



Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

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



**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

Departamento de Medicina

Programa de Doctorado en Medicina

**El microambiente tumoral:  
Su influencia pronóstica y predictiva  
en el cáncer de mama HER2- negativo.**

Tesis doctoral para optar al Grado de Doctor de:

**Cristina Arqueros Núñez**

Directores de la tesis: Dr. Agustí Barnadas Molins y Dra. Juliana Salazar Blanco

Tutora de la tesis: Dra. Montserrat Estorch Cabrera

Barcelona, Marzo de 2021





***A León, a mis hijos Dana y Alan.***

***A mis padres.***

*“Si cada día cae dentro de cada noche,  
existe un pozo donde la claridad está aprisionada.  
Necesitamos sentarnos en el borde del pozo de la oscuridad  
y pescar la luz caída con paciencia”.*

Pablo Neruda.

Reflexión en días de Pandemia.

## **AUTORIZACIÓN DE DIRECTOR DE LA TESIS**

El Dr. Agustí Barnadas Molins y la Dra. Juliana Salazar Blanco, investigadores seniors del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Institut de Recerca-IIB de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

### **CERTIFICAN:**

Que la memoria con título: **“El microambiente tumoral: su influencia pronóstica y predictiva en el cancer de mama HER2- negativo”** presentada por Cristina Arqueros Núñez para optar al grado de Doctor en Medicina, ha estado realizada bajo nuestra dirección. Una vez finalizada, autorizamos proceda a su presentación para ser evaluada por el tribunal correspondiente.

Para que conste a los efectos oportunos, firmamos la presente en,

Barcelona a 20 de Marzo de 2020

Dr.

## **AUTORIZACIÓN DE TUTOR DE TESIS**

La Dra. Montserrat Estorch Cabrera, Profesora Titular de Medicina Nuclear del Departamento de Medicina del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Institut de Recerca-IIB de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

### **CERTIFICA:**

Que la memoria con título: **“El microambiente tumoral: su influencia pronóstica y predictiva en el cancer de mama HER2- negativo”** presentada por Cristina Arqueros Núñez para optar al grado de Doctor en Medicina, ha estado realizada bajo nuestra supervisión. Una vez finalizada, autorizamos a su presentación para ser evaluada por el tribunal correspondiente.

Para que conste a los efectos oportunos, firmamos la presente en,

Barcelona a 20 de Marzo de 2020

Dr.

## ■ AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es la culminación de una etapa en mi vida que no hubiera sido posible sin la colaboración de muchas personas que han dedicado su tiempo, sus conocimientos y me han apoyado en este largo camino que comprende la Tesis doctoral.

Quisiera empezar por mis directores de tesis, al Dr. Agustí Barnadas, quien no sólo representa el verdadero impulsor de esta tesis si no que además me dio la oportunidad de dedicarme a lo que realmente me gusta y en el lugar donde aprendí a ser Oncóloga. Además como jefe de Servicio considero destacar su humildad y paciencia, capaz de mantener la calma sin perder la crítica, “Agustí, gràcies per creure en mi”. A Juliana Salazar por todo lo que me ha ayudado de forma voluntaria tanto en horas de trabajo como fuera del horario laboral, compartiendo risas y penas, y creando un ambiente ideal de compañera de trabajo, he aprendido mucho de ti, pues sin ti todo esto no hubiera sido posible, gracias y gracias.

A la doctora Montserrat Estorch, que amablemente aceptó ser la tutora de esta tesis.

Gracias a la Dra. Montse Baiget y al Dr. David Páez, quienes fueron los que me enseñaron a lo largo de mi residencia el apasionante mundo de la investigación y me contagiaron las ganas de seguir y creer en mí misma.

Al Dr. Alberto Gallardo y Dra. Silvia Vidal, quienes de forma desinteresada y desde el primer momento que piqué a su puerta no dudaron en poner su apoyo a mi disposición, además de aportarme conocimientos tan necesarios para la investigación.

A Olga Lidia Bell Ramírez que también me ayudó a poder seguir trabajando con las muestras y me alimentó de entusiasmo en el poco tiempo que nos conocimos.

Gracias a mis compañeros de Oncología médica, especialmente a las oncólogas de las pacientes incluidas: Teresa Ramón y Cajal y Ariadna Tibau. Mención cariñosa a Ariadna, quien, sin ella saberlo, ha sido mi “mentora” en muchos aspectos que suponen compaginar la vida laboral, familiar y de investigación, un ejemplo de persona íntegra, de resiliencia, de docencia y de valores humanos. Ariadna “ em sento orgullosa de formar part del teu equip”.

A Marta Andrés, quién me ayudó a la recogida de datos.

A Sara García, quién me enseñó la capacidad de superar momentos difíciles en el mundo de la Oncología y a sonreírle a la vida.



A Ivana Sullivan, mi residente mayor, mi amiga dentro y fuera del hospital, mi “mentora”, mi hermana mayor y porque siempre has contribuido de forma incesante a mi formación.

A mi amiga Edilmar, por ser parte de la familia que elegí en el camino, porque eres lo más valioso que tengo en el Hospital de Sant Pau, porque sin ti probablemente no hubiera finalizado esta tesis. Eres un contagio de vitalidad, de energía, de inteligencia, de honestidad y de amistad incondicional.

A todos mis amigos, que siempre me han dado un gran soporte, por su incalculable cariño y atención con los que he compartido buenos momentos y también los más difíciles. Mención especial a Patri Pulgar, porque después de tantos años de amistad no solo le diste color a mi boda, también lo has hecho en la presente tesis.

A mis padres, por ser la familia que tanto necesito, por darme la oportunidad de cursar los estudios que me han llevado aquí y por vuestro soporte todos estos años.

De forma especial a mi marido León y mis hijos Dana y Alan, porque son mi TODO, mi aliento, mi motor de vida, y por su eterna paciencia.

La realización de esta Tesis ha sido también posible gracias a la ayuda de donaciones por parte de un grupo de pacientes y familiares, quienes quisieron a través de la elaboración de trabajos manuales, aportar su grano de arena a la investigación en Cáncer de mama. Esto último pudo llevarse a cabo gracias a Magda Ciendones, a quien también debo mi agradecimiento por su eterna colaboración en éste trabajo, y por su labor no solo como gestora de casos sino como vínculo humano con las pacientes.

## ■ ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS

<b>ADN</b>	Ácido DesoxiriboNucleico
<b>APC</b>	Del inglés <i>Adenomatous polyposis coli</i>
<b>ARNm</b>	Ácido RiboNucleico mensajero
<b>BRCA1</b>	Del inglés <i>BRest CAncer 1</i>
<b>BRCA2</b>	Del inglés <i>BRest CAncer 2</i>
<b>CMF</b>	Ciclofosfamida, Metrotrexate y Flurouracilo
<b>CTCs</b>	Del inglés <i>Circulating tumor cells</i>
<b>ctDNA</b>	Del inglés <i>Circulating Tumor DNA</i>
<b>DTCs</b>	Del inglés <i>Disseminated Tumor Cells</i>
<b>EGFR</b>	Del inglés <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
<b>FAC</b>	Fluorouracilo3, ciclofosfamida y doxorrubicina
<b>FDA</b>	Del inglés <i>Food and Drug Administration</i>
<b>FGF</b>	Del inglés <i>fibroblast Growth Factor</i>
<b>FOXP3+</b>	Del inglés <i>Forkhead boX P3</i>
<b>HER2</b>	Del inglés <i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
<b>HLA I</b>	Del inglés <i>Human Leukocyte Antigen class I molecules</i>
<b>HMGB1</b>	Del inglés <i>High Mobility Group Box 1 proteins</i>
<b>HR</b>	Del inglés <i>Hazard Ratio</i>
<b>IC</b>	Intervalo de confianza al 95%
<b>ISH</b>	Del inglés <i>In Situ Hybridisation</i>
<b>IRS</b>	Del inglés <i>ImmunoReactive Score</i>
<b>ki67</b>	Antígeno identificado por el anticuerpo monoclonal ki67
<b>MEC</b>	Matriz ExtraCelular
<b>MDSCs</b>	Del inglés <i>Myeloid-Derived Suppressor Cells</i>
<b>mTOR</b>	Del inglés <i>mammalian Target Of Rapamycin</i>
<b>NLR</b>	Del inglés <i>Neutrophil-to-Lymphocyte ratio</i>
<b>NK</b>	Del inglés <i>Natural Killer cells</i>
<b>NF-κB</b>	Del inglés <i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
<b>NGS</b>	Del inglés <i>Next Generation Sequencing</i>
<b>NPI</b>	Del inglés <i>Nottingham Prognostic Index</i>
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OSNA</b>	Del inglés <i>One-Step Nucleic Acid Amplification</i>
<b>pT</b>	Tamaño tumoral (estudio anatomopatológico)
<b>PAI-1</b>	Del inglés <i>Plasminogen Activator Inhibitor 1</i>
<b>PDL<sup>1/2</sup></b>	Del inglés <i>Programmed Death-ligand 1/2</i>

<b>PARP</b>	Poli ADP Ribosa Polimerasa
<b>PDGF</b>	Del inglés <i>Platelet Derived Growth Factor</i>
<b>RE</b>	Receptor de Estrógeno
<b>RP</b>	Receptor de Progesterona
<b>RRHH</b>	Receptores hormonales
<b>RCB</b>	Del inglés <i>Residual Cancer Burden</i>
<b>RCp</b>	Respuesta completa patológica
<b>RT-PCR</b>	Del inglés <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
<b>RS</b>	Del inglés <i>Recurrence Score</i>
<b>ROR</b>	Del inglés <i>Risk Of Recurrence</i>
<b>SEER</b>	Del inglés <i>Cancer incidence Public-Use Database Surveillance, Epidemiology and End Results</i>
<b>SG</b>	Supervivencia Global
<b>SLE</b>	Supervivencia Libre de Enfermedad
<b>SPARC</b>	Del inglés <i>Secreted Protein Acidic And Cysteine Rich</i>
<b>SNPs</b>	Del inglés <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
<b>αSMA</b>	Del inglés <i>α-Smooth Muscle Actin</i>
<b>TNM</b>	Estadificación/nódulos/metástasis
<b>TILs</b>	Del inglés <i>Tumor-Infiltrating Lymphocytes</i>
<b>Tregs</b>	Del inglés <i>Regulatory T cells</i>
<b>Th1/Th2</b>	Del inglés <i>linfocitos T helper tipo 1 o 2</i>
<b>TNC-C/W</b>	Del inglés <i>Tenascin-C/W</i>
<b>TSP-1</b>	Del inglés <i>Thrombospondin 1</i>
<b>T-DM1</b>	Ado-trastuzumab emtansina
<b>TGFβ</b>	Del inglés <i>Transforming Growth Factor β</i>
<b>uPA</b>	Del inglés <i>Urokinase Plasminogen Activator</i>
<b>VEGF</b>	Del inglés <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

## ■ ÍNDICE

RESUMEN .....	12
SUMMARY .....	13
1. INTRODUCCIÓN	
1.1- Epidemiología .....	16
1.2- Etiología .....	16
1.3- Factores pronósticos .....	16
1.3.1-Factores pronósticos dependientes de las pacientes .....	17
1.3.2-Factores pronósticos dependientes del tumor .....	18
1.3.2.1-Tamaño tumoral .....	18
1.3.2.2-Histología del cáncer de mama .....	18
1.3.2.3-Grado histológico .....	20
1.3.2.4-Afectación ganglionar .....	20
1.3.2.5-Invasión vascular, linfática y perineural .....	20
1.3.2.6-Índice de proliferación celular: Ki67 .....	21
1.4- Factores predictivos .....	21
1.4.1-Receptores hormonales .....	22
1.4.2-Oncogén HER2 .....	23
1.4.3-Nuevos biomarcadores .....	24
1.5- Clasificación molecular del cáncer de mama .....	25
1.6- Concepto de quimioterapia neoadyuvante .....	28
1.6.1-Impacto de la respuesta patológica completa .....	28
1.7-Estudios farmacogenéticos en el cáncer de mama .....	29
1.7.1-Concepto de Farmacogenética .....	29
1.7.2-Polimorfismos en genes relacionados con la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante en cáncer de mama .....	29
1.8-El microambiente tumoral .....	31
1.9- El gen <i>SPARC</i>	
1.9.1-Definición y función biológica .....	32
1.9.2-Implicación en procesos neoplásicos .....	33
1.9.3-Función pronóstica y predictiva en el cáncer de mama: ¿El gen <i>SPARC</i> tiene un papel en el microambiente tumoral? .....	33

1.10-Inmunidad y cáncer de mama .....	36
1.10.1.Introducción .....	36
1.10.2.Infiltrados inmunes en cáncer de mama .....	37
1.10.2.1-Subtipos celulares de TILs .....	37
1.10.2.2-Evaluación de los TILs en cáncer de mama .....	40
1.10.2.3-Relevancia clínica de los TILs .....	40
1.10.3-SPARC y respuesta inmunológica .....	42
1.10.4-Biomarcadores emergentes .....	42
2. JUSTIFICACIÓN .....	45
3. HIPÓTESIS .....	47
4. OBJETIVOS .....	49
5. MÉTODOS	
5.1-Diseño del estudio .....	52
5.2-Selección de pacientes .....	52
5.3-Procedimientos .....	52
5.4-Análisis estadístico .....	56
5.5-Consideraciones éticas .....	58
6. RESULTADOS .....	59
7. DISCUSIÓN .....	93
8. CONCLUSIONES .....	101
9. LÍNEAS DE FUTURO .....	103
10. BIBLIOGRAFÍA .....	105
11. ANEXOS	
11.1 Publicación .....	130
11.2 Datos no presentados en la tesis .....	138

## ■ RESUMEN

En el tratamiento del cáncer de mama localmente avanzado o inflamatorio se impuso el uso de citostáticos como opción de tratamiento inicial, la denominada quimioterapia neoadyuvante, de manera que muchos de los tumores previamente inoperables ahora son susceptibles de ser tratados con cirugía.

Disponemos de indicadores clínico-patológicos asociados al pronóstico de las pacientes, entre los que se incluyen el tamaño del tumor, el subtipo y grado histopatológico, la presencia de metástasis ganglionares y la invasión linfovascular. Sin embargo, su poder predictivo en la selección del enfoque terapéutico óptimo es bastante limitado. Ello es debido a que los resultados obtenidos de respuesta y toxicidad al tratamiento no son uniformes a pesar de que las pacientes pertenezcan al mismo subtipo histológico o presenten características inmunohistoquímicas similares, que traduce la existencia de una heterogeneidad en el cáncer de mama.

Los métodos de alto rendimiento permiten identificar grupos de pacientes con una evolución diferente, pero éstas no reflejan todos los factores implicados en la respuesta al tratamiento neoadyuvante. La respuesta no solo se debe a las características propias del tumor sino también a un proceso dinámico basado en las interacciones de las células tumorales con su microambiente.

A raíz de nuestro primer trabajo publicado de variantes farmacogenéticas pronósticas del gen *SPARC* en cáncer de páncreas nos dimos cuenta que éste podía tener un papel en la respuesta inmunitaria y que existían otros factores ligados al mismo que podían influir también en la respuesta a los tratamientos en otros tumores como es el cáncer de mama.

Caracterizar *in vitro* e *in vivo* el complejo funcionamiento del microambiente tumoral es de vital importancia en la mejora del manejo de las pacientes con cáncer. El objetivo de nuestro estudio ha sido identificar biomarcadores pronósticos y predictivos al tratamiento así como valorar la respuesta inmunológica del microambiente tumoral en el cáncer de mama.

## ■ SUMMARY

Treatment of locally advanced or inflammatory breast cancer, is usually based on neoadjuvant chemotherapy. For instance many cases with previously inoperable tumors, could be treated with surgery at the end of primary treatment.

Classic prognostic clinical-pathological variables for breast cancer patients include tumour size, subtype, histopathological grade, the presence of lymph node metastases and lymphovascular invasion. However, its predictive power in selecting the optimal therapeutic approach for neoadjuvant treatment is limited. Results obtained in response and toxicity to chemotherapy are not uniform, despite patients belonging to the same histological subtype or have similar immunohistochemical characteristics.

Nowadays, genomic signatures are available as prognostic biomarkers. Nonetheless, these signatures do not reflect all the factors involved in the response to neoadjuvant treatment. The response to treatment is not only based on the characteristics of the tumour itself, but also depends on a dynamic process based on interactions of the tumour cells with their microenvironment.

As a result of our first study evaluating pharmacogenetic variants of the *SPARC* gene in pancreatic cancer, we learned that *SPARC* and other factors could have a role in the immune response to treatments in other tumours such as breast cancer. The objective of our study was to identify prognostic and predictive biomarkers for treatment, as well as to assess the immune response of the tumour microenvironment in breast cancer.



## ■ 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Epidemiología

El cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente en la mujer española (2012) representando un 29% de todos los nuevos casos diagnosticados de cáncer en el sexo femenino. En España en 2018 se diagnosticaron 32.825 nuevos casos de cánceres de mama. Es la primera causa de mortalidad por cáncer en la población femenina en España, representando un 15.5 % de las muertes por cáncer en la mujer, con una prevalencia a 5 años del 40.8%. En el año 2018 se diagnosticaron en todo el mundo un total de 2.1 millones de nuevos casos de cáncer de mama en la mujer, representando uno de cada 4 casos de cáncer en la población femenina, y 630.000 mujeres murieron por dicha causa (1).

Los avances terapéuticos y la implementación de medidas de diagnóstico precoz han permitido reducir significativamente la tasa de mortalidad por cáncer de mama en Europa (2) y en América del Norte (3).

## 1.2 Etiología

En el cáncer de mama se ha observado una predisposición genética hereditaria en una escasa proporción que es inferior al 10 % de todos los casos, siendo fundamentalmente un tumor de aparición esporádica. Además, existe una fuerte interacción entre el estilo de vida, la historia reproductiva y las condiciones ambientales (4). Se estima que entre un 5 a un 10 % de los casos de cáncer de mama pueden atribuirse a mutaciones en los genes de alta penetrancia (los genes *BRCA1* y *BRCA2*) que se transmiten mediante un patrón de herencia autosómica dominante. Las mujeres portadoras de mutaciones en estos genes tiene entre un 40 y un 80 % de probabilidades de desarrollar la enfermedad a lo largo de su vida (5). La identificación de diversos genes asociados a síndromes de predisposición hereditaria al cáncer ha permitido una valoración individualizada del riesgo de desarrollar cáncer de mama y poder recomendar estrategias de prevención y cribaje con el objetivo de minimizar el riesgo de aparición de la misma, detectar la enfermedad de forma precoz, disminuyendo así su incidencia y la mortalidad (6).

Los datos publicados por la OMS en su informe Mundial sobre el Cáncer del 2014, alrededor de 1/3 de las muertes por cáncer eran debidas a causas evitables. En el caso concreto del cáncer de mama, entre los factores epidemiológicos destacan los factores asociados a una mayor exposición a las hormonas femeninas, incluidas la menarquia precoz, la menopausia tardía, la edad avanzada, el uso de tratamiento hormonal sustitutivo en la menopausia y la nuliparidad (7). El estilo de vida es una de las causas de mayor impacto. El consumo de alcohol se asocia a cáncer de mama (8) y el humo del tabaco contiene productos químicos, muchos de los cuales se sabe que son reconocidos como carcinógenos sobre el epitelio glandular mamario (9).

La obesidad estambién un factor de riesgo; se ha observado un incremento de casos de cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas con receptores hormonales positivos y en mujeres premenopáusicas de cáncer de mama de tipo triple negativo y que tienen obesidad (10). Por contra, el ejercicio y la actividad física protegen del desarrollo de cáncer de mama (11).

## 1.3 Factores pronósticos

Un factor pronóstico es toda aquella característica de la paciente y del tumor que se relaciona con la supervivencia global o con cualquier otro resultado intermedio (supervivencia libre de progresión, tiempo hasta la progresión, tasa de respuesta, etc.) independientemente del tratamiento recibido.

Las variables demográficas de la paciente, como son la edad en el momento del diagnóstico o la raza pueden influir en la evolución pero no son propiamente consideradas variables pronósticas como tal. En cambio, los factores pronósticos patológicos clásicos del cáncer de mama son: el tamaño tumoral, el tipo histológico, el grado de diferenciación histológico, la afectación ganglionar, la invasión linfocascular, la afectación perineural y la capacidad de proliferación celular.

### 1.3.1 Factores pronósticos dependientes de las pacientes

#### Edad

La incidencia del cáncer de mama se incrementa con la edad, duplicándose cada 10 años hasta la menopausia donde esta progresión disminuye, produciéndose una inflexión que no es evidente para otras formas de cáncer (12). Esta inflexión, conocida como el gancho de Clemmensen puede reflejar la superposición de dos curvas diferentes, correspondientes a los tumores RE negativos y positivos. Los tumores con RE negativos aumentan su incidencia rápidamente hasta los 50 años y después se enlentecen o disminuyen, mientras que los tumores con RE positivos aumentan rápidamente hasta los 50 años, y luego continúan aumentando a un ritmo más lento (12).

#### Edad y subtipo histopatológico

Además de los dos patrones de incidencia de edad para la expresión de RE, los datos de SEER muestran tres curvas de tasa de incidencia según el subtipo histopatológico:

En primer lugar, hay un rápido aumento de la incidencia hasta los 50 años de edad y después un aumento lento para los carcinomas de tipo ductal, tubular y lobulillar.

En segundo lugar, hay un rápido aumento hasta la edad de 50 años seguido de una nivelación de los carcinomas medulares.

Por último, hay un aumento constante, con el envejecimiento, de los carcinomas de tipo papilar y mucinosos (12).

#### Edad y subtipo molecular

La incidencia de cada subtipo molecular también varía con la edad tal como muestra la Tabla 1(13,14)

	<40 años	40-49 años	50-59 años	60-69 años	>70 años
Luminal A	2.9%	14.2%	28.3%	31.9%	22.7%
Luminal B	8.1%	20.7%	32.4%	20.8%	17.9%
Her2	5.5%	16.3%	31.6%	28.8%	17.8%
TN	10.8%	26.5%	35.5%	17.5%	10.1%

Tabla 1: Incidencia del cáncer de mama en función de la edad. Adaptación de McGuire A et al. (13). TN triple negativo; HER2 del inglés *Human Epidermal growth factor Receptor 2*;

Los casos luminales tienen una distribución predominante en las pacientes de mayor edad. Como era de esperar el subtipo más agresivo (triple negativo) es el que se ha presentado con mayor frecuencia en el grupo de mujeres menores de 40 años.

## Edad, pronóstico y supervivencia

Las mujeres diagnosticadas con cáncer de mama a los 20-30 años parecen tener peor pronóstico; las mujeres menores de 35 años muestran mayor porcentaje de tumores con RRHH negativos, invasión vascular o linfática y tumores grado III, que las mujeres de entre 35 años y 50 años. Las diferencias en el tamaño del tumor, la afectación de los ganglios linfáticos y el estado de HER2 entre mujeres jóvenes y ancianas diagnosticadas con cáncer de mama han sido menos claras (15). El efecto pronóstico negativo de la edad temprana se observa casi exclusivamente en mujeres diagnosticadas con enfermedad de bajo riesgo que no recibieron tratamiento con quimioterapia adyuvante. Estos resultados sugieren que las mujeres jóvenes con cáncer de mama, basándose únicamente en la edad, deberían ser consideradas como pacientes de alto riesgo y recibir tratamiento citotóxico adyuvante (16).

La supervivencia relativa de las pacientes de 70 años con cáncer de mama es similar a la supervivencia de las pacientes de 40-70 años. Sólo se han observado tasas de supervivencia ligeramente inferiores para las pacientes de 80 años o más años de edad, a pesar de su más escasa distribución y bajo tratamiento, lo que indica que los tumores se comportan de manera menos agresiva en las pacientes mayores (17).

## Etnia y raza

Las mujeres afroamericanas con cáncer de mama son las que presentan mayor tasa de mortalidad por cáncer de mama debido principalmente a que tienen más probabilidad de desarrollar cáncer de mama tipo triple negativo (18). Además, aunque que los resultados para la positividad de RRHH de cáncer de mama son generalmente peores comparadas con las de raza blanca, no hay diferencias significativas en resultados de supervivencia entre las pacientes afroamericanas y blancas para el cáncer de mama triple negativo. Hay dos razones potenciales para estas diferencias: 1) la discrepancia socioeconómica en los países subdesarrollados en cuanto al acceso al sistema sanitario (18,19). 2) las diferencias biológicas inherentes (genómicas tumorales) (20).

### 1.3.2 Factores pronósticos dependientes del tumor

#### 1.3.2.1 Tamaño tumoral

El tamaño de la lesión se establece en el examen anatomopatológico midiendo los dos diámetros máximos del tumor en el transcurso del estudio macroscópico y microscópico del espécimen (21). Con las medidas de la lesión infiltrante puede precisarse la categoría pT del TNM.

El pronóstico del cáncer de mama está influenciado por el tamaño tumoral independientemente de la afectación axilar, efecto que se mantiene en el seguimiento a largo plazo (22). En pacientes con tumores sin metástasis ganglionares, el aumento del tamaño tumoral se asocia a un aumento de la mortalidad específica por cáncer de mama (23,24). A su vez, el aumento del tamaño tumoral se correlaciona también con mayor riesgo de afectación ganglionar en la axila (25).

#### 1.3.2.2 Histología del cáncer de mama

El cáncer ductal invasivo o infiltrante es el tipo histológico más frecuente del cáncer de mama y representa un 80 % de los casos. Puede afectar a cualquier edad y su diagnóstico es por exclusión, al no reconocer ningún tipo específico (también denominado carcinoma de tipo no específico o no especial) (26). Tienen una supervivencia a los 10 años del 35-50%, dependiendo de las variables pronósticas clásicas. El 70-80% expresan RRHH y el 15 % son HER2 positivos. Existen otros subtipos histológicos asociados a diferentes pronósticos (Figura 1).

El carcinoma lobulillar infiltrante es el segundo subtipo más frecuente (supone un 5-10%) (27) y se diferencia del carcinoma ductal infiltrante por presentar mayor multifocalidad, multicentralidad y bilateralidad (28). Se presenta en pacientes de mayor edad, son tumores RRHH positivos de bajo grado nuclear, con una menor frecuencia presentan invasión linfovascular y suelen debutar con estadios más avanzados en el momento del diagnóstico (27,29). El perfil de diseminación también parece diferir del carcinoma ductal infiltrante observándose con más frecuencia metástasis leptomenígeas, en peritoneo, en retroperitoneo, en tracto gastrointestinal, en órganos reproductores y en hueso, en cambio, tienen un menor tropismo por el pulmón, hígado y parénquima cerebral (28). Su valor pronóstico es controvertido si lo comparamos con el carcinoma ductal infiltrante (30).

Otros subtipos histológicos menos frecuentes como el papilar puro, el tubular, el mucinoso o coloidal, los medulares típicos y adenoides quísticos se identifican como fenotipos menos agresivos mientras que los subtipos micropapilar y metaplásico parecen concebir un peor pronóstico (26).

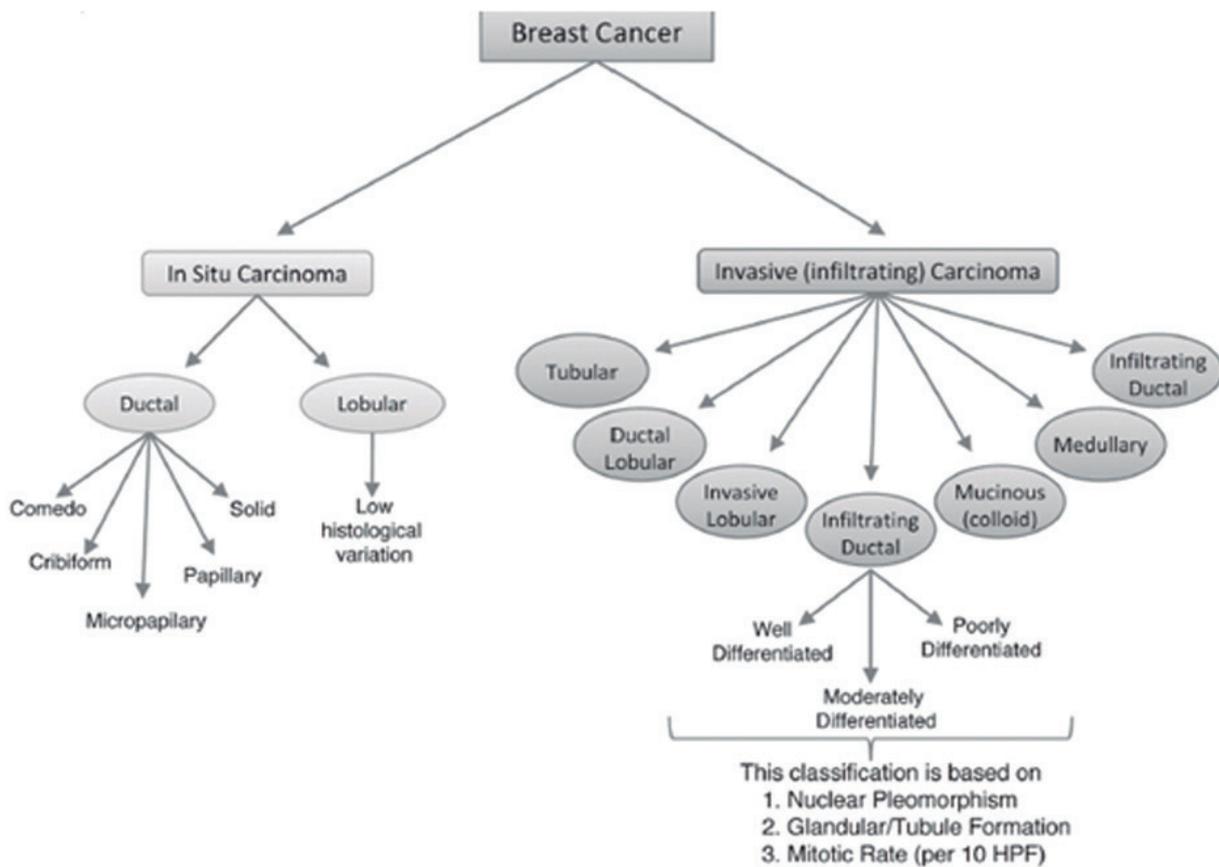


Figura 1: Clasificación histológica del cáncer de mama. Este esquema, utilizado actualmente por los clínicos, clasifica la heterogeneidad del cáncer de mama en base a las características histológicas arquitectónicas y los patrones de crecimiento; extraído de Malhotra GK et. al. (31). HPF: Del inglés *High Power Field*.

### 1.3.2.3 Grado histológico

El grado histológico está definido por el patrón de diferenciación del tumor y es un factor pronóstico en el cáncer de mama. Adquiere mayor relevancia en tumores sin afectación ganglionar. Además también representa un factor pronóstico post-neoadyuvancia aunque en asociación con el grado previo al tratamiento (32,33).

El sistema de gradación recomendado por varias instituciones (OMS, AJCC, EU, UK RECPATH y UICC) es el método de Nottingham (34). Se basa en la evaluación de parámetros morfológicos y valora tres variables: grado de pleomorfismo nuclear, porcentaje de formación de túbulos e índice mitótico, en un gradación independiente en la que se asignan valores comprendidos entre de 1 y 3. El grado final deriva de la suma de estos parámetros, correspondiendo a: Bajo grado (3-5 o 1), Grado intermedio (6-7 o 2) y Alto grado (8-9 o 3).

Entre un 30-60 % de tumores son clasificados como grado histológico II con un riesgo intermedio de recurrencia y son menos informativos de cara a una decisión clínica respecto a los grados histológicos I o III (35). Ello ha derivado la necesidad de establecer factores adicionales para seleccionar las pacientes con beneficio real a la quimioterapia complementaria, evitando así morbilidad secundaria en las pacientes que no se benefician de estas terapias. Los estudios moleculares y las plataformas génicas pueden analizar diferentes genes en un solo análisis y han identificado subgrupos moleculares con relevancia clínica directa (36).

### 1.3.2.4 Afectación ganglionar

La afectación axilar linfática es el factor pronóstico independiente más importante en el cáncer de mama. Se sabe que existe una relación directa entre el número de ganglios afectados por la enfermedad y la supervivencia, de manera que la proporción de pacientes libres de enfermedad a los 5 años del diagnóstico puede oscilar del 96 % sin afectación ganglionar al 66% con afectación de más de 4 ganglios axilares (23).

Una linfadenectomía axilar rutinaria conlleva a la identificación y el análisis patológico de, como mínimo, 6 a 10 ganglios de los niveles axilares I y II. Debido a la alta morbilidad de la disección axilar, técnicas menos agresivas, como la biopsia selectiva del ganglio centinela, han cobrado mayor importancia en la práctica clínica habitual, sobretodo en aquellos casos en que el ganglio está libre de enfermedad o presenta células tumorales aisladas (<2mm) (37-39) o bien micrometástasis (0.2-2mm) (40) o , en casos seleccionados, también con macrometástasis (>2 mm) (41).

Para el análisis del ganglio centinela se puede hacer un estudio intraoperatorio en tejido fresco, un estudio postoperatorio de la pieza quirúrgica parafinada y, actualmente, también metodología OSNA, técnica que cuantifica el número de copias de ARNm de la queratina CK 19 y que permite el análisis intraoperatorio del ganglio centinela de una forma más precisa y sensible (42).

### 1.3.2.5 Invasión vascular, linfática y perineural

#### Invasión vascular y linfática

La invasión vascular y linfática se define como la presencia de émbolos tumorales intraendoteliales en el tejido adyacente al tumor invasivo. La presencia de invasión tumoral linfática y vascular es un factor pronóstico adverso en cáncer de mama y se relaciona con un mayor riesgo de recurrencia local, menor supervivencia global e intervalo libre de enfermedad (43,44). No obstante, la invasión tumoral linfática es el principal factor de riesgo para la afectación nodal axilar, que es el más importante predictor de pronóstico en cáncer de mama.

## Invasión perineural

Se define como la presencia de nidos de carcinoma infiltrante en los vasa nervorum de los nervios periféricos a lo largo de su trayecto en la proximidad del margen tumoral. La invasión perineural es un marcador de agresividad tumoral, sin embargo, su incidencia en cáncer de mama es muy baja y su efecto sobre el pronóstico de la enfermedad es poco relevante, siendo un dato de uso no obligatorio en los protocolos de esta enfermedad aunque sí recomendable. La invasión perineural en cáncer de mama ocurre con una frecuencia diez veces menor a la invasión vascular y linfática, con una incidencia entre un 1 y 4 % dependiendo de las escasas series publicadas (45).

### 1.3.2.6 Índice de proliferación celular: Ki67

El antígeno policlonal ki67 y el anticuerpo monoclonal MIB1 se unen y se expresan en las fases del ciclo celular denominadas G1 tardía, S, M, y G2, traduciendo el estado de la proliferación celular(46). Un valor alto de ki67 se asocia a peor pronóstico y factores pronósticos adversos (alto grado histológico, afectación ganglionar y receptores hormonales negativos) (47). No obstante, la validez clínica de éste marcador de proliferación es controvertida dadas las limitaciones técnicas que dificultan su reproducibilidad, una difícil estandarización y falta de homogeneidad entre los distintos estudios para poder establecer un punto de corte y determinar el valor pronóstico.

Las últimas guías europeas adaptaron el punto de corte del índice ki67 para definir un alto o bajo riesgo proliferativo según la adaptación que se consensuó en la reunión de St Gallen de 2013 (48). donde se estableció como un factor pronóstico importante en la toma de decisiones terapéuticas en ausencia de plataformas genéticas. Aunque el valor que separa tumores de alta y baja proliferación debe adaptarse a los resultados del propio laboratorio, se definió que si la media de ki67 en un centro es del 20 %, la presencia de <10% de células con positividad nuclear para ki67 se podría considerar baja y la de más del 30 % alta, estableciendo así el límite entre baja y alta actividad proliferativa.

A parte de su valor pronóstico, puede tener valor predictivo de respuesta hormonal, al haberse observado una asociación de la eficacia del tratamiento con Letrozol aumentada en los grupos con tumores con alta expresión de ki67 (49).

La detección de marcadores mediante técnicas de inmunohistoquímica ha cobrado importancia en la práctica clínica ahora y han sido incorporados en la octava edición de la estadificación del sistema AJCC TNM para redefinir el pronóstico del cáncer de mama. A su vez las plataformas genómicas son de utilidad en su definición concretamente para aquellos tumores RE positivo y sin afectación ganglionar (50).

Los parámetros clínicos (edad, estadio tumoral, RE, RP, expresión HER2 y grado histológico) también han sido integrados en los sistemas de puntuación, que nos permiten una estimación relativa de la probabilidad de recurrencia y muerte por cáncer de mama, como por ejemplo el Nottingham Prognostic Index (NPI), el PREDICTscore y el Adjuvant! Online (51–53).

## 1.4 Factores predictivos

Un factor predictivo es toda aquella característica del tumor que se relaciona con las probabilidades de respuesta a un tratamiento específico.

Es importante diferenciar entre factor pronóstico y factor predictivo para separar aquellos pacientes que se van a beneficiar del tratamiento, de aquellos en los que la exposición a ciertos fármacos y el uso de nuevas terapias no solo no van a ser capaces de mejorar el pronóstico, la calidad de vida ni la supervivencia, sino que incluso es posible que les aporten toxicidad.

## 1.4.1 Receptores hormonales

El RE es una proteína que pertenece a la superfamilia de receptores nucleares, que incluye los receptores de la hormona tiroidea, del ácido retinoico y de la vitamina D2. El RE es un factor de transcripción que se une al ADN, pero tiene también funciones adicionales independientes de la unión a éste (54). Las dos isoformas más comúnmente expresadas del RE,  $\alpha$  y  $\beta$ , están codificadas por sendos genes, *ESR1* y *ESR2*. *ESR1* está localizado en el cromosoma 6q (25.1), mientras que *ESR2* se localiza en 14q (23-24.1) (55). En respuesta a la señalización estrogénica, el RE $\alpha$  normalmente promueve la proliferación del epitelio normal y neoplásico, por lo que se le reconoce un papel fundamental en el desarrollo del cáncer de mama, mientras que el RE $\beta$  tiene en general un efecto antiproliferativo y pro-apoptótico. El RE activado por su ligando forma dímeros y en principio se considera que es un receptor citoplasmático en su estado inactivado, pero estudios de visualización lo localizan prácticamente siempre en el núcleo celular. Hoy en día se considera que el estrógeno actúa a nivel celular a través de tres mecanismos: vía genómica, vía no genómica y post-transcripcional (56,57).

El RP también forma parte de la súperfamilia de receptores hormonales nucleares. Tras unirse a su ligando en el citoplasma, el complejo RP-progesterona dimeriza, se transloca al núcleo y actúa sobre el ADN, de manera similar a la vía genómica del RE. El gen que codifica para RP, *PGR*, se localiza en el cromosoma 11q22-q23 y su transcripción se halla regulada por el propio RE, que de esta manera, puede mediar en los efectos de la progesterona durante el desarrollo de la glándula mamaria normal así como en la génesis del cáncer de mama (58).

Mediante las técnicas de inmunohistoquímica, el método que mide el grado de expresión del RE (marcador nuclear) más empleado fue propuesto por el grupo de Allred (59) y tiene en cuenta tanto el porcentaje de células positivas (valorado del 1 al 5) como la intensidad de la tinción (valorada del 1 al 3). La puntuación final se calcula sumando los dos valores. Se considera positivo si se expresa con una puntuación igual o mayor a 3. El RP también un marcador nuclear que detecta si las células expresan la proteína receptora de la progesterona y se mide mediante el método de Allred (59), y se valora como positivo empleando el mismo umbral que el mencionado para el RE.

El 60 % de los carcinoma de mama en mujeres menores de 50 años expresan RRHH, en comparación con el 80 % en las mujeres postmenopáusicas (60). La positividad de los RRHH está inversamente relacionada con el grado histológico (61), el índice de proliferación celular ki67 (62) y es un factor de buen pronóstico reconocido (63).

La expresión de los RRHH no es solamente un factor pronóstico sino que también representa un factor predictivo de respuesta a la hormonoterapia (64). En ausencia del RE o de RP, el tratamiento hormonal apenas tiene efecto en la recurrencia ni en la supervivencia. Además el grado de respuesta al tratamiento hormonal se correlaciona con los niveles de positividad del RE y la presencia del RP parece aumentar el valor predictivo de respuesta del RE a la hormonoterapia (65). Desafortunadamente, no todas las pacientes presenta respuesta al tratamiento hormonal. Ello es debido a la presencia o adquisición de resistencias al tratamiento hormonal (66). Diferentes estudios demuestran que la resistencia al tratamiento hormonal estaría mediatizada por la vía de la *PI3K-AKT-mTOR* (67,68).

En base a datos preclínicos, los tumores con mutaciones de *ESR1* serían resistentes a la depleción estrogénica inducida por inhibidores de la aromatasa, y en menor medida también al tamoxifeno, y en cambio serían más sensibles a dosis más altas de fulvestrant u otros fármacos orales que degradan los RE. Estas mutaciones no se suelen detectar en los tumores primarios (<2%) y suelen ser más frecuentes a medida que aumenta el tiempo de exposición a inhibidores de la aromatasa en el contexto metastásico y el número de líneas hormonales recibidas (69-71).

Aunque el metanálisis del *Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group* sugiere que el beneficio a la quimioterapia en pacientes con cáncer de mama se da independientemente del estatus de los RRHH (72), estudios más recientes basados en la expresión génica (73,74); sugieren que en algunos subgrupos de pacientes la expresión de receptores hormonales se asociaría a un menor beneficio al tratamiento con quimioterapia.

## 1.4.2 Oncogen HER2

La familia de las glicoproteínas Erb-B está compuesta por cuatro miembros: HER1 o EGFR, HER2 (que no tiene ligando conocido), HER3 (que carece de actividad tirosin-cinasa) y HER4. Los receptores HER se caracterizan por ser glicoproteínas transmembrana compuestas por 3 dominios (extracelular, transmembrana e intracelular que tienen una actividad protein cinasa).

Esta familia de receptores se encuentra expresada en las células epiteliales, mesenquimales, neuronales y en sus progenitores celulares. La familia de receptores Erb-B regula la proliferación, diferenciación y la función de numerosos tejidos en humanos y una desregulación de su función está relacionada con diferentes neoplasias (75,76).

Cuando estos receptores se activan son translocados al núcleo, dónde participan en la señalización celular. La dimerización de estos receptores, ya sea entre dos diferentes miembros de la familia (heterodimerización) o entre los mismos receptores HER (homodimerización), genera una cascada de señalización capaz de activar otras vías. El gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano HER2/neu se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 y codifica la proteína HER2, un receptor transmembrana de 185 kDa con actividad tirosin cinasa (77).

La amplificación y/o sobreexpresión del receptor HER2 fue inicialmente considerado factor pronóstico negativo en todas las pacientes con cáncer de mama(78). En la era previa a la introducción de los tratamientos dirigidos, en este caso anti-HER2, la positividad mediante inmunohistoquímica de HER2 suponía peor pronóstico en las pacientes con afectación ganglionar(79). En un estudio retrospectivo que incluía 2026 pacientes sin ganglios afectos también hallaron diferencias en cuanto a tiempo de recidiva y mortalidad relacionada con el cáncer en aquellas pacientes que presentaban amplificación/sobreexpresión de HER2 mediante análisis de microarrays (80).

HER2 está sobreexpresado en alrededor del 20 % de los tumores de mama. La amplificación del gen HER2 se debe determinar rigurosamente en todos los carcinomas invasivos mediante la *hibridación in situ* (ISH), reemplazando la inmunohistoquímica o en los tumores con resultado equívoco, es decir tinción de membrana moderada (++)/+++ y completa en 10 % o > 10 % de las células tumorales. La evaluación de HER2 debe realizarse de acuerdo con las guías de la ASCO CAP (Del inglés *American Society of Clinical Oncology–College of American Pathologists*). Se define como HER2 positivo si se detecta por inmunohistoquímica (+++/+++) una tinción completa de membrana en >10% de las células tumorales invasoras y por ISH si el número de copias del gen HER2 es  $\geq 6$ , o si la ratio HER2/cromosoma 17 es  $> 2$  y las copias de HER2  $\geq 4$ , o HER2/cromosoma17 $< 2$  y copias de HER2  $\geq 6$  (81).

El principal atributo del HER2 es predecir la respuesta biológica con anticuerpos monoclonales (trastuzumab, pertuzumab, TDM1) combinados con la quimioterapia, tanto en la enfermedad avanzada como en el tratamiento neoadyuvante y adyuvante.

No obstante, el papel del gen HER2 como factor predictivo de respuesta a los citostáticos i a la hormonoterapia es controvertido: La amplificación de HER2 se ha asociado a un menor índice de respuesta a tratamientos tales como el CMF (79) o el tamoxifeno (82), en cambio, la amplificación de HER2 podría a su vez predecir una mayor sensibilidad a la quimioterapia con taxanos (83) y antraciclinas (84,85).

