



# Universidad de Alcalá

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

**CARACTERIZACIÓN MEDIANTE *NEXT-GENERATION SEQUENCING* DE LAS ALTERACIONES MOLECULARES QUE LLEVAN AL DESARROLLO DE LA METÁSTASIS CUTÁNEA EN EL CÁNCER DE MAMA**

TESIS DOCTORAL

***SILVIA GONZÁLEZ MARTÍNEZ***

Alcalá de Henares, 2022





# Universidad de Alcalá

Facultad de Medicina y Ciencias de la salud  
Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

**CARACTERIZACIÓN MEDIANTE *NEXT-GENERATION*  
*SEQUENCING* DE LAS ALTERACIONES MOLECULARES QUE  
LLEVAN AL DESARROLLO DE LA METÁSTASIS CUTÁNEA EN  
EL CÁNCER DE MAMA**

TESIS DOCTORAL presentada por  
**SILVIA GONZÁLEZ MARTÍNEZ**

Graduada en Biología,

Para optar al grado de Doctor

Directores de tesis:

DR. JOSÉ PALACIOS

DR. JAVIER CORTÉS

Alcalá de Henares, 2022



Esta tesis doctoral, realizada en el Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria del Hospital Ramón y Cajal de Madrid, ha sido financiada por la fundación Contigo Contra el Cáncer de la Mujer, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (PI19/01331) y CIBERONC (CB16/12/00316 y CB16/12/00449), cofinanciado por el Fondo Regional Europeo de Desarrollo. 'A way to achieve Europe' (FEDER).



## AGRADECIMIENTOS

Hace cuatro años llegué al Hospital Ramón y Cajal para realizar el doctorado. Durante este tiempo he pasado momentos muy buenos y me he llevado grandes alegrías al ver los frutos de todo el trabajo, pero también ha habido ciertas dificultades. Quiero dar las gracias a todas las personas que han estado a mi lado en todos esos momentos y han hecho posible esta tesis.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores de tesis. A Javier Cortés, por la confianza que puso en mí y la gran oportunidad que me dio para realizar la tesis doctoral en este campo y comenzar mi carrera investigadora con él, por sus palabras y apoyo. Y a Pepe Palacios, por su implicación, por abrirme las puertas de su laboratorio, por haber estado apoyándome y guiándome durante todos estos años. Gracias a los dos por todo lo que me habéis enseñado, por haber hecho que crezca mi pasión por la ciencia y mis ganas de continuar en este ámbito. Ha sido un placer y una gran suerte haber podido realizar este trabajo bajo vuestra dirección.

También quiero agradecerles a mis padres su apoyo incondicional, fundamental en toda esta etapa. Gracias por haberme ayudado a llegar hasta aquí, por todo lo que habéis hecho siempre por mí, ya que sin vosotros esto no hubiera sido posible. A Isabel, y a mis hermanas Selene y Paula por escucharme y poder contar siempre con vosotras.

Gracias a todo el laboratorio de investigación de Oncología Médica, por haberme acogido en el grupo, por haber compartido conmigo tantos buenos momentos y por el apoyo en otros no tan buenos. Gracias Cris, Jorge, Jesús, Emma, Julie, Sara, Marién, Cris P., Manu, Natalia... por todo lo compartido estos años, por vuestra generosidad, por lo que hemos crecido y aprendido juntos, y por la gran amistad con muchos de vosotros. Y a los miembros de la Unidad de mama de Oncología Médica, María, Elena, etc.

Gracias a mis compañeros de Anatomía Patológica, a Belén, a Tamara, y en especial a David, por vuestra disponibilidad y ayuda siempre que la he necesitado.

A mis amigas de siempre, Alicia, Ana, Blanca, Bea, Paola, Paula, María y Judith.

A la fundación Contigo Contra el Cáncer de la Mujer y a las pacientes, mil gracias por colaborar desinteresadamente, sin su aportación este trabajo no hubiera sido posible.



*A mis padres y hermanas*

*“Nada en este mundo debe ser temido, solo entendido...  
Ahora es el momento de comprender más, para que podamos temer menos”*

*Marie Curie*



## RESUMEN

El cáncer de mama (CM), la principal causa de muerte en las mujeres de entre 25 y 55 años, es una enfermedad heterogénea a nivel molecular, con diferentes patrones de expresión genética que conducen a un comportamiento y a un pronóstico distinto. Existe una clasificación molecular subrogada que distingue cuatro fenotipos moleculares de CM: luminal A-like, luminal B-like (HER2- y HER2+), HER2+ (no luminal) y triple negativo (TN).

El CM es el tumor que más frecuentemente metastatiza a piel en mujeres. Estas metástasis cutáneas (MC) están presentes en alrededor del 24% de los pacientes con CM metastásico e indican un estadio incurable de la enfermedad. El propósito del tratamiento en esta fase es aliviar los síntomas, mejorar la calidad de vida y retrasar el crecimiento del cáncer. Dado su mal pronóstico, el desarrollo de nuevas estrategias de manejo para la MC es un desafío clínico importante. Para avanzar en este campo, se necesita un mejor conocimiento de las alteraciones moleculares implicadas en el proceso metastásico.

El presente estudio tiene como objetivos principales analizar las características clinicopatológicas de los CM que desarrollan MC, comparar las diferencias moleculares entre tumores primarios de la mama y sus MC y determinar si el perfil molecular de los tumores primarios TN difiere según su patrón metastásico. Para ello estudiamos dos series de CM, (1) una serie de tumores primarios y sus MC y (2) otra serie constituida de tumores primarios TN con y sin metástasis en distintas localizaciones.

Se revisaron las características clinicopatológicas de las pacientes y se realizaron estudios inmunohistoquímicos y de hibridación in situ fluorescente. Además, mediante secuenciación masiva se hizo una caracterización molecular secuenciando un panel de genes específico de CM en los tumores primarios y MC de la serie 1, mientras que en la serie 2 se secuenció el exoma completo de los tumores primarios TN.

En la serie 1, se observó que el fenotipo molecular de CM con más riesgo de metastatizar a piel fue el TN. Se encontró un cambio de fenotipo tumoral en las metástasis en el 15% de los pacientes. En los tumores primarios las alteraciones moleculares más frecuentes fueron mutaciones en *TP53* (47%) y *PIK3CA* (39%), y amplificaciones en *MYC* (15%) y *MDM4* (11,8%). El 48,5% de las MC presentó alguna alteración molecular adicional respecto a los tumores primarios, siendo las amplificaciones en *MYC* y *MDM4* y las mutaciones en *PIK3CA* las más comunes, pero observándose también mutaciones adicionales de *TP53* y *KRAS*, entre otras. Sin embargo, no se observó un patrón mutacional característico relacionado con la progresión del tumor y el desarrollo de MC. En esta serie, la supervivencia se relacionó con el fenotipo tumoral y las mutaciones en *TP53*.

En la serie 2, el gen mutado con mayor frecuencia fue *TP53* en todos los grupos, aunque la frecuencia de mutación de este gen fue mayor en los tumores primarios TN que desarrollaron MC que en los que no desarrollaron ningún tipo de metástasis o desarrollaron otras. En cambio, *PIK3CA* estaba mutado con mayor frecuencia en tumores primarios TN sin MC que en los que desarrollaron MC. Sin embargo, la frecuencia fue mayor en los que desarrollaron MC que en los que desarrollaron otras metástasis.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>25</b>
1.1 CÁNCER DE MAMA.....	25
1.1.1 Incidencia .....	25
1.1.2 Etiología .....	26
1.1.3 Clasificación morfológica del cáncer de mama: Tipos histológicos .....	27
1.1.4 Clasificación molecular basada en perfiles de expresión genética .....	29
1.1.4.1 Luminal A, B .....	30
1.1.4.2 HER2 enriquecido .....	31
1.1.4.3 Basal (Basal-like).....	31
1.1.5 Clasificación molecular subrogada.....	35
1.1.6 Factores pronósticos y predictivos .....	37
1.1.6.1 Estadificación clinicopatológica .....	37
1.1.6.2 Grado histológico .....	38
1.1.6.3 Expresión de receptores de hormonas .....	38
1.1.6.4 Expresión y amplificación de HER2 .....	39
1.1.6.5 Índice proliferativo Ki67.....	40
1.1.6.6 Expresión de receptores de andrógenos .....	40
1.1.6.7 Firmas de expresión genéticas.....	41
1.1.7 Metástasis en cáncer de mama .....	42
1.1.8 Metástasis cutánea en cáncer de mama .....	42
1.1.8.1 Epidemiología, incidencia, pronóstico de la metástasis cutánea en cáncer de mama.....	43
1.1.8.2 Diagnóstico diferencial de metástasis cutánea de origen mamario.....	46
1.1.9 Alteraciones moleculares.....	48
1.1.9.1 Cáncer de mama metastásico.....	48
1.1.10 Tratamiento de metástasis cutánea en cáncer de mama.....	50
1.2 NEXT-GENERATION SEQUENCING .....	51
1.2.1 Descripción.....	51
1.2.2 Métodos .....	52
1.2.2.1 Secuenciadores.....	52
1.2.2.2 Librerías .....	54
1.2.3 Next-Generation Sequencing y cáncer de mama .....	55
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>59</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>63</b>
3.1 SELECCIÓN DE PACIENTES .....	63
3.1.1 Selección de las muestras de estudio .....	63
3.1.2 Características clinicopatológicas y de seguimiento clínico.....	64
3.2 DESARROLLO DE UN MICROARRAY TISULAR .....	65
3.3 SECUENCIACIÓN MASIVA .....	66
3.3.1 Disección tumoral .....	66
3.3.2 Purificación de ADN genómico de tejidos fijados con formalina e incluidos en parafina .....	66
3.3.3 Cuantificación de las muestras de ADN.....	68
3.3.4 Secuenciación dirigida .....	68
3.3.4.1 Diseño de panel de genes.....	68
3.3.4.2 Creación de librerías .....	69
3.3.4.3 Secuenciación con Ion Torrent S5.....	74
3.3.5 Secuenciación de exoma completo .....	75
3.3.5.1 Creación de librerías .....	75

3.3.5.2 Secuenciación con NovaSeq de Illumina .....	79
3.3.6 <i>Análisis bioinformático</i> .....	79
3.4 VALIDACIONES DE MUTACIONES .....	83
3.4.1 <i>Secuenciación Sanger para validación de mutaciones</i> .....	83
3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	83
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>87</b>
SERIE 1 .....	87
4.1. CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS E INMUNOFENOTÍPICAS .....	87
4.1.1 <i>Características clinicopatológicas</i> .....	88
4.1.2 <i>Fenotipos moleculares</i> .....	92
4.1.2.1 Distribución de fenotipos en los tumores primarios y en las metástasis cutáneas en función de la localización de la metástasis .....	93
4.1.2.2 Conversión de fenotipo entre tumor primario y metástasis cutánea .....	94
4.1.3 <i>Receptores de andrógenos en casos triple negativos</i> .....	95
4.1.4 <i>Inmunohistoquímica de p53 mediante TMA</i> .....	95
4.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR .....	96
4.2.1 <i>Alteraciones moleculares en tumores primarios y metástasis cutáneas</i> .....	96
4.2.1.1 Distribución de mutaciones entre las distintas muestras y fenotipos .....	96
4.2.1.2 Alteraciones moleculares en los tumores primarios .....	100
4.2.1.3 Alteraciones moleculares en las metástasis cutáneas .....	101
4.2.1.4 Validación de resultados de NGS .....	109
4.2.2 <i>Análisis de supervivencia</i> .....	113
SERIE 2 .....	115
4.3 CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS E INMUNOFENOTÍPICAS .....	115
4.3.1 <i>Características clinicopatológicas</i> .....	116
4.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR .....	120
4.4.1 <i>Mutaciones en tumores primarios triple negativo de pacientes metastásicas y no metastásicas</i> .....	120
4.4.1.1 Frecuencias de mutación en pacientes sin metástasis versus pacientes metastásicas .....	122
4.4.2 <i>Mutaciones en los tumores primarios triple negativo en 3 grupos de estudio</i> .....	123
4.4.2.1 Tumores primarios triple negativo con metástasis cutáneas versus sin metástasis y versus otras metástasis .....	125
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>129</b>
5.1 ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS DE LOS CARCINOMAS DE MAMA QUE DESARROLLAN METÁSTASIS CUTÁNEA .....	129
5.2 DIFERENCIAS MOLECULARES ENTRE TUMORES PRIMARIOS Y SUS METÁSTASIS CUTÁNEAS .....	134
5.2.1 <i>Tumores primarios</i> .....	135
5.2.2 <i>Metástasis cutáneas</i> .....	136
5.2.3 <i>Alteraciones moleculares adicionales en las metástasis cutáneas</i> .....	142
5.2.4 <i>Implicaciones terapéuticas</i> .....	144
5.2.5 <i>Pronóstico</i> .....	145
5.3 RELACIÓN ENTRE EL PERFIL MOLECULAR DE LOS TUMORES PRIMARIOS TRIPLE NEGATIVO Y SU PATRÓN METASTÁSICO .....	146
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>153</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>157</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>173</b>
ANEXO I: TABLAS SUPLEMENTARIAS .....	173

ANEXO II: FIGURAS SUPLEMENTARIAS .....	189
ANEXO III: LISTADO DE PUBLICACIONES.....	197
ANEXO IV: PUBLICACIONES RELACIONADAS CON ESTE TRABAJO .....	198





## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. ALTERACIONES MOLECULARES DE LOS DIFERENTES TIPOS MOLECULARES DE CÁNCER DE MAMA DE LA COLECCIÓN DEL TCGA.....	34
TABLA 2. CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS Y PRONÓSTICAS.....	34
TABLA 3. DEFINICIÓN DE LOS FENOTIPOS MOLECULARES SUBROGADOS SEGÚN EL CONSENSO DE ST GALLEN.....	36
TABLA 4. CONDICIONES APLICADAS PARA LA FRAGMENTACIÓN MECÁNICA.....	70
TABLA 5. PROGRAMA PARA LA UNIÓN DE ADAPTADORES Y <i>BARCODES</i> .....	71
TABLA 6. PROGRAMA PARA AMPLIFICACIÓN DE LIBRERÍAS.....	71
TABLA 7. PROGRAMA PARA LA HIBRIDACIÓN.....	72
TABLA 8. PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN DE LIBRERÍA FINAL.....	73
TABLA 9. PROGRAMA PARA LA AMPLIFICACIÓN PREHIBRIDACIÓN.....	76
TABLA 10. PROGRAMA PARA LA AMPLIFICACIÓN E INDEXACIÓN.....	77
TABLA 11. CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS DE LA SERIE 1.....	90
TABLA 12. DISTRIBUCIÓN DE FENOTIPOS SEGÚN LOCALIZACIÓN DE LA METÁSTASIS CUTÁNEA.....	94
TABLA 13. CAMBIO FENOTIPO ENTRE PRIMARIO Y METÁSTASIS.....	95
TABLA 14. DISTRIBUCIÓN DE MUESTRAS SEGÚN FENOTIPO MOLECULAR.....	96
TABLA 15. CONCORDANCIA EN AMPLIFICACIÓN DE HER2 MEDIANTE FISH Y LAS HERRAMIENTAS CONTRA Y KIT CNV.....	97
TABLA 16. ALTERACIONES MOLECULARES EN LOS GENES MÁS AFECTADOS EN LOS TUMORES PRIMARIOS SEGÚN FENOTIPO MOLECULAR.....	100
TABLA 17. ALTERACIONES MOLECULARES EN LOS GENES MÁS AFECTADOS EN LAS METÁSTASIS CUTÁNEAS SEGÚN FENOTIPO MOLECULAR.....	103
TABLA 18. ALTERACIONES MOLECULARES EN TUMORES PRIMARIOS Y SUS CORRESPONDIENTES METÁSTASIS CUTÁNEAS.....	106
TABLA 19. MUTACIONES Y CNVS ADICIONALES EN LAS METÁSTASIS CUTÁNEAS DE LOS CASOS PAREADOS.....	108
TABLA 20. MUTACIONES GERMINALES DE LOS CASOS PAREADOS.....	112
TABLA 21. CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS DE LA SERIE 2.....	118
TABLA 22. FRECUENCIAS DE MUTACIÓN EN TUMORES QUE DESARROLLARON METÁSTASIS CUTÁNEA, SIN METÁSTASIS Y OTRAS METÁSTASIS.....	125
TABLA 23. EDADES AGRUPADAS EN RANGOS DE NUESTRA SERIE FRENTE A LA DE LA REVISIÓN DE JOHNSON Y COL. ....	130
TABLA 24. DISTRIBUCIÓN DE FENOTIPOS MOLECULARES EN LOS CASOS DE CÁNCER DE MAMA CON METÁSTASIS CUTÁNEA DE CADA SERIE.....	131
TABLA 25. CONVERSIÓN DE RECEPTORES DE HORMONAS Y HER2 ENTRE TUMORES PRIMARIOS Y METÁSTASIS DE NUESTRA SERIE Y DE GEICAM.....	134

TABLA 26. FRECUENCIAS DE AMPLIFICACIÓN DE <i>CCND1</i> , <i>MYC</i> , <i>FGFR1</i> Y <i>MDM4</i> EN MUESTRAS DE TUMORES PRIMARIOS DE NUESTRA SERIE Y DE OTRAS PUBLICADAS.....	<b>136</b>
TABLA 27. FRECUENCIAS DE MUTACIÓN EN LAS METÁSTASIS CUTÁNEAS DE NUESTRA SERIE FRENTE A OTRAS PUBLICADAS.....	<b>137</b>
TABLA 28. DISTRIBUCIÓN DE LOS CASOS DE METÁSTASIS CUTÁNEA DE NUESTRA SERIE Y DE OTRAS PUBLICADAS .....	<b>138</b>
TABLA 29. FRECUENCIAS DE MUTACIÓN EN MUESTRAS CON FENOTIPO RH+HER2- DE LA SERIE 1 Y UNA SERIE DE CBIOPORTAL .....	<b>139</b>
TABLA 30. FRECUENCIAS DE AMPLIFICACIÓN DE <i>CCND1</i> , <i>MYC</i> , <i>FGFR1</i> Y <i>MDM4</i> EN MUESTRAS DE METÁSTASIS DE NUESTRA SERIE Y DE OTRAS PUBLICADAS.....	<b>141</b>
TABLA 31. MUTACIONES ADICIONALES EN METÁSTASIS CUTÁNEAS DE CASOS PAREADOS NO ENCONTRADAS EN TUMORES PRIMARIOS.....	<b>143</b>
TABLA 32. FRECUENCIAS DE MUTACIÓN EN TUMORES PRIMARIOS TRIPLE NEGATIVO DE NUESTRA SERIE Y LOS TUMORES DE METABRIC .....	<b>149</b>

