pacientes y se aplicó el algoritmo PAM50 como se describe en Parker *et al* (2009) (62). Se utilizó el algoritmo *genefu* de R / Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/genefu.html>) (289) para calcular el subtipo más probable basado en el perfil de expresión de estos 50 genes.

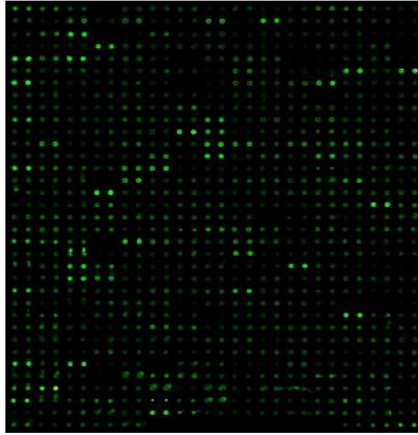
#### **14. Proteómica.**

Se utilizó 150 µL de plasma previamente congelado en el biobanco y se remitió a la plataforma de Ray tebu-Bio. Posteriormente, se hibridaron los *arrays* de anticuerpos serie G RayBio, se visualizó la señal, se midió la intensidad y se importó para su análisis en el programa de análisis de *arrays* de anticuerpos RayBio (figura 18).



**Figura 18. Procedimiento de obtención de datos de proteómica.** Se describen los pasos del proceso de realización de *arrays*, visualización de la señal y posterior lectura de los datos de proteómica.

Este programa se encuentra específicamente diseñado para analizar este tipo de *arrays* de anticuerpos serie G, que se encuentra basado en tecnología Excel. Esta herramienta permite localizar la intensidad de señal del anticuerpo en el mapa de *arrays* (figura 19), realiza una media de la intensidad de señales, un listado de las proteínas identificadas. Ofrece 4 formas diferentes de normalizar los resultados de las muestras y obtiene una comparativa de los niveles de proteínas entre las diferentes muestras.



**Figura 19.** Intensidad de señal del anticuerpo en el mapa de *arrays*.

### **15. Cultivo celular.**

Se trabajó con dos líneas celulares de CMTN, las líneas MDA-MB-453 y MDA-MB-231 con las cuales se realizó los experimentos de cultivo celular. Las líneas son comerciales de *American Type Culture Collection (ATCC)*.

- Línea MDA-MB-231: células de adenocarcinoma de mama metastásico derivadas de derrame pleural de mujer de raza caucásiana de 51 años. Morfología epitelial adherente. Estas células presentan un importante ritmo de crecimiento y rápida propagación, son células mutantes con gran actividad metabólica y capacidad de adaptación. Las células presentaban morfología redondeada, con gran adherencia a las células vecinas y con pocos desmosomas, con una alta relación núcleo-citoplasma. Constituían el paradigma de una célula altamente tumoral y con gran potencial metabólico. Estas células no sobreexpresan

receptores de estrógenos ni progesterona y que pueden crecer sin éstos. Esta línea celular tiene una alta actividad transcripcional tanto para diversos factores de crecimiento como para sus receptores, lo que apunta a que el crecimiento rápido y autónomo que presentan se debe principalmente a mecanismos auto y paracrinos (290, 291).

- Línea MDA-MB-453: células de adenocarcinoma de mama metastásico derivadas de derrame pleural de mujer caucásica de 48 años en 1976. Crecen sueltas en forma de monocapas parecidas al epitelio. Se trata de una línea celular con ausencia de expresión del receptor de estrógenos, pero positividad para la expresión del receptor de andrógenos. Presenta expresión elevada del factor de crecimiento fibroblástico (291).

### **15.1. Medios de cultivo.**

Para las líneas celulares 453 y 231 se utilizó el medio Leibovitz's. El medio fue suplementado con 10% FBS y 1% antibióticos (penicilina/estreptomicina). El medio, el suero y los antibióticos fueron adquiridos de la compañía GIBCO.

### **15.2. Mantenimiento de células.**

Todas las líneas celulares se mantuvieron en sus medios de cultivo correspondientes y se almacenaron en un incubador con atmósfera a 37°C. La manipulación de los cultivos y la preparación de las soluciones se llevaron a cabo en campanas de flujo laminar en condiciones de esterilidad.

### **15.3. Inactivación del Suero Bovino Fetal.**

Se inactivaron las toxinas presentes en el suero bovino fetal incubando el suero a 56°C durante 30 minutos. Una vez inactivado se alicuoteó y se mantuvo en congelador a -20°C hasta su uso.

### **15.4. Tratamiento con Tripsina-EDTA.**

Ambas líneas celulares (453 y 231) se crecieron en monocapa adheridas al frasco de cultivo, en subconfluencia antes de realizar los pases celulares con tripsina-EDTA. La tripsina es una enzima proteolítica que interfiere con las proteínas de superficie que mantienen la células adheridas entre sí y con la superficie del frasco donde crecen. El protocolo consiste en lavar las células con PBS (para eliminar los inhibidores de la tripsina presentes en el suero del medio de cultivo) y cubrirlas con una capa de tripsina-EDTA entre 2 y 3 minutos a 37°C. En cuanto se levantan las células, se neutraliza la tripsina añadiendo medio de cultivo y se centrifuga para recoger el botón celular.

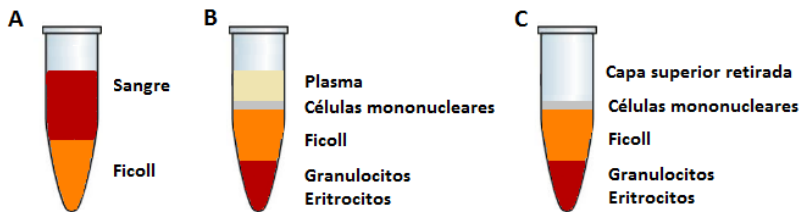
## **16. Co-cultivo con línea de cáncer de mama triple negativo y células inmunosupresoras mieloides primarias.**

Se realizaron varias extracciones de sangre periférica a pacientes con CMTN metastásico. Una vez extraída la sangre se purificaron las células mononucleares mediante centrifugación en gradiente de ficoll, técnica que nos permite separar las células de mayor flotabilidad del resto de células sanguíneas (granulocitos, eritrocitos...).

### **16.1. Realización de ficoll.**

Se utilizó sangre en fresco y la técnica se realizó a temperatura ambiente. En un tubo de centrífuga se añadió el mismo volumen de

sangre y PBS estéril. Se mezcló la sangre con los tampones invirtiendo el tubo varias veces. Para **aislar las células mononucleares** se añadió al tubo de centrifuga donde estaba la mezcla de ficoll, cuidadosamente se creó una capa de sangre diluida encima de la solución de ficoll. En este paso fue clave no mezclar la capa de sangre con la de ficoll (figura 20 A). Posteriormente se centrifugó a 400xg durante 30 minutos a 20°C (se quitó el freno de la centrifuga para evitar que las capas se mezclaran durante la fase de frenado). Se retiró la capa superior que contenía el plasma y las plaquetas con una pipeta estéril, dejando la capa de células mononucleares sin tocar la zona de la interfase conteniendo las células mononucleares (figura 20 B y C). Se transfirió la capa de células mononucleares a un tubo estéril de centrifuga con una pipeta estéril.



**Figura 20. A. Sangre en fresco sobre ficoll. B. Capas tras realizar la separación, donde se observa la capa intermedia de células mononucleares. C. Capas tras retirar el plasma.**

Tras el aislamiento de las células mononucleares se procedió al lavado de las células aisladas. Se estimó el volumen de las células mononucleares transferidas y se añadieron al menos 3 volúmenes de PBS. Se mezcló todo con pipeta y se centrifugó a 400xg durante 15 minutos a 20°C. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió las células



mononucleares en 6 ml de solución salina, se centrifugó a 400xg durante 10 minutos a 20°C y se retiró el sobrenadante.

### **16.2. Realización de tinción de células inmunosupresoras de origen mieloide.**

Tras el aislamiento y preparación de las células mononucleares se procedió a teñirlas como se explica en el apartado de citometría MDSCs.

### **16.3. Separación de las células células inmunosupresoras de origen mieloide mediante *sorter*.**

Tras la caracterización por citometría se aislaron las células MDSCs en tres poblaciones (PMN-MDSCs, e-MDSCs, Mo-MDSCs) mediante *sorter* (FACSARIA-III de Becton Dickinson, San José, CA, USA equipado con cuatro láseres y con posibilidad de trabajar con 14 parámetros, 12 de ellos de fluorescencia, y de separar hasta 4 poblaciones celulares distintas). Cada una de estas poblaciones fue introducida mediante el *sorter* en un tubo estéril con medio de cultivo.

### **16.4. Co-Cultivo línea cáncer de mama triple negativo y células inmunosupresoras de origen mieloide.**

Esas células fueron co-cultivas en canastillos de tamaño de poro pequeño, de 1  $\mu\text{m}$  dispuestos justo encima de las líneas celulares de CMTN (MDA-MB-231 y MDA-MB-453) durante 5 días a diferentes concentraciones.

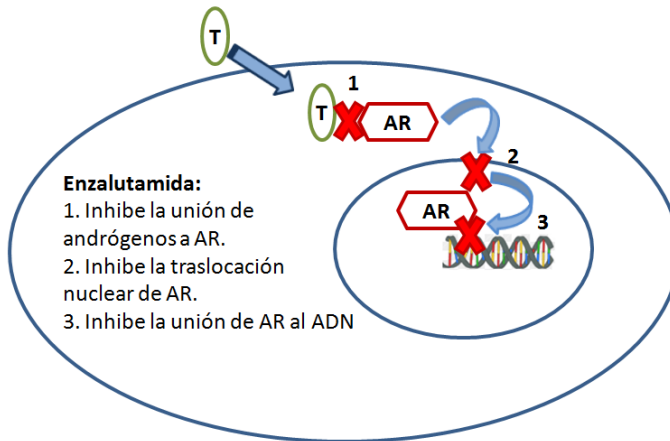
Dada las diferencias en velocidad de crecimiento de ambas líneas se sembraron diferente número de células en cada una. Para la línea MDA-

MB-453, que presenta una tasa menor de crecimiento, se sembraron inicialmente 120000 células y para la MDA-MB-231 se sembraron 60000 células. Las células se sembraron y se dejaron crecer sin co-cultivarlas durante 3 días para facilitar su aclimatación. Tras realizar el co-cultivo se dejaron crecer durante 5 días adicionales. Seguidamente se procedió a la extracción de ARN de la línea celular y se procedió a la amplificación y posterior hibridación de los *arrays*. Se utilizó el kit de Clariom S pico (affimetrix) y se siguió el protocolo estándar de la marca.

### **17. Cultivo celular con fármacos.**

Se trabajó con las dos líneas celulares de CMTN, la línea MDA-MB-453 y MDA-MB -231, descritas previamente, a las que se les añadió dos tipos de tratamientos a diferentes concentraciones:

- Enzalutamida: se trata de un inhibidor de la señalización del receptor de andrógenos que bloquea varios pasos en la vía de señalización de este receptor. Por un lado inhibe la translocación nuclear de los receptores activados y por otro inhibe la unión del receptor activado al ADN.



**Figura 21. Mecanismos de acción de la enzalutamida. AR: receptor de andrógenos. T: Testosterona.**

- Montelukast: es un antagonista del receptor de leucotrienos, disminuyendo los efectos del asma como: broncoconstricción, secreción mucosa, permeabilidad vascular y acumulación de eosinófilos. Además es un inhibidor de ABCC11, un miembro de los transportadores multidroga que especulamos que podría colaborar con la resistencia a la enzalutamida.

### 18. Análisis estadístico.

Los datos se resumieron mediante la media (desviación típica) y la mediana (primer y tercer cuartil) en el caso de variables continuas y mediante frecuencias relativas y absolutas en el caso de variables categóricas. La asociación de las diferentes variables con la respuesta al tratamiento se contrastó mediante modelos de regresión ordinal. Los datos de miRNA se analizaron mediante regresión logística con penalización *elastic net* (292). Los p-valores inferiores a 0.05 se

consideraron estadísticamente significativos. Todos los análisis se realizaron mediante el programa R (versión 3.5.0) y los paquetes de *R glmnet* (versión 2.0-16), *BootValidation* (versión 0.1.5) y *ordinal* (versión 2018.4-19). Todo el análisis se llevó a cabo con ayuda de la Unidad de Bioestadística del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe.

### **19. Análisis funcional de miARN.**

Se realizó junto con la Unidad de Genómica del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe. Se utilizaron los miARN más significativos para obtener un listado de supuestos genes diana, estimando una puntuación en cada uno como se describe en García-García F *et al* (293) y aplicando en el conjunto de genes un análisis enriquecido (gene set enrichment analysis (GSEA)) (294) basado en la puntuación previamente calculada y el número de genes que participa en cada proceso biológico, funciones moleculares y componentes celulares afectados de acuerdo a la Ontología de Genes (Gene Ontology (GO), <http://www.geneontology.org/>) (295-298)

### **20. Página web.**

Se diseñó una plataforma digital que permite obtener los resultados de metabolómica de forma rápida y sencilla. Con ayuda de un informático se diseñó un tipo de plataforma digital utilizando tecnología web, basándose en un Lenguaje de Formato de Documentos para Hipertexto versión 5 (HyperText Markup Language (HTML5)), Hojas de Estilo en Cascada versión 3 (Cascading Style Sheets (CSS3)) y programación en Preprocesador de Hipertexto (Hypertext Preprocessor (PHP)) que permite obtener resultados desde cualquier ordenador conectado a internet mediante una página web.

## **21. Aspectos éticos.**

Para la inclusión en el estudio y la obtención de muestras de sangre y tejido se informó a cada paciente sobre la finalidad del estudio, riesgos y beneficios del mismo. Las pacientes firmaron un consentimiento informado (modelo oficial del Hospital Universitari i Politècnic La Fe para la inclusión de muestras biológicas en el biobanco) antes de su inclusión para los posteriores análisis moleculares. Además, se adjuntó un consentimiento específico del estudio. Se explicó a las pacientes el carácter voluntario del estudio y sobre el rechazar su participación o retirar su consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni produzca perjuicio alguno en su tratamiento. Los datos recogidos para el estudio están identificados mediante un código y sólo el médico del estudio y colaboradores pueden relacionar dichos datos con el de los pacientes y con las historias clínicas.

En la realización del estudio se ha respetado los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki (299). El estudio se ha presentado en el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe/Hospital Universitario y Politècnic La Fe y fue aprobado previo al inicio del estudio.





## 4. RESULTADOS

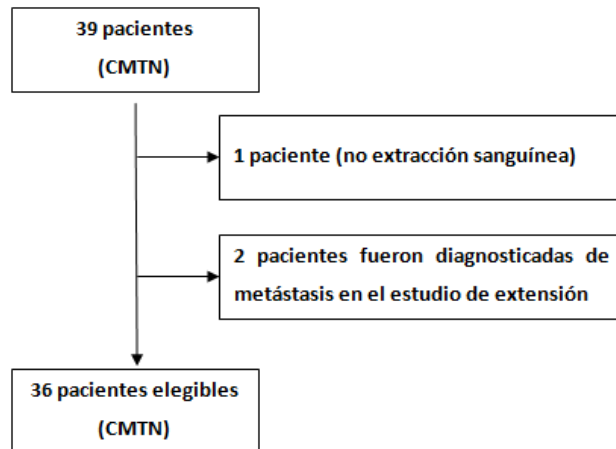




## 4. RESULTADOS

### 1. Características de las pacientes.

Entre noviembre de 2016 y noviembre de 2017, se analizó el estado inmunohistoquímico en 200 pacientes con cáncer de mama diagnosticadas en la Unidad Funcional de Patología Mamaria del Hospital Universitari i Politènic La Fe (Valencia). Treinta y nueve pacientes (39/200; 19.5%) fueron diagnosticadas de cáncer de mama triple negativo por inmunohistoquímica y 36 de ellas cumplieron los criterios de inclusión del estudio (figura 22).



**Figura 22. Algoritmo de selección de pacientes.**

La mediana de edad de las pacientes fue de 47,2 años (rango 27-75 años). Las características clínicas y patológicas de las 36 pacientes elegibles se resumen en la tabla 1. Todas las pacientes recibieron el mismo esquema de QT (cuatro ciclos de antraciclinas y ciclofosfamida seguidos por paclitaxel con o sin carboplatino (7/27), con las dosis descritas en el apartado de material y métodos). La QT no fue

completada por cuatro de las pacientes (11%), tres de ellas debido a progresión del tumor y una de ellas debido a neurotoxicidad. La cirugía local se realizó en todas las pacientes (100%) y la radioterapia se aplicó en 28 de ellas (82,4%). Las características patológicas del tumor se resumen en la tabla 1. La mediana del seguimiento fue de 13,5 meses (rango, 3-50 meses). En el momento del análisis, 5 pacientes (14%) habían recaído y 3 pacientes (8.3%) habían muerto.

**Tabla 11. Características clínico-patológicas de las pacientes.**

<b>Variables</b>	<b>N (%)</b>
<b>Pacientes incluidas</b>	36 (100)
<b>Sexo</b>	
- Hombre	0 (0)
- Mujer	36 (100)
<b>Edad (años)</b>	
Mediana (rango)	47.2 (27-75)
<b>Fumador</b>	
- Sí	7 (19,4)
- No	29 (80,5)
<b>Diabetes Mellitus</b>	
- Sí	2 (5,5)
- No	34 (94,4)
<b>Hipertensión arterial</b>	
- Sí	5 (13,8)
- No	31 (86,11)
<b>Dislipemia</b>	
- Sí	3 (8,3)
- No	33 (91,7)
<b>Tamaño previo a la QTNA (T)</b>	
- cT1	9 (25)
- cT2	22 (61,1)
- cT3	1 (2,7)
- cT4	4 (11,1)
<b>Afectación ganglionar previo a al QTNA (N)</b>	
- cN0	18 (50)

- cN1	9 (25)
- cN2	7 (19,4)
- cN3	2 (5,5)
<b>Linfadenectomía</b>	
- Sí	22 (61,1)
- No	14 (38,8)
<b>Respuesta en la mama según <i>Miller y Payne</i></b>	
- Grado 1	7 (19,4)
- Grado 2	6 (16,6)
- Grado 3	7 (19,4)
- Grado 4	3 (8,3)
- Grado 5	13 (36,1)
<b>Respuesta en la axila según <i>Miller y Payne</i></b>	
- Respuesta A	15 (41,6)
- Respuesta B	2 (5,5)
- Respuesta C	8 (22,2)
- Respuesta D	11 (30,5)
<b>Tamaño tras la QTNA (T)</b>	
- pT0	13 (36,1)
- pT1	8 (22,2)
- pT2	12 (33,3)
- pT3	2 (5,5)
- pT4	1 (2,7)
<b>Afectación ganglionar tras la QTNA (N)</b>	
- pN0	25 (69,4)
- pN1	6 (16,6)
- pN2	3 (8,3)
- pN3	2 (5,5)

Resp: respuesta, N: número de pacientes, QTNA: quimioterapia neoadyuvante, T: tamaño, N: ganglios; p: patológico, c: clínico

## 2. Valoración de la respuesta.

Todas las pacientes del estudio fueron intervenidas entre 4 y 6 semanas tras la QT neoadyuvante. La valoración de la respuesta se realizó según la clasificación de *Miller & Payne* (170). Con la intención de clarificar y simplificar el análisis estadístico y los resultados se tuvo en cuenta de

forma conjunta la respuesta en mama y en axila. La peor respuesta de ambos fue seleccionada como la respuesta global del paciente. Los grupos fueron clasificados en respuesta 1, 2, 3, 4 y 5 (siendo 1 la peor respuesta y 5 respuesta completa tanto en mama como en axila). Las características clínico-patológicas y la distribución de los grupos se encuentran descritas en la tabla 12. La figura 23 muestra la variación del índice de proliferación antes y después de la QT según el grado de respuesta observado, revelando que la respuesta 5 siempre coincidió con una importante disminución del índice proliferativo mientras que en la respuesta hubo poca variación. La tabla 12 revela que los grupos se encuentran bien balanceados y representados, salvo el grupo 4 que es el menos representado de todos ellos, probablemente dado lo estricto que se fue en la selección de la respuesta.

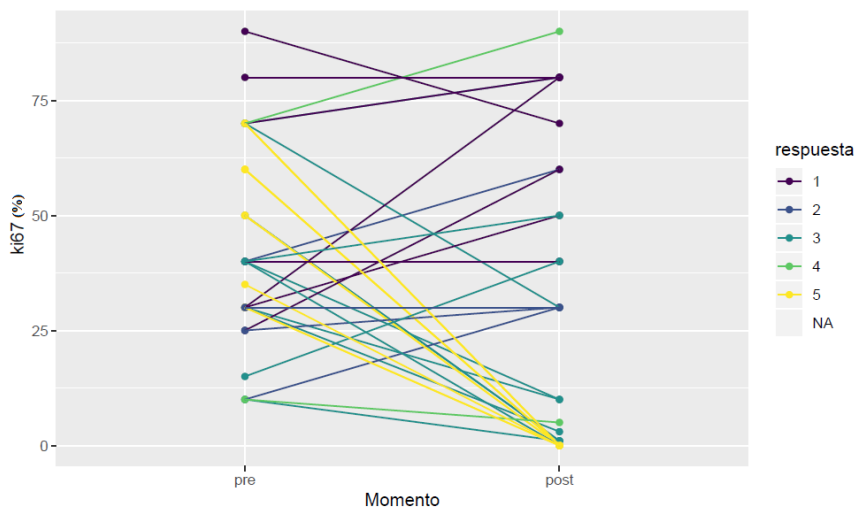
**Tabla 12. Características clínico-patológicas y la distribución de los grupos en función de la respuesta global.**

<b>Variables</b>	<b>Resp. 1</b>	<b>Resp. 2</b>	<b>Resp. 3</b>	<b>Resp. 4</b>	<b>Resp. 5</b>
<b>N</b>	7	6	10	2	11
<b>Edad (media)</b>	43,7	59,01	49,8	41,2	51,4
<b>Fumadora</b>					
- Sí	2	0	3	0	2
- No	5	6	7	2	9
<b>Diabetes Mellitus</b>					
- Sí	0	0	0	0	2
- No	7	6	10	2	9
<b>HTA</b>					
- Sí	0	2	1	0	2
- No	7	4	9	2	9
<b>Dislipemia</b>					
- Sí	0	1	1	0	2
- No	7	5	9	2	9

<b>Estatus menopáusico</b>					
- Premenopáusico	4	1	3	1	5
- Perimenopáusico	1	1	2	1	2
- Postmenopáusico	2	4	5	0	4
<b>Tamaño previo a la QTNA (T)</b>					
- T1	1	0	2	0	6
- T2	5	4	6	2	5
- T3	0	1	0	0	0
- T4	1	1	2	0	0
<b>Afectación ganglionar previo a la QTNA (N)</b>					
- N0	4	4	4	1	5
- N1	1	1	3	0	4
- N2	2	1	2	1	1
- N3	0	0	1	0	1
<b>Respuesta en la mama según Miller y Payne</b>					
- Grado 1	7	0	0	0	0
- Grado 2	0	6	0	0	0
- Grado 3	0	0	7	0	0
- Grado 4	0	0	1	2	0
- Grado 5	0	0	2	0	11
<b>Respuesta en la axila según Miller y Payne</b>					
- Respuesta A	3	4	3	1	4
- Respuesta B	2	0	0	0	0
- Respuesta C	2	1	5	0	0
- Respuesta D	0	1	2	1	7
<b>Tamaño tras la QTNA (T)</b>					
- T0	0	0	2	0	11
- T1	1	1	4	2	0
- T2	5	5	2	0	0
- T3	0	0	2	0	0
- T4	1	0	0	0	0

<b>Afectación ganglionar tras la QTNA (N)</b>					
- pN0	3	5	4	2	11
- pN1	2	1	3	0	0
- pN2	1	0	2	0	0
- pN3	1	0	1	0	0
<b>Seguimiento de seguimiento</b>					
- Viva sin enf.	2	5	8	2	11
- Viva con enf.	4	1	0	0	0
- Exitus por enf.	1	0	2	0	0
- Pérdida	0	0	0	0	0

Resp: respuesta, N: número de pacientes, QTNA: quimioterapia neoadyuvante, HTA: hipertensión arterial, T: tamaño, N: ganglios; p: patológico, c: clínico, enf: enfermedad.



**Figura 23. Variaciones de la expresión de Ki67 antes y después de QT según la categoría de respuesta. Pre: previo a la QT, Post: posterior a la QT.**

### **3. Comparación del perfil de expresión de micro-ARN en exosomas en función de la respuesta.**

Los exosomas son vesículas que pueden transportar información entre las células, incluidas las tumorales. Estas vesículas pueden contener miARN que pueden alterar el microambiente tumoral favoreciendo su crecimiento y desarrollo. Para identificar biomarcadores que se correlacionen con escasa respuesta a la QT neoadyuvante se realizó un cribado de alto rendimiento de miARN en exosomas extraídos de plasma de las pacientes previo al inicio de la QT neoadyuvante. En un primer momento se seleccionaron grupos extremos. Se analizaron 7 pacientes con respuesta 1 (ausencia de respuesta a la QT neoadyuvante) y otras 7 pacientes con respuesta 5 (respuesta completa en mama y axila a la QT neoadyuvante). Esto se hizo tratando de encontrar las máximas diferencias entre ambos grupos. Para la detección de los miARN en exosomas se utilizó el exoRNeasy Serum/Plasma kits (Qiagen) que está diseñado para una rápida purificación del ARN total de las vesículas. Estos kits utilizan una membrana que presenta una especial afinidad para aislar los exosomas. Para obtener el perfil de expresión de miARN y otros ARN no codificantes las muestras de ARN aisladas se analizaron con los *arrays* comerciales miARN 3.0.

Se utilizó *elastic net* como modelo de regresión logística con penalización para la selección de las variables más importantes que predijeran la respuesta al tratamiento. Este modelo reduce a cero los coeficientes de las variables no relacionadas con la respuesta. Las variables seleccionadas por el modelo de *elastic net* se representaron en un mapa de calor (figura 24), que representa los valores *z-score* de las variables seleccionadas para cada paciente. Cuando se comparó los

miARN en exosomas entre los pacientes con respuesta 1 (no respuesta) y respuesta 5 (respuesta completa) se encontraron 7 miARN que mostraron una expresión diferencial (figura 24).