### 1.4.3 Nuevos biomarcadores:

#### Angiogénesis

La inducción de la neoangiogénesis por parte del tumor es uno de los procesos fundamentales en el desarrollo del cáncer y está presente desde etapas muy precoces. La formación de nuevos vasos presenta una estructura y funcionalidad aberrante que es producto del desequilibrio entre estímulos activadores e inhibitorios de diversos factores implicados, tanto de las células tumorales por medio de fenómenos autocrinos y quimiotaxis, como de las células inflamatorias peritumorales (86). La neoangiogénesis influye sobre el metabolismo del tejido tumoral; y a la inversa, el metabolismo puede influir en la inducción/inhibición de este proceso (87,88). En el cáncer de mama la aproximación terapéutica antiangiogénica más estudiada es a través de la inhibición de VEGF por el anticuerpo monoclonal bevacizumab, que ha demostrado cierto beneficio y seguridad en el tratamiento del cáncer metastásico en pacientes con una enfermedad agresiva y/o fenotipo triple negativo. Sin embargo, sigue siendo necesario encontrar biomarcadores capaces de predecir qué pacientes presentan más beneficio de este tipo de tratamiento (89).

#### uPA, PAI-1

La determinación de uPA/PAI-1 puede considerarse un factor pronóstico y predictivo en el cáncer de mama en estadios precoces (90,91). Su utilidad se circunscribiría a tumores con expresión de RRHH y sin sobreexpresión de HER2 que no presentan afectación ganglionar (92). Como factor pronóstico, unos niveles bajos de estos marcadores implican una mejor supervivencia a 10 años (93). Como factor predictivo, en este grupo de tumores, valores elevados de estos marcadores pueden ayudar a seleccionar la indicación de quimioterapia y evitarla hasta en el 39 % de los casos, sin repercusión en la supervivencia (94,95).

Actualmente uPA y PAI-1 se están evaluando en dos ensayos prospectivos, que son el NNBC-3 (96) y el WSG-Plan B (97).

Para su determinación se utiliza el test UPA/PAI-1 (FEMTELLE; Sekisui Diagnostics, Lexington, MA) es un test inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) que evalúa el potencial metastásico de un tumor de cáncer de mama. A pesar de su nivel de evidencia (IA)(98) como valor pronóstico en las pacientes con cáncer de mama con o sin afectación ganglionar, no es un test que se haya extendido en la rutina de la práctica clínica y probablemente uno de los motivos sea porque se requiere de una muestra generosa del tejido tumoral en fresco (99).

#### Células tumorales circulantes y ADN circulante tumoral

En oncología, la obtención de muestras de tejidos tumorales son invasivas, costosas, requieren tiempo y pocas veces son susceptibles de repetición. Hay varios componentes de las células tumorales que puede ser liberados a la circulación sanguínea y pueden ser evaluados mediante la obtención de una muestra de sangre, que es lo que se conoce como biopsia líquida. En estas muestras es posible identificar células tumorales circulantes (CTCs), ADN circulante tumoral (ctDNA) y los exosomas.

#### \*CTCs

Las células tumorales que se vierten a la sangre desde las masas tumorales, se conocen como Células Tumorales Circulantes (100). El proceso de vertido de las CTCs hacia el torrente sanguíneo puede ocurrir desde el inicio del proceso del desarrollo tumoral, no obstante, el proceso de extravasación es un proceso altamente ineficiente, solo unas pocas CTCs tendrán la capacidad de sobrevivir y poder desarrollar una metástasis (101).

La identificación de CTCs en pacientes de cáncer de mama constituye una nueva herramienta para estratificar el riesgo de recaída en estas pacientes (102). La identificación de las características genéticas y fenotípicas de las CTCs nos puede permitir identificar qué esquema de tratamiento es el más eficaz para cada paciente, en base no solo a las tipologías biológicas del tumor, sino también en base a las características biológicas presentes en estas CTCs (103–105). El análisis genético, funcional y epigenético de estas CTCs, nos permitirá el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas, basadas en características propias del proceso de diseminación tumoral, responsable del desarrollo de la metástasis. Todo esto constituye una parte del nuevo concepto de “biopsia líquida”(106).

### \*ctDNA

La fracción de DNA libre de células tumorales que puede contener mutaciones tumorales de un paciente se denomina ctDNA (107,108). Por lo tanto, el ctDNA en plasma constituye una fuente no invasiva de material que puede permitir la caracterización genómica de los tumores. En el ctDNA de pacientes con cáncer de mama se han detectado variantes únicas de nucleótidos somáticos derivados de tumor, alteraciones del número de copias y variantes estructurales (109,110). Por lo tanto, el ctDNA proporciona una nueva técnica para el estudio de los pacientes de cáncer de mama en términos de seguimiento de la carga tumoral, la evaluación de los mecanismos de respuestas terapéuticas y la resistencia, la detección de la enfermedad residual y la comprensión de los desafíos biológicos no resueltos planteados por la heterogeneidad tumoral y la evolución clonal (109). Todo ello plantea una serie de desafíos, el principal es la necesidad de estandarización y validación de tecnologías entre laboratorios y la incorporación de análisis basados en ctDNA en ensayos clínicos y en la práctica clínica, entre otros (111).

**Exosomas:** Éste punto será discutido en el apartado 11.4.

**TILs:** Éste punto será discutido en el apartado 11.2.

## 1.5 Clasificación molecular del cáncer de mama

### Subtipos intrínsecos del cáncer de mama (Tabla 2)

Las ciencias “ómicas” (proteómica, metabolómica, transcriptómica, epigenómica) y las firmas genéticas concretamente han permitido asistir a un cambio en la forma de entender y clasificar una enfermedad tan heterogénea y compleja como es el cáncer de mama. La dificultad de llevar estos avances a la práctica clínica habitual, ha requerido aproximaciones subrogadas a esta nueva información. Así tras definir los subtipos intrínsecos por el Dr. Charles M Perou en el año 2000 (112), se ha establecido una clasificación subrogada basada en los hallazgos de la inmunohistoquímica y la hibridación in situ. El Dr. Perou, mediante un estudio no supervisado con microarrays, definió 5 subtipos de cáncer de mama: Luminal A, Luminal B, Basal-Like, Her 2 enriquecido y Normal-Like. Posteriormente se identificó un quinto subtipo molecular denominado claudin-low (113,114). Paralelamente al estudio del Dr. Charles M. Perou y cols; se desarrollaron perfiles genéticos supervisados (estudiando genes conocidos que están implicados en el pronóstico del cáncer de mama) que indican el perfil de riesgo.

Disponemos de varias plataformas genéticas que nos orientan sobre el pronóstico y nos pueden ayudar a tomar decisiones en cuanto a la indicación de quimioterapia complementaria en tumores con receptores hormonales positivos como se comentará en un apartado posterior.

No obstante la concordancia entre los subtipos intrínsecos del cáncer de mama y los subtipos basados en marcadores inmunohistoquímicos no es exacta (115).

## Tipo Luminal

Constituye alrededor de un 75-80% de los carcinomas de mama. Se caracteriza por la alta expresión de genes asociados a las células epiteliales luminales del ducto mamario. Engloba el grupo de tumores que expresan RE. Dentro de este grupo se han definido subtipos con pronóstico y evolución diferente (116).

### Subtipo Luminal A: RE(+), RP(+), HER2 negativo, ki67 bajo.

Constituye un 50-60% de los tumores luminales. Se caracteriza por su mejor pronóstico con menor incidencia de recaída, siendo la metástasis ósea la más frecuente y presentando una menor tasa de recaídas viscerales y en el sistema nervioso central. Asimismo presentan mayor supervivencia en caso de recaída, alta tasa de respuesta a la hormonoterapia y escaso o nulo beneficio de la quimioterapia. En este sentido, en las guías clínicas recomiendan la utilización de plataformas genéticas, si están disponibles, para precisar el riesgo y ayudar a la decisión de tratamiento quimioterápico adyuvante.

### Subtipo Luminal B RE(+), RP(+/-), HER2 +/-, ki67 alto.

Constituye un 10-20% de los tumores luminales. Presenta una expresión moderada baja de receptores de estrógeno y progesterona y una mayor expresión de genes de proliferación y ciclo celular. Representa el grupo de tumores luminales de mal pronóstico. Aunque la recaída ósea sea frecuente, presentan mayor tasa de recidivas viscerales y la supervivencia desde el diagnóstico de la recidiva es menor. Se benefician de la quimioterapia y de la hormonoterapia.

### Triple negativo RE(-), RP(-), HER2 (-).

Se caracteriza por su negatividad a los receptores hormonales de estrógenos y progesterona y la ausencia de amplificación del gen HER2. Constituye un 10-15% de los cánceres de mama. A este grupo heterogéneo pertenecen los tumores con características tan diferentes como el carcinoma medular y el carcinoma metaplásico. Se han propuesto diferentes subclasificaciones (117,118), que nos permiten diferenciar cuatro subtipos (119) dentro del cáncer de mama triple negativo, como son:

### Subtipo Basal-like

Se asocia con la expresión de genes característicos de las células mioepiteliales basales del acino mamario. Por inmunohistoquímica presenta expresión de las citoqueratinas 5/6. Se asocia con la expresión de BRCA1 y de EGFR, con una alta tasa de proliferación y mal pronóstico clínico con mayor tropismo visceral y cerebral (120,121). Cada vez hay más evidencia de la respuesta de este subtipo a tratamiento que incluyen sales de platino así como terapias dirigidas como son los inhibidores de PARP (122).

### Subtipo Mesenquimal

También llamado "claudin low". Presentan alteraciones de los genes implicados en la motilidad celular, interacción extracelular con la matriz, transición epitelio-mesenquima y la respuesta a factores de crecimiento. Más de la mitad suelen corresponder al subtipo histopatológico de carcinoma metaplásico (123). Presentan activación de la vía PI3K/AKT, por lo que se han propuesto que podrían ser sensibles a los inhibidores de mTOR (117).

### Subtipo inmuno-enriquecido

Se caracterizan por la activación de genes relacionados con los procesos inmunes. Están activadas las vías de señalización de las células T, células B, las Natural Killer y las células dendríticas. También la señalización responsable de la presentación de antígenos, señalización de citocinas y la transducción de señal inmune. Se ha de considerar este subtipo histológico en la infiltración linfocitaria del estroma o el carcinoma medular. Este suele tener mejor pronóstico que los demás triples negativos.

### Subtipo Luminal Receptor de Andrógeno

Es el que presenta características más diferentes. Presenta alteración de las vías de la regulación hormonal y presentan vías de estrógenos/andrógenos diferentes a otros subtipos moleculares. Se están ensayando terapias de bloqueo androgénico, con bicalutamida (124) o enzalutamida (125).

## Tipo HER2 enriquecido: RE(-) HER2(+)

Se caracteriza por tener receptores de estrógenos negativos y alta expresión de genes relacionados con la amplificación de HER2. Se asocian a un peor pronóstico que los subtipos luminales A y B y son tributarios de un tratamiento diana específico. Representan un 5-10% de todos los cánceres de mama (115,126).

## Tipo Normal Like

Los tumores incluidos en este grupo sobreexpresan genes propios de las células mioepiteliales de la mama normal y de las células adiposas, con disminución de la expresión de genes característicos de las células luminales. Este subtipo carece de correlación clínica, por lo que no se acostumbra a usar en la práctica clínica.

SUBTIPO INTRÍNSECO	DEFINICIÓN CLÍNICO-PATOLÓGICA
Luminal A	“Luminal A like”  RE-positivo HER2-negativo Ki67 bajo <sup>a</sup> RP alto <sup>b</sup> Firma molecular de bajo riesgo (si está disponible)
Luminal B	‘Luminal B-like (HER2-negativo)’  RE-positivo HER2-negativo Y no de estos: Ki67 alto o RP bajo Firma molecular de alto riesgo (si está disponible)
	‘Luminal B-like (HER2-positivo)’  RE-positivo HER2-positivo cualquier Ki67 cualquier RP
HER 2	‘HER2-positivo (no-luminal)’  HER2-positivo RE y RP ausente
Basal-like	‘Triple-negativo’ <sup>c</sup>  RE y RP ausente <sup>c</sup> HER2-negativo <sup>c</sup>

Tabla 2: Clasificación subrogada de los subtipos intrínsecos del cáncer de mama. a Los scores deben ser interpretados según los valores del laboratorio local. b El punto de corte sugerido es del 20 %. Se necesita de una calidad técnica del laboratorio a la hora de reportar estos resultados. c Existe un solapamiento del 80% entre el “triple negativo” y el subtipo intrínseco “basal like”, pero el “triple-negativo” también incluye algunos subtipos histológicos como el carcinoma enriquecido de infiltrado linfocitario estromal (medular), carcinoma secretor, carcinoma metaplásico de bajo grado y carcinoma adenoide quístico. RE: Receptor de estrógeno; RP: Receptor de progesterona; HER2 Del inglés *Human Epidermal growth factor Receptor 2*. Adaptación del Consenso de St Gallen 2013; ESMO clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up(48)

## 1.6 Concepto de quimioterapia neoadyuvante

El tratamiento neoadyuvante, preoperatorio, primario o de inducción en el cáncer de mama se define como todo aquel tratamiento sistémico que se administra previamente al tratamiento quirúrgico en casos de cáncer de mama localmente avanzado no inflamatorio (estadio III), cáncer de mama inflamatorio y cáncer de mama operable mayor de 2 centímetros.

Los objetivos del tratamiento neoadyuvante en el cáncer de mama son esencialmente dos:

- 1- Disminuir el tamaño del tumor y erradicar la afectación axilar, esto permite poder ofrecer a la paciente un tratamiento quirúrgico menos agresivo tanto en la mama como en la axila disminuyendo la morbilidad secundaria a dichas terapias.
- 2- Mostrar la sensibilidad in vivo del cáncer a la terapia administrada como modelo de trabajo para la investigación y como oportunidad única para evaluar biomarcadores pronósticos y predictivos.

### 1.6.1- Impacto de la RCp.

La mayoría de las pacientes tratadas con quimioterapia preoperatoria experimentan una respuesta clínica y patológica pero globalmente solo el 30 % alcanzan una RCp (127).

La RCp se define como la ausencia de tumor invasivo en la mama y en los ganglios axilares en el momento de la cirugía, independientemente de la presencia de carcinoma intraductal (ypT0/is ypN0)(128). La respuesta clínica completa no siempre se correlaciona con la RCp. Los resultados de varios estudios demuestran una tasa alta de respuesta clínicas (49-93%) y una tasa baja de RCp (4%-30%). Asimismo la exploración radiológica también tiene sus limitaciones para evaluar la respuesta al tratamiento, siendo la resonancia magnética la prueba de imagen más sensible para medir la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante, aunque esta respuesta no es igual para todos los fenotipos (129-131).

Los esquemas de quimioterapia secuenciales con antraciclinas y taxanos ofrecen una tasa de RCp entre un 26% y un 34%, superiores a las que se obtenían previamente solo con antraciclinas. Los tratamientos con una duración mayor de 3 meses incluyendo de 6 a 8 ciclos de quimioterapia permiten obtener tasas de RCp superiores a los esquemas con solo 4 ciclos (34-20% vs 5-17%)(132,133).

En cuanto al valor de la RCp como parámetro subrogado para supervivencia a largo plazo sigue siendo un tema discutido. Las pacientes con cáncer de mama de tipo triple negativo y las de tipo HER2 positivo, se conoce que pueden presentar de 6 a 9 veces más riesgo de recaída si no alcanzan una RCp (134,135). En estos grupos de mayor agresividad biológica se puede observar una asociación más firme entre la RCp y los resultados a largo plazo (136). Sin embargo, el análisis agrupado de la mayoría de ensayos clínicos solo pudo identificar la RCp como objetivo subrogado para SLE y SG en un grupo seleccionado de pacientes (137), planteando dudas sobre su posible valor predictivo.

Incluso en cáncer de mama de tipo triple negativo, a pesar de haber demostrado que un incremento en la RCp se traduce en un beneficio significativo en supervivencia, se requiere de una validación en un mayor número de pacientes que el calculado previamente en los ensayos clínicos (138,139).

Por todo ello, es imprescindible seguir profundizando en un mejor conocimiento de biomarcadores y sin duda el mejor escenario lo constituye la neoadyuvancia, ya que, a diferencia de los estudios de adyuvancia, los estudios neoadyuvantes necesitan de menor tamaño muestral, son menos costosos y el objetivo principal (generalmente la RCp) se alcanza en unos meses en lugar de años, a diferencia de lo que sucede cuando el objetivo primario es supervivencia.

## **1.7 Estudios farmacogenéticos en el cáncer de mama**

### **1.7.1 Concepto de Farmacogenética**

La farmacogenética tiene como objetivo comprender la respuesta concreta a un fármaco en función de la variabilidad genética individual. Mientras que las mutaciones somáticas ocurren únicamente en el órgano afecto o en el tumor, los polimorfismos de línea germinal tienen un origen ancestral y son hereditarios. Investigar el impacto de la variación genética individual en la respuesta a los diferentes tratamientos ha dado lugar a datos muy prometedores en distintos tipos de tumor a lo largo de los años (140–143). Este enfoque personalizado de la quimioterapia es actualmente objeto de investigación e implementación no solo para reducir la tasa de toxicidades sino también para optimizar los costes. Desde el punto de vista farmacogenómico, esta búsqueda está basada en el análisis de ADN, ARN y proteínas.

No obstante, los estudios farmacogenéticos en ocasiones conducen a resultados confusos y contradictorios que obligan a ser cautos en la interpretación de los resultados.

Hay que tener muy presente que no solo la identificación de genes o de perfiles genéticos permite la selección personalizada del tratamiento para algunos pacientes. Otros biomarcadores analizados, ya sea en sangre periférica o en tumor, como son los marcadores anatomopatológicos y los inmunológicos, entre otros, también son útiles como predictores.

Es por todo ello que uno de los objetivos de la presente tesis doctoral pretende estudiar la respuesta desde un punto de vista farmacogenético, sin embargo, y teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, hemos querido dar un paso más allá correlacionando nuestras variantes polimórficas con nuevos biomarcadores con el objetivo de entender la implicación de nuestros SNPs en el microambiente tumoral y la respuesta inmunitaria.

### **1.7.2 Polimorfismos en genes relacionados con la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante en cáncer de mama**

La farmacogenética en el cáncer de mama juega un papel importante en distintos aspectos, tanto a nivel pronóstico en el momento del diagnóstico, como en la respuesta a un tratamiento específico de la que muchas veces se derivan toxicidades. Hasta hace unos años la mayor parte de la investigación ha ido dirigida a evaluar la predisposición genética de desarrollar cáncer de mama, sin embargo, se ha trabajado poco en la identificación de variables genéticas que predisponen a una respuesta concreta a las distintas terapias (Tabla 3) (144).

Drug	Gene with described variants that may affect drug efficacy or safety	Role of gene	Possible events due to genetic polymorphism
Tamoxifen	ER	Target	Primary resistance, acquired resistance, tamoxifen-stimulated growth May affect other tamoxifen benefits/risks
	CYP2D6	DME	Diminished concentrations of 4-hydroxy-N-desmethyl-tamoxifen (endoxifen); effect on efficacy or safety unknown
	SULT1A1	Elimination of active metabolites	Two-fold lower sulfation of the antiestrogenic metabolite 4-hydroxy-tamoxifen
Aromatase inhibitors	CYP19 (aromatase)	Target	May be associated with primary resistance May affect drug-related toxicity
	CYP1A2 CYP2C9 CYP3A	DME	Unknown
Cyclophosphamide	GST	Detoxifies DNA-reactive metabolites	Improved outcomes due to lower enzyme activity and greater drug availability
Methotrexate	MTHFR	Regulate the pool of intracellular folates available for nucleic acid and protein synthesis	Lower activity of the enzyme results in retention of folates, possibly increasing bone marrow sensitivity to the drug
Doxorubicin	GST	Detoxifies DNA-reactive metabolites	Improved outcomes due to lower enzyme activity and greater drug availability
	MDR	Transporter	May correlate with resistance
Epirubicin	UGT2B7	Inactivation	Unknown
Paclitaxel	CYP2C8	DME	May correlate with reduced metabolism of paclitaxel
	MDR	Transporter	May correlate with resistance
Docetaxel	CYP3A4 CYP3A5	DME	Unknown
	MDR	Transporter	May correlate with resistance
5-Fluorouracil, capecitabine	DPD	DME	Worse toxicity, especially neurotoxicity, death
	TS	Target	Increased expression correlated with worse outcomes

Tabla 3: Posibles polimorfismos que pueden influir en la eficacia y seguridad en los tratamientos más comúnmente aplicados en el tratamiento del cáncer de mama. DME: enzima metabolizadora de la droga; DPD: dihidroimidina deshidrogenasa; ER: receptor de estrógeno; GST:glutation-S-transferasa; MDR: resistencia multidroga;MHTFR: metileno tetrahidrofolato reductasa; SULT1A1: sulfotransferasa 1A1; TS: timidilato sintasa; UGT-UDP: glucuronosiltransferasa. Extraído de V Stearns et. al. (144)

La farmacogenética se ha enfocado en la identificación de SNPs en ADN germinal que se encuentran en más de un 1% de la población y que pueden afectar de forma significativa tanto a la farmacocinética como a la farmacodinámica de los tratamientos (145).

La mayoría de las publicaciones se han centrado en estudiar polimorfismos en genes implicados en procesos tales como la protección contra el estrés oxidativo, la apoptosis, la transformación oncogénica, la proliferación, la respuesta inmune, la reparación del ADN y las vías de metabolización de los fármacos implicados en el tratamiento del cáncer de mama (146–150).

De entre los estudios publicados, destacar un estudio francés (151) que demostró que los genes *ERCC1*, *BRCA1* y *SLCO1B3* podían jugar un papel como marcadores de respuesta para la quimioterapia neoadyuvante en cáncer de mama y que la combinación de *ERCC1/CYP1B1* era de particular interés en predecir respuesta para el subgrupo RE positivo.

Más recientemente, y dentro del marco del ensayo clínico PROMIX, se publicaron datos del impacto farmacogenético de Docetaxel en el tratamiento neoadyuvante del cáncer de mama, resultados de gran interés teniendo en cuenta las toxicidades que algunos pacientes presentan en la práctica clínica con este citostático (152).

Sin embargo, y como ya hemos comentado, los resultados en muchos casos son discordantes y, entre otros motivos, se postula que puede ser debido a la influencia de factores inherentes al microambiente tumoral y otros procesos epigenéticos.

## 1.8 El microambiente tumoral

La investigación basada en oncogenes y genes supresores de tumores ha revelado mucho sobre el papel de alteraciones genéticas en las vías de señalización subyacentes para la función celular normal y para la progresión tumoral. Sin embargo, está claro que las teorías de un solo gen o incluso la adquisición secuencial de las mutaciones subestiman la naturaleza de los cambios genéticos y epigenéticos en los tumores, y no tienen en cuenta la observación de que muchos genes de susceptibilidad al cáncer (por ejemplo, BRCA1, APC) muestran un alto grado de especificidad tisular en su asociación con la transformación neoplásica. Por lo tanto, el lecho celular y tisular debe conferir información adicional necesaria para entender cómo los genes mutados ejercen su acción. Cada vez hay más evidencia de la existencia de interacciones entre las células y de las células con la MEC que a su vez juegan un papel crucial en la regulación de la homeostasis y la especificidad tisular. La pérdida de esta integridad funcional es la que da lugar a los procesos neoplásicos.

Los factores de crecimiento, las hormonas, las citocinas, las moléculas de la MEC y metaloproteasas ejercen su función en cada uno de estos procesos de remodelación de la glándula mamaria (153,154) pero también tienen un papel en el cáncer de mama (155). El equipo de Fiorino y cols. (156) ha publicado recientemente datos que demuestran una relación evidente entre las modificaciones de la composición del estroma en la mama y los resultados clínicos de las pacientes. No es la primera vez que se constata como la alteración en la composición de factores tales como las metaloproteasas tiene un impacto en el pronóstico de las pacientes con cáncer de mama.

Los análisis comparativos de patrones de expresión genética de líneas celulares y de tumores de mama sugieren que la tumorigénesis dentro del tejido mamario es el resultado de distintos patrones de expresión genética que reflejan la influencia del contexto tisular en el desarrollo del cáncer de mama (157). Por todo ello el desarrollo de modelos biológicos se debe realizar en condiciones donde participe el microambiente y la comunidad de células que forman el órgano.

Hace unos años varios estudios demostraron que el cáncer de mama se origina de las células epiteliales lumbinales, pero en el desarrollo del carcinoma puede diferenciarse hacia un fenotipo de miofibroblasto (158). Por otro lado, las células mioepiteliales pueden a su vez suprimir tanto el crecimiento normal como el tumoral de las células epiteliales mamarias, y la presencia de células mioepiteliales normales residuales en los tumores se asocia con mejor pronóstico (159). Hay datos publicados que avalan el posible papel del estroma intratumoral como predictor de respuesta a la quimioterapia en pacientes afectas de cáncer de mama (160).

Por todo ello, ya se han publicado en la literatura firmas genéticas estromales que predicen resistencia a las Antraciclinas en el cáncer de mama (208). A raíz de estos hallazgos se ha propuesto una clasificación del cáncer de mama en base a su perfil genético estromal, cuyo patrón aporta una información pronóstica independiente que podría ser de utilidad clínica en el futuro (209).

El cáncer de mama no es el único escenario donde el ecosistema tumoral está cobrando importancia. En otros tumores malignos, como por ejemplo el Adenocarcinoma ductal pancreático, también se ha

observado un enriquecimiento de ciertos genes implicados en las vías de señalización del estroma que implican peor supervivencia y resistencia a ciertos tratamientos como la Gemcitabina (163).

El estroma intratumoral estimula directamente la proliferación tumoral celular secretando factores de crecimiento, hormonas y citoquinas. Su contribución en la invasión y la metástasis, así como la respuesta al tratamiento, lo realiza principalmente induciendo la transición epitelio-mesénquima, un programa epigenético muy conocido que convierte a las células en un fenotipo móvil y proteolítico (164). Las principales proteínas que se expresan a nivel del estroma intratumoral son las TSP-1, la TNC, la fibronectina, *SPARC* y  $\alpha$ -SMA, siendo además las más reportadas en su implicación en procesos oncogénicos y de respuesta a tratamiento.

En resumen, reproducir *in vitro* o *in vivo* el complejo funcionamiento del microambiente tumoral supone un reto.

## 1.9 El gen *SPARC*

### 1.9.1 Definición y función biológica

Tal como mencionábamos en apartados anteriores, la MEC es una red que determina la arquitectura tisular y proporciona el engranaje estructural necesario para las células. Es un entramado que regula la diferenciación celular, la supervivencia, la proliferación y la migración. La remodelación de la MEC está regulada por una familia de proteínas extracelulares denominadas proteínas matricelulares (165).

*SPARC*, también conocida como osteonectina o BM-40, es una glicoproteína multifuncional de 32–35 kDa que ejemplifica el tipo de proteínas que conforman la MEC (166). *SPARC* tiene una alta afinidad de unión a la albumina lo que facilita su interacción con las células de la MEC (167).

En el desarrollo de los mamíferos la expresión de *SPARC* es robusta, pero declina a medida que avanza el proceso de maduración. En la fase final de este desarrollo, *SPARC* se expresa principalmente en los tejidos donde existe una continua renovación (por ej.: el hueso o el epitelio intestinal). Algunos de los procesos donde también se induce su expresión son la cicatrización de las heridas, la angiogénesis y en el estroma durante la oncogénesis (168).

Todas estas observaciones sugieren que *SPARC* funciona como un regulador de la remodelación tisular. De hecho, los estudios con ratones deficientes en *SPARC* validan los hallazgos de que *SPARC* controla la remodelación tisular y que es necesario para la correcta maduración del colágeno de la MEC (169). Los ratones deficientes en *SPARC* suelen debutar con procesos de cataratas a edades tempranas, laxitud en la piel, osteopenia progresiva y una cola rizada, todo ello indicando defectos del ensamblaje de la MEC (166). También se ha observado alteración en el proceso de deposición del colágeno y en la fibrogénesis de la dermis y de las estructuras oculares. En esta consistente participación en el proceso de renovación de la MEC, *SPARC* une directamente las proteínas de la MEC e influye en la secreción y activación de las metaloproteasas. Además, *SPARC* interactúa de forma directa o indirecta con diferentes factores de crecimiento involucrados en procesos de angiogénesis y remodelación tisular como son FGF, VEGF, PDGF y TGF $\beta$ .

Debido a esta implicación *SPARC* tiene la capacidad de regular procesos de oncogénesis como la angiogénesis, la migración, la proliferación y la supervivencia. El concepto propuesto de que el microambiente tumoral es un “remanente de una herida que nunca llegó a cicatrizar” ha conducido a muchos investigadores desarrollar diversos estudios en pacientes con cáncer en los que se analiza la participación de *SPARC* en estos procesos (170).

## 1.9.2 Implicación en procesos neoplásicos

De forma general, *SPARC* tiene un papel crucial en modular el microambiente tumoral y la actividad de la célula cancerígena (171). La propiedad “antiadhesiva” a nivel de la MEC viene condicionada por no permitir la adhesión entre célula y célula (172). *SPARC* puede estimular la propagación metastásica de las células tumorales regulando cinasas como las integrinas y otros factores de crecimiento, así como a través de la estimulación de enzimas que degradan la matriz y las metaloproteasas (173).

Hasta ahora todos los datos que se han publicado sobre la función de *SPARC* durante la tumorigénesis han sido inconsistentes y en su mayoría contradictorios, incluso dentro del mismo tipo de tumor.

La literatura ha demostrado que su expresión se encuentra aumentada en melanoma, cáncer de mama, carcinoma hepatocelular, cáncer de colorectal, cáncer de pulmón y carcinoma gástrico. Por el contrario, se ha constatado menor expresión en otros tipos de tumores. Por esta razón se han descrito posibles variaciones en la expresión de proteasas específicas de cáncer que explicarían las acciones opuestas en cuanto a su papel en la carcinogénesis (171).

En relación con su implicación en la oncogénesis, cada vez hay más evidencia de que su función como supresor tumoral se debe a un proceso de hipermetilación del promotor de *SPARC*, reduciendo así la producción de *SPARC* por parte de las células tumorales. Dicha metilación se ha reportado en casos de cáncer colorectal, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de próstata y cáncer de endometrio. En la mayoría de estos casos la hipermetilación se correlaciona con un peor pronóstico y una menor supervivencia (174–176).

Las afirmaciones anteriores sugieren que hay una expresión compartimental en los diferentes tipos de cáncer epitelial. Vinculado a este concepto se ha observado una regulación al alza de *SPARC* en el estroma intra y peritumoral y en cambio una regulación a la baja del mismo en las células malignas. Este patrón paradójico de la expresión de *SPARC* es característico del cáncer de mama y de páncreas, entre otros (177,178). Por ejemplo, se ha observado una alta expresión en tejido mamario normal comparado con el tejido de carcinoma ductal infiltrante donde la expresión está claramente disminuida, sin embargo, el estroma del tumor muestra una intensa inmunoreactividad a *SPARC*. Asimismo, aunque el compartimento tumoral en cáncer de páncreas exhibe una reducción en la producción de *SPARC* debido a una hipermetilación del promotor, las células estromales infiltrantes responden con una mayor expresión de *SPARC* (177).

Por consiguiente, una de las explicaciones propuestas es que la heterogeneidad y la compartimentalización de la expresión de *SPARC* podría justificar los resultados contradictorios dentro de un mismo tipo de tumor, como son el cáncer de páncreas y el cáncer de mama.

## 1.9.3 Función pronóstica y predictiva en el cáncer de mama: ¿el gen *SPARC* tiene un papel en el microambiente tumoral?

Hasta ahora los estudios de expresión génica de los tumores de cáncer de mama han identificado subtipos con diferentes resultados clínicos y respuesta a los tratamientos, pero pocos han tenido en cuenta el componente estromal de los tumores (36,112).

Los estudios de expresión génica que identificaran genes implicados en el tejido estromal nos podrían aportar mucha información de la relación de un fenotipo tumoral concreto con las características del estroma tumoral. El equipo de A Bergamaschi y cols (179); constataron en su publicación la composición del estroma tumoral de distintos tumores de carcinoma mamario a partir de la caracterización de la MEC. En este estudio propusieron una clasificación de los tumores de cáncer de mama en base a la expresión de los componentes de la MEC y correlacionaron esta clasificación con diferentes resulta-

dos clínicos. Además identificaron marcadores cuya expresión se correlacionaba con la supervivencia y el riesgo de recaída, entre los cuales se encontraba *SPARC*. Este estudio representó un elemento adicional demostrativo de como el comportamiento del cáncer de mama está muy relacionado con las características del estroma adyacente

Los niveles de transcripción de *SPARC* son mayores en los tumores de mama que en el tejido mamario normal (180). En modelos de ratón en donde las células de cáncer de mama fueron seleccionadas para colonizar los pulmones, las células metastásicas expresaron de forma significativa mayores niveles de *SPARC* comparado con aquellas células parentales no seleccionadas (181). Además, varios análisis de muestras de tejido de cáncer de mama revelan que la expresión de *SPARC* se correlaciona con la progresión del mismo. Esta expresión se ve incrementada en aquellos tipos de cáncer de mama con mayor grado histológico, afectación adenopática y en general en tumores de peor pronóstico y peores resultados clínicos(182). Otros datos de interés nos demuestran que los niveles de ARNm de *SPARC* en tejidos de cáncer de mama están inversamente correlacionados con la expresión de RE (183). Dentro de este marco también tenemos información de posibles vías de señalización en las que está implicada la proteína *SPARC*, ya que se ha observado que la producción de *SPARC* está regulada por la integrina  $\beta 4$  que estimula mTOR y conduce a una menor producción de miR-29, uniéndose a su vez a *SPARC* (184). Además, *SPARC* también estaría implicado en el proceso de la angiogénesis. Se conoce que la angiogénesis es esencial para el crecimiento y la diseminación de un tumor. Este proceso está mediado por varios factores, de los cuales el VEGF es uno de los más importantes. Concretamente, en el cáncer de mama *SPARC* modula la actividad mitogénica de VEGF uniéndose directamente a él mediante varios mecanismos específicos y de esta manera reduce a su vez la interacción de VEGF con sus correspondientes receptores de superficie inhibiendo además la fosforilación de las proteínas tirosin cinasa (185–187).

Tal como hemos ido mencionando en los apartados anteriores, *SPARC* no es una proteína específica de tumor, pero su sobreexpresión se ha asociado a crecimiento tumoral, metástasis y agresividad (165). Las afirmaciones que hemos expuesto anteriormente sugieren que la sobreexpresión de *SPARC* en cáncer de páncreas se correlaciona con un peor pronóstico, pero hemos comprobado que en el caso del cáncer de mama existe mucha controversia cuando revisamos su implicación pronóstica en función del subtipo molecular. Hay publicaciones que sugieren que la expresión de *SPARC* es mayor en el subtipo triple negativo de cáncer de mama que en otros subtipos y que a su vez se correlaciona con un peor pronóstico, mientras que otras publicaciones demuestran resultados diferentes e incluso opuestos (188–190). El estudio de Zhu y cols (191); es un estudio retrospectivo que se diseñó con el objetivo de investigar si la expresión de *SPARC* en tejidos humanos afectados de cáncer de mama de tipo triple negativo podría tener un valor pronóstico. Con un seguimiento de 10 años, observaron que una mayor expresión de *SPARC* es un factor pronóstico independiente para recurrencia y muerte en las pacientes con cáncer de mama triple negativo tras ajustar por factores como edad, status menopáusico, grado histopatológico, tamaño tumoral, afectación ganglionar, invasión vascular, estadio tumoral y tratamiento dirigido del cáncer.

Por el contrario Nagai y cols (189); con 10 años de seguimiento, reportaron que la menor señalización de *SPARC* se correlacionaba con un peor pronóstico en pacientes con cáncer de mama triple negativo, tanto para de SLE como para SG ( $p=0.001$  para ambos), comparado con aquellos con altos niveles de *SPARC*. Su conclusión fue que el pronóstico era peor cuando la tinción para *SPARC* resultaba negativa.

Adicionalmente, Azim y cols (188); estudiaron los niveles de mRNA y demostraron que la mayor expresión del gen *SPARC* se asociaba con peores respuestas clínicas (similar al estudio de Zhu y cols). En su población de estudio encontraron que la mayor expresión de *SPARC* se presentaba en el subtipo luminal A. Todo ello nos hace sospechar que la habilidad de *SPARC* para inducir o progresar un tumor depende del contexto de tipo celular, el estadio tumoral y el microambiente (165).

El pronóstico del cáncer de mama está sujeto al riesgo de recaída local, pero también al riesgo de metástasis oseas, por esta razón, mejorar el conocimiento de los mecanismos moleculares que impulsan la diseminación de las células cancerígenas a los huesos también ha sido de especial interés.

La recurrencia y progresión metastásica en el esqueleto es una de las causas principales de muerte por cáncer de mama, cuya evolución puede debutar hasta 10 años después de la cirugía local del tumor primario (192). Las complicaciones derivadas de las metástasis óseas incluyen dolor, aumento de riesgo de fracturas, hipercalcemia y disminución del recuento de células rojas. Una vez han alcanzado el hueso, las células malignas provocan una disrupción del proceso de remodelación normal, modificando el número de osteoclastos y aumentando consecutivamente la reabsorción ósea y la liberación de factores necesarios para la expansión de células metastásicas. La cantidad de osteoblastos dependerá del tipo de lesión que se establece en el hueso, es decir, si son osteoblásticas, osteoclasticas o mixtas. Los procesos biológicos que dan lugar a este trofismo esquelético ha suscitado interés y se han analizado varios marcadores cuyos niveles en sangre u orina pueden servir como herramienta predictora de detección precoz de estos eventos. El microambiente óseo debe proveer factores estimulantes de crecimiento u otras proteínas que estimulan la adhesión y la proliferación. En este contexto, han sido varios los grupos de investigadores que han mostrado su interés en explorar el rol de *SPARC* en las metástasis óseas. Los resultados de Maroni y cols; (193) indicaron que la función biológica de *SPARC* depende de la fase progresiva del cáncer de mama, el tejido compartimental en el que se expresaba y su distribución en el organismo, revelando que los niveles plasmáticos de *SPARC* se correlacionaban de forma opuesta a la implantación metastásica. Se halló que la mayor expresión de *SPARC* se localizaba en el estroma de las metástasis óseas, sugiriendo un efecto positivo directo de la expresión de *SPARC* sobre el crecimiento de las células metastásicas. Cabe destacar que este estudio pone de manifiesto otras posibles hipótesis respecto a las vías de actuación de *SPARC*, como la existencia de una producción local en el hueso regulada por la vía Endothelin 1/ETAR, necesaria para la formación del nicho en el hueso. Por consiguiente, los niveles de *SPARC* en plasma fueron indetectables en las pacientes con cáncer de mama y metástasis óseas. También sugieren que las células madre progenitoras de los fibroblastos serían las principales responsables de la migración de *SPARC* a las células tumorales. Postulan que *SPARC* debe sufrir un proceso de reciclaje en el que estarían implicadas microvesículas que modularían las células diana tumorales a diferentes distancias; estas células tumorales contactarían con moléculas de superficie permitiendo activar vías de señalización internas (194).

Otro estudio más reciente reveló que el aumento de *SPARC* estromal se correlacionaba con menores tasas de metástasis óseas y que *SPARC* podía inhibir la migración e invasión *in vitro*. Sus hallazgos demuestran que *SPARC* podría estar suprimiendo la activación osteoclastica en el microambiente del cáncer de mama y que podría posicionarse como futura diana terapéutica para el tratamiento de las metástasis óseas (195).

Además de toda la información pronóstica relatada hasta ahora, cabe destacar que *SPARC* y el contenido estromal también han sido objeto de evaluación desde un punto de vista predictivo.

Las mujeres premenopáusicas con cáncer de mama sin afectación axilar, que han recibido tratamiento perioperatorio basado en quimioterapia y cuyos tumores tienen mayor contenido estromal, tienen más posibilidades de presentar una recaída independientemente de otros parámetros clinicopatológicos (196). Por otra parte, las alteraciones en el patrón de expresión de genes estromales son predictoras de resistencia al tratamiento perioperatorio de quimioterapia basada en antraciclinas (161). Farmer y cols. demostraron que el incremento de la expresión genética estromal en la zona de estroma reactivo de tejido de cáncer de mama predecía resistencia al tratamiento perioperatorio de quimioterapia basada en 5-fluorouracilo, epirrubicina y ciclofosfamida.

Refiriéndonos de nuevo exclusivamente al gen *SPARC*, la publicación en el año 2013 por Azim y cols (197) confirmó la asociación entre la mayor expresión de RNAm de *SPARC* y la menor respuesta patológica completa, especialmente para el subtipo biológico HER2 positivo tras quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclinas con o sin taxanos.

Posteriormente se han publicado varios trabajos que han evaluado la alteración de la expresión de *SPARC* en cáncer de mama y su principal implicación en la respuesta a los tratamientos de quimioterapia. Unos de los más recientes es el estudio Gepartrio (190) donde se evaluó la expresión de *SPARC* por

inmunohistoquímica utilizando el IRS en 667 pacientes. El estudio finalmente constató que la mayor expresión de *SPARC* (IRS>6) se asociaba con un incremento en la respuesta patológica completa respecto a los de menor expresión (IRS<6) (47% vs. 26%,  $P = 0.032$ ). La mayor expresión se halló sobretudo en el subtipo histológico triple negativo (37 %;  $P=0.038$ ) comparado con el resto de subtipos. *SPARC* además fue factor predictor independiente de respuesta para toda la población ( $P = 0.010$ ) así como también para el subtipo triple negativo ( $P = 0.036$ ). Sin embargo, en este estudio no hubo significación estadística para la asociación con supervivencia. De forma consistente con el estudio de Zhu y cols (191), la mayor expresión de *SPARC* tampoco se asociaba con el tamaño tumoral o el grado histopatológico.

Tal como mencionábamos en apartados anteriores, *SPARC* se une a la albúmina con una alta afinidad, por esta razón la mayor expresión de *SPARC* en tejidos malignos puede promover la acumulación de la albúmina y mejorar la respuesta a la nanopartícula unida a ésta (Nab-paclitaxel). Nab-paclitaxel está aprobado en cáncer de mama en segunda línea de tratamiento para estadios metastásicos. El estudio Geparsepto (198) reveló que Nab-paclitaxel incrementaba de forma significativa la tasa de respuestas patológicas completas tras quimioterapia neoadyuvante, especialmente en cáncer de mama triple negativo. En un subestudio, evaluaron los niveles citoplasmáticos de la proteína *SPARC* en tejido tumoral (positivo [IRS de 6-12] vs negativo [IRS 0-5]). Lo que observaron es que la tasa de RCp era significativamente mayor en el grupo de nab-paclitaxel respecto al comparador con paclitaxel para el grupo de *SPARC* negativizado (38% vs 29%,  $P = 0.0034$ ); de todas maneras para el grupo positivo de *SPARC*, la tasa de RCp fue similar en ambos grupos (42% vs 30%,  $p = 0.10$ ). Además la tasa de RCp fue comparable entre los grupos de *SPARC* negativo y positivo (38% vs 42%) para las pacientes que fueron tratadas con nab-paclitaxel. Esta inconsistencia respecto a los resultados del estudio Gepartrio podría ser atribuida a la población estudiada: menor tasa de positividad de *SPARC* en Geparsepto (15.8% vs 26%) y además solo el 23 % de las pacientes eran triple negativo. No obstante, los datos que disponemos hasta el momento nos sugieren que la eficacia de nab-paclitaxel no está asociada a la expresión de *SPARC*, resultados que ya habían obtenido Schneeweiss y cols. en 2014 (199) para enfermedad metastásica.

Tal como muestran los datos expuestos anteriormente, la mayoría de la investigación del gen *SPARC* en cáncer de páncreas y en cáncer de mama se basa en la evaluación de *SPARC* a nivel de expresión tisular. A nuestro conocimiento, se han reportado datos escasos en la literatura que estudien el posible papel de variantes polimórficas del gen *SPARC* como biomarcadores para el cáncer de mama.

## 1.10 Inmunidad y cáncer de mama

### 1.10.1 Introducción

El cáncer de mama generalmente no se ha caracterizado por ser un tumor inmunogénico, aunque la investigación de los últimos años ha revelado la existencia de un microambiente inmune que confiere una implicación clínica en ciertos subtipos de cáncer de mama.

El infiltrado inmune comprende células tanto de la respuesta inmune innata como de la adaptativa y puede detectarse en las mismas piezas de biopsias con valor pronóstico. Referente al sistema inmune adaptativo, los TILs son los principales representantes del infiltrado mononuclear inmune en el microambiente del tumor de mama y se pueden identificar de forma sencilla en las muestras de tejido fijadas en parafina tras una tinción estándar con hematoxilina-eosina.

Inicialmente, la observación temprana de que existían nichos de infiltrados inmunes, tanto en estroma como en tumor, introdujo un nuevo foco de investigación en cuanto a entender la cronología de la respuesta inmune en el cáncer. Todo ello sugiere que los linfocitos, concretamente aquellos pertenecientes a la inmunidad adaptativa, están capacitados para reconocer y eliminar a las células malignas. Por el contrario, se supone que también existe un proceso que permite a las células tumorales evadir la defensa inmune y proliferar permitiendo explicar la anergia asociada a los infiltrados inmunes. El proceso que

permite a las células tumorales escapar del reconocimiento inmune se conoce como Inmunoedición, un mecanismo descrito por primera vez por Dunn y cols en 2004 (200).