#### TABLAS SUPLEMENTARIAS

TABLA SUPLEMENTARIA 1. LISTADO DE GENES MUTADOS CON MAYOR FRECUENCIA EN METABRIC .....	<b>173</b>
TABLA SUPLEMENTARIA 2. LISTADO DE PRIMERS PARA VALIDACIÓN DE MUTACIONES POR SANGER .....	<b>174</b>
TABLA SUPLEMENTARIA 3. MUESTRAS DE LA SERIE 1.....	<b>174</b>
TABLA SUPLEMENTARIA 4. INMUNOHISTOQUÍMICA DE P53 VS MUTACIÓN EN <i>TP53</i> MEDIANTE NGS Y AMPLIFICACIONES POR FISH.....	<b>177</b>
TABLA SUPLEMENTARIA 5. AMPLIFICACIONES Y DELECCIONES DE 8 REGIONES EN LA SERIE 1 ENCONTRADAS MEDIANTE KIT CNV .....	<b>179</b>
TABLA SUPLEMENTARIA 6. AMPLIFICACIONES Y DELECCIONES DE 8 REGIONES EN LA SERIE 1 ENCONTRADAS MEDIANTE CONTRA.....	<b>181</b>
TABLA SUPLEMENTARIA 7. MUTACIONES Y CNVS EN ALGUNOS DE LOS GENES MÁS RELEVANTES .....	<b>185</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTACIÓN DE ALGUNOS DE LOS SUBTIPOS HISTOLÓGICOS DE CÁNCER DE MAMA.....	28
FIGURA 2. CARCINOMA LOBULILLAR INFILTRANTE Y PÉRDIDA DE LA MOLÉCULA DE ADHESIÓN CELULAR EPITELIAL E-CADHERINA .....	29
FIGURA 3. REPRESENTACIÓN DE GRADOS HISTOLÓGICOS 1 Y 3.....	38
FIGURA 4. PRESENTACIONES CLÍNICAS DE LAS METÁSTASIS CUTÁNEAS .....	46
FIGURA 5. REPRESENTACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GATA3.....	47
FIGURA 6. REPRESENTACIÓN DE LA EXPRESIÓN SOX10.....	48
FIGURA 7. MICROARRRAY TISULAR.....	66
FIGURA 8. VISUALIZACIÓN DE LA INTENSIDAD DE LAS MUESTRAS EN TAPESTATION 2200	72
FIGURA 9. RESUMEN DEL RUN .....	75
FIGURA 10. CREACIÓN DE LIBRERÍAS.....	78
FIGURA 11. ESQUEMA DEL PIPELINE USADO PARA EL ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO .....	81
FIGURA 12. DIAGRAMA DE PACIENTES Y MUESTRAS DE LA SERIE 1 DEL ESTUDIO.....	87
FIGURA 13. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA DISTRIBUCIÓN DE TIPOS HISTOLÓGICOS EN LA SERIE 1.....	89
FIGURA 14. DIAGRAMA DE CASOS DE LA SERIE 1 AGRUPADOS SEGÚN FENOTIPO MOLECULAR.....	92
FIGURA 15. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA DISTRIBUCIÓN DE LOS DIFERENTES FENOTIPOS EN LOS CARCINOMAS PRIMARIOS DE LA SERIE 1 .....	93
FIGURA 16. DISTRIBUCIÓN DE LAS ALTERACIONES ENTRE LAS MUESTRAS.....	99
FIGURA 17. TIPO Y FRECUENCIA DE MUTACIÓN EN TUMORES PRIMARIOS VERSUS METÁSTASIS CUTÁNEAS.....	102
FIGURA 18. DISTRIBUCIÓN DE MUTACIONES Y CNVS EN LOS CASOS PAREADOS .....	105
FIGURA 19. HEMATOXILINA Y FISH DE <i>FGFR1</i> .....	109
FIGURA 20. MUTACIONES VERIFICADAS POR SANGER EN <i>TP53</i> Y <i>PIK3CA</i> .....	110
FIGURA 21. MUTACIONES SOMÁTICAS EN <i>ERBB2</i> EN IGV Y VERIFICADAS POR SANGER EN CASO PAREADO.....	111
FIGURA 22. VALIDACIÓN DE MUTACIÓN GERMINAL I654V EN EL GEN <i>ERBB2</i> .....	112
FIGURA 23. SUPERVIVENCIA GLOBAL SEGÚN DIFERENTES VARIABLES CON DIFERENCIA ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA .....	114
FIGURA 24. DIAGRAMA DE PACIENTES Y MUESTRAS DE LA SERIE 2 DEL ESTUDIO.....	115
FIGURA 25. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA DISTRIBUCIÓN DE TIPOS HISTOLÓGICOS EN LA SERIE 2.....	117
FIGURA 26. DISTRIBUCIÓN DE MUTACIONES ENTRE LOS GRUPOS DE PACIENTES CON METÁSTASIS Y SIN METÁSTASIS .....	121

FIGURA 27. FRECUENCIAS DE MUTACIÓN DE LOS GENES ALTERADOS EN LAS PACIENTES NO METASTÁSICAS VERSUS LAS PACIENTES METASTÁSICAS.....	<b>122</b>
FIGURA 28. DISTRIBUCIÓN DE MUTACIONES ENTRE LOS TUMORES PRIMARIOS TRIPLE NEGATIVO CON METÁSTASIS CUTÁNEAS, OTRAS METÁSTASIS Y SIN METÁSTASIS.....	<b>124</b>
FIGURA 29. CASOS DE CÁNCER DE MAMA HER2 EN EL HOSPITAL RAMÓN Y CAJAL Y A NIVEL NACIONAL EN ESPAÑA SEGÚN LA SEAP.....	<b>132</b>
FIGURA 30. ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LAS METÁSTASIS CUTÁNEAS... ..	<b>145</b>

**FIGURAS SUPLEMENTARIAS**

FIGURA SUPLEMENTARIA 1. RESUMEN DE TUMORES PRIMARIOS Y METÁSTASIS CUTÁNEAS	<b>190</b>
FIGURA SUPLEMENTARIA 2. MUTACIONES COCURRENTES O MUTUAMENTE EXCLUYENTES EN LOS TUMORES PRIMARIOS Y EN LAS METÁSTASIS CUTÁNEAS.....	<b>191</b>
FIGURA SUPLEMENTARIA 3. ALTERACIONES EN RUTAS DE SEÑALIZACIÓN EN LOS TUMORES PRIMARIOS Y METÁSTASIS CUTÁNEAS.....	<b>192</b>
FIGURA SUPLEMENTARIA 4. TIPO Y FRECUENCIA DE MUTACIONES EN LOS TUMORES PRIMARIOS TRIPLE NEGATIVO.....	<b>194</b>
FIGURA SUPLEMENTARIA 5. MUTACIONES COCURRENTES O MUTUAMENTE EXCLUYENTES EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO NO METASTÁSICO Y METASTÁSICO.....	<b>195</b>
FIGURA SUPLEMENTARIA 6. ALTERACIONES EN RUTAS DE SEÑALIZACIÓN EN LOS TUMORES PRIMARIOS TRIPLE NEGATIVO.....	<b>196</b>

## ABREVIATURAS

CM	Cáncer de mama
OMS	Organización Mundial de la Salud
TN	Triple negativo
RE	Receptores de estrógenos
RP	Receptores de progesterona
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
RH	Receptores de hormonas
NOS	Carcinomas de tipo no especial
CLI	Carcinoma lobulillar invasivo
CK	Citoqueratinas
CLIS	Carcinoma lobulillar in situ
TCGA	The Cancer Genome Atlas
GRB7	Receptor del factor de crecimiento 7
EGFR	Receptor 1 del factor de crecimiento epidérmico humano
PD-L1	Ligando 1 de muerte programada
BL1	Basal 1
BL2	Basal 2
M	Mesenquimal
LAR	Luminal receptor de andrógenos
BLIS	Basal-like inmunosuprimido
BLIA	Basal-like inmunoactivado
TEM	Transición epitelio-mesénquima
IHC	Inmunohistoquímica
AJCC	American Joint Committee of Cancer
UICC	Unión Internacional Contra el Cáncer
ESMO	European Society for Medical Oncology
ASCO	American Society of Clinical Oncology

NCCN	National Comprehensive Cancer Network
RA	Receptor de andrógenos
EGTM	The European Group of Tumor Markers
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
EMA	Agencia Europea de Medicamentos
TILs	Linfocitos tumorales infiltrantes
PD-1	Proteína programada 1
CTLA-4	T-linfocito-asociada citotóxica 4
MC	Metástasis cutáneas
FTT-1	Factor de transcripción tiroideo-1
u-MUC1	MUC1 subglicosilado
sLe x	Sialil Lewis x
ECT	Electroquimioterapia
NGS	Next-generation sequencing
PGM™	Ion Personal Genome Machine™
PacBio	Pacific Biosciences
SMRT	Singe Molecule Real Time
ZMW	Zero-mode waveguide
CAP	College of American Pathologists
FISH	Hibridación fluorescente in situ
TMA	Microarray tisular
GMAF	Frecuencia global de alelos menores
CNVs	Variación en el número de copias
pT	Tamaño del tumor
SNP	Polimorfismo de nucleótido único
TMB	Tumor mutational burden
VS.	Versus
Y COL.	Y colaboradores
SEAP	Sociedad Española de Anatomía Patológica

# INTRODUCCIÓN

---





## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 CÁNCER DE MAMA

#### 1.1.1 Incidencia

El cáncer de mama (CM) es el carcinoma más común entre las mujeres, la principal causa de muerte en este grupo entre 25 y 55 años (SESPM, 2021) y según un informe reciente de la Organización Mundial de la Salud (OMS), es el cáncer más común del mundo con una estimación de 2,3 millones de diagnósticos en 2020 (un 11,7% del total de cánceres), superando al cáncer de pulmón («The Global Cancer Observatory», 2020). Se estima que el riesgo de padecer CM a lo largo de la vida es de aproximadamente, 1 de cada 8 mujeres (AECC, 2018). De todos los carcinomas de mama, menos del 1% se diagnostican en hombres, estos tumores tienen similitudes con los carcinomas femeninos, pero en los hombres la patología tiene un perfil propio que la hace única (Abdelwahab Yousef, 2017).

En cuanto a la prevalencia de este tipo de tumor, varía mucho según la región geográfica. Las zonas que tienen mayor porcentaje de casos son Australia, Europa y Norteamérica, donde el 6% de las mujeres desarrollan CM invasivo antes de los 75 años. Por el contrario, en países menos desarrollados, como en África subsahariana o en el este de Asia, la incidencia es menor (WHO Classification of Tumours Editorial Board et al., 2019).

En España los casos de CM han ido aumentando en las últimas décadas, esto se debe a un aumento de la población, al desarrollo de nuevas técnicas para la detección precoz del cáncer y al aumento de la esperanza de vida. Según los últimos datos publicados por la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN), en el año 2020 se diagnosticaron 32.953 casos nuevos de CM, lo que supone el 11,9% del total de cánceres (REDECAN, 2020).

### 1.1.2 Etiología

El origen del CM es multifactorial. Se trata, en la mayoría de los casos, de un carcinoma esporádico, en ocasiones asociado al estilo de vida y a las condiciones ambientales (WHO Classification of Tumours Editorial Board et al., 2019). La edad es un factor de riesgo muy relevante; de hecho, el riesgo de desarrollar CM aumenta proporcionalmente con los años; así, se desarrolla con mayor frecuencia en mujeres cerca de la menopausia y significativamente con menos frecuencia en mujeres menores de 45 años (Kamińska et al., 2015), aunque tiende a ser más agresivo cuando se presenta en mujeres jóvenes (Anders et al., 2009). El consumo de bebidas alcohólicas, la obesidad, la falta de actividad física y la terapia hormonal son otros factores ambientales importantes que aumentan el riesgo de padecer esta enfermedad (Kamińska et al., 2015). El tratamiento hormonal sustitutivo también es un factor de riesgo, dado que las pacientes que lo han recibido tras la menopausia durante al menos 10 años tienen un incremento significativo de tener CM (Poggio et al., 2022; Yoo et al., 2020).

En un grupo de pacientes con CM existe predisposición genética. Los dos genes clásicamente descritos con alta penetrancia, *BRCA1* y *BRCA2*, incrementan el riesgo de padecer este tumor entre 4 y 6 veces respecto a la población general. Mutaciones germinales en *BRCA1* se asocian con alto riesgo de padecer CM triple negativo (TN) (ausencia de expresión de receptores de estrógenos (RE), receptores de progesterona (RP) y receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2)), en cambio mutaciones germinales en *BRCA2* están asociadas con CM receptores de hormonas (RH) positivos. Estos genes se relacionan con una probabilidad de padecer CM a lo largo de la vida de un 60-80%; sin embargo, las alteraciones en estos dos genes únicamente justifica el 30% de los carcinomas familiares (Kamińska et al., 2015; Mavaddat et al., 2010; WHO Classification of Tumours Editorial Board et al., 2019). Otro gen que cada vez se está considerando más como gen de alta susceptibilidad para CM

es *PALB2* (Antoniou et al., 2014). Además, el CM puede relacionarse con alteraciones moleculares en otros genes de media penetrancia como *TP53*, *PTEN*, *STK11*, *ATM*, o *CHEK2* (Mavaddat et al., 2010; WHO Classification of Tumours Editorial Board et al., 2019). De hecho, existen síndromes genéticos con alteraciones en estos genes en los que se ve aumentada la susceptibilidad al CM, por ejemplo, síndrome Cowden (alteración en *PTEN*), síndrome Li-Fraumeni (alteración en *TP53*) o síndrome Peutz-Jeghers (alteración en *STK11*) (WHO Classification of Tumours Editorial Board et al., 2019).

### 1.1.3 Clasificación morfológica del cáncer de mama: Tipos histológicos

La mayor parte de los CM son carcinomas infiltrantes de tipo no especial (NOS), siendo una minoría, aproximadamente un 20%, los subtipos histológicos especiales. En la última edición de la OMS (WHO Classification of Tumours Editorial Board et al., 2019) se reconocen distintos tipos especiales como el carcinoma lobulillar infiltrante (CLI), el carcinoma tubular, el carcinoma cribiforme o el carcinoma mucinoso, entre los que suelen expresar receptores hormonales, o el carcinoma metaplásico entre los que no los expresan.

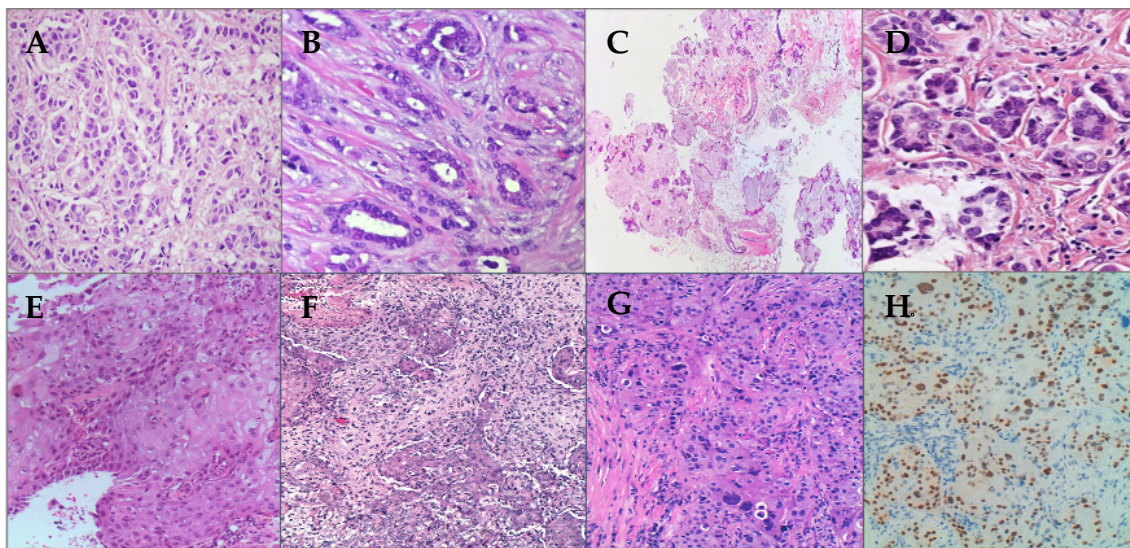
Los distintos tipos muestran características fenotípicas e inmunofenotípicas diferentes, así como distintas alteraciones moleculares; por ello cada tipo tiene características biológicas y pronósticas distintas. Por ejemplo, los carcinomas tubulares, que muestran una expresión de RE elevada, Ki67 bajo y negatividad para el HER2, tienen un buen pronóstico, mientras que otros, como los carcinomas metaplásicos, son característicamente TN, expresan citoqueratinas (CK) basales de alto peso molecular (CK5/6, CK14, CK17) y se comportan como tumores muy agresivos con mal pronóstico (WHO Classification of Tumours Editorial Board et al., 2019). (Fig. 1)

También existen subtipos especiales que se caracterizan por alteraciones moleculares específicas, como ocurre con los CLI. Estos tumores muestran pérdida de la molécula de adhesión celular epitelial E-cadherina, codificada por el gen *CDH1*. Se han

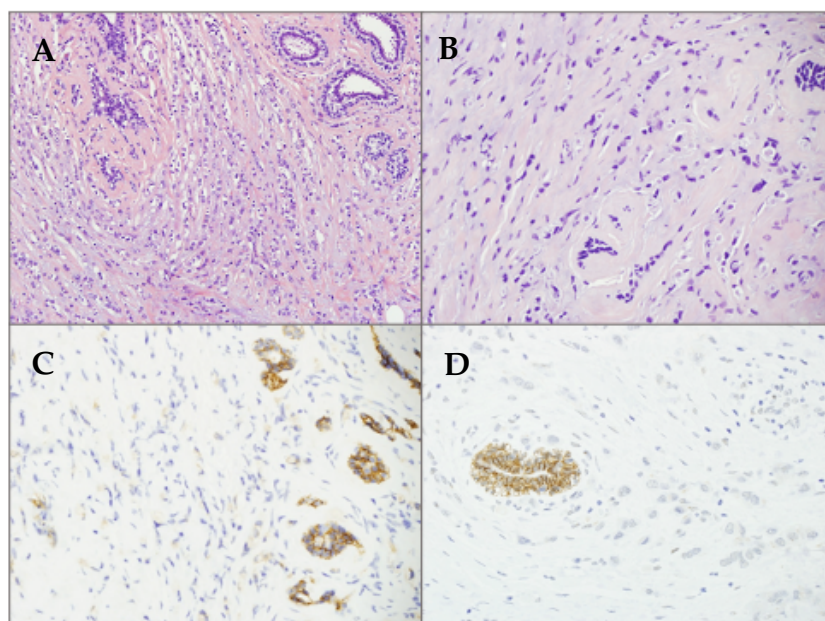
descrito mutaciones en este gen en todos los subtipos de CLI, con la pérdida asociada de expresión de E-cadherina (Dabbs et al., 2013; Pizarro et al., 1994).

Entre el 50% y el 60% de los casos de CLI presentan pérdida de función del gen; además, este evento se suele observar en el carcinoma lobulillar in situ (CLIS), por lo que se cree que esta mutación es un evento temprano en este tipo de tumores. Las mutaciones en *CDH1*, suelen ir acompañadas de la pérdida de 16q, donde se encuentra. Así, se produce una pérdida completa de E-cadherina, lo que confiere la característica morfológica altamente no cohesiva de este tipo de tumor (Ciriello et al., 2015). (Fig. 2)

**FIGURA 1. REPRESENTACIÓN DE ALGUNOS DE LOS SUBTIPOS HISTOLÓGICOS DE CÁNCER DE MAMA**



**A.** Carcinoma infiltrante NOS. **B.** Carcinoma tubular. **C.** Carcinoma mucinoso. **D.** Carcinoma micropapilar infiltrante. **E.** Carcinoma metaplásico de células escamosas. **F.** Carcinoma metaplásico productor de matriz condroide. **G.** Carcinoma apocrino. **H.** Receptores de andrógenos de carcinoma apocrino.

**FIGURA 2. CARCINOMA LOBULILLAR INFILTRANTE Y PÉRDIDA DE LA MOLÉCULA DE ADHESIÓN CELULAR EPITELIAL E-CADHERINA**

**A y B.** Carcinoma lobulillar infiltrante clásico. **C y D.** Tinción de E-cadherina en carcinoma lobulillar infiltrante (el tumor pierde la tinción y el ducto normal la conserva).

**1.1.4 Clasificación molecular basada en perfiles de expresión genética**

El CM es heterogéneo a nivel molecular, con diferentes patrones de expresión genética que conducen a un comportamiento y a un pronóstico distinto.

Perou y col. (Perou et al., 2000) demostraron mediante estudios de expresión genética que los tumores se podían dividir en dos grupos dependiendo de la positividad o negatividad para RE, y que existían subgrupos adicionales secundarios más pequeños. Estudios posteriores (Parker et al., 2009; Z. Hu et al., 2006; Rouzier et al., 2005; van 't Veer et al., 2002; Sørlie et al., 2001) confirmaron la existencia de estos grupos moleculares y han mejorado y demostrado la validez clínica de la clasificación. Además, en el 2012 el consorcio The Cancer Genome Atlas (TCGA) demostró con su estudio que los grupos intrínsecos luminal A, luminal B, HER2 y basal recapitulaban la diversidad biológica en CM (Cancer Genome Atlas Network, 2012).