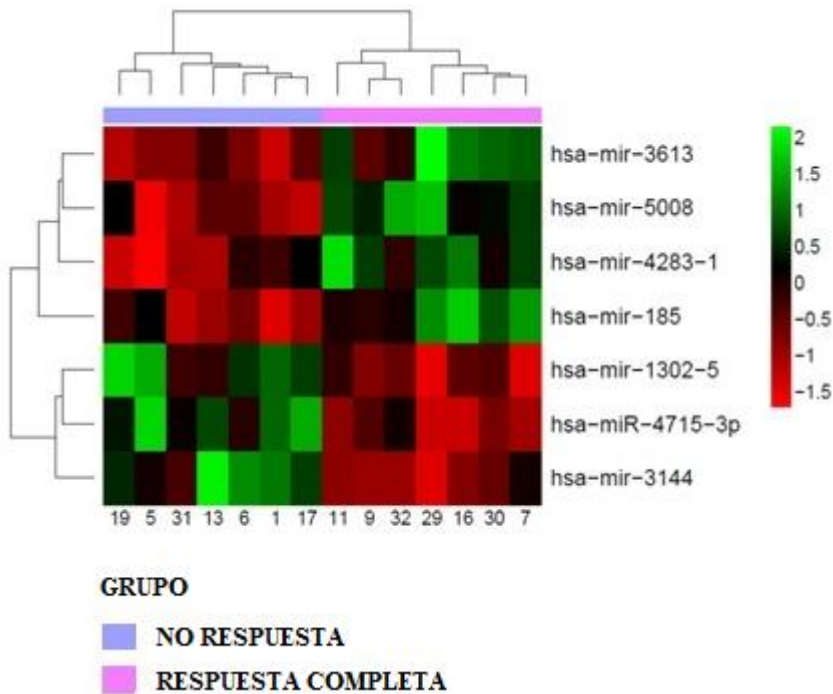


Figura 24. Perfil de expresión de miARN en exosomas de pacientes con cáncer de mama local o localmente avanzado en función del grado de respuesta 1 o 5.

Las pacientes que no presentaron respuesta tenían pobre expresión de mir-185, mir-4283, mir-5008 y mir-3613 respecto a las que presentaron respuesta patológicamente completa. Por el contrario, la mayor expresión de mir-1302, mir-4715 y mir-3144 se detectó en las pacientes sin respuesta (figura 25).



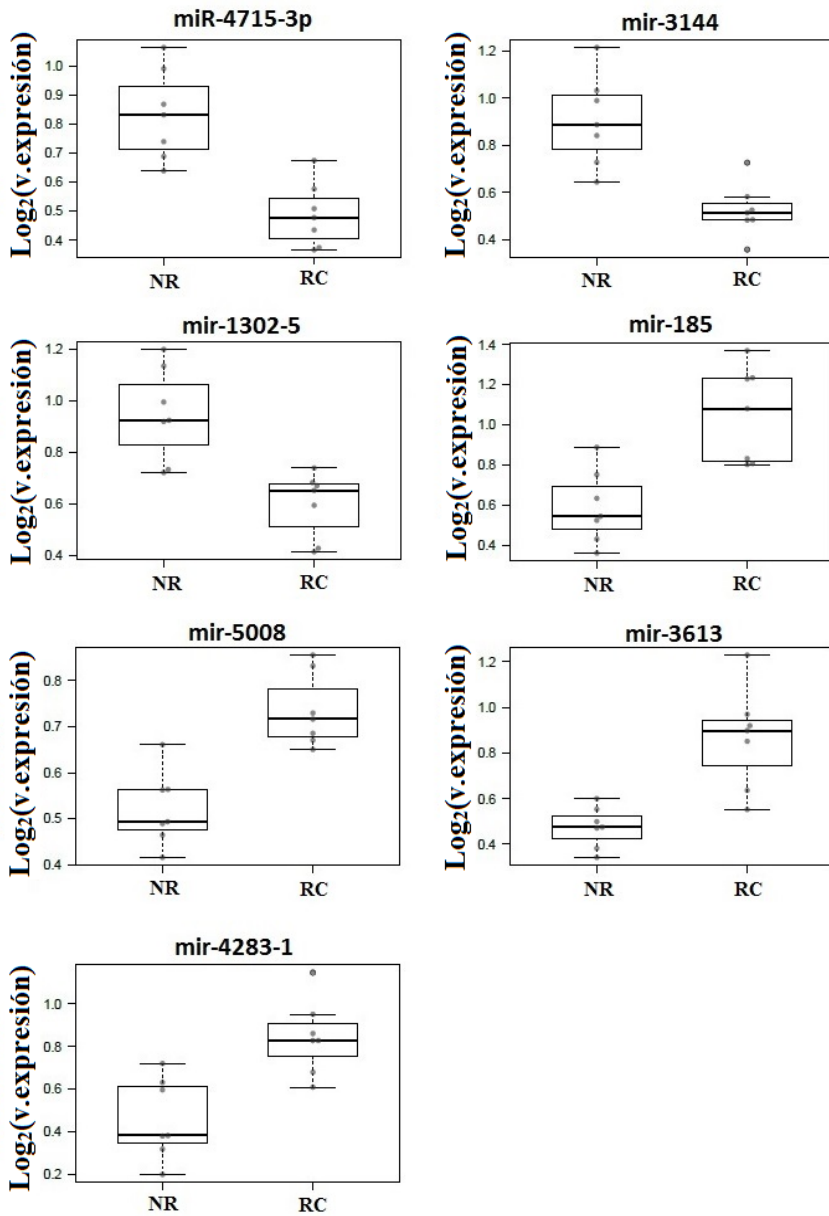


Figura 25. Niveles de miARN en exosomas entre los pacientes sin respuesta y los pacientes con respuesta completa. NR: no respuesta, RC: respuesta completa; v: valor.

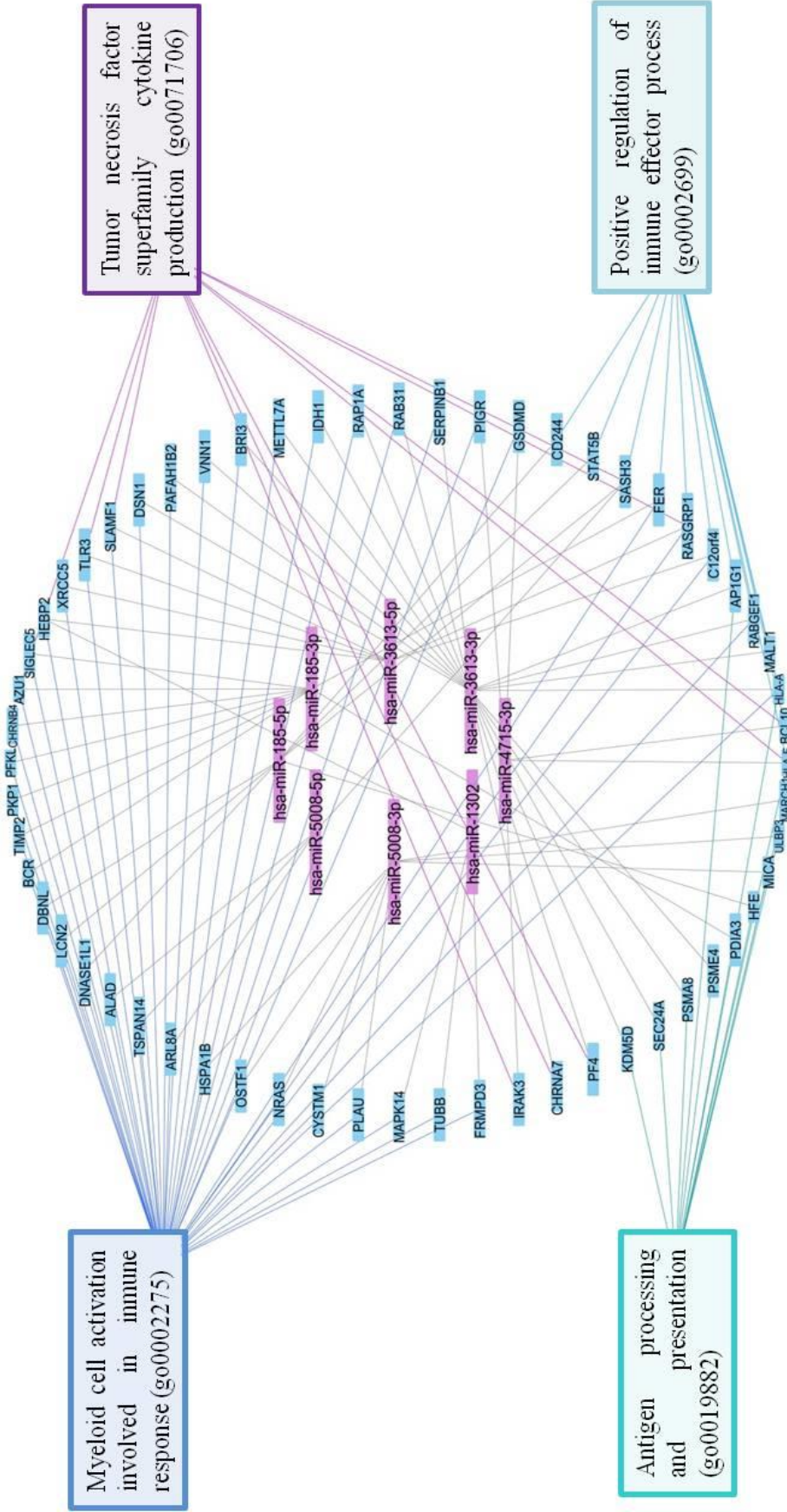
Múltiples estudios han mostrado que los miARN en exosomas se liberan de las células tumorales a la circulación y pueden ser excelentes biomarcadores en estadios tempranos (300).

Posteriormente se realizó un análisis de expresión diferencial incluyendo el resto de pacientes con respuestas intermedias. Se identificaron un total de 40 miARN con una  $p < 0.01$  (anexo 1, tabla 1), incluyendo los identificados en el análisis anterior de grupos extremos, que eran capaces de segregar la respuesta según sus niveles de expresión. Con todos ellos se inició un análisis de interacciones de ARNm codificante con los miARN que habían demostrado ser más significativos. Se realizó un análisis funcional obteniendo los procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares afectados según Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>) (297). Tras realizar la selección inicial y posteriormente eliminar los procesos redundantes, se utilizaron los miARN seleccionados para valorar tanto los procesos funcionales implicados (tabla 13) como los genes involucrados en esta vía (figura 26).

Tabla 13. Micro-ARN seleccionados y procesos a los que afectan.

miARN	Proceso involucrado
hsa-miR-3613-3p hsa-miR-3613-5p hsa-miR-4715-3p hsa-miR-185-5p hsa-miR-185-3p hsa-miR-5008-5p	Regulación positiva del proceso efector inmune.
hsa-miR-3613-3p hsa-miR-3613-5p hsa-miR-4715-3p hsa-miR-185-5p hsa-miR-185-3p hsa-miR-5008-5p	Producción de citoquinas de la superfamilia del factor de necrosis tumoral.
hsa-miR-1302 hsa-miR-3613-3p hsa-miR-3613-5p hsa-miR-4715-3p hsa-miR-185-3p hsa-miR-185-5p hsa-miR-5008-3p hsa-miR-5008-5p	Activación de las células mieloides involucradas en la respuesta inmune.
hsa-miR-3613-3p hsa-miR-4715-3p hsa-miR-185-3p hsa-miR-185-5p hsa-miR-5008-3p	Presentación y procesamiento de antígenos.

**Figura 26. Mapa de interacción.** MiARNs maduros prediciendo la respuesta a la QT neoadyuvante conectados con sus genes diana y sus vías específicas.



De este estudio funcional de miARN se observó que las cuatro vías se encontraban relacionadas con la activación inmune, inmunosupresión o respuesta inmune (figura 26). Estos resultados sugieren que defectos en el sistema inmune pueden estar implicados en la patogénesis del CMTN.

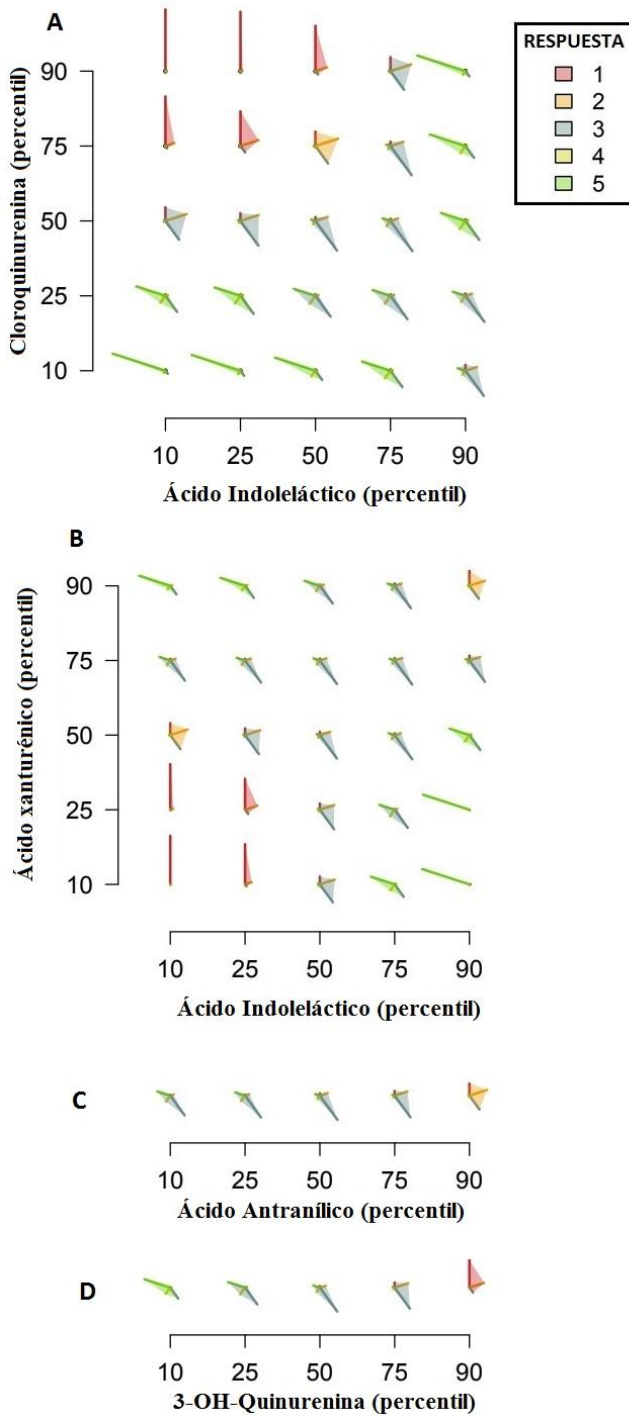
#### **4. Metabolómica.**

En base a los hallazgos obtenidos con los miARN expresados diferencialmente en exosomas de respuestas 1 y 5 y que predecían una regulación de 4 vías relacionadas con la inmunidad, decidimos iniciar un estudio metabolómico dirigido a la vía del triptófano y de sus catabolitos incluyendo la quinurenina. Esta vía se ha estudiado en cáncer y se ha observado que la quinurenina tiene efectos paracrinos supresores en las células inmunitarias (241). En nuestro estudio se trató de identificar metabolitos que fueran capaces de discriminar entre los grupos de respuesta (entre pacientes que respondían al tratamiento y aquellas que no lo hacían).

Para ello, se realizó un análisis metabolómico UPLC-ESI-MS/MS dirigido a la vía del triptófano en plasmas de pacientes al diagnóstico. Para el análisis se seleccionaron 20 metabolitos que presentaban una concentración superior al límite de cuantificación (concentración > 4 nM).

Mediante el algoritmo *elastic net* aplicado a una regresión ordinal se seleccionaron 5 metabolitos cuyos niveles predecían la respuesta a la QT neoadyuvante (figura 27). A partir de estos 5 metabolitos y teniendo en cuenta las rutas bioquímicas involucradas, se elaboró una regresión ordinal modelizando, no solo las relaciones de cada uno de estos

compuestos con la respuesta, sino también las posibles interacciones entre ellos. Mediante este modelo establecíamos una asociación entre las variables ácido indolelático, ácido xanturénico, antranílico, quinurenina y cloroquinurenina con el grado de respuesta al tratamiento. Además, se encontró evidencia de que los efectos de ácido indolelático y cloroquinurenina no son aditivos, ya que existe una interacción entre ambos compuestos (figura 27A). Del mismo modo, también se encontró una interacción entre ácido indolelático y ácido xanturénico (figura 27B). Estos resultados de metabolómica nos permitieron desarrollar un algoritmo que permite predecir el grado de respuesta al tratamiento de las pacientes en base a los niveles en plasma de estos 5 metabolitos (figura 27).



**Figura 27. Distribución de probabilidad de respuesta a la QT neoadyuvante en función del nivel de 5 metabolitos en plasma.** Las predicciones del modelo de regresión ordinal bayesiano se generan para diferentes valores de los predictores. Para facilitar su interpretación, se ha representado la predicción para los percentiles 10, 25, 50, 75 y 90 de cada variable. Las cinco probabilidades están representadas en estrellas de cinco puntas, siendo el largo de cada punta proporcional a la probabilidad de cada respuesta. La respuesta más plausible para cada predicción determina la sombra de color de la estrella de acuerdo con la leyenda que se muestra a la derecha de la imagen. En A y B se encuentran representadas las interacciones de la cloroquinurenina frente al ácido indoleláctico y del ácido xanturenico frente al ácido indoleláctico, respectivamente. En C y D están representadas el ácido antranílico y la 3-OH-quinurenina, respectivamente.

La capacidad predictiva del modelo fue evaluada mediante su curva ROC, siendo su valor aparente de 0.88. A su vez, se realizó una validación interna del modelo mediante 1000 iteraciones *bootstrap* obteniendo un AUC validado de 0.81.

Para facilitar el uso del modelo se desarrolló una calculadora online donde únicamente es necesario añadir los valores de los cinco metabolitos, con ello la aplicación facilita la probabilidad de cada respuesta. La calculadora se encuentra en la siguiente dirección web: <http://ific.uv.es/~dacaldia/index.php>.

Estos resultados sugieren que la degradación del triptófano a través de vía de la quinurenina *versus* la producción de ácido indoleláctico es relevante para predecir la respuesta a la QT neoadyuvante. Puesto que las enzimas de IDO son esenciales en el primer paso limitante de la



degradación del triptófano a través de la vía de la quinurenina, una posibilidad es que IDO1 se encuentre sobreexpresado en los tumores menos respondedores al tratamiento y, por ello, cause un flujo desequilibrado del triptófano hacia los derivados de la quinurenina (cloroquinurenina o ácido xanturénico) *versus* hacia el ácido indoleláctico.

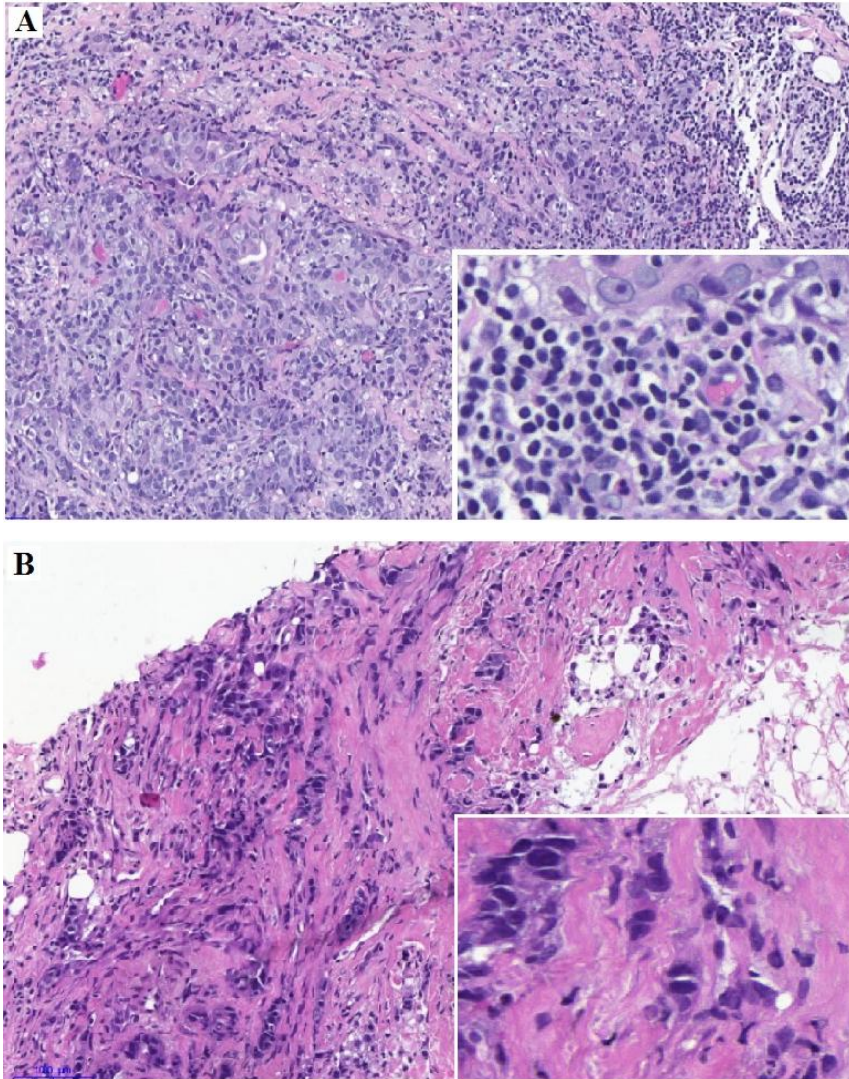
## **5. Tinciones sobre tejido.**

Durante el proceso de diagnóstico, previo al inicio del tratamiento, se extrajo de las pacientes biopsia de tejido sobre la que se realizó el diagnóstico histopatológico habitual (hematoxilina-eosina, receptores de estrógenos y progesterona, HER2 y Ki67). Si el patólogo confirmaba el diagnóstico de CMTN, se procedía a la inclusión de la paciente en el estudio y a la realización de varios cortes que posteriormente se tiñeron inmunohistoquímicamente para los antígenos de interés en este estudio. Dado los resultados estudiados en los miARN y en los metabolitos, se propuso valorar no sólo los TILs sino también su composición (CD4, CD8, CD163, FOXP3, IDO1).

### **5.1. Tinción de TILs.**

Se valoró el infiltrado linfocitario estromal, como se muestra en la figura 28. Se cuantificó como una variable continua según las recomendaciones del Grupo de Trabajo Internacional de TILs (288). La cuantificación de los TILs se realizó en todas las pacientes. La mediana de expresión de TILs fue del 5% (rango entre 1-90%). La distribución fue la siguiente: 15 pacientes (41,6%) presentaban TILs del 1%, 7 pacientes (19,4%) fueron valorados como TILs de 5%, 6 pacientes (16,6%) los TILs fueron entre 10-20%, 3 pacientes (8,3%) entre 40-

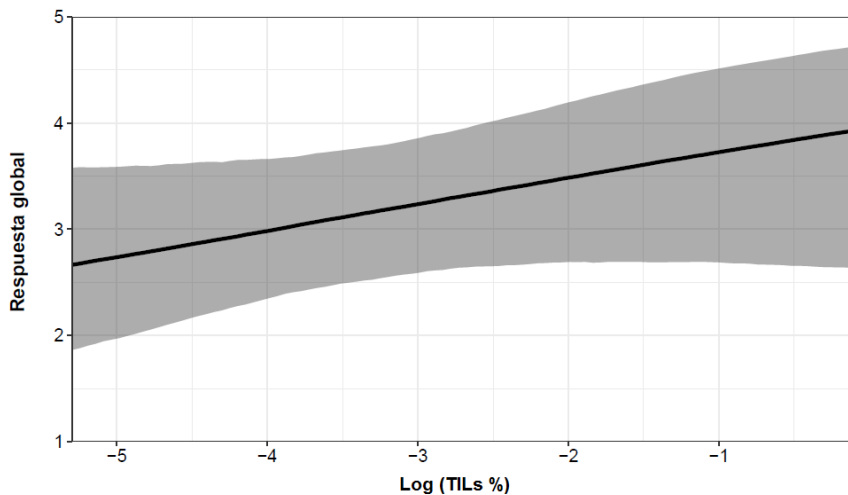
50%, 2 pacientes (5,5%) un 60%, 2 pacientes (5,5%) un 80% y 1 paciente (2,7%) un 90% de TILs.



**Figura 28. Infiltrado linfocitario estromal. A.** Paciente con infiltrado linfocitario estromal del 80%. **B.** Paciente con infiltrado linfocitario estromal

del 1%. Las imágenes se encuentran a 10x, mientras que el aumento de los cuadros más pequeños se encuentran a 40x.

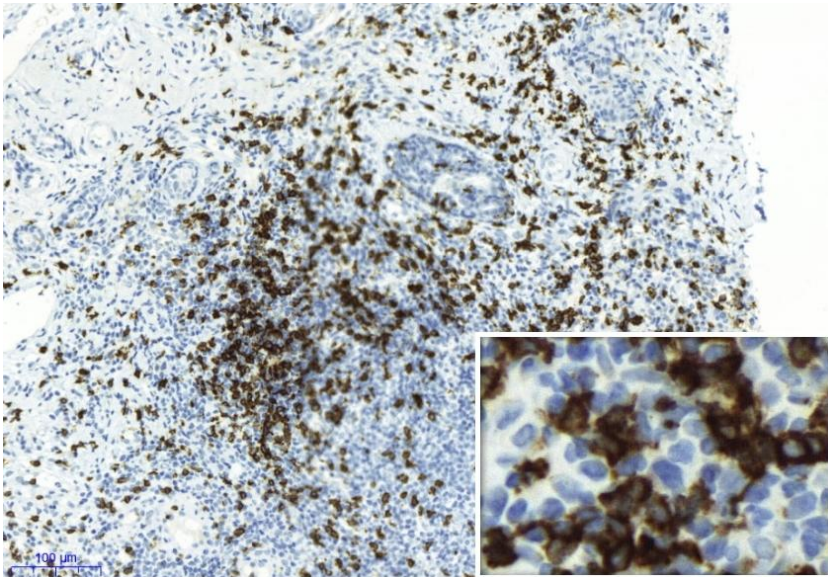
Se contrastó la asociación de los TILs con la respuesta de las pacientes a la QT neoadyuvante mediante una regresión ordinal, todo ello ajustado por número de ganglios afectados y tamaño tumoral. Encontrando un efecto positivo (mayor grado de respuesta tumoral a mayor TILs) aunque no estadísticamente significativo (OR = 1.34, IC 95% [0.87, 2.08]), como se muestra en la figura 29. Es muy posible que con un tamaño muestral mayor hubiésemos obtenido un efecto estadísticamente significativo.



**Figura 29. Relación del infiltrado linfocitario con la respuesta a la QT neoadyuvante.** El gráfico nos muestra cómo a mayor infiltrado linfocitario las pacientes presentan mayor respuesta al tratamiento. La zona marcada en gris es el intervalo de confianza del 95%.