La inmunoedición es un proceso de tres pasos: eliminación, equilibrio y escape. Este proceso tiene lugar como resultado de las interacciones que se establecen entre las células inmunes y el microambiente y permite que las células tumorales sean capaces de evadir el reconocimiento inmune del huésped y ser erradicadas. Habitualmente el cáncer es el resultado del proceso de inmunoedición y solo es clínicamente detectable en la fase de escape. El microambiente tumoral incluye células polimorfonucleares, macrófagos, células T, células natural killer, células dendríticas y células B. De hecho, el proceso de las células tumorales de evadir dicho reconocimiento se sustenta en el hallazgo de que los tumores con baja expresión del HLA I comprenden un número bajo de infiltrado linfocitario (201). Todas estas células varían en composición e intensidad en función del tipo de cáncer que se establece (202). Durante las etapas tempranas de este proceso, los linfocitos relacionados con la inmunovigilancia (Linfocitos T CD8+, Linfocitos T CD4+ helper 1 y las células NK) son capaces de reconocer y eliminar las células malignas (fase de eliminación). A pesar de ello, las células también empiezan a padecer una selección darwiniana que conlleva a favorecer de forma progresiva la proliferación de clones malignos. Estos están más condicionados a evadir el reconocimiento inmune adoptando varias estrategias biológicas que les permite a las células tumorales transformarse en “invisibles”, reduciendo la expresión en la superficie de antígenos carcinogénicos y disminuyendo a su vez la inmunogenicidad (fase de equilibrio). Las células cancerígenas también incrementan su capacidad para inhibir a los linfocitos por un proceso relacionado con la inmunovigilancia. Para ello, las células sobreexpresan moléculas de tipo inmune checkpoints que promueven la proliferación y supervivencia de células inmunosupresoras (células Tregs FOXP3+ y MDSCs (fase de escape). Las células inmune checkpoints, que normalmente tienen la función de evitar la propia reactividad de huésped, se transforman en un mecanismo deletéreo; aumentan el microambiente inmunosupresor que conlleva a que una lesión maligna se caracterice por la presencia de TILs inefectivas, que confirma la existencia de este mecanismo de inmunovigilancia (203).

## 1.10.2 Infiltrados inmunes en cáncer de mama:

### 1.10.2.1 Subtipos celulares de TILs (Tabla 4)

Según la evidencia científica hay presencia de poblaciones inmunes en el cáncer de mama que son cruciales en el proceso de malignización (204).

En este trabajo nos vamos a enfocar en el papel del sistema adaptativo inmune caracterizado principalmente por la presencia de TILs. Tenemos conocimiento de que la composición linfocitaria del cáncer de mama ha sido ampliamente estudiada y que está aceptado que una mayor presencia de TILs conlleva a un mejor pronóstico, sin embargo, la correlación entre las distintas subpoblaciones de TILs y la respuesta sigue siendo un tema controvertido (205):

**1-Células dendríticas:** Las células dendríticas son células centrales en la regulación de la respuesta inmune adaptativa y por consiguiente son necesarias para la respuesta inmunitaria del cáncer mediada por células T (206). La respuesta antitumoral depende específicamente de un subtipo de célula dendrítica que se encarga de transportar antígenos tumorales, drenarlos en los nódulos linfáticos y presentar el antígeno a los linfocitos T citotóxicos activados. La maduración de las células dendríticas es necesaria para proporcionar señales co-estimuladoras a las células T, sin embargo, mientras la maduración de las células dendríticas sucede en los tumores, a veces es insuficiente para producir una respuesta inmunitaria potente, particularmente en el ambiente inmunosupresor característico de los tumores. A pesar de ello, existen otros tipos de células presentadoras de antígenos que pueden, de la misma manera, presentar el antígeno mediante el sistema de histocompatibilidad tipo I o II (207). Hay pocos datos en el cáncer de mama respecto a su caracterización individual y su papel pronóstico y predictivo. Las antraciclinas, esquema que sigue siendo habitual en el tratamiento del cáncer de mama, pueden

causar una muerte celular inmunogénica promoviendo la fagocitosis de células tumorales y emitiendo señales co-estimuladoras mediante células dendríticas. De hecho, los sistemas inmunes adaptativos e innatos en el nicho tumoral son co-dependientes, tal como se ilustra cuando se requiere la funcionalidad de las células T citotóxicas para conseguir una eliminación tumoral más eficiente en respuesta al tratamiento con antraciclina (208).

**2-Macrófagos:** Los macrófagos asociados a tumor son también una parte importante del microambiente tumoral. Estos pueden cambiar su fenotipo en función de las señales que reciben del microambiente tumoral, y de la misma manera pueden inhibir o estimular las células tumorales (209). En los estadios tempranos del cáncer de mama, los tumores están infiltrados normalmente por macrófagos de tipo I que liberan una serie de citoquinas proinflamatorias y quimocinas que promueven la diferenciación de TH17 a partir de los linfocitos T CD4 naive. Por otro lado, en estadios avanzados, los macrófagos asociados a tumor se polarizan a macrófagos de tipo II que liberan TGF- $\beta$  1 y IL-10 e inducen la diferenciación de los Th2, favoreciendo el desarrollo de las Tregs y por consiguiente la inhibición de la respuesta a terapias inmunes (210).

**3-Linfocitos T CD8+:** Los linfocitos T CD8+ son las células efectoras primarias del sistema inmune, habitualmente conocidas como linfocitos T citotóxicos. Su papel principal es el de identificar los complejos de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad en la superficie de cualquier célula produciendo su muerte por citotoxicidad. Son los que infiltran en mayor proporción los nichos tumorales del cáncer de mama. El 75 % de las TILs son de tipo linfocitos T y de éstos, los Linfocitos T CD8 + son el tipo de linfocitos que mejor se correlacionan con resultados clínicos favorables y con mejores tasas de supervivencia global (211).

**4-Linfocitos T CD4 +:** El papel primordial de estas células es el de activar los linfocitos CD8+ específicos para un determinado antígeno, comúnmente conocidos como linfocitos T “cooperadores”. Esta definición no valora suficientemente el papel real de los linfocitos CD4+, dado que en muchas situaciones resultan indispensables para iniciar la respuesta citotóxica mediada por linfocitos T CD8+. Los linfocitos T CD4+ identifican los péptidos de cadena larga presentados por las moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad. Cuando un linfocito T identifica su antígeno específico en la superficie de una célula presentadora de antígeno, mediante diferentes pasos, permitirá que se activen los linfocitos T CD4+, que a su vez activan las células presentadoras de antígeno. La activación de estas células presentadoras de antígeno incrementa la capacidad de activar los linfocitos T CD8+. Posteriormente la función de los linfocitos T “cooperadores” es determinada por la producción de ciertas citoquinas activadoras (tipo 1) o inhibitorias (tipo 2). En el cáncer de mama, tal como sucede con los Linfocitos T CD8+, también representan un factor de buen pronóstico, asociándose a mejores resultados clínicos (212). Por otro lado, las células Tregs, un subtipo específico de linfocitos T CD4+, se han analizado en varios estudios y han generado cierto grado de controversia. Algunos datos afirman que la mayor infiltración por estas células se correlaciona con peor grado tumoral y menor expresión de receptores hormonales (213). Por el contrario, también se ha reportado una correlación positiva entre las altas tasas de infiltración de Tregs y mejores resultados clínicos, sobretodo en las formas más agresivas del cáncer de mama (214). De forma interesante, lo que cada vez se ha puesto más de manifiesto es que parece que la importancia reside en la ratio Linfocitos T CD8+/Tregs; se ha constatado una correlación positiva entre las altas tasas de infiltración de Tregs y mayor cantidad de células T CD8+ reflejando el intento del huésped de eliminar las células malignas (inmunovigilancia) en un ambiente inmunosupresor (inmunoección). Por otra parte, la correlación entre Tregs y Linfocitos T CD8 + ha demostrado un mejor resultado pronóstico y predictivo (215).

**5- Células NK:** Son el primer punto de defensa en asociación con los Linfocitos T CD8 +. Se encuentran infiltrando las lesiones de cáncer de mama en una proporción de aproximadamente un 5% del total de la población linfocitaria. Recientemente se ha observado que los niveles bajos de NK están aparentemente relacionados con peores resultados clínicos (216).

**6- Linfocitos B CD19 +:** No está claro el papel que desempeñan los linfocitos B en la respuesta inmune antitumoral. Se sabe que las inmunoglobulinas son mediadores en otros procesos celulares que eliminan las células neoplásicas. Así, pueden unirse a las células malignas y mediar opsonización y fagocitosis por parte de los macrófagos. También pueden intervenir en la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos. Esta subpoblación ha sido menos estudiada y disponemos de pocos datos hasta el momento. Habitualmente su presencia en los infiltrados de cáncer de mama se encuentra en un promedio de un 20 % del total del cáncer de mama, y por lo general se asocia a un pronóstico favorable debido a su capacidad para diferenciarse a células secretoras de granzima B a partir de la estimulación de la señal mediada por IL-2 (204).

Célula	Marcador	Subtipos	Función en microambiente tumoral	Proporción de TILs
<b>Células T citotóxicas</b>	CD3	NA	Citolisis de las células tumorales	20%
	CD8			
<b>Células T helpers</b>	CD3	TH1	Dar soporte a las células CD8+ T secretando IFN $\gamma$	40%
	CD4	TH2	Asociado con una inmunidad antitumoral inefectiva	
		TH17	Efectos antitumorales y protumorales	
		TFH	Papel en las estructuras linfocitarias terciarias	
		TREG	Tolerancia de antígenos tumorales	
<b>Células B</b>	CD19	NA	Anticuerpos antitumorales	20%
	CD20			
<b>Macrófagos</b>	CD14	M1	Secreción de citoquinas antitumorales	<5%
	CD11b			
	HLA DR			
		M2	Citoquinas inmunosupresoras	
			Angiogénesis	
<b>Células NK</b>	CD16	NA	Matar células tumorales	<5%
	CD56			
	NKG2D			
<b>Células dendríticas</b>	CD135	NA	Presentación cruzada de péptidos de antígenos tumorales	1%
	Flt3			
	CD117			
	CD26			
	CD103			

Tabla 4: Subpoblaciones de TILs y marcadores moleculares.

CTLA-4: proteína 4 asociada a linfocito T citotóxico;IDO: indolamina 2,3-dioxigenasa; NA: no aplica; PD-1: proteína 1 de muerte celular programada; PD-L1 ligando 1 de PD-1; TIM3: proteína de membrana 3 de linfocito T. Adaptación del artículo de Savas et.al. (206)

### 1.10.2.2 Evaluación de los TILs en cáncer de mama

A medida que crece el interés en considerar a los TILs como un biomarcador inmunológico, también aumenta la necesidad de disponer de un método estandarizado de evaluación de los mismos. *El International Immuno-Oncology Biomarker Working Group* ha desarrollado unas guías de práctica clínica en las que se expone la metodología y forma de cuantificar los TILs en cáncer de mama en las muestras de hematoxilina-eosina (217). Más recientemente se ha publicado una actualización de las mismas añadiendo las recomendaciones de evaluación de los TILs en la enfermedad residual tras neoadyuvancia y en el carcinoma in situ (218).

Las principales conclusiones del consenso son:

- 1- Las muestras de tejido completas son preferibles respecto a las biopsias (aunque en el escenario neoadyuvante se aceptan las biopsias).
- 2- El compartimento estromal es por el momento la localización donde deben medirse los TILs, ya que es la que nos puede proporcionar la información más valiosa desde un punto de vista clínico.
- 3- Aunque clínicamente no se ha podido demostrar el punto de corte exacto, el *TIL Working Group* describe el término “Cáncer de mama predominantemente linfocitario” para aquellos tumores cuyo índice de infiltrado inmune es elevado (>60 %). Este tipo de cáncer de mama representa entre el 15 y el 30 % de los cánceres de mama y se encuentra de forma más frecuente en los subtipos triple negativo y HER2 positivo.

Actualmente, la mayoría de grupos de investigación clínica a nivel internacional están utilizando estas guías para sus estudios con el objetivo de hacer más comparables y reproducibles los resultados. Este aspecto permitirá evitar lo ya ocurrido con otros marcadores conocidos, como el Ki67.

### 1.10.2.3 Relevancia clínica de los TILs:

#### Biomarcador pronóstico

El valor pronóstico de los TILs como biomarcador en estadios localizados del cáncer de mama ya está establecido a partir de la evaluación de muestras tumorales procedentes de diversos ensayos clínicos. Se ha demostrado una relación lineal entre el incremento de TILs y la mejoría de SLE para triple negativo y Her2 positivo (206).

Uno de los primeros análisis de TILs documentados en el escenario de tratamiento adyuvante fue en los estadios localizados con afectación ganglionar en el estudio BIG 02-98 (219) donde se analizaron los TILs en aproximadamente 2000 muestras. En las muestras con cáncer de mama triple negativo, cada incremento en el nivel de TILs de un 10 % se traducía en una reducción del riesgo de recaída del 17 % y una disminución del riesgo de muerte del 27 %, independientemente del tipo de quimioterapia recibida. Estos resultados se validaron también en las muestras del estudio FinHER (220). En este estudio, en las pacientes con cáncer de mama de tipo triple negativo y HER2 positivo se constató como cada incremento de un 10 % de TILs se asociaba con un descenso de riesgo de recurrencia a distancia. En otra publicación, con 506 muestras tumorales de cáncer de mama fenotipo triple negativo procedente de los ensayos clínicos de adyuvancia ECOG E2197 y E1199, los TILs estromales evaluados como una variable continua se asociaban con mejor pronóstico (221). De forma similar, en un análisis de 647 muestras de cáncer de mama de tipo triple negativo, los TILs, tras una mediana de seguimiento de 6,9 años también, se asociaron con mejor pronóstico (222). Por cada incremento del 10 % de TILs, el riesgo del intervalo libre de cáncer de mama se reducía un 13 % (HR 0.87, 95% CI: 0.79–0.95, P = 0.003). Mayores niveles de TILs se asociaban también a mejor SLE y SG, con reducciones de riesgo de hasta el 11% (P = 0.005) y el 17% (P < 0.001), respectivamente.

Ali y cols (223); analizaron muestras de 4 estudios que incluían más de 12000 pacientes. Lo que observaron fue que en los tumores con RRHH negativos la presencia de linfocitos T CD8+ tanto a nivel estromal como intratumoralse correlacionaba con mejor supervivencia por cáncer de mama. Sin embargo, en cáncer de mama con RRHH positivos no se identificó dicha correlación.

De forma interesante, cuando se evalúan las TILs como variable estratificada en sus diferentes subtipos y se analizan exclusivamente los Linfocitos T CD8+, se constata como una mayor densidad de células citotóxicas en el estroma se correlaciona con mejor supervivencia por cáncer de mama a largo plazo en el subtipo triple negativo. En el caso de FOXP3+ Tregs, cuya acción principal es la de impedir una actividad efectiva de las células T citotóxicas, cuando se analiza su ratio Linfocitos TCD8+ T/FOXP3+ Tregs, se demuestra que a mayor valor de la misma mejor predicción de SLE y SG, por lo que puede representar otro parámetro útil en este contexto (223).

Teniendo en cuenta los estudios arriba mencionados podemos deducir que a día de hoy de la evaluación de los TILs supone un marcador pronóstico robusto en los estadios localizados de cáncer de mama triple negativo y en algunos HER2 positivos, en cambio, para los subtipos luminales aún es controvertido.

### Biomarcador predictivo

Los resultados reportados de los diferentes ensayos clínicos de adyuvancia en cáncer de mama nos sugieren que los TILs deben funcionar como un biomarcador predictivo de beneficio a la quimioterapia. Ali y cols (223); observaron que la presencia de células T CD8+ se asociaba con mayor beneficio a la Epirubicina, sin diferencias cuando se analizaron los resultados según los subtipos histológicos. Este hallazgo se fundamenta en estudios preclínicos donde se demostró que la quimioterapia basada en antraciclinas induce muerte celular y que además es particularmente inmunogénica (208).

Asimismo la asociación entre RCp al tratamiento neoadyuvante y la presencia de TILs se ha descrito en diferentes estudios (224,225). En los ensayos clínicos GeparDuo y GeparTrio, se incluyeron pacientes que recibieron quimioterapia neoadyuvante con esquemas basados en antraciclinas y taxanos. Obtuvieron muestras tumorales de hasta 1.058 pacientes donde estaban representados todos los subtipos histológicos (224). Se analizaron los TILs como variable continua y también como variable dicotómica con un punto de corte del 60 % (donde se definió el concepto de cáncer de mama predominantemente linfocitario para los que tenían una presencia de más del 60 %). La tasa de RCp fue de un 30 % mayor para los TILs >60 % comparada con aquellos que presentaban ≤ del 60 % en el estudio GeparDuo, mismo hallazgo que el observado en el ensayo GeparTrio.

Estos resultados son consistentes con los procedentes de otros estudios prospectivos (277,283,284).

En uno de los estudios más recientes (el ensayo Geparsixto (225)), las pacientes con cáncer de mama predominantemente linfocitario fueron tratadas con carboplatino además de antraciclinas y taxanos. Las tasas de RCp para este grupo fueron sorprendentes (74 % en cáncer de mama fenotipo HER 2 positivo y 78 % en cáncer de mama fenotipo triple negativo), valores muy superiores a los obtenidos en el grupo de pacientes que no fueron tratadas con carboplatino (43% y 50% en cáncer de mama de tipo triple negativo y HER2 positivo, respectivamente). Esta diferencia fue estadísticamente significativa (P <0.005).

El trabajo más recientemente reportado en este escenario ha sido liderado por el *German Breast Cancer Group (GBG)*. Un total de 3771 pacientes tratadas con diferentes esquemas de quimioterapia neoadyuvante procedentes de los ensayos GeparDuo, GeparTrio, GeparQuattro, GeparQuinto, GeparSixto y GeparSepto fueron analizadas siguiendo las guías del *TIL Working Group* (228). Estaban representados todos los subtipos histológicos: Her2 positivo, luminal-Her2 negativo y triple negativo (38, 37 and 25%, respectivamente) así como también los 3 grupos predeterminados en función de la densidad de TILs: predominantemente linfocitario (60–100%), intermedio (11–59%) y bajo (0–10%). Los casos definidos como cáncer de mama predominantemente linfocitario se encontraron con más frecuencia en los sub-

tipos triple negativo y HER2 positivo (30 y 19 %, respectivamente). Los resultados demostraron que el incremento de la concentración de TILs fue predictor de respuesta para todos los subtipos, alcanzando tasas de RCp de un 20 % para el grupo de niveles bajos de TILs, 27 % para los de nivel intermedio y un 44 % para los de concentración de TILs alta, con diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.0001$ ), confirmando de esta manera los resultados de los estudios previamente publicados.

Sin embargo a día de hoy, la guías de consenso internacionales no recomiendan su uso como criterio de decisión terapéutica para escalar o desescalar tratamientos (229). En estas pacientes, los TILs podrían representar una herramienta útil para identificar las que podrían evolucionar de una forma excelente sugiriendo asimismo la posibilidad de una desescalada en el tratamiento o incluso evitar quimioterapias peroperatorias.

Probablemente se necesiten más estudios que evalúen el papel de cada unas de las subpoblaciones y correlacionarlas con otros marcadores implicados en el microambiente tumoral y a respuesta inmunitaria.

### 1.10.3 *SPARC* y respuesta inmunológica

Para que las células abandonen el tumor primario y puedan acceder al torrente sanguíneo necesitan de procesos de des-adhesión de la masa tumoral, introducirse en el tejido colindante y finalmente de una intravasación. La extravasación será requerida cuando puedan alcanzar el órgano secundario. Por todo ello, para poder completar esta compleja cascada de una manera exitosa, las células tumorales requieren de la existencia de un microambiente permisivo y de una interacción dinámica con la célula huésped (230). Algunos datos publicados ponen en evidencia que los macrófagos derivados de *SPARC* están involucrados en el proceso de metástasis, principalmente en la migración de las células invasivas mediada por integrinas (231). Varios resultados publicados exponen la capacidad antiproliferativa, proapoptótica y antimetastásica de *SPARC* en procesos neoplásicos, a través de su implicación en la respuesta inmunitaria. Asimismo, una de las hipótesis planteadas ha sido la posibilidad de diseñar un modelo terapéutico que permita la liberación de la proteína *SPARC* en ciertas cavidades, como por ejemplo, en el espacio intraperitoneal en la enfermedad avanzada del cáncer de ovario (231–236).

Por otro lado, hay trabajos que apoyan la implicación de *SPARC* en la respuesta inmunitaria, no necesariamente relacionado con el escenario neoplásico (237–241)

Lo anteriormente descrito expone la posible implicación de *SPARC* en la respuesta inmunitaria que, aunado a su función en los procesos neoplásicos, ha conducido a explorar su posible papel a nivel terapéutico y se ha propuesto como un antígeno diana para la inmunoterapia en varios tipos de cáncer (242).

### 1.10.4 Biomarcadores emergentes

#### Exosomas

##### Definición

Las vesículas extracelulares son un conjunto heterogéneo de estructuras membranosas liberadas por las células. Las principales vesículas extracelulares son los exosomas, las microvesículas y los cuerpos apoptóticos.

Los exosomas son vesículas de comunicación de 30 nm a 150 nm de diámetro y que tienen un origen endocítico. Se liberan al espacio extracelular tras la fusión de los cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática (243,244).

Inicialmente se descubrió que los exosomas eran liberados por linfocitos B y células dendríticas a través de una vía muy similar. Posteriormente se demostró que la liberación de los exosomas mediante la fusión endosómica de cuerpos multivesiculares también podía proceder de otros tipos celulares, tanto hematopoyéticos como no hematopoyéticos, como por ejemplo células citotóxicas tipo T, plaquetas, neuronas, oligodendrocitos, células de Schwann, células intestinales y epiteliales. Se han aislado vesículas con propiedades exosómicas de diversos tipos de fluidos incluyendo el semen, la sangre, la orina, la saliva, la leche materna, el líquido ascítico y amniótico, la bilis etc. (243).

### **Estructura y composición de los exosomas**

Los exosomas se caracterizan por una composición específica. Contienen ADN, ARN codificante y no codificante, enzimas asociadas a tráfico vesicular (por ejemplo la familia Rab) y moléculas de adhesión celular (tetraspaninas). La membrana de los exosomas está formada por lípidos saturados (esfingomielina, fosfatidilserina y colesterol).

En la biogénesis de los exosomas están implicadas un grupo de proteínas del complejo ESCRT, proveniente de la sigla en inglés “*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*” (243,244).

Los exosomas ejercen un mecanismo de feedback regulatorio liberando más exosomas de la glándula mamaria normal, eso se traduce en que los exosomas liberados, tanto en el contexto del cáncer de mama como de las células epiteliales humanas de una glándula mamaria normal, son regulados por exosomas que se desprenden de sus propias células (245). En las células de cáncer de mama, la liberación celular de sus anclajes de adherencia del nicho tumoral son un motor estimulante para la secreción exosómica (246).

### **Funciones biológicas**

Uno de los primeros estudios que nos reportó la funcionalidad del exosoma (interacción de vesículas extracelulares con las células) fue el trabajo de motilidad de la célula espermática por los prostasomas (247). Posteriormente se la han ido atribuyendo diversas funciones. En los años 80 la secreción de exosomas por reticulocitos fue reportada como mecanismo de erradicación de moléculas obsoletas (248). Más tarde, se describió la capacidad de los exosomas para actuar como vesículas presentadoras de antígeno, estimular la respuesta inmune antitumoral o incluso inducir tolerancia inmunológica (249,250). Las células tumorales y otro tipo de células del microambiente tumoral también secretan vesículas extracelulares (tanto exosomas como microvesículas) y cada vez hay más evidencia de que contribuyen a la progresión tumoral estimulando la angiogénesis y la migración de las células tumorales en la metástasis (251,252). Las vesículas que derivan de células tumorales también tiene propiedades inmunosupresoras que les permite inactivar linfocitos T o células NK o incluso motivar la diferenciación de Linfocitos T reguladores y suprimir respuestas inmunes (253).

Debido a todas las propiedades anteriormente mencionadas (angiogénesis, inflamación, apoptosis, presentación de antígenos) hoy en día los exosomas se consideran como potenciales biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico de varias enfermedades, entre las que se encuentra el cáncer.

Los exosomas implicados en procesos neoplásicos contribuyen a una transformación horizontal y fenotípica de reprogramación que se traduce en una modulación del microambiente tumoral. Diferentes trabajos han permitido testar y evaluar como ciertos miRNAs contenidos en exosomas pueden ser útiles como biomarcadores para el diagnóstico del cáncer (254).

Además también se está evaluando el comportamiento exosómico para algunos de los subtipos biológicos del cáncer de mama. Un estudio reveló como los exosomas derivados de pacientes con cáncer de mama subtipo triple negativo con linaje Hs578Ts(i) mejoraban de forma significativa la proliferación, migración e invasión de las células que las contenía estimulando a su vez un tipo de muerte celular programada (anoikis) (255).

Curiosamente tenemos que mencionar que no solo los exosomas que derivan de células cancerígenas

contribuyen a la oncogénesis sino que también lo hacen aquellos cuyo origen proviene de células no cancerígenas. Por ejemplo, la vía de señalización tipo WNT puede estimular la secreción exosómica y participar en el transporte de moléculas de exosoma en la progresión del cáncer de mama (256).

## MDSCs

Las MDSCs son una población heterogénea de células mieloides inmaduras con capacidad inmunosupresora que poseen características intermedias entre monocitos y granulocitos (257). En condiciones normales, las células mieloides inmaduras generadas en la médula ósea mediante el proceso de mielopoiesis, se diferencian rápidamente y dan lugar a macrófagos, células dendríticas o granulocitos (258). En cambio, en condiciones patológicas como en cáncer, las mieloides inmaduras proliferan y se activan, adquiriendo propiedades inmunosupresoras que las convierten en MDSCs (258). La acumulación de las MDSCs ocurre tanto en los ganglios linfáticos, como en el foco inflamatorio, e induce la disminución de la respuesta inmune y la expansión del tumor (259). Por lo tanto, podemos observar que las MDSCs son células que dañan la respuesta inmunitaria anti-tumoral y que normalmente se expanden cuando responden a estímulos inflamatorios (260). Actualmente los focos de investigación han estado dirigidos a conseguir estrategias para inhibir la actividad de estas células, como por ejemplo, utilizando inhibidores tirosin-cinasa (261). Uno de los mecanismos a partir del cual las MDSCs pueden suprimir respuestas inmunes necesarias y beneficiosas es perjudicando la función de las células T liberando reactantes de oxígeno gracias a la producción de moléculas supresoras. Otra vía es por el agotamiento de arginina, todos estos son mecanismos susceptibles de ser bloqueados terapéuticamente para reducir la función supresora (262,263). Esto sería lo deseable ya que niveles elevados de MDSCs están asociados a mal pronóstico de los pacientes en varios tipos de cáncer (264). A pesar del interés creciente en la relevancia clínica de las MDSCs en cáncer, sorprendentemente solo hay unos pocos estudios que examinan el papel clínico de las MDSCs periféricas de origen monocitario en cáncer de mama (265–267).

## NLR

Las células inflamatorias así como otros mediadores del microambiente tumoral juegan un papel pronóstico en la progresión tumoral. Hay estudios publicados que evalúan el papel de “ratios” o proporciones de diferentes tipos celulares del sistema inmune en la evolución de la progresión tumoral, como son los linfocitos y monocitos o las plaquetas y los monocitos (268–270).

La presencia de un valor periférico elevado de la ratio de neutrófilos respecto a linfocitos (NLR) es indicativo de una inflamación sistémica y ha sido reconocido como un posible factor de mal pronóstico en varios cánceres (271), sin embargo dicha relación está poco definida en el cáncer de mama.

## ■ 2. JUSTIFICACIÓN

La quimioterapia neoadyuvante en el cáncer de mama ha mejorado los resultados clínicos para algunos subtipos biológicos. En concreto, para aquellas pacientes que presentan una respuesta patológica completa al tratamiento, con una mayor supervivencia respecto a aquellas que no la presentan.

Además la indicación de la quimioterapia neoadyuvante nos ha permitido evaluar los efectos de los tratamientos aplicados sobre la masa tumoral, ya que la respuesta clínica y patológica obtenida proporciona una oportunidad única para adquirir información pronóstica y predictiva.

Sin embargo, en el cáncer de mama a pesar de pertenecer al mismo subtipo histológico o presentar características inmunohistoquímicas similares, tanto la respuesta al tratamiento como la toxicidad presentada no es uniforme, lo que traduce la existencia de una heterogeneidad en esta patología que exige disponer de mejores biomarcadores.

El rápido desarrollo de métodos de alto rendimiento ha permitido el análisis de varios biomarcadores, pero, a pesar de ello, éstos siguen sin reflejar todos los factores implicados en la respuesta al tratamiento neoadyuvante, ya que dicha respuesta no solo se debe a señales propias del tumor sino también a cambios dinámicos en las interacciones de las células tumorales con su microambiente, entre otros.

Este *background* justifica la realización de esta tesis doctoral, cuyo proyecto se diseñó en pacientes con cáncer de mama HER2 negativo que han recibido tratamiento con quimioterapia neoadyuvante, en las que la heterogeneidad en la respuesta al tratamiento mencionada exige la identificación de nuevos biomarcadores. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de una publicación nuestra en referencia al gen *SPARC*, hemos querido explorar de una forma más específica, no solo su papel como predictor de respuesta al tratamiento, sino también su posible participación en la respuesta inmunológica. Además hemos explorado otros biomarcadores relacionados directa o indirectamente con el microambiente tumoral que conjuntamente con el gen *SPARC* nos puedan ayudar a generar un modelo de predicción de pronóstico y de respuesta al tratamiento.

Los resultados derivados de esta tesis pueden contribuir a diseñar en el futuro nuevas estrategias dirigidas a mejorar el pronóstico y permitir seleccionar mejor los tratamientos de las pacientes con diagnóstico de cáncer de mama.

## ■ 3. HIPÓTESIS

La hipótesis a partir de la cual se genera el trabajo que incluye esta tesis es la siguiente:

- El microambiente tumoral tiene una influencia en los resultados clínicos de las pacientes afectas de cáncer de mama fenotipo HER2 negativo tratadas con quimioterapia neoadyuvante (antracilcinas-taxanos).
- Los polimorfismos del gen *SPARC* y la presencia de ciertas subpoblaciones de TILs, conjuntamente con otros biomarcadores emergentes, pueden suponer un conjunto de variables útiles en la generación de un modelo de predicción, empleando la respuesta patológica completa como marcador subrogado de quimiosensibilidad.

## ■ 4. OBJETIVOS

## PRINCIPAL

Identificar marcadores implicados en el microambiente tumoral y en la respuesta inmunológica como predictores de respuesta a esquemas de quimioterapia y analizar su implicación pronóstica en pacientes con cáncer de mama.

## SECUNDARIOS

1- Estudiar el papel pronóstico y predictivo de polimorfismos de *SPARC* y de su expresión en el tejido tumoral en pacientes afectas de cáncer de mama. Así como su correlación con otros biomarcadores con el fin de investigar la función de *SPARC* en la respuesta inmunológica.

**(Objetivo 1).**

2- Determinar si existe una correlación de la cantidad de TILs en tejido tumoral con la respuesta patológica (biomarcador predictivo) y con la supervivencia (biomarcador pronóstico), además de evaluar su asociación con biomarcadores de expresión sistémica en cáncer de mama.

**(Objetivo 2).**

3- Explorar la posible asociación de los biomarcadores emergentes (NLR, MDSCs, exosomas) con las variables clínico-patológicas, la respuesta patológica y la supervivencia.

**(Objetivo 3).**

4- Generar un modelo predictivo de respuesta a la quimioterapia en cáncer de mama integrando las variables clínico-patológicas, las subpoblaciones de TILs y los biomarcadores de interés

**(Objetivo 4).**

## ■ 5. MÉTODOS

## 5.1 Diseño del estudio

Esta tesis es un estudio de cohorte, observacional y retrospectivo, realizado en una población de pacientes con cáncer de mama que recibieron quimioterapia neoadyuvante en las que de forma correlativa se obtuvieron muestras tisulares y plasmáticas para efectuar las determinaciones que a continuación se detallan.

## 5.2 Selección de pacientes

Se analizó una muestra de 161 pacientes diagnosticadas de carcinoma infiltrante de mama de tipo HER2 negativas que habían recibido tratamiento de quimioterapia neoadyuvante con esquemas de antraciclina y taxanos entre el año 2011 y 2017. Las pacientes se seleccionaron según muestreo de conveniencia y de acuerdo con los criterios que a continuación se especifican: pacientes mujeres mayores de 18 años, estadios II-III que hubieran recibido tratamiento con quimioterapia con intención neoadyuvante (esquema de antraciclina y taxanos) y que fueran potencialmente resecables además de tener una evaluación de la respuesta patológica según los criterios del sistema de Miller y Payne y del sistema de RCB (272). Quedaron excluidas las pacientes con sobreexpresión de HER2 y aquellas que hubieran recibido tratamiento con hormonoterapia en neoadyuvancia.

## 5.3 Procedimientos

### Recogida de datos clínicos

Los datos clínicos (edad, status menopáusico, tamaño del tumor, afectación de la axila, fecha de inicio y fin de tratamiento, tipo de respuesta patológica, fecha de recidiva/progresión/muerte etc.) e histológicos (grado de diferenciación, status receptor hormonal, % de ki67, invasión vascular y/o perineural) de las pacientes fueron recogidos retrospectivamente de la base de datos clínica.

La evaluación de la respuesta se realizó de forma asistencial: clínicamente cada 3 semanas y radiológicamente tras completar los 6 meses de quimioterapia neoadyuvante, según el protocolo de nuestro hospital.

La respuesta patológica se evaluó en las pacientes una vez operadas en base a los hallazgos histológicos de las piezas obtenidas durante el acto quirúrgico. La RCp se define como la ausencia de elementos celulares de cáncer infiltrante residual en la evaluación efectuada mediante hematoxilina y eosina de la pieza de mama resecada y de todos los ganglios linfáticos ipsilaterales aislados tras la finalización del tratamiento sistémico neoadyuvante (e de forma abreviada esta situación se categorizada como: ypT0 ypN0 en el sistema de estadificación AJCC). La presencia de carcinoma ductal *in situ* o carcinoma lobulillar *in situ* residual en la pieza quirúrgica no conlleva un cambio en la definición de RCp propuesta por la FDA.

La respuesta tumoral se evaluó en la pieza quirúrgica utilizando el sistema Miller y Payne y el RCB. Las variables RCB y las de respuesta por Miller y Payne tanto en la mama como en la axilase ordenaron en varias categorías cada una de ellas según gravedad (RCB: 0 vs I/II vs III; Miller y Payne; 1/2/3 vs 4/5 y en axila AD vs BC). Los tumores con RCp, Miller y Payne 4/5 y RCB 0 se clasificaron como respuesta, mientras que RCB I/II y III y Miller y Payne 1/2/3 como no respuesta.

Para la SG se consideró como tiempo a riesgo el tiempo comprendido entre el diagnóstico de la enfermedad y la muerte de la paciente o en su caso, el final del seguimiento. Para la SLE, se calculó el tiempo hasta la recaída local, contralateral o progresión a distancia o, en su defecto, hasta fin de seguimiento.

Las pacientes con carcinoma infiltrante fueron estadiadas según la clasificación de la WHO (Del inglés *World Health Organization (WHO) classification*) (273) y el grado histológico de cada tumor se analizó según el método de Elston y Ellis (274).

Los datos inmunohistoquímicos para el RE, RP, HER2 y Ki67 se obtuvieron retrospectivamente de la base de datos clínica recogida. Todos fueron evaluados utilizando los protocolos estándares. El RE se determinó utilizando el clon 6F11 (dilution 1:40) de Novocastra (Newcastle); el RP con el clon 16 (1:200) de Novocastra; Ki67 con el clon MIB-1 (prediluido) de Dako (Glostrup, Denmark). El RE, RP y el Ki67 fueron pretratados con un tampón de citrato de pH=6 en autoclavo por 8 minutos. La proteína de HER2 se evaluó utilizando el anticuerpo Herceptest (Dako; Glostrup, Denmark).

En el presente estudio utilizamos el Consenso de St Gallen de 2011 (275) y los datos procedentes del equipo de Cheang MCU y cols (276); para la clasificación de los subgrupos moleculares.

Los marcadores subrogados para los Luminal A fueron: positividad para RE y/o RP, HER2 negativo (277) y con un índice de Ki-67 bajo en un punto de corte de  $<14\%$ . Para los tumores Luminal B los marcadores subrogados fueron: RE y/o RP positivo, HER2 negativo e índice de ki67 alto para valores  $\geq 14\%$ . Los tumores Triple negativos fueron los que presentaron RE y RP ausentes y HER2 negativos. Se procedió a un buen control de calidad local en nuestro laboratorio para la tinción de ki-67.

La duración global del tratamiento fue de un máximo de 8 meses de quimioterapia, en función de la respuesta y tolerancia de las pacientes. Todas las pacientes fueron seguidas durante al menos 1 año después del fin del tratamiento.

## Obtención de muestras

Para el desarrollo de la hipótesis de trabajo de la presente tesis, se analizaron biomarcadores de expresión sistémica y biomarcadores de expresión tumoral. Para ello se extrajo el ADN germinal de 132 pacientes en las que se analizaron los polimorfismos seleccionados del gen *SPARC* (rs4958487, rs12153644, rs10065756, rs17718347, rs2347128, rs967527, rs1978707, rs3210714). En 74 de estas pacientes se analizaron los niveles totales de la proteína *SPARC* en suero y en 45 de ellas se determinó la expresión proteica de *SPARC* en tejido tumoral procedente de biopsias basales.

Los TILs han sido estudiados como recuento total en el tejido tumoral de biopsias basales de 118 pacientes y como subpoblaciones moleculares por inmunohistoquímica en 100 de las pacientes.

Finalmente, se estudiaron 3 biomarcadores emergentes en las mismas 74 muestras de las que disponíamos de suero, estos son: MDSCs, NLR pre y post quimioterapia y exosomas. Cabe destacar que la extracción de muestras se realizaron en tiempos diferentes, los TILs y NLR prequimioterapia se analizaron en las muestras extraídas previo al inicio de quimioterapia mientras que el resto de biomarcadores se recogieron en tiempos diferentes (algunas durante el tratamiento de quimioterapia y otras tras finalizar el mismo).

## Genotipado

En el presente estudio fueron seleccionados los 8 mismos *tagging single-nucleotide polymorphisms* (TagSNPs) del gen *SPARC* analizados en nuestro estudio anterior (278). El trabajar con TagSNPs permite reducir el número SNPs a analizar, ya que el tagSNP representa a un conjunto de SNPs de una región con alto desequilibrio de ligamiento y, por lo tanto, permite inferir la variación genética en esa región. Se utilizaron fuentes literarias, el buscador genómico de HapMap ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)) y el software Haploview 4.2 (<http://www.broad.mit.edu/personal/jcbarret/haplo/>) basándonos en dos criterios predefinidos:

**1) coeficiente con punto de corte de 0.80; 2) frecuencia del alelo minoritario (MAF, del inglés minor allele frequency)  $\geq 0.10$ .**

El ADN genómico se extrajo a partir de sangre total mediante el equipo Autopure (Qiagen, Hilden, Germany) y se cuantificó mediante el espectrofotómetro BioSpec-nano (Shimadzu, Kyoto, Japón).

Los SNPs se genotiparon mediante discriminación alélica por PCR (reacción en cadena de la polimerasa, de las siglas en inglés PCR: *polymerase chain reaction*) a tiempo real en el equipo BioMark™ (Fluidigm, San Francisco, CA, EE.UU.). Para ello se utilizaron ensayos SNPtype diseñados para este estudio y chips dinámicos de 48.48 de Fluidigm. Los ensayos SNPtype consisten en una pareja de primers específicos de alelo marcados con los fluorocromos FAM™ o HEX™, y otra pareja de primers específicos de locus. Las muestras se llevaron a una concentración de 60 ng/μL. Tanto las muestras como los ensayos se prepararon según las indicaciones del fabricante. Los datos fueron analizados mediante el software de análisis de genotipado de SNPs de Fluidigm.

En la tabla 5 se indica la referencia de cada uno de los SNPs en la base dbSNP (NCBI), la referencia de la secuencia, sus ubicaciones en el genoma y sus valores de MAF reportados en población europea del proyecto 1000 Genomas, o en su ausencia (rs12153644) la reportada en población caucásica del proyecto HapMap.

refSNP	referencia secuencia	localización	MAF
rs4958487	c.-14+2752T>C	Intron 1	0.403
rs12153644	c.-13-4174A>T	Intron 1	0.333
rs10065756	c.-13-3184G>T	Intron 1	0.258
rs17718347	c.-13-3131G>A	Intron 1	0.358
rs2347128	c.-13-1945G>C	Intron 1	0.483
rs967527	c.58-484A>G	Intron 2	0.115
rs1978707	c.208+31C>T	Intron 4	0.451
rs3210714	c.*1200G>A	Exon 10(3'-UTR)	0.477

Tabla 5. Características de los TagSNPs analizados.refSNP: Referencia del SNP; MAF: frecuencia del alelo minoritario (HapMap);

## Análisis in silico

Para analizar el posible papel de los SNPs estudiados, hemos utilizado las bases de datos Regulome y Haploreg que integran datos provenientes del proyecto ENCODE. El Regulome (<https://regulomedb.org/regulome-search/>) contiene información sobre elementos reguladores en regiones no codificantes del genoma, como la unión de factores de transcripción, la modificación de la cromatina y la metilación del ADN, etc. (279) y el HaploReg (<https://pubs.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>), que recoge información de desequilibrio de ligamiento del proyecto 1000 Genomas, del efecto de los SNPs en los elementos de regulación y en la expresión génica (eQTL), etc.(280).

## Evaluación anatomopatológica

### Evaluación de los TILs estromales tumorales

Se cuantificaron los TILs estromales en los cortes de hematoxilina-eosina obtenidos de las biopsias previas al inicio del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante. Se evaluaron los TILs en base a las guías del International *TIL working group* (218). Los TILs estromales se cuantificaron como porcentaje de células inmunes en el estroma y se recogieron como variable continua. Los TILs estromales a su vez fueron estratificados en 2 grupos: bajo si  $\leq 10\%$  y alto si  $>11\%$  Estos dos grupos fueron escogidos teniendo en cuenta la literatura (281) y el punto de corte obtenido del análisis de curvas ROC en nuestros datos, con la sensibilidad y especificidad más altas. También se recogieron los TILs intratumorales aunque no se incluyeron en el análisis estadístico.

## Imunohistoquímica de *SPARC* y de las subpoblaciones de TILs

Todas las tinciones inmunohistoquímicas se realizaron en las muestras de biopsia obtenidas con aguja fina previo al tratamiento de quimioterapia neoadyuvante.

Se cortaron secciones seriadas de 5µm y se tiñeron usando el método Envision (Dako; Glostrup, Denmark) para todos los marcadores.

Para la determinación de la proteína *SPARC*, seleccionamos el anticuerpo anti *SPARC* (ON1 1;ph High, 30 min incubación primario. ON1-1. Dilución 1:200 ; Invitrogen). Los scores de inmunotinción de *SPARC* fueron calculados multiplicando el porcentaje de células marcadas en estroma y en epitelio por la intensidad de la tinción (H-score; range 0-300) (282).

Se procedió a la determinación de las diferentes subpoblaciones de TILs usando el método Dako (Dako; Glostrup, Denmark) y según las siguientes condiciones: CD20 (ph High, 20 min incubación primario. Clone L26 Ready to use), CD4 (ph High, 20 min incubación primario, mouse linker. Clone 4b12 Ready to use), CD8 (ph High, 20 min incubación primario. Clone C8-144B Ready to use ), CD68 (ph High, 35 min incubación primario. Clone KP1 Ready to use), y CD1a (ph High, 20 min incubación primario, mouse linker. Clone 010 Ready to use ) La evaluación de los linfocitos infiltrantes de tumor (CD20, CD8 y CD4), células dendríticas (CD1a) e histiocitos (CD68) se efectuó cuantificando la positividad celular en 10 campos diferentes para cada uno de los marcadores.

Todas las tinciones inmunohistoquímicas se evaluaron por dos patólogos de forma independiente y los resultados discordantes se revisaron para conseguir un consenso mutuo.

### Estudio inmunológico:

#### Tinción inmunofluorescente

Un millón de células mononucleadas fueron resuspendidas en muestra de sangre periférica (MSP) y se tiñeron con dos paneles de anticuerpos (paneles A y B) durante 15 minutos en la oscuridad y a temperatura ambiente. El panel A incluyó anti-CD33-APC, CD15-PECy7, HLA-DR-APCH7, CD14-PERCP (Miltenyi), CD11b-PE (Immunotools) y VIVID-VioBlue (Thermo Fisher Scientific). El panel B incluyó anti-CD3-FITC, CD20-FITC, CD56-FITC, CD11c-APC (Immunotools), HLA-DR-APCH7, CD14-PERCP, CD123-VioGreen, (Miltenyi), CD86-PE (BDBiosciences) y VIVID-VioBlue (Thermo Fisher Scientific, Oregon, USA). Seguidamente se procedió al lavado de las células con 1 ml de DMSO por centrifugación a 547xg por 5 minutos a temperatura ambiente. Las células del pellet fueron finalmente resuspendidas con 200µl de MSP para el análisis de citometría de flujo. Los dos valores recogidos para los cálculos estadísticos fueron el valor relativo de MDSCs (% total de MDSCs respecto del total de células mononucleadas) y el valor absoluto de MDSCs (número de células MDSCS maduras por µl de sangre).

#### Determinación de concentraciones plasmáticas de *SPARC*

*SPARC* se midió en el plasma de las pacientes con cáncer de mama utilizando el kit SimpleStep enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Abcam). Los pasos que se siguieron se detallan a continuación:

1. Se añadieron 50µl de las muestras diluidas (1:50) en una microplaca recubierta anti-tag (SimpleStep ELISA Kit). Para el estándar, se añadieron 50µl de cada serial diluido por duplicado a la placa.
2. Para la captura y la detección de los anticuerpos, se añadieron 50µl del Cocktail de Anticuerpo a la placa. A su vez la placa fue incubada a TA por una hora.