A continuación, se describen las características moleculares según TCGA y según técnicas de expresión, así como el pronóstico de cada subtipo molecular intrínseco.

### 1.1.4.1 Luminal A, B

Los carcinomas luminales de mama se caracterizan por la expresión del gen de RE, en general, el 70-75% de los CM expresan RE y el 60-70% coexpresan RP (Manni et al., 1980). Además, los carcinomas luminales expresan genes (*LIV1* y *CCND1*) y queratinas de bajo peso molecular, similares al epitelio luminal de los conductos mamarios (Perou et al., 2000; Sotiriou et al., 2003).

-Luminal A. Este grupo se caracteriza por una alta expresión de RE sin expresión de HER2. Además, suelen presentar una alta expresión de *PgR*, *GATA*, *BCL2*, *CK8*, *CK18*, *BCL-2*, proteína de unión X-box, factor de trébol 3, factor nuclear de hepatocitos 3a, *LIV1* regulado por estrógenos, *ERBB3* y *ERBB4* (Badowska-Kozakiewicz & Budzik, 2016). Este subtipo tiene el mejor pronóstico desde un punto de vista biológico y menor tasa de recaídas. Además, la posibilidad de tratamiento endocrino mejora las posibilidades terapéuticas. Por otro lado, muestran menor respuesta a la quimioterapia tanto adyuvante como neoadyuvante (Ring et al., 2004). Las metástasis óseas son las más frecuentes en este subtipo y presenta mayor supervivencia en caso de recaída (Coleman, 1997; Lipton, 2003).

- Luminal B. Este tipo incluye tumores que expresan RE, pero se caracteriza por una baja expresión de *PgR* y una mayor tasa de expresión de genes relacionados con el ciclo celular y la proliferación. Dentro de este, hay un subgrupo que expresa HER2 (Badowska-Kozakiewicz & Budzik, 2016). Son tumores luminales de peor comportamiento biológico. A diferencia del subtipo luminal A, la tasa de metástasis viscerales es mayor y la supervivencia desde el diagnóstico de la recidiva es menor. Desde un punto de vista conceptual, pueden beneficiarse de la quimioterapia, del tratamiento hormonal y, en caso de sobreexpresar HER2, también de tratamiento

dirigido contra esta proteína (WHO Classification of Tumours Editorial Board et al., 2019).

#### **1.1.4.2 HER2 enriquecido**

El carcinoma de mama HER2+ “puro” o enriquecido con HER2, que constituye el 10-15% de los CM, muestra amplificación en el cromosoma 17 y por tanto sobreexpresión de genes como *ERBB2* o proteína unida al receptor del factor de crecimiento 7 (*GRB7*) (Malhotra et al., 2010; Sørlie et al., 2001; Perou et al., 2000; Fukushige et al., 1986). Además, se caracteriza por no expresar RE y sobreexpresar genes de proliferación (Perou et al., 2000). También suele asociarse con otros marcadores de mal pronóstico, incluidas alteraciones de genes como *TOP2A*, que codifica los genes de la topoisomerasa II alfa, *GATA4* y genes relacionados con la angiogénesis (Arrechea Irigoyen et al., 2011).

Este subgrupo tiene mal pronóstico desde un punto de vista biológico; además, es resistente a la terapia hormonal debido a la ausencia de RHs. Por el contrario, los tratamientos basados en anticuerpos monoclonales como trastuzumab o pertuzumab, inhibidores tirosin-quinasa como lapatinib o tucatinib u otros grupos de fármacos como el trastuzumab emtansia (T-DM1) o el trastuzumab deruxtecan (T-DXd), producen una mejora significativa de supervivencia en los pacientes. Además, este subtipo muestra buena respuesta a tratamiento con quimioterapia que incluya antraciclinas y/o taxanos y un patrón excelente de respuesta a la terapia sistémica primaria (Chang, 2010; Gutierrez & Schiff, 2011; Payne et al., 2008; Vu & Claret, 2012; Wright, 2012).

#### **1.1.4.3 Basal (Basal-like)**

Se incluye dentro de los tumores TN, que suponen el 15-20% de los CM (Malhotra et al., 2010; Perou et al., 2000; Sørlie et al., 2001). Se caracteriza por la sobreexpresión de genes propios de las células basales/mioepiteliales como

citoqueratinas de alto peso molecular (CK5, CK17, etc.), c-kit, factores de crecimiento de hepatocitos e insulina, calponina 1, caveolina y laminina. Además, en estos tumores también existen alteraciones de los genes de reparación del ADN, se asocian con mutaciones en *BRCA1* y sobreexpresión del receptor 1 del factor de crecimiento epidérmico humano (*EGFR*).

Este subtipo presenta el comportamiento más agresivo a pesar de su alta sensibilidad a la quimioterapia basada en antraciclinas y taxanos, aunque se distinguen tumores TN con distinta morfología y pronóstico, como por ejemplo, carcinomas medulares, metaplásicos o secretores (Arrechea Irigoyen et al., 2011). Los tumores que presentan alteraciones en *BRCA1* responden a las sales de platino, pero las respuestas pueden durar poco tiempo. Recientemente se ha aprobado el uso de la terapia combinada del quimioterapéutico nab-paclitaxel (Abraxane) junto con un anticuerpo monoclonal dirigido contra el ligando 1 de muerte programada (PD-L1) (Atezolizumab) para estos tumores. La combinación se aprobó para la administración en mujeres con CMTN localmente avanzado o metastásico que no puede tratarse quirúrgicamente y cuyos tumores presentan PD-L1 (se encuentra en aproximadamente el 20% de los CMTN) (Vranic et al., 2020).

Hay que resaltar que desde el punto de vista inmunohistoquímico, no hay una definición exacta de carcinoma basal, pero la clasificación propuesta por el grupo de Nielsen y col. (Nielsen et al., 2004) basada en 4 marcadores (RE, HER2, CK5/6 y EGFR) permitía detectar adecuadamente a los carcinomas basales con una buena especificidad y definía a un grupo de tumores con un peor pronóstico.

A pesar de que se han considerado prácticamente iguales los términos TN y basal, hay que diferenciarlos. Entre los carcinomas TN, el fenotipo basal es el más predominante, pero podemos encontrar todos los fenotipos moleculares (Bastien et al., 2012; Cheang et al., 2015; Prat et al., 2014). Además, los CMTN son tumores



heterogéneos a nivel transcripcional. Lehmann y col. (Lehmann et al., 2016) diferenciaron cuatro subtipos estables de CMTN caracterizados por la expresión de distintos perfiles moleculares que tienen distintos pronósticos: basal 1 (BL1) y basal 2 (BL2), mesenquimal (M) y luminal receptor de andrógenos (LAR). Estos subtipos presentan distinta supervivencia y sensibilidad a la quimioterapia neoadyuvante (Santonja et al., 2018). Combinando análisis de ARN y ADN, también se diferenciaron 4 grupos: basal-like inmunosuprimido (BLIS), basal-like inmunoactivado (BLIA), M y LAR (Burstein et al., 2015).

Los tumores BL1 expresaban principalmente genes involucrados en el ciclo celular y en respuesta al daño en ADN y los de tipo BL2 se caracterizaban por expresión de marcadores mioepiteliales y genes de vías de señalización relacionadas con factores de crecimiento. El subtipo M también se caracterizaba por genes implicados en las vías de señalización relacionadas con factores de crecimiento, además de otros que participan en la transición epitelio-mesénquima (TEM). Y el subtipo LAR por expresión de genes luminales y el receptor de andrógenos (RA) (Lehmann et al., 2016).

En las Tablas 1 y 2 se pueden ver resumidas las características moleculares según TCGA y según técnicas de expresión y pronósticas de cada subtipo molecular intrínseco.

**TABLA 1. ALTERACIONES MOLECULARES DE LOS DIFERENTES TIPOS MOLECULARES DE CÁNCER DE MAMA DE LA COLECCIÓN DEL TCGA**

CARACTERÍSTICAS MOLECULARES SEGÚN TCGA			
Luminal A	Luminal B	HER2+	Basal
Mutaciones de <i>PIK3CA</i> (49%), <i>TP53</i> (12%), <i>GATA3</i> (14%), <i>MAP3K1</i> (14%)	Mutaciones de <i>PIK3CA</i> (32%), <i>TP53</i> (32%), <i>MAP3K1</i> (5%)	Mutaciones de <i>PIK3CA</i> (42%), <i>TP53</i> (75%), <i>PIK3R1</i> (8%)	Mutaciones de <i>PIK3CA</i> (7%), <i>TP53</i> (84%)
Expresión mRNA baja proliferación	Amplificación ciclina D1 (58%) Expresión mRNA alta proliferación	Expresión mRNA alta proliferación	Expresión mRNA alta proliferación

**TABLA 2. CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS Y PRONÓSTICAS**

CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS (SEGÚN TÉCNICAS DE EXPRESIÓN GENÉTICA) Y PRONÓSTICAS			
Luminal A	Luminal B	HER2+	Basal
Alta expresión de RE y genes relacionados con RE ( <i>FOXA1</i> , <i>PgR</i> , <i>BCL2</i> , <i>EsR1</i> , <i>GATA3</i> , etc).	Expresión de "genes luminales" ( <i>FOXA1</i> , <i>PgR</i> , <i>BCL2</i> , <i>EsR1</i> , <i>GATA3</i> )  Incremento de genes asociados a proliferación ( <i>CNNB1</i> , <i>CCND1</i> , <i>CCNE1</i> , <i>MYBL2</i> , etc)	Expresión de genes localizados en amplicón HER2 (17q11) ( <i>HER2</i> , <i>GRB7</i> , <i>GATA4</i> ) y altos niveles de activación de NF-κB y mutaciones de <i>TP53</i>	Expresión de genes característicos de las células basales/mioepiteliales ( <i>CK5</i> y <i>17</i> , integrina4, laminina, c-KIT, p-cadherina, <i>EGFR</i> , α6-integrina o NF-κB). Mutaciones <i>BRCA1</i>
Mejor pronóstico	Peor pronóstico	Comportamiento clínico agresivo, mal pronóstico.	Comportamiento clínico agresivo, mal pronóstico.

### 1.1.5 Clasificación molecular subrogada

En la práctica clínica, para decidir qué tratamiento administrar a cada paciente es muy importante tener en cuenta el grupo molecular al que pertenece cada tumor. Por ello, se usa una clasificación subrogada molecular, en la que, mediante métodos más rápidos y económicos, como la inmunohistoquímica (IHC), se clasifican los CM. Se usa un panel con los marcadores RE, RP, Ki67, grado histológico y HER2 para determinar de forma subrogada el fenotipo molecular (WHO Classification of Tumours Editorial Board et al., 2019).

St Gallen ha publicado una clasificación según los marcadores de IHC, mediante la cual, se distinguen cuatro fenotipos moleculares (luminal A-like, luminal B-like (HER2- y HER2+), HER2+ (no luminal) y TN) que se detallan a continuación (Tabla 3):

- Luminal A-like. RE+, RP+, HER2- y Ki67 bajo.

- Luminal B-like (HER2-). RE+, RP- o bajo, HER2- y Ki67 alto.

- Luminal B-like (HER2+). RE+, HER2 sobreexpresado o amplificado, RP cualquiera y Ki67 cualquiera.

- HER2+ (no luminal). HER2 sobreexpresado o amplificado, RE- y RP-.

- TN. RE-, RP- y HER2-.

**TABLA 3. DEFINICIÓN DE LOS FENOTIPOS MOLECULARES SUBROGADOS SEGÚN EL CONSENSO DE ST GALLEN**

CLASIFICACIÓN MOLECULAR SUBROGADA ST. GALLEN				
Luminal A-like	Luminal B-like (HER2-)	Luminal B (HER2+)	HER2+ (no luminal)	TN
RE+	RE+	RE+	HER2 sobreexpresado o amplificado	RE-
RP+	RP- o bajo	HER2 sobreexpresado o amplificado	RE-	RP-
HER2-	HER2-	RP cualquiera	RP-	HER2-
Ki67 bajo	Ki67 alto	Ki67 cualquiera		

Hay que resaltar que existe una dificultad para estandarizar y definir un punto de corte óptimo para el índice proliferativo Ki67, que distinga entre tumores luminal A y B. Las plataformas genómicas son de gran ayuda para orientar el pronóstico y a la hora de toma de decisiones de tratamiento quimioterápico en tumores luminales.

Esta clasificación mediante marcadores IHC no concuerda del todo con la que se obtiene mediante pruebas de análisis de expresión genética (Bastien et al., 2012; Cheang et al., 2015), siendo en el subtipo HER2 en el que se observan las mayores diferencias. En el ensayo N9831 (Perez et al., 2016) solo el 72% de los tumores que mostraban HER2 3+ mediante IHC o mostraban amplificación mediante técnicas de hibridación in situ correspondían al subtipo HER2 mediante expresión génica; en parte esto puede ocurrir porque los tumores que expresaban RH además de HER2 se incluían en el grupo luminal B.

### 1.1.6 Factores pronósticos y predictivos

El pronóstico del CM está influenciado por diferentes variables, como las características clinicopatológicas (edad, estado menopáusico, invasión linfo-vascular (LIV) etc.), estado de los RHs, sobreexpresión o amplificación del gen HER2 y otros marcadores (WHO Classification of Tumours Editorial Board et al., 2019). A continuación, se detallan los más usados en la práctica clínica.

#### 1.1.6.1 Estadificación clinicopatológica

El CM se estadifica según American Joint Committee of Cancer (AJCC)/ Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) mediante un sistema basado en tres parámetros (TNM). T, que se refiere al tamaño del tumor, N, que hace referencia al estado de los ganglios linfáticos y M, que corresponde a la presencia o no de metástasis a distancia. Con este recurso se puede determinar la etapa del cáncer siguiendo unas normas (WHO Classification of Tumours Editorial Board et al., 2019).

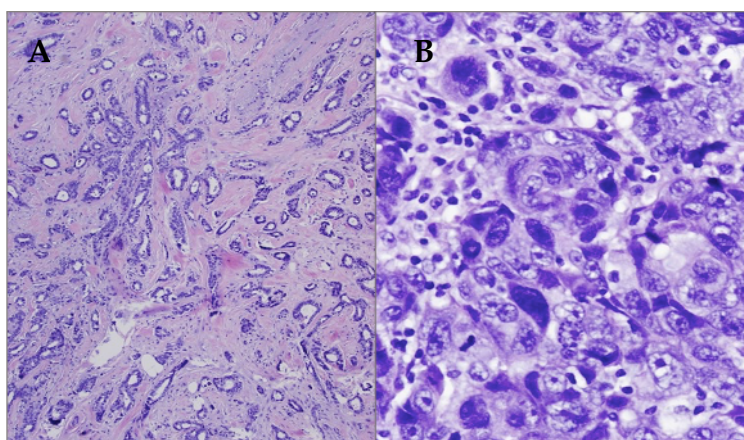
Cuando se determinan los valores para el TNM (T0, T1-4, N0, N1-3 y M0, M1), se pueden agrupar las combinaciones TNM en cinco estadios menos detallados (0, I-IV). Cuanto mayor es el número, mayor es el tumor y más posibilidades presenta de extensión a otros tejidos. Además, las etapas a veces se pueden dividir usando letras como A, B (WHO Classification of Tumours Editorial Board et al., 2019).

Se diferencia el estadio clínico del patológico. La estadificación clínica se basa en los resultados de las pruebas que se realizan antes de la cirugía, y la patológica en qué se encuentra durante la cirugía; esta última aporta la mayor parte de la información para determinar el pronóstico de un paciente. Para ayudar a su determinación, se asigna el estadio del cáncer combinando las clasificaciones TNM con el grado del tumor y las pruebas RE/RP y HER2 (WHO Classification of Tumours Editorial Board et al., 2019).

### 1.1.6.2 Grado histológico

El grado histológico es un factor pronóstico y predictivo que da información sobre la proliferación tumoral, la arquitectura y las alteraciones nucleares (Rakha et al., 2010). La OMS recomienda usar el sistema de gradación Nottingham, también llamado modificación de Elston-Ellis del sistema de gradación de Scarff-Bloom-Richardson (Elston & Ellis, 1991), en el que se evalúan las variables formación tubular, grado de pleomorfismo nuclear e índice mitótico. Cada categoría se puntúa del 1 al 3. Finalmente se suman las puntuaciones de estos tres parámetros obteniendo un resultado del 3 al 9, que corresponde al grado final. Hay tres grados posibles: bajo grado o bien diferenciado (3-5 o G1), grado medio o moderadamente diferenciado (6-7 o G2) y alto grado o pobremente diferenciado (8-9 alto o G3) (Rakha et al., 2010). (Fig. 3)

**FIGURA 3. REPRESENTACIÓN DE GRADOS HISTOLÓGICOS 1 y 3**



**A.** Grado histológico 1. **B.** Grado histológico 3

### 1.1.6.3 Expresión de receptores de hormonas

El estado de los RH, tanto de RE como de RP y el estado de HER2 son factores predictivos y de pronóstico indispensables para la toma de decisiones terapéuticas según guías internacionales como St Gallen International Breast Cancer, European Society for Medical Oncology (ESMO), American Society of Clinical Oncology (ASCO) y

National Comprehensive Cancer Network (NCCN) (WHO Classification of Tumours Editorial Board et al., 2019).

La mayor parte de los tumores de mama expresan RE y más de la mitad coexpresan RP. El papel principal del estado de los RE es predictivo, pacientes con CM que muestran expresión de RE  $\geq 1\%$  se beneficia de la terapia endocrina; en cambio cuando esta es  $< 1\%$  no hay beneficio alguno. Además, el estado de RE tiene un papel pronóstico, ya que los CM altamente positivos para RE tienen mejor pronóstico a corto plazo que los negativos (WHO Classification of Tumours Editorial Board et al., 2019). Dentro del grupo de tumores RE+ se ha visto que los RP tienen un valor pronóstico independiente al de RE (Purdie et al., 2014), los casos RP- se asocian con un aumento del riesgo de mortalidad independientemente del grado histológico (Dunnwald et al., 2007). Los tumores luminales tienen mayor probabilidad de producir recidivas tardías y menor número de recaídas tempranas (Saphner et al., 1996). Además, este tipo se asocia con otros factores pronósticos favorables como bajo grado histológico, baja proliferación o edad avanzada. Cuando la positividad para RE es muy baja, entre 1-9%, hay controversia, ya que a pesar de ser positivos para RE, estos casos tienen un mal pronóstico, semejante al de los tumores RH- (Allison et al., 2020; Yi et al., 2014).

#### **1.1.6.4 Expresión y amplificación de HER2**

HER2 es un marcador tanto predictivo como pronóstico; alrededor del 15% de los CM muestran sobreexpresión o amplificación del gen *ERBB2* y esta positividad para HER2 predice beneficio en la supervivencia cuando se administra una terapia dirigida (por ejemplo, anticuerpo monoclonal trastuzumab y pertuzumab) junto al régimen de quimioterapia. Sin embargo, en ausencia de una terapia dirigida adecuada, estos tumores tienen muy mal pronóstico debido a su biología tan agresiva (Slamon et al., 1987; WHO Classification of Tumours Editorial Board et al., 2019). Su evaluación debe

realizarse de acuerdo a las recomendaciones internacionales (ASCO/CAP) (Wolff et al., 2018).