## **5.2. Tinciones de CD4 y CD8.**

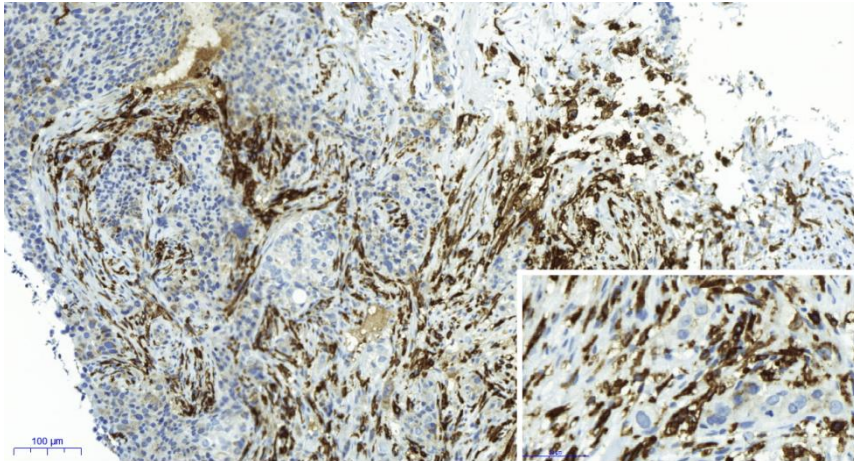
La cuantificación de CD4 y CD8 se realizó en todas las pacientes. Se valoró el infiltrado linfocitario intratumoral y se cuantificó como una variable continua (figura 30). La mediana de expresión de CD4 fue del 1% (rango entre 0-50%). La distribución fue la siguiente:  $\leq 1\%$  en 26 pacientes (72,2%), 5-10% en 6 pacientes (16,6%), 15-30% en 3 pacientes (8,3%) y 50% en 1 paciente (2,7%).



**Figura 30. Tinción de CD4 con infiltración sobre el 50%.** La imagen grande tiene una magnificación de 10x, mientras que el aumento de la imagen incluida es de 40x.

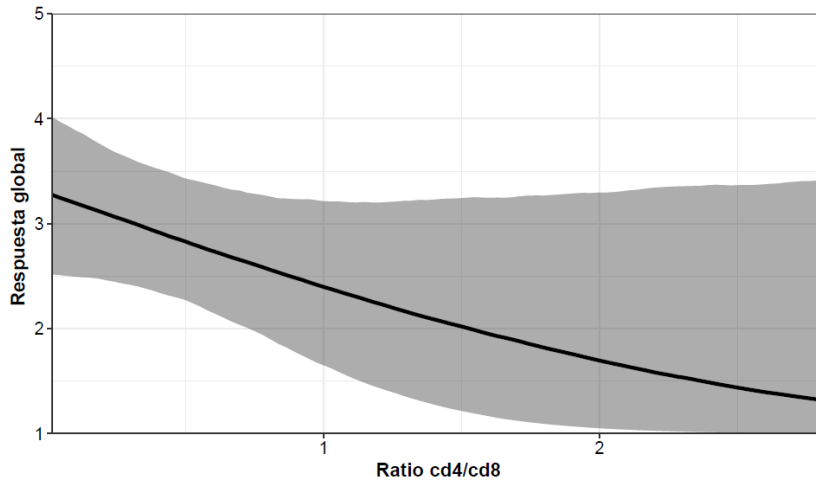
La mediana de expresión de CD8 fue del 5% (rango entre 0-70%). La distribución fue la siguiente:  $\leq 1\%$  en 6 pacientes (16,6%),  $\leq 5\%$  en 7 pacientes (19,4%), 10-25% en 13 pacientes (36,1%), entre 30-40% en 7

pacientes (19,4%), y entre 55-70% en 3 pacientes (8,3%). Un ejemplo de ello se encuentra en la figura 31.



**Figura 31. Tinción de CD8 con infiltración sobre el 60%.** La imagen grande tiene una magnificación de 10x, mientras que la imagen incluida se encuentra a 40x.

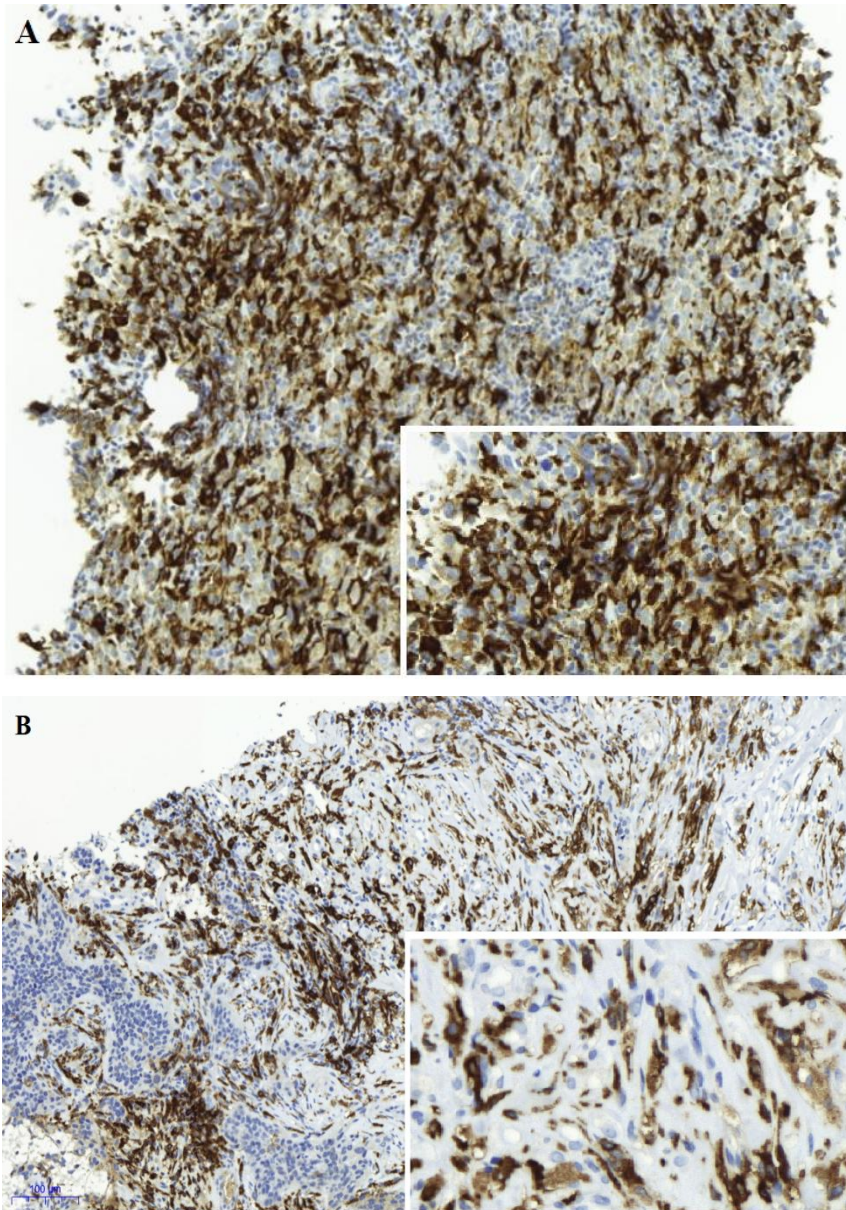
Se contrastó la asociación de CD4 y CD8 con la respuesta de las pacientes a la QT neoadyuvante mediante una regresión ordinal, todo ello ajustado por número de ganglios afectados y tamaño tumoral. No se encontró asociación estadísticamente significativa entre CD4 (OR = 1.06, IC 95% [0.9, 1.17]) ni CD8 (OR = 1.03, IC 95% [0.9, 1.08]) con el grado de respuesta tumoral. Sin embargo, al contrastar la proporción CD4/CD8 con la respuesta tumoral se observó (OR = 0.2, IC 95% [0.04, 1.3]) un efecto negativo (mayor grado de respuesta tumoral a menor proporción CD4/CD8) aunque no estadísticamente significativo (figura 32). Es posible que con un tamaño muestral mayor hubiésemos obtenido un efecto estadísticamente significativo.



**Figura 32. Grado de respuesta a la QT neoadyuvante en función de la ratio CD4/CD8.** Se observa que a más proporción CD4/CD8 las pacientes presentan peor respuesta al tratamiento. La zona gris nos indica el intervalo de confianza del 95%.

### 5.3. Tinción de CD163.

Se realizó la tinción de CD163 para caracterizar la infiltración de los macrófagos M2, tanto en el nicho tumoral como en su entorno (figura 33). Ambas se cuantificaron como variables continuas. La cuantificación de CD163 se realizó en todas las pacientes.



**Figura 33. Tinciones de CD163.** A. Tinción en nicho tumoral (90%). B. Tinción en estroma (50%). Las imágenes grandes se encuentran a 10x, mientras que la magnificación de las imágenes pequeñas incluidas son de 40x.

La mediana de expresión de CD163 en nicho fue del 1% (rango entre 0-90%), mientras que en el estroma fue del 30% (rango entre 1-80%). La distribución en de CD163 tanto en el nicho tumoral como en el estroma se encuentra en la tabla 14.

**Tabla 14. Distribución de CD163 tanto en el nicho tumoral como en estroma.**

Infiltrado (%)	0-5%	10-20%	30-40%	50-60%	80-90%
<b>CD163 nicho</b>	18 p (50%)	8 p (22,2%)	4 p (11,1%)	4 p (11,1%)	2 p (5,5%)
<b>CD163 estroma</b>	4 p (11,1%)	6 p (16,6%)	12 p (33,3%)	9 p (25%)	5 p (13,8%)

p: pacientes.

Se contrastó la asociación de CD163 estromal y CD163 en nicho con la respuesta de las pacientes a la QT neoadyuvante mediante una regresión ordinal, todo ello ajustado por número de ganglios afectados y tamaño tumoral. No se encontró asociación estadísticamente significativa entre CD163 estromal (OR = 1,91, IC 95% [0,88, 4,51]) ni CD163 en nicho (OR = 1,1, IC 95% [0,73, 1,67]) con el grado de respuesta tumoral.

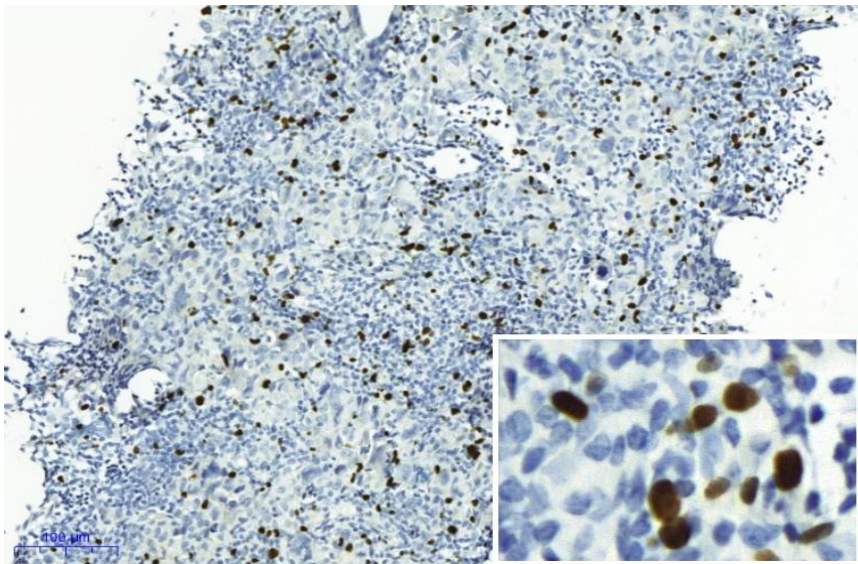
Sin embargo, se observó que la expresión de FOXP3 se asociaba con el aumento de expresión de CD163 en el nicho tumoral (OR= 181,879; IC 95%: 4,6-7251,5; p<0,006) .



#### 5.4. Tinción de IDO1 y FOXP3.

Se realizó la tinción de IDO1 y FOXP3 para valorar si el grado de inmunosupresión debida a la degradación del triptófano y a los linfocitos Tregs en el tumor se correlacionaba con la respuesta de las pacientes. La tinción de IDO1 se realizó en todas las pacientes. Sin embargo, la tinción de FOXP3 se realizó en 35 de las 36 pacientes por falta de tejido en una de ellas. Se valoró el infiltrado linfocitario intratumoral. Ambas se cuantificaron como variables continuas.

La mediana de expresión de FOXP3 fue del 1% (rango entre 0-40%). La distribución fue la siguiente:  $\leq 1\%$  en 16 pacientes (45,7%),  $\leq 5\%$  en 4 pacientes (11,4%), 10-25% en 13 pacientes (37,1%), entre 30-40% en 2 pacientes (5,7%). Un ejemplo de ello se encuentra en la figura 34.



**Figura 34. Tinción de FOXP3 (30%).** La imagen grande tiene una magnificación de 10x, mientras que la imagen más pequeña incluida se encuentra a 40x.

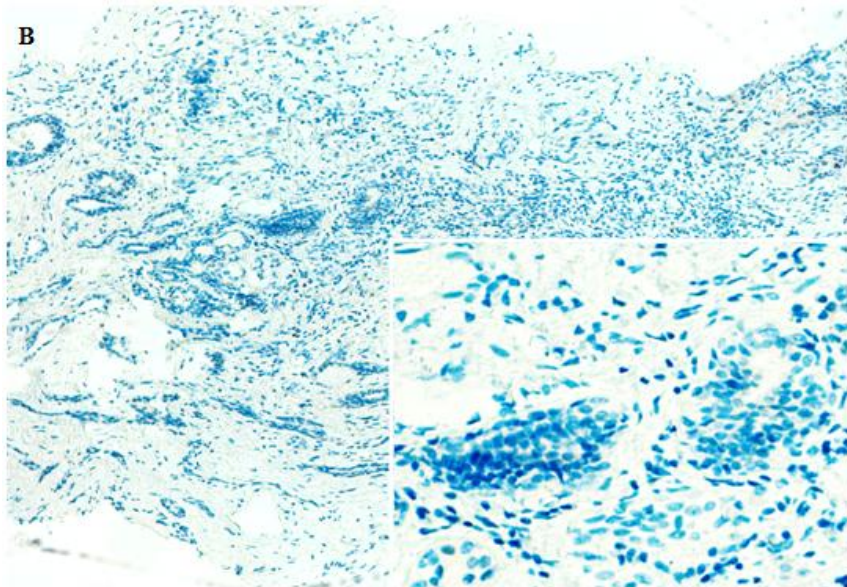
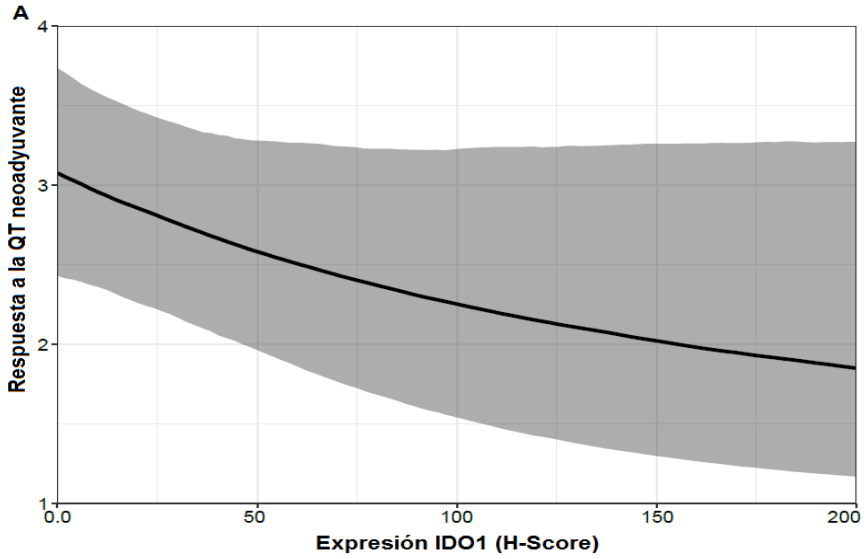
Al evaluar la asociación de FOXP3 con la respuesta de las pacientes a la QT neoadyuvante, se encontró una asociación estadísticamente significativa entre FOXP3 y la respuesta tumoral. Los resultados nos revelaron que a mejor respuesta mayor infiltrado por células expresando FOXP3 nuclear (OR = 1,9, IC 95% [1,1-3,6]).

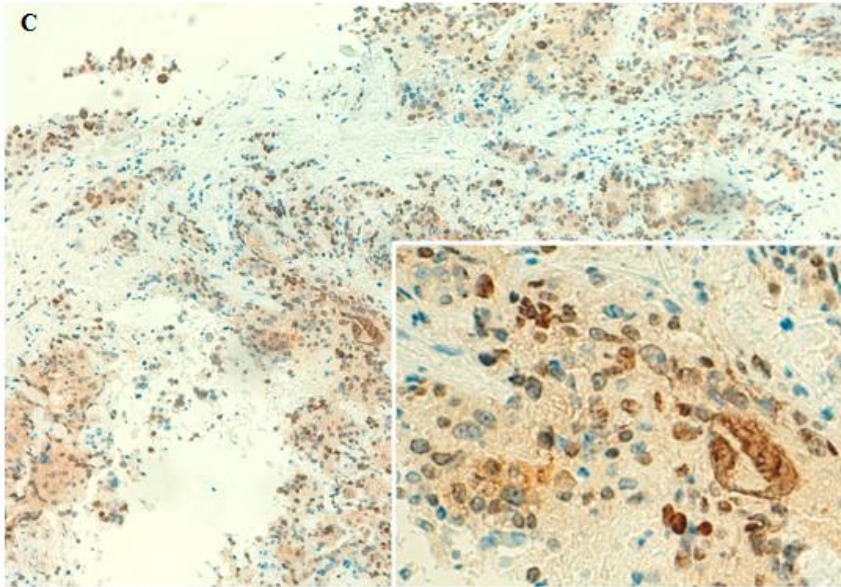
La mediana de expresión de IDO1 (medida en porcentaje) fue del 1% (rango entre 0-90%). La distribución fue la siguiente:  $\leq 1\%$  en 14 pacientes (38,9%),  $\leq 5\%$  en 6 pacientes (16,6%), 10% en 2 pacientes (5,5%), entre 30-40% en 6 pacientes (16,6%), entre 50-60% en 5 pacientes (13,9%) y entre 80-90% en 3 pacientes (8,3%). La distribución de H-score de IDO1 fue la siguiente:  $\leq 1\%$  en 14 pacientes (38,9%),  $\leq 5\%$  en 6 pacientes (16,6%), 10% en 2 pacientes (5,5%), 40-60% en 6 pacientes (16,6%), entre 80-90% en 3 pacientes (8,3%), entre 150-200% en 5 pacientes (13,9%).

Las tinciones mostraron importantes diferencias, observándose que las pacientes con ausencia de respuesta presentaban fuerte expresión de IDO1 (medida con H-score), mientras que los que presentaban respuesta completa no expresaban IDO1 (figura 35).

Se contrastó la asociación de IDO1 con la respuesta de las pacientes a la QT neoadyuvante mediante regresión ordinal ajustada por número de ganglios afectos y tamaño tumoral. Se encontró un efecto negativo (mayor grado de respuesta tumoral a menor expresión de IDO1 y viceversa) aunque no estadísticamente significativo (OR = 0,99, IC 95% [0,98-1,00],  $p=0.08$ ), como se muestra en la figura 35. En base a la

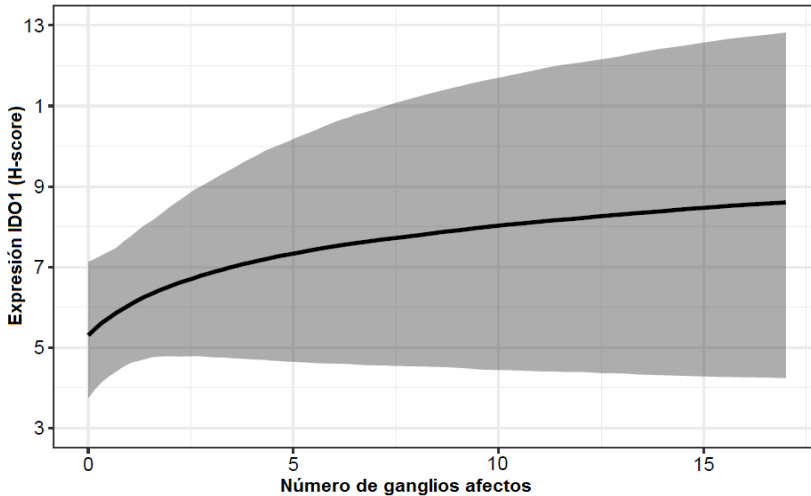
tendencia, es posible que con un tamaño muestral mayor se hubiera obtenido un efecto significativo.





**Figura 35. Relación de IDO1 con la respuesta.** A. Grado de respuesta a la QT neoadyuvante (respuesta en mama y axila) en función de H-score de IDO1. B. Ausencia de expresión de IDO1 en pacientes con respuesta completa. C. Expresión aumentada de IDO1 en paciente con ausencia de respuesta. Las imágenes se encuentran a 10x, mientras que la magnificación de las imágenes incluidas se encuentran a 40x.

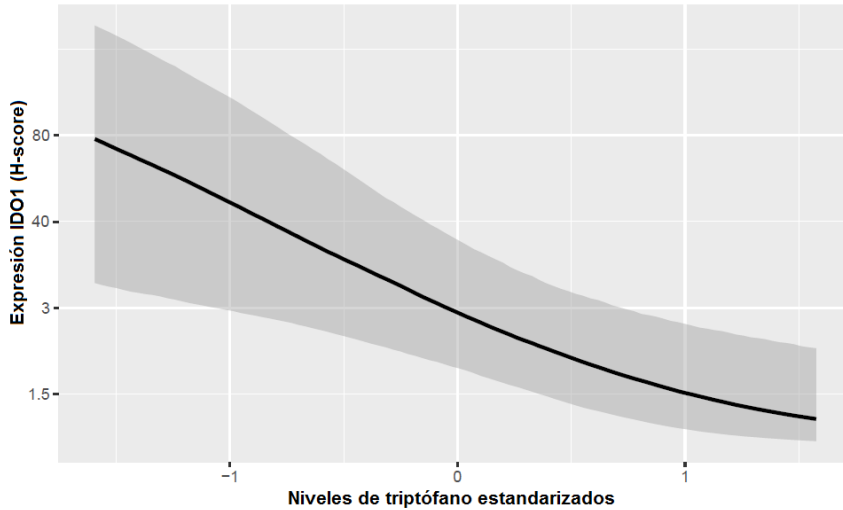
No se observó asociación entre el aumento de H-score IDO1 y mayor afectación ganglionar (OR=1,08, IC 95% [0,93-1,25], p=0.31), aunque cabe destacar que los pacientes que no expresaban IDO1 en el tumor no presentaban ganglios afectados (figura 36).



**Figura 36. Relación de H-score IDO1 con afectación ganglionar.** A más porcentaje de IDO1 mayor afectación ganglionar. La zona gris indica el intervalo de confianza del 95%.

La mayoría de las pacientes que no presentaba respuesta a la QT neoadyuvante presentaban una elevada expresión de H-score IDO1, mientras que los tumores que presentaban un grado 5 de respuesta tenían muy poca o ninguna expresión. Se observó que el aumento en la expresión de IDO1 medido por H-score se correlacionaba de forma significativa con menores niveles de triptófano circulante en plasma (OR=0,34, IC 95% [0,13- 0,8], p=0.02), sugiriendo que el descenso del nivel de triptófano circulante puede ser debido, al menos en parte, por el

incremento de la expresión de IDO1 en las células tumorales (figura 37).



**Figura 37. Relación entre el nivel de triptófano circulante en plasma al diagnóstico y la expresión de IDO1 en tumor valorada mediante H-score.** Modelo de regresión ordinal (OR=0,34, IC 95% [0,13-0,8], p=0,02). A más expresión de la enzima IDO1 (catalizadora del triptófano), menos expresión de triptófano y viceversa.

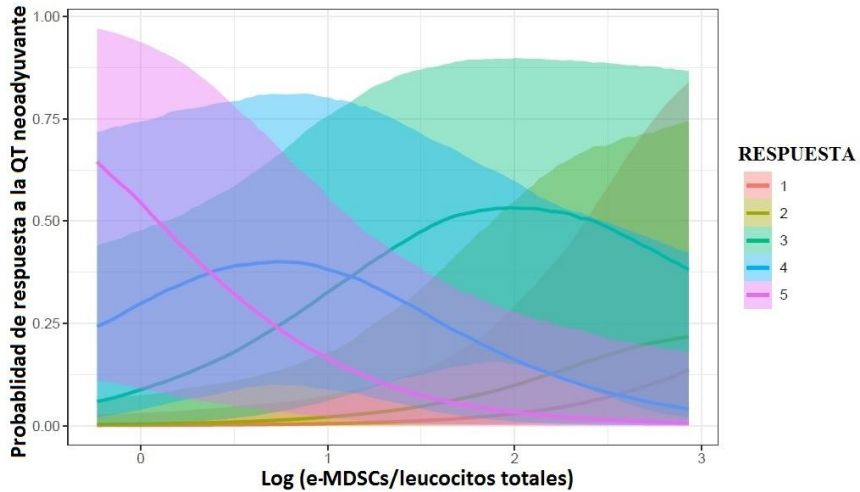
## 6. Citometría.

Con objeto de comprender mejor la biología inmune que envuelve a esta enfermedad se determinaron células inmunosupresoras (células Tregs y MDSCs) mediante citometría de flujo. Esta técnica permite la identificación multiparamétrica de células individuales en función de la expresión de antígenos específicos marcados con moléculas fluorescentes.

Dadas las diferencias en la bibliografía de marcar las células Tregs, se decidió utilizar diversas aproximaciones, tratando de valorar si con alguna de las combinaciones de AcMo se conseguía una mejor caracterización de estas células y, por tanto, un mejor modelo predictivo. Sin embargo, pese a los diferentes análisis realizados, no se encontró relación entre estas células y la respuesta a la QT neoadyuvante.

A diferencia de las Tregs, la subpoblación de e-MDSCs se correlaciona con la respuesta a la QT neoadyuvante de forma estadísticamente significativa (OR=0,16, IC95% [0,02- 0,78], p=0,01). Las pacientes que presentaban un mayor número de e-MDSCs presentaban peor respuesta al tratamiento y viceversa (figura 38), en las figuras 39-42 se pueden observar dos ejemplos de buena y mala respuesta. A su vez, encontramos correlación estadísticamente significativa entre el aumento de células e-MDSCs en sangre y la expresión de IDO1 (valorado mediante H-score) en las células tumorales (regresión lineal p=0,04). A mayor expresión de IDO1 mayor número de e-MDSCs (figura 43), sugiriendo que un aumento en los metabolitos de la vía de la quinurenina mediante la sobreexpresión de IDO1 podrían promover las

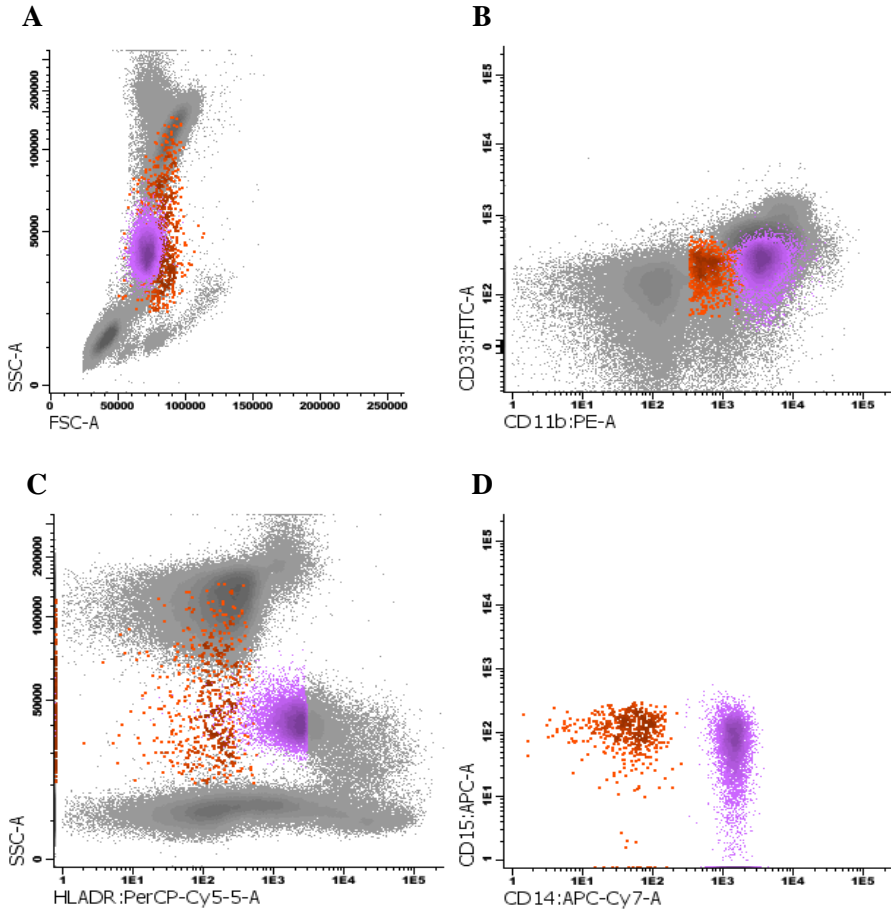
e-MDSCs. Todo ello confirmando el ambiente inmunosupresor de este tipo tumoral.