3. Tras la incubación, la placa fue lavada tres veces con 350µl de wash buffer.
4. Una vez la placa ya estaba lavada, se añadieron 100µl de solución sustrato a cada pocillo. Seguidamente la placa fue incubada durante 10 minutos.
5. Después de este tiempo, se añadieron 100µl de solución stop a cada uno de los pocillos. La densidad óptica de cada pocillo se determinó utilizando un lector de microplacas ELISA a 450 nm y se obtuvo una curva estándar confiable. La concentración de las muestras (pg/ml) se determinó extrapolando su valor de absorbancia dentro de la ecuación de la curva estándar y multiplicándolo por el factor de dilución.

### Aislamiento y caracterización exosómica

La obtención de exosomas se realizó a partir de una muestra de plasma. Un volumen de 1 mL de plasma se centrifugó 5 minutos a 5400 rpm. Después el sobrenadante se volvió a centrifugar 30 minutos a temperatura ambiente a 14.000g. Del sobrenadante se separó 100 uL.

Mientras tanto se prepararon los reactivos del kit para cuantificar los exosomas (ExoStep Plasma, Immunostep). Primero se resuspendió y agitó el vial que contenía las bolas de captura que llevan anticuerpos anti-CD63 durante 20 segundos. De este vial, se pipetearon 25 uL y se pasaron al tubo con 100 uL de plasma. La mezcla se incubó toda la noche a TA y sin agitación. Al día siguiente, se añadió 1 mL de Assay buffer 1x y se centrifugó a 2500g 5 min TA. Se aspiró todo el sobrenadante dejando los 100 uL del pellet sin tocar. A continuación se añadieron 25uL del anticuerpo anti-CD81 conjugado con phycoerythrin se mezcló la suspensión pipeteando. Se volvió a incubar durante 1h a 4°C y en la oscuridad. Pasado este tiempo se volvió a añadir 1ml Assay buffer 1x y centrifugar 5 min a 2500g. Se aspiró el sobrenadante, dejando 100uL de pellet al que se añadió 350 uL Assay Buffer 1x. La muestra estaba preparada para ser adquirida por el citómetro de flujo.

### Cálculo NLR

La ratio neutrófilos / linfocitos fue calculada en las muestras basales preoperatorias (previas al inicio de la quimioterapia neoadyuvante) y en las postoperatorias dividiendo el número absoluto de recuento de neutrófilos por el número absoluto de recuento de linfocitos. En base a los estudios previamente publicados (283–285), se escogió el punto de corte de NLR de 3 para discriminar entre alto NLR ( $\geq 3$ ) y bajo NLR ( $< 3$ ).

## **5.4 Análisis estadístico**

### **- Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico inicial, se describieron las variables cuantitativas mediante la media aritmética y su correspondiente desviación estándar. Las variables categóricas se describieron mediante tabla de frecuencias (número y porcentaje).

Las variables respuesta de interés se analizaron según su tipología. Así, las variables binarias (RCp, ki67, etc) se analizaron mediante regresión logística binaria. Las variables RCB y las de respuesta por Miller y Payne tanto en la mama como en la axila, se analizaron mediante regresión logística ordinal. Para estos análisis los resultados se expresaron como OR.

Por su parte, la supervivencia y el tiempo de recidiva se representaron con las curvas de Kaplan-Meier y se expresaron mediante % debido a que el 50% de las pacientes no experimentaron un evento (muerte o recurrencia) en el tiempo de seguimiento del estudio y, por lo tanto, no se pudieron obtener las media-

nas. La SG y la SLE se analizaron mediante long-rank test y regresión de Cox de riesgos proporcionales. Los resultados se expresaron mediante HR.

Se evaluaron posibles diferencias entre las categorías de las variables NLR pre y postquimioterapia y los TILs mediante test ji-cuadrado para las variables categóricas y el test no paramétrico de Mann – Whitney para las variables continuas. Para el análisis de correlación entre variables continuas se empleó el coeficiente de correlación de Spearman evaluando su significación estadística. Estos resultados se presentan en forma de gráficos X-Y o Scatter Plots.

Las variables de ajuste utilizadas en los análisis realizados fueron el grado histológico (G3 vs G1/G2), el tamaño tumoral (T2/T3/T4 vs T1), el estatus ganglionar (N+ vs N0) y el tipo molecular (luminal A, luminal B, triples negativas).

Las asociaciones del análisis estratificado para cada uno de los subtipos moleculares, se evaluaron mediante test ji-cuadrado o test exacto de Fisher. El reducido tamaño muestral disponible al dividir la muestra en subtipos planteó la limitación de la falta de potencia estadística y de factibilidad de los propios cálculos, por lo que solo se presentan los resultados de los p-values de los análisis univariados.

Las asociaciones entre las medianas de las distintas subpoblaciones de TILs con las respuestas patológicas se evaluaron mediante el test ji-cuadrado para las variables categóricas y el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para las variables continuas. Las variables categóricas se obtuvieron teniendo en cuenta los puntos de corte específicos para cada subpoblación mediante las curvas ROC (CD4: 1; CD8: 5; CD20:1; CD68: 16; CD1a:1). La SLE se analizó mediante long-rank test y regresión de Cox de riesgos proporcionales.

Se consideraron asociaciones estadísticamente significativas aquellas cuyo p-valor <0.05. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el paquete estadístico STATA 15.1, el programa R (V.3.2.3) y el software estadístico SPSS (v26.0, IBM).

Se generaron *heat maps* y *clusters* de los datos de pacientes basados en los diferentes marcadores para todos los pacientes y para cada uno de los subtipos moleculares. Estos análisis se realizaron en R (versión 3.6.3; <https://www.R-project.org/>), utilizando paquetes estándar así como los paquetes *haven* (R package versión 2.2.0; <https://CRAN.R-project.org/package=have>) y *pheatmap* (versión 1.0.12; <https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap>) con los valores de los parámetros por defecto.

La selección de los pacientes, la realización del estudio y el análisis de datos se llevó a cabo siguiendo las guías REMARK (Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies) (286) .

#### **- Cálculo del score predictivo:**

Se realizó regresión logística multivariada con las variables que se seleccionaron para introducir en el score (edad, grado histológico, status de los RRHH, ki67, cT, cN). En nuestro caso se han considerado variables cuyo p-valor fuera de <0.2 y se evaluó colinealidad. Tras encontrar el modelo se analizó su poder predictivo (Área bajo la curva ROC=AUC). Una vez se analizó el poder predictivo del modelo (AUC) se valoraron sus coeficientes y odds ratios correspondientes. Esto se realizó para construir un modelo que simplificara el dato para la regresión logística multivariada. Todo ello sin pérdida del poder predictivo o con una pérdida mínima. El peso para el risk score se ha calculado redondeando el coeficiente de regresión al entero más próximo. Seguidamente se valoró la curva ROC (y su AUC) correspondiente al modelo simplificado que define el score. Una vez se estableció como válido el sistema de puntuación del score, se consideró la posibilidad de establecer un punto de corte que defina la población en alto y bajo riesgo en una tabla 2 x 2 que permitió calcular la sensibilidad, especificidad y las otras medidas de exactitud diagnóstica. El método utilizado para el cálculo del punto de corte es el asociado a maximizar el índice de Youden (J). Se define  $J = \text{Sensibilidad} + \text{Especificidad} - 1$ .

## 5.5 Consideraciones éticas

Ambos estudios se han llevado a cabo siguiendo rigurosamente las recomendaciones éticas internacionales para la investigación médica en humanos. El investigador ha sido responsable de garantizar que el estudio se realice de acuerdo con las normas recogidas en la Declaración de Helsinki.

Ambos estudios han sido aprobados por el comité de ética del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Los pacientes que en el momento de la inclusión estaban vivos, otorgaron previamente su consentimiento informado, en los casos de incapacidad por cualquier motivo, lo hicieron sus familiares más cercanos.

## ■ 6. RESULTADOS

1.1 Características de las pacientes.

1.2 Estudiar el papel pronóstico y predictivo de polimorfismos de *SPARC* y de su expresión en el tejido tumoral en pacientes afectas de cáncer de mama. Así como su correlación con otros biomarcadores con el fin de investigar la función de *SPARC* en la respuesta inmunológica.

**(Objetivo 1).**

1.3 Determinar si existe una correlación de la cantidad de TILs en tejido tumoral con la respuesta patológica (biomarcador predictivo) y con la supervivencia (biomarcador pronóstico), además de evaluar su asociación con biomarcadores de expresión sistémica en cáncer de mama.

**(Objetivo 2).**

1.4 Explorar la posible asociación de los biomarcadores emergentes (NLR, MDSCs, exosomas) con las variables clínico-patológicas, la respuesta patológica y la supervivencia.

**(Objetivo 3).**

1.5 Generar un modelo predictivo de respuesta a la quimioterapia en cáncer de mama integrando las variables clínico-patológicas, las subpoblaciones de TILs y los biomarcadores de interés.

**(Objetivo 4).**

## 1.1 Características de las pacientes

La tabla 6 muestra las características de las 161 pacientes incluidas en nuestro estudio. La mediana de edad de las pacientes incluidas al diagnóstico fue de 55 años. De las 161 pacientes que recibieron quimioterapia neoadyuvante, el 27% se clasificaron como triples negativas, el 27 % como luminales A y el 46 % como luminales B. La respuesta al tratamiento fue de RCp en un 16,8 % y no-RCp en un 83,2 % de las pacientes. Basándonos en el subtipo molecular, 77 pacientes con cáncer de mama triple negativo alcanzaron una RCp (48%), en 13 (8%) pacientes luminales A y en 71 de las pacientes luminales B (44%). Según el sistema de gradación de Miller y Payne las lesiones se clasificaron en grado 1 (12,4%), 2 (16,8%), 3 (39,1%), 4 (13,7%) y 5 (18%). La clase RCB fue 0 (17,4%), I (8,7%), II (46,6%) y III (27,3%).

La mediana de seguimiento fue de 63 meses (10.2 - 116.0). 24 pacientes (14.9%) presentaron una recurrencia, se dieron 17 muertes (10,6%), 10 debidas a cáncer de mama y 7 debidas a otras causas (datos no mostrados en las tablas). La mediana de SLE y SG a 5 años fue del 85.6% (CI95: 78.6%, 90.4%) y del 89.9% (CI95: 83.5%, 93.9%), respectivamente.

Característica	Nº de pacientes (%) (n=161)
<b>Edad</b>	
<50	55 (34.2)
≥50	106(65.8)
<b>Estado menopáusico</b>	
Premenopausia	61(37.8)
Postmenopausia	88 (54.7)
Perimenopausia	12 (7.5)
<b>Tamaño tumoral</b>	
T1	11 (6.8)
T2	67(41.6)
T3	42(26)
T4	41(25.6)
<b>Tipo tumoral</b>	
Lobulillar	14 (8.7)
Ductal	140 (86.3)
Mlxto	3 (1.9)
Otro tipo histológico	4 (3.1)
<b>Grado histológico</b>	
G1	10 (6.2)
G2	104 (65.2)
G3	45 (28.6)
<b>Invasión linfovascular</b>	
Negativo	133 (82.6)
Positivo	28 (17.4)
<b>Invasión perineural</b>	
Negativo	147 (91.3)
Positivo	14 (8.7)

Tabla 6: Características de las pacientes. KI 67 Antígeno identificado por el anticuerpo monoclonal ki67; RE Receptor de estrógeno; RP Receptor de progesterona; RCp respuesta patológica completa.

<b>Característica</b>	<b>Nº de pacientes (%) (n=161)</b>
<b>Ki 67%</b>	
0-14%	53 (32.9)
>14%	108 (67.1)
<b>Estadio clínico N</b>	
cN0	60 (37.3)
cN+	101(62.7)
<b>RE</b>	
Positivo	116 (72)
Negativo	45 (28)
<b>RP</b>	
Positivo	97 (60.2)
Negativo	64 (39.8)
<b>Respuesta patológica</b>	
No-RCp	134 (83.2)
RCp	27 (16.8)

Tabla 6 (cont.)

Tal como nos han mostrado publicaciones previas, el grado histológico, los receptores hormonales negativos, ki67 >14 % se han asociado de forma significativa con RCp, SLE y SG (Tabla 7).

Por este motivo, las covariables de grado histológico y tipo molecular, junto con el tamaño tumoral y el estado ganglionar, son las que se han incluido en el modelo multivariado.

Variable	RCp		SLE		SG	
	OR (IC 95%)	P'	HR (IC 95%)	P'	HR (IC 95%)	P'
<b>Edad</b>						
<50	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
>=50	0.86 [0.36;2.03]	0.727	1.13 [0.48;2.64]	0.780	1.96 [0.64;6.04]	0.238
<b>SM</b>						
Pre	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
Post	0.77 [0.33;1.81]	0.558	1.15 [0.47;2.81]	0.763	1.79 [0.55;5.83]	0.333
Peri	0.37 [0.04;3.16]	0.395	3.80 [1.13;12.8]	0.031	9.24 [2.27;37.7]	0.002
<b>Grado</b>						
1 o 2	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
3	2.84 [1.21;6.66]	0.019	3.38 [1.51;7.55]	0.003	3.72 [1.41;9.78]	0.008
<b>RRHH</b>						
Positivo	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
Negativo	3.22 [1.37;7.59]	0.009	4.87 [2.16;11.0]	<0.001	6.00 [2.22;16.2]	<0.001
<b>Ki67</b>						
<14	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
>14	4.76 [1.36;16.6]	0.006	2.87 [0.98;8.40]	0.055	4.22 [0.96;18.5]	0.056
<b>cT</b>						
<=2	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
>2	2.10 [0.26;17.1]	0.543	75279428 [0.00;.]	0.998	75724296 [0.00;.]	0.998
<b>cN</b>						
N+	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
N0	1.43 [0.62;3.31]	0.407	0.81 [0.35;1.89]	0.623	0.35 [0.10;1.22]	0.100

Tabla 7: Correlación entre características clínico-patológicas y la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante, SLE y SG. SM estado menopáusico; RRHH receptores hormonales; LV: invasión linfovascular; KI 67 Antígeno identificado por el anticuerpo monoclonal ki67; IPN: invasión perineural; OR Odds ratio; SLE Supervivencia libre de enfermedad; SG Supervivencia Global; HR Hazard ratio; RCp respuesta patológica completa; IC Intervalo de confianza; P': P-valor basado en el test de log-rank

Variable	RCp		SLE		SG	
	OR (IC 95%)	P'	HR (IC 95%)	P'	HR (IC 95%)	P'
<b>LV</b>						
No	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
Si	0.00 [0.00;.]	0.003	0.60 [0.24;1.52]	0.280	2.54 [0.94;6.87]	0.066
<b>SIPN</b>						
No	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
Si	0.00 [0.00;.]	0.068	0.60 [0.18;2.01]	0.404	3.99 [1.29;12.3]	0.016

Tabla 7 (cont.)

## 1.2 Estudiar el papel pronóstico y predictivo de polimorfismos de *SPARC* y de su expresión en el tejido tumoral en pacientes afectas de cáncer de mama. Así como su correlación con otros biomarcadores con el fin de investigar la función de *SPARC* en la respuesta inmunológica (Objetivo 1):

En nuestra muestra de estudio la distribución de las frecuencias alélicas de los polimorfismos fue comparable a las reportadas por el proyecto 1000 genomas (The 1000 Genomes Project. Available at: <http://www.internationalgenome.org/>. Accessed January, 2019). Asimismo, las frecuencias genotípicas observadas para los polimorfismos estudiados cumplían el equilibrio de Hardy-Weinberg, excepto las de rs967527 que, por lo tanto, fue excluido de los análisis.

### • Asociaciones entre polimorfismos *SPARC* y las variables clinico-patológicas:

Al analizar las relaciones entre los polimorfismos de *SPARC* y las variables clínicas se identificaron asociaciones con 4 polimorfismos (Tabla 8). El alelo A del rs12153644 se asoció con una mayor probabilidad de presentar receptor hormonal positivo, el 83.3% de las pacientes con genotipo AA y el 80.3% con genotipo TA eran positivas para los receptores hormonales frente al 62.8% de las pacientes homocigotas para el alelo T (TA  $p= 0.046$ ; AA  $p= 0.124$ ). El polimorfismo rs4958487 presentó una asociación con la afectación ganglionar, el 81% de las pacientes con genotipo GG presentaban afectación ganglionar comparadas con el 65.3% de las heterocigotas y el 48.7% de las pacientes con genotipo AA (AG  $p= 0.097$ ; GG  $p= 0.017$ ). Por otro lado, el rs3210714 mostró una asociación estadísticamente significativa con una menor probabilidad de presentar invasión linfovascular, el 92.7% de las pacientes con genotipo GG no presentaron invasión linfovascular comparadas con el 77.2% de las heterocigotas y el 73.5% de las pacientes con genotipo AA (GA  $p= 0.043$ ; AA  $p= 0.031$ ). Se observó un resultado similar con el rs19789707, el 92% de las pacientes con genotipo GG no presentaron invasión linfovascular comparadas con el 83.9% de las heterocigotas y el 71.1% de las pacientes con genotipo AA (AG  $p= 0.124$ ; GG  $p= 0.043$ ).

SNPs	GH		RRHH		ki67		T		N		IVL		IPN	
	OR(IC95%)	P'												
rs10065756:														
C/C	Ref.	Ref.												
A/C	1.05 [0.47;2.36]	0.912	0.73 [0.32;1.68]	0.471	0.81 [0.37;1.78]	0.609	0.56 [0.13;2.45]	0.465	1.17 [0.56;2.47]	0.677	0.53 [0.20;1.37]	0.195	0.48 [0.14;1.70]	0.268
A/A	2.06 [0.62;6.87]	0.258	0.69 [0.17;2.78]	0.637	0.53 [0.16;1.75]	0.314	0.68 [0.07;7.12]	0.736	1.67 [0.47;5.93]	0.453	0.90 [0.22;3.67]	0.913	0.00 [0.00;]	0.170
rs12153644:														
T/T	Ref.	Ref.												
T/A	0.70 [0.31;1.62]	0.416	0.41 [0.18;0.97]	0.046	0.59 [0.25;1.40]	0.242	0.64 [0.12;3.47]	0.650	1.25 [0.57;2.70]	0.583	0.48 [0.18;1.24]	0.139	1.24 [0.35;4.39]	0.766
A/A	1.04 [0.32;3.33]	0.945	0.34 [0.08;1.35]	0.124	0.38 [0.12;1.22]	0.117	0.39 [0.05;3.01]	0.411	1.87 [0.57;6.19]	0.321	0.83 [0.23;3.07]	0.807	0.00 [0.00;]	0.236
rs17718347:														
T/T	Ref.	Ref.												
T/C	1.06 [0.46;2.45]	0.890	0.54 [0.23;1.31]	0.182	0.89 [0.40;1.97]	0.773	0.64 [0.14;2.80]	0.575	1.16 [0.54;2.47]	0.712	0.70 [0.27;1.86]	0.490	0.74 [0.21;2.58]	0.653
C/C	2.08 [0.69;6.21]	0.207	1.10 [0.35;3.39]	0.866	0.72 [0.24;2.17]	0.570	1.06 [0.10;10.8]	0.986	1.93 [0.61;6.12]	0.280	1.40 [0.41;4.71]	0.596	0.44 [0.05;3.95]	0.519
rs19789707:														
A/A	Ref.	Ref.												
A/G	0.48 [0.21;1.12]	0.095	0.66 [0.26;1.64]	0.383	1.16 [0.52;2.60]	0.725	0.67 [0.16;2.82]	0.611	0.85 [0.38;1.90]	0.696	0.47 [0.19;1.21]	0.124	1.10 [0.29;4.14]	0.906
G/G	0.64 [0.22;1.85]	0.427	1.55 [0.54;4.42]	0.429	1.75 [0.58;5.26]	0.336	. [.;.]	0.259	0.64 [0.23;1.74]	0.391	0.21 [0.04;1.04]	0.043	0.89 [0.15;5.25]	0.931
rs19789707:														
A/A o A/G	Ref.	Ref.												
G/G	0.95 [0.36;2.51]	0.941	1.95 [0.76;4.95]	0.177	1.61 [0.59;4.37]	0.367	. [.;.]	0.141	0.70 [0.29;1.70]	0.439	0.32 [0.07;1.45]	0.121	0.84 [0.17;4.11]	0.888
rs2347128:														
C/C	Ref.	Ref.												
C/G	1.35 [0.52;3.55]	0.555	1.24 [0.47;3.29]	0.674	0.79 [0.32;1.95]	0.619	0.41 [0.04;3.79]	0.476	0.48 [0.20;1.18]	0.112	1.96 [0.58;6.61]	0.290	0.55 [0.15;2.06]	0.398
G/G	2.07 [0.73;5.87]	0.182	1.21 [0.41;3.61]	0.740	0.74 [0.27;2.02]	0.566	0.22 [0.02;2.09]	0.195	0.74 [0.27;2.02]	0.566	2.77 [0.76;10.0]	0.127	0.38 [0.07;2.08]	0.284

Tabla 8: Asociaciones entre polimorfismos de SPARC y variables clínico-patológicas. SNPs: Del inglés *Single Nucleotide Polymorphisms*; KI 67 Antígeno identificado por el anticuerpo monoclonal ki67; GH: grado histológico; RRHH: receptores hormonales; LV: invasión linfocelular; IPN: invasión perineural; OR: Odds ratio; IC: Intervalo de confianza; P' P-valor basado en el test de log-rank

SNPs	GH		RRHH		ki67		T		N		IVL		IPN	
	OR(IC95%)	P'												
rs3210714:														
G/G	Ref.	Ref.												
G/A	0.89 [0.35;2.22]	0.801	0.64 [0.26;1.63]	0.364	0.83 [0.35;1.97]	0.680	0.33 [0.04;3.08]	0.362	0.55 [0.24;1.28]	0.174	3.74 [0.99;14.1]	0.043	0.69 [0.19;2.57]	0.596
A/A	1.69 [0.64;4.49]	0.307	0.87 [0.31;2.40]	0.798	0.87 [0.32;2.32]	0.778	0.19 [0.02;1.76]	0.142	1.11 [0.41;2.99]	0.838	4.56 [1.12;18.5]	0.031	0.45 [0.08;2.48]	0.389
rs4958487:														
A/A	Ref.	Ref.												
A/G	0.67 [0.28;1.56]	0.361	0.51 [0.22;1.20]	0.133	0.84 [0.36;1.97]	0.695	0.29 [0.03;2.50]	0.266	1.98 [0.89;4.38]	0.097	0.52 [0.20;1.37]	0.199	1.50 [0.37;6.01]	0.599
G/G	1.00 [0.32;3.08]	0.993	0.30 [0.07;1.19]	0.083	0.64 [0.21;1.96]	0.449	0.25 [0.02;2.93]	0.317	4.47 [1.27;15.7]	0.017	0.68 [0.19;2.52]	0.592	0.60 [0.06;6.16]	0.731

Tabla 8 (cont.)

• **Polimorfismos de SPARC como marcador predictivo**

En las tabla 9 y 10 podemos observar los resultados obtenidos de los análisis al enfrentar los distintos polimorfismos con la respuesta patológica. Al analizar la relación entre los polimorfismos de SPARC y la respuesta local valorada según la escala de Miller y Payne en la mama, observamos en los análisis univariados una correlación con el rs19789707 ( $p=0.07$ , modelo recesivo), que alcanza la significación estadística al ajustar por las covariables clínicas con una OR de 3.81 (95% CI: 1.15-12.56;  $p=0.028$ ). Las pacientes con el genotipo GG presentaron un mayor riesgo de no responder que la pacientes portadoras del alelo A (genotipos AA y AG) (84% vs 65.4%). Cuando se realizaron los análisis univariados considerando el subtipo molecular se observó que la asociación era estadísticamente significativa con el grupo de pacientes luminales ( $p=0.047$ ) (datos mostrados en el apartado ANEXO). En cambio esta variante no presentó ninguna asociación con respecto a la respuesta axilar, ni en el total de la muestra ni en el subgrupo de pacientes luminales. Al analizar la relación de rs19789707 con la respuesta por RCB, se observa una tendencia a una menor respuesta de los pacientes heterocigotos A/G respecto a los homocigotos AA (AG  $p=0.074$ ; GG  $p=0.537$ ). Esta relación pasa a ser significativa en el análisis multivariado (AG  $p=0.048$ ; GG  $p=0.538$ ).

Por otro lado, encontramos que para el rs4958487, los pacientes con genotipo G/G presentan una menor probabilidad de respuesta por Miller y Payne en la axila en el análisis univariado (GG 66.7% vs AG 51.4% vs AA 40.5%; AG  $p=0.293$ ; GG  $p=0.064$ ), aunque sin ser significativo. No hubo asociación de esta variante con la respuesta evaluada por Miller y Payne en la mama o por RCB.

SNPs	N	RCp		RCB		M y P mama		M y P axila	
		OR(IC95%)	P'	OR(IC95%)	P'	OR(IC95%)	P'	OR(IC95%)	P'
<b>rs10065756:</b>									
C/C	60	1						Ref.	Ref.
A/C	58	0.82 [0.31;2.15]	0.694	1.00 [0.49;2.05]	1.000	0.81 [0.38;1.76]	0.609	0.76 [0.37;1.57]	0.465
A/A	14	0.34 [0.04;2.90]	0.346	1.54 [0.50;4.74]	0.454	1.57 [0.39;6.31]	0.556	2.33 [0.66;8.30]	0.200
<b>rs12153644:</b>									
T/T	43	1						Ref.	Ref.
T/A	71	0.80 [0.29;2.18]	0.669	0.99 [0.47;2.11]	0.986	0.85 [0.38;1.92]	0.703	0.96 [0.45;2.08]	0.928
A/A	18	0.55 [0.10;2.87]	0.514	1.34 [0.45;3.94]	0.600	1.52 [0.42;5.50]	0.552	2.10 [0.66;6.67]	0.221
<b>rs17718347:</b>									
T/T	54	1						Ref.	Ref.
T/C	59	0.53 [0.19;1.47]	0.232	1.43 [0.69;2.99]	0.337	1.14 [0.52;2.51]	0.752	1.12 [0.53;2.36]	0.775
C/C	19	0.73 [0.18;2.97]	0.700	1.32 [0.46;3.75]	0.602	1.40 [0.44;4.50]	0.595	1.49 [0.51;4.29]	0.480
<b>rs19789707:</b>									
A/A	45	1						Ref.	Ref.
A/G	62	1.72 [0.60;4.95]	0.323	0.49 [0.23;1.07]	0.074	0.91 [0.40;2.04]	0.824	0.88 [0.41;1.92]	0.759
G/G	25	0.57 [0.11;3.04]	0.545	0.74 [0.29;1.92]	0.538	2.62 [0.76;9.03]	0.127	0.99 [0.37;2.64]	0.982
<b>rs19789707GG:</b>									
A/A o A/G	107	1						Ref.	Ref.
G/G	25	0.40 [0.09;1.86]	0.244	1.12 [0.48;2.57]	0.796	2.78 [0.89;8.69]	0.070	1.06 [0.44;2.54]	0.894

Tabla 9: Análisis univariado de las SNPs con las respuesta patológicas. SNPs Del inglés *Single Nucleotide Polymorphisms*; RCp respuesta patológica completa; RCB Del inglés Residual Burden Cancer ; MyP Miller y Payne ; OR Odds ratio; IC Intervalo de confianza; P' P-valor basado en el test de log-rank.

SNPs	N	RCp		RCB		M y P mama		M y P axila	
		OR(IC95%)	P'	OR(IC95%)	P'	OR(IC95%)	P'	OR(IC95%)	P'
<b>rs2347128:</b>									
C/C	36	1						Ref.	Ref.
C/G	61	1.22 [0.42;3.61]	0.732	0.97 [0.43;2.19]	0.934	0.73 [0.30;1.80]	0.511	0.49 [0.21;1.13]	0.098
G/G	35	0.47 [0.11;2.04]	0.336	2.07 [0.82;5.20]	0.123	0.96 [0.34;2.70]	0.942	0.72 [0.28;1.85]	0.503
<b>rs3210714:</b>									
G/G	41	1						Ref.	Ref.
G/A	57	1.03 [0.36;2.99]	0.961	1.33 [0.60;2.95]	0.482	0.97 [0.40;2.35]	0.958	0.57 [0.25;1.29]	0.185
A/A	34	0.65 [0.17;2.43]	0.543	1.75 [0.71;4.29]	0.224	0.76 [0.29;2.01]	0.588	0.75 [0.30;1.89]	0.557
<b>rs4958487:</b>									
A/A	39	1						Ref.	Ref.
A/G	72	0.74 [0.26;2.12]	0.577	1.01 [0.47;2.18]	0.983	0.69 [0.29;1.65]	0.414	1.55 [0.69;3.46]	0.293
G/G	21	1.08 [0.28;4.20]	0.906	1.07 [0.37;3.11]	0.903	0.69 [0.22;2.19]	0.542	2.93 [0.96;8.99]	0.064

Tabla 9 (cont.)

SNPs	RCp		RCB		M y P mama		M y P axila	
	OR(IC95%)	P'	OR(IC95%)	P'	OR(IC95%)	P'	OR(IC95%)	P'
<b>rs10065756</b>								
C/C							Ref.	
A/C	0.89 [0.32;2.45]	0.825	0.91 [0.44;1.89]	0.803	0.75 [0.33;1.68]	0.483	0.62 [0.26;1.46]	0.272
A/A	0.32 [0.03;3.00]	0.321	1.35 [0.42;4.35]	0.618	1.46 [0.34;6.33]	0.614	2.08 [0.45;9.52]	0.346
<b>rs12153644</b>								
T/T							Ref.	
T/A	1.03 [0.36;2.99]	0.956	0.82 [0.38;1.78]	0.615	0.71 [0.30;1.70]	0.447	0.74 [0.29;1.84]	0.514
A/A	0.75 [0.13;4.39]	0.751	0.97 [0.32;3.01]	0.964	1.18 [0.30;4.65]	0.812	1.45 [0.37;5.77]	0.597
<b>rs17718347</b>								
T/T							Ref.	
T/C	0.57 [0.20;1.68]	0.312	1.31 [0.62;2.78]	0.481	1.03 [0.45;2.38]	0.937	1.03 [0.43;2.48]	0.952
C/C	0.65 [0.14;2.92]	0.573	1.16 [0.40;3.35]	0.791	1.55 [0.45;5.35]	0.492	1.20 [0.34;4.26]	0.782
<b>rs19789707</b>								
A/A							Ref.	
A/G	2.52 [0.79;8.04]	0.118	0.45 [0.20;0.99]	0.048	0.80 [0.33;1.91]	0.615	0.93 [0.37;2.36]	0.884
G/G	0.47 [0.08;2.67]	0.391	0.83 [0.31;2.22]	0.704	3.37 [0.93;12.22]	0.065	1.74 [0.52;5.81]	0.365
<b>rs19789707</b>								
A/A o A/G							Ref.	
G/G	0.28 [0.06;1.36]	0.114	1.31 [0.55;3.13]	0.543	3.81 [1.15;12.56]	0.028	1.82 [0.62;5.30]	0.274

Tabla 10: Análisis multivariado de las SNPs con las respuesta patológicas. SNPs Del inglés *Single Nucleotide Polymorphisms*; RCp respuesta patológica completa; RCB Del inglés *Residual Burden Cancer* ; MyP Miller y Payne ; OR Odds ratio; IC Intervalo de confianza; P' P-valor basado en el test de log-rank.

SNPs	RCp		RCB		M y P mama		M y P axila	
	OR(IC95%)	P'	OR(IC95%)	P'	OR(IC95%)	P'	OR(IC95%)	P'
<b>rs2347128</b>								
C/C							Ref.	
C/G	1.33 [0.41;4.31]	0.635	1.14 [0.49;2.68]	0.759	0.55 [0.21;1.46]	0.232	0.51 [0.19;1.37]	0.181
G/G	0.41 [0.08;1.95]	0.260	2.48 [0.94;6.52]	0.066	0.78 [0.26;2.33]	0.654	0.65 [0.22;1.98]	0.451
<b>rs3210714</b>								
G/G							Ref.	
G/A	1.32 [0.42;4.13]	0.636	1.43 [0.63;3.27]	0.393	0.71 [0.28;1.81]	0.471	0.54 [0.21;1.44]	0.221
A/A	0.62 [0.15;2.51]	0.502	1.88 [0.74;4.77]	0.187	0.62 [0.22;1.73]	0.358	0.53 [0.18;1.58]	0.254
<b>rs4958487</b>								
A/A							Ref.	
A/G	0.92 [0.30;2.83]	0.891	0.76 [0.34;1.70]	0.504	0.64 [0.25;1.60]	0.339	1.14 [0.44;2.92]	0.787
G/G	1.56 [0.35;6.95]	0.560	0.66 [0.22;2.04]	0.475	0.60 [0.17;2.06]	0.413	1.51 [0.41;5.54]	0.534

Tabla 10 (cont.)

• **Polimorfismos de SPARC como marcador pronóstico**

En los análisis univariados, la variante rs19789707 mostró una tendencia a la significación con la SG ( $p=0.069$ ), debido a una mayor supervivencia de las pacientes heterocigotas (no hubo evento) respecto a las homocigotas (AA y GG). La SG a 5 años fue 100% (95% CI NA-NA) en las pacientes heterocigotas en comparación con 95.2% (95% CI 81.9-98.8%) en las pacientes con genotipo AA y 91.1% (95% CI 68.8-97.7%) en las pacientes con genotipo GG. Las variantes rs19789707 y rs4958487 se asociaron con la SLE (Tabla 11 y 12). Para la variante rs19789707, las pacientes con genotipo GG presentaron una menor SLE a 5 años, 84.1% (95% CI 57.1-94.8), que las pacientes portadoras del alelo A, 94.1% (95% CI 87.4-97.3%), ( $p=0.089$ , modelo recesivo), sin llegar a ser significativo al ajustar por las covariables del estudio (HR 2.44 (0.66-8.93);  $p=0.179$ ).

Esta asociación mostró significación estadística al analizar el grupo de pacientes luminales A ( $p=0.022$  modelo codominante;  $p=0.006$ , modelo recesivo) (Datos mostrados en el apartado ANEXO). Para la variante rs4958487, no se obtuvieron asociaciones significativas con la SLE al analizar toda la muestra ( $p=0.479$ ), aunque al analizar por tipo molecular se observó que en el grupo de pacientes luminales B, las que tenían el genotipo GG presentaban una menor SLE que el resto de pacientes ( $p=0.066$  modelo codominante;  $p=0.022$  modelo recesivo) (Tabla 11 y 12).

SNPs	SLE		SG	
	HR(IC95%)	P'	HR(IC95%)	P'
<b>rs10065756</b>				
C/C				
A/C	0.48 [0.12;1.92]	0.299	0.68 [0.11;4.04]	0.668
A/A	1.64 [0.33;8.26]	0.546	1.40 [0.15;13.5]	0.769
<b>rs12153644</b>				
T/T				
T/A	0.69 [0.18;2.58]	0.577	0.40 [0.07;2.42]	0.321
A/A	1.37 [0.25;7.52]	0.719	0.86 [0.09;8.28]	0.897
<b>rs17718347</b>				
T/T				
T/C	1.07 [0.29;4.01]	0.916	1.36 [0.23;8.15]	0.736
C/C	1.61 [0.29;8.91]	0.583	1.48 [0.13;16.4]	0.747

Tabla 11: Análisis univariado de los polimorfismos de *SPARC* con SLE y SG  
SNPs Del inglés *Single Nucleotide Polymorphisms*; SLE Supervivencia Libre de Enfermedad; SG Supervivencia Global;  
HR Hazard ratio ; IC Intervalo de confianza; P' P-valor basado en el test de log-rank

SNPs	SLE		SG	
	HR(IC95%)	P'	HR(IC95%)	P'
<b>rs19789707</b>				
A/A				
A/G	0.51 [0.11;2.27]	0.374	0.00 [0.00;.]	0.998
G/G	2.00 [0.50;8.05]	0.329	1.01 [0.18;5.56]	0.989
<b>rs19789707</b>				
A/A o A/G				
G/G	2.83 [0.82;9.76]	0.101	2.37 [0.43;13.0]	0.321
<b>rs2347128</b>				
C/C				
C/G	0.22 [0.04;1.14]	0.071	0.19 [0.02;1.87]	0.156
G/G	0.79 [0.21;2.94]	0.723	0.61 [0.10;3.66]	0.590
<b>rs3210714</b>				
G/G				
G/A	0.41 [0.10;1.70]	0.219	0.24 [0.02;2.27]	0.211
A/A	0.69 [0.17;2.92]	0.618	0.70 [0.12;4.19]	0.693
<b>rs4958487</b>				
A/A				
A/G	0.85 [0.20;3.59]	0.830	0.82 [0.14;4.90]	0.826
G/G	2.02 [0.41;10.0]	0.391	0.99 [0.09;10.9]	0.994

Tabla 11 (cont.)

SNPs	SLE		SG	
	HR(IC95%)	P'	HR(IC95%)	P'
<b>rs10065756</b>				
C/C				
A/C	0.47 [0.12;1.92]	0.294	0.72 [0.12;4.40]	0.722
A/A	1.57 [0.30;8.20]	0.596	0.99 [0.10;9.99]	0.992
<b>rs12153644</b>				
T/T				
T/A	0.89 [0.23;3.45]	0.865	0.62 [0.10;3.90]	0.608
A/A	1.80 [0.31;10.48]	0.511	0.91 [0.09;9.31]	0.940
<b>rs17718347</b>				
T/T				
T/C	1.17 [0.31;4.45]	0.821	1.60 [0.26;9.92]	0.616
C/C	1.30 [0.23;7.48]	0.766	0.86 [0.08;9.88]	0.906
<b>rs19789707</b>				
A/A				
A/G	0.67 [0.15;3.10]	0.610	ND*	
G/G	2.02 [0.48;8.61]	0.340		
<b>rs19789707</b>				
A/A o A/G				
G/G	2.44 [0.66;8.93]	0.179	1.86 [0.31;11.03]	0.495
<b>rs2347128</b>				
C/C				
C/G	0.14 [0.02;0.84]	0.031	0.28 [0.03;3.08]	0.299
G/G	0.47 [0.11;2.10]	0.326	0.41 [0.06;2.87]	0.368

Tabla 12: Análisis multivariado de los polimorfismos de *SPARC* con SLE y SG .

SNPs Del inglés *Single Nucleotide Polymorphisms*; SLE Supervivencia Libre de Enfermedad; SG Supervivencia Global; HR Hazard ratio ; IC Intervalo de confianza; P' P-valor basado en el test de log-rank; ND\*: HR no estimable debido a la ausencia de datos en el análisis ajustado.

SNPs	SLE		SG	
	HR(IC95%)	P'	HR(IC95%)	P'
<b>rs3210714</b>				
G/G				
G/A	0.42 [0.10;1.84]	0.250	0.38 [0.04;3.87]	0.411
A/A	0.57 [0.13;2.55]	0.462	0.47 [0.07;3.16]	0.438
<b>rs4958487</b>				
A/A				
A/G	1.17 [0.27;5.02]	0.834	1.28 [0.20;8.02]	0.794
G/G	3.39 [0.59;19.31]	0.170	0.97 [0.08;11.74]	0.979

Tabla 12 (cont).

• **Asociaciones de los polimorfismos de SPARC con su expresión en tejido y sus niveles en sangre, con la cantidad de TILs en tejido y con los nuevos biomarcadores (exosomas, NLR, MDSCs)**

1) **Polimorfismos de SPARC y expresión de SPARC en tejido:**

En la Tabla 13 podemos identificar fuertes correlaciones entre varios polimorfismos de SPARC y su expresión proteica en el tejido tumoral cuantificada mediante el sistema H-score (0-300), tanto en estroma como en epitelio. Para la variante rs10065756, en estroma, las pacientes con genotipo CC presentaron una mediana del H-score (120) superior al de las pacientes con genotipo CA (40) y AA (100) ( $p=0.046$ ); en epitelio se observó que las pacientes con genotipo CC presentaron una mediana del H-score (160) superior al de las pacientes heterocigotas (100) y de las pacientes con genotipo AA (40) ( $p=0.068$ ). Para la variante rs121553644, en estroma, las pacientes con genotipo TT presentaron una mediana del H-score (140) superior al de las pacientes heterocigotas (60) y de las pacientes homocigotas para el alelo A (80) ( $p=0.010$ ); en epitelio se observó que las pacientes con genotipo TT presentaron una mediana del H-score (180) superior al de las pacientes heterocigotas (120) y de las pacientes homocigotas AA (60) ( $p=0.007$ ). Destacar que, la variante rs4958487 asociada en nuestro estudio con variables clínicas también se correlacionó con el H-score de SPARC en estroma y en epitelio. En estroma, las pacientes con genotipo AA presentaron una mediana de H-score (150) superior a la de las pacientes heterocigotas (40) y de las pacientes homocigotas para el alelo G (80) ( $p=0.005$ ). En epitelio, las pacientes con genotipo AA presentaron una mediana de H-score (210) superior a la de las pacientes heterocigotas (120) y de las pacientes con genotipo GG (90) ( $p=0.005$ ). Finalmente, el rs17718347 presentó correlación solo en epitelio; las pacientes con genotipo TT presentaron una mediana del H-score (160) superior al de las pacientes con genotipo TC (120) y CC (40) ( $p=0.030$ ). El resto de variantes estudiadas no mostró correlación con la expresión de la proteína en estroma y/o epitelio.

2) **Polimorfismos de SPARC y niveles de SPARC en suero:**

En este caso no hubo significación estadística para ninguna de las variantes de interés (Tabla 13). A pesar de ello, si analizamos los números, se constata una linealidad de la variante rs4958487 y los niveles de SPARC en suero que, aunque no es estadísticamente significativa, es muy parecida a la observada en tejido: los valores son inferiores en los pacientes con genotipo GG.

SNPs	N	SPARC tejido				SPARC suero	
		Epitelio		Estroma		Mediana	P'
		Mediana	P'	Mediana	P'		
rs10065756	132		0.068		0.046		0.740
C/C	60	160.0 (120.0, 195.0)		120.0 (75.0, 145.0)		88.0 (69.5, 108.0)	
A/C	58	100.0 (40.0, 180.0)		40.0 (20.0, 140.0)		82.0 (66.3, 113.8)	
A/A	14	40.0 (20.0, 60.0)		100.0 (80.0, 120.0)		82.1 (62.5, 95.5)	
rs12153644	132		0.007				0.215
T/T	43	180.0 (150.0, 240.0)		140.0 (120.0, 160.0)	0.010	95.5 (74.7, 141.0)	
T/A	71	120.0 (40.0, 180.0)		60.0 (20.0, 140.0)		79.9 (66.1, 104.6)	
A/A	18	60.0 (40.0, 60.0)		80.0 (40.0, 80.0)		82.1 (66.3, 95.5)	
rs4958487	132		0.005		0.005		0.675
A/A	39	210.0 (160.0, 240.0)		150.0 (120.0, 160.0)		89.5 (69.5, 104.7)	
A/G	72	120.0 (40.0, 160.0)		40.0 (20.0, 140.0)		83.5 (67.9, 113.8)	
G/G	21	70.0 (60.0, 120.0)		80.0 (60.0, 100.0)		80.6 (66.3, 95.4)	
rs17718347	132		0.030		0.161		0.640
T/T	54	160.0 (120.0, 180.0)		120.0 (70.0, 140.0)		85.3 (68.3, 111.3)	
T/C	59	120.0 (40.0, 180.0)		40.0 (20.0, 140.0)		85.1 (70.5, 104.6)	
C/C	19	40.0 (12.5, 60.0)		100.0 (42.5, 130.0)		75.1 (62.2, 95.5)	

Tabla 13: Correlación de los polimorfismos de *SPARC* con la expresión de *SPARC* en tejido y sus niveles en suero. SNPs Del inglés *Single Nucleotide Polymorphisms*; *SPARC*, secreted protein acid and rich in cysteine; P' P-valor basado en el test de log-rank

### 3) Polimorfismos de *SPARC* y cuantificación de TILs:

Los análisis de la relación de los polimorfismos de *SPARC* con el % de TILs estromales, tanto de forma cuantitativa como estratificada, mostraron una relación de la variante rs2347128 que no llegó a ser estadísticamente significativa. Las pacientes con genotipo CC presentaron una mediana de TILs (7.5%) inferior a la de las pacientes con genotipos GC (15%) y CC (20%) ( $p=0.135$ , modelo codominante). Al realizar el análisis según el modelo de herencia dominante, dicha asociación sí fue estadísticamente significativa en el total de la muestra genotipada ( $p=0.044$ ), y prácticamente mantuvo la significación en el grupo de pacientes luminales B ( $p=0.073$ ) (datos no mostrados en las tablas). Los análisis con el resto de polimorfismos no mostraron ninguna asociación significativa.

#### 4) Polimorfismos de SPARC y marcadores emergentes:

Identificamos como la variante rs12153644 se asociaba de manera significativa con los niveles de exosomas: los pacientes con genotipo T/T (9.0) y T/A (11.3) presentaron medianas de exosomas mayores que los pacientes con genotipo AA (6.6) ( $p=0.028$ ). Del mismo modo, la variante rs17718347 presentó una correlación casi significativa con las MDSCs ( $p=0.068$ , modelo codominante): los pacientes con genotipo TT presentaron una mediana de MDSCs (1.3) inferior a los pacientes con genotipo TC (1.9) y CC (1.4) (Tabla 14). Cuando lo analizamos según el modelo dominante, sí resultó en una asociación estadísticamente significativa ( $p=0.043$ ). En cuanto a las variantes rs4958487 y rs19789707 con las que observamos resultados clínicos, no hayamos una correlación ni con la cuantificación exosómica, ni con las MDSCs, ni tampoco con la NLR.