### 1.1.6.5 Índice proliferativo Ki67

Ki67 es una proteína nuclear involucrada en la proliferación celular. En la clínica se evalúa la expresión de Ki67 para identificar el nivel de proliferación de las células tumorales, muy importante para determinar la agresividad de la enfermedad y las decisiones terapéuticas. En tumores mamarios, un valor alto de Ki67 se ha relacionado con peor pronóstico y buena respuesta al tratamiento con quimioterapia. (Panal Cusati et al., 2014; WHO Classification of Tumours Editorial Board et al., 2019). Sin embargo, este parámetro no es un marcador independiente, ni se usa de forma universal en la práctica clínica debido a falta de estandarización y de capacidad para definir puntos de corte que discriminen altas y bajas tasas de proliferación (Klauschen et al., 2015). A pesar de esto, en combinación con otros factores clínicos como el grado histológico, el tamaño tumoral y los RHs sí tiene aplicabilidad (Panal Cusati et al., 2014). Además, existen diferentes modelos matemáticos para obtener un valor pronóstico en CM, como el índice PEPI, RPCB, IHC4 o MS, que incluyen el valor de Ki67. Por otro lado, se ha observado su capacidad predictiva de respuesta a tratamiento, tanto como marcador independiente como en combinación con el estado de los RH y HER2 (Sheri et al., 2015).

Su evaluación debe realizarse de acuerdo a las recomendaciones internacionales del Working Group (Nielsen et al., 2021).

### 1.1.6.6 Expresión de receptores de andrógenos

Estudios recientes han demostrado que los tumores que muestran expresión de RA por IHC y altos niveles de mRNA de RA se asocian con un aumento en la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia promedio en pacientes con CM en estadios tempranos. La determinación del RA no se está llevando a cabo actualmente en



la práctica clínica de manera estándar en todos los tumores de mama, aunque puede ser solicitado en algunos casos (WHO Classification of Tumours Editorial Board et al., 2019).

En el CMTN, el subtipo LAR está estrechamente vinculado a los tumores de tipo histológico apocrino y se denominó así porque puede definirse como CMTN por IHC, pero histológica y genéticamente es similar al CM RE+, además las mutaciones de *PIK3CA* se activan con frecuencia en estos tumores. Los CMTN LAR tienen un mejor pronóstico, con tasas de proliferación más bajas en comparación con los otros subtipos de CMTN, lo que da lugar a una quimiorresistencia parcial. Las pruebas clínicas sugieren un papel para las terapias antiandrógenas como alternativa a la quimioterapia, lo que podría cambiar las estrategias de tratamiento actuales (Gerratana et al., 2018; Masuda et al., 2013).

#### **1.1.6.7 Firmas de expresión genéticas**

Debido a la gran variedad de tratamientos posibles, los factores pronósticos y predictivos clínicos y patológicos clásicos no eran suficientes para reflejar la heterogeneidad molecular y clínica de la enfermedad; por ello surgieron las plataformas genéticas. Estas plataformas consisten en pruebas que analizan la expresión de determinados genes de los tumores de mama, estudiando la agresividad y riesgo de recaída. Entre ellas varían los genes estudiados, los métodos para cuantificar la expresión génica, las variables clinicopatológicas incluidas, la estratificación en grupos de riesgo o si la prueba se realiza o no de forma centralizada. Las más importantes aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) son: Mammaprint®, Oncotype DX®, PAM50/Prosigna® y Endopredict® (WHO Classification of Tumours Editorial Board et al., 2019).

### 1.1.7 Metástasis en cáncer de mama

La enfermedad metastásica es la última etapa, generalmente fatal, en el desarrollo del cáncer. Es un proceso complejo en el que las células de un tumor primario se propagan a órganos distales, alterando la angiogénesis y mostrando un crecimiento descontrolado en estos tejidos distales. El proceso metastásico comienza cuando una o más células se diseminan a través del sistema sanguíneo y/o linfático, escapando así del tumor primario. Después de penetrar en el torrente linfático y/o sanguíneo, las células tumorales circulan, se produce estasis dentro del vaso, extravasación, invasión del nuevo tejido y finalmente las células cancerosas pueden proliferar en el sitio de la metástasis (Chiang & Massagué, 2008; Liotta, 1990).

El CM produce metástasis predominantemente en el hígado, pulmón, huesos y cerebro (Arozullah et al., 2004), aunque el patrón metastásico varía entre los diferentes subtipos. Los tumores RE+ generalmente metastatizan al hueso (Coleman, 1997; Lipton, 2003) y son menos invasivos y metastásicos (Richert & Welch, 2009). El HER2+ tiene una alta incidencia de metástasis cerebrales (Heitz et al., 2009; Lentzsch et al., 1999) y casi el 50% de los pacientes con enfermedad avanzada fallecen con afectación del sistema nervioso central (Bendell et al., 2003). Los CMTN con frecuencia metastatizan a órganos viscerales, muestran un mayor tropismo para el pulmón con una alta tasa de metástasis al sistema nervioso central también (Gerratana et al., 2015).

### 1.1.8 Metástasis cutánea en cáncer de mama

El CM, aunque puede producir metástasis en diferentes partes del cuerpo, es el tumor que más metastatiza a piel en mujeres (Alcaraz et al., 2012; De Giorgi et al., 2010; Guanzioli et al., 2017; Tan, 2016). Estas metástasis cutáneas (MC) están presentes en alrededor del 24% de los pacientes con CM metastásico (Alcaraz et al., 2012; Casimiro, 2009; De Giorgi et al., 2010; Guanzioli et al., 2017; Tan, 2016). Pueden aparecer localmente (86%) o a distancia (14%).

Las MC representan el 2% de todas las lesiones malignas de la piel (Alcaraz et al., 2012; Casimiro, 2009). Además, debido a la alta incidencia de CM, estas manifestaciones cutáneas son el tipo de metástasis más frecuentes entre las mujeres atendidas por dermatólogos; concretamente el 69% de las metástasis cutáneas proceden de CM (Tan, 2016). Por lo general, se asocian con un mal pronóstico (S.-S. Hu et al., 2008) y, por lo tanto, el desarrollo de estrategias de manejo para la MC es un desafío clínico importante.

### **1.1.8.1 Epidemiología, incidencia, pronóstico de la metástasis cutánea en cáncer de mama**

El CM es el tumor más propenso a metastatizar en la piel en mujeres con una mediana de edad de 74 años (Guanziroli et al., 2017). Todas las MC, independientemente del subtipo, suelen aparecer en las últimas etapas del curso del cáncer. Brownstein y col. (Brownstein & Helwig, 1972), analizaron 724 casos de cánceres metastásicos con MC y observaron que sólo en el 3% de los casos de CM metastásico, la MC era el signo de presentación de la enfermedad. Kong et al. (Kong et al., 2011) observaron que más de la mitad de los pacientes (56,8%) tenían más de una metástasis visceral en el momento del diagnóstico de MC; hueso en el 41,6% de los pacientes, pulmón en el 36%, hígado en el 13,6% y cerebro en el 1,6%. Todo ello confiere un pronóstico grave, con una supervivencia media de 3 a 6 meses, con pocas diferencias en cuanto a si las lesiones son únicas o múltiples, y con una mortalidad superior al 70% en el primer año tras el diagnóstico (Cox & Cruz, 1994; Marcoval et al., 2008).

La ubicación de estas metástasis no es completamente aleatoria; ocurre con mayor frecuencia en la vecindad del tumor primario, hecho que puede ocurrir por extensión directa del tumor subyacente o por diseminación linfática (Guanziroli et al., 2017). Las MC de CM tienden a desarrollarse en la pared torácica, aunque también pueden desarrollarse en el abdomen, las extremidades, la cabeza o el cuello (Alcaraz

et al., 2012; Guanziroli et al., 2017; Spencer & Helm, 1987; Tan, 2016). Además de poder desarrollarse en diferentes localizaciones, las metástasis mamarias cutáneas pueden manifestarse con diferentes patrones.

### Nódulos

Los nódulos son la presentación clínica más común de MC, con una incidencia del 80% (Tan, 2016). Varían en tamaño de 1 a 3 cm y pueden presentarse como pápulas firmes, solitarias o múltiples que se localizan en la dermis o en el tejido subcutáneo. A menudo son de color rosado, pero pueden ser de color marrón, negro azulado o marrón rojizo (Nava et al., 2009; Pipkin & Lio, 2008). Los nódulos suelen ser asintomáticos, aunque también pueden ulcerarse e infectarse (Lookingbill et al., 1993) (Fig. 4 A).

### Telangiectásico

Este patrón puede aparecer como un parche eritematoso con telangiectasias prominentes o como una lesión pseudovesicular similar a un linfangioma circunscrito (Marneros et al., 2009). Se caracteriza por pápulas, placas o nódulos purpúricos y, a menudo, se acompaña de prurito (Lin et al., 2004; Pakula & Robinson, 1992). La presentación telangiectásica se produce con una incidencia del 8-11% entre los pacientes (De Giorgi et al., 2010; Tan, 2016).

### Erisipeloide o erisipelatoides

También se conoce como carcinoma metastásico inflamatorio (Bourke et al., 2017). Este patrón muestra una presentación similar a la de la erisipela, con placas y parches eritematosos bien delimitados que afectan la mama y la piel circundante (Fig. 4 B). Las células tumorales malignas se encuentran predominantemente dentro de los vasos dérmicos. Se cree que las células de CM obstruyen los vasos linfáticos en forma de émbolos tumorales (Marneros et al., 2009). La erisipeloide ocurre con una incidencia del 3-6,3% entre los pacientes (De Giorgi et al., 2010; Tan, 2016).

### Carcinoma en Cuirasse

También se denomina carcinoma escirro y aparece como placas eritematosas e induradas dispersas y firmes que se infiltran en la pared torácica (Carlesimo et al., 2009; Mullinax & Cohen, 2004). A veces, la piel puede adquirir un color amarillo y una consistencia fibrótica (Carlesimo et al., 2009). El carcinoma de Cuirasse se produce con una incidencia del 3-4% entre los pacientes (De Giorgi et al., 2010; Tan, 2016).

### Alopecia neoplásica

Se presenta como áreas circulares induradas de alopecia en el cuero cabelludo debido a la diseminación hematógena del CM (Mallon & Dawber, 1994). Las áreas de alopecia son típicamente indoloras, no pruriginosas y están bien delimitadas, y aparecen como placas ovaladas, que a menudo muestran un tono rojo rosado y una superficie lisa (Brownstein & Helwig, 1972). Las células neoplásicas pueden destruir los folículos pilosos induciendo fibroplasia a través de mediadores inflamatorios. La naturaleza infiltrativa de dicha alopecia puede no ser evidente o sólo mínimamente aparente (Scheinfeld, 2006). Este tipo se presenta con una incidencia del 2 al 12% entre los pacientes (De Giorgi et al., 2010).

**FIGURA 4. PRESENTACIONES CLÍNICAS DE LAS METÁSTASIS CUTÁNEAS**



**A.** Metástasis cutáneas en forma de nódulos infectados y ulcerados. **B.** Metástasis cutáneas en forma de parches y placas eritematosas fuertemente delimitadas que afectan a la mama y a la piel circundante.

#### **1.1.8.2 Diagnóstico diferencial de metástasis cutánea de origen mamario**

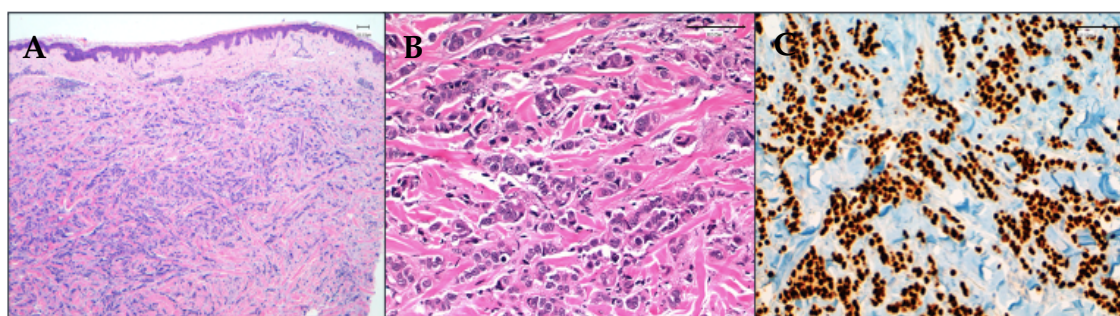
Ciertos marcadores inmunohistoquímicos se utilizan en la investigación del origen de la MC en los casos en los que aún no se ha diagnosticado un tumor primario en el momento de la biopsia cutánea. La distinción de la lesión cutánea como resultado de metástasis de CM tiene una gran importancia clínica, ya que puede modificar completamente las pautas de tratamiento. Hasta la fecha, no existe un marcador totalmente específico para confirmar el origen de la mama. Sin embargo, existen múltiples anticuerpos que pueden ayudar a distinguirlo de los tumores cutáneos primarios o de las metástasis de otros orígenes.

En los tumores de mama luminales, que presentan intensa expresión de RHs, y en los tumores HER2, el diagnóstico se puede realizar con mayor facilidad, ya que estos tumores presentan el inmunofenotipo característico de origen mamario con positividad para la proteína del factor de enfermedad quística macroscópica (GCDFP), mamaglobina, GATA3, RH, o HER2 si corresponde.

Los casos de TN son el grupo más difícil de diagnosticar. Este subgrupo de tumores presenta una positividad mucho menor para los marcadores típicos de mama (Lewis et al., 2011). En cambio, la positividad de SOX10 se ha descrito en el 66%-74% de los carcinomas de mama TN y metaplásicos, pero sólo en el 5% de los carcinomas no TN. Este marcador puede ser útil incluso en ausencia de expresión de GATA3 (Tozbikian & Zynger, 2019). Y los RA presentan una positividad entre el 25% y el 35% en los carcinomas TN, aunque su expresión está más estrechamente relacionada con la expresión del RE (Tozbikian & Zynger, 2019).

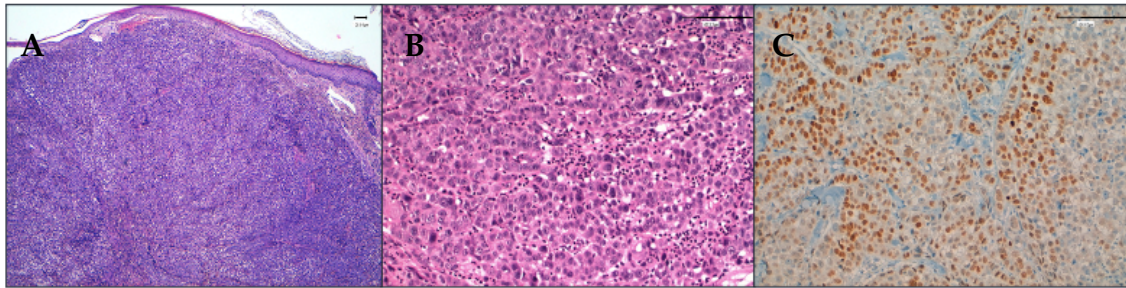
Recientemente se han llevado a cabo estudios de SOX10, RA y expresión de GATA3 en CMTN, tanto en tumores primarios como en carcinomas metastásicos (Tozbikian & Zynger, 2019) (Fig. 5 y 6). En la revisión de Tozbikian et al. (Tozbikian & Zynger, 2019), el más sensible de los tres marcadores fue GATA3 (82% de positividad) y el menos sensible fue el RA. SOX10, a su vez, sigue siendo el más estable al comparar la expresión entre carcinoma primario y metastásico y, además, es capaz de permitir la detección de casos en los que no existe expresión de GATA3.

#### FIGURA 5. REPRESENTACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GATA3



**A.** Patrón trabecular infiltrante en una metástasis nodular cutánea de un carcinoma de mama triple negativo de ningún tipo especial. **B.** Células tumorales que disecan fibras de colágeno dérmico. **C.** Expresión intensa de GATA3.

**FIGURA 6. REPRESENTACIÓN DE LA EXPRESIÓN SOX10**



**A.** Patrón sólido de infiltración en una metástasis nodular cutánea de un carcinoma de mama triple negativo de ningún tipo especial. **B.** Células tumorales que forman nidos sólidos en la dermis. **C.** Expresión intensa de SOX10.

### 1.1.9 Alteraciones moleculares

#### 1.1.9.1 Cáncer de mama metastásico

Las metástasis se asocian con la adquisición de mutaciones impulsoras adicionales en comparación con el tumor primario (Yates et al., 2017). Diferentes estudios muestran que el número de mutaciones somáticas en las lesiones de mama metastásicas es significativamente mayor que en las lesiones primarias (Kjällquist et al., 2018; Paul et al., 2020; Roy-Chowdhuri et al., 2015; Schrijver et al., 2018; Yates et al., 2017).

La mayor parte de los estudios de CM metastásico, aunque en ocasiones incluyen tumores primarios de mama y sus correspondientes metástasis, generalmente se restringen a un solo tipo de muestra (primario o metástasis). Rinaldi y col. (Rinaldi et al., 2020), que exploraron un conjunto de 11.616 tumores de mama, incluidas 5.034 metástasis, mostraron un enriquecimiento significativo de mutaciones de *ESR1* en lesiones metastásicas (18,3% en metástasis frente a 2,2% en enfermedad local). Lefebvre y col. (Lefebvre et al., 2016) en su estudio de 216 tumores de mama metastásicos, también observaron más mutaciones de *ESR1* en metástasis que en tumores primarios, así como más mutaciones en *RB1*. En este estudio, otros genes que se observaron



mutados con mayor frecuencia en el CM metastásico en comparación con el CM temprano fueron *FSIP2*, *FRAS1*, *OSBPL3*, *EDC4*, *PALB2*, *IGFN1*, y *AGRN*.

Otros autores han comparado mutaciones entre casos pareados de tumores primarios de mama y sus metástasis (en distintas localizaciones). Schijver y col. (Schrijver et al., 2018) incluyeron 17 casos pareados RE-/HER2+ y TN y encontraron que un gran subconjunto de mutaciones somáticas no sinónimas (45%) se compartían entre tumores primarios y metástasis pareadas. Además, observaron que las mutaciones de *TP53* y *RB1*, entre otros genes, participaban en la progresión de tumores primarios a metástasis.

Roy-Chowdhuri y col. (Roy-Chowdhuri et al., 2015) mostraron resultados muy similares: analizaron 61 casos pareados y observaron 77% de mutaciones concordantes entre primarios y metástasis y 23% de mutaciones solo en metástasis, incluidas *TP53*, *PIK3CA*, *KRAS*, *PTEN*, *BRAF* y *AKT1*. Sin embargo, su grupo de pacientes se centró en el subtipo RE+ e incluyó solo un 2% de tumores de mama RE-/HER2+ y un 25% de tumores de mama TN. Otros estudios también han demostrado que *TP53* y *PIK3CA* son los genes mutados con mayor frecuencia en las metástasis (Goswami et al., 2015; Yates et al., 2017).

Paul y col. (Paul et al., 2020) que incluyeron 28 casos pareados observaron que siete genes estaban mutados preferentemente en metástasis, *MYLK*, *PEAK1*, *SLC2A4RG*, *EVC2*, *XIRP2*, *PALB2* y también *ESR1*, 5 de los cuales no están mutados significativamente en ningún tipo de cáncer primario humano. Además, Kjällquist et al. (Kjällquist et al., 2018), que incluyeron 30 casos pareados, mostraron un enriquecimiento de mutaciones en genes *AKAP* en CM metastásicos y sugirió la participación de *AKAPs* en el proceso metastásico.

### 1.1.10 Tratamiento de metástasis cutánea en cáncer de mama

Cuando el CM se propaga a la piel, no se puede curar. El propósito del tratamiento es aliviar los síntomas, mejorar la calidad de vida y retrasar el crecimiento del cáncer. Las MC se tratan con un tratamiento sistémico, teniendo en cuenta el tipo molecular. Un tumor luminal se puede tratar con una variedad de agentes endocrinos. Para las MC que son RH- o progresan rápidamente, se utiliza la quimioterapia. Un tumor HER2+ debe recibir terapia dirigida a HER2 con o sin quimioterapia, según la extensión de la enfermedad. Para el control local de las MC, la radioterapia externa es una opción paliativa, pero no se utilizaría en áreas previamente irradiadas debido a la dosis acumulada (Tan, 2016).