**Figura 38. Correlación entre el nivel de e-MDSCs en sangre y la probabilidad de respuesta de las pacientes a la QT neoadyuvante** (OR=0,16, IC95% [0,02- 0,78], p=0,01). Log es el logaritmo natural de la relación entre las e-MDSCs y el conteo total de leucocitos. En el gráfico podemos observar que en ausencia o con niveles bajos de e-MDSCs la respuesta más probable es la respuesta 5 (morada). Sin embargo, conforme aumenta el nivel de las e-MDSCs, disminuye la probabilidad de respuesta 5 y 4 y aumenta la probabilidad de las otras respuestas.



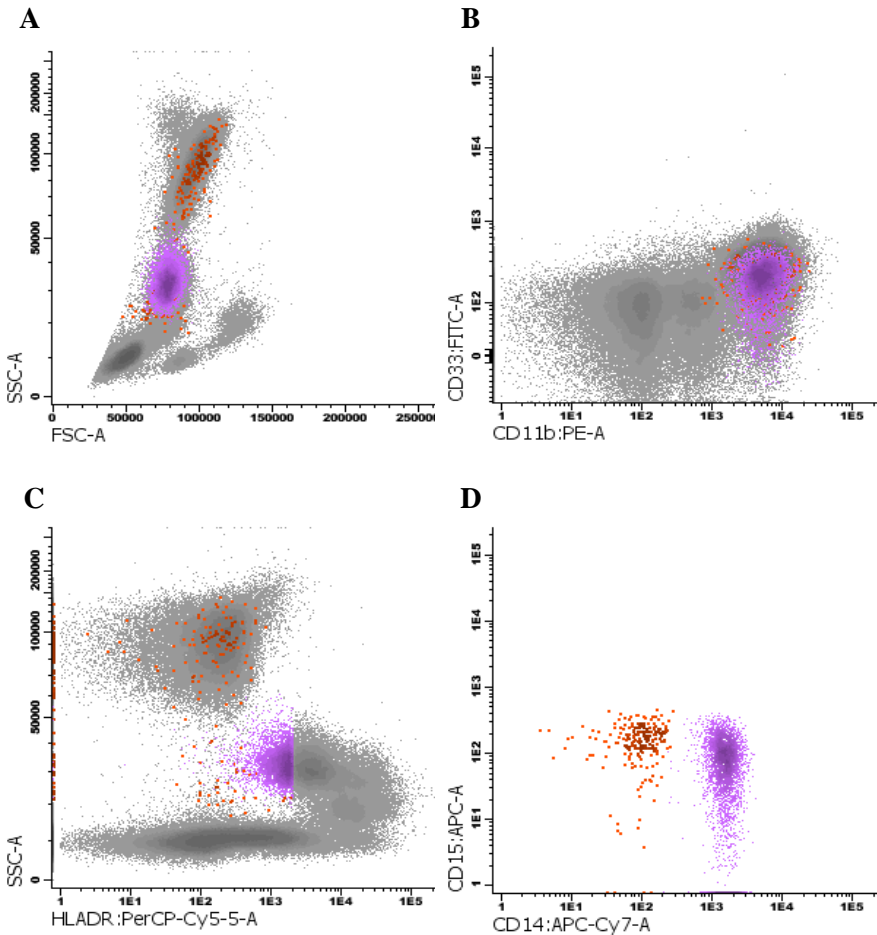
**Paciente con mala respuesta a la QT neoadyuvante.  
Muestra previa al tratamiento.**



Población	MDSCs (%)
e-MDSCs	0,3367
Mo-MDSCs	3,6052

**Figura 39. Paciente con mala respuesta a la QT neoadyuvante. Análisis de MDSCs previo al inicio de la QT neoadyuvante.**

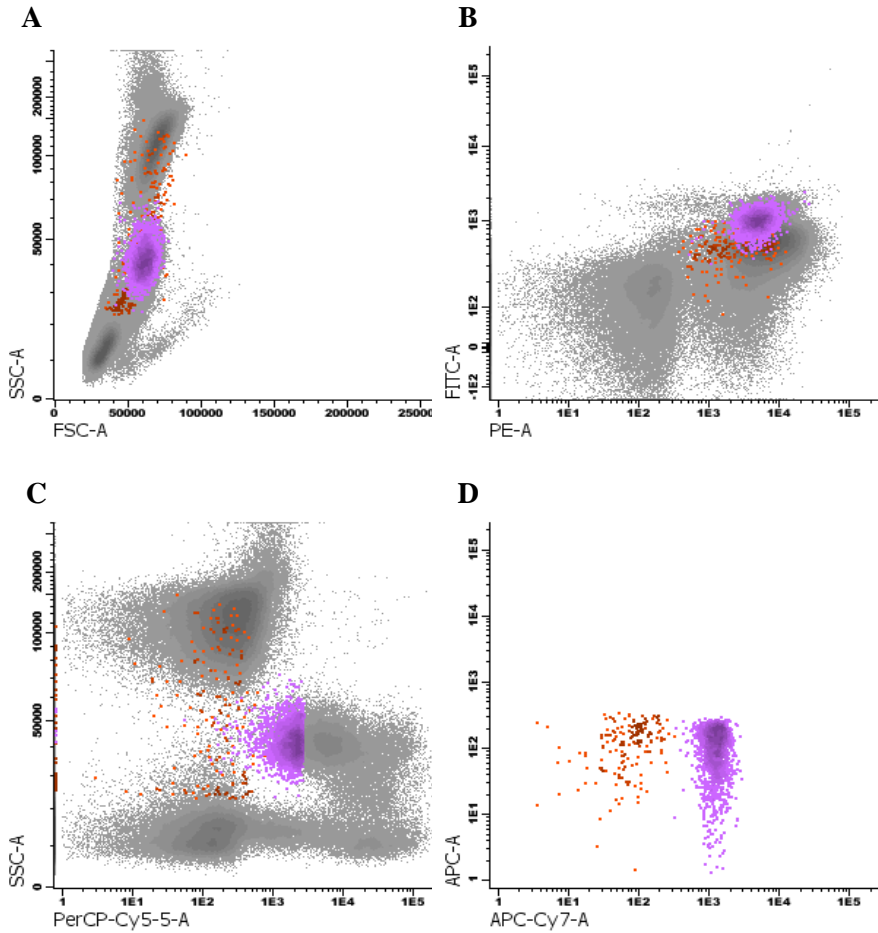
**Paciente con mala respuesta. Muestra tras el tratamiento.**



Población	MDSCs (%)
e-MDSCs	0,1300
Mo-MDSCs	2,5967

**Figura 40. Paciente con mala respuesta a la QT neoadyuvante. Análisis de MDSCs al finalizar la QT neoadyuvante.** En naranja se observan las e-MDSCs aumentadas y en morado las Mo-MDSCs aumentadas y como prácticamente no se modifican con el tratamiento.

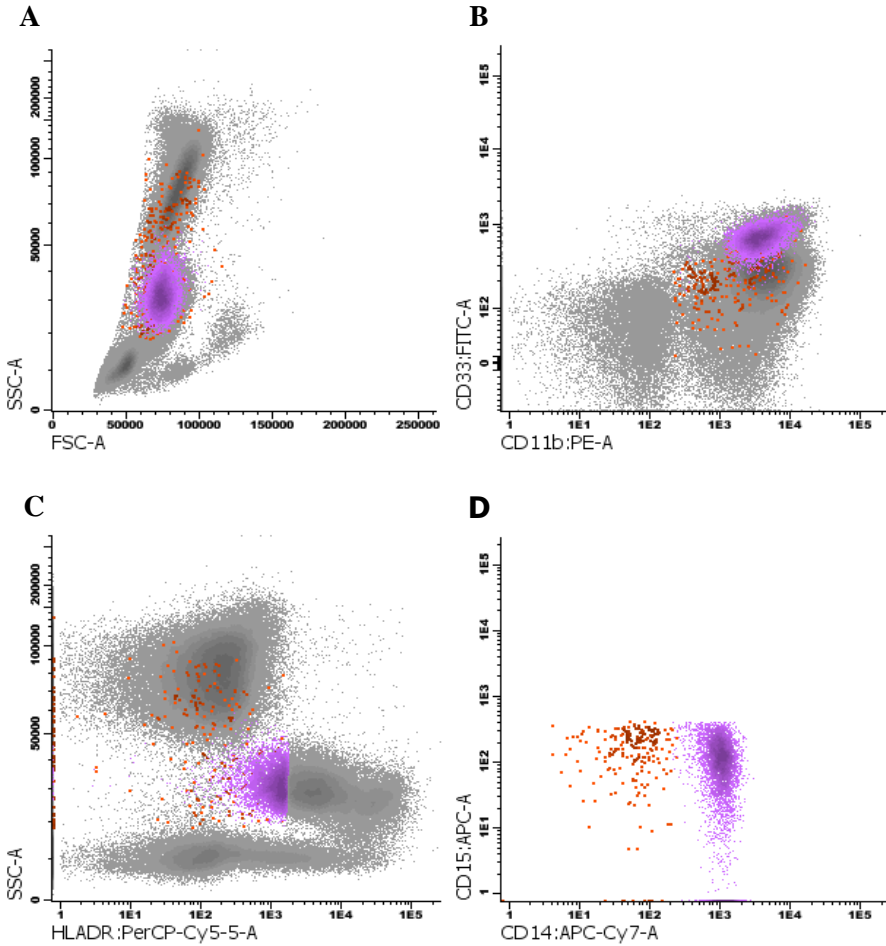
**Paciente con buena respuesta. Muestra previa al inicio.**



Población	MDSCs (%)
e-MDSCs	0,1020
Mo-MDSCs	0,9307

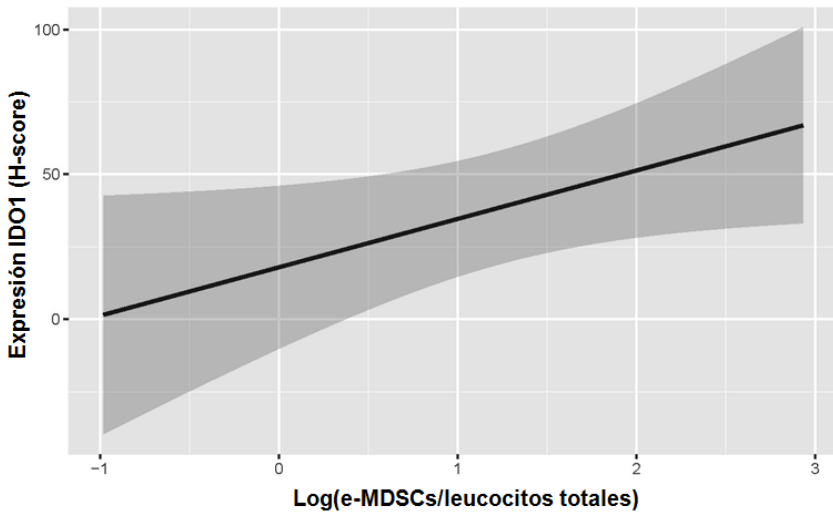
**Figura 41. Paciente con buena respuesta a la QT neoadyuvante. Análisis de MDSCs previo al inicio de la QT neoadyuvante.** En naranja se observan las e-MDSCs y en morado las Mo-MDSCs, ambas en niveles más bajos que la paciente de mal pronóstico.

**Paciente con buena respuesta. Muestra al finalizar el tratamiento.**



Población	MDSCs (%)
e-MDSCs	0,1099
Mo-MDSCs	2,6631

**Figura 42. Paciente con buena respuesta a la QT neoadyuvante. Análisis de MDSCs al finalizar la QT neoadyuvante.** En naranja se observan las e-MDSCs que no se han modificado tras la QT y en morado las Mo-MDSCs, que han aumentado tras la QT.



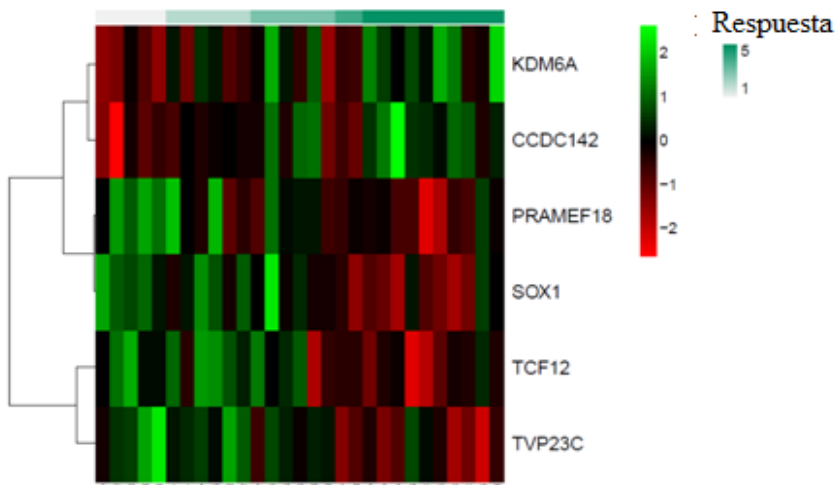
**Figura 43.** Correlación significativa entre el aumento del número de e-MDSCs en sangre y la expresión de IDO1 en las células tumorales (regresión lineal  $p=0,04$ ). Se observa que a mayor número de e-MDSCs mayor expresión de IDO1. Log es el logaritmo natural de la relación entre las e-MDSCs y el conteo total de leucocitos. La expresión de IDO1 corresponde a la evaluación de la inmunohistoquímica mediante H-score.

Estos resultados sugieren que los niveles de e-MDSCs al diagnóstico tiene impacto en la respuesta a la QT neoadyuvante y pueden utilizarse como marcadores predictivos para la identificación de pacientes que no van a beneficiarse de la QT neoadyuvante. Por ello, estos pacientes deberían ser tratados con QT diferente o al menos, someterse a cirugía previa a la QT para evitar que su tumor siga creciendo.

## 7. Expresión de genes.

Tras la valoración del tejido mediante un corte de hematoxilina-eosina, se realizaron tres cilindros sobre la zona tumoral seleccionada cuidadosamente por el patólogo. Esos cilindros tumorales se sometieron a la extracción de ARN de parafina. El ARN total aislado de parafina se utilizó para hibridar los *arrays* de Clariom S Pico (Affymetrix).

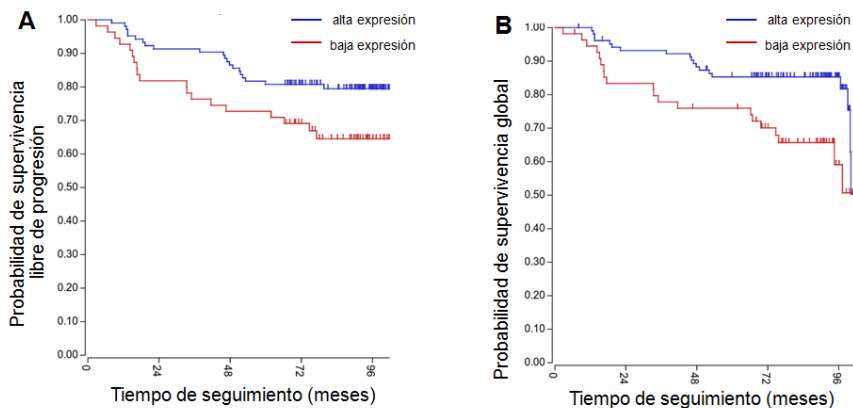
Para la identificación de las variables más importantes que predigan la respuesta al tratamiento se utilizó un modelo de regresión ordinal penalizado por *elastic net*. Las variables seleccionadas por el modelo de *elastic net* se representaron en un mapa de calor (figura 44), que contiene los valores *z-scores* de las variables identificadas para cada paciente. La comparación de la expresión de genes con la respuesta de las pacientes identificó 6 genes con expresión diferencial (figura 44).



**Figura 44. Mapa de calor de expresión de genes.** El análisis de la expresión diferencial de genes mediante regresión logística con penalización *elastic net*

identifica un perfil de expresión que se asocia a la respuesta a la QT neoadyuvante.

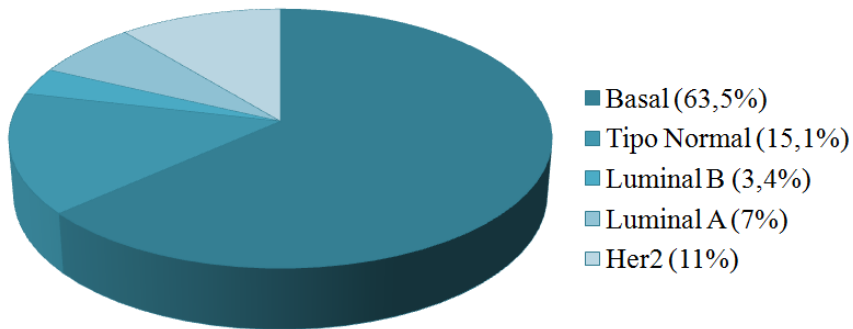
Tras la valoración de los 6 genes que diferenciaban la respuesta de las pacientes a la QT neoadyuvante, se centró nuestra atención sobre el gen KDM6A que se encontraba sobreexpresado en las pacientes de mejor respuesta e infraexpresado en las pacientes pobremente respondedoras. KDM6A es una desmetilasa que actúa preferencialmente sobre la lisina 27 metilada de la histona 3. Se realizó la validación *in silico* de nuestros hallazgos con la cohorte de Bergh que contiene 159 tumores de mama (figura 45).



**Figura 45. Validación *in silico* de la expresión de KDM6A.** Datos obtenidos del estudio de Bergh en R2: *microarray analysis and visualization platform* (<http://r2.amc.nl>). Análisis de la expresión de KDM6A en 159 tumores de mama. **A.** Curvas de Kaplan-Meier mostrando que la sobreexpresión de KDM6A se asocia a mejor supervivencia libre de progresión ( $p=0.0036$ ) y **B.** a mejor supervivencia global ( $p<0.001$ ).

### **7.1. Análisis de las muestras por PAM 50.**

De los *arrays* de expresión se extrajo la información de 50 genes relevantes para PAM50. Se perfiló la expresión génica de las pacientes y se aplicó el algoritmo PAM50, como se describe en materiales y métodos, para calcular el subtipo molecular más probable basado en el perfil de expresión de estos 50 genes. La correlación con la plataforma fue del 52% y la distribución por subtipos fue la que se muestra en la figura 46.



**Figura 46. Distribución de subtipos intrínsecos según PAM50.**

### **7.2. Análisis de los subtipos de Lehmann.**

A partir de la expresión de genes determinada se evaluaron los subtipos de CMTN de Lehmann de las pacientes de nuestra serie como se describe en materiales y métodos.

Este análisis se realizó solo en 29 de las 36 pacientes, por falta de muestra en el resto de las mismas. Al realizar el análisis, 8 de ellas no fueron clasificadas como CMTN sino como receptor de estrógenos



positivo. No obstante, el resultado de estas 8 pacientes difería si se realizaba por PAM50, ya que tres de ellas eran nuevamente clasificadas como basales y dos de ellas como HER2 positivas (Tabla 15).

**Tabla 15. Correspondencia de las 8 pacientes clasificadas como luminales en los subtipos de Lehmann con la clasificación de PAM50.**

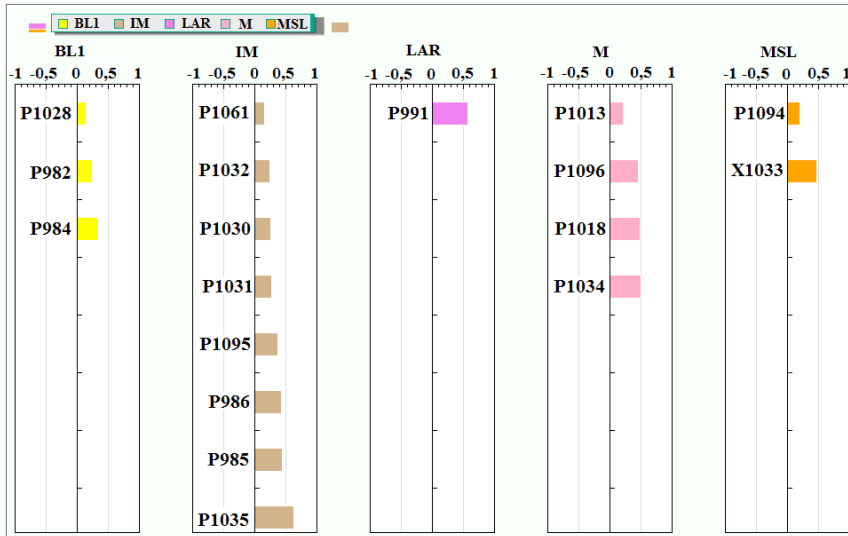
Paciente	Lehmann	PAM50
<b>P1027</b>	RE positivo	HER2
<b>P1026</b>	RE positivo	Basal
<b>P1067</b>	RE positivo	Luminal A
<b>P989</b>	RE positivo	Luminal A
<b>P1063</b>	RE positivo	Luminal A
<b>P1020</b>	RE positivo	Basal
<b>P1062</b>	RE positivo	HER2
<b>P1011</b>	RE positivo	Basal

El resultado completo del análisis de los subtipos de Lehmann, de las 21 pacientes restantes, realizado puede encontrarse en la página <http://cbc.mc.vanderbilt.edu/tnbc/display.php?id=b9549ed9-6001-4a14-b4bd-263509df14ce> (tabla 16).

**Tabla 16. Tipos de CMTN según Lehmann.**

Muestra	Subtipo	Correlación	p-valor
<b>p1061</b>	IM	0.153	<0.001
<b>p982</b>	BL1	0.247	<0.001
<b>p1094</b>	MSL	0.195	0.001
<b>p1035</b>	IM	0.622	<0.001
<b>X1033</b>	MSL	0.478	<0.001
<b>p1095</b>	IM	0.372	<0.001
<b>p1017</b>	UNS	NA	NA
<b>p985</b>	IM	0.439	<0.001
<b>p1096</b>	M	0.464	<0.001
<b>p986</b>	IM	0.428	<0.001
<b>p1013</b>	M	0.217	<0.001
<b>p984</b>	BL1	0.335	<0.001
<b>p991</b>	LAR	0.57	<0.001
<b>p1031</b>	IM	0.272	0.001
<b>p1028</b>	BL1	0.148	0.027
<b>p1030</b>	IM	0.259	<0.001
<b>p1014</b>	UNS	NA	NA
<b>p983</b>	UNS	NA	NA
<b>p1032</b>	IM	0.244	<0.001
<b>p1034</b>	M	0.502	<0.001
<b>p1018</b>	M	0.492	<0.001

Los subtipos definidos fueron BL1 (3 pacientes), IM (8 pacientes), LAR (1 paciente), M (4 pacientes), MSL (2 pacientes) como se muestra en la figura 47.



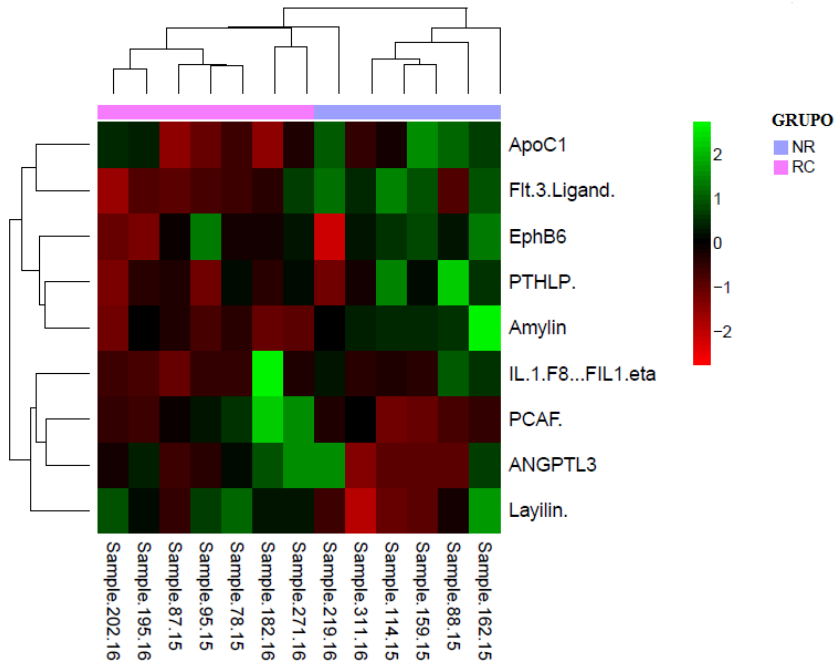
**Figura 47. Distribución de las pacientes analizadas según los subtipos de Lehmann.**

## 8. Proteómica.

Se utilizó el plasma previamente congelado en el biobanco y se remitió a la plataforma de Ray tebu-Bio. Posteriormente, se hibridaron los *arrays* de anticuerpos serie G RayBio, se cuantificó la señal y se importó para su análisis en el programa de análisis de *arrays* de anticuerpos RayBio.

La selección de las variables más importantes que predecían la respuesta se realizó por el algoritmo probabilístico de *random forest* (301). Los p valores de las variables seleccionadas se estimaron por Janitza *et al.*, basado en la modificación de la versión de permutación (302). Los resultados del análisis realizado por *random forest* fueron representados

en un mapa de calor con los valores de z-score de las variables seleccionadas para cada paciente (figura 48).