SNPs	N	MDSCs*				NLR*				Exosomas*			
		count/microL	P'	%	P'	pre-QT		P'	post-QT		P'		
						bajo	alto		bajo	alto			
<b>rs12153644</b>	<b>132</b>		<b>0.863</b>		<b>0.568</b>			<b>0.421</b>			<b>0.631</b>		<b>0.028</b>
T/T	43	45.5 (16.8, 69.9)		1.6 (1.1, 2.1)		13 (21.3%)	5 (41.7%)		13 (22.4%)	5 (33.3%)		9.0 (5.6, 10.0)	
T/A	71	50.3 (31.4, 73.2)		1.6 (1.2, 2.4)		40 (65.6%)	6 (50.0%)		38 (65.5%)	8 (53.3%)		11.3 (8.6, 21.7)	
A/A	18	49.8 (33.9, 67.0)		2.1 (1.3, 2.4)		8 (13.1%)	1 (8.3%)		7 (12.1%)	2 (13.3%)		6.6 (6.0, 10.5)	
<b>rs17718347</b>	<b>132</b>		<b>0.138</b>		<b>0.068</b>			<b>0.831</b>			<b>0.270</b>		<b>0.319</b>
T/T	54	45.4 (16.8, 54.9)		1.3 (1.1, 2.1)		21 (34.4%)	5 (41.7%)		21 (36.2%)	5 (33.3%)		9.4 (7.5, 18.0)	
T/C	59	55.2 (33.5, 84.5)		1.9 (1.3, 2.5)		31 (50.8%)	6 (50.0%)		31 (53.4%)	6 (40.0%)		10.8 (8.4, 18.6)	
C/C	19	47.5 (33.9, 67.0)		1.4 (1.1, 2.3)		9 (14.8%)	1 (8.3%)		6 (10.3%)	4 (26.7%)		7.6 (6.1, 17.5)	

Tabla 14: Correlación de los polimorfismos de SPARC con MDSCs, NLR pre y postquimioterapia y Exosomas.\*los datos se presentan como medianas. SNPs Del inglés Single Nucleotide Polymorphisms; P' P-valor basado en el test de log-rank; NLR Del inglés Neutrophil-to-Lymphocyte ratio; pre-QT pre-quimioterapia; post-QT post quimioterapia; MDSCs Del inglés Myeloid-Derived Suppressor Cells;

#### Análisis in silico

Hemos estudiado *in silico* la posible funcionalidad de las variantes intrónicas rs1978707 y rs4958487 mediante las bases de datos RegulomeDB y HaploReg que integran datos provenientes del proyecto ENCODE. La base de datos RegulomeDB asigna un score de 5 a la variante rs1978707 (intrón 4), lo que indica que la evidencia de que regule la expresión del gen es mínima. No obstante, la variante está en desequilibrio de ligamiento ( $r^2 > 0.8$ ) con 15 SNPs (HaploReg), de los cuales dos de ellos tienen un score de 1f: rs725937 ( $D'=1$ ;  $r^2=0.95$ ) y rs7719521 ( $D'=1$ ;  $r^2=1$ ). En este caso, el bajo valor de score es indicativo de una alta evidencia de que dichos SNPs pueden afectar la expresión génica, ya que son eQTL para SPARC en monocitos de sangre periférica. Además pueden alterar el dominio de unión de factores de transcripción, rs725937 (E2F, Irf, SIX5) y rs7719521 (Spz1), aunque por ChIP-Seq no se ha observado la unión de las correspondientes proteínas. Por consiguiente, estas dos variantes sí serían candidatas a ser la variante causante de las asociaciones observadas con rs1978707. A la variante rs4958487 el RegulomeDB le asigna un score elevado de 4 (intrón 1), por lo que aunque la variante altera posibles dominios de unión a factores de transcripción (Dux1, Pbx3) su funcionalidad es poco evidente. La variante se encuentra en desequilibrio de ligamiento con un único SNP, rs1545030 ( $D'=1$ ;  $r^2=0.99$ ), que presenta un score de 3<sup>a</sup>. Este altera el lugar de unión de varios factores de transcripción (ELF3 y familia de FOX).

- **Asociaciones entre expresión de SPARC en tejido y variables clínicas, respuesta patológica, supervivencia y otros biomarcadores del estudio (datos no mostrados en las tablas).**

Los valores de la mediana de expresión de *SPARC* en tejido tumoral (h-score) son de 120 en epitelio y de 80 en estroma. Observamos que hay una correlación entre la expresión de *SPARC* en epitelio y en estroma ( $p < 0.001$ ). No obstante, cuando realizamos el análisis entre el subtipo molecular y h-score de *SPARC* en epitelio y/o estroma no identificamos asociaciones significativas, aunque los resultados sugieren diferencias entre los subtipos luminales y triples negativos, constatando mayor expresión de *SPARC* en el subtipo triple negativo. Concretamente para el subtipo luminal se identifica mayor expresión en epitelio (Luminal A (N=14): mediana 160; Luminal B (N=25) mediana 110; Triple negativo (N=6) mediana 110;  $p = 0,861$ ). En cambio, para el subtipo triple negativo la mayor expresión de *SPARC* se observa a nivel estromal (Luminal A: mediana 40; Luminal B: mediana 80; Triple negativo: mediana 150;  $p = 0.398$ ).

En la presente tesis, no identificamos asociación significativa de la expresión de *SPARC* en tejido con las variables clínico-patológicas analizadas. A excepción del interesante hallazgo de una asociación que rozó la significación entre la expresión de *SPARC* en epitelio y la probabilidad de presentar ganglios axilares afectados (ganglios no afectados (N=21): mediana 160; ganglios afectados (N=24): mediana 80,  $p = 0.093$ ). A su vez, se observó una mayor expresión estromal para aquellas pacientes con afectación axilar, aunque sin ser significativo estadísticamente (ganglios no afectados: mediana 60; ganglios afectados: mediana 100,  $p = 0.664$ ).

No observamos asociaciones con la posibilidad de presentar una RCp o un impacto en supervivencia.

En este apartado encontramos una correlación que rozó la significación entre el valor de NLR pre-quimioterapia y la expresión de *SPARC* en epitelio, una mayor expresión se relacionó con un mayor nivel de la ratio en sangre (NLR < 3 (N = 36): mediana 117; NLR > 3 (N=8): mediana 170;  $p = 0.064$ ).

Cuando analizamos la posible relación entre la expresión de *SPARC* y el infiltrado inflamatorio (subpoblaciones de TILs), constatamos que una mayor expresión de *SPARC* en estroma se correlacionó con más infiltrado inflamatorio para el subtipo de los linfocitos CD20 ( $r = 0.429$ ,  $p = 0.006$ ). Sin embargo, una mayor expresión de *SPARC* en epitelio se relacionaba con menos densidad de células dendríticas CD1a ( $r = -0.298$ ,  $p = 0.062$ ).

### **1.3 Determinar si existe una correlación de la cantidad de TILs en tejido tumoral con la respuesta patológica (biomarcador predictivo) y con la supervivencia (biomarcador pronóstico) además de evaluar su asociación con biomarcadores de expresión sistémica en cáncer de mama (Objetivo 2).**

- **TILs y variables clínico- patológicas:**

La tabla 15 muestra las asociaciones entre la cuantificación de TILs (explorada tanto de forma continua como estratificada) y las variables clínico-patológicas. La cuantificación de los TILs pudo ser evaluada en 118 muestras de biopsia tumorales (73%), 91 de las cuales se clasificaron como luminales y 27 como triples negativas. Del total de las pacientes, 65 se clasificaron en el grupo bajo de TILs (46% Luminales/9% triples negativas), y 53 en el alto (31% Luminales/14% triples negativas).

Se observó una asociación que se aproximó a la significación estadística entre la cantidad de TILs y el grado histológico observando que aquellas pacientes con menor cantidad de TILs presentaban un mayor grado histológico: para TILs estratificada (grado 3: 37.7% (11-100%) vs 21.5% (0-10%)  $p = 0.058$ ) y para TILs continua ( $p = 0.023$ ) La variable TILs analizada tanto de forma continua como de forma estratificada no se asoció con el estatus del receptor hormonal, tampoco con el grado de Ki67, el tamaño tumoral, la afectación de la axila, invasión perineural o linfovascular.



• **TILs como biomarcador predictivo**

La Tabla 16 y 17 muestran las asociaciones entre la cuantificación de TILs y las respuestas patológicas. Respecto a la probabilidad de presentar una RCp hubo una asociación estadísticamente significativa de los TILs tanto de forma estratificada (22.6% (11-100%) vs 6.15% (0-10%); p=0.011) como continua (p= 0.010). En este análisis podemos identificar un efecto protector del nivel alto de TILs en relación al nivel bajo, debido a que la probabilidad estimada de RCp es 4.5 (1/0.22) veces mayor en el grupo de TILs alto respecto al bajo. Esta significación se mantuvo en el análisis multivariado: TILs de forma estratificada (OR = 0.27; 95%CI, 0.07-0.99; p= 0.048) y continua (OR=0.83; 95%CI, 0.07-1.00; p= 0.046).

Cuando analizamos estos datos según tipo molecular, identificamos como la significación se da principalmente en el grupo de luminales, de las pacientes que sí responden el 16.2% tienen niveles de TILs alto y el 3.7% bajo (p=0.058) (datos mostrados en el apartado ANEXO).

Al analizar la respuesta por Miller y Payne en la mama, identificamos una correlación entre mayor nivel de TILs y mayor respuesta considerando los TILs de forma estratificada (39.6% (11-100%) vs 20% (0-10%); p=0.022) y continua (p= 0.013). De nuevo, la significación se mantuvo en el análisis multivariado: TILs de forma estratificada (OR = 2.45; 95%CI, 1.02-5.88; p= 0.045) y continua (OR=1.17; 95%CI, 1.02-1.35; p= 0.027). Una vez más se observa que dicha significación es principalmente para el subtipo luminal, de las pacientes que sí responden el 35.1% tienen niveles de TILs alto y el 16.7% bajo (p=0.043) (datos mostrados en el apartado ANEXO). Respecto a la respuesta axilar no identificamos correlación estadística.

En cuanto a la respuesta patológica por RCB, no observamos asociación con la cantidad de TILs (ver tabla). Aunque sí cuando realizamos los análisis por subtipo molecular, las luminales presentaron una tendencia a la significación (p=0.085): RCB=0 (16.2% (11-100%) vs 3.7% (0-10%)), RCB=1 (51.4% (11-100%) vs 68.5% (0-10%) y RCB=3 (32.4% (11-100%) vs 27.8% (0-10%) (datos mostrados en el apartado ANEXO).

TILs	N	RCp		RCB		MyP mama		MyP axila	
		OR (IC 95%)	P'						
TILs estrat.									
11-100%	53	1						Ref.	Ref.
0-10%	65	0.22 [0.07;0.74]	0.011	1.43 [0.69;2.95]	0.333	2.62 [1.16;5.96]	0.022	1.46 [0.70;3.05]	0.324
TILs cont.		0.82 [0.70;0.95]	0.010	1.11 [0.98;1.26]	0.110	1.18 [1.04;1.34]	0.013	1.05 [0.93;1.19]	0.458

Tabla 16: Análisis univariado de TILs con respuesta patológica.

TILs, del inglés Tumor-Infiltrating Lymphocytes; TILs estrat.: se presenta como variable categórica; TILs cont.: Se presenta como variable continua; RCp Respuesta patológica completa; RCB del inglés Residual Burden Cancer; MyP Miller y Payne; OR Odds ratio; IC Intervalo de confianza; P' P-valor basado en el test de log-rank

TILs	RCp		RCB		MyP mama		MyP axila	
	OR (IC 95%)	P'						
TILs estrat.								
11-100%	1						Ref.	
0-10%	0.27 [0.07;0.99]	0.048	1.14 [0.53;2.45]	0.728	2.45 [1.02;5.88]	0.045	1.55 [0.58;4.12]	0.383
TILs cont.	0.83 [0.70;1.00]	0.046	1.08 [0.94;1.23]	0.259	1.17 [1.02;1.35]	0.027	1.05 [0.90;1.24]	0.530

Tabla 17: Análisis multivariado TILs con respuesta patológica

TILs, del inglés Tumor-Infiltrating Lymphocytes; TILs estrat.: se presenta como variable categórica; TILs cont.: Se presenta como variable continua; RCp Respuesta patológica completa; RCB del inglés Residual Burden Cancer; MyP Miller y Payne; OR Odds ratio; IC Intervalo de confianza; P' P-valor basado en el test de log-rank

### • TILs como biomarcador pronóstico

En la Tabla 18 y 19 constatamos, tanto en el análisis univariado como en el multivariado, que a menor presencia de TILs en el tejido peor SLE. La SLE a 5 años fue 98.1% (95% CI 87.1–99.7) para TILs alto en comparación con 89.8% (95% CI 78.4–95.3%) para TILs bajo (univariado  $p=0.055$ ; multivariado HR=11.28; 95%CI 1.33-96.03;  $p=0.027$ ). Para TILs en forma continua (univariado  $p=0.109$ ; multivariado HR=1.56 95%CI, 0.96-2.53;  $p=0.071$ ). Si analizamos los resultados en función del subtipo molecular encontramos que a menor cantidad de TILs más riesgo de recaída en las triples negativas ( $p=0.024$ ) y la misma tendencia en las luminales ( $p=0.171$ ) (datos mostrados en el apartado ANEXO).

En cambio no encontramos una asociación con SG con el tiempo de seguimiento establecido.

TILs	N	SLE		SG	
		Univariado		Univariado	
		HR (IC 95%)	P'	HR (IC 95%)	P'
TILs estrat.					
11-100%	53				
0-10%	65	7.53 [0.95;59.5]	0.055	2.39 [0.25;23.0]	0.450
TILs cont.		1.53 [0.91;2.57]	0.109	1.25 [0.75;2.07]	0.388

Tabla 18: Análisis univariado de los TILs con SLE y SG. TILs, del inglés *Tumor-Infiltrating Lymphocytes*; TILs estrat.: se presenta como variable categórica; TILs cont.: Se presenta como variable continua; IC Intervalo de confianza; P' P-valor basado en el test de log-rank; SLE Supervivencia Libre de Enfermedad; SG Supervivencia Global; HR Hazard ratio.

TILs	SLE		SG	
	Multivariado		Multivariado	
	HR (IC 95%)	P'	HR (IC 95%)	P'
TILs estrat.				
11-100%				
0-10%	11.28 [1.33;96.03]	0.027	4.83 [0.40;58.04]	0.215
TILs cont.	1.56 [0.96;2.53]	0.071	1.41 [0.79;2.50]	0.244

Tabla 19: Análisis multivariado de los TILs con SLE y SG. TILs, del inglés *Tumor-Infiltrating Lymphocytes*; TILs estrat.: se presenta como variable categórica; TILs cont.: Se presenta como variable continua; IC Intervalo de confianza; P' P-valor basado en el test de log-rank; SLE Supervivencia Libre de Enfermedad; SG Supervivencia Global; HR Hazard ratio.

- **Correlación de cada una de las subpoblaciones de TILs con la respuesta patológica y la supervivencia.**

Cuando analizamos el impacto que tienen las 5 subpoblaciones de TILs seleccionadas con la respuesta y la supervivencia obtuvimos los siguientes resultados. Identificamos una asociación, con una tendencia a la significación estadística, de los linfocitos CD4 con respuesta por Miller y Payne en la mama, tanto para la población en conjunto ( $p=0.055$ ) como para el subtipo luminal B ( $p=0.054$ ). Además esta asociación presentaba un tendencia aun mejor SLE para este subtipo molecular ( $p=0.06$ ). Por otro lado, las células dendríticas (CD1a) se asociaron de forma estadísticamente significativa con la SLE en el subgrupo con fenotipo luminal B ( $p=0.012$ ).

Finalmente los histiocitos (CD68) se correlacionaron con RCp para el subtipo molecular triple negativo siendo el p-valor estadísticamente significativo ( $p=0.027$ ). No identificamos un impacto de las poblaciones linfocitarias en respuesta por RCB o en SG (datos mostrados en el apartado ANEXO).

- **Correlación entre los biomarcadores de expresión tisular y los biomarcadores de expresión sistémica.**

Este apartado tiene como objetivo hacer una correlación no paramétrica entre los biomarcadores analizados en tejido respecto a los biomarcadores medidos en sangre. Tal como muestra la Tabla 20 identificamos una asociación entre la cantidad de exosomas y la variable continua de TILs, constatando que a mayor cantidad exosómica menor cantidad de TILs ( $r= -0.293$ ;  $p=0.035$ ). Asimismo se observa una asociación similar entre las MDSCs y la cantidad de TILs, de tal manera que a más concentración relativa del marcador CD33+ en células monocíticas en suero menor densidad de TILs en tejido ( $r= -0.277$ ;  $p=0.039$ ).

Suero	Tejido	Rho	P-valor
Sparc suero	TILs continua	0.023	0.862
Sparc suero	Sparc epitelio	-0.046	0.766
Sparc suero	Sparc estroma	0.054	0.727
MDSCs_abs	TILs continua	-0.118	0.385
MDSCs_abs	Sparc epitelio	0.055	0.728
MDSCs_abs	Sparc estroma	-0.116	0.464
MDSCs_rel	TILs continua	-0.277	0.039
MDSCs_rel	Sparc epitelio	-0.256	0.101
MDSCs_rel	Sparc estroma	-0.237	0.131
exosomas	TILs continua	-0.293	0.035
exosomas	Sparc epitelio	0.022	0.894
exosomas	Sparc estroma	-0.016	0.923

Tabla 20: Asociaciones entre TILs como variable continua y SPARC tisular con biomarcadores en suero. MDSCs Del inglés *Myeloid-Derived Suppressor Cells* ; MDSCs\_abs: el valor absoluto de MDSCs (número de células MDSCs maduras por  $\mu$ l de sangre; MDSCs\_rel : Valor relativo de MDSCs ( % total de MDSCs respecto del total de células mononucleadas); TILs, del inglés *Tumor-Infiltrating Lymphocytes*; SPARC, secreted protein acid and rich in cysteine

Cuando utilizamos la variable TILs como variable estratificada, de nuevo constatamos una correlación entre TILs y la variable MDSCs traduciéndose en una mayor presencia del biomarcador MDSCs en las muestras que menos cantidad de TILs presentan (2.0 (11-100%) vs 1.4 (0-10%);  $p= 0.031$ ) (Tabla 21).

Biomarcador suero	TILs 0-10%	TILs 11-100	Total	P'
	(N = 65)	(N = 53)	(N = 118)	
SPARC suero (ug/ml)				0.866
Mediana	83.5 (69.5, 103.3)	80.2 (62.8, 100.3)	80.6 (66.3, 101.8)	
MDSCs_abs				0.197
Mediana	54.9 (41.0, 84.0)	42.1 (24.9, 72.8)	52.1 (29.9, 77.0)	
MDSCs_rel				0.031
Mediana	2.0 (1.5, 2.5)	1.4 (1.1, 2.2)	1.7 (1.2, 2.3)	
Exosomas				0.154
Mediana	14.1 (7.5, 23.7)	8.7 (6.6, 18.0)	9.8 (7.0, 18.5)	

Tabla 21: Asociaciones entre TILs como variable estratificada con biomarcadores en suero.

MDSCs Del inglés *Myeloid-Derived Suppressor Cells* ; MDSCs\_abs: el valor absoluto de MDSCs (número de células MDSCs maduras por  $\mu$ l de sangre; MDSCs\_rel : Valor relativo de MDSCs ( % total de MDSCs respecto del total de células mononucleadas); TILs, del inglés *Tumor-Infiltrating Lymphocytes*; SPARC, secreted protein acid and rich in cysteine; P' P-valor basado en el test de log-rank.

Cuando analizamos estos datos solo para la población de cáncer de mama de tipo luminal, se mantiene la asociación entre la variable MDSCs y la cantidad de TILs como variable continua ( $r= -0.311$ ;  $p=0.038$ ) y estratificada (2.1 vs 1.4;  $p=0.037$ ) (Tabla 22 y 23). No pudimos obtener datos interpretables para el subgrupo de triples negativas debido al bajo número de muestras disponibles para este grupo.

Suero	Tejido	Rho	P-valor
SPARC suero	TILs continua	-0.057	0.699
SPARC suero	SPARC epitelio	-0.117	0.485
SPARC suero	SPARC estroma	-0.049	0.771
MDSC_abs	TILs continua	-0.123	0.419
MDSC_abs	SPARC epitelio	0.207	0.226
MDSC_abs	SPARC estroma	-0.043	0.803
MDSC_rel	TILs continua	-0.311	0.038
MDSC_rel	SPARC epitelio	-0.238	0.162
MDSC_rel	SPARC estroma	-0.269	0.113
exosomas	TILs continua	-0.255	0.103
exosomas	SPARC epitelio	0.022	0.905
exosomas	SPARC estroma	-0.002	0.990

Tabla 22: Asociaciones entre TILs como variable continua con biomarcadores en suero para la población de tipo Luminal.

MDSCs Del inglés *Myeloid-Derived Suppressor Cells* ; MDSCs\_abs: el valor absoluto de MDSCs (número de células MDSCs maduras por  $\mu$ l de sangre; MDSCs\_rel : Valor relativo de MDSCs ( % total de MDSCs respecto del total de células mononucleadas); TILs, del inglés *Tumor-Infiltrating Lymphocytes*; SPARC, secreted protein acid and rich in cysteine.

Biomarcador suero	TIL 0-10%	TIL 11-100	Total	P'
	(N = 54)	(N = 37)	(N = 91)	
SPARC suero (ug/ml) Mediana	88.6 (69.5, 104.6)	80.2 (66.1, 95.5)	84.3 (67.3, 101.0)	0.548
MDSCs_abs Mediana	54.9 (46.4, 84.5)	40.3 (23.5, 72.8)	52.7 (31.4, 78.5)	0.275
MDSCs_rel Mediana	2.1 (1.5, 2.6)	1.4 (1.2, 2.0)	1.6 (1.3, 2.3)	0.037
Exosomas Mediana	11.7 (6.8, 21.7)	9.3 (6.2, 18.3)	9.8 (6.6, 18.6)	0.525

Tabla 23: Asociaciones entre TILs como variable estratificada con biomarcadores en suero para la población de tipo Luminal.

MDSCs Del inglés *Myeloid-Derived Suppressor Cells* ; MDSCs\_abs: el valor absoluto de MDSCs (número de células MDSCs maduras por  $\mu$ l de sangre; MDSCs\_rel : Valor relativo de MDSCs ( % total de MDSCs respecto del total de células mononucleadas); TILs, del inglés *Tumor-Infiltrating Lymphocytes*; SPARC, secreted protein acid and rich in cysteine; P' P-valor basado en el test de log-rank.

#### 1.4 Explorar biomarcadores emergentes (NLR, MDSCs, exosomas) y estudiar su asociación con las variables clínico-patológicas, la respuesta patológica y la supervivencia (Objetivo 3).

En este apartado se exponen las asociaciones identificadas entre los biomarcadores emergentes y la clínica. Encontramos una asociación de la NLR prequimioterapia con la afectación axilar, de tal manera que a menor proporción de NLR (NLR<3) más riesgo de encontrar un ganglio afecto por neoplasia mamaria (65.6% vs 33.3%; p= 0.048). Otras asociación se presentó entre el nivel de MDSCs (valor relativo) y respuesta patológica axilar por Miller y Payne, donde se puede deducir una mejor respuesta cuando hay mayor cantidad de este biomarcador en suero (37.9% vs 25.5%; univariado p=0.036; multivariado OR= 0.98 (95%CI, 0.96-1.00); p=0.046. En nuestra muestra de estudio no hallamos asociaciones de estos biomarcadores con el resto de respuestas patológicas ni con la supervivencia (datos nos mostrados en las tablas).

#### 1.5 Generar un modelo predictivo de respuesta a la quimioterapia en cáncer de mama integrando las variables clínico-patológicas, las subpoblaciones de TILs y los biomarcadores de interés (Objetivo 4).

Para analizar la relación entre los diferentes marcadores, se realizaron los estudios de *clúster* no jerarquizado incluyendo los marcadores correspondientes a linfocitos infiltrantes de tumor (CD20, CD8 y CD4), células dendríticas (CD1a) e histiocitos (CD68) y, a continuación, eliminando cada marcador consecutivamente hasta hallar el mejor *clúster*. Finalmente seleccionamos el *clúster* que incluía los marcadores CD4, CD8, CD20 y CD68 (denominado *Clúster CD4/8/20/68*) descartando, por lo tanto, el marcador de células dendríticas (CD1a).

Para la representación gráfica de los *heatmaps* hicimos una transformación logarítmica de la expresión de los diferentes marcadores, de tal manera que obtuvimos marcadores sobre-expresados (representados de color rojo) e infra-expresados (representados de color azul).

Los diferentes tumores de las pacientes se agruparon según el dendrograma mostrado en la figura 2, correspondiente al *Clúster CD4/8/20/68*. El *heatmap* muestra la abundancia relativa de las poblaciones inmunes en las muestras de biopsia para cada campo. Cada fila se corresponde con la muestra tumoral de un paciente y cada columna ilustra el enriquecimiento para cada población celular inmune. Las columnas de la izquierda hacen referencia a las variables incluidas en el análisis: la respuesta patológica, las recaídas y el estadio clínico.

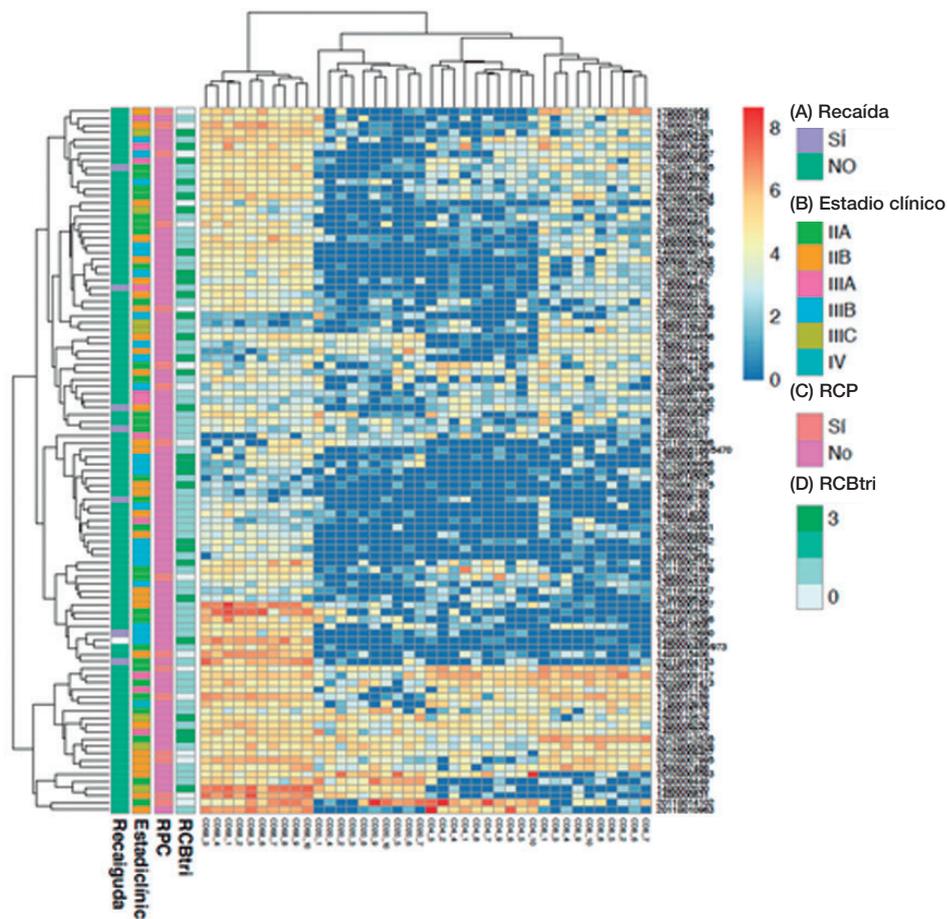


Figura 2: *Clúster CD4/8/20/68* para todos los subtipos moleculares. RPC: respuesta patológica completa; RCBtri: Del inglés *Residual Burden Cancer*.

El análisis identificó dos grupos (Figura 3). El grupo marcado de color rojo (Grupo 2; N=20) en la parte inferior de la figura se comparó con el grupo de la parte superior de la figura de color azul (Grupo 1; N=76). Como podemos observar son dos grupos que se caracterizan por comportamientos clínicos y biológicos distintos.

La población del grupo 1 (color azul) se caracteriza clínicamente por presentar mayor número de recaídas (9 %) y una baja probabilidad de alcanzar una respuesta patológica (RCp 9%; Miller y Payne 4/5 15%). Por otro lado, el grupo 2 (color rojo) no presenta recaídas y hay un mayor porcentaje de respuestas (28% RCp; Miller y Payne 4/5 52%). A nivel de subpoblaciones de TILs, el grupo de buen pronóstico (grupo 2), a diferencia del grupo de mayor riesgo clínico (grupo 1), se caracteriza por una gran cantidad de histiocitos (CD68) acompañado de un mayor infiltrado del resto de linfocitos, ya sean CD4, CD8 o CD20.

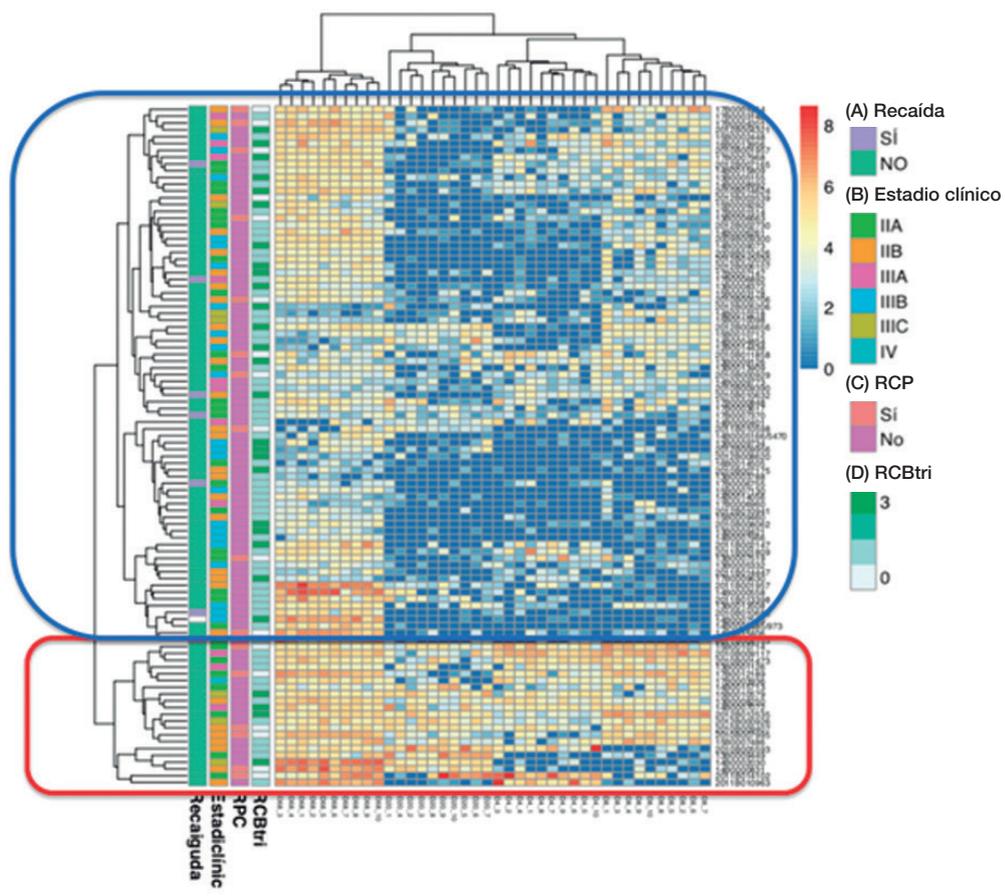


Figura 3: Clúster CD4/8/20/68: Grupo 1 (color azul) y Grupo 2 (color rojo) para todos los subtipos moleculares. RPC: respuesta patológica completa; RCBtri: Del inglés *Residual Burden Cancer*, clasificación categorizada en 3 grupos.

Cuando analizamos los *heatmaps* del *Clúster CD4/8/20/68* por subtipo molecular, los resultados mas interesantes los obtuvimos en los tumores de tipo luminal B y de tipo triple negativo. Tanto para las de tipo Luminal B (Figura 4) como para las de tipo triple negativa (Figura 5) observamos como el *clustering* identifica de nuevo dos grupos con compartamientos similares; uno de los grupos con mayor infiltrado inflamatorio y con mejores resultados clínicos. En la Figura 4 para luminales B observamos como el grupo marcado de color azul (Grupo 1; N=32) tiene dos recaídas mientras que en el otro grupo de color rojo (Grupo 2; N=10) no se observa ninguna recaída. El grupo 2 tiene dos RCp (20%) mientras que en el grupo 1 las RCp representan una menor proporción (15%). Además en el grupo 1 se constata un 23.5% de respuesta 4/5 por Miller y Payne en comparación con el 60 % del grupo 2.

La agrupación de los marcadores inflamatorios se mantiene de forma similar al obtenido cuando estudiamos toda la muestra en conjunto sin seleccionar por subtipo molecular: en el grupo 2 se constata mucha presencia de histiocito y mayor densidad inflamatoria de todos los linfocitos. En la Figura 5 de pacientes con cáncer de mama de tipo triples negativas vemos que el grupo con mejores resultados en este caso está representado en la parte superior de color rojo (grupo 2; N=5), caracterizado por no presentar ninguna recaída, 40 % de RCp y 60% de Miller y Payne 4/5, mientras que en el de color azul (grupo 1; N=20) se identifican 3 recaídas, 25 % de RCp y 40 % Miller y Payne 4/5.

El *cluster* sigue seleccionando un grupo de tumores con marcada reacción inflamatoria y denso infiltrado por histiocitos (grupo2).

Teniendo en cuenta las poblaciones seleccionadas por los *heatmaps* descritos previamente, solo vamos a destacar los resultados obtenidos para los subtipos moleculares luminales *By* triples negativos del cáncer de mama.

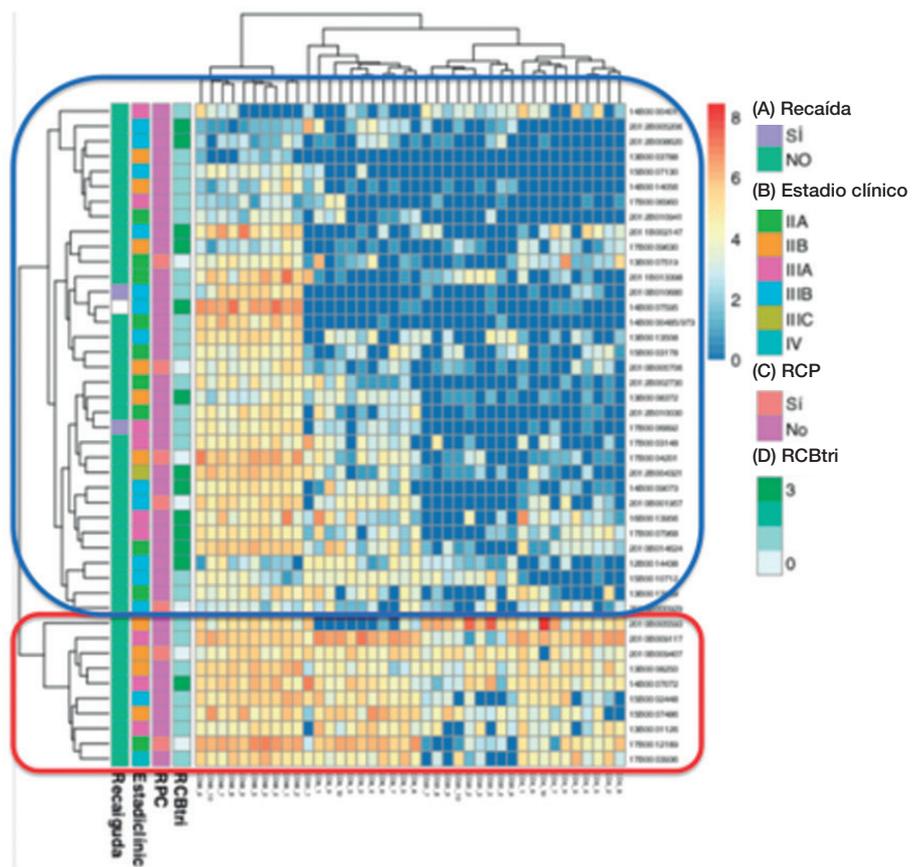


Figura 4: *Clúster CD4/8/20/68*: Grupo 1 (color azul) y grupo 2 (color rojo) para subtipo Luminal B. RPC: respuesta patológica completa; RCBtri: Del inglés *Residual Burden Cancer*, clasificación categorizada en 3 grupos.

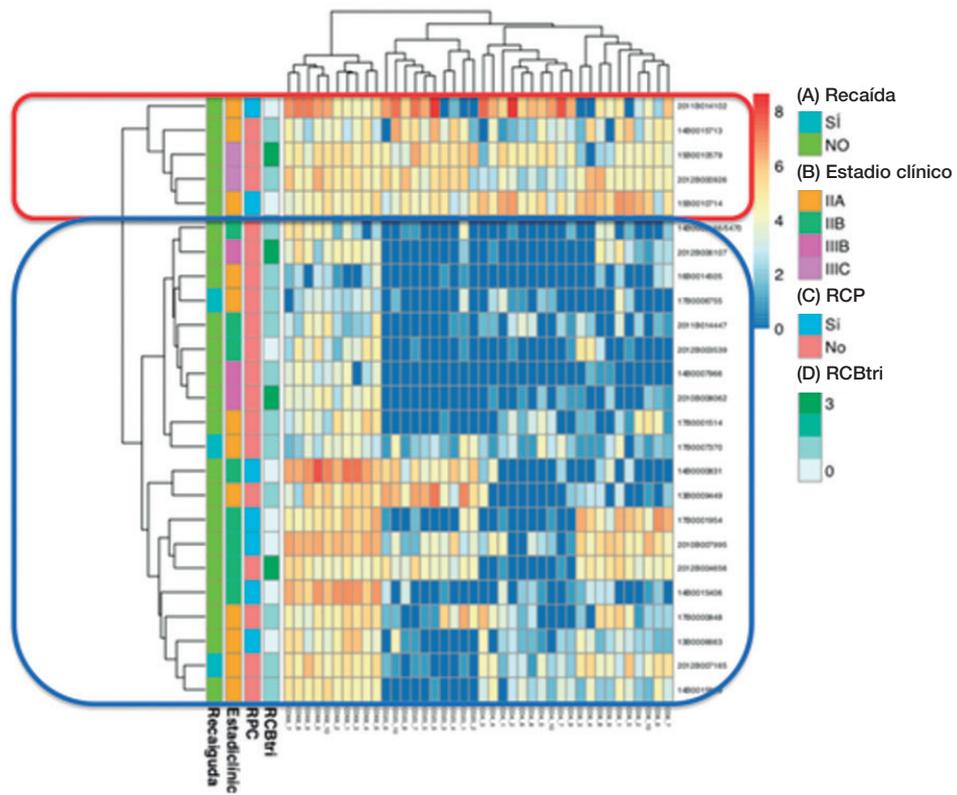


Figura 5: *Clúster CD4/8/20/68*: Grupo 1 (color azul) y Grupo 2 (color rojo) para subtipo Triple negativo. RPC: respuesta patológica completa; RCBtri: Del inglés *Residual Burden Cancer*, clasificación categorizada en 3 grupos.

• **Asociación entre el Clúster CD4/8/20/68 y las variables clínico-patológicas:**

Tal como podemos observar en la tabla 24 hemos identificado una asociación estadísticamente significativa para el grupo 2 del clúster CD4/8/20/68 que incluye los tumores de todos los subtipos moleculares con presentar mayor grado histológico ( $p=0.012$ ) y mayor índice de proliferación ki67 ( $>14\%$ ) (en este caso fue una tendencia  $p=0.057$ ). Estos resultados explicarían las mejores respuestas patológicas observadas para este grupo tras el tratamiento con quimioterapia. Cuando analizamos los clúster por subtipo molecular no encontramos ninguna relación estadísticamente significativa.

Clúster	GH	RRHH	ki67	T	N	IVL	IPN							
	OR(IC95%)	P'	OR(IC95%)	P'	OR(IC95%)	P'	OR(IC95%)							
Total														
G1	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.							
G2	3.73 [1.36;10.2]	0.012	2.24 [0.80;6.29]	0.139	3.05 [0.94;9.90]	0.057	0.78 [0.15;4.18]	0.752	1.30 [0.49;3.43]	0.608	0.49 [0.10;2.34]	0.394	0.51 [0.06;4.43]	0.608
Luminal B														
G1	Ref.	Ref.												
G2	2.57 [0.57;11.7]	0.252	. [.;.]	1.000	. [.;.]	0.452	. [.;.]	0.342	1.63 [0.36;7.43]	0.558	0.69 [0.12;3.90]	0.724	0.83 [0.08;8.43]	0.939
Triple negativo														
G1	Ref.	Ref.												
G2	3.27 [0.31;34.7]	0.370	. [.;.]	1.000	. [.;.]	0.496	. [.;.]	1.000	1.56 [0.20;11.8]	0.692	0.00 [0.00;.]	0.633	0.00 [0.00;.]	0.800

Tabla 24: Correlación del Clúster CD4/8/20/68 con características clínico-patológicas.

GH: grado histológico; RRHH receptores hormonales; LV: invasión linfovascular; IPN: invasión peri neural; OR Odds ratio; IC Intervalo de confianza; P' P-valor basado en el test de log-rank.

• **Asociación entre el Clúster CD4/8/20/68 y la respuesta patológica:**

En este caso cuando analizamos los dos grupos identificados en el clúster CD4/8/20/68 para toda la muestra, observamos que la asociación se daba con la respuesta local por Miller y Payne para el grupo 2 (univariado p= 0.024; multivariado p= 0.057). Las otras asociaciones estadísticamente significativas fueron para el subtipo luminal B (también grupo 2) que se correlacionaba con presentar mayor respuesta por RCB (en este caso lo rozó en el multivariado con p= 0.072), por Miller y Payne en la mama (univariado p= 0.046 y multivariado p= 0.023) y además respuesta por Miller y Payne en la axila (univariado p= 0.039 y multivariado p= 0.020) (Tablas 25 y 26).

Clúster	N	RCp	RCB	MyP mama	My P axila
		OR (IC 95%)	P'	OR (IC 95%)	P'
CD4/8/20/68					
Total					
G1	79	1			Ref.
G2	21	2.76 [0.87;8.77]	0.103	0.31 [0.11;0.83]	0.56 [0.20;1.53]
Luminal B					
G1	34		1.00		Ref.
G2	10	1.45 [0.24;8.92]	0.691	0.21 [0.05;0.91]	0.18 [0.03;0.95]
Triple negativo					
G1	20		1.00		Ref.
G2	5	2.00 [0.26;15.6]	0.549	0.44 [0.06;3.29]	5.00 [0.49;50.8]

Tabla 25: Análisis univariado del Clúster CD4/8/20/68 con respuesta patológica. OR: Odds ratio; IC: Intervalo de confianza; P': P-valor basado en el test de log-rank. RCP, Respuesta patológica completa; RCB, del inglés *Residual Cancer Burden*; MyPMiller y Payne.

Clúster CD4/8/20/68	RCp	RCB	MyP mama	My P axila	RCp	RCB	MyP mama	My P axila
	OR (IC 95%)	P'	OR (IC 95%)	P'	OR (IC 95%)	P'	OR (IC 95%)	P'
Total								
G1	1						Ref.	
G2	2.34 [0.62;8.79]	0.208	0.54 [0.20;1.48]	0.231	0.36 [0.13;1.03]	0.057	0.48 [0.14;1.70]	0.255
Luminal B								
G1	1.00		1.00		1.00		Ref.	
G2	2.50 [0.30;20.93]	0.399	0.24 [0.05;1.14]	0.072	0.15 [0.03;0.77]	0.023	0.10 [0.01;0.70]	0.020
Triple negativo								
G1	1.00		1.00		1.00			
G2	1.93 [0.18;20.84]	0.590	0.80 [0.12;5.58]	0.826	0.54 [0.07;4.29]	0.562		

Tabla 26: Análisis multivariado del Clúster CD4/8/20/68 con respuesta patológica; OR Odds ratio; IC Intervalo de confianza; P' P-valor basado en el test de log-rank. RCp, Respuesta patológica completa; RCB, del inglés *Residual Cancer Burden*; MyP Miller y Payne.

• **Asociación entre el Clúster CD4/8/20/68 y supervivencia:**

No identificamos ninguna asociación estadísticamente significativa ni para supervivencia libre de progresión ni para supervivencia global, por lo que solo mostramos resultados para el análisis univariado (Tabla 27).

Clúster CD4/8/20/68	N	SLE		OS	
		HR (IC 95%)	P'	HR (IC 95%)	P'
Total					
G1	79				
G2	21	0.00 [0.00;.]	0.999	0.00 [0.00;.]	0.999
Luminal B					
G1	34				
G2	10	0.00 [0.00;.]	0.999	0.00 [0.00;.]	0.999
Triple negativo					
G1	20				
G2	5	0.00 [0.00;.]	0.999	0.00 [0.00;.]	1.000

Tabla 27: Análisis univariado del Clúster CD4/8/20/68 con SLE y SG.