Si las lesiones presentan hemorragias, se puede recomendar el desbridamiento. Otras opciones incluyen el imiquimod, con buenos resultados en lesiones localizadas, o la escisión quirúrgica puede mejorar la calidad de vida de los pacientes (Ferreira et al., 2018; Utkan et al., 2009).

En varios casos, se ha objetivado cómo la crioterapia y los inmunomoduladores tópicos pueden desempeñar un papel en el tratamiento de la MC de CM, posiblemente al provocar mejores respuestas a la quimioterapia sistémica tradicional y las terapias emergentes que incluyen agentes dirigidos y bloqueantes de puntos de control inmune.

Otra opción para el tratamiento de la MC en CM es la electroquimioterapia (ECT). Este es un tratamiento eficaz para las lesiones cutáneas del CM que han demostrado ser refractarias a las terapias estándar. Como se encontró que las lesiones más pequeñas respondían mejor, Bourke y col. (Bourke et al., 2017) sugieren que la ECT debe considerarse como una modalidad de tratamiento temprano, dentro de las estrategias de tratamiento multimodal.

## 1.2 NEXT-GENERATION SEQUENCING

### 1.2.1 Descripción

La secuenciación paralela masiva o *Next-Generation Sequencing* (NGS) se desarrolló en la última década, ha reemplazado a la secuenciación de Sanger (considerada de “primera generación”), y proporciona un enfoque muy versátil para aplicaciones clínicas y no clínicas. Estas tecnologías permiten la secuenciación simultánea de millones de fragmentos de ADN sin conocimiento previo de la secuencia (Kamps et al., 2017).

La aparición de estas tecnologías resuelve el problema de secuenciar uno a uno los genes de interés, permitiendo el análisis paralelo de todos los genes potencialmente responsables de la enfermedad y, por otro lado, reduce el tiempo de respuesta y el proceso. Los métodos más usados en NGS son los de “segunda generación”; estos se pueden agrupar en dos categorías principales: secuenciación por hibridación y secuenciación por síntesis. Los métodos de secuenciación por síntesis son un desarrollo adicional de la secuenciación de Sanger, sin los terminadores didesoxi, en combinación con ciclos repetidos de síntesis, formación de imágenes de nucleótidos marcados o reacciones químicas basadas en la incorporación de un nucleótido en la cadena en crecimiento. La NGS suele tener una tasa de error más alta que la secuenciación Sanger y dependen de una gran cobertura de secuencia ("secuenciación masivamente paralela"), de millones a miles de millones de lecturas de secuencias de ADN cortas (50-300 nucleótidos) como una forma de obtener una precisión de la secuencia basada en la identificación de una secuencia de consenso.

Estos nuevos métodos pueden parecer costosos, pero las reacciones se ejecutan en paralelo a menudo a volúmenes de nanolitros, picolitros o zeptolitros en cámaras pequeñas y, por lo tanto, el coste por par de bases secuenciadas no es tan alto. Además, las mejoras en esta tecnología están reduciendo aún más los costos (Slatko et al., 2018).

La evolución en la precisión, costo y rendimiento de las nuevas plataformas NGS ha permitido una rápida expansión de su uso en la comunidad científica permitiendo la secuenciación de exomas, genomas completos y la secuenciación dirigida a áreas específicas del genoma. Además, estas tecnologías de secuenciación más eficientes y económicas permitieron la implementación de proyecciones más ambiciosas como el Proyecto de 1000 genomas (1000 Genomes Project Consortium et al., 2010).

### 1.2.2 Métodos

#### 1.2.2.1 Secuenciadores

Los secuenciadores de “segunda generación” basados en secuenciación por síntesis, usan un soporte sólido que contiene microcanales o pocillos en los que se producen las reacciones de secuenciación. La mayoría de estos nuevos métodos de secuenciación por síntesis no usan terminadores didesoxi, aunque en algunas tecnologías se usan terminadores "reversibles", que permiten que las reacciones de incorporación de nucleótidos se desarrollen de manera normal mientras se obtienen imágenes de los nucleótidos incorporados y luego se eliminan las fracciones de bloqueo de síntesis para permitir la incorporación de la siguiente base en la secuencia (Slatko et al., 2018).

Una limitación importante de estas tecnologías es la secuenciación de regiones de repetición, ya que cuando un *read* proviene de secuencias de homopolímeros con múltiplos consecutivos de la misma base, como “AAAAAAAAAA”, y el *read* es más corto que esta, no se sabe con certeza de qué copia de la repetición se obtuvo y no se pueden determinar con precisión el número de bases consecutivas.

Uno de los primeros métodos de secuenciación de “segunda generación” fue Roche/454, basado en pirosecuenciación. Mediante la detección de pirofosfato

utilizando una reacción generadora de luz, se informa de si una base en particular se incorpora en una cadena de ADN en crecimiento (Slatko et al., 2018).

Otra tecnología es Ion Torrent <sup>TM</sup> que convierte directamente la secuencia de nucleótidos en información digital en un chip semiconductor (Rothberg et al., 2011). En una reacción de síntesis de ADN, cuando se incorpora un nucleótido correcto frente a su base complementaria en una cadena de ADN en crecimiento, se libera un ion hidrógeno. Esto cambia el pH de la solución que se puede registrar como un cambio de voltaje por un sensor de iones, al igual que un medidor de pH. Cuando dos nucleótidos adyacentes incorporan el mismo nucleótido, se liberan dos hidrógenos y el voltaje se duplica, por lo que se pueden identificar varias incorporaciones del mismo nucleótido. Existen varias versiones de la plataforma disponibles, incluido el sistema Ion Personal Genome Machine <sup>TM</sup> (PGM <sup>TM</sup>), el sistema Ion Proton <sup>TM</sup>, el sistema Ion S5 y el sistema ION S5 XL, cada uno con diferentes características de rendimiento (Slatko et al., 2018).

Otra tecnología de secuenciación muy importante en esta generación es Illumina, basada en una técnica conocida como "amplificación en puente". Illumina utiliza moléculas de ADN con adaptadores ligados en cada extremo como sustratos para reacciones de síntesis de amplificación repetidas en un soporte sólido, dicho soporte contiene secuencias de oligonucleótidos complementarias a un adaptador ligado. Durante la síntesis, los nucleótidos marcados con fluoróforos se incorporan y luego se detectan. Los nucleótidos también actúan como terminadores de síntesis para cada reacción, que se desbloquean después de la detección para la siguiente ronda de síntesis. Las diferentes plataformas de secuenciación de Illumina proporcionan distintos niveles de rendimiento, incluidos los modelos MiniSeq, MiSeq, NextSeq, NovaSeq y HiSeq (Slatko et al., 2018).

Después se desarrollaron la “tercera” y “cuarta generación”, aunque algunas de estas plataformas se encuentran todavía en fase de experimentación o requieren de una mejora.

La tecnología líder de “tercera generación” ha sido desarrollada por Pacific Biosciences (PacBio), que ha comercializado dos sistemas de secuenciación, el modelo RSII original y más recientemente, el Sequel™. La secuenciación PacBio, también es conocida como secuenciación Single Molecule Real Time (SMRT). Esta es una plataforma que utiliza la fluorescencia para secuenciar una única molécula de ADN en tiempo real. El diseño se basa en nanopocillos con un orificio en la base, llamado zero-mode waveguide (ZMW), a través del cual pasa la luz. Al fondo de cada pocillo se inmoviliza una única molécula de ADN junto con una sola enzima de ADN polimerasa. Con la incorporación de los nucleótidos se van liberando fluoróforos de distintos colores, los cuales son detectados. A medida que se incorpora cada nucleótido a la cadena se van formando imágenes a escala de tiempo de milisegundos, permitiendo conocer la secuencia desconocida (Slatko et al., 2018).

Finalmente, la “cuarta generación” se basa en secuenciación de largas moléculas de ADN mediante la medición de diferentes corrientes a medida que cada nucleótido pasa por un detector enlazado a poro de pequeño diámetro (Liu et al., 2016). Se están desarrollando dos tipos de sistemas de nanoporos para la secuenciación de ADN, los sistemas de membranas biológicas y la tecnología de sensores de estado sólido (Slatko et al., 2018). Oxford Nanopore Technologies ha desarrollado los secuenciadores MinION portátil, GridION de sobremesa PromethION (Greninger et al., 2015; Slatko et al., 2018).

### 1.2.2.2 Librerías

Una librería contiene los fragmentos de ADN que se van a secuenciar. En general, los pasos de preparación del ADN para el análisis de NGS son: fragmentación

de las secuencias diana a una longitud deseada, unión de adaptadores de oligonucleótidos a los extremos de los fragmentos diana y cuantificación del producto final de la librería para la secuenciación (Head et al., 2014).

Las librerías pueden crearse mediante diferentes métodos. Un método muy utilizado para su creación es HaloPlex, en el que las sondas HaloPlex personalizadas deben diseñarse antes de obtener el kit con la herramienta SureDesign de Agilent. El sistema de enriquecimiento de objetivos HaloPlex amplifica miles de objetivos en la misma reacción, incorporando motivos de secuenciación de extremos emparejados de Illumina estándar. Durante la hibridación, cada muestra se puede indexar de forma única, lo que permite agrupar hasta 96 muestras por carril de secuenciación y la hibridación da como resultado fragmentos de ADN circulares (Coonrod et al., 2014).

Otra opción es la creación de librerías por captura, que fue elegida para este proyecto. Esta tecnología permite la captura de regiones genómicas utilizando sondas largas de ARN de 120 nucleótidos que permiten un enriquecimiento eficiente de las regiones de interés, lo que facilita la llamada de variantes confiables.

Además, las librerías podrían basarse en la amplificación, lo que consiste en un grupo de pares de cebadores de oligonucleótidos, cada par diseñado para amplificar una región genómica específica. Cada panel puede diseñarse para abarcar todas las bases de un gen o puede centrarse en una mutación específica.

### **1.2.3 *Next-Generation Sequencing* y cáncer de mama**

La exploración de mutaciones somáticas del cáncer se ha realizado recientemente mediante el uso masivo de NGS y la implementación de esta tecnología ha avanzado sustancialmente nuestro conocimiento en la biología del cáncer, mediante la identificación de aberraciones genéticas subyacentes al inicio, desarrollo y metástasis tumoral. También ha permitido diversas aplicaciones clínicas, clasificación mejorada de

pacientes, predicción del pronóstico, tratamientos dirigidos, farmacorresistencia y farmacogenética. La NGS es capaz de detectar mutaciones de un solo nucleótido, inserciones y deleciones, variaciones en el número de copias y grandes reordenamientos genómicos (Kamps et al., 2017).

Para la mayoría de las aplicaciones clínicas, el uso de paneles de genes para secuenciar solo un número particular de genes de interés ha sido el método de elección, debido a su rentabilidad y porque al mismo tiempo alcanza una alta cobertura. También ofrece una mayor simplicidad cuando se analizan los datos brutos obtenidos después de la secuenciación. Además, el uso de paneles genéticos en la detección de mutaciones somáticas ha sido de gran ayuda. Después de que los estudios del genoma o del exoma completo identificaran genes relacionados con diferentes tipos de cáncer y mutaciones con implicaciones terapéuticas, los paneles genéticos comenzaron a detectar estos genes (Kamps et al., 2017). Un catálogo de alteraciones moleculares detectadas en muchos tipos de cáncer por NGS es el mencionado anteriormente que se puede encontrar en TCGA (cBioPortal for Cancer Genomics, 2021).

El TCGA es un programa de genómica del cáncer que ha caracterizado molecularmente más de 20.000 cánceres primarios. En CM se obtuvieron muestras de ADN de la línea germinal y del tumor de 825 pacientes. En total, 510 tumores de 507 pacientes fueron sometidos a secuenciación de exoma completo, identificando 30.626 mutaciones somáticas compuestas por 28.319 mutaciones puntuales, 4 mutaciones de dinucleótidos y 2.302 inserciones y deleciones (que varían de 1 a 53 nucleótidos). Las mutaciones puntuales incluyeron 6.486 silenciosas, 19.045 sin sentido, 26 de lectura completa, 506 mutaciones en el sitio de empalme y 819 mutaciones en genes de ARN (Cancer Genome Atlas Network, 2012). En la Tabla 1 del apartado “Clasificación molecular basada en perfiles de expresión genética” se detallaron las alteraciones principales de cada subtipo de CM según el TCGA.



# OBJETIVOS

---



## 2. OBJETIVOS

1. Analizar las características clinicopatológicas de los carcinomas de mama que desarrollan metástasis cutánea.
2. Comparar las diferencias moleculares entre carcinomas primarios de mama y sus metástasis cutáneas.
3. Determinar si el perfil molecular de los carcinomas primarios de mama triple negativo difiere según su patrón metastásico o no.



# MATERIAL Y MÉTODOS

---



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los procedimientos realizados en estudios con participantes humanos cumplen con los estándares éticos del comité de investigación institucional y nacional y con la declaración de Helsinki de 1964 y sus enmiendas posteriores o estándares éticos comparables. El uso de muestras de pacientes para cumplir con los objetivos de esta tesis ha sido aprobado por el Comité de Ética del Hospital Ramón y Cajal mediante dos proyectos, “Diferencias en el perfil mutacional entre los carcinomas de mama primarios y su metástasis cutánea” e “Identificación de perfil mutacional en cáncer de mama metastásico mediante NGS” (230-18, 130-21).

#### 3.1 SELECCIÓN DE PACIENTES

El presente trabajo está basado en el estudio de dos series diferentes:

La **primera serie** del estudio comprendía todos los casos de los CM que desarrollaron MC, siempre y cuando hubiera tejido tumoral disponible, diagnosticados y/o tratados en los Hospitales Universitarios Ramón y Cajal (Madrid, España) y 12 de Octubre (Madrid, España) desde el año 2005 hasta el año 2020, obtenidos de listados retrospectivos de las bases de datos de ambos hospitales.

La **segunda serie** del proyecto incluyó casos de pacientes con CMTN con metástasis no cutáneas o sin metástasis con al menos 5 años sin evidencia de progresión, diagnosticados y/o tratados en el hospital Ramón y Cajal desde el 2010 hasta el año 2018, obtenidos también de listados retrospectivos de la base de datos del hospital Ramón y Cajal.

##### 3.1.1 Selección de las muestras de estudio

Todos los casos correspondían a tejido de tumor primario de CM o tejido de MC de origen mamario perteneciente a piezas de resección quirúrgica o biopsias

diagnósticas, fijadas en formol tamponado al 4% e incluidas en bloques de parafina para su procesado y conservación.

### 3.1.2 Características clinicopatológicas y de seguimiento clínico

Respecto a los datos relacionados con edad, tipo de cirugía, estado menopáusico, antecedentes familiares y personales, tratamientos neoadyuvantes, presencia o no de recidiva local o a distancia, tiempo desde el diagnóstico a la primera metástasis y a la MC en concreto, y fecha de éxitus, se obtuvieron de los sistemas de información de los hospitales Ramón y Cajal y 12 de octubre disponibles en la historia clínica digital. El tamaño, presencia de metástasis ganglionares, LIV, estadio, tipo y grado histológicos se recogieron de los informes de Anatomía Patológica. Y el grado histológico de reevaluó según la clasificación histológica de Nottingham.

Asimismo, se revaluaron los datos inmunohistoquímicos mediante el sistema Agilent Dako Omnis, tales como RE, RP, Ki67 y HER2, y se repitieron de nuevo, cuando la calidad no fue suficiente o faltaba, mediante IHC o hibridación fluorescente in situ (FISH) en el caso de HER2, si había material suficiente para ello. Se evaluaron los RE (Agilent Dako IR084, clone EP1) y RP (Agilent Dako Omnis, clon PgR 1294) según las directrices de ASCO/College of American Pathologists (CAP) de 2020 (Allison et al., 2020). El índice Ki67 (Agilent Dako Omnis, MIB-1) según las directrices del Working Group de 2021 (Nielsen et al., 2021). Y la expresión o amplificación de HER2 (Agilent Dako SK001, clone poly/ Abbot Laboratories, kit PathVysion II), se interpretó de acuerdo con las directrices de ASCO/CAP de 2018 (Wolff et al., 2018).

Además, se realizó IHC de E-cadherina (Agilent Dako Omnis, clon NHC-38) y RA (SP107 Cell Marque, Ventana Medical Systems) en algunos casos. Y sobre un microarray tisular (TMA) (ver más adelante) se detectó expresión de p53 (Agilent Dako Omnis, clon DO-7) y los CNVs en los genes *CCND1*, *MYC*, *FGFR1* y *MDM4*. Para los



FISH se utilizó el kit de sondas Dual color SPEC *CCND1/CEN11*, *MYC/CEN8*, *FGFR1/CEN8* y *MDM4/1p12* de Zytovision.

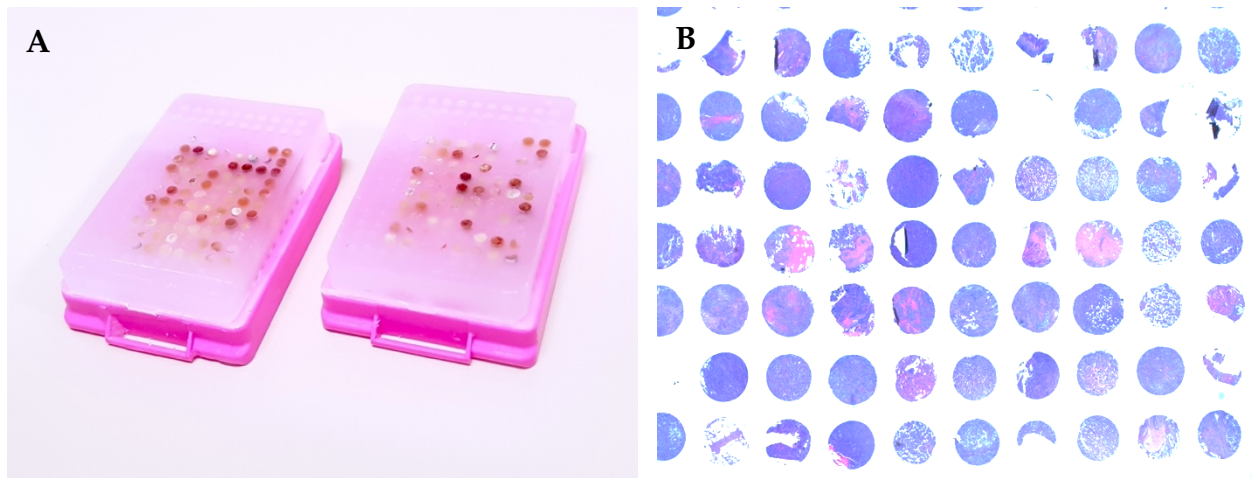
El criterio para la evaluación de la expresión de P53 se basó en la intensidad, el patrón y el porcentaje de núcleos tumorales teñidos y se calificó de forma dicotómica como patrón mutado o *wild-type*. Se consideró patrón mutado si se identificaba una fuerte expresión nuclear en > 10-15% de las células tumorales o había ausencia total de tinción. Se ha descrito en la literatura que ambos patrones de tinción son indicativos de mutaciones en *TP53*, siendo las mutaciones que resultan en un *Stop Codon* las responsables de la pérdida total de expresión de la proteína (Baas et al., 1994; Kaye et al., 2010; Köbel et al., 2010).

Por otro lado, los FISH se observaron con un microscopio de fluorescencia a 100X con aceite de inmersión y para la evaluación se realizó una puntuación detallada de al menos 20 células neoplásicas por muestra. Se consideró que había amplificación cuando la población de células tumorales tenía al menos el doble de señales genéticas que de señales del centrómero del cromosoma respectivo ( $\text{ratio} \geq 2$ ), y polisomía cuando la media de señales del centrómero en las células tumorales era > 3.