**Figura 48. Proteómica. Mapa de calor de las pacientes con respuesta 1 frente a las pacientes con respuesta 5.**

### 9. Cultivos con fármacos.

Tras los últimos artículos publicados y los últimos intentos en subdividir esta enfermedad, la comunidad científica se ha dado cuenta de que posiblemente dentro del cáncer de mama triple negativo existe una entidad que cada vez más parece separarse de los otros subgrupos, el cáncer de mama triple negativo receptor de andrógenos positivo. Tras este descubrimiento se pensó que si se bloqueaba el receptor de andrógenos probablemente se podría controlar mejor estos pacientes que

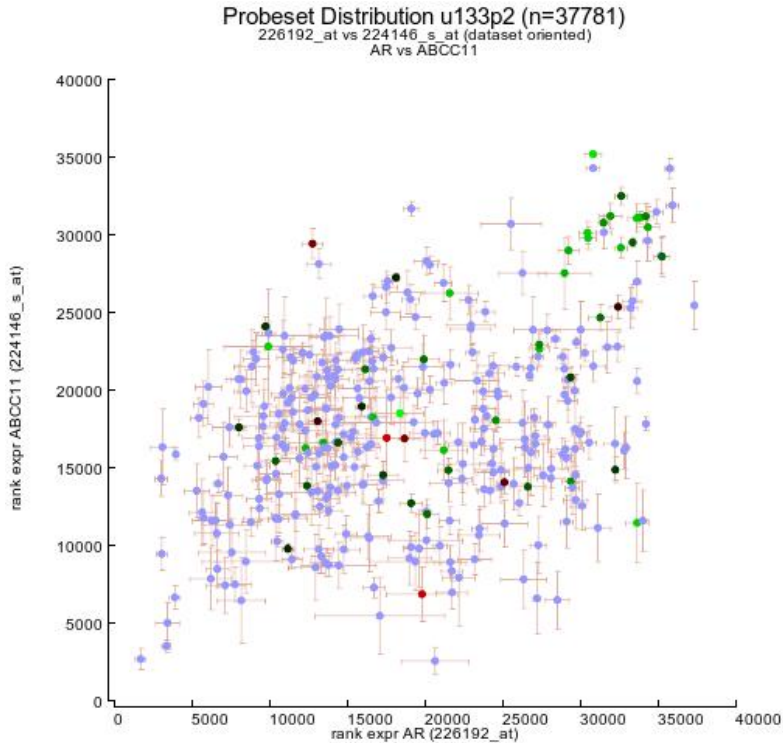
no responden adecuadamente a la quimioterapia, quizás porque tienen un perfil más hormonosensible, como ocurre con las pacientes luminales A. Los resultados de los estudios fases I revelaron respuestas, pero quizás en menor porcentaje del esperado. Por ello, se trató de desarrollar una línea de trabajo en esa dirección. Realizamos varios estudios *in silico* con varias cohortes de pacientes de cáncer de mama y observamos que la expresión del receptor de andrógenos se correlacionaba significativamente con la expresión del transportador multidroga ABCC11 (MRP8), lo que podría estar influyendo en disminuir la concentración de los inhibidores del receptor de andrógeno sacándolos fuera de la célula (figura 49).

Identificación de biomarcadores en CMTN

Cáncer de mama - Sotiriou - 120 - MAS5.0 - u133p2  
 120 muestras, transform\_2log, PresCalls>=1  
 Sourcegene=AR(226192\_at)

HUGO	R	P-valor	Pres
AR <i>TF, development, drugtarget, sign transd, transcription regulator Act</i>	1.000	0.0e+00	106
FOXA1 <i>TF, development, diff, transcription regulator Act</i>	0.712	5.0e-16	78
ABCC11 <i>membrane</i>	0.712	6.7e-16	34
TFAP2B <i>TF, development, transcription regulator Act</i>	0.706	9.4e-16	85
SPDEF <i>TF, development, transcription regulator Act</i>	0.704	1.0e-15	42
CYP4Z2P <i>membrane</i>	0.672	1.2e-13	43
ERBB2 <i>development, drugtarget, kinase, membrane, sign transd</i>	0.660	5.3e-13	120
GPD1L	0.653	1.2e-12	120
REEP6 <i>membrane</i>	0.647	2.3e-12	40
SIDT1 <i>membrane</i>	0.637	8.3e-12	115
GALNT10 <i>membrane</i>	0.622	4.2e-11	119
TMEM45B <i>membrane</i>	0.622	3.9e-11	55
CRAT <i>drugtarget</i>	0.621	4.4e-11	117
FAM214A	0.618	6.0e-11	120
TFF3	0.614	9.2e-11	72
FHOD1	0.610	1.2e-10	86
CREB3L4 <i>TF, transcription regulator Act</i>	0.609	1.4e-10	120
HOXB2 <i>TF, development, transcription regulator Act</i>	0.606	1.8e-10	95
RHOB <i>apoptosis, cell cycle, development, diff, membrane, sign transd</i>	0.600	3.2e-10	120

**Figura 49. Correlación entre el receptor de andrógenos y ABCC11.** Estudio *in silico* en el que utilizó la cohorte Sotiriou de 120 pacientes de cáncer de mama para correlacionar la expresión del receptor de andrógenos (AR) con otros genes, siendo ABCC11 el segundo mejor correlacionado (R=0,71; P=6,7x10<sup>-16</sup>). Plataforma genómica de análisis y visualización (<http://r2.amc.nl>).



**Figura 50. Correlación entre el transportador multidroga ABCC11 y AR (receptor de andrógenos) en diversas cohortes de tumores y de líneas celulares.** Cada punto representa la expresión media de ABCC11 y AR en una cohorte de tumores o de líneas celulares recogida en la plataforma genómica de análisis y visualización (<http://r2.amc.nl>). Aunque la correlación global es baja (correlación de Pearson o *Rank*,  $R= 0,31$ ;  $P= 2,7 \times 10^{-9}$ ), se aprecia una correlación lineal entre AR y ABCC11 de manera que a mayor expresión de AR mayor expresión de ABCC11.

Esta correlación se ha hecho extensible a otros tumores y líneas celulares de cáncer distintas a las de cáncer de mama (figura 50 y tabla 16).

**Tabla 16. Correlación entre ABCC11 y AR.** Se representan las cohortes con las correlaciones más robustas del estudio de la figura 50. Muchos de los estudios que presentan mejor correlación corresponden a cohortes de tumores de mama.

Datos u133p2	R
Mixed pancreatic (PDA) - Sadanandam - 47	0.811
Tumor Breast (mutation status) - Meijers-Heijboer - 155	0.726
Exp Various PTEN - - 12	0.673
Tumor Breast - Bos - 204	0.662
Tumor Ovarium - Tothill - 10	0.653
Tumor Breast - Black - 107	0.648
Tumor Breast (Relapse) - Smid - 210	0.647
Cellline Breast - Hoeflich - 51	0.626
Tumor Breast - Yu - 683	0.625
Xenograft Tumor Breast - Shaw - 44	0.619
Tumor Lymphoma (PCNSL/PMLBCL) - Shipp - 26	0.610
Tumor Breast (MDC) - Bertucci - 266	0.602
Tumor Breast (Anthracycline) - Sotiriou - 120	0.596
Tumor Medulloblastoma public - Delattre - 57	0.575
Tumor Lung Metastases - Massague - 29	0.574
Mixed colorectal cancer microdissected - Galamb - 18	0.566
Tumor Breast (mutation status) - Meijers-Heijboer - 155	0.563
Tumor Breast (Chemotherapy) - Quiles - 61	0.561



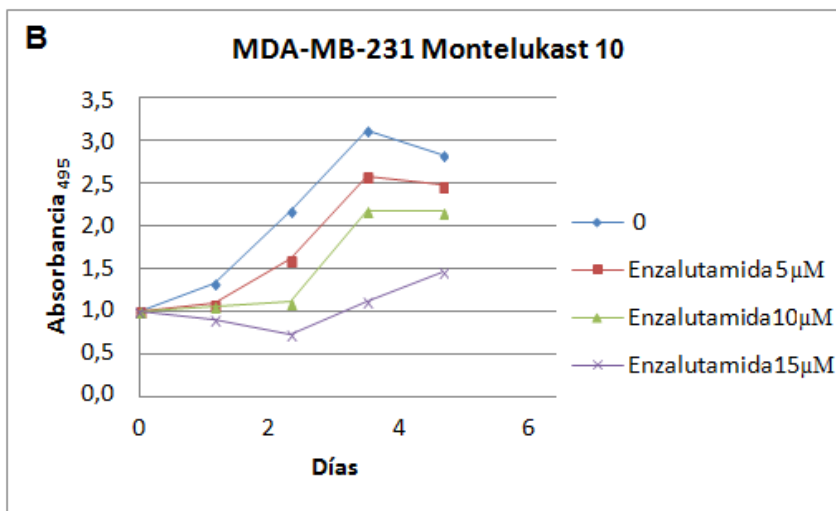
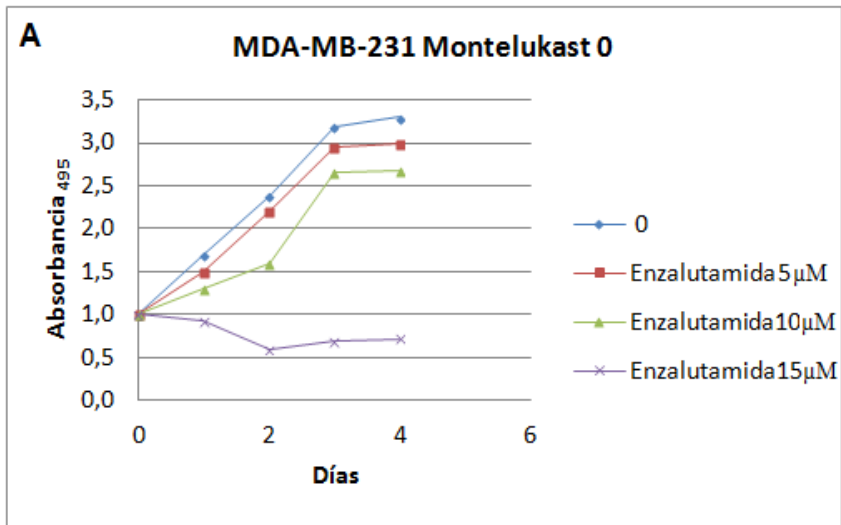
Tumor Breast - Iglehart - 123	0.501
Mixed pancreatic (PDA) - Sadanandam - 47	0.811
Tumor Breast (mutation status) - Meijers-Heijboer - 155	0.726
Exp Various PTEN - - 12	0.673
Tumor Breast - Bos - 204	0.662
Tumor Ovarium - Tothill - 10	0.653
Tumor Breast - Black - 107	0.648
Tumor Breast (Relapse) - Smid - 210	0.647
Cellline Breast - Hoeflich - 51	0.626
Tumor Breast - Yu - 683	0.625
Xenograft Tumor Breast - Shaw - 44	0.619

R: coeficiente r

El análisis del promotor de ABCC11 a partir de su secuencia obtenida de la última versión del genoma humano (hg38, <https://genome.ucsc.edu/>) nos reveló un potencial sitio consenso de unión del receptor de andrógenos a -339 del inicio de la transcripción (AGcgannnTGTTTC;(303)). Debido a todos estos hallazgos se decidió buscar inhibidores de ABCC11. Montelukast, un inhibidor del receptor de leucotrienos 4 ampliamente usado en procesos asmáticos, ha mostrado también ser un inhibidor del transportador multidroga MRP2, miembro de la familia de ABCC11 (304). Por este motivo decidimos analizar si Montelukast pudiera tener un sinergismo con antiandrógenos como la enzalutamida en células que sobreexpresan el receptor de andrógenos.

Se crecieron en placa de 96 pocillos dos líneas celulares de CMTN, la línea MDA-MB-453 y 231, la primera de ellas con sobreexpresión del receptor de andrógenos. Se les añadió dos tipos de tratamientos:

enzalutamida (a concentraciones de 0, 5, 10 y 15  $\mu\text{M}$ ) y montelukast (a concentraciones de 0, 10 y 30  $\mu\text{M}$ ). Se combinaron como se muestran en las figuras 51 y 52 observando un sinergismo entre ambos tratamientos principalmente en la línea celular con el receptor de andrógenos sobreexpresado (enzalutamida 5  $\mu\text{M}$  montelukast 10  $\mu\text{M}$ , figura 52B).



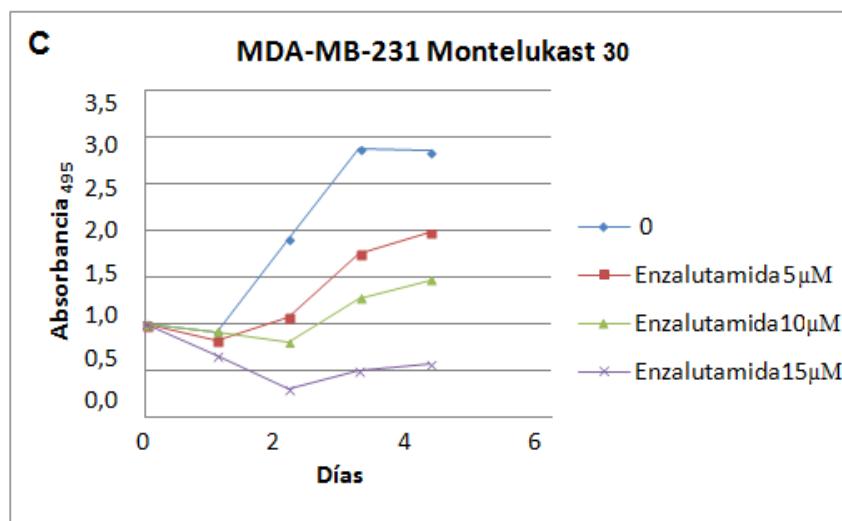
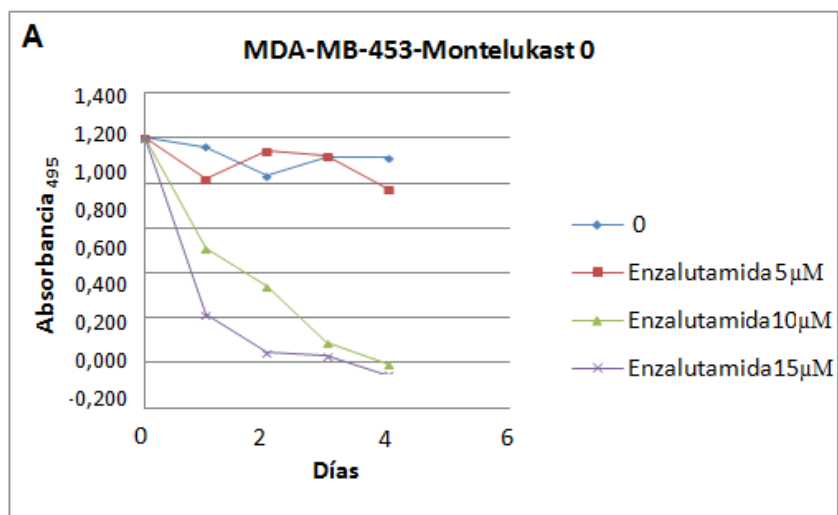


Figura 51. Línea MDA-MB231 combinación de montelukast con enzalutamida.



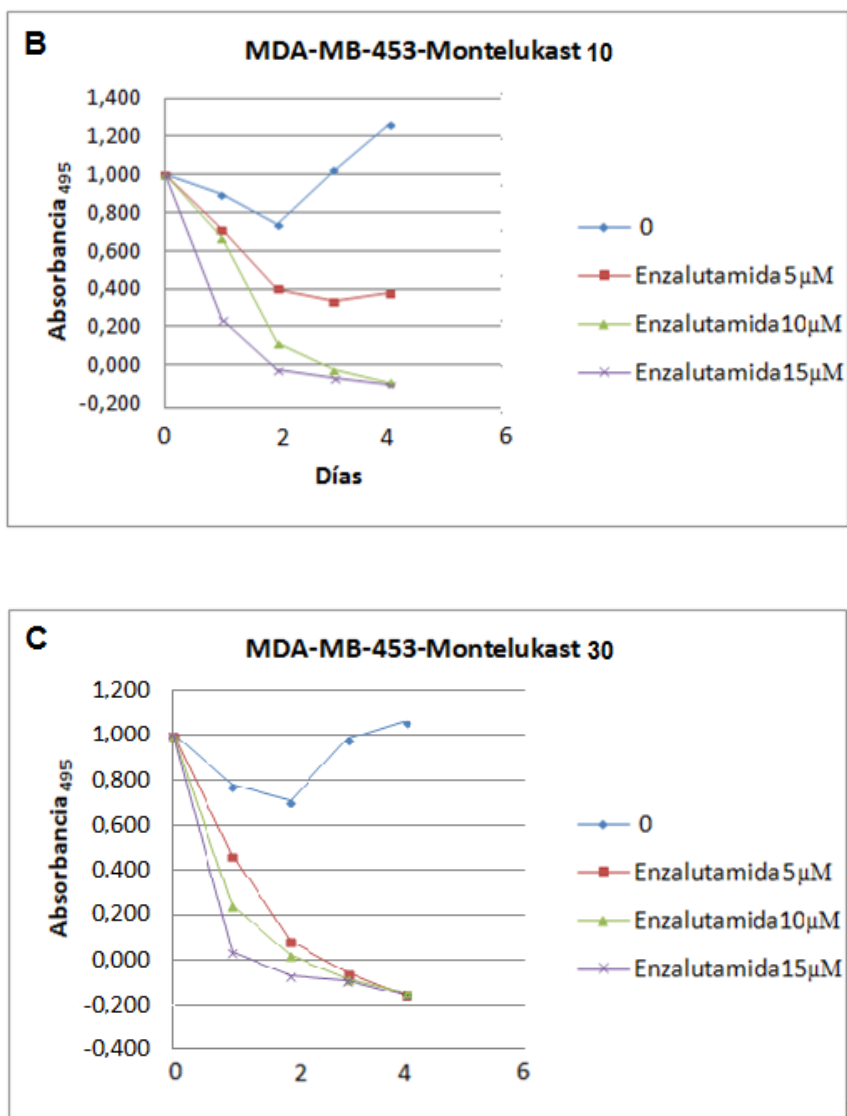
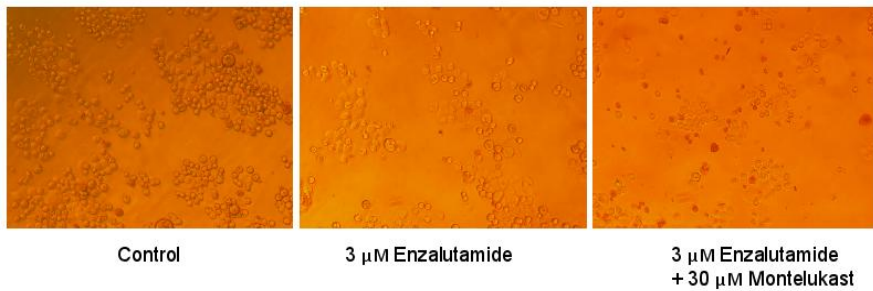


Figura 52. Línea MDA-MB-453 combinación de montelukast con enzalutamida.



**Figura 53. Fotos de los cultivos celulares. A.** Células de la línea MDA-MB453 sin fármacos (control). **B.** Células de la línea MDA-MB453 con enzalutamida (3  $\mu$ M) en la que vemos que algunas células mueren. **C.** Células de la línea MDA-MB453 con enzalutamida (3  $\mu$ M) + montelukast (30  $\mu$ M) observamos aumento de muerte celular.





## 5. DISCUSIÓN





## **5. DISCUSIÓN**

El CMTN es una enfermedad muy heterogénea que parece englobar en su definición diferentes subtipos con unas características biológicas, de respuesta al tratamiento y pronósticas distintas. Aunque en la práctica clínica habitual se continúa utilizando la inmunohistoquímica y no los subtipos moleculares, probablemente esta situación cambiará en un futuro próximo. Por ello, como criterio de inclusión en nuestro estudio se decidió utilizar la inmunohistoquímica como criterio diagnóstico, dado que se trata de la técnica estándar utilizada en la mayoría de centros. El CMTN, como hemos visto en nuestra serie, afecta generalmente a pacientes jóvenes, es agresivo, con escasa respuesta al tratamiento y de mal pronóstico. Motivo por el cual existe una inminente necesidad de desarrollar nuevas terapias para este subtipo tumoral.

Durante muchos años, se pensó que el cáncer de mama tenía una naturaleza menos inmunogénica en comparación con otras neoplasias como el melanoma o el cáncer de pulmón. Sin embargo, a medida que se avanza en el conocimiento sobre el papel del microambiente tumoral en la aparición del tumor, su progresión y respuesta al tratamiento existe cada vez más evidencia de que el CMTN es más inmunogénico que otros subtipos de cáncer de mama (305). Basados en los pobres resultados de la QT en este subtipo tumoral y en los esperanzadores resultados de la inmunoterapia, se ha comenzado a explorar el papel de la inmunoterapia en el CMTN (306). A su vez, algunos estudios han demostrado que la alteración de la regulación inmune se encuentra implicada en la patogénesis del cáncer de mama, principalmente en el CMTN (307).

En el proyecto se ha llevado a cabo un estudio generalizado del proceso biológico que sufre la paciente con CMTN. Se ha realizado un estudio de biomarcadores en biopsias líquidas derivadas de sangre y biopsias de tumor al diagnóstico como una estrategia integrada para valorar el impacto de la respuesta a la QT neoadyuvante. Nuestros resultados muestran una asociación significativa entre distintos perfiles inmunes que predicen la respuesta a la QT neoadyuvante. Destacar la homogeneidad de la serie, puesto que se trata de pacientes con CMTN pero que además han sido tratadas en un mismo centro y de forma similar en todos los casos, manteniendo la homogeneidad en los tratamientos y el seguimiento.

Múltiples estudios han mostrado que los miARN en exosomas se liberan de las células tumorales a la circulación y pueden ser excelentes biomarcadores en estadios tempranos de la enfermedad neoplásica (298). Los exosomas en el CMTN son moléculas que comunican el tumor con las células de su alrededor, células distantes y tejidos, confiriéndoles rasgos fenotípicos para la progresión tumoral y preparan el nicho para ser colonizado (308). Por todo ello, los exosomas contienen biomarcadores que pueden explicar la biología tumoral y la respuesta o la ausencia de la misma a la QT. Este conocimiento ha llevado a realizar nuevos estudios *ex vivo* donde se introducirían miARN, siARN o QT en exosomas, por su potencial uso como agentes terapéuticos y como vehículo de vacunas en CMTN (309).

El análisis funcional de los miARN encontrados en nuestro estudio reveló que los procesos que se encontraban involucrados estaban relacionados con la inmunidad:

- Regulación positiva del proceso efector inmune.
- Producción de citoquinas de la superfamilia del factor de necrosis tumoral.
- Activación de las células mieloides involucradas en la respuesta inmune.
- Presentación y procesamiento de antígenos.

Nuestro estudio reveló que los exosomas circulantes de las pacientes que presentaban pobre respuesta al tratamiento contenían miARNs reguladores de vías celulares de la maduración y la supresión inmune. Estos resultados sugieren que entre los diferentes subtipos de CMTN, las pacientes pobremente respondedoras representan un subgrupo con un perfil de inmunosupresión más comprometido. Una posibilidad es que la condición sea innata a la genética de las pacientes o, alternativamente, que pueda resultar de la evolución e interacción entre las células tumorales, el microambiente y las células inmunes. Otra posibilidad es que no sea únicamente una condición, sino que ambas estén implicadas.

Con objeto de identificar las condiciones que determinan la activación o la supresión inmune, valoramos los niveles circulantes del triptófano y de sus catabolitos, incluyendo la quinurenina. Estos interfieren con la activación/viabilidad de las células T y la proliferación de las células inmunosupresoras (243). Además, la quinurenina tiene efectos paracrinos inmunosupresores en las células inmunes y efectos directos en las células T CD8+ reduciendo su viabilidad. Nuestro análisis metabolómico en plasma de sangre extraída al diagnóstico de la enfermedad, muestra una predicción robusta de respuesta a la QT

neoadyuvante basada en los niveles circulantes de 5 catabolitos del triptófano: cloroquinurenina, ácido indoleláctico, ácido xanturénico, ácido antranílico y 3-hidroxiquinureina. El catabolismo del triptófano deriva en dos vías, la vía de la quinurenina y la del ácido indoleláctico. Nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión de IDO1, enzima que modifica el equilibrio hacia la vía de la quinurenina, se correlaciona con una peor respuesta al tratamiento y una peor supervivencia. Nuestros resultados concuerdan con el papel inmunosupresor de IDO1 y sugieren que la identificación temprana de su expresión en biopsias al diagnóstico o la de catabolitos del triptófano en plasma de sangre pueden ayudar a la identificación temprana de las pacientes poco respondedoras a la QT.

Estos resultados no sólo confirman que el CMTN es un tumor inmunogénico, sino que se encuentra envuelto en un microambiente inmunosupresor que le confiere un peor pronóstico. Este microambiente tumoral juega un papel central en la carcinogénesis, progresión tumoral, metástasis y respuesta al tratamiento (305). El CMTN presenta más proporción de alteración inflamatoria peritumoral induciendo macrófagos, células dendríticas activadas, células B, células T activadas que los cánceres de mama que no son triple negativos (310). En los últimos años el estudio del microambiente tumoral se ha incrementado y los TILs han ganado protagonismo, sobre todo en el cáncer de mama. Se cree que los TILs migran desde la sangre al microambiente tumoral y que se encuentran en niveles más elevados en el CMTN comparado con los cánceres de mama no triple negativos (305, 306). Elevados niveles de TILs se han asociado con mejor supervivencia global, disminución de un 30% del riesgo de recidiva, un 22% del riesgo de recidiva a

distancia y un 34% del riesgo de muerte en el CMTN independientemente de la localización de los TILs (intratumorales o estromales) (311, 312). Los CMTN con elevados niveles de TILs presentan mejor respuesta a la QT neoadyuvante y una diferencia significativa en supervivencia global, comparando CMTN con TILs elevados y TILs bajos tratados con antraciclinas, la diferencia fue de 89% y de 68%, respectivamente (313). En nuestra serie se observa una correlación positiva entre el grado de respuesta tumoral a la QT neoadyuvante y el porcentaje de TILs. Sin embargo, no alcanza la significación estadística probablemente debido al reducido tamaño muestral. La mayoría de los estudios comentados previamente se realizaron entre 1000 y 2000 pacientes. Es importante destacar que también existen estudios que no muestran esa correlación positiva. Una de las explicaciones plausibles para esta aparente contradicción es que inicialmente se pudiera producir una evolución temporal de los TILs en la que se produzca un ataque al tumor para posteriormente fatigarse y extinguirse (305, 314). Otra teoría sería la distinta y compleja composición celular de los TILs que envuelven al tumor. De entre los distintos tipos de TILs identificados se encuentran las células Tregs (FOXP3 positivas), las células T CD8 positivas y las CD4 positivas, conocidas como mediadores clave en procesos contrapuestos como la vigilancia inmune y la tolerancia (315). Las células T CD8 positivas son mediadores de la inmunidad antitumorales y pueden lisar las células tumorales directamente. Varios estudios con largas cohortes de pacientes han correlacionado un beneficio en la supervivencia con el incremento de estas células T. Las células T CD4 positivas también presentan un rol antitumoral que se encuentra implicado por su función de célula de memoria (315). En nuestras pacientes no se encontró

asociación estadísticamente significativa con la respuesta. Sin embargo, cuando se exploró el ratio CD4/CD8 se observó una tendencia a presentar mejor respuesta cuando el ratio es menor. La influencia del ratio CD4/CD8 en la supervivencia de las pacientes o respuesta tumoral no es clara. En estos momentos existen estudios controvertidos y contradictorios y la mayoría constan de series pequeñas y heterogéneas de pacientes difíciles de interpretar. Por el momento, se necesitan más estudios en este sentido para tratar de esclarecer su posible papel pronóstico (316).