SLE, Supervivencia libre de enfermedad; SG Supervivencia Global; HR Hazard ratio; IC Intervalo de confianza; P' P-valor basado en el test de log-rank;

- **Asociación entre el Clúster CD4/8/20/68 y los biomarcadores analizados:**

Al analizar si los polimorfismos de *SPARC* pueden predecir los grupos identificados por las subpoblaciones de TILs en el total de la muestra, observamos una asociación con la variante rs19789707. Las pacientes heterocigotas (90.7%) para esta variante presentaron una mayor probabilidad de pertenecer al grupo 1 (grupo con peores respuestas patológicas y una población inflamatoria más pobre) que las pacientes homocigotas AA (70%) y GG (64.3%) (AG  $p= 0.030$ ; GG  $p= 0.713$ ) En la Tabla 28 solo mostramos los resultados de los dos polimorfismos de *SPARC* de interés de la presente tesis (rs4958487 y rs19789707).

Los análisis también mostraron una correlación con la expresión de *SPARC* en tejido ( $p=0.044$ ), según la cual la mediana del H-score en estroma para el grupo 1 (136) era superior a la del grupo 2 (80.2). (Grupo 1 (N=33): mediana 70; Grupo 2 (N=8) mediana 145:  $p=0,066$ ).

También se obtuvo una correlación con los niveles de TILs en tejido (tanto para variable estratificada como variable continua) con la probabilidad de pertenecer al grupo 1 (estratificada 11-100%: 61.7% vs 0-10%: 93.9%;  $p< 0.001$ , continua  $p< 0.001$ ). Finalmente no identificamos resultados significativos para los biomarcadores emergentes (Tabla 28). Cuando analizamos los resultados por subtipo molecular no obtuvimos resultados significativos.

Biomarcador	Clúster CD4/8/20/68											
	Total				Luminal B				Triple negativo			
	G1 (N=75)	G2 (N=21)	OR	P'	G1 (N=32)	G2 (N=10)	OR	P'	G1 (N=20)	G2 (N=5)	OR	P'
N(%)				N(%)				N(%)				
<b>MDSCs</b>												
count/microL	56.9 (34.5)	43.3 (39.5)	0.99 [0.97;1.01]	0.269	58.6 (35.1)	59.5 (55.0)	1.00 [0.98;1.02]	0.958	59.4 (29.4)	22.4 (23.5)	0.92 [0.82;1.04]	0.184
%	1.80 (0.67)	1.81 (1.60)	1.01 [0.49;2.07]	0.988	1.85 (0.69)	1.79 (0.72)	0.86 [0.24;3.17]	0.825	2.30 (1.60)	0.78 (0.63)	0.02 [0.00;8.96]	0.209
Exosomas	14.2 (11.3)	15.8 (21.0)	1.01 [0.96;1.06]	0.728	12.0 (7.52)	18.7 (26.4)	1.03 [0.97;1.09]	0.375	16.2 (16.4)	18.4 (-)	1.01 [0.89;1.15]	0.882
<b>NLR</b>												
pre-QT												
bajo	31 (73.8%)	11 (26.2%)	Ref.	Ref.	16 (72.7%)	6 (27.3%)	Ref.	Ref.	7 (77.8%)	2 (22.2%)	Ref.	Ref.
alto	8 (88.9%)	1 (11.1%)	0.35 [0.04;3.15]	0.382	3 (75.0%)	1 (25.0%)	0.89 [0.08;10.3]	0.972	2 (100%)	0 (0.00%)	0.00 [0.00;.]	0.655
post-QT												
bajo	31 (73.8%)	11 (26.2%)	Ref.	Ref.	14 (66.7%)	7 (33.3%)	Ref.	Ref.	7 (77.8%)	2 (22.2%)	Ref.	Ref.
alto	8 (88.9%)	1 (11.1%)	0.42 [0.05;3.77]	0.483	5 (100%)	0 (0.00%)	0.00 [0.00;.]	0.177	2 (100%)	0 (0.00%)	0.00 [0.00;.]	0.655
<b>SNPs</b>												
<b>rs4958487:</b>												
A/A	22 (84.6%)	4 (15.4%)	Ref.	Ref.	7 (87.5%)	1 (12.5%)	Ref.	Ref.	8 (80.0%)	2 (20.0%)	Ref.	Ref.
A/G	37 (75.5%)	12 (24.5%)	1.78 [0.51;6.22]	0.383	17 (70.8%)	7 (29.2%)	2.88 [0.30;28.0]	0.403	9 (81.8%)	2 (18.2%)	0.89 [0.10;7.86]	0.925
G/G	10 (83.3%)	2 (16.7%)	1.10 [0.17;7.03]	0.904	5 (83.3%)	1 (16.7%)	1.40 [0.07;28.1]	0.857	1 (50.0%)	1 (50.0%)	4.00 [0.17;95.8]	0.500
<b>rs19789707:</b>												
A/A	21 (70.0%)	9 (30.0%)	Ref.	Ref.	6 (54.5%)	5 (45.5%)	Ref.	Ref.	8 (80.0%)	2 (20.0%)	Ref.	Ref.
A/G	39 (90.7%)	4 (9.30%)	0.24 [0.07;0.87]	0.030	19 (86.4%)	3 (13.6%)	0.19 [0.03;1.04]	0.068	7 (100%)	0 (0.00%)	0.00 [0.00;.]	0.331
G/G	9 (64.3%)	5 (35.7%)	1.30 [0.34;4.97]	0.713	4 (80.0%)	1 (20.0%)	0.30 [0.02;3.63]	0.404	3 (50.0%)	3 (50.0%)	4.00 [0.43;37.1]	0.277
<b>rs19789707:</b>												
A/A o A/G	60 (82.2%)	13 (17.8%)	Ref.	Ref.	25 (75.8%)	8 (24.2%)	Ref.	Ref.	15 (88.2%)	2 (11.8%)	Ref.	Ref.
G/G	9 (64.3%)	5 (35.7%)	2.56 [0.74;8.92]	0.162	4 (80.0%)	1 (20.0%)	0.78 [0.08;8.04]	0.899	3 (50.0%)	3 (50.0%)	7.50 [0.85;66.1]	0.096

Tabla 28: Asociaciones entre el Clúster CD4/8/20/68 y los biomarcadores analizados. OR Odds ratio; IC Intervalo de confianza; P' P-valor basado en el test de log-rank. MDSCs Del inglés Myeloid-Derived Suppressor Cells ; MDSCs\_abs: el valor absoluto de MDSCs (número de células MDSCs maduras por µl de sangre; MDSCs\_rel : Valor relativo de MDSCs ( % total de MDSCs respecto del total de células mononucleadas); TILs, del inglés *Tumor-Infiltrating Lymphocytes*; TILs estrat.: se presenta como variable categórica; TILs cont.: Se presenta como variable continua; SPARC , secreted protein acid and rich in cysteine; NLR Del inglés *Neutrophil-to-Lymphocyte ratio* ;pre-QT pre-quimioterapia; post-QT post quimioterapia.

Biomarcador	Clúster CD4/8/20/68											
	Total				Luminal B				Triple negativo			
	G1 (N=75)	G2 (N=21)	OR	P'	G1 (N=32)	G2 (N=10)	OR	P'	G1 (N=20)	G2 (N=5)	OR	P'
	N(%)				N(%)				N(%)			
<b>SPARC tejido</b>												
Epitelio	127 (80.3)	139 (73.0)	1.00 [0.99;1.01]	0.692	118 (70.4)	122 (43.1)	1.00 [0.99;1.02]	0.888	124 (103)	. (.)	NA	
Estroma	80.2 (57.3)	136 (84.2)	1.01 [1.00;1.03]	0.044	83.8 (41.3)	80.0 (70.7)	1.00 [0.98;1.02]	0.870	134 (103)	. (.)	NA	
SPARC suero	94.9 (51.3)	76.3 (28.4)	0.98 [0.96;1.01]	0.208	88.5 (29.8)	63.7 (21.9)	0.96 [0.92;1.00]	0.068	115 (93.9)	58.8 (4.45)	0.96 [0.92;1.00]	0.068
<b>TILs</b>												
TILs estrat.												
11-100%	29 (61.7%)	18 (38.3%)	Ref.	Ref.	14 (66.7%)	7 (33.3%)	Ref.	Ref.	10 (66.7%)	5 (33.3%)	Ref.	Ref.
0-10%	46 (93.9%)	3 (6.12%)	0.11 [0.03;0.39]	<0.001	18 (85.7%)	3 (14.3%)	0.33 [0.07;1.53]	0.172	10 (100%)	0 (0.00%)	0.00 [0.00;.]	0.057
TILs cont.	-1.85 (2.46)	-5.36 (3.49)	0.71 [0.60;0.84]	<0.001	-1.96 (2.31)	-4.36 (3.51)	0.75 [0.57;0.97]	0.028	-2.71 (3.42)	-5.70 (3.11)	0.79 [0.60;1.05]	0.104

Tabla 28 (cont.)

• **Diseño del modelo predictivo en nuestra muestra:**

Según nuestro modelo de regresión logística multivariada se tomó como variable dependiente el *Clúster CD4/8/20/68* para toda la población (subtipos luminal A, B y triple negativo) (Figura 6) y se consideraron las siguientes variables con p-valor <0.2: edad, grado histológico y variable estratificada de TILs. El peso para el *risk score* de estas variables resultó en: edad  $\geq 50 = 1$  (OR:2.13 [0.70 ; 6.51]; p-valor =0,186); grado histológico I o II =1 ( OR: 2.83 [0.93 ; 8.61], p-valor 0,0066, TILs 0-10%=2 (OR: 8.39 [2.21 ; 31.84]; p-valor= 0,002)

Tras sumar las puntuaciones del score y calcular el punto de corte de índice de Youden (fue de 1,5 que a la práctica se considera 1) obtuvimos los valores correspondientes de bajo riesgo y de alto (Tabla 29).

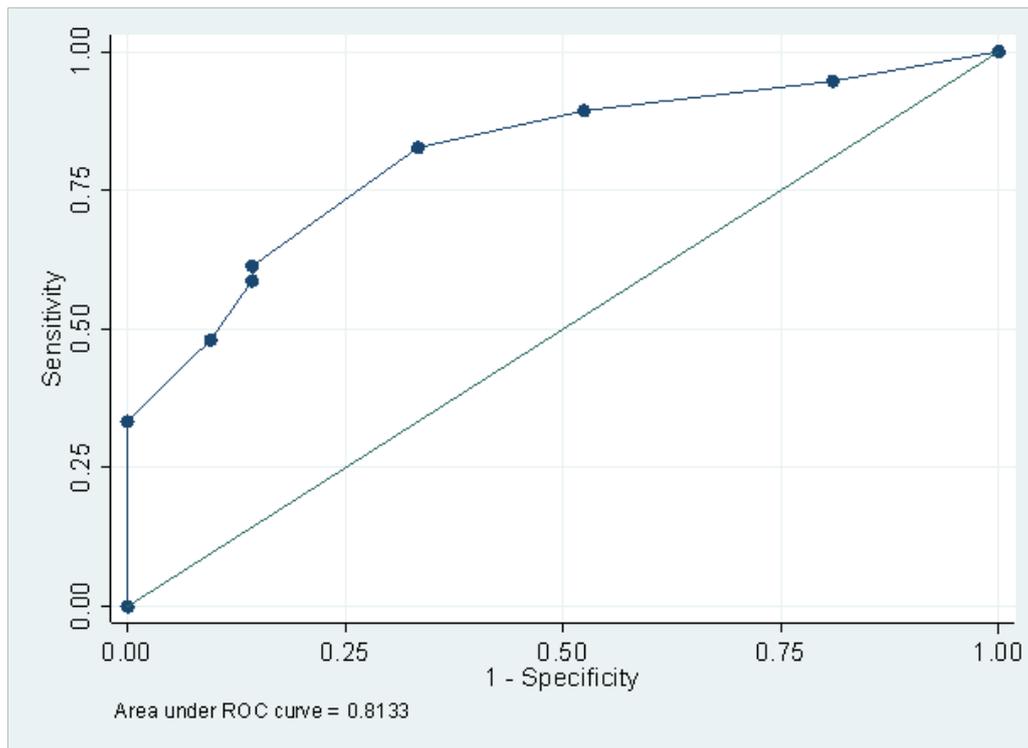


Figura 6: Poder predictivo del modelo (Área bajo la curva)

Variables			Puntuación			Score
TILs 11-100%	GH≠ 1 o 2	Edad < 50	0	0	0	<b>0</b>
TILs 11-100%	GH≠ 1 o 2	Edad $\geq 50$	0	0	1	<b>1</b>
TILs 11-100%	GH=1 o 2	Edad < 50	0	1	0	<b>1</b>
TILs 11-100%	GH=1 o 2	Edad $\geq 50$	0	1	1	<b>2</b>
TILs 0-10%	GH≠ 1 o 2	Edad < 50	2	0	0	<b>2</b>
TILs 0-10%	GH≠ 1 o 2	Edad $\geq 50$	2	0	1	<b>3</b>
TILs 0-10%	GH=1 o 2	Edad < 50	2	1	0	<b>3</b>
TILs 0-10%	GH=1 o 2	Edad $\geq 50$	2	1	1	<b>4</b>

Tabla 29: Score para nuestro modelo predictivo; El score = 0 o 1 corresponde a bajo riesgo y el score =2, 3 o 4 corresponde a alto riesgo. GH Grado histológico.

## ■ 7. DISCUSIÓN

En el cáncer de mama la quimioterapia neoadyuvante ha permitido obtener mejores respuestas clínicas para algunos subtipos moleculares. No obstante, actualmente no disponemos de biomarcadores específicos para predecir la respuesta al tratamiento de quimioterapia. Por ello, la caracterización biológica de biomarcadores, así como su influencia en el pronóstico puede contribuir a diseñar estrategias que nos permitan optimizar el manejo de las pacientes, minimizando a su vez las toxicidades secundarias.

En esta tesis se ha explorado, en una amplia serie de pacientes con cáncer de mama incluidas de manera consecutiva durante 6 años, si ciertos biomarcadores del microambiente tumoral tiene una influencia en los perfiles de respuesta inmunitaria y en la evolución clínica tras recibir tratamiento con esquemas de quimioterapia.

#### A continuación se discuten los resultados obtenidos en este trabajo:

La selección de nuestro primer biomarcador, el gen *SPARC*, parte de una publicación previa en la que incluimos pacientes con cáncer de páncreas (278), y que nos sirvió de punto de partida para desarrollar la presente tesis. Hasta ese momento en la literatura se había descrito el aumento de la expresión de *SPARC* en diferentes tipos de tumor, entre los cuales se incluían el cáncer de mama, el melanoma, el colon y el cáncer de páncreas. Tomando como génesis el cáncer de páncreas, los diferentes trabajos nos revelan como *SPARC* se sobreexpresa en el microambiente tumoral a nivel celular y a nivel estromal, sugiriendo su papel en las interacciones del tumor y el estroma. Se hace necesario resaltar, que la mayoría de estudios publicados hasta el momento analizaban *SPARC* desde un punto de vista inmunohistoquímico y que muchos de ellos no fueron concluyentes. Por otro lado, el análisis de variantes genéticas como biomarcadores se realiza mediante técnicas de genotipado robustas que son poco costosas y que, por lo tanto, tienen una fácil traslación a la práctica clínica. Además, los polimorfismos de línea germinal han demostrado predecir el pronóstico y la respuesta a diferentes terapias en enfermedades neoplásicas (287–289). Lo anteriormente expuesto nos ha conducido a analizar el papel de variantes del gen *SPARC* como biomarcadores pronóstico y de respuesta al tratamiento de quimioterapia neoadyuvante en cáncer de mama.

De forma remarcable, dos de los ocho polimorfismos seleccionados de *SPARC* (rs1978707 y rs4958487) se asociaron con respuesta patológica y con supervivencia. Ambos polimorfismos se asociaron con una menor probabilidad de presentar respuesta patológica y con peor SLE, especialmente para el grupo de luminales (**Objetivo 1**). Este resultado es de especial interés en la práctica clínica ya que representa la posibilidad de disponer de estos biomarcadores en sangre periférica antes de iniciar el tratamiento. A nuestro conocimiento nuestro estudio es el primero que intenta analizar las variantes polimórficas de *SPARC* desde el punto de vista pronóstico y predictivo para pacientes que han recibido quimioterapia en el cáncer de mama. Recientemente se ha publicado un trabajo cuyos investigadores se han servido de la farmacogenética para otorgarnos más información pronóstica de *SPARC* en el cáncer de mama. Bawazeer S. y cols (290), con un diseño de caso-control, estudiaron el posible papel de los polimorfismos de *SPARC* en el desarrollo del cáncer de mama y los correlacionaron con la expresión de VEGF. Consideraron el NPI para medir el riesgo de cáncer de mama, que a su vez, traduce la tasa de crecimiento, susceptibilidad metastásica e inestabilidad genética. Los pacientes de este estudio se clasificaron de acuerdo con el NPI en moderado y pobre pronóstico sin candidatos para el grupo de buen pronóstico. Lo que constataron fue que el NPI se asoció de forma estadísticamente significativa con el polimorfismos 7719521 del gen *SPARC*, y que este además se correlacionaba con la expresión de VEGF. Estos datos en su conjunto podrían sugerir el posible papel de la variante genética en el riesgo de desarrollo del cáncer de mama y su implicación en la angiogénesis. Tras realizar el análisis *in silico* de nuestras variantes identificamos que el rs1978707 se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el rs7719521 ( $D' = 1$ ;  $r^2 = 1$ ). Parece poco probable que la variante intrónica rs1978707 regule la expresión del gen y sea funcional, mientras que rs7719521 sí podría afectar la expresión génica al ser eQTL para *SPARC* y alterar el dominio de unión de factores de transcripción.

Por otro lado, la funcionalidad de la variante rs4958487 queda menos clara. En este trabajo de tesis, además de estudiar los polimorfismos de *SPARC*, se han analizado sus niveles séricos y su expresión en tejido. Tras analizar la posible correlación de nuestros polimorfismos del gen *SPARC* con su expresión en tejido y en suero nos encontramos que el rs4958487 se asociaba con menor expresión tanto a nivel de epitelio como de estroma. Al mismo tiempo, aunque no de forma estadísticamente significativa, sí observamos una linealidad numérica con menores niveles de la proteína a nivel sérico (**Objetivo 1**). Todo ello es indicativo de una posible funcionalidad del SNP, aunque sería necesario realizar más estudios.

Mencionar también, que en nuestro primer estudio (278) identificamos que dos de los ocho polimorfismos de *SPARC* analizados se asociaban a supervivencia en pacientes con cáncer pancreático tratados con quimioterapia o terapia combinada con radioterapia tras ajustar por las características basales (rs17718347 y rs2347128). Este estudio aporta más datos al hecho de que las variantes en *SPARC* pueden tener una implicación pronóstica y predictora.

Dentro de este marco, y teniendo en cuenta la gran incógnita expuesta en la literatura respecto al papel de la expresión de *SPARC* en tejido en el cáncer de mama, nosotros identificamos una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de *SPARC* en epitelio y la expresión de *SPARC* en estroma ( $p < 0,001$ ). Por lo tanto, estos resultados podrían sugerir que su expresión tanto a nivel de epitelio como de estroma nos aporta información, y que en la práctica clínica deberían analizarse en conjunto. Además, este hallazgo podría sugerir que hay más procesos que influyen en el comportamiento de *SPARC*. Esto está en concordancia con algunos estudios que explican como las células tumorales probablemente median un efecto paracrino que induce la expresión de *SPARC* por parte del estroma colindante, proceso en el cual podrían intervenir exosomas. Al respecto, se han aislado fibroblastos de tejido normal de páncreas que aumentan la expresión de *SPARC* cuando se ponen en cultivo con células pancreáticas de cáncer de páncreas (178). Por lo tanto, parece que la capacidad de *SPARC* para promover o inhibir la progresión tumoral podría ser dependiente del tipo de célula donde se inicia y el contexto del microambiente y no tanto de la hipótesis compartimental (la hipótesis compartimental, tal como mencionábamos en el apartado de la introducción, hace referencia a que la implicación clínica de *SPARC* se deba a su expresión en el estroma o en el epitelio, pero no a ambas). Finalmente, no encontramos diferente expresión entre las muestras de pacientes con cáncer de mama de tipo luminal y las de tipo triple negativo. Tampoco pudimos demostrar una correlación de su expresión con las variables clínico-patológicas, con la respuesta patológica ni con la supervivencia, todo ello posiblemente debido al bajo número de muestras disponibles (**Objetivo 1**).

En cuanto a la forma de evaluar *SPARC* en tejido, en nuestro estudio, y de acuerdo con nuestros patólogos, utilizamos el método H-score (0-300) (282). Este método difiere del método del estudio de Nagai y cols (189), cuyos investigadores analizaron la expresión de *SPARC* de forma cuantitativa a partir de un sistema de imagen de captura. En cambio, nuestro método es similar al utilizado por el equipo de Zhu y cols (191) y al empleado en el ensayo Gepartrio (190); que evaluaron la expresión del gen *SPARC* teniendo en cuenta la intensidad de la tinción y la proporción de las células positivas e integraron ambos parámetros en un score estandarizado semicuantitativo.

Otro de los principales hallazgos de la presente tesis ha sido identificar una posible influencia de *SPARC* en la respuesta inmunológica (**Objetivo 1**). Constatamos como la expresión de *SPARC* en las biopsias podría influir en el patrón del infiltrado inflamatorio, tanto de forma directa (en los Linfocitos T CD20 y las células dendríticas en tejido) como de forma indirecta (en el valor NLR pre-quimioterapia en suero). Nuestros resultados sugieren que *SPARC* podría estar favoreciendo la inmunogenicidad ya que la mayor expresión de *SPARC* en tejido se asoció con menos densidad de células dendríticas, con más infiltrado inflamatorio para el subtipo de los linfocitos CD20 y con mayor cantidad de neutrófilos en sangre. Además a esta información se suma la asociación entre la expresión de *SPARC* en estroma y la probabilidad de pertenecer al grupo 2 de nuestro *clúster* un grupo caracterizado por un mayor infiltrado inflamatorio y mejores tasas de respuesta patológica. Por el contrario, nosotros no identificamos asociación de estas variantes de *SPARC* con los otros biomarcadores emergentes (Exosomas, NLR o MDCs) ni con los TILs.

En líneas generales se conoce que *SPARC* no está vinculado a una vía de señalización en concreto, si no que puede estar implicado en múltiples vías dependiendo de las interacciones celulares establecidas y del estadio del cáncer. Algunos ejemplos de éstas vías de señalización son: (ILK)/PI3K/Akt, Ras/Raf/MEK/ERK $\frac{1}{2}$ /AP-1 y NF- $\kappa$ B (291). De este modo se ha observado como *SPARC* a través de la vía AKT podría activar la transición epitelio-mesénquima para algunos tipos de cáncer, incrementando en consecuencia la progresión tumoral (292). Llama la atención la identificación de la mayoría de los receptores de las moléculas de la matriz extracelular en la literatura excepto para *SPARC*; sigue siendo una incertidumbre como éste coopera con la superficie celular para llevar a cabo sus funciones (172).

El infiltrado inmune tumoral está asociado a mejores resultados para el cáncer de mama de tipo HER2 positivo y triple negativo, tanto en enfermedad localizada como en enfermedad avanzada (206,293). La incorporación de la densidad del infiltrado de la respuesta inmune pre-existente con otros factores pronósticos y clínicos, permitirá a los clínicos estimar mejor la supervivencia a largo plazo tras un diagnóstico de cáncer de mama. Sin embargo, el valor pronóstico y predictivo de los TILs en el cáncer de mama de tipo luminal sigue siendo controvertido (294). Por este motivo, en nuestro trabajo de tesis hemos querido evaluar el papel de los TILs en una cohorte de pacientes de tipo luminal, además de las de fenotipo triple negativo, tratadas y seguidas en nuestra institución.

Los autores Carsten Denkert y cols (228); estudiaron el valor pronóstico y predictivo de la concentración de TILs, examinándolo en las muestras de biopsias teñidas con hematoxilina-eosina previas al tratamiento en 6 ensayos clínicos aleatorizados cuyo objetivo era estudiar el tratamiento neoadyuvante en cáncer de mama. Los autores confirmaron la importancia de la cantidad de TILs en la predicción de la RCp, independientemente del subtipo molecular de cáncer de mama. Además la RCp se asoció a mejor pronóstico (SLE) en pacientes con cáncer de mama de tipo HER2 positivo y triple negativo, pero no en el pequeño subgrupo de lumbinales-HER2 negativas. En el grupo de lumbinales, la concentración de TILs no se asociaba con SLE y, sorprendentemente, una baja densidad de TILs se asociaba de forma significativa con mayor SG que las de alta concentración de TILs, mostrando resultados opuestos a los de las poblaciones de triple negativas y HER2 positivas. De momento no se ha dado ninguna explicación con un buen aval científico respecto a esto. A todos nos surgió la cuestión de si los TILs confieren peor evolución en la enfermedad de tipo luminal. Esta asociación paradójica entre los TILs y los tumores de tipo luminal-HER2 negativo traduce una biología peculiar del infiltrado inmunológico.

Estudios previos al mencionado muestran los resultados de cada uno de los ensayos más destacados (GeparDuo, GeparTrio, y GeparQuinto) revelando datos similares para el total de la población y para el grupo de lumbinales. En éstos, el análisis exploratorio del subgrupo de cáncer de mama predominantemente linfocitario presentaban de forma estadísticamente significativa mayores tasas de RCp comparado con aquellas que no eran de este subtipo (224,226). En los tumores RRHH positivos, la tasa de RCp para el subtipo predominantemente linfocitario fue de 28.2 % en contraste con los que no lo eran (8.2%). Por lo tanto, el uso de TILs como biomarcador para cáncer de mama de tipo luminal requiere de más validación(226). En uno de los metanálisis realizados a partir de grandes cohortes incluyeron pacientes con tumores de alto grado de tipo luminal que alcanzaban RCp impactando a su vez en supervivencia a largo plazo, mientras que estos hallazgos no se observaron para tumores de grado I o II (137). Recientemente, un estudio de neoadyuvancia en cáncer de mama de tipo luminal altamente proliferativo ha reportado una estimación de tasas de respuesta patológica completa mayor para las pacientes que reciben pembrolizumab junto con terapia estándar frente a las que solo recibían tratamiento estándar (295).

Uno de las principales aportaciones de la presente tesis ha sido identificar datos de la implicación de los TILs para el grupo de pacientes con cáncer de mama de tipo luminal. A través de la evaluación de la cantidad de TILs como variable continua y estratificada (en este caso como variable dicotómica) identificamos una asociación entre cantidad de TILs y un mayor grado histológico. En el grupo de lumbinales, las pacientes cuyas biopsias presentaban mayor concentración de TILs se traducían en una mayor probabilidad de presentar RCp y mayor grado de respuesta por Miller y Payne que además podría tener un impacto en SLE. Por el contrario no observamos estos datos en SG, probablemente debido a

la necesidad de un seguimiento de las pacientes superior. El posible impacto en supervivencia para el grupo de luminales está en consonancia con la publicación reciente del equipo de Curigliano (296). Para el grupo de triples negativas, a pesar de no constatar impacto en respuesta patológica, sí observamos su impacto en SLE (**Objetivo 2**). Los hallazgos de la presente tesis conjuntamente con las del equipo de Curigliano podrían sugerir que los TILs tienen un valor pronóstico que difiere entre las pacientes tratadas con quimioterapia respecto a las que no la recibieron. Ciertamente también se puede intuir que hay un subgrupo dentro de las luminales más inmunogénico y que merecen de una mejor exploración para inmunoterapias futuras. El trabajo de Curigliano difiere del nuestro en 2 aspectos, por un lado era un estudio de adyuvancia y por otro establecieron el punto de corte de TILs en 5%, punto de corte que en nuestro caso no llegamos a utilizar tras confirmar en nuestra muestra buenos resultados para el grupo de RE positivo con el umbral de TILs al 10%. Estos resultados también respaldan la posibilidad de que esquemas que contienen antraciclinas aportan un grado de inmunogenicidad. Algunos grupos argumentan que la muerte celular inducida por la quimioterapia implica una variedad de reacciones inmunes que median un “efecto vacuna”, liberando una serie de señales antigénicas que representan el éxito de la terapia citostática en las enfermedades oncológicas (297). Los tratamientos de quimioterapia destruyen las células tumorales por apoptosis y estudios recientes sugieren que algunos quimioterápicos deben inducir una destrucción tumoral que mejora el reconocimiento de la célula cancerígena por el sistema inmune (298). La explicación para esta activación inmunitaria selectiva es por un incremento de la expansión de los Linfocitos T CD8+ y un aumento de la densidad de TILs mediada por el sistema HLA clase I, que permite una presentación antigénica efectiva (299). Actualmente hay una evidencia clara que da soporte a que ciertos quimioterápicos como las antraciclinas, la ciclofosfamida o la gemtamicina puedan promover la apoptosis en las células cancerígenas con efectos inmunogénicos a través de mecanismos diferentes (300). Este patrón de muerte tumoral inmunogénica se caracteriza por una secuencia temporal de eventos que incluyen procesos tales como la translocación temprana de la calreticulina a la superficie celular y, consecutivamente, la interacción de la calreticulina con múltiples receptores presentes en las células dendríticas (299).

Los principales ensayos clínicos prospectivos del grupo alemán previamente descritos no nos han caracterizado las subpoblaciones de TILs en las biopsias y tampoco nos han diferenciado los grupos moleculares luminal A vs B. Por este motivo, con el objetivo de estudiar mejor el impacto de la respuesta inmune y el microambiente tumoral tras un tratamiento neoadyuvante en pacientes con cáncer de mama, hemos determinado 5 subpoblaciones: histiocitos (CD68), linfocitos T (CD4 y CD8), células dendríticas (CD1a) y linfocitos B (CD20). Seguidamente, realizamos un estudio de clustering a partir de los diferentes marcadores de linfocitos y seleccionamos el *Clúster CD4/8/20/68* como el mejor predictor de respuesta patológica. En el análisis del clustering, teniendo en cuenta los resultados previamente descritos en el grupo de pacientes con cáncer de mama de tipo luminal, diferenciamos los subtipos luminales A vs B. Los resultados obtenidos de este análisis, además de identificarnos un patrón de infiltrado inflamatorio que nos permitió generar nuestro modelo predictivo final, nos aportó datos para los dos primeros objetivos de la tesis:

- 1) Una subpoblación de pacientes con tumores de tipo luminal B y otra de triple negativo con una mejor respuesta patológica, a nivel local y algunas también a nivel ganglionar, y cuya población linfocitaria se caracteriza por un enriquecimiento de histiocitos y linfocitos T y B (**Objetivo 2**);
- 2) Del grupo 1 del *Clúster CD4/8/20/68* por una variante de *SPARC* (rs1978707) se puede traducir en una posible implicación en la respuesta inmunológica (**Objetivo 1**). El grupo 1 además se asoció con peor evolución clínica, con menor infiltrado inflamatorio y con características clínico patológicas de peor pronóstico (mayor grado histológico y  $ki67 > 14\%$ ).

En resumen, en su conjunto estos datos apoyan una posible correlación entre el fenotipo molecular y el perfil inmunogénico en el cáncer de mama.

Los datos obtenidos de nuestro *Clúster CD4/8/20/68* revelan además el tipo de poblaciones linfocitarias que pueden tener un papel en resultados clínicos de nuestra cohorte de cáncer de mama, concretamente observamos una implicación tanto de los macrófagos como de las células B, poblaciones cuyos datos publicados hasta ahora son controvertidos, a diferencia de lo que sucede con los linfocitos T CD4 y CD8. Los macrófagos pueden afectar el microambiente tumoral, ya que proporcionan factores con capacidad trófica y promueven la migración y la extravasación (301). Además los macrófagos, reclutados por el factor estimulador de colonias derivado de tumor tipo 1 produce el factor de crecimiento epidérmico que activa la migración celular en tumor. Pocos son los estudios que han evaluado el valor pronóstico de los macrófagos en el cáncer de mama. Los datos que disponemos para la mayoría de procesos malignos apuntan a que la infiltración macrocitaria se correlaciona con peor pronóstico (302). En nuestro estudio, aunque no pudimos proceder a la diferenciación de los dos subtipos de macrófagos (M1/2), observamos que la presencia de los mismos en el grupo 2 de nuestro *clúster* selecciona un grupo de pacientes de tipo luminal B con una tasa de respuesta patológicas mayor a la quimioterapia, sin embargo, nuestro seguimiento no nos ha permitido demostrar un impacto en la supervivencia.

Otra población celular poco estudiada en cáncer de mama y para la que también hemos aportado datos, es la de los linfocitos B. Muy pocos estudios han examinado el valor pronóstico o predictivo de TILs CD20 tras un tratamiento de quimioterapia. Denkert y cols (224);encontraron una correlación estadísticamente significativa entre los TILs CD20 y la RCp. En otro trabajo, un grupo de pacientes con cáncer de mama con altas tasas de respuesta se caracterizó por un alto infiltrado de TILs CD20 en las biopsias pre-tratamiento, y con un decrecimiento del infiltrado tras recibir la quimioterapia (303). En otro estudio que incluía 580 biopsias con cáncer de mama previas al tratamiento, una alta expresión de CD20 se asoció con 5.5 veces más de probabilidad de presentar RCp al tratamiento neoadyuvante basado en el esquema de antracilinas y taxanos (304).

Esta información se añade a la identificada en un análisis previo que realizamos para cada una de las poblaciones de TILs de forma individualizada: identificamos una correlación de las subpoblaciones CD68, CD20, CD4 y CD1a con la respuesta patológica y la SLE, siendo especialmente significativa para las células dendríticas, lo cual, aunque nuestro *clúster* no las seleccionó, avala la posible implicación de las mismas en nuestra cohorte de pacientes con cáncer de mama. Los datos identificados en nuestra tesis para las poblaciones CD4 y CD8 están en consonancia con los datos publicados (211,212) y además añaden un valor a su función predictiva para los grupos moleculares de tipo luminal y triple negativo.

Los TILs no pueden considerarse como una única pieza del puzzle inmunogénico del tumor y debe ser complementario a la evaluación de otros datos morfológicos (subtipos moleculares) genómicos (perfiles de expresión génica) para establecerse como un marcador robusto de utilidad clínica. Como ejemplo, el *Working Group* ha activado un esfuerzo internacional para incluir los TILs en el índice de RCB con el objetivo de ganar precisión en la estratificación del riesgo del cáncer de mama tras un tratamiento neoadyuvante (305). Por consiguiente, desde un punto de vista especulativo, quisimos explorar nuevos biomarcadores cuyo rol en el cáncer de mama no está bien estudiado, sin embargo, podrían ser integrados a futuro en un modelo predictivo y pronóstico, conjuntamente con *SPARC* y TILs, entre otros. Cuando analizamos los 3 biomarcadores seleccionados en nuestro segundo estudio (NLR, exosomas, MDSCs) no identificamos datos interpretables respecto a su correlación con las variables clínico-patológicas, respuesta patológica o supervivencia, probablemente debido al bajo número de muestras para cada uno de ellos (**Objetivo 3**). En cambio, los datos más interesantes los obtuvimos en el subestudio donde enfrentamos los biomarcadores séricos con los biomarcadores tisulares: cabe destacar la asociación observada de los niveles de TILs con los exosomas y las MDSCs. Esta asociación se mantenía de una forma característica cuando analizamos exclusivamente la población de tipo luminal. Lo que observamos es un efecto supresor de los exosomas y de las MDSCs, cuyos niveles en sangre nos están disminuyendo la expresión de TILs a nivel tisular, y especialmente en la población luminal. Las fuentes

literarias nos argumentan que en la mayoría de estudios en cáncer de mama los exosomas emiten señales negativas, lo que supone un efecto supresor en la respuesta inmune antitumoral ya que inhibe la respuesta de célula T convirtiendo a las células inmunes a un fenotipo pro-tumoral (306). Los exosomas que derivan de lesiones tumorales de cáncer de mama contribuyen a su vez al crecimiento tumoral bloqueando la señal mediada por IL-2 que activa a las células NK y su respuesta inmune contra las células tumorales (307). Otro trabajo demostró que los exosomas circulantes secretados por células de cáncer de mama contribuyen a la activación del NF- $\kappa$ B de los macrófagos lo que induce una respuesta pro-inflamatoria incrementando los niveles de citoquinas inflamatorias (308). Respecto a lo observado con las MDSCs también está en consonancia con trabajos reportados en otros muchos tipos de cáncer, pero en el caso concreto de cáncer de mama hay escasa evidencia (309). Esta aproximación permitirá en un futuro estudiar la potencialidad de algunas otras células del torrente sanguíneo como las Tregs y otras poblaciones mieloides inmunosupresoras e identificar las diferencias con grupos de mujeres sanas respecto a las pacientes con cáncer de mama con el objetivo de explorar nuevas dianas para la inmunoterapia.

En el cáncer de mama de tipo luminal, teniendo en cuenta nuestros resultados, podemos especular que su comportamiento biológico podría estar relacionado con una mayor señalización sistémica (mayor concentración en suero de marcadores indirectos tales como MDSCs y exosomas), que retroactivamente suprime el infiltrado linfocitario en el tejido. Se conoce que el grupo de luminales se caracteriza por un mayor número de mutaciones en TP53 así como amplificaciones en FGFR1 y CCND1, que implica una mayor inestabilidad genómica y que podría activar una respuesta inmunogénica, sin embargo, por los motivos previamente expuestos, no parece ser suficiente para ser contrarrestado por el sistema inmune adaptativo, esto explicaría la peor evolución de algunas pacientes (310).

Respecto al biomarcador NLR, aunque los estudios más recientes (311,312) apuntan a que una mayor proporción de NLR se relaciona con peores resultados de supervivencia, sobretodo para el cáncer de mama de tipo no luminal HER2 negativo, nosotros no lo hemos podido demostrar.

Desafortunadamente en nuestro estudio tampoco encontramos una relación de los biomarcadores emergentes con el *clúster* seleccionado, ni tampoco con el gen *SPARC*. A destacar una reciente publicación que propone a *SPARC* como un potencial marcador de las MDSCs con capacidad inmunosupresora y pro-tumoral incluyendo procesos tales como la transición epitelio mesénquima y la angiogénesis (313). Sin duda sería algo interesante de explorar en estudios futuros para entender la funcionalidad y el comportamiento de estos marcadores indirectos de fácil obtención para los distintos subtipos de cáncer de mama.

Los resultados de este estudio nos proporcionan una visión de la contribución del microambiente tumoral en la biología del cáncer de mama, principalmente para los fenotipos triple negativo y luminal. Además, la integración de los biomarcadores analizados en nuestra muestra nos ha permitido diseñar un modelo predictivo que, validado de forma prospectiva, nos podría ayudar a seleccionar aquellas pacientes con una mejor respuesta y evolución pronóstica (**Objetivo 4**). Estos datos nos permitirán además desescalar o escalar tratamientos y seleccionar las pacientes que podrían beneficiarse de nuevas terapias inmunológicas.

Nuestro modelo predictivo ha sido el resultado de comprender la interacción que se establece entre las células cancerígenas con el microambiente. Además traduce las posibles vías que controlan la transformación y crecimiento de un tumor, de la metastásis, la tolerancia inmune y la respuesta terapéutica.

Esta tesis tiene algunas limitaciones. Los resultados no pueden generalizarse a todos los pacientes debido al pequeño tamaño muestral y al diseño retrospectivo que podría haber sesgado la selección de la muestra, por lo que deben ser interpretados con cautela. Cabe destacar la ausencia de un grupo control para discernir realmente si la tasa de RCp o de mayor gradación de respuesta se deben a los esquemas de quimioterapia empleados. Resaltar además que el momento de la obtención de las muestras para cada uno de los biomarcadores ha sido en momentos distintos, resultando un número de muestras distintas para cada uno de ellos.

En resumen, una mejor comprensión de estos biomarcadores en pacientes seleccionados de forma prospectiva, y en distintos momentos evolutivos de la enfermedad, nos ayudará a comprender mejor los cambios dinámicos que se establecen en el ecosistema tumoral.

## ■ 8. CONCLUSIONES

- ✓ El gen *SPARC* tiene una función pronóstica y predictiva en el cáncer de mama. La variante rs19789707 del gen *SPARC* así como la expresión de *SPARC* en tejido tanto a nivel de estroma como de epitelio tienen una implicación en la respuesta inmune **(Objetivo 1)**.
- ✓ En el cáncer de mama, la densidad de TILs y las subpoblaciones CD4, CD8, CD20, CD1a, CD68, analizados en las biopsias previas al tratamiento de quimioterapia neoadyuvante, tienen un papel pronóstico y predictivo para los subtipos de cáncer de mama de tipo triple negativo y luminal. **(Objetivo 2)**.
- ✓ El análisis de nuevos biomarcadores séricos (exosomas, NLR, MDSCs) aporta información indirecta de lo que está sucediendo en el tejido tumoral y describe un posible comportamiento biológico para el cáncer de mama de tipo luminal **(Objetivo 3)**.
- ✓ La integración de las subpoblaciones de TILs (*clúster*), el gen *SPARC* y los biomarcadores emergentes en un modelo predictivo permite identificar una subpoblación de pacientes con cáncer de mama triple negativo y una de tipo luminal B con una mejor respuesta patológica y mejor evolución clínica **(Objetivo 4)**.

## ■ 9. LINEAS DE FUTURO

1. Teniendo en cuenta que algunos de estos biomarcadores ofrecen beneficio en el diagnóstico obtenido a partir de una biopsia líquida, entender y caracterizarlos biológicamente, recogiendo muestras basales, pre y post-tratamiento, es de vital importancia ya que permitirá investigar el potencial terapéutico de cada uno de ellos.
2. Es indispensable estandarizar la forma de evaluar cada uno de los biomarcadores. Concretamente los TILs aún no han sido integrados en la decisión terapéutica a pesar de haberse establecido ya su valor pronóstico. Los TILs deben incorporarse en un modelo de predicción de riesgo para guiar decisiones terapéuticas, tanto en la neoadyuvancia como la adyuvancia. El análisis digital probablemente será una herramienta útil, ya que además permitirá obtener el patrón general de infiltrado inmune en el cáncer de mama, escaneando la heterogeneidad de esta población gracias a la imagen proporcionada por un software.
3. Finalmente, deberán validarse los biomarcadores en estudios randomizados y controlados. Combinando estos marcadores podremos disponer de un modelo pronóstico y predictivo que correlacionado con otras variables clínico-patológicas, con la expresión génica y con la carga mutacional nos permita predecir la respuesta a los tratamientos, tanto de quimioterapia como de las nuevas terapias.