### 3.2 DESARROLLO DE UN MICROARRAY TISULAR

Se construyó un TMA mediante cilindros de las muestras (Fig. 7 A). Los cilindros fueron obtenidos a partir de los bloques de parafina, estos fueron de 1,73 mm de diámetro y se obtuvieron mediante un *arrayer*. Este nuevo bloque fue cortado en laminillas de 6-8  $\mu\text{m}$  para llevar a cabo ensayos mediante técnicas de FISH e IHC (Fig. 7 B).

**FIGURA 7. MICROARRAY TISULAR**



**A.** Imagen de los dos microarrays tisulares con muestras de la serie 1. **B.** Preparación de hematoxilina-eosina de un corte del microarray tisular.

### 3.3 SECUENCIACIÓN MASIVA

#### 3.3.1 Disección tumoral

Se obtuvo muestra tumoral de diferentes lesiones de dos modos, para garantizar un mínimo de 30% de células tumorales: mediante “punchs” de bloques de parafina en áreas seleccionadas previamente marcadas en portaobjetos de hematoxilina/eosina (H&E), con el fin de enriquecer la muestra en células tumorales, o mediante secciones de Microtomo RM2255 (Leica) de 10  $\mu\text{m}$  de bloques de parafina de muestras con amplia densidad de células tumorales distribuida de forma homogénea.

#### 3.3.2 Purificación de ADN genómico de tejidos fijados con formalina e incluidos en parafina

Para este paso se utilizó el kit QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen, Valencia, CA, España). El kit proporciona unas condiciones de lisis especiales para liberar el ADN de las secciones de tejido y superar los efectos inhibidores causados por la reticulación de

los ácidos nucleicos con formalina. Utiliza columnas de centrifugación QIAamp MinElute para la purificación de ADN de alta calidad en pequeños volúmenes.

### Procedimiento:

Primero retiramos el exceso de parafina con un bisturí. Luego se sometió la muestra a un proceso de desparafinación, que consistió en incubar la muestra y centrifugarla con xileno para remover la parafina y luego se realizó una segunda incubación con etanol para remover el xileno residual de la muestra. Una vez que la muestra estuvo libre de xilol y se evaporó todo el etanol residual, el sedimento se resuspendió en 180  $\mu$ l de tampón ATL (tampón de lisis de tejidos). Después de agregar 20  $\mu$ l de proteinasa K, mezclamos la muestra con vórtex y se incubó a 56 °C hasta su completa lisis.

Una vez lisada la muestra, se incubó a 90 °C durante 1 hora. Esta incubación en Buffer ATL invierte parcialmente la modificación de ácidos nucleicos con formaldehído. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, todo el lisado se transfirió a la columna QIAamp MinElute sin mojar el borde. Luego, se centrifugó (Eppendorf 5415R Refrigerated Centrifuge) y se desechó el tubo de recolección que contenía el flujo continuo. Los siguientes pasos consistieron en dos lavados de la columna, uno con Tampón AW1 (tampón de lavado 1) y el otro con Tampón AW2 (tampón de lavado 2), en ambos se añadió el tampón en la columna QIAamp MinElute, se centrifugó y se descartó el contenido del tubo recolector. Antes del último paso, la muestra se centrifugó a máxima velocidad para secar completamente la membrana de la columna. Este paso fue necesario, ya que el arrastre de etanol al eluido puede interferir con algunas aplicaciones posteriores. Una vez que la membrana se secó, la columna se colocó en un nuevo recipiente y se aplicó agua libre de nucleasas al centro de la membrana, fue necesaria una breve incubación a temperatura ambiente para aumentar

el rendimiento de ADN. Posteriormente, se centrifugó a toda velocidad, lo que resultó en la extracción del ADN en la parte inferior del Eppendorf que contiene la columna.

### 3.3.3 Cuantificación de las muestras de ADN

Después de la extracción de ADN y como paso previo a la creación de una librería, fue necesario controlar la cantidad de dicho ADN.

Mediante el QUBIT 2.0 (Fluorómetro Thermo Fisher Scientific Qubit 2.0) medimos con precisión la concentración de las muestras. El QUBIT es un fluorómetro de sobremesa para la cuantificación de ADN, ARN y proteínas. El uso de reactivos de última generación selectivos para ADN, ARN y proteínas minimiza los efectos de los contaminantes en la muestra que afectan a la cuantificación. Además, las últimas tecnologías de iluminación y detección utilizadas en el fluorómetro QUBIT 2.0 para lograr la mayor sensibilidad nos permitieron usar tan solo 2  $\mu$ l de muestra y aún así alcanzar altos niveles de precisión, incluso con muestras muy diluidas.

### 3.3.4 Secuenciación dirigida

#### 3.3.4.1 Diseño de panel de genes

Para lograr los objetivos de este proyecto, diseñamos un panel personalizado que incluyó los genes más frecuentemente mutados en CM y en la reparación del ADN.

Se diseñó un panel genético personalizado utilizando la plataforma SureDesign de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EE. UU.) Este incluye 61 genes (*AKT1*, *ARID1A*, *ARID1B*, *ARID5B*, *ATR*, *BCOR*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRAF*, *CASP8*, *CCNE1*, *CDH1*, *CDH4*, *CDH19*, *COL1A1*, *CSMD3*, *CTCF*, *CTNNB1*, *EGFR*, *ERBB2*, *ESR1*, *FBXW7*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FOXA2*, *GRB7*, *GSDMB*, *MAP2K4*, *KRAS*, *MAP3K1*, *MLL3*, *MLH1*, *MKI67*, *MSH2*, *MSH6*, *MYC*, *NCOR1*, *NF1*, *NRAS*, *PGAP3*, *PIK3R1*, *PNMT*, *POLE*, *PPP2R1A*, *PRPF18*, *PTEN*, *KMT2B*, *RB1*, *RPL22*, *SF3B1*, *SPOP*, *STARD3*, *TAF1*, *TBX3*,

*TCAP, TP53, VGLL1, ZNF217, ZNF703*) y 8 regiones de amplificación (chr3: 176730001-18804866, chr8: 35066171-40705120, chr8: 127339481-131439911, chr11: 68475551-70356153, chr12: 5408501-10102027, chr17: 31873304-38102169, chr19: 28687501-32402303, chr20: 49794259-54614800), que incluyen genes como *PIK3CA, FGFR1, MYC, CCND1, KRAS, ERBB2, CCNE1* y *ZNF217*.

### 3.3.4.2 Creación de librerías

La construcción de librerías consistió en la creación de una colección de fragmentos de ADN de interés. En este proyecto, se utilizó para la primera serie el protocolo SureSelect XT FFPE (Agilent Technologies, Inc.) modificado y puesto a punto en el laboratorio de investigación de Anatomía Patológica del Hospital Ramón y Cajal para el secuenciador ION Torrent S5™ (Thermo Fisher Scientific). Y para la segunda serie se crearon las librerías siguiendo el protocolo SureSelect XT FFPE (Agilent Technologies, Inc.) sin modificar para llevar a cabo la secuenciación con el sistema NovaSeq™ 6000 (Illumina). Para esta segunda serie, se secuenció el exoma completo, por ello, se usó una tecnología distinta a la usada en la primera serie, en la que se realizó una secuenciación dirigida a un panel de genes concreto.

Protocolo para la creación de librerías mediante el protocolo SureSelect XT FFPE (Agilent Technologies, Inc.) modificado.

- Fragmentación mecánica Covaris (M220 Focused-ultrasonicator con tecnología AFA®). La generación de fragmentos de ADN es un paso crítico de preparación de muestras requerido por todos los secuenciadores. El ultrasonicator Covaris aplica fuerzas de cizallamiento hidrodinámicas al ADN para fragmentarlo aleatoriamente. Se lleva a cabo en condiciones isotérmicas que garantizan una fragmentación imparcial y una alta recuperación del ADN de doble hebra. Fragmentamos entre 1-2 µg de ADN en tubos de 50 µl bajo las condiciones de la Tabla 4 en fragmentos de entorno a 250 pb.

TABLA 4. CONDICIONES APLICADAS PARA LA FRAGMENTACIÓN MECÁNICA

CONFIGURACIÓN	FFPE ADN
Factor de trabajo	10%
Pico de potencia incidente (PIP)	75
Ciclos	200
Tiempo	360 seg
Temperatura	22° a 8 °C

- Reparación de extremos. El ADN fragmentado requiere de la reparación de extremos 3' y 5' antes de la ligación de los adaptadores. Se generan extremos romos a los que se unirán los adaptadores.
- Purificación. El objetivo de este paso fue eliminar todos los componentes que no eran ADN de la muestra. Para ello se utilizó el kit AMPure XP (Beckman Coulter, Inc.), este consistió en bolas magnéticas que se unen al ADN y lo reclutan para su posterior lavado con etanol al 70%.
- Unión de adaptadores y *barcodes*. En esta fase se unieron unos adaptadores a la secuencia que sirven de punto de inicio para la secuenciación. Asimismo, estos adaptadores son utilizados para anclar la molécula de ADN a una esfera sintética, a partir de la cual se amplificará el fragmento de ADN. Además, en este paso se unieron cebadores (*barcodes*) específicos que permiten la identificación de cada muestra después de la secuenciación. Para que se den estas uniones se programa el termociclador con el programa de la Tabla 5.

**TABLA 5. PROGRAMA PARA LA UNIÓN DE ADAPTADORES Y BARCODES**

FASES	TEMPERATURA	TIEMPO
1	25°C	15 min
2	72°C	5 min
3	4°C	∞

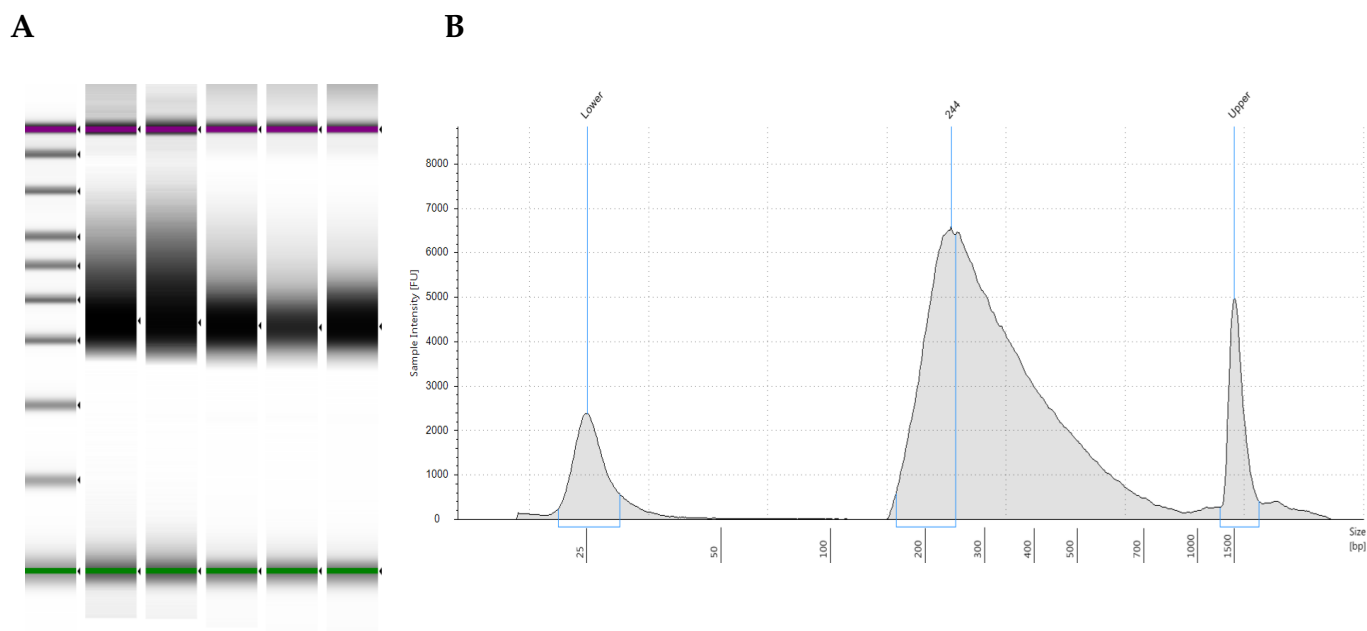
- Purificación. Se realiza una segunda purificación con el kit AMPure XP (Beckman Coulter, Inc.) y los lavados con etanol al 70%.
- Amplificación. Se obtuvo una gran cantidad de copias mediante PCR anidada (12 ciclos), utilizando el programa de termociclador detallado en la Tabla 6.

**TABLA 6. PROGRAMA PARA AMPLIFICACIÓN DE LIBRERÍAS**

FASES	NÚMERO DE CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
1	1	98°C	2 min
2	12	98°C	30 seg
		60°C	10 seg
		72°C	1 min
3	1	72°C	10 min
4	1	4°C	∞

- Purificación. Se realiza una tercera purificación con el kit AMPure XP (Beckman Coulter, Inc.) y los lavados con etanol al 70%.
- Check point. La librería se cuantificó por TapeStation 2200 (Agilent 2200 TapeStation), mediante el ensayo D1000 ScreenTape, ya que era necesario un punto de control, para confirmar que valía la pena continuar el proceso. (Fig. 8)

**FIGURA 8. VISUALIZACIÓN DE LA INTENSIDAD DE LAS MUESTRAS EN TAPESTATION 2200**



**A.** Imagen en la que se visualiza la intensidad de las muestras y la medida de la mayor parte de los fragmentos de la librería entorno a 250 pb según el marcador. **B.** Gráfico de intensidad de las muestras, el segundo pico representa la mayor parte de los fragmentos que miden entorno a 250 pb.

- Hibridación con las sondas específicas del panel diseñado. El ADN se mezcló con una mezcla de hibridación que contenía las sondas. Utilizando el programa de termociclador óptimo (Tabla 7), las sondas se unen a los genes de interés del producto de amplificación.

**TABLA 7. PROGRAMA PARA LA HIBRIDACIÓN**

FASES	TEMPERATURA	TIEMPO
1	95°C	5 min
2	65°C	∞ (hasta 5 min)



- Captura. Las sondas que se utilizaron en el paso anterior se unieron de antemano a partículas de biotina. Por tanto, para la captura de las sondas de interés se utilizó la afinidad entre biotina y estreptavidina para su obtención. Se añadió estreptavidina magnética a la solución. Se unió al complejo biotina-sonda, y este fue capturado por un soporte magnético.
- Amplificación. Los fragmentos de interés recuperados se amplificaron mediante una PCR anidada (11 ciclos) (Tabla 8).

**TABLA 8. PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN DE LIBRERÍA FINAL**

FASES	NÚMERO DE CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
1	1	98°C	2 min
2	11	98°C	30 seg
		60°C	10 seg
		72°C	1 min
3	1	72°C	10 min
4	1	4°C	∞

- Purificación. Se utilizó el kit AMPure XP (Beckman Coulter, Inc.), como en las purificaciones anteriores, para eliminar los residuos de la PCR. Las muestras se recogieron en un volumen final de 15 µl de agua libre de nucleasas.
- Control cuantitativo de las librerías. La cantidad de ADN de las librerías finales se midió mediante el QUBIT 2.0 (Fluorómetro Thermo Fisher Scientific Qubit 2.0), obteniendo así las concentraciones finales de las mismas.
- Pool de secuenciación. Para la secuenciación se realizaron pooles de 6 librerías a una concentración de 100 pM.

### 3.3.4.3 Secuenciación con Ion Torrent S5

La secuenciación de las muestras de la primera serie fue llevada a cabo mediante el secuenciador Ion Torrent S5 (Thermo Fisher Scientific) de “segunda generación”.

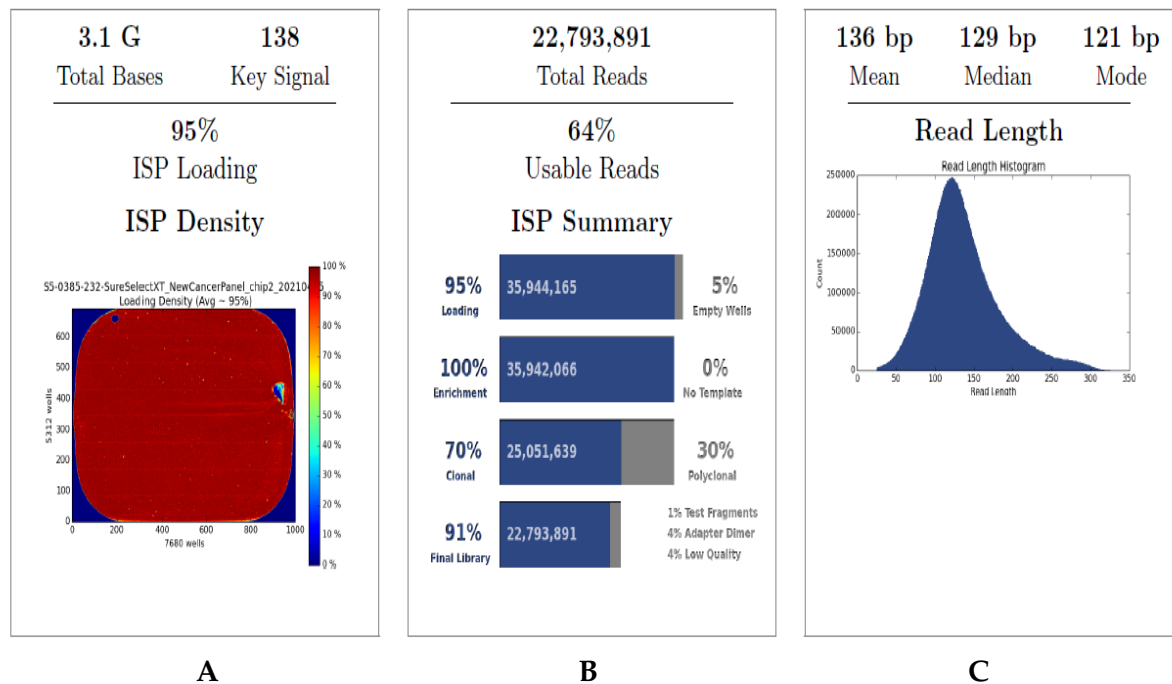
La tecnología Ion Torrent <sup>TM</sup> convierte directamente la secuencia de nucleótidos en información digital en un chip semiconductor (Rothberg et al., 2011). En una reacción de síntesis de ADN, cuando se incorpora un nucleótido correcto frente a su base complementaria en una cadena de ADN en crecimiento, se libera un ion hidrógeno. Esto cambia el pH de la solución que se puede registrar como un cambio de voltaje por un sensor de iones, al igual que un medidor de pH. Si no se incorpora ningún nucleótido, no se produce ningún pico de voltaje. Inundando y lavando secuencialmente una cámara de secuenciación con reactivos que incluyen sólo uno de los 4 nucleótidos a la vez, se producen cambios de voltaje cuando se incorpora el nucleótido apropiado (Slatko et al., 2018).

Durante el proceso de secuenciación, las reacciones se dan en millones de pocillos que cubren un chip semiconductor con millones de píxeles que convierten la información química en información de secuenciación. Primero, los fragmentos de ADN se unen mediante los adaptadores a unas perlas (ISP) con secuencias complementarias y el ADN se amplifican en la perla mediante PCR en emulsión. Este proceso permite que millones de perlas tengan cada una múltiple copia de una secuencia de ADN. A continuación, las perlas se hacen fluir a través del chip que contiene los pocillos de modo que solo una de ellas pueda entrar en cada pocillo (Fig. 10). Cuando los reactivos de secuenciación fluyen a través de los pocillos, se incorpora el nucleótido apropiado, se libera un ion hidrógeno y se registra la señal (Slatko et al., 2018).