Por el contrario, las células Tregs se conocen por tener un importante papel inmunosupresor en el escape de las células neoplásicas a la respuesta de las células T antitumorales. Estas células son también linfocitos T y constituyen el 5-10% de las células CD4 positivas. Las células Tregs regulan la respuesta inmune suprimiendo la producción de citoquinas y la proliferación de las células T (317). Nuestro estudio mostró que las pacientes que presentaban un mayor infiltrado intratumoral por células Tregs (medido mediante la expresión de FOXP3) presentaban mejor respuesta que las pacientes cuyo infiltrado era más bajo. Esta controversia no es nueva, hay estudios que indican que un infiltrado más elevado por células Tregs puede predecir un aumento de supervivencia (318, 319). La mayor infiltración por Tregs presenta una expresión de genes distinta, caracterizada por genes relacionados con la inflamación y la respuesta inmune, además, se ha observado que frecuentemente contienen elevadas densidades de células T CD8 positivas y células B CD20 positivas (318). Por el contrario, otros estudios han encontrado que un infiltrado elevado por células Tregs se relaciona con peor supervivencia en cáncer de mama (320,

321). En un meta-análisis reciente se ha observado que la mera presencia de células Tregs en el tumor no es suficiente evidencia para predecir su efecto en la evolución de la enfermedad. Por tanto, el número de células podría verse afectado por el estatus del receptor HER2, los receptores de estrógenos y progesterona y el infiltrado por células Treg podría tener un pronóstico diferente en los tumores con receptor hormonal positivo y negativo, indicando una posible interacción del receptor hormonal con la regulación inmune (305, 322). También se ha observado el aumento de células T CD8 positivas y de citoquinas pro-inflamatorias en tumores con niveles mayores de células Treg respecto a los tumores con niveles más bajos. Este resultado sugiere que la inmunidad antitumoral puede encontrarse activa en los CMTN a pesar de la presencia de células Tregs. En un análisis de 31 genes en pacientes con CMTN y niveles elevados de células Treg, se encontraron 9 genes relacionados con la respuesta inflamatoria, el tráfico celular, la respuesta inmune celular y la supresión tumoral en el cáncer de mama (323). Este resultado refuerza la idea de que el microambiente particular del CMTN puede atenuar las funciones inmunosupresoras de las células Treg. También sería posible que las células Treg mantengan su función inmunosupresora, pero que no sea suficiente para suprimir la actividad antitumoral de las células T (305). En conjunto, todos estos resultados resaltan la necesidad de realizar una aproximación integrada y comprensiva del fenotipo y perfil de las células Treg en los tumores para entender si la existencia de esta población es beneficiosa, deletérea o adquirirá diferentes roles dependiendo del contexto tumoral.

Tratando de caracterizar mejor el infiltrado tumoral se trató de valorar mediante CD163 los macrófagos M2. Los macrófagos asociados a tumor pueden actuar como una espada de doble filo, pueden suprimir las células tumorales y también producir citoquinas que promuevan la progresión tumoral (258, 324). Los macrófagos tienen plasticidad y pueden cambiar su fenotipo dependiendo del microambiente. Los macrófagos M1 se caracterizan por la alta expresión de factores proinflamatorios y actividad tumoricida. Los macrófagos M2 son inmunosupresores, producen elevados niveles de citoquinas antiinflamatorias y presentan actividad promotora del crecimiento, proliferación y metástasis (324, 325). Sin embargo, aunque el papel de los M2 está siendo cada vez más aparente en el microambiente tumoral su efecto se encuentra pobremente definido y en nuestro estudio no ha mostrado correlación con la respuesta a la QT neoadyuvante.

Como se ha comentado previamente, nuestros resultados mostraron notables diferencias en la expresión de IDO1 en las células epiteliales del tumor, correlacionándose los que presentaban mayor nivel de expresión de la enzima con menores niveles de triptófano circulante y con una tendencia a presentar peor respuesta a la QT neoadyuvante. Pero además, se observó una correlación significativa entre la expresión de IDO1 y el incremento en el porcentaje de e-MDSCs circulantes.

El estudio de la identificación de genes que se expresan en el tumor de manera diferencial según la respuesta a la QT neoadyuvante nos ha revelado 6 genes que pudieran estar directa o indirectamente implicados en el proceso de resistencia a la QT (figura 44). La mayoría de estos 6 genes son factores de transcripción y reguladores de la transcripción



(*KDM6A*, *PRAMEF18*, *SOX1* y *TCF12*). El resto de genes están implicados en el transporte intercelular (*CCDC142* y *TVP23C*). Este estudio se ha hecho con muestras de biopsias del tumor al diagnóstico. Dado que el perfil de expresión de estos genes puede predecir la respuesta a la quimioterapia, la implementación de este perfil de expresión podría aplicarse a la práctica clínica, conjuntamente con los modelos metabólicos, miARNs y e-MDSCs circulantes en sangre descritos en esta tesis doctoral., Todos estos modelos predicen de manera temprana cual va a ser la respuesta a la QT. Resulta particularmente interesante el gen de la lisina desmetilasa *KDM6A*, el cual está muy pobremente expresado en los tumores de peor respuesta (respuestas 1 y 2, figura 44). *KDM6A* ha sido implicado en la desmetilación de histonas, principalmente en la lisina 27 de la histona H3 (H3K27), resultando en la desrepresión de la expresión génica (326). En este sentido, cabe esperar que estos tumores de peor respuesta presenten un mayor grado de metilación de histonas y su consecuente represión de genes diana tales como supresores tumorales. La poca expresión de *KDM6A* en los tumores pobre respondedores sería el equivalente a la sobreexpresión de las enzimas H3K27 metilantes como *EZH1* y *EZH2*, sobreexpresados en cánceres de pulmón, leucemias, carcinomas de próstata y hepatocarcinomas (327). Por tanto, una posibilidad de tratamiento alternativo en estos pacientes de CMTN de peor respuesta sería el tratamiento con inhibidores de *EZH2* como tazemetostat o el inhibidor más reciente *SHR2554*, ambos estudiados actualmente en diversos ensayos clínicos aunque ninguno incluye a CMTN. Adicionalmente, los resultados aportados en esta tesis doctoral revelan que la regulación del sistema inmune puede estar jugando un papel muy importante en la inmunosupresión de los CMTN pobres

respondedores a la QT neoadyuvante. Es por ello que una terapia inmune podría también constituir una terapia alternativa en estas pacientes pobres respondedoras para ser evaluada en futuros ensayos clínicos. Finalmente, la identificación temprana de estas pacientes pobres respondedoras permitiría estudiar otra estrategia basada en la cirugía previa a la QT, evitando de esta manera el crecimiento innecesario del tumor durante todo el periodo que abarca la QT neoadyuvante.



## 6. CONCLUSIONES



## 6. CONCLUSIONES

1. El perfil de expresión de miARNs en exosomas circulantes en sangre al diagnóstico identifica a pacientes que no responderán a la QT neoadyuvante en CMTN.
2. Los miARN en exosomas circulantes que se expresan diferencialmente en pacientes de pobre respuesta a la QT neoadyuvante regulan genes involucrados en vías inmunosupresoras.
3. El análisis de la expresión diferencial de genes mediante regresión logística con penalización *elastic net* identifica un perfil de expresión que se asocia a la respuesta a la QT neoadyuvante.
4. Los niveles circulantes de cinco metabolitos de la vía del triptófano relacionados con la inmunosupresión predicen la respuesta a la QT neoadyuvante en CMTN.
5. La expresión de IDO1 en las células tumorales se correlaciona inversamente con los niveles circulantes de triptófano.
6. La expresión de IDO1 en las células tumorales se correlaciona directamente con los niveles circulantes de células mieloides inmunosupresoras tempranas (e-MDSCs).
7. Los niveles circulantes de células mieloides inmunosupresoras tempranas (e-MDSCs) predicen la respuesta a la QT neoadyuvante..

**8.** El inhibidor de leucotrienos montelukast tiene un efecto antiproliferativo y apoptótico sinérgico con el antiandrogénico enzalutamida en células de CMTN receptor de andrógenos positivas.



7. ANEXO I



The image is a composite of two microscopic views of tissue. The top half shows a tissue section with brown staining, likely indicating the presence of a specific protein or marker. The bottom half shows a tissue section with pink and purple staining, likely representing a different tissue type or a different staining protocol. The text '7. ANEXO I' is centered between the two images.





## 7. ANEXO I.

Tabla 1. miARN con una  $p < 0.01$ 

<b>ID</b>	<b>t</b>	<b>P.Value</b>
<b>hs a-miR-550a-3p</b>	-4,31770179	0,00013882
<b>hs a-miR-4282</b>	3,97989966	0,00036327
<b>hs a-miR-6504-3p</b>	3,7502047	0,00069096
<b>hs a-miR-4672</b>	-3,67720141	0,00084567
<b>hs a-miR-376a-5p</b>	-3,42919241	0,00166407
<b>hs a-miR-5192</b>	3,41759513	0,00171691
<b>hs a-miR-6511a-3p</b>	3,37444273	0,00192807
<b>hs a-miR-4715-3p</b>	-3,36494085	0,00197781
<b>hs a-miR-4722-5p</b>	-3,35665616	0,00202218
<b>hs a-mir-3192</b>	-3,34369009	0,00209354
<b>hs a-mir-3672</b>	-3,31442929	0,00226358
<b>hs a-mir-449c</b>	3,28604117	0,00244115
<b>hs a-miR-4677-5p</b>	-3,23957117	0,00276092
<b>hs a-mir-1243</b>	3,23262119	0,00281205
<b>hs a-miR-3915</b>	-3,19038638	0,00314281
<b>hs a-mir-5192</b>	-3,17364904	0,00328388
<b>hs a-miR-634</b>	3,1578348	0,00342271
<b>hs a-miR-4483</b>	3,13413044	0,00364131
<b>hs a-mir-205</b>	-3,12262346	0,00375216
<b>hs a-mir-185</b>	3,11367291	0,00384059
<b>hs a-mir-3188</b>	3,01857956	0,00491073
<b>hs a-miR-4697-5p</b>	3,01665334	0,00493508
<b>hs a-mir-1253</b>	2,98776561	0,00531424
<b>hs a-miR-6831-5p</b>	2,98519807	0,00534924
<b>hs a-miR-3936</b>	2,98194173	0,00539394
<b>hs a-mir-1182</b>	2,97804808	0,00544786
<b>hs a-mir-4417</b>	2,94114914	0,00598468
<b>hs a-mir-105-1</b>	2,93155851	0,00613216
<b>hs a-mir-105-2</b>	2,93155851	0,00613216
<b>hs a-mir-3186</b>	-2,92740704	0,00619705
<b>hs a-mir-181b-1</b>	-2,92697195	0,00620389
<b>hs a-mir-3119-1</b>	-2,90058529	0,00663218
<b>hs a-mir-6827</b>	2,86458387	0,00726152
<b>hs a-mir-489</b>	2,84887388	0,00755335
<b>hs a-miR-1306-3p</b>	2,82749612	0,00796818
<b>hs a-miR-597-3p</b>	2,81695211	0,00818055
<b>hs a-mir-548at</b>	2,78683304	0,00881675
<b>hs a-miR-548au-5p</b>	2,7619941	0,0093759
<b>hs a-miR-548ae</b>	2,74048551	0,00988665





## 8. BIBLIOGRAFÍA



## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Sociedad Española de Oncología Médica SEOM. Las cifras de cáncer en España. Sociedad Española de Oncología Médica; 2017.
2. Estimaciones de la incidencia y la supervivencia del cáncer en España y su situación en Europa [database on the Internet]. Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN). 2014 [cited 05/11/2017]. Available from: <http://redecn.org/es/index.cfm>.
3. Estadística de Defunciones [database on the Internet]. Instituto Nacional de Estadística (INE). [cited 05/11/2017]. Available from: [http://www.ine.es/dyngs/INEbase/es/operacion.htm?c=Estadistica\\_C&cid=1254736176780&menu=resultados&idp=1254735573175](http://www.ine.es/dyngs/INEbase/es/operacion.htm?c=Estadistica_C&cid=1254736176780&menu=resultados&idp=1254735573175).
4. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, *et al.* Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013;49(6):1374-403. Epub 2013/03/15.
5. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: International Agency for Research on Cancer. CancerBase [database on the Internet]. GLOBOCAN. 2013 [cited 2017]. Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
6. Marquez-Rodas I, Pollan M, Escudero MJ, Ruiz A, Martin M, Santaballa A, *et al.* Frequency of breast cancer with hereditary risk features in Spain: Analysis from GEICAM "El Alamo III" retrospective study. *PLoS One*. 2017;12(10):e0184181. Epub 2017/10/07.
7. Ravdin PM CK, Howlader N, Berg CD, Chlebowski RT, Feuer EJ, *et al.* The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. *N Engl J Med*. 2007;356 (16):1670-4.
8. Depypere H, Desreux J, Perez-Lopez FR, Ceausu I, Erel CT, Lambrinoudaki I, *et al.* EMAS position statement: individualized breast cancer screening versus population-based mammography screening programmes. *Maturitas*. 2014;79(4):481-6. Epub 2014/10/04.
9. Schousboe JT, Kerlikowske K, Loh A, Cummings SR. Personalizing mammography by breast density and other risk factors for breast cancer: analysis of health benefits and cost-effectiveness. *Ann Intern Med*. 2011;155(1):10-20. Epub 2011/07/06.
10. Cardoso F, Costa A, Senkus E, Aapro M, Andre F, Barrios CH, *et al.* 3rd ESO-ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 3). *Ann Oncol*. 2017;28(1):16-33. Epub 2017/02/09.
11. Lopez-Abente G, Aragoes N, Perez-Gomez B, Pollan M, Garcia-Perez J, Ramis R, *et al.* Time trends in municipal distribution

patterns of cancer mortality in Spain. *BMC Cancer*. 2014;14:535. Epub 2014/07/26.

12. Lopez-Abente G, Mispireta S, Pollan M. Breast and prostate cancer: an analysis of common epidemiological features in mortality trends in Spain. *BMC Cancer*. 2014;14:874. Epub 2014/11/26.

13. Parsa Y, Mirmalek SA, Kani FE, Aidun A, Salimi-Tabatabaee SA, Yadollah-Damavandi S, *et al.* A Review of the Clinical Implications of Breast Cancer Biology. *Electronic Physician*. 2016;8(5):2416-24.

14. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70. Epub 2000/01/27.

15. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74. Epub 2011/03/08.

16. Di Fiore PP, Pierce JH, Kraus MH, Segatto O, King CR, Aaronson SA. *erbB-2* is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science*. 1987;237(4811):178-82. Epub 1987/07/10.

17. Hunter T. Oncoprotein networks. *Cell*. 1997;88(3):333-46. Epub 1997/02/07.

18. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science*. 1999;285(5430):1028-32. Epub 1999/08/14.

19. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2010;141(7):1117-34. Epub 2010/07/07.

20. Burkhart DL, Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(9):671-82. Epub 2008/07/25.

21. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007;26(9):1324-37. Epub 2007/02/27.

22. Junttila MR, Evan GI. p53--a Jack of all trades but master of none. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(11):821-9. Epub 2009/09/25.

23. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996;86(3):353-64. Epub 1996/08/09.

24. Stuelten CH, Parent CA, Montell DJ. Cell motility in cancer invasion and metastasis: insights from simple model organisms. *Nature Reviews Cancer*. 2018;18:296.

25. Albritton JL, Miller JS. 3D bioprinting: improving in vitro models of metastasis with heterogeneous tumor microenvironments. *Dis Model Mech*. 2017;10(1):3-14. Epub 2017/01/10.

26. Berdasco M, Esteller M. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev Cell*. 2010;19(5):698-711. Epub 2010/11/16.

27. Cavallo F, De Giovanni C, Nanni P, Forni G, Lollini P-L. 2011: the immune hallmarks of cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2011;60(3):319-26.
28. Marabelle A, Routy B, Michels J, Kroemer G, Zitvogel L. Prime time for immune-checkpoint targeted therapy at ASCO 2015. *Oncoimmunology*. 2016;5(3):e1068494.
29. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:235-71. Epub 2011/01/12.
30. Mao Y, Poschke I, Kiessling R. Tumour-induced immune suppression: role of inflammatory mediators released by myelomonocytic cells. *J Intern Med*. 2014;276(2):154-70. Epub 2014/03/07.
31. Dong HP, Elstrand MB, Holth A, Silins I, Berner A, Trope CG, *et al*. NK- and B-cell infiltration correlates with worse outcome in metastatic ovarian carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2006;125(3):451-8. Epub 2006/04/15.
32. Dieci MV, Radosevic-Robin N, Fineberg S, van den Eynden G, Ternes N, Penault-Llorca F, *et al*. Update on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer, including recommendations to assess TILs in residual disease after neoadjuvant therapy and in carcinoma in situ: A report of the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer. *Semin Cancer Biol*. 2017. Epub 2017/10/13.
33. Fritz V, Fajas L. Metabolism and proliferation share common regulatory pathways in cancer cells. *Oncogene*. 2010;29(31):4369-77.
34. Bates JP, Derakhshandeh R, Jones L, Webb TJ. Mechanisms of immune evasion in breast cancer. *BMC Cancer*. 2018;18:556.
35. Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, Talib WH, Stagg J, Elkord E, *et al*. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol*. 2015;35 Suppl:S185-S98. Epub 2015/03/31.
36. Feng Y, Spezia M, Huang S, Yuan C, Zeng Z, Zhang L, *et al*. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & Diseases*. 2018;5(2):77-106.
37. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012;490(7418):61-70. Epub 2012/09/25.
38. Sever R, Brugge JS. Signal transduction in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(4). Epub 2015/04/03.

39. Lloyd-Lewis B, Harris OB, Watson CJ, Davis FM. Mammary Stem Cells: Premise, Properties, and Perspectives. *Trends Cell Biol.* 2017;27(8):556-67. Epub 2017/05/11.
40. Soteriou D, Fuchs Y. A matter of life and death: stem cell survival in tissue regeneration and tumour formation. *Nat Rev Cancer.* 2018;18(3):187-201. Epub 2018/01/20.
41. Brooks MD, Burness ML, Wicha MS. Therapeutic Implications of Cellular Heterogeneity and Plasticity in Breast Cancer. *Cell Stem Cell.* 2015;17(3):260-71. Epub 2015/09/05.
42. Inman JL, Robertson C, Mott JD, Bissell MJ. Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *Development.* 2015;142(6):1028-42. Epub 2015/03/12.
43. Suzuki H, Maruyama R, Yamamoto E, Niinuma T, Kai M. Relationship Between Noncoding RNA Dysregulation and Epigenetic Mechanisms in Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2016;927:109-35. Epub 2016/07/05.
44. Sinn HP, Kreipe H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast Care (Basel).* 2013;8(2):149-54. Epub 2014/01/15.
45. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, *et al.* Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(10):736-50. Epub 2009/05/14.
46. 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. Epub 2000/08/30.
47. Hugh J, Hanson J, Cheang MC, Nielsen TO, Perou CM, Dumontet C, *et al.* Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *J Clin Oncol.* 2009;27(8):1168-76. Epub 2009/02/11.
48. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(19):10869-74. Epub 2001/09/13.
49. Prat A, Carey LA, Adamo B, Vidal M, Taberero J, Cortes J, *et al.* Molecular features and survival outcomes of the intrinsic subtypes within HER2-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(8). Epub 2014/08/21.



50. Prat A, Fan C, Fernández A, Hoadley KA, Martinello R, Vidal M, *et al.* Response and survival of breast cancer intrinsic subtypes following multi-agent neoadjuvant chemotherapy. *BMC Medicine*. 2015;13(1):303.
51. Prat A, Lluch A, Albanell J, Barry WT, Fan C, Chacón JI, *et al.* Predicting response and survival in chemotherapy-treated triple-negative breast cancer. *British Journal Of Cancer*. 2014;111:1532.
52. Anderson WF, Rosenberg PS, Prat A, Perou CM, Sherman ME. How many etiological subtypes of breast cancer: two, three, four, or more? *J Natl Cancer Inst*. 2014;106(8). Epub 2014/08/15.
53. Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol*. 2010;28(10):1684-91. Epub 2010/03/03.
54. Cejalvo JM, de Dueñas EM, Galván P, García-Recio S, Gasión OB, Paré L, *et al.* Intrinsic Subtypes and Gene Expression Profiles in Primary and Metastatic Breast Cancer. *Cancer research*. 2017;77(9):2213-21.
55. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, *et al.* Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 2006;295(21):2492-502. Epub 2006/06/08.
56. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ, *et al.* Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol*. 2011;22(8):1736-47. Epub 2011/06/29.
57. 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. *Clin Cancer Res*. 2010;16(21):5222-32. Epub 2010/09/15.
58. Eroles P, Bosch A, Perez-Fidalgo JA, Lluch A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev*. 2012;38(6):698-707. Epub 2011/12/20.
59. Hashmi AA, Aijaz S, Khan SM, Mahboob R, Irfan M, Zafar NI, *et al.* Prognostic parameters of luminal A and luminal B intrinsic breast cancer subtypes of Pakistani patients. *World Journal of Surgical Oncology*. 2018;16:1.
60. Gao JJ, Swain SM. Luminal A Breast Cancer and Molecular Assays: A Review. *Oncologist*. 2018;23(5):556-65. Epub 2018/02/24.

61. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MC, Voduc D, Speers CH, *et al.* Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol.* 2010;28(20):3271-7. Epub 2010/05/26.
62. Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, Leung S, Voduc D, Vickery T, *et al.* Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. *Journal of Clinical Oncology.* 2009;27(8):1160-7.
63. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, *et al.* Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med.* 2001;344(11):783-92. Epub 2001/03/15.
64. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T, *et al.* Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med.* 2006;355(26):2733-43. Epub 2006/12/29.
65. Schwartzberg LS, Franco SX, Florance A, O'Rourke L, Maltzman J, Johnston S. Lapatinib plus Letrozole as First-Line Therapy for HER-2(+) Hormone Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer. *The Oncologist.* 2010;15(2):122-9.
66. von Minckwitz G, Procter M, de Azambuja E, Zardavas D, Benyunes M, Viale G, *et al.* Adjuvant Pertuzumab and Trastuzumab in Early HER2-Positive Breast Cancer. *The New England journal of medicine.* 2017;377(2):122-31.
67. 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. *Lancet Oncol.* 2012;13(1):25-32. Epub 2011/12/14.
68. Verma S, Miles D, Gianni L, Krop IE, Welslau M, Baselga J, *et al.* Trastuzumab Emtansine for HER2-Positive Advanced Breast Cancer. *The New England journal of medicine.* 2012;367(19):1783-91.
69. Krop IE, Kim SB, Martin AG, LoRusso PM, Ferrero JM, Badovinac-Crnjevic T, *et al.* Trastuzumab emtansine versus treatment of physician's choice in patients with previously treated HER2-positive metastatic breast cancer (TH3RESA): final overall survival results from a randomised open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(6):743-54. Epub 2017/05/21.
70. Prat A, Pascual T, Adamo B. Intrinsic molecular subtypes of HER2+ breast cancer. *Oncotarget.* 2017;8(43):73362-3.
71. Llombart-Cussac A, Cortes J, Pare L, Galvan P, Bermejo B, Martinez N, *et al.* HER2-enriched subtype as a predictor of pathological complete response following trastuzumab and lapatinib without chemotherapy in early-stage HER2-positive breast cancer (PAMELA):

an open-label, single-group, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(4):545-54. Epub 2017/02/28.

72. Bosch A, Eroles P, Zaragoza R, Vina JR, Lluch A. Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer Treat Rev.* 2010;36(3):206-15. Epub 2010/01/12.

73. Prat A, Adamo B, Cheang MCU, Anders CK, Carey LA, Perou CM. Molecular Characterization of Basal-Like and Non-Basal-Like Triple-Negative Breast Cancer. *The Oncologist.* 2013;18(2):123-33.

74. Kreike B, van Kouwenhove M, Horlings H, Weigelt B, Peterse H, Bartelink H, *et al.* Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res.* 2007;9(5):R65. Epub 2007/10/04.

75. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, *et al.* Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* 2007;8(5):R76. Epub 2007/05/12.

76. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, *et al.* Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol.* 2009;27(8):1160-7. Epub 2009/02/11.

77. Hennessy BT, Gonzalez-Angulo AM, Stenke-Hale K, Gilcrease MZ, Krishnamurthy S, Lee JS, *et al.* Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Res.* 2009;69(10):4116-24. Epub 2009/05/14.

78. Di Cosimo S, Baselga J. Management of breast cancer with targeted agents: importance of heterogeneity. *Nature Reviews Clinical Oncology.* 2010;7:139.

79. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2010;363(20):1938-48. Epub 2010/11/12.

80. Carey L, Winer E, Viale G, Cameron D, Gianni L. Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? *Nature Reviews Clinical Oncology.* 2010;7:683.

81. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 2010;28(16):2784-95.

82. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, *et al.* Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical

Practice Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology*. 2013;31(31):3997-4013.

83. Trivers KF, Lund MJ, Porter PL, Liff JM, Flagg EW, Coates RJ, *et al*. The epidemiology of triple-negative breast cancer, including race. *Cancer causes & control : CCC*. 2009;20(7):1071-82.

84. Gonzalez-Angulo AM, Timms KM, Liu S, Chen H, Litton JK, Potter J, *et al*. Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(5):1082-9.

85. Parise CA, Bauer KR, Brown MM, Caggiano V. Breast cancer subtypes as defined by the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) among women with invasive breast cancer in California, 1999-2004. *Breast J*. 2009;15(6):593-602. Epub 2009/09/22.

86. Anderson KN, Schwab RB, Martinez ME. Reproductive Risk Factors and Breast Cancer Subtypes: A Review of the Literature. *Breast cancer research and treatment*. 2014;144(1):1-10.

87. Phipps AI, Chlebowski RT, Prentice R, McTiernan A, Wactawski-Wende J, Kuller LH, *et al*. Reproductive History and Oral Contraceptive Use in Relation to Risk of Triple-Negative Breast Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 2011;103(6):470-7.

88. Palmer JR, Viscidi E, Troester MA, Hong C-C, Schedin P, Bethea TN, *et al*. Parity, Lactation, and Breast Cancer Subtypes in African American Women: Results from the AMBER Consortium. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 2014;106(10):dju237.

89. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, *et al*. Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clinical Cancer Research*. 2007;13(15):4429-34.