## ■ 10. BIBLIOGRAFIA

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* noviembre de 2018;68(6):394-424.
2. Gatta G, Mallone S, van der Zwan JM, Trama A, Siesling S, Capocaccia R, et al. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: Results of EUROCARE-5 - A population-based study. *Lancet Oncol.* 1 de enero de 2014;15(1):23-34.
3. Berry DA, Cronin KA, Plevritis SK, Fryback DG, Clarke L, Zelen M, et al. Effect of Screening and Adjuvant Therapy on Mortality from Breast Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 27 de octubre de 2005 [citado 15 de marzo de 2018];353(17):1784-92. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16251534>
4. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 13 de marzo de 2008 [citado 15 de marzo de 2018];358(11):1148-59. Disponible en: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra072067>
5. Fackenthal JD, Olopade OI. Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 1 de diciembre de 2007 [citado 15 de marzo de 2018];7(12):937-48. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18034184>
6. González-Santiago S, Ramón y Cajal T, Aguirre E, Alés-Martínez JE, Andrés R, Balmaña J, et al. SEOM clinical guidelines in hereditary breast and ovarian cancer (2019). *Clin Transl Oncol.* 1 de febrero de 2020;22(2):193-200.
7. Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, Orecchia R, Viale G. Breast cancer. *Lancet (London, England)* [Internet]. mayo de 2005 [citado 15 de marzo de 2018];365(9472):1727-41. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673605665464>
8. Singletary KW, Gapstur SM. Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms. *JAMA* [Internet]. 7 de noviembre de 2001 [citado 15 de marzo de 2018];286(17):2143-51. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11694156>
9. Gaudet MM, Gapstur SM, Sun J, Diver WR, Hannan LM, Thun MJ. Active smoking and breast cancer risk: original cohort data and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 17 de abril de 2013 [citado 15 de marzo de 2018];105(8):515-25. Disponible en: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/djt023>
10. Pierobon M, Frankenfeld CL. Obesity as a risk factor for triple-negative breast cancers: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 20 de enero de 2013 [citado 15 de marzo de 2018];137(1):307-14. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10549-012-2339-3>
11. Friedenreich CM, Cust AE. Physical activity and breast cancer risk: impact of timing, type and dose of activity and population subgroup effects. *Br J Sports Med* [Internet]. 3 de agosto de 2008 [citado 15 de marzo de 2018];42(8):636-47. Disponible en: <http://bjsm.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bjsm.2006.029132>
12. Anderson WF, Pfeiffer RM, Dores GM, Sherman ME. Comparison of age distribution patterns for different histopathologic types of breast carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 1 de octubre de 2006 [citado 19 de marzo de 2018];15(10):1899-905. Disponible en: <http://cebp.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1055-9965.EPI-06-0191>
13. McGuire A, Brown J, Malone C, McLaughlin R, Kerin M. Effects of Age on the Detection and Management of Breast Cancer. *Cancers (Basel)* [Internet]. 22 de mayo de 2015 [citado 19 de marzo de 2018];7(2):908-29. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26010605>
14. Kolečková M, Kolář Z, Ehrmann J, Kořínková G, Trojanec R. Age-associated prognostic and predictive biomarkers in patients with breast cancer. *Oncol Lett* [Internet]. junio de 2017 [citado 19 de marzo de 2018];13(6):4201-7. Disponible en: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2017.6000>
15. Anders CK, Johnson R, Litton J, Phillips M, Bleyer A. Breast Cancer Before Age 40 Years. *Semin Oncol* [Internet]. junio de 2009 [citado 19 de marzo de 2018];36(3):237-49. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093775409000372>
16. Kroman N. Factors influencing the effect of age on prognosis in breast cancer: population based study Commentary: much still to learn about relations between tumour biology, prognosis, and treatment outcome in early breast cancer. *BMJ* [Internet]. 19 de febrero de 2000 [citado 16 de noviembre de 2020];320(7233):474-9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10678859/>
17. Louwman WJ, Vulto JCM, Verhoeven RHA, Nieuwenhuijzen GAP, Coebergh JWW, Voogd AC. Cli-

- nical epidemiology of breast cancer in the elderly. *Eur J Cancer* [Internet]. octubre de 2007 [citado 19 de marzo de 2018];43(15):2242-52. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804907006168>
18. Eley JW, Hill HA, Chen VW, Austin DF, Wesley MN, Muss HB, et al. Racial differences in survival from breast cancer. Results of the National Cancer Institute Black/White Cancer Survival Study. *JAMA* [Internet]. 28 de septiembre de 1994 [citado 19 de marzo de 2018];272(12):947-54. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8084062>
  19. Kohler BA, Sherman RL, Howlader N, Jemal A, Ryerson AB, Henry KA, et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2011, Featuring Incidence of Breast Cancer Subtypes by Race/Ethnicity, Poverty, and State. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. junio de 2015 [citado 19 de marzo de 2018];107(6):djv048. Disponible en: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/djv048>
  20. 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* [Internet]. 7 de junio de 2006 [citado 19 de marzo de 2018];295(21):2492. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16757721>
  21. Varma S, Ozerdem U, Hoda SA. Complexities and challenges in the pathologic assessment of size (T) of invasive breast carcinoma. *Adv Anat Pathol* [Internet]. noviembre de 2014 [citado 20 de marzo de 2018];21(6):420-32. Disponible en: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00125480-201411000-00004>
  22. Rosen PP, Groshen S, Kinne DW, Norton L. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol* [Internet]. noviembre de 1993 [citado 20 de marzo de 2018];11(11):2090-100. Disponible en: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.1993.11.11.2090>
  23. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* [Internet]. 1 de enero de 1989 [citado 20 de marzo de 2018];63(1):181-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2910416>
  24. Chia SK, Speers CH, Bryce CJ, Hayes MM, Olivotto IA. Ten-year outcomes in a population-based cohort of node-negative, lymphatic, and vascular invasion-negative early breast cancers without adjuvant systemic therapies. *J Clin Oncol* [Internet]. 1 de mayo de 2004 [citado 20 de marzo de 2018];22(9):1630-7. Disponible en: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2004.09.070>
  25. Gajdos C, Tartter PI, Bleiweiss IJ. Lymphatic invasion, tumor size, and age are independent predictors of axillary lymph node metastases in women with T1 breast cancers. *Ann Surg* [Internet]. noviembre de 1999 [citado 25 de marzo de 2018];230(5):692-6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10561094>
  26. Li CI, Uribe DJ, Daling JR. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer* [Internet]. 20 de octubre de 2005 [citado 20 de marzo de 2018];93(9):1046-52. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16175185>
  27. Pestalozzi BC, Zahrieh D, Mallon E, Gusterson BA, Price KN, Gelber RD, et al. Distinct clinical and prognostic features of infiltrating lobular carcinoma of the breast: combined results of 15 International Breast Cancer Study Group clinical trials. *J Clin Oncol* [Internet]. 20 de junio de 2008 [citado 20 de marzo de 2018];26(18):3006-14. Disponible en: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2007.14.9336>
  28. Arpino G, Bardou VJ, Clark GM, Elledge RM. Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome. *Breast Cancer Res* [Internet]. 17 de junio de 2004 [citado 20 de marzo de 2018];6(3):R149. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15084238>
  29. Cristofanilli M, Gonzalez-Angulo A, Sneige N, Kau S-W, Broglio K, Theriault RL, et al. Invasive lobular carcinoma classic type: response to primary chemotherapy and survival outcomes. *J Clin Oncol* [Internet]. 1 de enero de 2005 [citado 20 de marzo de 2018];23(1):41-8. Disponible en: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2005.03.111>
  30. Sastre-Garau X, Jouve M, Asselain B, Vincent-Salomon A, Beuzeboc P, Dorval T, et al. Infiltrating lobular carcinoma of the breast. Clinicopathologic analysis of 975 cases with reference to data on conservative therapy and metastatic patterns. *Cancer* [Internet]. 1 de enero de 1996 [citado 20 de marzo de 2018];77(1):113-20. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291097-0142%2819960101%2977%3A1%3C113%3A%3AAID-CNCR19%3E3.0.CO%3B2-8>

31. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther* [Internet]. 15 de noviembre de 2010 [citado 20 de marzo de 2018];10(10):955-60. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21057215>
32. Trudeau ME, Pritchard KI, Chapman J-AW, Hanna WM, Kahn HJ, Murray D, et al. Prognostic factors affecting the natural history of node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. enero de 2005 [citado 21 de marzo de 2018];89(1):35-45. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10549-004-1368-y>
33. Pinder SE, Rakha EA, Purdie CA, Bartlett JMS, Francis A, Stein RC, et al. Macroscopic handling and reporting of breast cancer specimens pre- and post-neoadjuvant chemotherapy treatment: review of pathological issues and suggested approaches. *Histopathology* [Internet]. septiembre de 2015 [citado 21 de marzo de 2018];67(3):279-93. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/his.12649>
34. Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AHS, Elston CW, Grainge MJ, Hodi Z, et al. Prognostic Significance of Nottingham Histologic Grade in Invasive Breast Carcinoma. *J Clin Oncol* [Internet]. 1 de julio de 2008 [citado 21 de marzo de 2018];26(19):3153-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18490649>
35. Ignatiadis M, Sotiriou C. Understanding the molecular basis of histologic grade. *Pathobiology* [Internet]. 2008 [citado 21 de marzo de 2018];75(2):104-11. Disponible en: <https://www.karger.com/Article/FullText/123848>
36. 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* [Internet]. 11 de septiembre de 2001 [citado 19 de mayo de 2019];98(19):10869-74. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11553815>
37. Harlow SP, Krag DN, Julian TB, Ashikaga T, Weaver DL, Feldman SA, et al. Prerandomization Surgical Training for the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-32 trial: a randomized phase III clinical trial to compare sentinel node resection to conventional axillary dissection in clinically node-negative breast cancer. *Ann Surg* [Internet]. enero de 2005 [citado 21 de marzo de 2018];241(1):48-54. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15621990>
38. Gill G, SNAC Trial Group of the Royal Australasian College of Surgeons (RACS) and NHMRC Clinical Trials Centre. Sentinel-Lymph-Node-Based Management or Routine Axillary Clearance? One-Year Outcomes of Sentinel Node Biopsy Versus Axillary Clearance (SNAC): A Randomized Controlled Surgical Trial. *Ann Surg Oncol* [Internet]. 3 de febrero de 2009 [citado 21 de marzo de 2018];16(2):266-75. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19050973>
39. Zavagno G, De Salvo GL, Scalco G, Bozza F, Barutta L, Del Bianco P, et al. A Randomized clinical trial on sentinel lymph node biopsy versus axillary lymph node dissection in breast cancer: results of the Sentinella/GIVOM trial. *Ann Surg* [Internet]. febrero de 2008 [citado 21 de marzo de 2018];247(2):207-13. Disponible en: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00000658-200802000-00001>
40. Galimberti V, Cole BF, Zurrada S, Viale G, Luini A, Veronesi P, et al. Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel-node micrometastases (IBCSG 23-01): a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol* [Internet]. abril de 2013 [citado 21 de marzo de 2018];14(4):297-305. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204513700354>
41. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman K V, Beitsch PD, Whitworth PW, Blumencranz PW, et al. Axillary Dissection vs No Axillary Dissection in Women With Invasive Breast Cancer and Sentinel Node Metastasis. *JAMA* [Internet]. 9 de febrero de 2011 [citado 21 de marzo de 2018];305(6):569. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21304082>
42. Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, Kaneko T, Iwase T, Akiyama F, et al. One-step Nucleic Acid Amplification for Intraoperative Detection of Lymph Node Metastasis in Breast Cancer Patients. *Clin Cancer Res* [Internet]. 15 de agosto de 2007 [citado 21 de marzo de 2018];13(16):4807-16. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17699859>
43. Pinder SE, Ellis IO, Galea M, O'Rourke S, Blamey RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. III. Vascular invasion: relationship with recurrence and survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* [Internet]. enero de 1994 [citado 25 de marzo de 2018];24(1):41-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8144141>
44. Rakha EA, Martin S, Lee AHS, Morgan D, Pharoah PDP, Hodi Z, et al. The prognostic significance of

- lymphovascular invasion in invasive breast carcinoma. *Cancer* [Internet]. 1 de agosto de 2012 [citado 25 de marzo de 2018];118(15):3670-80. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.26711>
45. Karak SG, Quatrano N, Buckley J, Ricci A. Prevalence and significance of perineural invasion in invasive breast carcinoma. *Conn Med* [Internet]. enero de 2010 [citado 25 de marzo de 2018];74(1):17-21. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20175368>
  46. Beresford MJ, Wilson GD, Makris A. Measuring proliferation in breast cancer: practicalities and applications. *Breast Cancer Res* [Internet]. 30 de diciembre de 2006 [citado 26 de marzo de 2018];8(6):216. Disponible en: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr1618>
  47. Colozza M, Azambuja E, Cardoso F, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart MJ. Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now? *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* [Internet]. 1 de noviembre de 2005 [citado 26 de marzo de 2018];16(11):1723-39. Disponible en: <http://academic.oup.com/annonc/article/16/11/1723/130356/Proliferative-markers-as-prognostic-and-predictive>
  48. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: Highlights of the st gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast Cancer 2013. *Ann Oncol*. 2013;24(9):2206-23.
  49. Viale G, Giobbie-Hurder A, Regan MM, Coates AS, Mastropasqua MG, Dell'Orto P, et al. Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki-67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from Breast International Group Trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole. *J Clin Oncol* [Internet]. 1 de diciembre de 2008 [citado 26 de marzo de 2018];26(34):5569-75. Disponible en: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2008.17.0829>
  50. Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, Solin LJ, et al. Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*. 8 de julio de 2017;67(4):290-303.
  51. Blamey RW, Pinder SE, Ball GR, Ellis IO, Elston CW, Mitchell MJ, et al. Reading the prognosis of the individual with breast cancer. *Eur J Cancer*. julio de 2007;43(10):1545-7.
  52. Ravdin PM, Siminoff LA, Davis GJ, Mercer MB, Hewlett J, Gerson N, et al. Computer program to assist in making decisions about adjuvant therapy for women with early breast cancer. *J Clin Oncol*. 15 de febrero de 2001;19(4):980-91.
  53. Wishart GC, Bajdik CD, Azzato EM, Dicks E, Greenberg DC, Rashbass J, et al. A population-based validation of the prognostic model PREDICT for early breast cancer. *Eur J Surg Oncol*. mayo de 2011;37(5):411-7.
  54. Levin ER. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol* [Internet]. agosto de 2005 [citado 28 de marzo de 2018];19(8):1951-9. Disponible en: <https://academic.oup.com/mend/article-lookup/doi/10.1210/me.2004-0390>
  55. Zhu BT, Han G-Z, Shim J-Y, Wen Y, Jiang X-R. Quantitative structure-activity relationship of various endogenous estrogen metabolites for human estrogen receptor alpha and beta subtypes: Insights into the structural determinants favoring a differential subtype binding. *Endocrinology* [Internet]. septiembre de 2006 [citado 28 de marzo de 2018];147(9):4132-50. Disponible en: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/en.2006-0113>
  56. Saceda M, Lindsey RK, Solomon H, Angeloni S V, Martin MB. Estradiol regulates estrogen receptor mRNA stability. *J Steroid Biochem Mol Biol* [Internet]. agosto de 1998 [citado 28 de marzo de 2018];66(3):113-20. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9719445>
  57. El-Ashry D, Chrysogelos SA, Lippman ME, Kern FG. Estrogen induction of TGF-alpha is mediated by an estrogen response element composed of two imperfect palindromes. *J Steroid Biochem Mol Biol* [Internet]. noviembre de 1996 [citado 28 de marzo de 2018];59(3-4):261-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9010318>
  58. Hill KK, Roemer SC, Churchill MEA, Edwards DP. Structural and functional analysis of domains of the progesterone receptor. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 30 de enero de 2012 [citado 28 de marzo de 2018];348(2):418-29. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0303720711003972>
  59. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* [Internet]. febrero de 1998 [citado 28 de marzo de 2018];11(2):155-68. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9504686>

60. Anderson WF, Chatterjee N, Ershler WB, Brawley OW. Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. noviembre de 2002 [citado 28 de marzo de 2018];76(1):27-36. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12408373>
61. Mohammed RH, Lakatua DJ, Haus E, Yasmineh WJ. Estrogen and progesterone receptors in human breast cancer. Correlation with histologic subtype and degree of differentiation. *Cancer* [Internet]. 1 de septiembre de 1986 [citado 28 de marzo de 2018];58(5):1076-81. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3015374>
62. Wong H, Lau S, Cheung P, Wong TT, Parker A, Yau T, et al. Lobular breast cancers lack the inverse relationship between ER/PR status and cell growth rate characteristic of ductal cancers in two independent patient cohorts: implications for tumor biology and adjuvant therapy. *BMC Cancer* [Internet]. 10 de noviembre de 2014 [citado 28 de marzo de 2018];14(1):826. Disponible en: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-14-826>
63. Viale G, Regan MM, Maiorano E, Mastropasqua MG, Dell'Orto P, Rasmussen BB, et al. Prognostic and predictive value of centrally reviewed expression of estrogen and progesterone receptors in a randomized trial comparing letrozole and tamoxifen adjuvant therapy for postmenopausal early breast cancer: BIG 1-98. *J Clin Oncol* [Internet]. 1 de septiembre de 2007 [citado 28 de marzo de 2018];25(25):3846-52. Disponible en: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2007.11.9453>
64. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet (London, England)* [Internet]. 27 de agosto de 2011 [citado 31 de marzo de 2018];378(9793):771-84. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673611609938>
65. Bardou V-J, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol* [Internet]. 15 de mayo de 2003 [citado 31 de marzo de 2018];21(10):1973-9. Disponible en: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2003.09.099>
66. Ring A, Dowsett M. Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocr Relat Cancer* [Internet]. 1 de diciembre de 2004 [citado 31 de marzo de 2018];11(4):643-58. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15613444>
67. Yamnik RL, Holz MK. mTOR/S6K1 and MAPK/RSK signaling pathways coordinately regulate estrogen receptor alpha serine 167 phosphorylation. *FEBS Lett* [Internet]. 4 de enero de 2010 [citado 31 de marzo de 2018];584(1):124-8. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2009.11.041>
68. Yamnik RL, Digilova A, Davis DC, Brodt ZN, Murphy CJ, Holz MK. S6 Kinase 1 Regulates Estrogen Receptor  $\alpha$  in Control of Breast Cancer Cell Proliferation. *J Biol Chem* [Internet]. 6 de marzo de 2009 [citado 31 de marzo de 2018];284(10):6361-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19112174>
69. Jeselsohn R, Buchwalter G, De Angelis C, Brown M, Schiff R. ESR1 mutations—a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 30 de octubre de 2015 [citado 31 de marzo de 2018];12(10):573-83. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26122181>
70. Schiavon G, Hrebien S, Garcia-Murillas I, Cutts RJ, Pearson A, Tarazona N, et al. Analysis of ESR1 mutation in circulating tumor DNA demonstrates evolution during therapy for metastatic breast cancer. *Sci Transl Med* [Internet]. 11 de noviembre de 2015 [citado 31 de marzo de 2018];7(313):313ra182. Disponible en: <http://stm.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/scitranslmed.aac7551>
71. Fribbens C, O'Leary B, Kilburn L, Hrebien S, Garcia-Murillas I, Beaney M, et al. Plasma ESR1 Mutations and the Treatment of Estrogen Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 1 de septiembre de 2016 [citado 31 de marzo de 2018];34(25):2961-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27269946>
72. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Peto R, Davies C, Godwin J, Gray R, Pan HC, et al. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet (London, England)* [Internet]. 4 de febrero de 2012 [citado 31 de marzo de 2018];379(9814):432-44. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673611616255>

73. Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W, et al. Gene Expression and Benefit of Chemotherapy in Women With Node-Negative, Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 10 de agosto de 2006 [citado 31 de marzo de 2018];24(23):3726-34. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16720680>
74. Albain KS, Barlow WE, Shak S, Hortobagyi GN, Livingston RB, Yeh I-T, et al. Prognostic and predictive value of the 21-gene recurrence score assay in postmenopausal women with node-positive, oestrogen-receptor-positive breast cancer on chemotherapy: a retrospective analysis of a randomised trial. *Lancet Oncol* [Internet]. enero de 2010 [citado 31 de marzo de 2018];11(1):55-65. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204509703146>
75. Carpenter G, Liao H-J. Trafficking of receptor tyrosine kinases to the nucleus. *Exp Cell Res* [Internet]. 15 de mayo de 2009 [citado 31 de marzo de 2018];315(9):1556-66. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014482708003911>
76. Kainulainen V, Sundvall M, Määttä JA, Santiestevan E, Klagsbrun M, Elenius K. A natural ErbB4 isoform that does not activate phosphoinositide 3-kinase mediates proliferation but not survival or chemotaxis. *J Biol Chem* [Internet]. 24 de marzo de 2000 [citado 31 de marzo de 2018];275(12):8641-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10722704>
77. Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, Toyoshima K, Yamamoto T. The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science* [Internet]. 27 de junio de 1986 [citado 31 de marzo de 2018];232(4758):1644-6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3012781>
78. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* [Internet]. 9 de enero de 1987 [citado 31 de marzo de 2018];235(4785):177-82. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3798106>
79. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, Sävje-Söderborgh J, Anbazhagan R, et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* [Internet]. julio de 1992 [citado 31 de marzo de 2018];10(7):1049-56. Disponible en: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.1992.10.7.1049>
80. Chia S, Norris B, Speers C, Cheang M, Gilks B, Gown AM, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 overexpression as a prognostic factor in a large tissue microarray series of node-negative breast cancers. *J Clin Oncol* [Internet]. 10 de diciembre de 2008 [citado 31 de marzo de 2018];26(35):5697-704. Disponible en: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2007.15.8659>
81. Wolff AC, Elizabeth Hale Hammond M, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American society of clinical oncology/ college of American pathologists clinical practice guideline focused update. *J Clin Oncol*. 10 de julio de 2018;36(20):2105-22.
82. Ellis MJ, Tao Y, Young O, White S, Proia AD, Murray J, et al. Estrogen-independent proliferation is present in estrogen-receptor HER2-positive primary breast cancer after neoadjuvant letrozole. *J Clin Oncol* [Internet]. 1 de julio de 2006 [citado 31 de marzo de 2018];24(19):3019-25. Disponible en: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2005.04.3034>
83. Hayes DF, Thor AD, Dressler LG, Weaver D, Edgerton S, Cowan D, et al. HER2 and response to paclitaxel in node-positive breast cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 11 de octubre de 2007 [citado 31 de marzo de 2018];357(15):1496-506. Disponible en: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa071167>
84. Del Mastro L, Bruzzi P, Nicolò G, Cavazzini G, Contu A, D'Amico M, et al. HER2 expression and efficacy of dose-dense anthracycline-containing adjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Br J Cancer* [Internet]. 11 de julio de 2005 [citado 31 de marzo de 2018];93(1):7-14. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/6602660>
85. Muss HB, Thor AD, Berry DA, Kute T, Liu ET, Koerner F, et al. c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 5 de mayo de 1994 [citado 31 de marzo de 2018];330(18):1260-6. Disponible en: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199405053301802>
86. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* [Internet]. 9 de agosto de 1996 [citado 5 de abril de 2018];86(3):353-64. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8756718>

87. Baeriswyl V, Christofori G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* [Internet]. octubre de 2009 [citado 5 de abril de 2018];19(5):329-37. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044579X09000649>
88. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* [Internet]. junio de 2003 [citado 5 de abril de 2018];3(6):401-10. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc1093>
89. Hamilton EP, Blackwell KL. Safety of Bevacizumab in Patients with Metastatic Breast Cancer. *Oncology* [Internet]. 2011 [citado 5 de abril de 2018];80(5-6):314-25. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21778772>
90. Foekens JA, Peters HA, Look MP, Portengen H, Schmitt M, Kramer MD, et al. The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients. *Cancer Res* [Internet]. 1 de febrero de 2000 [citado 5 de abril de 2018];60(3):636-43. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10676647>
91. Jänicke F, Prechtel A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M, et al. Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 20 de junio de 2001 [citado 5 de abril de 2018];93(12):913-20. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11416112>
92. Witzel I, Milde-Langosch K, Schmidt M, Karn T, Becker S, Wirtz R, et al. Role of urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor mRNA expression as prognostic factors in molecular subtypes of breast cancer. *Onco Targets Ther* [Internet]. noviembre de 2014 [citado 5 de abril de 2018];7:2205-13. Disponible en: <http://www.dovepress.com/role-of-urokinase-plasminogen-activator-and-plasminogen-activator-inhi-peer-reviewed-article-OTT>
93. Duffy MJ, McGowan PM, Harbeck N, Thomssen C, Schmitt M. uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies. *Breast Cancer Res* [Internet]. 22 de agosto de 2014 [citado 5 de abril de 2018];16(4):428. Disponible en: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-014-0428-4>
94. Harbeck N, Schmitt M, Meisner C, Friedel C, Untch M, Schmidt M, et al. Ten-year analysis of the prospective multicentre Chemo-N0 trial validates American Society of Clinical Oncology (ASCO)-recommended biomarkers uPA and PAI-1 for therapy decision making in node-negative breast cancer patients. *Eur J Cancer*. mayo de 2013;49(8):1825-35.
95. Duffy MJ, McGowan PM, Harbeck N, Thomssen C, Schmitt M. uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies. *Breast Cancer Res* [Internet]. 22 de agosto de 2014 [citado 17 de octubre de 2018];16(4):428. Disponible en: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-014-0428-4>
96. Kantelhardt EJ, Vetter M, Schmidt M, Veyret C, Augustin D, Hanf V, et al. Prospective evaluation of prognostic factors uPA/PAI-1 in node-negative breast cancer: Phase III NNBC3-Europe trial (AGO, GBG, EORTC-PBG) comparing 6 × FEC versus 3 × FEC/3 × Docetaxel. *BMC Cancer*. 16 de abril de 2011;11:140.
97. Nitz U, Gluz O, Christgen M, Kates RE, Clemens M, Malter W, et al. Reducing chemotherapy use in clinically high-risk, genomically low-risk pN0 and pN1 early breast cancer patients: five-year data from the prospective, randomised phase 3 West German Study Group (WSG) PlanB trial. *Breast Cancer Res Treat*. 1 de octubre de 2017;165(3):573-83.
98. Oxman AD. Grading quality of evidence and strength of recommendations. Vol. 328, *British Medical Journal*. BMJ; 2004. p. 1490-4.
99. Harbeck N, Sotlar K, Wuerstlein R, Doisneau-Sixou S. Molecular and protein markers for clinical decision making in breast cancer: Today and tomorrow. Vol. 40, *Cancer Treatment Reviews*. 2014. p. 434-44.
100. Nadal R, Lorente JA, Rosell R, Serrano MJ. Relevance of molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer in the era of targeted therapies. *Expert Rev Mol Diagn* [Internet]. 9 de abril de 2013 [citado 5 de abril de 2018];13(3):295-307. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/erm.13.7>
101. Serrano MJ, Ortega FG, Alvarez-Cubero MJ, Nadal R, Sanchez-Rovira P, Salido M, et al. EMT and EGFR in CTCs cytokeratin negative non-metastatic breast cancer. *Oncotarget* [Internet]. 15 de sep-

- tiembre de 2014 [citado 5 de abril de 2018];5(17):7486-97. Disponible en: <http://www.oncotarget.com/fulltext/2217>
102. Mathiesen RR, Borgen E, Renolen A, Løkkevik E, Nesland JM, Anker G, et al. Persistence of disseminated tumor cells after neoadjuvant treatment for locally advanced breast cancer predicts poor survival. *Breast Cancer Res* [Internet]. 14 de agosto de 2012 [citado 5 de abril de 2018];14(4):R117. Disponible en: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr3242>
  103. Nadal R, Fernandez A, Sanchez-Rovira P, Salido M, Rodríguez M, García-Puche JL, et al. Biomarkers characterization of circulating tumour cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Res* [Internet]. 3 de junio de 2012 [citado 5 de abril de 2018];14(3):R71. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22554015>
  104. Gaforio J-J, Serrano M-J, Sanchez-Rovira P, Sirvent A, Delgado-Rodríguez M, Campos M, et al. Detection of breast cancer cells in the peripheral blood is positively correlated with estrogen-receptor status and predicts for poor prognosis. *Int J cancer* [Internet]. 20 de diciembre de 2003 [citado 5 de abril de 2018];107(6):984-90. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.11479>
  105. Serrano MJ, Lorente JA, Delgado Rodríguez M, Fernández A, Fernández M, de la Torre C, et al. Circulating tumour cells in peripheral blood: potential impact on breast cancer outcome. *Clin Transl Oncol* [Internet]. marzo de 2011 [citado 5 de abril de 2018];13(3):204-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21421466>
  106. Martos T, Casadevall D, Albanell J. Circulating Tumor Cells: Applications for Early Breast Cancer. En 2020. p. 135-46.
  107. Diaz LA, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol* [Internet]. 20 de febrero de 2014 [citado 5 de abril de 2018];32(6):579-86. Disponible en: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2012.45.2011>
  108. Mouliere F, Rosenfeld N. Circulating tumor-derived DNA is shorter than somatic DNA in plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 17 de marzo de 2015 [citado 5 de abril de 2018];112(11):3178-9. Disponible en: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1501321112>
  109. De Mattos-Arruda L, Weigelt B, Cortes J, Won HH, Ng CKY, Nuciforo P, et al. Capturing intra-tumor genetic heterogeneity by de novo mutation profiling of circulating cell-free tumor DNA: a proof-of-principle. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* [Internet]. septiembre de 2014 [citado 5 de abril de 2018];25(9):1729-35. Disponible en: <https://academic.oup.com/annonc/article-lookup/doi/10.1093/annonc/mdu239>
  110. Dawson S-J, Tsui DWY, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin S-F, et al. Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 28 de marzo de 2013 [citado 5 de abril de 2018];368(13):1199-209. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23484797>
  111. Alimirzaie S, Bagherzadeh M, Akbari MR. Liquid biopsy in breast cancer: A comprehensive review. Vol. 95, *Clinical Genetics*. Blackwell Publishing Ltd; 2019. p. 643-60.
  112. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* [Internet]. 17 de agosto de 2000 [citado 8 de abril de 2018];406(6797):747-52. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/35021093>
  113. 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* [Internet]. 2007 [citado 8 de abril de 2018];8(5):R76. Disponible en: <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2007-8-5-r76>
  114. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2 de octubre de 2010 [citado 8 de abril de 2018];12(5):R68. Disponible en: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr2635>
  115. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol* [Internet]. febrero de 2011 [citado 8 de abril de 2018];5(1):5-23. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.molonc.2010.11.003>
  116. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 19 de febrero de 2009 [citado 8 de abril de 2018];360(8):790-800. Disponible en: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra0801289>

117. 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. *J Clin Invest* [Internet]. 1 de julio de 2011 [citado 8 de abril de 2018];121(7):2750-67. Disponible en: <http://www.jci.org/articles/view/45014>
118. Jézéquel P, Loussouarn D, Guérin-Charbonnel C, Champion L, Vanier A, Gouraud W, et al. Gene-expression molecular subtyping of triple-negative breast cancer tumours: importance of immune response. *Breast Cancer Res* [Internet]. 20 de marzo de 2015 [citado 8 de abril de 2018];17(1):43. Disponible en: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-015-0550-y>
119. Ahn SG, Kim SJ, Kim C, Jeong J. Molecular Classification of Triple-Negative Breast Cancer. *J Breast Cancer* [Internet]. septiembre de 2016 [citado 8 de abril de 2018];19(3):223. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27721871>
120. Hergueta-Redondo M, Palacios J, Cano A, Moreno-Bueno G. "New" molecular taxonomy in breast cancer. *Clin Transl Oncol* [Internet]. diciembre de 2008 [citado 8 de abril de 2018];10(12):777-85. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19068448>
121. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 11 de noviembre de 2010 [citado 8 de abril de 2018];363(20):1938-48. Disponible en: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra1001389>
122. Watkins JA, Irshad S, Grigoriadis A, Tutt ANJ. Genomic scars as biomarkers of homologous recombination deficiency and drug response in breast and ovarian cancers. *Breast Cancer Res* [Internet]. 3 de junio de 2014 [citado 8 de abril de 2018];16(3):211. Disponible en: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr3670>
123. Weigelt B, Ng CKY, Shen R, Popova T, Schizas M, Natrajan R, et al. Metaplastic breast carcinomas display genomic and transcriptomic heterogeneity [corrected]. *Mod Pathol* [Internet]. 21 de marzo de 2015 [citado 8 de abril de 2018];28(3):340-51. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/modpathol2014142>
124. Gucalp 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. *Clin Cancer Res* [Internet]. 1 de octubre de 2013 [citado 8 de abril de 2018];19(19):5505-12. Disponible en: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-12-3327>
125. Traina TA, Miller K, Yardley DA, Eakle J, Schwartzberg LS, O'Shaughnessy J, et al. Enzalutamide for the Treatment of Androgen Receptor-Expressing Triple-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 20 de marzo de 2018 [citado 8 de abril de 2018];36(9):884-90. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29373071>
126. Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* [Internet]. 10 de marzo de 2009 [citado 8 de abril de 2018];27(8):1160-7. Disponible en: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2008.18.1370>
127. Kaufmann M, Morrow M, von Minckwitz G, Harris JR, Biedenkopf Expert Panel Members. Locoregional treatment of primary breast cancer. *Cancer* [Internet]. 1 de marzo de 2010 [citado 9 de abril de 2018];116(5):1184-91. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20087962>
128. Green MC, Buzdar AU, Smith T, Ibrahim NK, Valero V, Rosales MF, et al. Weekly paclitaxel improves pathologic complete remission in operable breast cancer when compared with paclitaxel once every 3 weeks. *J Clin Oncol* [Internet]. 1 de septiembre de 2005 [citado 9 de abril de 2018];23(25):5983-92. Disponible en: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2005.06.232>
129. Loo CE, Straver ME, Rodenhuis S, Muller SH, Wesseling J, Vrancken Peeters M-JTFD, et al. Magnetic Resonance Imaging Response Monitoring of Breast Cancer During Neoadjuvant Chemotherapy: Relevance of Breast Cancer Subtype. *J Clin Oncol* [Internet]. 20 de febrero de 2011 [citado 9 de abril de 2018];29(6):660-6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21220595>
130. Jochelson MS, Lampen-Sachar K, Gibbons G, Dang C, Lake D, Morris EA, et al. Do MRI and Mammography Reliably Identify Candidates for Breast Conservation After Neoadjuvant Chemotherapy? *Ann Surg Oncol* [Internet]. 17 de mayo de 2015 [citado 9 de abril de 2018];22(5):1490-5. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25777093>
131. Rauch GM, Adrada BE. Comparison of Breast MR Imaging with Molecular Breast Imaging in Breast Cancer Screening, Diagnosis, Staging, and Treatment Response Evaluation. *Magn Reson Imaging Clin N Am* [Internet]. mayo de 2018 [citado 9 de abril de 2018];26(2):273-80. Disponible en: <http://>

linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1064968917301678

132. Bear HD, Anderson S, Smith RE, Geyer CE, 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* [Internet]. 1 de mayo de 2006 [citado 9 de abril de 2018];24(13):2019-27. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16606972>
133. Buzdar AU, Singletary SE, Theriault RL, Booser DJ, Valero V, Ibrahim N, et al. Prospective evaluation of paclitaxel versus combination chemotherapy with fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide as neoadjuvant therapy in patients with operable breast cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. noviembre de 1999 [citado 9 de abril de 2018];17(11):3412-7. Disponible en: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.1999.17.11.3412>
134. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to Neoadjuvant Therapy and Long-Term Survival in Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 10 de marzo de 2008 [citado 9 de abril de 2018];26(8):1275-81. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18250347>
135. Untch M, Fasching PA, Konecny GE, Hasmüller S, Lebeau A, Kreienberg R, et al. Pathologic Complete Response After Neoadjuvant Chemotherapy Plus Trastuzumab Predicts Favorable Survival in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Overexpressing Breast Cancer: Results From the TECHNO Trial of the AGO and GBG Study Groups. *J Clin Oncol* [Internet]. 1 de septiembre de 2011 [citado 9 de abril de 2018];29(25):3351-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21788566>
136. von Minckwitz G, 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. *J Clin Oncol* [Internet]. 20 de mayo de 2012 [citado 9 de abril de 2018];30(15):1796-804. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22508812>
137. 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* (London, England) [Internet]. 12 de julio de 2014 [citado 9 de abril de 2018];384(9938):164-72. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673613624228>
138. Berry DA, Hudis CA. Neoadjuvant Therapy in Breast Cancer as a Basis for Drug Approval. *JAMA Oncol* [Internet]. 1 de octubre de 2015 [citado 9 de abril de 2018];1(7):875. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26181139>
139. Hatzis C, Symmans WF, Zhang Y, Gould RE, Moulder SL, Hunt KK, et al. Relationship between Complete Pathologic Response to Neoadjuvant Chemotherapy and Survival in Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 1 de enero de 2016 [citado 9 de abril de 2018];22(1):26-33. Disponible en: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-14-3304>
140. Shiraishi K, Kohno T, Tanai C, Goto Y, Kuchiba A, Yamamoto S, et al. Association of DNA repair gene polymorphisms with response to platinum-based doublet chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 20 de noviembre de 2010 [citado 8 de octubre de 2018];28(33):4945-52. Disponible en: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2010.30.5334>
141. Kim JG, Chae YS, Sohn SK, Moon JH, Ryoo HM, Bae SH, et al. Prostaglandin synthase 2/cyclooxygenase 2 (PTGS2/COX2) 8473T>C polymorphism associated with prognosis for patients with colorectal cancer treated with capecitabine and oxaliplatin. *Cancer Chemother Pharmacol* [Internet]. 15 de octubre de 2009 [citado 8 de octubre de 2018];64(5):953-60. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19219602>
142. Windsor RE, Strauss SJ, Kallis C, Wood NE, Whelan JS. Germline genetic polymorphisms may influence chemotherapy response and disease outcome in osteosarcoma: a pilot study. *Cancer* [Internet]. 1 de abril de 2012 [citado 8 de octubre de 2018];118(7):1856-67. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.26472>
143. Bergmann C, Bachmann HS, Bankfalvi A, Lotfi R, Pütter C, Wild CA, et al. Toll-like receptor 4 single-nucleotide polymorphisms Asp299Gly and Thr399Ile in head and neck squamous cell carcinomas. *J Transl Med* [Internet]. 21 de agosto de 2011 [citado 8 de octubre de 2018];9(1):139. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21854645>
144. Stearns V, Davidson NE, Flockhart DA. Pharmacogenetics in the treatment of breast cancer. *Phar-*

- macogenomics J [Internet]. 16 de junio de 2004 [citado 16 de octubre de 2018];4(3):143-53. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15024382>
145. Fuksa L, Micuda S, Grim J, Ryska A, Hornychova H. Predictive biomarkers in breast cancer: their value in neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Invest* [Internet]. 25 de noviembre de 2012 [citado 16 de octubre de 2018];30(9):663-78. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07357907.2012.725441>
  146. Szkandera J, Absenger G, Dandachi N, Regitnig P, Lax S, Stotz M, et al. Analysis of functional germline polymorphisms for prediction of response to anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Mol Genet Genomics* [Internet]. 18 de septiembre de 2012 [citado 16 de octubre de 2018];287(9):755-64. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s00438-012-0715-7>
  147. Sacco K, Grech G. Actionable pharmacogenetic markers for prediction and prognosis in breast cancer. *EPMA J* [Internet]. 22 de diciembre de 2015 [citado 16 de octubre de 2018];6(1):15. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1186/s13167-015-0037-z>
  148. George J, Dharanipragada K, Krishnamachari S, Chandrasekaran A, Sam SS, Sunder E. A single-nucleotide polymorphism in the MDR1 gene as a predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Clin Breast Cancer* [Internet]. agosto de 2009 [citado 9 de marzo de 2018];9(3):161-5. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1526820911706607>
  149. Hertz DL, Motsinger-Reif AA, Drobish A, Winham SJ, McLeod HL, Carey LA, et al. CYP2C8\*3 predicts benefit/risk profile in breast cancer patients receiving neoadjuvant paclitaxel. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 18 de julio de 2012 [citado 9 de marzo de 2018];134(1):401-10. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10549-012-2054-0>
  150. Cuzick J, Brentnall AR, Segal C, Byers H, Reuter C, Detre S, et al. Impact of a Panel of 88 Single Nucleotide Polymorphisms on the Risk of Breast Cancer in High-Risk Women: Results From Two Randomized Tamoxifen Prevention Trials. *J Clin Oncol* [Internet]. marzo de 2017 [citado 16 de octubre de 2018];35(7):743-50. Disponible en: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2016.69.8944>
  151. Dumont A, Pannier D, Ducoulombier A, Tresch E, Chen J, Kramar A, et al. ERCC1 and CYP1B1 polymorphisms as predictors of response to neoadjuvant chemotherapy in estrogen positive breast tumors. *Springerplus* [Internet]. 7 de diciembre de 2015 [citado 9 de marzo de 2018];4(1):327. Disponible en: <http://www.springerplus.com/content/4/1/327>
  152. Sim S, Bergh J, Hellström M, Hatschek T, Xie H. Pharmacogenetic impact of docetaxel on neoadjuvant treatment of breast cancer patients. *Pharmacogenomics* [Internet]. 10 de septiembre de 2018 [citado 16 de octubre de 2018];pgs-2018-0080. Disponible en: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/pgs-2018-0080>
  153. Bissell MJ, Radisky DC, Rizki A, Weaver VM, Petersen OW. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation* [Internet]. diciembre de 2002 [citado 9 de marzo de 2018];70(9-10):537-46. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1432-0436.2002.700907.x>
  154. Daniel CW, Smith GH. The mammary gland: a model for development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* [Internet]. enero de 1999 [citado 16 de octubre de 2018];4(1):3-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10219902>
  155. Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* [Internet]. octubre de 2001 [citado 16 de octubre de 2018];1(1):46-54. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/35094059>
  156. Fiorino S, Di Saverio S, Leandri P, Tura A, Birtolo C, Silingardi M, et al. The role of matricellular proteins and tissue stiffness in breast cancer: a systematic review. *Future Oncol* [Internet]. julio de 2018 [citado 17 de octubre de 2018];14(16):1601-27. Disponible en: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fon-2017-0510>
  157. Ross DT, Perou CM. A comparison of gene expression signatures from breast tumors and breast tissue derived cell lines. *Dis Markers* [Internet]. 2001 [citado 16 de octubre de 2018];17(2):99-109. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11673656>
  158. Rønnev-Jessen L, Petersen OW, Bissell MJ. Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. *Physiol Rev* [Internet]. enero de 1996 [citado 16 de octubre de 2018];76(1):69-125. Disponible en: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.1996.76.1.69>

159. Péchoux C, Gudjonsson T, Rønnev-Jessen L, Bissell MJ, Petersen OW. Human Mammary Luminal Epithelial Cells Contain Progenitors to Myoepithelial Cells. *Dev Biol* [Internet]. 1 de febrero de 1999 [citado 16 de octubre de 2018];206(1):88-99. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9918697>
160. Wang T, Srivastava S, Hartman M, Buhari SA, Chan C-W, lau P, et al. High expression of intratumoral stromal proteins is associated with chemotherapy resistance in breast cancer. *Oncotarget* [Internet]. 23 de agosto de 2016 [citado 3 de junio de 2019];7(34):55155-68. Disponible en: <http://www.oncotarget.com/fulltext/10894>
161. Farmer P, Bonnefoi H, Anderle P, Cameron D, Wirapati P, Wirapati P, et al. A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nat Med* [Internet]. 4 de enero de 2009 [citado 3 de junio de 2019];15(1):68-74. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/nm.1908>
162. Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, Zhao H, et al. Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med* [Internet]. 27 de mayo de 2008 [citado 9 de marzo de 2018];14(5):518-27. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18438415>
163. Garrido-Laguna I, Uson M, Rajeshkumar N V., Tan AC, De Oliveira E, Karikari C, et al. Tumor engraftment in nude mice and enrichment in stroma-related gene pathways predict poor survival and resistance to gemcitabine in patients with pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 1 de septiembre de 2011;17(17):5793-800.
164. Franco OE, Shaw AK, Strand DW, Hayward SW. Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. Vol. 21, *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd; 2010. p. 33-9.
165. Arnold SA, Brekken RA. SPARC: a matricellular regulator of tumorigenesis. *J Cell Commun Signal* [Internet]. 7 de diciembre de 2009 [citado 25 de marzo de 2019];3(3-4):255-73. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19809893>
166. Framson PE, Sage EH. SPARC and tumor growth: where the seed meets the soil? *J Cell Biochem* [Internet]. 1 de julio de 2004 [citado 25 de marzo de 2019];92(4):679-90. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.20091>
167. Sage H, Johnson C, Bornstein P. Characterization of a novel serum albumin-binding glycoprotein secreted by endothelial cells in culture. *J Biol Chem* [Internet]. 25 de marzo de 1984 [citado 25 de marzo de 2019];259(6):3993-4007. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6368555>
168. Podhajcer OL, Benedetti LG, Girotti MR, Prada F, Salvatierra E, Llera AS. The role of the matricellular protein SPARC in the dynamic interaction between the tumor and the host. *Cancer Metastasis Rev* [Internet]. 10 de diciembre de 2008 [citado 25 de marzo de 2019];27(4):691-705. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18542844>
169. Murphy-Ullrich JE, Sage EH. Revisiting the matricellular concept. *Matrix Biol* [Internet]. julio de 2014 [citado 25 de marzo de 2019];37:1-14. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0945053X14001231>
170. Clark CJ, Sage EH. A prototypic matricellular protein in the tumor microenvironment--where there's SPARC, there's fire. *J Cell Biochem* [Internet]. 1 de junio de 2008 [citado 25 de marzo de 2019];104(3):721-32. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.21688>
171. Nagaraju GP, Dontula R, El-Rayes BF, Lakka SS. Molecular mechanisms underlying the divergent roles of SPARC in human carcinogenesis. *Carcinogenesis* [Internet]. 1 de mayo de 2014 [citado 15 de abril de 2019];35(5):967-73. Disponible en: <https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/bgu072>
172. Nagaraju GPC, Sharma D. Anti-cancer role of SPARC, an inhibitor of adipogenesis. Vol. 37, *Cancer Treatment Reviews*. *Cancer Treat Rev*; 2011. p. 559-66.
173. Thomas SL, Alam R, Lemke N, Schultz LR, Gutiérrez JA, Rempel SA. PTEN augments SPARC suppression of proliferation and inhibits SPARC-induced migration by suppressing SHC-RAF-ERK and AKT signaling. *Neuro Oncol* [Internet]. septiembre de 2010 [citado 17 de noviembre de 2020];12(9):941-55. Disponible en: [/pmc/articles/PMC2940688/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC2940688/?report=abstract)
174. Socha MJ, Said N, Dai Y, Kwong J, Ramalingam P, Trieu V, et al. Aberrant promoter methylation of SPARC in ovarian cancer. *Neoplasia* [Internet]. febrero de 2009 [citado 15 de abril de 2019];11(2):126-35. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19177197>
175. Yang E, Kang HJ, Koh KH, Rhee H, Kim NK, Kim H. Frequent inactivation of SPARC by promoter