Para este proyecto usamos los chips 530 <sup>TM</sup> (Thermo Fisher Scientific), en los que introducimos el pool con 6 librerías. Este chip proporciona de 15-20 millones de lecturas, y tiene una capacidad de 3-4 Gb, lo que nos permite secuenciar las muestras a

una profundidad de entorno a 100X. El chip tarda entorno a 12 horas en cargarse, una vez cargado la secuenciación dura entre 3-4 horas y la duración del procesamiento de la señal para obtener los archivos fastq es de 12 horas. (Fig. 9)

**FIGURA 9. RESUMEN DEL RUN**



**A.** Imagen de chip cargado. Se observa que la densidad de carga es del 95%, con un 5% de pocillos vacíos. **B.** Resumen de la carga. Hay un 100% de enriquecimiento, por lo que todas las ISP son válidas. El 70% de las ISP son clonales, es decir, el 70% de las ISP solo contienen una única secuencia de ADN. EL 91% del material secuenciado son librerías finales, siendo el porcentaje restante fragmentos de baja calidad y dímeros de adaptadores. **C.** Longitud de los fragmentos secuenciados, la mayor parte de los fragmentos miden entorno a 129 pb.

### 3.3.5 Secuenciación de exoma completo

#### 3.3.5.1 Creación de librerías

Protocolo para la creación de librerías mediante el protocolo SureSelect XT FFPE (Agilent Technologies, Inc.) sin modificar.

(En la Fig. 10 se representa esquemáticamente este protocolo de construcción de librerías)

- Fragmentación mecánica Covaris. Igual que en el protocolo modificado.
- Reparación de extremos. Paso realizado para para convertir los 5' y 3' protuberantes en extremos romos
- Purificación. Igual que en el protocolo modificado.
- Adenilación. Los extremos del ADN se modificaron mediante la adenilación de los extremos 3' para crear un protuberante de base individual.
- Purificación. Igual que en el protocolo modificado.
- Ligación de adaptadores. Se unen adaptadores que contienen un 3' protuberante de desoxitimidina de base sencilla, se ligan a los fragmentos de ADN adenilados.
- Purificación. Igual que en el protocolo modificado.
- Amplificación. Se obtuvo una gran cantidad de copias mediante PCR anidada (10 ciclos), utilizando el programa de termociclador propuesto por el productor (Tabla 9).

**TABLA 9. PROGRAMA PARA LA AMPLIFICACIÓN PREHIBRIDACIÓN**

FASES	NÚMERO DE CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
1	1	98°C	2 min
2	10	98°C	30 seg
		65°C	30 seg
		72°C	1 min
3	1	72°C	10 min
4	1	4°C	∞

- Purificación. Igual que en el protocolo modificado.

- Check point. Igual que en el protocolo modificado.
- Hibridación con la sonda de exoma completo. “SureSelect Human All Exon v6” (Agilent technologies). Igual que en el protocolo modificado.
- Captura. Igual que en el protocolo modificado.
- Amplificación e indexación. Los fragmentos de interés recuperados se amplificaron y además se utilizaron índices para permitir su identificación después de la secuenciación. Los índices son cebadores específicos que permiten la identificación de cada muestra. Este paso se realizó bajo las condiciones de la Tabla 10.

**TABLA 10. PROGRAMA PARA LA AMPLIFICACIÓN E INDEXACIÓN**

FASES	NÚMERO DE CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
1	1	98°C	2 min
2	14	98°C	30 seg
		57°C	30 seg
		72°C	1 min
3	1	72°C	10 min
4	1	4°C	∞

- Purificación. Igual que en el protocolo modificado.
- Control cuantitativo de las librerías. Igual que en el protocolo modificado.
- Pool de secuenciación. Para la secuenciación se realizaron pooles de 11-12 librerías a una concentración de 1,5 nM.

FIGURA 10. CREACIÓN DE LIBRERÍAS

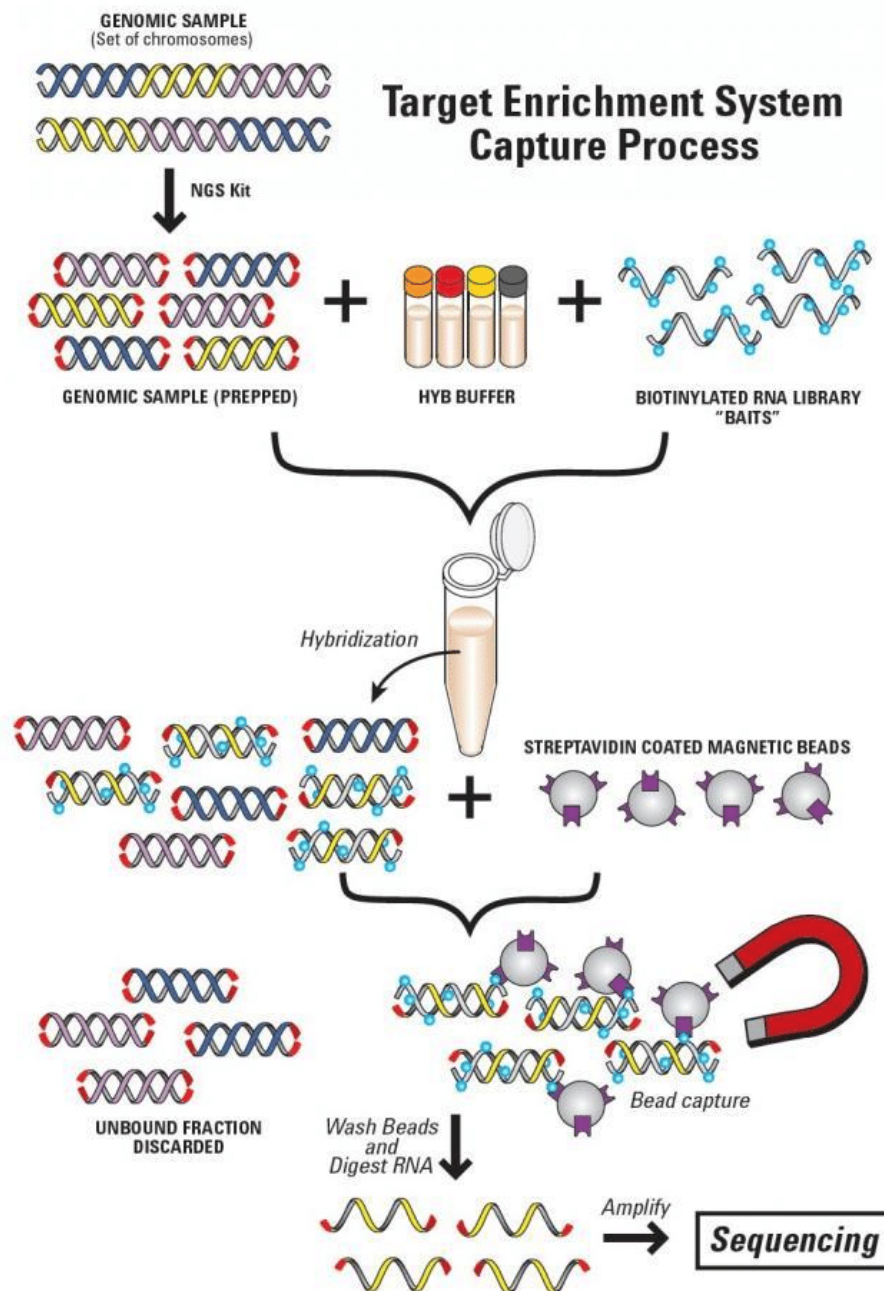


Imagen de la captura de librerías con el protocolo SureSelect XT de Agilent ®. Las librerías están asociadas con sondas biotiniladas. Después de la hibridación, las perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina se integran en el medio de reacción. El complejo librería-sonda-perla se selecciona mediante un imán. Después del lavado, las librerías capturadas se utilizan para la secuenciación.

### 3.3.5.2 Secuenciación con NovaSeq de Illumina

La secuenciación de las muestras de la segunda serie fue llevada a cabo mediante el secuenciador NovaSeq (Illumina) de “segunda generación”, ya que necesitábamos un secuenciador que tuviera la capacidad de secuenciar exoma completo de manera rentable.

La secuenciación de Illumina se basa en una técnica conocida como "amplificación en puente" en la que se utilizan moléculas de ADN con adaptadores ligados a los extremos como sustratos para reacciones de síntesis de amplificación repetidas en un soporte sólido que contiene secuencias de oligonucleótidos complementarias al adaptador ligado. Los oligonucleótidos del soporte están espaciados de manera que el ADN, que luego se somete a rondas repetidas de amplificación, crea "agrupaciones" clonales que constan de aproximadamente 1000 copias de cada fragmento de oligonucleótidos. Durante las reacciones de síntesis, los nucleótidos modificados patentados, correspondientes a cada una de las cuatro bases, cada uno con un marcador fluorescente diferente, se incorporan y luego se detectan. Los nucleótidos también actúan como terminadores de síntesis para cada reacción, que se desbloquean después de la detección para la siguiente ronda de síntesis. Las reacciones se repiten durante 300 o más rondas (Slatko et al., 2018).

Los pools de secuenciación los corrimos en unos “Flow Cell SP” (Illumina) de 300 ciclos con una capacidad de 200–250 Gb, lo que nos permitió obtener una profundidad de exomas de entorno a 100X.

### 3.3.6 Análisis bioinformático

Las tecnologías NGS proporcionan una gran cantidad de datos para procesar. Para ello, es necesario el desarrollo de pipelines de análisis y el uso de bases de datos, y debe integrarse con flujos de trabajo automatizados.

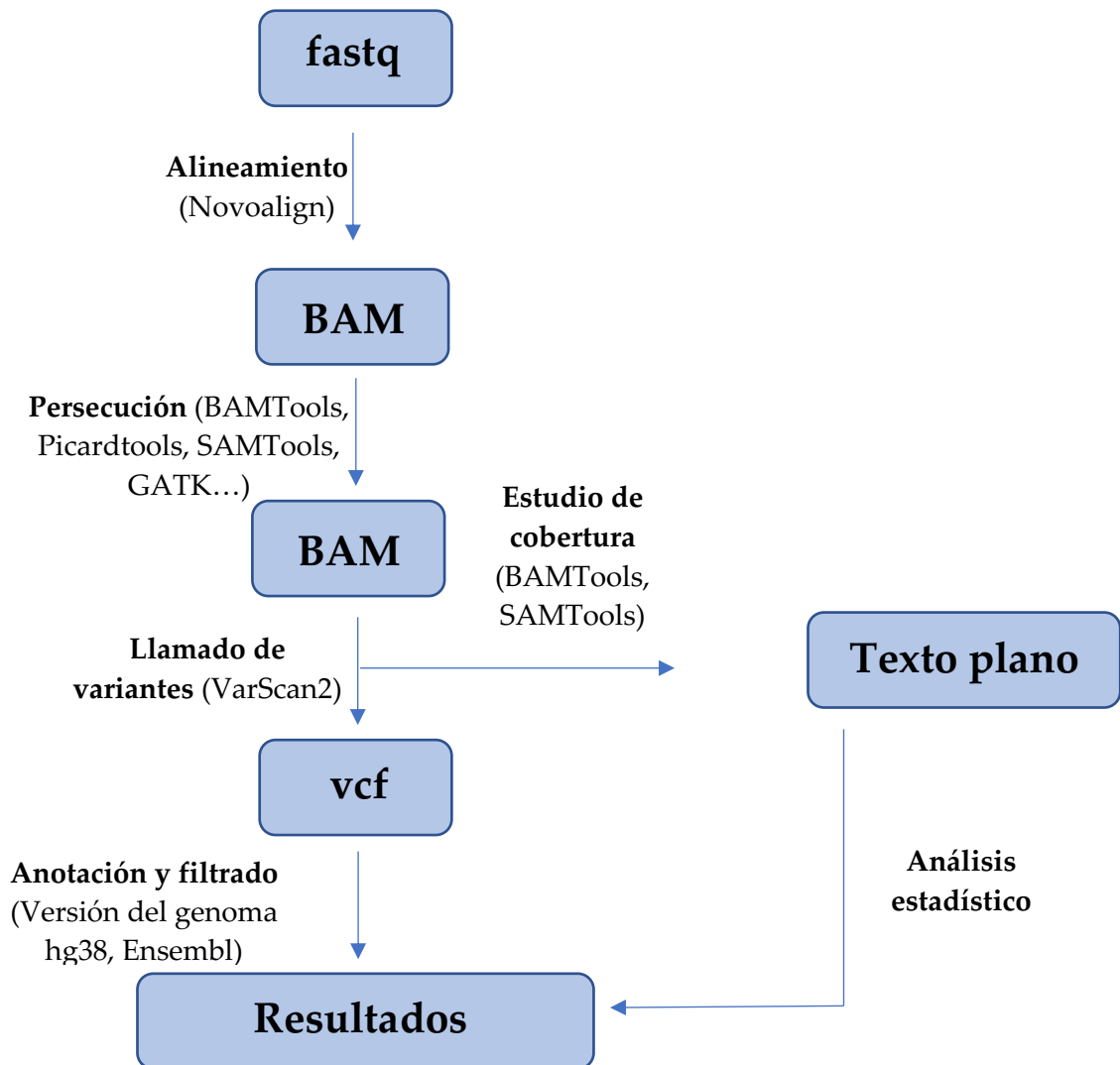
En este estudio, el análisis bioinformático se llevó a cabo mediante un pipeline específico (Fig. 11) utilizando Novoalign (<http://www.novocraft.com/products/novoalign/>) como alineador (se obtiene un archivo BAM) y VarScan (Koboldt et al., 2012) como *variant-caller* (se obtiene un archivo VCF), sin filtros. La anotación de variantes se realizó utilizando el VEP de Ensembl versión 88 (<http://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html>), que corresponde a la versión hg38 del genoma de referencia humano.

Posteriormente, las variantes se filtraron siguiendo los siguientes criterios, según:

- Consecuencia, con este filtro eliminamos aquellas variantes que no tenían evidencia de ser patogénicas, filtrando aquellas que estaban codificando secuencias, involucrando cambios en el marco de lectura, codones incompletos, *missense*, *splicing* y cambios de aminoácidos que generan un codón de parada o pérdida de un codón de parada.
- Frecuencia de variante, con este filtro pudimos seleccionar todas las variantes que estuvieran en un porcentaje superior al 10%. Esto nos permitió eliminar todas las que aparecían por errores.
- Frecuencia global de alelos menores (GMAF), con este filtro seleccionamos aquellas variantes que se encontraban en un porcentaje menor a 1% en la población, ya que las que se encontraban en un porcentaje mayor no indicaban ser patógenas.
- Sesgo de hebra tanto de la variante como del alelo de referencia.

Finalmente, se realizó usando el archivo BAM la inspección visual como criterio de selección final mediante la herramienta de visualización interactiva IGV. Adicionalmente, de esta forma pudimos analizar la cobertura.



**FIGURA 11. ESQUEMA DEL PIPELINE USADO PARA EL ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO**

Para el análisis posterior de las muestras, se filtraron los 206 genes involucrados en mayor frecuencia en CM según el estudio METABRIC de cBioportal (cBioPortal for Cancer Genomics, 2021). (Tabla suplementaria 1)

Para el estudio de la variación en el número de copias (CNVs), que consiste en macroinserciones o macrodelecciones de regiones de ADN de entre 100 y 3.000.000 de pares de bases (Zhang et al., 2009), se utilizó por un lado el paquete CONTRA (J. Li

et al., 2012), y por otro lado el CNVkit (Talevich et al., 2016). Estas son las dos únicas herramientas que permiten trabajar sin muestras control de tejido sano para comparar.

El paquete CONTRA utiliza para analizar la inestabilidad del genoma una línea de base obtenida de varias muestras de tejidos fijados con formalina (FFPE) secuenciadas con el mismo panel, esto sería el control con esta herramienta.

En cambio, el CNVkit crea una línea de base de cada muestra individualmente usando todos los *reads* de la misma. Esta herramienta utiliza tanto las lecturas de las regiones de interés como las lecturas de regiones capturadas no específicamente para calcular las proporciones de copias  $\log_2$  en el genoma para cada muestra. Hace las correcciones usando los valores de profundidad de la lectura y el conteo CG de la fracción genómica.

Es complicado extraer información de CNVs a partir de un número reducido de muestras cuando no hay disponible referencia adecuada o un conjunto de muestras normales. Las llamadas del número de copia no serán tan precisas, pero los CNVs a gran escala son visibles. Además, al trabajar con muestras parafinadas no conocemos la pureza celular de la muestra, inferimos que el número de células tumorales es muy elevado por la región seccionada de la muestra, pero no tenemos el porcentaje exacto. Por ello, para obtener unos mejores resultados realizamos el análisis de CNVs con las dos herramientas.

### 3.4 VALIDACIONES DE MUTACIONES

#### 3.4.1 Secuenciación Sanger para validación de mutaciones

Se confirmaron mediante la secuenciación de Sanger mutaciones encontradas en baja frecuencia y mutaciones probablemente germinales encontradas mediante secuenciación masiva. En la Tabla suplementaria 2 se pueden ver las mutaciones validadas y los primers que se diseñaron para dicha validación.

Para la secuenciación directa de Sanger, se utilizó el reactivo *ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup* para la eliminación enzimática del exceso de cebadores y nucleótidos no incorporados en el producto de PCR amplificado (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Usamos 10 µl de producto de PCR purificado, 0,75 µL de cebador designado (concentración de 10 µM) y el kit de secuenciación del ciclo BigDye Terminator v1.1 (Thermo Fisher Scientific) para las reacciones de secuenciación. Los productos de secuenciación se purificaron mediante precipitación con etanol y las pruebas de Sanger se llevaron a cabo en el SeqStudio (Thermo Fisher Scientific). Los electroferogramas se analizaron utilizando el software Chromas 2.6.6 (Technelysium Pty Ltd) y las secuencias obtenidas se cargaron en la herramienta BLASTN para la búsqueda de homología.

### 3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se centraron en primer lugar en estudiar si las mutaciones de los distintos genes se distribuyen de forma homogénea en tumores primarios o lesiones cutáneas. Para ello se estudiaron la asociación de las variables cualitativas (tumor primario/metástasis vs. mutación/no mutación o amplificación/no amplificación) mediante la prueba estadística chi cuadrado ( $\chi^2$ ) o la prueba exacta de Fisher. Para estudiar la asociación de la presencia de mutaciones en muestras de tumor

primario y MC con los distintos parámetros clinicopatológicos y demográficos de los pacientes también se aplicará el test de  $\chi^2$ .

Para el análisis de supervivencia se utilizó el método de Kaplan-Meier para el análisis univariante. Se calculó la supervivencia global en función de las características clinicopatológicas (edad, pT, pN, tipo histológico, tipo molecular subrogado, LIV, grado histológico, estadio clínico, localización de la metástasis y terapia neoadyuvante) y de las mutaciones en los genes *TP53* y *PIK3CA* y CNVs en *MYC*, *MDM4*, *FGFR1* y *CCND1*. Posteriormente, se utilizaron modelos de riesgos proporcionales de Cox para un análisis multivariante incluyendo las variables que influían de manera estadísticamente significativa en la supervivencia.

Para todos los test estadísticos se consideró significativo el valor de  $p \leq 0,05$ .

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software R versión 4 .1.