90. Lin NU, Vanderplas A, Hughes ME, Theriault RL, Edge SB, Wong Y-N, *et al*. Clinicopathological Features, Patterns of Recurrence, and Survival Among Women With Triple-Negative Breast Cancer in the National Comprehensive Cancer Network. *Cancer*. 2012;118(22):5463-72.

91. Reddy SM, Barcenas CH, Sinha AK, Hsu L, Moulder SL, Tripathy D, *et al*. Long-term survival outcomes of triple-receptor negative breast cancer survivors who are disease free at 5 years and relationship with low hormone receptor positivity. *British Journal of Cancer*. 2018;118(1):17-23.

92. Cossetti RJD, Tyldesley SK, Speers CH, Zheng Y, Gelmon KA. Comparison of Breast Cancer Recurrence and Outcome Patterns

- Between Patients Treated From 1986 to 1992 and From 2004 to 2008. *Journal of Clinical Oncology*. 2015;33(1):65-73.
93. Hubalek M, Czech T, Müller H. Biological Subtypes of Triple-Negative Breast Cancer. *Breast Care*. 2017;12(1):8-14.
94. Bareche Y, Venet D, Ignatiadis M, Aftimos P, Piccart M, Rothe F, *et al.* Unravelling triple-negative breast cancer molecular heterogeneity using an integrative multiomic analysis. *Annals of Oncology*. 2018;29(4):895-902.
95. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer*. 2007;109(1):25-32. Epub 2006/12/06.
96. Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, *et al.* Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res*. 2008;14(5):1368-76. Epub 2008/03/05.
97. Perou CM. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist*. 2011;16 Suppl 1:61-70. Epub 2011/02/10.
98. Shah SP, Roth A, Goya R, Oloumi A, Ha G, Zhao Y, *et al.* The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple negative breast cancers. *Nature*. 2012;486(7403):10.1038/nature10933.
99. Abramson VG, Lehmann BD, Ballinger TJ, Pietenpol JA. Subtyping of triple-negative breast cancer: implications for therapy. *Cancer*. 2015;121(1):8-16.
100. Isakoff SJ, Mayer EL, He L, Traina TA, Carey LA, Krag KJ, *et al.* TBCRC009: A Multicenter Phase II Clinical Trial of Platinum Monotherapy With Biomarker Assessment in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2015;33(17):1902-9.
101. Darb-Esfahani S, Denkert C, Stenzinger A, Salat C, Sinn B, Schem C, *et al.* Role of TP53 mutations in triple negative and HER2-positive breast cancer treated with neoadjuvant anthracycline/taxane-based chemotherapy. *Oncotarget*. 2016;7(42):67686-98.
102. Matros E, Wang ZC, Lodeiro G, Miron A, Iglehart JD, Richardson AL. BRCA1 promoter methylation in sporadic breast tumors: relationship to gene expression profiles. *Breast Cancer Res Treat*. 2005;91(2):179-86. Epub 2005/05/04.
103. Turner N, Tutt A, Ashworth A. Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(10):814-9. Epub 2004/10/29.
104. Weigman VJ, Chao H-H, Shabalín AA, He X, Parker JS, Nordgard SH, *et al.* Basal-like Breast cancer DNA copy number losses identify genes involved in genomic instability, response to therapy, and

patient survival. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2012;133(3):865-80.

105. Yam C, Mani SA, Moulder SL. Targeting the Molecular Subtypes of Triple Negative Breast Cancer: Understanding the Diversity to Progress the Field. *Oncologist*. 2017;22(9):1086-93. Epub 2017/06/01.

106. Vollebergh MA, Lips EH, Nederlof PM, Wessels LFA, Schmidt MK, van Beers EH, *et al*. An aCGH classifier derived from BRCA1-mutated breast cancer and benefit of high-dose platinum-based chemotherapy in HER2-negative breast cancer patients. *Annals of Oncology*. 2011;22(7):1561-70.

107. Cerrato A, Morra F, Celetti A. Use of poly ADP-ribose polymerase [PARP] inhibitors in cancer cells bearing DDR defects: the rationale for their inclusion in the clinic. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*. 2016;35:179.

108. Muvarak NE, Chowdhury K, Xia L, Robert C, Choi EY, Cai Y, *et al*. Enhancing the Cytotoxic Effects of PARP Inhibitors with DNA Demethylating Agents – A Potential Therapy for Cancer. *Cancer cell*. 2016;30(4):637-50.

109. Tutt A, Tovey H, Cheang MCU, Kernaghan S, Kilburn L, Gazinska P, *et al*. Carboplatin in BRCA1/2-mutated and triple-negative breast cancer BRCAness subgroups: the TNT Trial. *Nat Med*. 2018;24(5):628-37. Epub 2018/05/02.

110. Robson M, Im SA, Senkus E, Xu B, Domchek SM, Masuda N, *et al*. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med*. 2017;377(6):523-33. Epub 2017/06/06.

111. McArthur HL. Innovations and Challenges in the Treatment of Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of Oncology Practice*. 2018;14(5):290-1.

112. Litton J, Rugo H, Ettl J, Hurvitz S, Gonçalves A, Lee K-H, *et al*. Abstract GS6-07: EMBRACA: A phase 3 trial comparing talazoparib, an oral PARP inhibitor, to physician's choice of therapy in patients with advanced breast cancer and a germline *BRCA* mutation. *Cancer Research*. 2018;78(4 Supplement):GS6-07-GS6-.

113. 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.

114. Chen X, Li J, Gray WH, Lehmann BD, Bauer JA, Shyr Y, *et al*. TNBCtype: A Subtyping Tool for Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Informatics*. 2012;11:CIN.S9983.

115. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, *et al*. Identification of human triple-negative breast cancer

subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(7):2750-67.

116. Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, Covington KR, Contreras A, Fuqua SAW, *et al.* Comprehensive Genomic Analysis Identifies Novel Subtypes and Targets of Triple-negative Breast Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015;21(7):1688-98.

117. Ring BZ, Hout DR, Morris SW, Lawrence K, Schweitzer BL, Bailey DB, *et al.* Generation of an algorithm based on minimal gene sets to clinically subtype triple negative breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2016;16:143.

118. Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, Estrada MV, Johnson KN, Shyr Y, *et al.* Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLoS ONE*. 2016;11(6):e0157368.

119. Santonja A, Sánchez-Muñoz A, Lluch A, Chica-Parrado MR, Albanell J, Chacón JI, *et al.* Triple negative breast cancer subtypes and pathologic complete response rate to neoadjuvant chemotherapy. *Oncotarget*. 2018;9(41):26406-16.

120. Masuda H, Baggerly KA, Wang Y, Zhang Y, Gonzalez-Angulo AM, Meric-Bernstam F, *et al.* Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013;19(19):10.1158/078-0432.CCR-13-799.

121. Stefansson OA, Jonasson JG, Johannsson OT, Olafsdottir K, Steinarsdottir M, Valgeirsdottir S, *et al.* Genomic profiling of breast tumours in relation to BRCA abnormalities and phenotypes. *Breast Cancer Research : BCR*. 2009;11(4):R47-R.

122. Nanda R, Chow LQ, Dees EC, Berger R, Gupta S, Geva R, *et al.* Pembrolizumab in Patients With Advanced Triple-Negative Breast Cancer: Phase Ib KEYNOTE-012 Study. *J Clin Oncol*. 2016;34(21):2460-7. Epub 2016/05/04.

123. 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*. 2010;12(5):R68.

124. Yu K-D, Zhu R, Zhan M, Rodriguez AA, Yang W, Wong S, *et al.* Identification of Prognosis-Relevant Subgroups in Patients with Chemoresistant Triple Negative Breast Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013;19(10):2723-33.

125. Abouharb S, Moulder S. Metaplastic breast cancer: clinical overview and molecular aberrations for potential targeted therapy. *Curr Oncol Rep.* 2015;17(3):431. Epub 2015/02/19.
126. Gerhard R, Ricardo S, Albergaria A, Gomes M, Silva AR, Logullo AF, *et al.* Immunohistochemical features of claudin-low intrinsic subtype in metaplastic breast carcinomas. *Breast.* 2012;21(3):354-60. Epub 2012/04/03.
127. Jung SY, Kim HY, Nam BH, Min SY, Lee SJ, Park C, *et al.* Worse prognosis of metaplastic breast cancer patients than other patients with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;120(3):627-37. Epub 2010/02/10.
128. Kochhar R, Howard EM, Umbreit JN, Lau SK. Metaplastic Breast Carcinoma with Squamous Differentiation: Molecular and Clinical Analysis of Six Cases. *The Breast Journal.* 2005;11(5):367-9.
129. Basho RK, Gilcrease M, Murthy RK, Helgason T, Karp DD, Meric-Bernstam F, *et al.* Targeting the PI3K/AKT/mTOR Pathway for the Treatment of Mesenchymal Triple-Negative Breast Cancer: Evidence From a Phase 1 Trial of mTOR Inhibition in Combination With Liposomal Doxorubicin and Bevacizumab. *JAMA Oncol.* 2017;3(4):509-15. Epub 2016/11/29.
130. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(6):442-54. Epub 2002/08/22.
131. Locatelli MA, Aftimos P, Dees EC, LoRusso PM, Pegram MD, Awada A, *et al.* Phase I study of the gamma secretase inhibitor PF-03084014 in combination with docetaxel in patients with advanced triple-negative breast cancer. *Oncotarget.* 2017;8(2):2320-8.
132. Traina TA, Miller K, Yardley DA, O'Shaughnessy J, Cortes J, Awada A, *et al.* Results from a phase 2 study of enzalutamide (ENZA), an androgen receptor (AR) inhibitor, in advanced AR+ triple-negative breast cancer (TNBC). *Journal of Clinical Oncology.* 2015;33(15\_suppl):1003-.
133. Traina TA, Miller K, Yardley DA, Eakle J, Schwartzberg LS, O'Shaughnessy J, *et al.* Enzalutamide for the Treatment of Androgen Receptor-Expressing Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 2018;36(9):884-90.
134. Gucaip A, Tolaney S, Isakoff SJ, Ingle JN, Liu MC, Carey LA, *et al.* Phase II Trial of Bicalutamide in Patients with Androgen Receptor-Positive, Estrogen Receptor-Negative Metastatic Breast Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2013;19(19):5505-12.
135. J. Redig A, McAllister S. Breast cancer as a systemic disease: A view of metastasis 2013. 113-26 p.



136. Verrill M. Chemotherapy for early-stage breast cancer: a brief history. *British Journal of Cancer*. 2009;101(Suppl 1):S2-S5.
137. Bonadonna G, Valagussa P, Moliterni A, Zambetti M, Brambilla C. Adjuvant cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in node-positive breast cancer: the results of 20 years of follow-up. *N Engl J Med*. 1995;332(14):901-6. Epub 1995/04/06.
138. Fisher B, Brown AM, Dimitrov NV, Poisson R, Redmond C, Margolese RG, *et al*. Two months of doxorubicin-cyclophosphamide with and without interval reinduction therapy compared with 6 months of cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in positive-node breast cancer patients with tamoxifen-nonresponsive tumors: results from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-15. *Journal of Clinical Oncology*. 1990;8(9):1483-96.
139. Mamounas EP, Bryant J, Lembersky B, Fehrenbacher L, Sedlacek SM, Fisher B, *et al*. Paclitaxel After Doxorubicin Plus Cyclophosphamide As Adjuvant Chemotherapy for Node-Positive Breast Cancer: Results From NSABP B-28. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(16):3686-96.
140. Martin M, Rodriguez-Lescure A, Ruiz A, Alba E, Calvo L, Ruiz-Borrego M, *et al*. Randomized phase 3 trial of fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide alone or followed by Paclitaxel for early breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(11):805-14. Epub 2008/05/29.
141. Martin M, Segui MA, Anton A, Ruiz A, Ramos M, Adrover E, *et al*. Adjuvant docetaxel for high-risk, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2010;363(23):2200-10. Epub 2010/12/03.
142. Kaufmann M, von Minckwitz G, Bear HD, Buzdar A, McGale P, Bonnefoi H, *et al*. Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: new perspectives 2006. *Annals of Oncology*. 2007;18(12):1927-34.
143. Shenkier T, Weir L, Levine M, Olivotto I, Whelan T, Reyno L, *et al*. Clinical practice guidelines for the care and treatment of breast cancer: 15. Treatment for women with stage III or locally advanced breast cancer. *CMAJ : Canadian Medical Association Journal*. 2004;170(6):983-94.
144. Wolmark N, Wang J, Mamounas E, Bryant J, Fisher B. Preoperative chemotherapy in patients with operable breast cancer: nine-year results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2001(30):96-102. Epub 2002/01/05.

145. Komenaka IK, Hibbard ML, Hsu C-H, Low BG, Salganick JA, Bouton ME, *et al.* Preoperative Chemotherapy for Operable Breast Cancer Improves Surgical Outcomes in the Community Hospital Setting. *The Oncologist*. 2011;16(6):752-9.
146. Bonadonna G VP, Zucali R, Salvadori B. Primary chemotherapy in surgically resectable breast cancer *CA Cancer J Clin*. 1996;45(4):227-43.
147. Kuerer HM, Newman LA, Buzdar AU, Hunt KK, Dhingra K, Buchholz TA, *et al.* Residual metastatic axillary lymph nodes following neoadjuvant chemotherapy predict disease-free survival in patients with locally advanced breast cancer. *Am J Surg*. 1998;176(6):502-9. Epub 1999/02/02.
148. Hage JAVd, Velde CJHvd, Julien J-P, Tubiana-Hulin M, Vandervelden C, Duchateau L, *et al.* Preoperative Chemotherapy in Primary Operable Breast Cancer: Results From the European Organization for Research and Treatment of Cancer Trial 10902. *Journal of Clinical Oncology*. 2001;19(22):4224-37.
149. Minckwitz Gv, Untch M, Blohmer J-U, 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*. 2012;30(15):1796-804.
150. 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. *J Clin Oncol*. 2012;30(15):1796-804. Epub 2012/04/18.
151. von Minckwitz G, Untch M, Nuesch E, Loibl S, Kaufmann M, Kummel S, *et al.* Impact of treatment characteristics on response of different breast cancer phenotypes: pooled analysis of the German neoadjuvant chemotherapy trials. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;125(1):145-56. Epub 2010/11/03.
152. Omarini C, Guaitoli G, Pipitone S, Moscetti L, Cortesi L, Cascinu S, *et al.* Neoadjuvant treatments in triple-negative breast cancer patients: where we are now and where we are going. *Cancer Management and Research*. 2018;10:91-103.
153. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, Andre F, Tordai A, Mejia JA, *et al.* Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(8):1275-81. Epub 2008/02/06.
154. Sikov WM, Dizon DS, Strenger R, Legare RD, Theall KP, Graves TA, *et al.* Frequent Pathologic Complete Responses in

Aggressive Stages II to III Breast Cancers With Every-4-Week Carboplatin and Weekly Paclitaxel With or Without Trastuzumab: A Brown University Oncology Group Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(28):4693-700.

155. Chen XS, Nie XQ, Chen CM, Wu JY, Wu J, Lu JS, *et al*. Weekly paclitaxel plus carboplatin is an effective nonanthracycline-containing regimen as neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Ann Oncol*. 2010;21(5):961-7. Epub 2010/03/10.

156. Roy V, Pockaj BA, Allred JB, Apsey H, Northfelt DW, Nikcevich D, *et al*. A Phase II trial of docetaxel and carboplatin administered every two weeks as preoperative therapy for stage II or III breast cancer: NCCTG Study N0338. *American journal of clinical oncology*. 2013;36(6):10.1097/COC.0b013e318256f619.

157. Chang HR, Glaspy J, Allison MA, Kass FC, Elashoff R, Chung DU, *et al*. Differential response of triple-negative breast cancer to a docetaxel and carboplatin-based neoadjuvant treatment. *Cancer*. 2010;116(18):4227-37. Epub 2010/06/16.

158. Gomez SC, Gomez KAC, Garces MG, Morelos G, Alvarez JH. Neoadjuvant carboplatin and docetaxel in locally advanced triple negative breast cancer: A Hispanic trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(15\_suppl):e12554-e.

159. von Minckwitz G, Schneeweiss A, Loibl S, Salat C, Denkert C, Rezai M, *et al*. Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(7):747-56. Epub 2014/05/06.

160. 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. *Lancet Oncol*. 2016;17(3):345-56. Epub 2016/02/13.

161. Gianni L, Mansutti M, Anton A, Calvo L, Bisagni G, Bermejo B, *et al*. Comparing Neoadjuvant Nab-paclitaxel vs Paclitaxel Both Followed by Anthracycline Regimens in Women With ERBB2/HER2-Negative Breast Cancer-The Evaluating Treatment With Neoadjuvant Abraxane (ETNA) Trial: A Randomized Phase 3 Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2018;4(3):302-8. Epub 2018/01/13.

162. Gluz O, Nitz U, Liedtke C, Christgen M, Grischke EM, Forstbauer H, *et al*. Comparison of Neoadjuvant Nab-Paclitaxel+Carboplatin vs Nab-Paclitaxel+Gemcitabine in Triple-Negative Breast Cancer: Randomized WSG-ADAPT-TN Trial Results. *J Natl Cancer Inst*. 2018;110(6):628-37. Epub 2017/12/12.

163. Kuwayama T, Yamauchi H, Takano T, Tsugawa K, Sato T, Kitani A, *et al.* Primary analysis of a randomized phase II, multicenter trial: Neoadjuvant weekly nab-paclitaxel 100mg/m<sup>2</sup> followed by FE100C compared with docetaxel 75mg/m<sup>2</sup> followed by FE100C for early breast cancer in Japan. *Journal of Clinical Oncology*. 2015;33(28\_suppl):136-.
164. Kaklamani VG, Jeruss JS, Hughes E, Siziopikou K, Timms KM, Gutin A, *et al.* Phase II neoadjuvant clinical trial of carboplatin and eribulin in women with triple negative early-stage breast cancer (NCT01372579). *Breast Cancer Res Treat*. 2015;151(3):629-38. Epub 2015/05/27.
165. 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. *Ann Oncol*. 2015;26 Suppl 5:v8-30. Epub 2015/09/01.
166. Feldman LD, Hortobagyi GN, Buzdar AU, Ames FC, Blumenschein GR. Pathological assessment of response to induction chemotherapy in breast cancer. *Cancer Res*. 1986;46(5):2578-81. Epub 1986/05/01.
167. Bear HD, Anderson S, Smith RE, Geyer CE, Jr., Mamounas EP, Fisher B, *et al.* Sequential preoperative or postoperative docetaxel added to preoperative doxorubicin plus cyclophosphamide for operable breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol*. 2006;24(13):2019-27. Epub 2006/04/12.
168. 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. Epub 2014/02/18.
169. Penault-Llorca F, Abrial C, Raouf I, Cayre A, Mouret-Reynier MA, Leheurteur M, *et al.* Comparison of the prognostic significance of Chevallier and Sataloff's pathologic classifications after neoadjuvant chemotherapy of operable breast cancer. *Hum Pathol*. 2008;39(8):1221-8. Epub 2008/06/13.
170. Ogston KN, Miller ID, Payne S, Hutcheon AW, Sarkar TK, Smith I, *et al.* A new histological grading system to assess response of breast cancers to primary chemotherapy: prognostic significance and survival. *Breast*. 2003;12(5):320-7. Epub 2003/12/09.
171. Schnitt SJ, Connolly JL. Processing and evaluation of breast excision specimens. A clinically oriented approach. *Am J Clin Pathol*. 1992;98(1):125-37. Epub 1992/07/01.
172. Chevallier B, Roche H, Olivier JP, Chollet P, Hurteloup P. Inflammatory breast cancer. Pilot study of intensive induction

chemotherapy (FEC-HD) results in a high histologic response rate. *Am J Clin Oncol.* 1993;16(3):223-8. Epub 1993/06/01.

173. Sataloff DM, Mason BA, Prestipino AJ, Seinige UL, Lieber CP, Baloch Z. Pathologic response to induction chemotherapy in locally advanced carcinoma of the breast: a determinant of outcome. *J Am Coll Surg.* 1995;180(3):297-306. Epub 1995/03/01.

174. Mrózek E, Layman R, Ramaswamy B, Lustberg M, Vecchione A, Knopp MV, *et al.* Phase II Trial of Neoadjuvant Weekly Nanoparticle Albumin-Bound Paclitaxel, Carboplatin, and Biweekly Bevacizumab Therapy in Women With Clinical Stage II or III HER2-Negative Breast Cancer. *Clinical breast cancer.* 2014;14(4):228-34.

175. Guarneri V, Dieci MV, Bisagni G, Boni C, Cagossi K, Puglisi F, *et al.* Preoperative carboplatin-paclitaxel-bevacizumab in triple-negative breast cancer: final results of the phase II Ca.Pa.Be study. *Ann Surg Oncol.* 2015;22(9):2881-7. Epub 2015/01/13.

176. Nahleh ZA, Barlow WE, Hayes DF, Schott AF, Gralow JR, Sikov WM, *et al.* SWOG S0800 (NCI CDR0000636131): addition of bevacizumab to neoadjuvant nab-paclitaxel with dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide improves pathologic complete response (pCR) rates in inflammatory or locally advanced breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment.* 2016;158:485-95.

177. 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.* 2015;33(1):13-21.

178. Earl HM, Hiller L, Dunn JA, Blenkinsop C, Grybowicz L, Vallier AL, *et al.* Efficacy of neoadjuvant bevacizumab added to docetaxel followed by fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide, for women with HER2-negative early breast cancer (ARTemis): an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(6):656-66. Epub 2015/05/16.

179. Kim HR, Jung KH, Im SA, Im YH, Kang SY, Park KH, *et al.* Multicentre phase II trial of bevacizumab combined with docetaxel-carboplatin for the neoadjuvant treatment of triple-negative breast cancer (KCSG BR-0905). *Ann Oncol.* 2013;24(6):1485-90. Epub 2013/02/06.

180. Gerber B, Loibl S, Eidtmann H, Rezai M, Fasching PA, Tesch H, *et al.* Neoadjuvant bevacizumab and anthracycline-taxane-based chemotherapy in 678 triple-negative primary breast cancers; results

from the geparquinto study (GBG 44). *Ann Oncol.* 2013;24(12):2978-84. Epub 2013/10/19.

181. Telli ML, Jensen KC, Vinayak S, Kurian AW, Lipson JA, Flaherty PJ, *et al.* Phase II Study of Gemcitabine, Carboplatin, and Iniparib As Neoadjuvant Therapy for Triple-Negative and BRCA1/2 Mutation–Associated Breast Cancer With Assessment of a Tumor-Based Measure of Genomic Instability: PrECOG 0105. *Journal of Clinical Oncology.* 2015;33(17):1895-901.

182. Rugo HS, Olopade OI, DeMichele A, Yau C, van 't Veer LJ, Buxton MB, *et al.* Adaptive Randomization of Veliparib–Carboplatin Treatment in Breast Cancer. *The New England journal of medicine.* 2016;375(1):23-34.

183. Schmid P, Park YH, Muñoz-Couselo E, Kim S-B, Sohn J, Im S-A, *et al.* Pembrolizumab (pembro) + chemotherapy (chemo) as neoadjuvant treatment for triple negative breast cancer (TNBC): Preliminary results from KEYNOTE-173. *Journal of Clinical Oncology.* 2017;35(15\_suppl):556-.

184. Nanda R, Liu MC, Yau C, Asare S, Hylton N, Veer LVt, *et al.* Pembrolizumab plus standard neoadjuvant therapy for high-risk breast cancer (BC): Results from I-SPY 2. *Journal of Clinical Oncology.* 2017;35(15\_suppl):506-.

185. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, *et al.* Prospective Validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(21):2005-14. Epub 2015/09/29.

186. Cardoso F, van't Veer LJ, Bogaerts J, Slaets L, Viale G, Delalogue S, *et al.* 70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2016;375(8):717-29. Epub 2016/08/25.

187. Ellis MJ, Perou CM. The Genomic Landscape of Breast Cancer as a Therapeutic Roadmap. *Cancer discovery.* 2013;3(1):27-34.

188. Fasching PA, Brucker SY, Fehm TN, Overkamp F, Janni W, Wallwiener M, *et al.* Biomarkers in Patients with Metastatic Breast Cancer and the PRAEGNANT Study Network. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2015;75(1):41-50. Epub 2015/02/17.

189. Polasik A, Tzschaschel M, Schochter F, de Gregorio A, Friedl TWP, Rack B, *et al.* Circulating Tumour Cells, Circulating Tumour DNA and Circulating MicroRNA in Metastatic Breast Carcinoma – What is the Role of Liquid Biopsy in Breast Cancer? *Geburtshilfe und Frauenheilkunde.* 2017;77(12):1291-8.

190. Taran F-A, Schneeweiss A, Lux MP, Janni W, Hartkopf AD, Nabieva N, *et al.* Update Breast Cancer 2018 (Part 1) – Primary Breast

- Cancer and Biomarkers. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*. 2018;78(3):237-45.
191. Schmidt M, Fasching PA, Beckmann MW, Kölbl H. Biomarkers in Breast Cancer – An Update. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*. 2012;72(9):819-32.
192. Morceau F, Chateauvieux S, Gaigneaux A, Dicato M, Diederich M. Long and Short Non-Coding RNAs as Regulators of Hematopoietic Differentiation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013;14(7):14744-70.
193. Hosseinahli N, Aghapour M, Duijf PHG, Baradaran B. Treating cancer with microRNA replacement therapy: A literature review. *J Cell Physiol*. 2018;233(8):5574-88. Epub 2018/03/10.
194. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009;19(1):92-105. Epub 2008/10/29.
195. Tüfekci KU, Meuwissen RLJ, Genç Ş. The Role of MicroRNAs in Biological Processes. In: Yousef M, Allmer J, editors. *miRNomics: MicroRNA Biology and Computational Analysis*. Totowa, NJ: Humana Press; 2014. p. 15-31.
196. Norouzi-Barough L, Sarookhani MR, Sharifi M, Moghbelinejad S, Jangjoo S, Salehi R. Molecular mechanisms of drug resistance in ovarian cancer. *J Cell Physiol*. 2018;233(6):4546-62. Epub 2017/11/21.
197. Salehi M, Sharifi M. Exosomal miRNAs as novel cancer biomarkers: Challenges and opportunities. *Journal of Cellular Physiology*. 2018;233(9):6370-80.
198. Dvinge H, Git A, Graf S, Salmon-Divon M, Curtis C, Sottoriva A, *et al*. The shaping and functional consequences of the microRNA landscape in breast cancer. *Nature*. 2013;497(7449):378-82. Epub 2013/05/07.
199. Kolacinska A, Morawiec J, Fendler W, Malachowska B, Morawiec Z, Szemraj J, *et al*. Association of microRNAs and pathologic response to preoperative chemotherapy in triple negative breast cancer: preliminary report. *Mol Biol Rep*. 2014;41(5):2851-7. Epub 2014/01/29.
200. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, *et al*. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15524-9. Epub 2002/11/16.
201. Acunzo M, Romano G, Wernicke D, Croce CM. MicroRNA and cancer--a brief overview. *Adv Biol Regul*. 2015;57:1-9. Epub 2014/10/09.

202. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, *et al.* Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 2008;18(10):997-1006. Epub 2008/09/04.
203. Najafi Z, Sharifi M, Javadi G. Degradation of miR-21 induces apoptosis and inhibits cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther.* 2015;22(11):530-5. Epub 2015/10/03.
204. Nedaeinia R, Sharifi M, Avan A, Kazemi M, Rafiee L, Ghayour-Mobarhan M, *et al.* Locked nucleic acid anti-miR-21 inhibits cell growth and invasive behaviors of a colorectal adenocarcinoma cell line: LNA-anti-miR as a novel approach. *Cancer Gene Ther.* 2016;23(8):246-53. Epub 2016/07/02.
205. Chen L, Cui B, Zhang S, Chen G, Croce CM, Kipps TJ. Association Between the Proficiency of B-Cell Receptor Signaling and the Relative Expression Levels of ZAP-70, SHIP-1, and Mir-155 in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood.* 2008;112(11):3155-.
206. Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, Falconi M, Capelli P, Bersani S, *et al.* MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol.* 2006;24(29):4677-84. Epub 2006/09/13.
207. Calin GA, Croce CM. Chronic lymphocytic leukemia: interplay between noncoding RNAs and protein-coding genes. *Blood.* 2009;114(23):4761-70. Epub 2009/09/12.
208. Sharifi M, Salehi R, Gheisari Y, Kazemi M. Inhibition of microRNA miR-92a induces apoptosis and necrosis in human acute promyelocytic leukemia. *Advanced Biomedical Research.* 2014;3:61.
209. Sharifi M, Salehi R. Blockage of miR-92a-3p with locked nucleic acid induces apoptosis and prevents cell proliferation in human acute megakaryoblastic leukemia. *Cancer Gene Ther.* 2016;23(1):29-35. Epub 2015/12/15.
210. Zhao JL, Rao DS, Boldin MP, Taganov KD, O'Connell RM, Baltimore D. NF-kappaB dysregulation in microRNA-146a-deficient mice drives the development of myeloid malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(22):9184-9. Epub 2011/05/18.
211. Boldin MP, Taganov KD, Rao DS, Yang L, Zhao JL, Kalwani M, *et al.* miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *J Exp Med.* 2011;208(6):1189-201. Epub 2011/05/11.
212. Choi YJ, Lin CP, Ho JJ, He X, Okada N, Bu P, *et al.* miR-34 miRNAs provide a barrier for somatic cell reprogramming. *Nat Cell Biol.* 2011;13(11):1353-60. Epub 2011/10/25.



213. Christoffersen NR, Shalgi R, Frankel LB, Leucci E, Lees M, Klausen M, *et al.* p53-independent upregulation of miR-34a during oncogene-induced senescence represses MYC. *Cell Death Differ.* 2010;17(2):236-45. Epub 2009/08/22.
214. Corney DC, Hwang CI, Matoso A, Vogt M, Flesken-Nikitin A, Godwin AK, *et al.* Frequent downregulation of miR-34 family in human ovarian cancers. *Clin Cancer Res.* 2010;16(4):1119-28. Epub 2010/02/11.
215. Hermeking H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ.* 2010;17(2):193-9. Epub 2009/05/23.
216. Iorio MV, Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation. *Cancer J.* 2012;18(3):215-22. Epub 2012/06/01.
217. Iorio MV, Croce CM. microRNA involvement in human cancer. *Carcinogenesis.* 2012;33(6):1126-33. Epub 2012/04/12.
218. Yang H, Fu H, Xu W, Zhang X. Exosomal non-coding RNAs: a promising cancer biomarker. *Clinical chemistry and laboratory medicine.* 2016;54(12):1871-9.
219. Mirzaei H, Sahebkar A, Jaafari MR, Goodarzi M, Mirzaei HR. Diagnostic and Therapeutic Potential of Exosomes in Cancer: The Beginning of a New Tale? *J Cell Physiol.* 2017;232(12):3251-60. Epub 2016/12/15.
220. Xu L, Yang BF, Ai J. MicroRNA transport: a new way in cell communication. *J Cell Physiol.* 2013;228(8):1713-9. Epub 2013/03/06.
221. Sato-Kuwabara Y, Melo SA, Soares FA, Calin GA. The fusion of two worlds: non-coding RNAs and extracellular vesicles--diagnostic and therapeutic implications (Review). *Int J Oncol.* 2015;46(1):17-27. Epub 2014/10/24.
222. Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, Mathivanan S. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomics.* 2009;6(3):267-83. Epub 2009/06/06.
223. Li P, Kaslan M, Lee SH, Yao J, Gao Z. Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics.* 2017;7(3):789-804. Epub 2017/03/04.
224. Bell E, Taylor MA. Functional Roles for Exosomal MicroRNAs in the Tumour Microenvironment. *Computational and Structural Biotechnology Journal.* 2017;15:8-13.
225. Falcone G, Felsani A, D'Agnano I. Signaling by exosomal microRNAs in cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 2015;34(1):32.
226. King HW, Michael MZ, Gleadle JM. Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. *BMC Cancer.* 2012;12(1):421.

227. Liu Y, Luo F, Wang B, Li H, Xu Y, Liu X, *et al.* STAT3-regulated exosomal miR-21 promotes angiogenesis and is involved in neoplastic processes of transformed human bronchial epithelial cells. *Cancer Lett.* 2016;370(1):125-35. Epub 2015/11/04.
228. Li J, Yu J, Zhang H, Wang B, Guo H, Bai J, *et al.* Exosomes-Derived MiR-302b Suppresses Lung Cancer Cell Proliferation and Migration via TGFbetaRII Inhibition. *Cell Physiol Biochem.* 2016;38(5):1715-26. Epub 2016/05/11.
229. Zhou W, Fong MY, Min Y, Somlo G, Liu L, Palomares MR, *et al.* Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. *Cancer Cell.* 2014;25(4):501-15. Epub 2014/04/17.
230. Fong MY, Zhou W, Liu L, Alontaga AY, Chandra M, Ashby J, *et al.* Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis. *Nature Cell Biology.* 2015;17:183.
231. Ouyang M, Li Y, Ye S, Ma J, Lu L, Lv W, *et al.* MicroRNA profiling implies new markers of chemoresistance of triple-negative breast cancer. *PLoS One.* 2014;9(5):e96228. Epub 2014/05/03.
232. Gasparini P, Cascione L, Fassan M, Lovat F, Guler G, Balci S, *et al.* microRNA expression profiling identifies a four microRNA signature as a novel diagnostic and prognostic biomarker in triple negative breast cancers. *Oncotarget.* 2014;5(5):1174-84. Epub 2014/03/19.
233. Farazi TA, Horlings HM, Ten Hoeve JJ, Mihailovic A, Halfwerk H, Morozov P, *et al.* MicroRNA sequence and expression analysis in breast tumors by deep sequencing. *Cancer Res.* 2011;71(13):4443-53. Epub 2011/05/19.
234. Bathen TF, Geurts B, Sitter B, Fjosne HE, Lundgren S, Buydens LM, *et al.* Feasibility of MR metabolomics for immediate analysis of resection margins during breast cancer surgery. *PLoS One.* 2013;8(4):e61578. Epub 2013/04/25.
235. Claudino WM, Goncalves PH, di Leo A, Philip PA, Sarkar FH. Metabolomics in cancer: a bench-to-bedside intersection. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2012;84(1):1-7. Epub 2012/03/21.
236. Aboud OA, Weiss RH. New opportunities from the cancer metabolome. *Clin Chem.* 2013;59(1):138-46. Epub 2012/11/15.
237. Wei S, Liu L, Zhang J, Bowers J, Gowda GAN, Seeger H, *et al.* Metabolomics approach for predicting response to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Molecular Oncology.* 2013;7(3):297-307.
238. Stagg J, Divisekera U, McLaughlin N, Sharkey J, Pommey S, Denoyer D, *et al.* Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor

- growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(4):1547-52. Epub 2010/01/19.
239. Singer K, Gottfried E, Kreutz M, Mackensen A. Suppression of T-cell responses by tumor metabolites. *Cancer Immunol Immunother*. 2011;60(3):425-31. Epub 2011/01/18.
240. D'Amato NC, Rogers TJ, Gordon MA, Greene LI, Cochrane DR, Spoelstra NS, *et al*. A TDO2-AhR signaling axis facilitates anoikis resistance and metastasis in triple-negative breast cancer. *Cancer Res*. 2015;75(21):4651-64. Epub 2015/09/13.
241. Mezrich JD, Fechner JH, Zhang X, Johnson BP, Burlingham WJ, Bradfield CA. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J Immunol*. 2010;185(6):3190-8. Epub 2010/08/20.
242. Wei L, Zhu S, Li M, Li F, Wei F, Liu J, *et al*. High Indoleamine 2,3-Dioxygenase Is Correlated With Microvessel Density and Worse Prognosis in Breast Cancer. *Frontiers in Immunology*. 2018;9:724.
243. Greene LI, Bruno TC, Christenson JL, D'Alessandro A, Culp-Hill R, Torkko K, *et al*. A Role for Tryptophan-2,3-dioxygenase in CD8 T Cell Suppression and Evidence of Tryptophan Catabolism in Breast Cancer Patient Plasma. *Molecular Cancer Research*. 2018.
244. Liu H, Shen Z, Wang Z, Wang X, Zhang H, Qin J, *et al*. Increased expression of IDO associates with poor postoperative clinical outcome of patients with gastric adenocarcinoma. *Sci Rep*. 2016;6:21319. Epub 2016/02/19.
245. Ben-Haj-Ayed A, Moussa A, Ghedira R, Gabbouj S, Miled S, Bouzid N, *et al*. Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase activity and expression in nasopharyngeal carcinoma. *Immunol Lett*. 2016;169:23-32. Epub 2015/11/27.
246. Tang X, Lin CC, Spasojevic I, Iversen ES, Chi JT, Marks JR. A joint analysis of metabolomics and genetics of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2014;16(4):415. Epub 2014/08/06.
247. Lyon DE, Walter JM, Starkweather AR, Schubert CM, McCain NL. Tryptophan degradation in women with breast cancer: a pilot study. *BMC Res Notes*. 2011;4:156. Epub 2011/05/28.
248. Weinlich G, Murr C, Richardsen L, Winkler C, Fuchs D. Decreased serum tryptophan concentration predicts poor prognosis in malignant melanoma patients. *Dermatology*. 2007;214(1):8-14. Epub 2006/12/28.
249. Balic M, Schwarzenbacher D, Stanzer S, Heitzer E, Auer M, Geigl JB, *et al*. Genetic and epigenetic analysis of putative breast cancer stem cell models. *BMC Cancer*. 2013;13(1):358.

250. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, *et al.* Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One*. 2008;3(11):e3694. Epub 2008/11/13.
251. Yang N, Mosher R, Seo S, Beebe D, Friedl A. Syndecan-1 in breast cancer stroma fibroblasts regulates extracellular matrix fiber organization and carcinoma cell motility. *Am J Pathol*. 2011;178(1):325-35. Epub 2011/01/13.
252. Yang N, Friedl A. Syndecan-1-Induced ECM Fiber Alignment Requires Integrin  $\alpha\beta3$  and Syndecan-1 Ectodomain and Heparan Sulfate Chains. *PLOS ONE*. 2016;11(2):e0150132.
253. Eriksson AS, Spillmann D. The Mutual Impact of Syndecan-1 and Its Glycosaminoglycan Chains—A Multivariable Puzzle. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2012;60(12):936-42.
254. Zagorac I, Fernandez-Gaitero S, Penning R, Post H, Bueno MJ, Mouron S, *et al.* In vivo phosphoproteomics reveals kinase activity profiles that predict treatment outcome in triple-negative breast cancer. *Nature Communications*. 2018;9(1):3501.
255. Ehmsen S, Hansen LT, Bak M, Brasch-Andersen C, Ditzel HJ, Leth-Larsen R. S100A14 is a novel independent prognostic biomarker in the triple-negative breast cancer subtype. *Int J Cancer*. 2015;137(9):2093-103. Epub 2015/04/29.
256. Sharon E, Streicher H, Goncalves P, Chen HX. Immune checkpoint inhibitors in clinical trials. *Chin J Cancer*. 2014;33(9):434-44. Epub 2014/09/06.
257. Criscitiello C, Curigliano G. Immunotherapy of Breast Cancer. *Prog Tumor Res*. 2015;42:30-43. Epub 2015/09/18.
258. Obeid E, Nanda R, Fu YX, Olopade OI. The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression (review). *Int J Oncol*. 2013;43(1):5-12. Epub 2013/05/16.
259. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004;25(12):677-86. Epub 2004/11/09.
260. Dm S, Schäfer I, Koch R, Singh A, Handgretinger R, Rieber N, *et al.* Functional Assessment of Myeloid-Derived Suppressor Cells , Mesenchymal Stromal Cells , and Regulatory T Cells for the Control of T Cell Function : Implications for Graft- versus-Host Disease. *Annals of Hematology & Oncology*. 2017;4(1):1-8.
261. Plitas G, Konopacki C, Wu K, Bos PD, Morrow M, Putintseva EV, *et al.* Regulatory T Cells Exhibit Distinct Features in Human Breast Cancer. *Immunity*. 2016;45(5):1122-34. Epub 2016/11/17.

262. Decker T, Fischer G, Bucke W, Bucke P, Stotz F, Gruneberger A, *et al.* Increased number of regulatory T cells (T-regs) in the peripheral blood of patients with Her-2/neu-positive early breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012;138(11):1945-50. Epub 2012/07/05.
263. Ladoire S, Arnould L, Apetoh L, Coudert B, Martin F, Chauffert B, *et al.* Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating foxp3+ regulatory T cells. *Clin Cancer Res.* 2008;14(8):2413-20. Epub 2008/04/17.
264. Mahmoud SM, Lee AH, Paish EC, Macmillan RD, Ellis IO, Green AR. The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;132(2):545-53. Epub 2011/06/15.
265. Mao Y, Qu Q, Chen X, Huang O, Wu J, Shen K. The Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE.* 2016;11(4):e0152500.
266. Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, *et al.* Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol.* 2006;24(34):5373-80. Epub 2006/12/01.
267. Ladoire S, Mignot G, Dabakuyo S, Arnould L, Apetoh L, Rebe C, *et al.* In situ immune response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer predicts survival. *J Pathol.* 2011;224(3):389-400. Epub 2011/03/26.
268. Bronte V, Brandau S, Chen SH, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, *et al.* Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun.* 2016;7:12150. Epub 2016/07/07.
269. Damuzzo V, Pinton L, Desantis G, Solito S, Marigo I, Bronte V, *et al.* Complexity and challenges in defining myeloid-derived suppressor cells. *Cytometry B Clin Cytom.* 2015;88(2):77-91. Epub 2014/12/17.
270. Dumitru CA, Moses K, Trellakis S, Lang S, Brandau S. Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. *Cancer Immunol Immunother.* 2012;61(8):1155-67. Epub 2012/06/14.
271. Ugel S, De Sanctis F, Mandruzzato S, Bronte V. Tumor-induced myeloid deviation: when myeloid-derived suppressor cells meet tumor-associated macrophages. *J Clin Invest.* 2015;125(9):3365-76. Epub 2015/09/02.

272. Casacuberta-Serra S, Pares M, Golbano A, Coves E, Espejo C, Barquinero J. Myeloid-derived suppressor cells can be efficiently generated from human hematopoietic progenitors and peripheral blood monocytes. *Immunol Cell Biol.* 2017;95(6):538-48. Epub 2017/01/22.
273. Heine A, Held SAE, Schulte-Schrepping J, Wolff JFA, Klee K, Ulas T, *et al.* Generation and functional characterization of MDSC-like cells. *OncoImmunology.* 2017;6(4):e1295203.
274. Lechner MG, Liebertz DJ, Epstein AL. Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol.* 2010;185(4):2273-84. Epub 2010/07/21.
275. Draghiciu O, Lubbers J, Nijman HW, Daemen T. Myeloid derived suppressor cells-An overview of combat strategies to increase immunotherapy efficacy. *Oncoimmunology.* 2015;4(1):e954829. Epub 2015/05/08.
276. Solito S, Pinton L, Mandruzzato S. In Brief: Myeloid-derived suppressor cells in cancer. *J Pathol.* 2017;242(1):7-9. Epub 2017/01/18.
277. Umansky V, Blattner C, Gebhardt C, Utikal J. The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) in Cancer Progression. *Vaccines (Basel).* 2016;4(4). Epub 2016/11/10.
278. Mabuchi S, Yokoi E, Komura N, Kimura T. Myeloid-derived suppressor cells and their role in gynecological malignancies. *Tumour Biol.* 2018;40(7):1010428318776485. Epub 2018/08/04.
279. Zhang C, Wang S, Liu Y, Yang C. Epigenetics in myeloid derived suppressor cells: a sheathed sword towards cancer. *Oncotarget.* 2016;7(35):57452-63.
280. Cui TX, Kryczek I, Zhao L, Zhao E, Kuick R, Roh MH, *et al.* Myeloid-derived suppressor cells enhance stemness of cancer cells by inducing microRNA101 and suppressing the corepressor CtBP2. *Immunity.* 2013;39(3):611-21. Epub 2013/09/10.
281. Florcken A, Takvorian A, Singh A, Gerhardt A, Ostendorf BN, Dorken B, *et al.* Myeloid-derived suppressor cells in human peripheral blood: Optimized quantification in healthy donors and patients with metastatic renal cell carcinoma. *Immunol Lett.* 2015;168(2):260-7. Epub 2015/10/16.
282. Gabbitass RF, Annels NE, Stocken DD, Pandha HA, Middleton GW. Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60(10):1419-30. Epub 2011/06/07.

283. Kleivi Sahlberg K, Bottai G, Naume B, Burwinkel B, Calin GA, Borresen-Dale AL, *et al.* A serum microRNA signature predicts tumor relapse and survival in triple-negative breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2015;21(5):1207-14. Epub 2014/12/31.
284. West NR, Kost SE, Martin SD, Milne K, Deleeuw RJ, Nelson BH, *et al.* Tumour-infiltrating FOXP3(+) lymphocytes are associated with cytotoxic immune responses and good clinical outcome in oestrogen receptor-negative breast cancer. *Br J Cancer.* 2013;108(1):155-62. Epub 2012/11/22.
285. Cimino-Mathews A, Ye X, Meeker A, Argani P, Emens LA. Metastatic triple-negative breast cancers at first relapse have fewer tumor-infiltrating lymphocytes than their matched primary breast tumors: a pilot study. *Hum Pathol.* 2013;44(10):2055-63. Epub 2013/05/25.
286. Shang B, Liu Y, Jiang SJ, Liu Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2015;5:15179. Epub 2015/10/16.
287. Lario S, Ramirez-Lazaro MJ, Sanjuan-Herraez D, Brunet-Vega A, Pericay C, Gombau L, *et al.* Plasma sample based analysis of gastric cancer progression using targeted metabolomics. *Sci Rep.* 2017;7(1):17774. Epub 2017/12/21.
288. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, *et al.* The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol.* 2015;26(2):259-71. Epub 2014/09/13.
289. Gendoo DM RN, Schroder MS, Pare L, Parker JS, Prat A, Haibe-Kains B. *genefu*: Computation of Gene Expression-Based Signatures in Breast Cancer. R package version 2.12.0. 2015.
290. Cailleau R, Young R, Olive M, Reeves WJ, Jr. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst.* 1974;53(3):661-74. Epub 1974/09/01.
291. Martínez-Carpio PA NMM. El cultivo celular en la investigación básica del cáncer de mama. *Rev Oncol.* 2003;5(4):184-91.
292. Zou H, Hastie T. Regularization and variable selection via the elastic net. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology).* 2005;67(2):301-20.
293. Garcia-García F, Panadero J, Dopazo J, Montaner D. Integrated gene set analysis for microRNA studies. *Bioinformatics.* 2016;32(18):2809-16. Epub 2016/06/22.
294. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, *et al.* PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative

phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet.* 2003;34(3):267-73. Epub 2003/06/17.

295. Mi H, Huang X, Muruganujan A, Tang H, Mills C, Kang D, *et al.* PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D183-D9. Epub 2016/12/03.

296. The Gene Ontology C. Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D331-D8. Epub 2016/12/03.

297. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, *et al.* Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet.* 2000;25(1):25-9. Epub 2000/05/10.

298. Carbon S, Ireland A, Mungall CJ, Shu S, Marshall B, Lewis S, *et al.* AmiGO: online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics.* 2009;25(2):288-9. Epub 2008/11/27.

299. World Medical A. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA.* 2013;310(20):2191-4. Epub 2013/10/22.

300. Sueta A, Yamamoto Y, Tomiguchi M, Takeshita T, Yamamoto-Ibusuki M, Iwase H. Differential expression of exosomal miRNAs between breast cancer patients with and without recurrence. *Oncotarget.* 2017;8(41):69934-44.

301. Malley JD, Kruppa J, Dasgupta A, Malley KG, Ziegler A. Probability machines: consistent probability estimation using nonparametric learning machines. *Methods Inf Med.* 2012;51(1):74-81. Epub 2011/09/15.

302. Janitzka S CE, Boulesteix AL. . A computationally fast variable importance test for random forests for high-dimensional data. . *Advances in Data Analysis and Classification.* 2016:1-.

303. Claessens F, Alen P, Devos A, Peeters B, Verhoeven G, Rombauts W. The androgen-specific probasin response element 2 interacts differentially with androgen and glucocorticoid receptors. *J Biol Chem.* 1996;271(32):19013-6. Epub 1996/08/09.

304. Roy U, Chakravarty G, Honer Zu Bentrup K, Mondal D. Montelukast is a potent and durable inhibitor of multidrug resistance protein 2-mediated efflux of taxol and saquinavir. *Biol Pharm Bull.* 2009;32(12):2002-9. Epub 2009/12/03.

305. Chok N, Chok S. Immune Checkpoint Inhibitors in Triple Negative Breast Cancer: What is the Evidence? *Journal of Neoplasms.* 2018;03(02).



306. Liu Z, Li M, Jiang Z, Wang X. A Comprehensive Immunologic Portrait of Triple-Negative Breast Cancer. *Translational Oncology*. 2018;11(2):311-29.
307. Bettaieb A, Paul C, Plenchette S, Shan J, Chouchane L, Ghiringhelli F. Precision medicine in breast cancer: reality or utopia? *J Transl Med*. 2017;15(1):139. Epub 2017/06/19.
308. O'Brien K, Rani S, Corcoran C, Wallace R, Hughes L, Friel AM, *et al*. Exosomes from triple-negative breast cancer cells can transfer phenotypic traits representing their cells of origin to secondary cells. *Eur J Cancer*. 2013;49(8):1845-59. Epub 2013/03/05.
309. Li Z, Qiu Y, Lu W, Jiang Y, Wang J. Immunotherapeutic interventions of Triple Negative Breast Cancer. *Journal of Translational Medicine*. 2018;16(1):147.
310. Gasco M, Shami S, Crook T. The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2002;4(2):70-6. Epub 2002/03/07.
311. Loi S, Michiels S, Salgado R, Sirtaine N, Jose V, Fumagalli D, *et al*. Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. *Ann Oncol*. 2014;25(8):1544-50. Epub 2014/03/13.
312. Ibrahim EM, Al-Foheidi ME, Al-Mansour MM, Kazkaz GA. The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2014;148(3):467-76. Epub 2014/11/02.
313. Dieci MV, Mathieu MC, Guarneri V, Conte P, Delaloge S, Andre F, *et al*. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in two phase III randomized adjuvant breast cancer trials. *Ann Oncol*. 2015;26(8):1698-704. Epub 2015/05/23.
314. Kansy BA, Concha-Benavente F, Srivastava RM, Jie HB, Shayan G, Lei Y, *et al*. PD-1 Status in CD8(+) T Cells Associates with Survival and Anti-PD-1 Therapeutic Outcomes in Head and Neck Cancer. *Cancer Res*. 2017;77(22):6353-64. Epub 2017/09/15.
315. Rasha Abd El-Ghany Khedr AAE-AG, Mohamed Ali El-Rashidy and Aliaa Atef Shama El-Deen. The Prognostic Role of Tumor-Infiltrating Lymphocytes CD8 and Foxp3 and their Impact on Recurrence in Breast Cancer Patients. *J Cancer Sci Ther*. 2016;8(7).
316. Xiaojing Yang HR, Yi Sun, Yuhui Shao, Lihua Zhang, Hongling Li, Xiulong Zhang, Xinmiao Yang, Weiwei Yu, Jie Fu. Prognostic significance of CD4/CD8 ratio in patients with breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2017;10(4):4787-93.

317. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(4):295-307. Epub 2006/03/25.
318. Lee S, Cho EY, Park YH, Ahn JS, Im YH. Prognostic impact of FOXP3 expression in triple-negative breast cancer. *Acta Oncol.* 2013;52(1):73-81. Epub 2012/10/19.
319. Yeong J, Thike AA, Lim JCT, Lee B, Li H, Wong S-C, *et al.* Higher densities of Foxp3+ regulatory T cells are associated with better prognosis in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment.* 2017;163(1):21-35.
320. Lal A, Chan L, Devries S, Chin K, Scott GK, Benz CC, *et al.* FOXP3-positive regulatory T lymphocytes and epithelial FOXP3 expression in synchronous normal, ductal carcinoma in situ, and invasive cancer of the breast. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;139(2):381-90. Epub 2013/05/29.
321. Takenaka M, Seki N, Toh U, Hattori S, Kawahara A, Yamaguchi T, *et al.* FOXP3 expression in tumor cells and tumor-infiltrating lymphocytes is associated with breast cancer prognosis. *Mol Clin Oncol.* 2013;1(4):625-32. Epub 2014/03/22.
322. Jiang D, Gao Z, Cai Z, Wang M, He J. Clinicopathological and prognostic significance of FOXP3+ tumor infiltrating lymphocytes in patients with breast cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer.* 2015;15:727. Epub 2015/10/18.
323. Xiong G, Wang C, Evers BM, Zhou BP, Xu R. RORalpha suppresses breast tumor invasion by inducing SEMA3F expression. *Cancer Res.* 2012;72(7):1728-39. Epub 2012/02/22.
324. Nara Yoon KMH, Soo Youn Cho, Seok Won Kim, Jeong Eon Lee, Seok Jin Nam, Eun Yoon Cho. Tumor-associated macrophages (TAMs) and tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in pretherapeutic breast cancer core biopsies: Anti-tumoral effect of immune cells associated with neoadjuvant chemotherapy. *Int J Clin Exp Pathol.* 2017;10(2):1738-46.
325. Xuan QJ, Wang JX, Nanding A, Wang ZP, Liu H, Lian X, *et al.* Tumor-associated macrophages are correlated with tamoxifen resistance in the postmenopausal breast cancer patients. *Pathol Oncol Res.* 2014;20(3):619-24. Epub 2014/01/15.
326. Lee MG, Villa R, Trojer P, Norman J, Yan KP, Reinberg D, *et al.* Demethylation of H3K27 regulates polycomb recruitment and H2A ubiquitination. *Science.* 2007;318(5849):447-50. Epub 2007/09/01.
327. Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature.* 2011;469(7330):343-9. Epub 2011/01/21.