- hypermethylation in colon cancers. *Int J cancer* [Internet]. 1 de agosto de 2007 [citado 15 de abril de 2019];121(3):567-75. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.22706>
176. Wang Y, Yu Q, Cho AH, Rondeau G, Welsh J, Adamson E, et al. Survey of differentially methylated promoters in prostate cancer cell lines. *Neoplasia* [Internet]. agosto de 2005 [citado 15 de abril de 2019];7(8):748-60. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16207477>
177. Barth PJ, Moll R, Ramaswamy A. Stromal remodeling and SPARC (secreted protein acid rich in cysteine) expression in invasive ductal carcinomas of the breast. *Virchows Arch* [Internet]. 19 de mayo de 2005 [citado 15 de abril de 2019];446(5):532-6. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s00428-005-1256-9>
178. Sato N, Fukushima N, Maehara N, Matsubayashi H, Koopmann J, Su GH, et al. SPARC/osteonectin is a frequent target for aberrant methylation in pancreatic adenocarcinoma and a mediator of tumor-stromal interactions. *Oncogene* [Internet]. 7 de agosto de 2003 [citado 15 de abril de 2019];22(32):5021-30. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/1206807>
179. Bergamaschi A, Tagliabue E, Sørli T, Naume B, Triulzi T, Orlandi R, et al. Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome. *J Pathol* [Internet]. febrero de 2008 [citado 9 de marzo de 2018];214(3):357-67. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18044827>
180. Watkins G, Douglas-Jones A, Bryce R, Mansel RE, Jiang WG. Increased levels of SPARC (osteonectin) in human breast cancer tissues and its association with clinical outcomes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* [Internet]. abril de 2005 [citado 27 de mayo de 2019];72(4):267-72. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952327805000049>
181. Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* [Internet]. 28 de julio de 2005 [citado 18 de mayo de 2019];436(7050):518-24. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/nature03799>
182. Hsiao Y-H, Lien H-C, Hwa H-L, Kuo W-H, Chang K-J, Hsieh F-J. SPARC (Osteonectin) in Breast Tumors of Different Histologic Types and Its Role in the Outcome of Invasive Ductal Carcinoma. *Breast J* [Internet]. 23 de febrero de 2010 [citado 9 de marzo de 2018];16(3):305-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20210803>
183. Graham JD, Balleine RL, Milliken JS, Bilous AM, Clarke CL. Expression of osteonectin mRNA in human breast tumours is inversely correlated with oestrogen receptor content. *Eur J Cancer* [Internet]. septiembre de 1997 [citado 19 de mayo de 2019];33(10):1654-60. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9389930>
184. Gerson KD, Shearstone JR, Maddula VSRK, Seligmann BE, Mercurio AM. Integrin  $\alpha 4$  regulates SPARC protein to promote invasion. *J Biol Chem* [Internet]. 23 de marzo de 2012 [citado 19 de mayo de 2019];287(13):9835-44. Disponible en: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M111.317727>
185. Kupprion C, Motamed K, Sage EH. SPARC (BM-40, Osteonectin) Inhibits the Mitogenic Effect of Vascular Endothelial Growth Factor on Microvascular Endothelial Cells. *J Biol Chem* [Internet]. 6 de noviembre de 1998 [citado 27 de mayo de 2019];273(45):29635-40. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9792673>
186. Raines EW, Lane TF, Iruela-Arispe ML, Ross R, Sage EH. The extracellular glycoprotein SPARC interacts with platelet-derived growth factor (PDGF)-AB and -BB and inhibits the binding of PDGF to its receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 15 de febrero de 1992 [citado 27 de mayo de 2019];89(4):1281-5. Disponible en: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.89.4.1281>
187. Yunker CK, Golembieski W, Lemke N, Schultz CR, Cazacu S, Brodie C, et al. SPARC-induced increase in glioma matrix and decrease in vascularity are associated with reduced VEGF expression and secretion. *Int J cancer* [Internet]. 15 de junio de 2008 [citado 27 de mayo de 2019];122(12):2735-43. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.23450>
188. Azim HA, Singhal S, Ignatiadis M, Desmedt C, Fumagalli D, Veys I, et al. Association between SPARC mRNA expression, prognosis and response to neoadjuvant chemotherapy in early breast cancer: a pooled in-silico analysis. Sarkar D, editor. *PLoS One* [Internet]. 26 de abril de 2013 [citado 9 de marzo de 2018];8(4):e62451. Disponible en: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0062451>
189. Nagai MA, Gerhard R, Fregnani JHTG, Nonogaki S, Rierger RB, Netto MM, et al. Prognostic value of NDRG1 and SPARC protein expression in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 6 de febrero de 2011 [citado 27 de mayo de 2019];126(1):1-14. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10549-010-0867-2>

190. Lindner JL, Loibl S, Denkert C, Ataseven B, Fasching PA, Pfitzner BM, et al. Expression of secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) in breast cancer and response to neoadjuvant chemotherapy. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* [Internet]. enero de 2015 [citado 27 de mayo de 2019];26(1):95-100. Disponible en: <https://academic.oup.com/annonc/article-lookup/doi/10.1093/annonc/mdu487>
191. Zhu A, Yuan P, Du F, Hong R, Ding X, Shi X, et al. SPARC overexpression in primary tumors correlates with disease recurrence and overall survival in patients with triple negative breast cancer. *Oncotarget* [Internet]. 22 de noviembre de 2016 [citado 27 de mayo de 2019];7(47):76628-34. Disponible en: <http://www.oncotarget.com/fulltext/10532>
192. Rucci N, Sanità P, Delle Monache S, Alesse E, Angelucci A. Molecular pathogenesis of bone metastases in breast cancer: Proven and emerging therapeutic targets. *World J Clin Oncol* [Internet]. 10 de agosto de 2014 [citado 29 de mayo de 2019];5(3):335-47. Disponible en: <http://www.wjgnet.com/2218-4333/full/v5/i3/335.htm>
193. Maroni P, Bendinelli P, Morelli D, Drago L, Luzzati A, Perrucchini G, et al. High SPARC Expression Starting from Dysplasia, Associated with Breast Carcinoma, Is Predictive for Bone Metastasis without Enhancement of Plasma Levels. *Int J Mol Sci* [Internet]. 26 de noviembre de 2015 [citado 27 de mayo de 2019];16(12):28108-22. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1422-0067/16/12/25997>
194. De Toro J, Herschlik L, Waldner C, Mongini C. Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: new insights for diagnosis and therapeutic applications. *Front Immunol* [Internet]. 4 de mayo de 2015 [citado 29 de mayo de 2019];6:203. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2015.00203/abstract>
195. Ma J, Gao S, Xie X, Sun E, Zhang M, Zhou Q, et al. SPARC inhibits breast cancer bone metastasis and may be a clinical therapeutic target. *Oncol Lett* [Internet]. 14 de noviembre de 2017 [citado 9 de marzo de 2018];14(5):5876-82. Disponible en: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2017.6925>
196. Dekker TJA, van de Velde CJH, van Pelt GW, Kroep JR, Julien J-P, Smit VTHBM, et al. Prognostic significance of the tumor-stroma ratio: validation study in node-negative premenopausal breast cancer patients from the EORTC perioperative chemotherapy (POP) trial (10854). *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 25 de junio de 2013 [citado 3 de junio de 2019];139(2):371-9. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10549-013-2571-5>
197. Azim HA, Singhal S, Ignatiadis M, Desmedt C, Fumagalli D, Veys I, et al. Association between SPARC mRNA expression, prognosis and response to neoadjuvant chemotherapy in early breast cancer: a pooled in-silico analysis. Sarkar D, editor. *PLoS One* [Internet]. 26 de abril de 2013 [citado 27 de mayo de 2019];8(4):e62451. Disponible en: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0062451>
198. 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* [Internet]. marzo de 2016 [citado 9 de marzo de 2018];17(3):345-56. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204515005422>
199. Schneeweiss A, Seitz J, Smetanay K, Schuetz F, Jaeger D, Bachinger A, et al. Efficacy of nab-paclitaxel does not seem to be associated with SPARC expression in metastatic breast cancer. *Anti-cancer Res* [Internet]. noviembre de 2014 [citado 9 de marzo de 2018];34(11):6609-15. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25368265>
200. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annu Rev Immunol* [Internet]. abril de 2004 [citado 5 de agosto de 2019];22(1):329-60. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15032581>
201. Whitford P, George WD, Campbell AM. Flow cytometric analysis of tumour infiltrating lymphocyte activation and tumour cell MHC Class I and II expression in breast cancer patients. *Cancer Lett* [Internet]. 10 de enero de 1992 [citado 10 de julio de 2020];61(2):157-64. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1730139/>
202. Heinrich EL, Walser TC, Krysan K, Liclican EL, Grant JL, Rodriguez NL, et al. The Inflammatory Tumor Microenvironment, Epithelial Mesenchymal Transition and Lung Carcinogenesis. *Cancer Microenviron* [Internet]. 16 de abril de 2012 [citado 7 de agosto de 2019];5(1):5-18. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21922183>

203. Burugu S, Asleh-Aburaya K, Nielsen TO. Immune infiltrates in the breast cancer microenvironment: detection, characterization and clinical implication. *Breast Cancer* [Internet]. 2 de enero de 2017 [citado 7 de agosto de 2019];24(1):3-15. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s12282-016-0698-z>
204. Ruffell B, Au A, Rugo HS, Esserman LJ, Hwang ES, Coussens LM. Leukocyte composition of human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 21 de febrero de 2012 [citado 7 de agosto de 2019];109(8):2796-801. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21825174>
205. Ravelli A, Roviello G, Cretella D, Cavazzoni A, Biondi A, Cappelletti MR, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and breast cancer: Beyond the prognostic and predictive utility. *Tumour Biol* [Internet]. 5 de abril de 2017 [citado 9 de marzo de 2018];39(4):1010428317695023. Disponible en: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1010428317695023>
206. Savas P, Salgado R, Denkert C, Sotiriou C, Darcy PK, Smyth MJ, et al. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 15 de abril de 2016 [citado 3 de septiembre de 2019];13(4):228-41. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/nr-clinonc.2015.215>
207. Gardner A, Ruffell B. Series: The Biology of Antigen Presentation Dendritic Cells and Cancer Immunity. *Trends Immunol* [Internet]. 2016 [citado 9 de enero de 2020];37(12):855-65. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2016.09.006>
208. Mattarollo SR, Loi S, Duret H, Ma Y, Zitvogel L, Smyth MJ. Pivotal role of innate and adaptive immunity in anthracycline chemotherapy of established tumors. *Cancer Res* [Internet]. 15 de julio de 2011 [citado 3 de septiembre de 2019];71(14):4809-20. Disponible en: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-11-0753>
209. Qiu SQ, Waaijer SJH, Zwager MC, de Vries EGE, van der Vegt B, Schröder CP. Tumor-associated macrophages in breast cancer: Innocent bystander or important player? Vol. 70, *Cancer Treatment Reviews*. W.B. Saunders Ltd; 2018. p. 178-89.
210. De La Cruz-Merino L, Barco-Sánchez A, Henao Carrasco F, Nogales Fernández E, Vallejo Benítez A, Brugal Molina J, et al. New insights into the role of the immune microenvironment in breast carcinoma. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013.
211. Mahmoud SMA, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Grainge MJ, Lee AHS, et al. Tumor-Infiltrating CD8 + Lymphocytes Predict Clinical Outcome in Breast Cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 20 de mayo de 2011 [citado 7 de agosto de 2019];29(15):1949-55. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21483002>
212. Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S, Equeter C, Libin M, de Wind A, et al. CD4+ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J Clin Invest* [Internet]. 1 de julio de 2013 [citado 7 de agosto de 2019];123(7):2873-92. Disponible en: <http://www.jci.org/articles/view/67428>
213. Liu S, Foulkes WD, Leung S, Gao D, Lau S, Kos Z, et al. Prognostic significance of FOXP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer depends on estrogen receptor and human epidermal growth factor receptor-2 expression status and concurrent cytotoxic T-cell infiltration. *Breast Cancer Res* [Internet]. 6 de septiembre de 2014 [citado 7 de agosto de 2019];16(5):432. Disponible en: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-014-0432-8>
214. 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* [Internet]. 15 de enero de 2013 [citado 7 de agosto de 2019];108(1):155-62. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/bjc2012524>
215. Miyashita M, Sasano H, Tamaki K, Hirakawa H, Takahashi Y, Nakagawa S, et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes in residual tumors and alterations in these parameters after neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Breast Cancer Res* [Internet]. 4 de septiembre de 2015 [citado 7 de agosto de 2019];17(1):124. Disponible en: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-015-0632-x>
216. Rathore AS, Goel MM, Makker A, Kumar S, Srivastava AN. Is the Tumor Infiltrating Natural Killer Cell (NK-TILs) Count in Infiltrating Ductal Carcinoma of Breast Prognostically Significant? *Asian Pacific J Cancer Prev* [Internet]. 30 de abril de 2014 [citado 7 de agosto de 2019];15(8):3757-61. Disponible en: <http://koreascience.or.kr/journal/view.jsp?kj=POCPA9&py=2014&vnc=v15n8&sp=3757>

217. 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 Off J Eur Soc Med Oncol* [Internet]. febrero de 2015 [citado 9 de marzo de 2018];26(2):259-71. Disponible en: <http://academic.oup.com/annonc/article/26/2/259/2800585/The-evaluation-of-tumorinfiltrating-lymphocytes>
218. 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* [Internet]. 1 de octubre de 2018 [citado 6 de abril de 2020];52(Pt 2):16-25. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29024776>
219. Loi S, Sirtaine N, Piette F, Salgado R, Viale G, Van Eenoo F, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol* [Internet]. 1 de marzo de 2013 [citado 3 de septiembre de 2019];31(7):860-7. Disponible en: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2011.41.0902>
220. 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 Off J Eur Soc Med Oncol* [Internet]. agosto de 2014 [citado 3 de septiembre de 2019];25(8):1544-50. Disponible en: <https://academic.oup.com/annonc/article-lookup/doi/10.1093/annonc/mdu112>
221. Adams S, Gray RJ, Demaria S, Goldstein L, Perez EA, Shulman LN, et al. Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancers From Two Phase III Randomized Adjuvant Breast Cancer Trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. *J Clin Oncol* [Internet]. 20 de septiembre de 2014 [citado 3 de septiembre de 2019];32(27):2959-66. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25071121>
222. Pruneri G, Gray KP, Vingiani A, Viale G, Curigliano G, Criscitiello C, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) are a powerful prognostic marker in patients with triple-negative breast cancer enrolled in the IBCSG phase III randomized clinical trial 22-00. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2 de julio de 2016 [citado 3 de septiembre de 2019];158(2):323-31. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10549-016-3863-3>
223. Ali HR, Provenzano E, Dawson S-J, Blows FM, Liu B, Shah M, et al. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* [Internet]. agosto de 2014 [citado 3 de septiembre de 2019];25(8):1536-43. Disponible en: <https://academic.oup.com/annonc/article-lookup/doi/10.1093/annonc/mdu191>
224. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, Komor M, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 1 de enero de 2010 [citado 12 de noviembre de 2020];28(1):105-13. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19917869/>
225. Denkert C, von Minckwitz G, Brase JC, Sinn B V., Gade S, Kronenwett R, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Response to Neoadjuvant Chemotherapy With or Without Carboplatin in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive and Triple-Negative Primary Breast Cancers. *J Clin Oncol* [Internet]. 20 de marzo de 2015 [citado 3 de septiembre de 2019];33(9):983-91. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25534375>
226. Issa-Nummer Y, Darb-Esfahani S, Loibl S, Kunz G, Nekljudova V, Schrader I, et al. Prospective validation of immunological infiltrate for prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in HER2-negative breast cancer--a substudy of the neoadjuvant GeparQuinto trial. *Glynn SA, editor. PLoS One* [Internet]. 2 de diciembre de 2013 [citado 3 de septiembre de 2019];8(12):e79775. Disponible en: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0079775>
227. West NR, Milne K, Truong PT, Macpherson N, Nelson BH, Watson PH. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* [Internet]. 8 de diciembre de 2011 [citado 3 de septiembre de 2019];13(6):R126. Disponible en: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr3072>

228. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner BI, Weber KE, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol* [Internet]. enero de 2018 [citado 3 de septiembre de 2019];19(1):40-50. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S147020451730904X>
229. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* [Internet]. 1 de agosto de 2019 [citado 11 de noviembre de 2020];30(8):1194-220. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31161190/>
230. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: The «seed and soil» hypothesis revisited. Vol. 3, *Nature Reviews Cancer*. 2003. p. 453-8.
231. Sangaletti S, Di Carlo E, Gariboldi S, Miotti S, Cappetti B, Parenza M, et al. Macrophage-derived SPARC bridges tumor cell-extracellular matrix interactions toward metastasis. *Cancer Res*. 1 de noviembre de 2008;68(21):9050-9.
232. Kassis J, Klominek J, Kohn EC. Tumor microenvironment: what can effusions teach us? *Diagn Cytopathol* [Internet]. noviembre de 2005 [citado 25 de noviembre de 2019];33(5):316-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16240401>
233. Freedman RS, Deavers M, Liu J, Wang E. Peritoneal inflammation - A microenvironment for epithelial ovarian cancer (EOC). Vol. 2, *Journal of Translational Medicine*. 2004.
234. Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today*. 1992;13(7):265-70.
235. Said NA, Elmarakby AA, Imig JD, Fulton DJ, Motamed K. SPARC ameliorates ovarian cancer-associated inflammation. *Neoplasia* [Internet]. octubre de 2008 [citado 9 de marzo de 2018];10(10):1092-104. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18813349>
236. Ikuta Y, Hayashida Y, Hirata S, Irie A, Senju S, Kubo T, et al. Identification of the H2-Kd-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes of a tumor-associated antigen, SPARC, which can stimulate antitumor immunity without causing autoimmune disease in mice. *Cancer Sci* [Internet]. enero de 2009 [citado 9 de marzo de 2018];100(1):132-7. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1349-7006.2008.01016.x>
237. Sangaletti S, Gioiosa L, Guiducci C, Rotta G, Rescigno M, Stoppacciaro A, et al. Accelerated dendritic-cell migration and T-cell priming in SPARC-deficient mice. *J Cell Sci* [Internet]. 15 de agosto de 2005 [citado 25 de noviembre de 2019];118(Pt 16):3685-94. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16046482>
238. Mitsdoerffer M, Lee Y, Jäger A, Kim H-J, Korn T, Kolls JK, et al. Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 10 de agosto de 2010 [citado 8 de enero de 2020];107(32):14292-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20660725>
239. Piconese S, Costanza M, Tripodo C, Sangaletti S, Musio S, Pittoni P, et al. The matricellular protein SPARC supports follicular dendritic cell networking toward Th17 responses. *J Autoimmun* [Internet]. diciembre de 2011 [citado 8 de enero de 2020];37(4):300-10. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21962567>
240. Rempel SA, Hawley RC, Gutiérrez JA, Mouzon E, Bobbitt KR, Lemke N, et al. Splenic and immune alterations of the Sparc-null mouse accompany a lack of immune response. *Genes Immun*. abril de 2007;8(3):262-74.
241. Luo Z, Zhou Y, Luo P, Zhao Q, Xiao N, Yu Y, et al. SPARC deficiency affects bone marrow stromal function, resulting in impaired B lymphopoiesis. *J Leukoc Biol*. julio de 2014;96(1):73-82.
242. Inoue M, Senju S, Hirata S, Ikuta Y, Hayashida Y, Irie A, et al. Identification of SPARC as a candidate target antigen for immunotherapy of various cancers. *Int J Cancer* [Internet]. 1 de septiembre de 2010 [citado 9 de marzo de 2018];127(6):1393-403. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.25160>
243. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. Vol. 200, *Journal of Cell Biology*. The Rockefeller University Press; 2013. p. 373-83.
244. Gurunathan S, Kang M-H, Jeyaraj M, Qasim M, Kim J-H. Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells*. 3 de abril de 2019;8(4):307.

245. Riches A, Campbell E, Borger E, Powis S. Regulation of exosome release from mammary epithelial and breast cancer cells - a new regulatory pathway. *Eur J Cancer* [Internet]. marzo de 2014 [citado 2 de abril de 2020];50(5):1025-34. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24462375>
246. Koumangoye RB, Sakwe AM, Goodwin JS, Patel T, Ochieng J. Detachment of breast tumor cells induces rapid secretion of exosomes which subsequently mediate cellular adhesion and spreading. *PLoS One*. 2011;6(9).
247. Stegmayr B, Ronquist G. Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomes. *Urol Res*. noviembre de 1982;10(5):253-7.
248. Harding C V, Heuser JE, Stahl PD. Exosomes: looking back three decades and into the future. *J Cell Biol* [Internet]. 18 de febrero de 2013 [citado 30 de marzo de 2020];200(4):367-71. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23420870>
249. Bobrie A, Colombo M, Raposo G, Théry C. Exosome Secretion: Molecular Mechanisms and Roles in Immune Responses [Internet]. Vol. 12, *Traffic*. 2011 [citado 30 de marzo de 2020]. p. 1659-68. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21645191>
250. Chaput N, Théry C. Exosomes: Immune properties and potential clinical imple1. Chaput N, Théry C. Exosomes: Immune properties and potential clinical implementations. *Semin Immunopathol*. 2011;33(5):419–40. mentations. *Semin Immunopathol*. 1 de enero de 2011;33(5):419-40.
251. Rak J. Microparticles in cancer [Internet]. Vol. 36, *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2010 [citado 30 de marzo de 2020]. p. 888-906. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21049390>
252. Hood JL, San RS, Wickline SA. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res* [Internet]. 1 de junio de 2011 [citado 30 de marzo de 2020];71(11):3792-801. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21478294>
253. Zhang H-G, Grizzle WE. Exosomes and cancer: a newly described pathway of immune suppression. *Clin Cancer Res* [Internet]. 1 de marzo de 2011 [citado 30 de marzo de 2020];17(5):959-64. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21224375>
254. Jia Y, Chen Y, Wang Q, Jayasinghe U, Luo X, Wei Q, et al. Exosome: Emerging biomarker in breast cancer [Internet]. Vol. 8, *Oncotarget. Impact Journals LLC*; 2017 [citado 3 de abril de 2020]. p. 41717-33. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28402944>
255. 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* [Internet]. mayo de 2013 [citado 3 de abril de 2020];49(8):1845-59. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23453937>
256. Luga V, Zhang L, Vitoria-Petit AM, Ogunjimi AA, Inanlou MR, Chiu E, et al. Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell* [Internet]. 21 de diciembre de 2012 [citado 19 de noviembre de 2020];151(7):1542-56. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23260141/>
257. Youn J-I, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor-Bearing Mice. *J Immunol*. 15 de octubre de 2008;181(8):5791-802.
258. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. Vol. 9, *Nature Reviews Immunology*. 2009. p. 162-74.
259. Huang B, Pan PY, Li Q, Sato AI, Levy DE, Bromberg J, et al. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res*. 15 de enero de 2006;66(2):1123-31.
260. Baniyash M. Myeloid-derived suppressor cells as intruders and targets: clinical implications in cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* [Internet]. 1 de julio de 2016 [citado 9 de abril de 2020];65(7):857-67. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27225641>
261. Heine A, Schilling J, Grünwald B, Krüger A, Gevensleben H, Held SAE, et al. The induction of human myeloid derived suppressor cells through hepatic stellate cells is dose-dependently inhibited by the tyrosine kinase inhibitors nilotinib, dasatinib and sorafenib, but not sunitinib. *Cancer Immunol Immunother* [Internet]. 1 de marzo de 2016 [citado 9 de abril de 2020];65(3):273-82. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26786874>
262. Rodríguez PC, Ochoa AC. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: Mechanisms and therapeutic perspectives [Internet]. Vol. 222, *Immunological Re-*

- views. 2008 [citado 9 de abril de 2020]. p. 180-91. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18364002>
263. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. Vol. 24, *Current Biology*. Cell Press; 2014.
264. Shipp C, Speigl L, Janssen N, Martens A, Pawelec G. A clinical and biological perspective of human myeloid-derived suppressor cells in cancer [Internet]. Vol. 73, *Cellular and Molecular Life Sciences*. Birkhauser Verlag AG; 2016 [citado 9 de abril de 2020]. p. 4043-61. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27236468>
265. Toor SM, Syed Khaja AS, El Salhat H, Faour I, Kanbar J, Quadri AA, et al. Myeloid cells in circulation and tumor microenvironment of breast cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* [Internet]. 1 de junio de 2017 [citado 9 de abril de 2020];66(6):753-64. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28283696>
266. Speigl L, Burow H, Bailur JK, Janssen N, Walter C-B, Pawelec G, et al. CD14+ HLA-DR-/low MDSCs are elevated in the periphery of early-stage breast cancer patients and suppress autologous T cell proliferation. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 1 de abril de 2018 [citado 9 de abril de 2020];168(2):401-11. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29230664>
267. Bergenfelz C, Larsson A-M, von Stedingk K, Gruvberger-Saal S, Aaltonen K, Jansson S, et al. Systemic Monocytic-MDSCs Are Generated from Monocytes and Correlate with Disease Progression in Breast Cancer Patients. *PLoS One* [Internet]. 20 de mayo de 2015 [citado 9 de abril de 2020];10(5):e0127028. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25992611>
268. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer. Vol. 140, *Cell*. 2010. p. 883-99.
269. Roxburgh CSD, McMillan DC. Role of systemic inflammatory response in predicting survival in patients with primary operable cancer. *Future Oncol* [Internet]. enero de 2010 [citado 9 de abril de 2020];6(1):149-63. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20021215>
270. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. Vol. 420, *Nature*. 2002. p. 860-7.
271. Guthrie GJK, Charles KA, Roxburgh CSD, Horgan PG, McMillan DC, Clarke SJ. The systemic inflammation-based neutrophil-lymphocyte ratio: experience in patients with cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. octubre de 2013 [citado 9 de abril de 2020];88(1):218-30. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23602134>
272. 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.
273. Yang WT, Zhu XZ. The introduction of 2012 WHO classification of tumours of the breast [Internet]. Vol. 42, *Chinese Journal of Pathology*. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*; 2013 [citado 19 de noviembre de 2020]. p. 78-80. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23710911/>
274. ELSTON CW, ELLIS IO. pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long term follow up. *Histopathology*. 1991;19(5):403-10.
275. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn H, 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;22:1736-47.
276. Cheang MCU, 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* [Internet]. 20 de mayo de 2009 [citado 15 de abril de 2020];101(10):736-50. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19436038>
277. Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. Vol. 25, *Journal of Clinical Oncology*. 2007. p. 118-45.
278. Arqueros C, Salazar J, Arranz MJ, Sebio A, Mora J, Sullivan I, et al. SPARC gene variants predict clinical outcome in locally advanced and metastatic pancreatic cancer patients. *Med Oncol* [Internet]. 7 de agosto de 2017 [citado 9 de marzo de 2018];34(8):136. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s12032-017-0993-3>

279. Boyle AP, Hong EL, Hariharan M, Cheng Y, Schaub MA, Kasowski M, et al. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Research* 2012, 22(9):1790-1797. PMID: 22955989. *Genome Res.* septiembre de 2012;22(9):1790-7.
280. Ward LD, Kellis M. HaploReg: A resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic Acids Res* [Internet]. enero de 2012 [citado 23 de febrero de 2021];40(D1):D930. Disponible en: [/pmc/articles/PMC3245002/](http://pmc/articles/PMC3245002/)
281. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner BI, Weber KE, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol* [Internet]. enero de 2018 [citado 9 de marzo de 2018];19(1):40-50. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S147020451730904X>
282. Fedchenko N, Reifenrath J. Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue - a review. *Diagn Pathol* [Internet]. 29 de noviembre de 2014 [citado 6 de abril de 2020];9:221. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25432701>
283. Noh H, Eomm M, Han A. Usefulness of pretreatment neutrophil to lymphocyte ratio in predicting disease-specific survival in breast cancer patients. *J Breast Cancer* [Internet]. marzo de 2013 [citado 16 de abril de 2020];16(1):55-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23593082>
284. Perez DR, Baser RE, Cavnar MJ, Balachandran VP, Antonescu CR, Tap WD, et al. Blood neutrophil-to-lymphocyte ratio is prognostic in gastrointestinal stromal tumor. *Ann Surg Oncol.* febrero de 2013;20(2):593-9.
285. Dutta S, Crumley ABC, Fullarton GM, Horgan PG, McMillan DC. Comparison of the prognostic value of tumour- and patient-related factors in patients undergoing potentially curative resection of oesophageal cancer. *World J Surg* [Internet]. agosto de 2011 [citado 16 de abril de 2020];35(8):1861-6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21538187>
286. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. REporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies (REMARK). *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. noviembre de 2006 [citado 19 de noviembre de 2020];100(2):229-35. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16932852/>
287. Schroth W, Antoniadou L, Fritz P, Schwab M, Muerdter T, Zanger UM, et al. Breast cancer treatment outcome with adjuvant tamoxifen relative to patient CYP2D6 and CYP2C19 genotypes. *J Clin Oncol* [Internet]. 20 de noviembre de 2007 [citado 9 de noviembre de 2020];25(33):5187-93. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18024866/>
288. Xu Y, Yao L, Ouyang T, Li J, Wang T, Fan Z, et al. p53 codon 72 polymorphism predicts the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 15 de octubre de 2005 [citado 9 de noviembre de 2020];11(20):7328-33. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16243804/>
289. Marmé F, Werft W, Benner A, Burwinkel B, Sinn P, Sohn C, et al. FGFR4 Arg388 genotype is associated with pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer. *Ann Oncol* [Internet]. 10 de febrero de 2010 [citado 9 de noviembre de 2020];21(8):1636-42. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20147743/>
290. Bawazeer S, Sabry D, Mahmoud RH, Elhanbuli HM, Yassen NN, Abdelhafez MN. Association of SPARC gene polymorphisms rs3210714 and rs7719521 with VEGF expression and utility of Nottingham Prognostic Index scoring in breast cancer in a sample of Egyptian women. *Mol Biol Rep* [Internet]. 27 de diciembre de 2018 [citado 27 de mayo de 2019];45(6):2313-24. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s11033-018-4394-2>
291. Bradshaw AD. Diverse biological functions of the SPARC family of proteins [Internet]. Vol. 44, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology. Int J Biochem Cell Biol*; 2012 [citado 10 de noviembre de 2020]. p. 480-8. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22249026/>
292. Chang CH, Yen MC, Liao SH, Hsu YL, Lai CS, Chang KP, et al. Secreted protein acidic and rich in cysteine (Sparc) enhances cell proliferation, migration, and epithelial mesenchymal transition, and sparc expression is associated with tumor grade in head and neck cancer. *Int J Mol Sci* [Internet]. 18 de julio de 2017 [citado 10 de noviembre de 2020];18(7). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28718842/>

293. Luen SJ, Salgado R, Fox S, Savas P, Eng-Wong J, Clark E, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes in advanced HER2-positive breast cancer treated with pertuzumab or placebo in addition to trastuzumab and docetaxel: a retrospective analysis of the CLEOPATRA study. *Lancet Oncol* [Internet]. 1 de enero de 2017 [citado 19 de noviembre de 2020];18(1):52-62. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27964843/>
294. Dieci MV, Griguolo G, Miglietta F, Guarneri V. The immune system and hormone-receptor positive breast cancer: Is it really a dead end? [Internet]. Vol. 46, *Cancer Treatment Reviews*. W.B. Saunders Ltd; 2016 [citado 18 de febrero de 2021]. p. 9-19. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27055087/>
295. Nanda R, Liu MC, Yau C, Shatsky R, Pusztai L, Wallace A, et al. Effect of Pembrolizumab Plus Neoadjuvant Chemotherapy on Pathologic Complete Response in Women with Early-Stage Breast Cancer: An Analysis of the Ongoing Phase 2 Adaptively Randomized I-SPY2 Trial. *JAMA Oncol* [Internet]. 1 de mayo de 2020 [citado 11 de noviembre de 2020];6(5):676-84. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32053137/>
296. Criscitiello C, Vingiani A, Maisonneuve P, Viale G, Viale G, Curigliano G. Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in ER+/HER2- breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 1 de septiembre de 2020 [citado 10 de noviembre de 2020];183(2):347-54. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32621251/>
297. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, André F, Tesniere A, Kroemer G. The anticancer immune response: Indispensable for therapeutic success? [Internet]. Vol. 118, *Journal of Clinical Investigation*. *J Clin Invest*; 2008 [citado 11 de noviembre de 2020]. p. 1991-2001. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18523649/>
298. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* [Internet]. septiembre de 2007 [citado 11 de noviembre de 2020];13(9):1050-9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17704786/>
299. Haynes NM, van der Most RG, Lake RA, Smyth MJ. Immunogenic anti-cancer chemotherapy as an emerging concept [Internet]. Vol. 20, *Current Opinion in Immunology*. *Curr Opin Immunol*; 2008 [citado 11 de noviembre de 2020]. p. 545-57. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18573339/>
300. Tesniere A, Apetoh L, Ghiringhelli F, Joza N, Panaretakis T, Kepp O, et al. Immunogenic cancer cell death: a key-lock paradigm [Internet]. Vol. 20, *Current Opinion in Immunology*. *Curr Opin Immunol*; 2008 [citado 11 de noviembre de 2020]. p. 504-11. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18573340/>
301. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: Obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. Vol. 124, *Cell*. 2006. p. 263-6.
302. Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res*. 15 de octubre de 1996;56(20):4625-9.
303. García-Martínez E, Gil GL, Benito AC, González-Billalabeitia E, Conesa MAV, García TG, et al. Tumor-infiltrating immune cell profiles and their change after neoadjuvant chemotherapy predict response and prognosis of breast cancer. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2014 [citado 12 de noviembre de 2020];16(1). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25432519/>
304. Brown JR, Wimberly H, Lannin DR, Nixon C, Rimm DL, Bossuyt V. Multiplexed quantitative analysis of CD3, CD8, and CD20 predicts response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 1 de diciembre de 2014 [citado 12 de noviembre de 2020];20(23):5995-6005. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25255793/>
305. Asano Y, Kashiwagi S, Goto W, Takada K, Takahashi K, Hatano T, et al. Prediction of survival after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer by evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes and residual cancer burden. *BMC Cancer* [Internet]. 28 de diciembre de 2017 [citado 9 de marzo de 2018];17(1):888. Disponible en: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-017-3927-8>
306. Iero M, Valenti R, Huber V, Filipazzi P, Parmiani G, Fais S, et al. Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity. Vol. 15, *Cell Death and Differentiation*. 2008. p. 80-8.

307. Liu C, Yu S, Zinn K, Wang J, Zhang L, Jia Y, et al. Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function. *J Immunol* [Internet]. 1 de febrero de 2006 [citado 3 de abril de 2020];176(3):1375-85. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16424164>
308. Chow A, Zhou W, Liu L, Fong MY, Champer J, Van Haute D, et al. Macrophage immunomodulation by breast cancer-derived exosomes requires Toll-like receptor 2-mediated activation of NF- $\kappa$ B. *Sci Rep* [Internet]. 18 de julio de 2014 [citado 3 de abril de 2020];4:5750. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25034888>
309. Speigl L, Burow H, Bailur JK, Janssen N, Walter CB, Pawelec G, et al. CD14<sup>+</sup> HLA-DR<sup>-</sup>/low MDSCs are elevated in the periphery of early-stage breast cancer patients and suppress autologous T cell proliferation. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 1 de abril de 2018 [citado 12 de noviembre de 2020];168(2):401-11. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29230664/>
310. Mostafa AA, Codner D, Hirasawa K, Komatsu Y, Young MN, Steimle V, et al. Activation of ER signaling differentially modulates IFN- $\gamma$  induced HLA-class II expression in breast cancer cells. *PLoS One* [Internet]. 27 de enero de 2014 [citado 12 de noviembre de 2020];9(1). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24475282/>
311. Marín Hernández C, Piñero Madrona A, Gil Vázquez PJ, Galindo Fernández PJ, Ruiz Merino G, Alonso Romero JL, et al. Usefulness of lymphocyte-to-monocyte, neutrophil-to-monocyte and neutrophil-to-lymphocyte ratios as prognostic markers in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Clin Transl Oncol* [Internet]. 1 de abril de 2018 [citado 9 de abril de 2020];20(4):476-83. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28785911>
312. Ethier JL, Desautels D, Templeton A, Shah PS, Amir E. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res* [Internet]. 5 de enero de 2017 [citado 9 de abril de 2020];19(1):2. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28057046>
313. Sangaletti S, Talarico G, Chiodoni C, Cappetti B, Botti L, Portararo P, et al. SPARC is a new myeloid-derived suppressor cell marker licensing suppressive activities. *Front Immunol* [Internet]. 2019 [citado 12 de noviembre de 2020];10(JUN). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31281314/>



## ■ 11. ANEXOS

## 11.1 Publicación

Arqueros C, Salazar J, Arranz MJ, Sebio A, Mora J, Sullivan I, Tobeña M, Martín-Richard M, Barnadas A, Baiget M, Páez D. SPARC gene variants predict clinical outcome in locally advanced and metastatic pancreatic cancer patients. *Med Oncol.* 2017 Aug;34(8):136. doi: 10.1007/s12032-017-0993-3. Epub 2017 Jul 7. PMID: 28687963.

✓ doi: 10.1007/s12032-017-0993-3.

## 11.2 Resultados no presentados en la tesis

- **Correlación de cada una de las subpoblaciones de TILs con la respuesta patológica y la supervivencia:**

	Todas	Triple negativo	Luminal A	Luminal B
	P'	P'	P'	P'
<b>RPC</b>				
CD1a	0.403	0.659	0.503	0.653
CD20	0.208	0.656	0.226	0.692
CD4	0.175	1.000	1.000	0.210
CD8	0.369	0.378	1.000	0.693
CD68	0.181	0.027	0.488	1.000
<b>RCB</b>				
CD1a	0.656	0.460	0.848	0.806
CD20	0.525	0.871	0.475	0.573
CD4	0.444	0.427	0.716	0.188
CD8	0.638	0.640	1.000	0.710
CD68	0.528	0.151	0.399	0.904
<b>M y P mama</b>				
CD1a	0.776	1.000	1.000	0.722
CD20	0.386	1.000	1.000	0.313
CD4	0.055	1.000	0.394	0.054
CD8	0.450	0.697	1.000	0.521
CD68	0.289	0.677	0.185	0.163
<b>M y P axila</b>				
CD1a	0.566	1.000	1.000	0.498
CD20	0.280	1.000	0.722	0.060
CD4	0.328	0.594	1.000	0.128
CD8	0.400	1.000	0.200	0.763
CD68	0.904	1.000	0.815	1.000
<b>SG</b>				
CD1a	0.504			
CD20	0.208			
CD4	0.143			
CD8	0.246			
CD68	0.120			
<b>SLE</b>				
CD1a	0.339	0.758	0.551	0.012
CD20	0.095	0.648	0.180	0.239
CD4	0.505	0.577	0.666	0.060
CD8	0.774	0.758	0.992	0.186
CD68	0.316	0.274	0.866	0.044

Tabla 30: Correlación de las subpoblaciones de TILs con las respuestas patológicas y la supervivencia. TILs, del inglés Tumor-Infiltrating Lymphocytes ; RCP respuesta patológica completa; RCB Del inglés Residual Burden Cancer ; MyP Miller y Payne; SLE, Supervivencia libre de enfermedad; SG Supervivencia Global; P' P-valor basado en el test de log-rank.

• **Correlación de los polimorfismos de *SPARC* y la densidad de TILs (variable estratificada) con la respuesta y la supervivencia por subtipo molecular.**

SNPs	Triple negativo	Luminal A	Luminal B	Luminales (A+B)
	P'	P'	P'	P'
rs10065756:	1.000	0.302	1.000	0.540
C/C				
A/C				
A/A				
rs12153644:	1.000	0.698	0.875	1.000
T/T				
T/A				
A/A				
rs17718347:	0.416	0.157	0.767	0.404
T/T				
T/C				
C/C				
rs19789707:	0.198	0.629	1.000	0.752
A/A				
A/G				
G/G				
rs19789707:	0.217	1.000	1.000	0.687
A/A o A/G				
G/G				
rs2347128:	0.303	0.457	0.537	0.252
C/C				
C/G				
G/G				
rs3210714:	0.246	1.000	0.655	0.505
G/G				
G/A				
A/A				
rs4958487:	1.000	0.090	0.289	0.508
A/A				
A/G				
G/G				
TILs*	0.405	0.351	0.221	0.058
11-100%				
0-10%				

Tabla 31: Correlación entre los polimorfismos de *SPARC* y la cantidad de TILs (\*variable estratificada) con la RCp. TILs, del inglés Tumor-Infiltrating Lymphocytes ; SNPs Del inglés Single Nucleotide Polymorphisms; RCp respuesta patológica completa; P' P-valor basado en el test de log-rank.

SNPs	Triple negativo	Luminal A	Luminal B	Luminales (A+B)
	P'	P'	P'	P'
rs10065756:	0.879	0.110	0.199	0.851
C/C				
A/C				
A/A				
rs12153644:	1.000	1.000	0.569	0.692
T/T				
T/A				
A/A				
rs17718347:	1.000	0.084	0.512	0.733
T/T				
T/C				
C/C				
rs19789707:	0.212	0.717		0.116
A/A			0.203	
A/G				
G/G				
rs19789707:	0.458	0.559	0.150	0.062
A/A o A/G				
G/G				
rs2347128:	0.542	0.866	0.836	1.000
C/C				
C/G				
G/G				
rs3210714:	0.566	1.000	0.236	0.491
G/G				
G/A				
A/A				
rs4958487:	0.886	1.000	0.148	0.386
A/A				
A/G				
G/G				
TILs*	0.696	0.321	0.238	0.043
11-100%				
0-10%				

Tabla 32: Correlación entre los polimorfismos de *SPARC* y la cantidad de TILs (\*variable estratificada) con la respuesta patológica por Miller y Payne en la mama. TILs, del inglés Tumor-Infiltrating Lymphocytes ; SNPs Del inglés Single Nucleotide Polymorphisms; P' P-valor basado en el test de log-rank.

SNPs	Triple negativo	Luminal A	Luminal B	Luminales (A+B)
	P'	P'	P'	P'
<b>rs10065756:</b>	<b>1.000</b>	<b>0.541</b>	<b>0.255</b>	<b>0.126</b>
C/C				
A/C				
A/A				
<b>rs12153644:</b>	<b>1.000</b>	<b>0.205</b>	<b>0.813</b>	<b>0.345</b>
T/T				
T/A				
A/A				
<b>rs17718347:</b>	<b>0.395</b>	<b>0.336</b>	<b>0.846</b>	<b>0.274</b>
T/T				
T/C				
C/C				
<b>rs19789707:</b>	<b>0.541</b>	<b>0.255</b>	<b>0.793</b>	<b>0.911</b>
A/A				
A/G				
G/G				
<b>rs19789707:</b>	<b>0.385</b>	<b>0.357</b>	<b>0.741</b>	<b>0.907</b>
A/A o A/G				
G/G				
<b>rs2347128:</b>	<b>0.043</b>	<b>0.813</b>	<b>0.452</b>	<b>0.737</b>
C/C				
C/G				
G/G				
<b>rs3210714:</b>	<b>0.117</b>	<b>0.613</b>	<b>0.806</b>	<b>0.729</b>
G/G				
G/A				
A/A				
<b>rs4958487:</b>	<b>1.000</b>	<b>0.112</b>	<b>0.886</b>	<b>0.283</b>
A/A				
A/G				
G/G				
<b>TILs:</b>	<b>0.615</b>	<b>0.495</b>	<b>0.784</b>	<b>0.395</b>
11-100%				
0-10%				

Tabla 33: Correlación entre los polimorfismos de *SPARC* y la cantidad de TILs (\*variable estratificada) con la respuesta patológica por Miller y Payne en la axila. TILs, del inglés Tumor-Infiltrating Lymphocytes ; SNPs Del inglés Single Nucleotide Polymorphisms; P' P-valor basado en el test de log-rank.

SNPs	Triple negativo	Luminal A	Luminal B	Luminales (A+B)
	P'	P'	P'	P'
rs10065756:	0.948	0.485	0.651	0.834
C/C				
A/C				
A/A				
rs12153644:	0.951	0.967	0.915	0.990
T/T				
T/A				
A/A				
rs17718347:	0.650	0.610	0.924	0.701
T/T				
T/C				
C/C				
rs19789707:	0.374	0.203	0.964	0.546
A/A				
A/G				
G/G				
rs19789707:	0.390	0.477	1.000	0.650
A/A o A/G				
G/G				
rs2347128:	0.303	0.196	0.828	0.439
C/C				
C/G				
G/G				
rs3210714:	0.344	0.102	0.886	0.613
G/G				
G/A				
A/A				
rs4958487:	0.888	0.330	0.577	0.843
A/A				
A/G				
G/G				
TILs*	0.876	0.261	0.309	0.085
11-100%				
0-10%				

Tabla 34: Correlación entre los polimorfismos de *SPARC* y la cantidad de TILs (\*variable estratificada) con el RCB. TILs, del inglés Tumor-Infiltrating Lymphocytes; RCB Del inglés Residual Burden Cancer; SNPs Del inglés Single Nucleotide Polymorphisms; P' P-valor basado en el test de log-rank.

SNPs	Triple negativo	Luminal A	Luminal B	Luminales (A+B)
	P'	P'	P'	P'
rs10065756:	0.359	0.927	0.359	0.689
C/C				
A/C				
A/A				
rs12153644:	0.643	0.579	0.327	0.820
T/T				
T/A				
A/A				
rs17718347:	0.974	0.429	0.486	0.612
T/T				
T/C				
C/C				
rs19789707:	0.537	0.022	0.728	0.240
A/A				
A/G				
G/G				
rs19789707:	0.764	0.006	0.448	0.092
A/A o A/G				
G/G				
rs2347128:	0.168	0.160	0.966	0.470
C/C				
C/G				
G/G				
rs3210714:	0.572	0.365	0.966	0.850
G/G				
G/A				
A/A				
rs4958487:	0.680	0.802	0.066	0.319
A/A				
A/G				
G/G				
rs4958487:				
A/A o A/G	0.395	0.715	0.022	0.132
G/G				
TILs*	0.024	0.350	0.272	0.171
11-100%				
0-10%				

Tabla 35: Correlación entre los polimorfismos de *SPARC* y la cantidad de TILs (\*variable estratificada) con la SLE. TILs, del inglés Tumor-Infiltrating Lymphocytes; SNPs Del inglés Single Nucleotide Polymorphisms; SLE Supervivencia libre de evento; P' P-valor basado en el test de log-rank.