# RESULTADOS

---



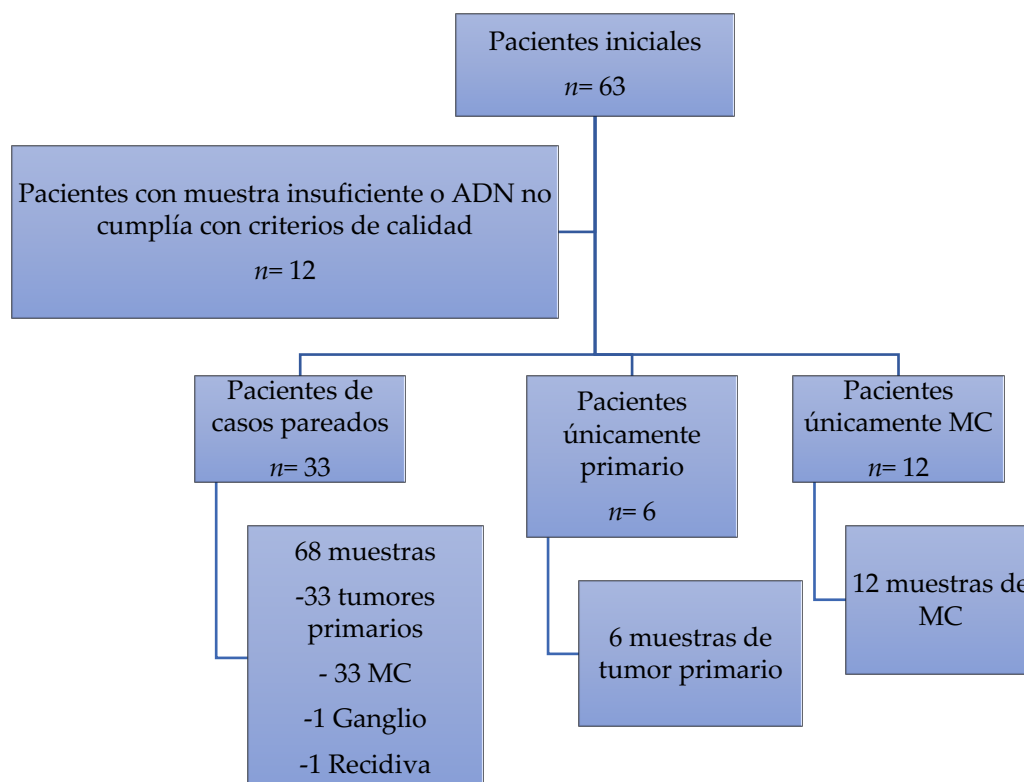
## 4. RESULTADOS

### SERIE 1

#### 4.1. CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS E INMUNOFENOTÍPICAS

La serie 1 constó de 86 muestras de 51 pacientes diagnosticadas entre 2005 y 2020. El tipo de muestra se distribuyó de la siguiente manera, 39 tumores primarios de mama, 45 muestras de MC, 1 ganglio y 1 recidiva (Tabla suplementaria 1), de todos estos casos 33 eran pareados. De 6 pacientes, existía un antecedente de tumor primario, uno de 1984, uno de 1986, dos de 1997, uno de 2003, y otro de 2002, estos tumores no estaban disponibles. Debido a los años transcurridos de un tumor a otro (10-27 años) y a la no disponibilidad de los más antiguos, no pudimos precisar si las muestras secuenciadas como tumor primario en estos casos eran recidivas o segundos tumores primarios. (Fig. 12)

FIGURA 12. DIAGRAMA DE PACIENTES Y MUESTRAS DE LA SERIE 1 DEL ESTUDIO



### 4.1.1 Características clinicopatológicas

Las características clinicopatológicas de las 51 pacientes de la serie 1 se detallan en la Tabla 11.

La edad mediana de las pacientes al diagnóstico fue de 61 años, siendo 23 pacientes (45%) menores o igual a 60 años y 28 pacientes (55%) mayores a 60 años. La media de la población estará con un 95% de probabilidades dentro de 60,6 más o menos 4,4 veces el error estándar (intervalo de confianza=  $60,6 \pm 4,4$  error estándar).

Las MC se desarrollaron a distancia en 22 pacientes (44%) y localmente en 28 (56%). De una de ellas no disponemos de este dato.

Del tamaño tumoral (pT) sólo se tenía el dato de 37 de ellas, ya que de 12 diagnosticadas en estadio IV y una en IIIC no se midieron estos parámetros y una paciente se operó en su país de origen. De los 37 tumores primarios con pT conocido, 7 casos (18,9%) eran pT1, 19 casos (51,4%) pT2, 6 casos (16,2%) pT3 y 5 casos (13,5%) pT4.

En relación con la presencia de metástasis en ganglios axilares, de los 35 casos en que estaba disponible este dato, 12 casos (34,3%) no mostraban metástasis. De los 23 casos con afectación axilar (N+, 65,7%), la distribución fue la siguiente: 12 casos N1 (34,3%), 4 casos N2 (11,4%) y 7 casos N3 (20%). Falta este dato de 16 casos debido al alto número de pacientes diagnosticadas en estadio IV a las que no se les realizó cirugía.

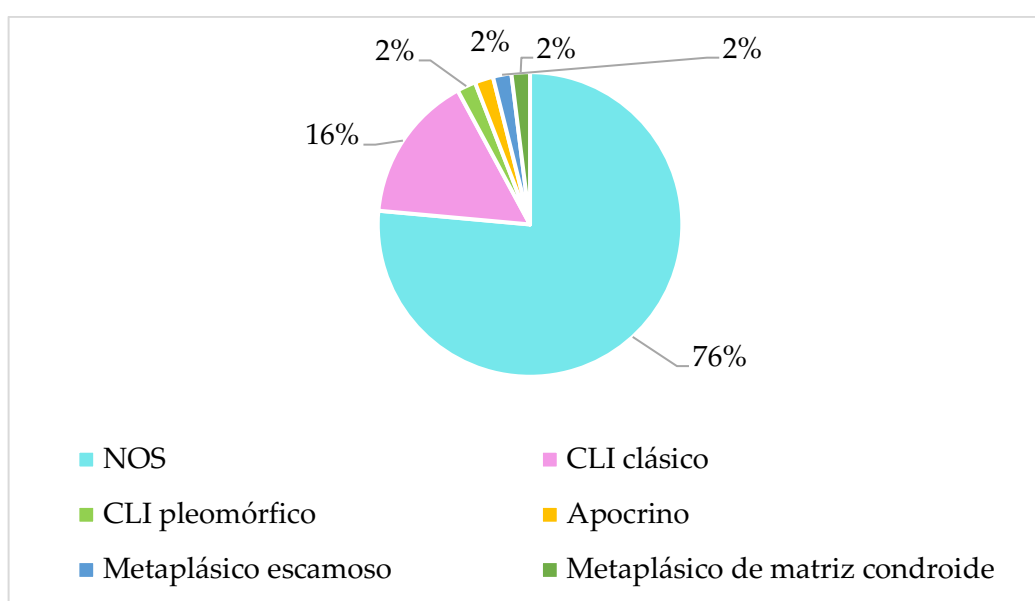
Con respecto al estadio anatómico, según AJCC, 2 casos (4,2%) correspondían a un estadio IA, 10 casos (20,8%) a un estadio IIA, 7 casos (14,6%) a un estadio IIB, 4 casos (8,3%) a IIIA, otros 4 casos (8,3%) a IIIB, 6 casos (12,5%) a un IIIC y 15 casos (31,3%) a un estadio IV.

Al estudiar la distribución de tipos histológicos, 39 casos (76,5%) correspondían a carcinomas infiltrantes NOS, siendo el resto subtipos histológicos especiales. El grupo



más numeroso, 8 casos (16%), correspondían a CLI clásico, 1 caso (2%) a CLI pleomórfico, en otro caso se observó diferenciación apocrina, otro caso era metaplásico escamoso (2%) y otro metaplásico productor de matriz condroide (2%) (Fig. 13). Los 9 CLI mostraron pérdida de expresión de cadherina E.

**FIGURA 13. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA DISTRIBUCIÓN DE TIPOS HISTOLÓGICOS EN LA SERIE 1**



En referencia al grado histológico, 1 (2,1%) correspondía a grado 1, 22 (43,1%) a grado 2 y 28 (54,9%) a grado 3.

LIV estaba presente en 17 casos (34,7%), mientras que en 32 casos (65,3%) no se objetivó y de 2 casos era dudosa.

En referencia a los biomarcadores en CM, 28 casos (54,9%) mostraban expresión de RE, siendo negativos 23 casos (45%). Por su parte, 22 casos mostraban expresión de RP (43,1%) y negatividad 29 casos (56,9%). Con respecto a HER2, 43 casos (84,3%) mostraban ausencia de sobreexpresión y/o amplificación, siendo positivos 8 casos (15,7%).

## RESULTADOS

En cuanto a las MC, 23 casos (45%) mostraban expresión de RE siendo negativos 28 casos (54,9%). Por su parte, 16 casos mostraban expresión de RP (31,4%) y negatividad 35 casos (68,6%). Con respecto a HER2, 47 casos (92,1%) mostraban ausencia de sobreexpresión y/o amplificación, siendo positivos 6 casos (11,8%).

Estratificando el índice proliferativo Ki67, de 51 casos, 16 (31,4%) mostraban un Ki67  $\leq$ 15%, 13 casos (25,5%) del 16-29%, y 22 casos (43,1%)  $\geq$  30%.

**TABLA 11. CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS DE LA SERIE 1**

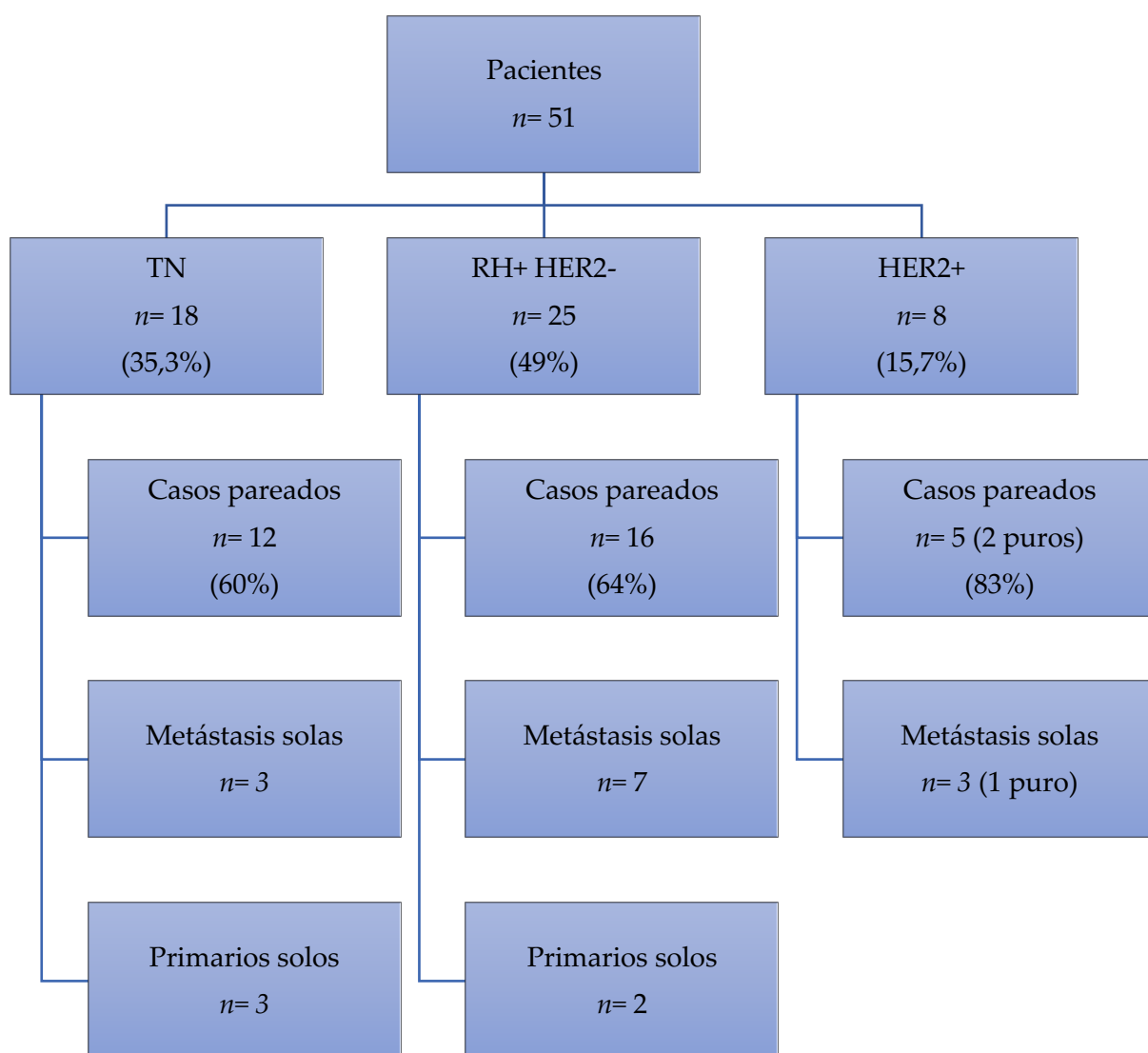
SERIE 1		
		Casos <i>n</i> (%)
<b>Sexo</b>	Mujer	51 (100)
<b>Edad</b>	$\leq$ 60	23 (45)
	> 60	28 (55)
<b>Localización</b>	MI	29 (57)
	MD	22 (43)
<b>Metástasis cutánea</b>	Local	28 (56)
	A distancia	22 (44)
	NC	1
<b>Estado menopáusico al diagnóstico</b>	Sí	38 (92,7)
	No	3 (7,3)
	NC	10
<b>pT</b>	1	7 (18,9)
	2	19 (51,4)
	3	6 (16,2)
	4	5 (13,5)
	NC	14
<b>pN</b>	0	12 (34,3)

	1	12 (34,3)
	2	4 (11,4)
	3	7 (20)
	NC	16
<b>AJCC estadio anatómico</b>	IA	2 (4,2)
	IIA	10 (20,8)
	IIB	7 (14,6)
	IIIA	4 (8,3)
	IIIB	4 (8,3)
	IIIC	6 (12,5)
	IV	15 (31,3)
	NC	3
<b>Grado Histológico</b>	1	1 (2,1)
	2	22 (43,1)
	3	28 (54,9)
<b>LIV</b>	Sí	17 (34,7)
	No	32 (65,3)
	NC	2
<b>Marcadores inmunohistoquímicos</b>	RE	28 (54,9)
	RP	22 (43,1)
	HER2	8 (15,7)
<b>Ki 67</b>	≤ 15%	16 (31,4)
	16-29%	13 (25,5)
	≥ 30%	22 (43,1)
<b>Fenotipo molecular</b>	Luminal HER2-	25 (49)
	Luminal HER2+	5 (9,8)
	HER2+	3 (5,9)
	TN	18 (35,3)

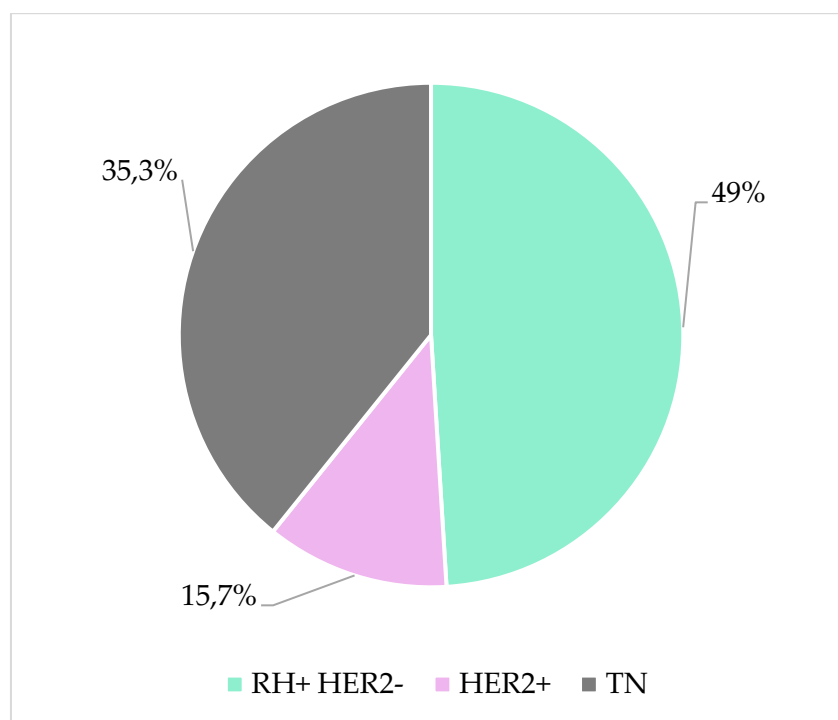
4.1.2 Fenotipos moleculares

De esta forma en la serie 1, 25 casos (49%) correspondían a un fenotipo RH+ HER2-, 8 casos (15,7%) a HER2+, siendo tres de éstos HER2+/RH-, y 18 casos (35,3%) fueron TN (Fig. 14 y 15).

FIGURA 14. DIAGRAMA DE CASOS DE LA SERIE 1 AGRUPADOS SEGÚN FENOTIPO MOLECULAR



**FIGURA 15. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA DISTRIBUCIÓN DE LOS DIFERENTES FENOTIPOS EN LOS CARCINOMAS PRIMARIOS DE LA SERIE 1**



#### **4.1.2.1 Distribución de fenotipos en los tumores primarios y en las metástasis cutáneas en función de la localización de la metástasis**

De las 51 pacientes, se incluyeron un total de 38 tumores primarios y 44 MC. En la Tabla 12 se presenta la distribución de los fenotipos moleculares. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de fenotipos según la localización de la metástasis ni en los tumores primarios ( $p= 1$ ), ni en las MC ( $p= 0,77$ ).

**TABLA 12. DISTRIBUCIÓN DE FENOTIPOS SEGÚN LOCALIZACIÓN DE LA METÁSTASIS CUTÁNEA**

		TUMORES PRIMARIOS ( <i>n</i> = 38)	METÁSTASIS CUTÁNEA ( <i>n</i> = 44)
		<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)
<b>METÁSTASIS CUTÁNEA</b>	TN	8 (42)	10 (50)
<b>A DISTANCIA</b>	RH+HER2-	9 (47)	8 (40)
<b><i>n</i>= 22</b>	HER2+	2 (11)	2 (10)
<b>METÁSTASIS CUTÁNEA</b>	TN	8 (42)	9 (36)
<b>LOCAL</b>	RH+HER2-	9 (47)	12 (50)
<b><i>n</i>= 28</b>	HER2+	2 (11)	3 (13)

#### 4.1.2.2 Conversión de fenotipo entre tumor primario y metástasis cutánea

De los 33 casos pareados, se confirmó el cambio de fenotipo entre el primario y la MC en 5 casos (15%), siendo el más común de luminal a TN (Tabla 13).

En el caso Pt14 en la metástasis perdió la amplificación de HER2; en cambio, en el caso Pt32 en la metástasis se sobreexpresó HER2 como consecuencia de polisomía del cromosoma 17.

TABLA 13. CAMBIO FENOTIPO ENTRE PRIMARIO Y METÁSTASIS

TUMOR	FENOTIPO
Pt7_Primary	Luminal B
Pt7_Metástasis	TN
Pt18_Primary	Luminal B
Pt18_Metástasis	TN
Pt29_Primary	Luminal A
Pt29_Metástasis	TN
Pt14_Primary	Luminal HER2+
Pt14_Metástasis	Luminal A
Pt32_Primary	Luminal B
Pt32_Metástasis	Luminal HER2+

#### 4.1.3 Receptores de andrógenos en casos triple negativos

Los RA en pacientes TN se relacionan con una menor proliferación celular y menor presencia de marcadores basales, además son característicos de tumores apocrinos, que tienen un patrón de mutación diferente al resto de tumores TN (Turner & Reis-Filho, 2013). Por ello, hemos estudiado los RA en los tumores primarios de los casos TN pareados por IHC. De ellos, 3 fueron positivos para RA y 9 negativos.

De los 3 casos RA positivos, uno era un carcinoma inflamatorio con componente intraductal que desarrolló MC a distancia y los otros 2 fueron carcinomas infiltrantes NOS que desarrollaron MC locales.

#### 4.1.4 Inmunohistoquímica de p53 mediante TMA

Se realizó una IHC de p53 en las muestras incluidas en el TMA. De las 74 muestras fueron evaluables 68. En la Tabla suplementaria 4 se puede observar la concordancia entre la expresión de p53 aberrante y las mutaciones de *TP53* que se

## RESULTADOS

---

encontraron mediante NGS. En 15 pacientes (ya sea en tumor primario o en la muestra de la MC, si no estaba incluido el tumor primario) de 48 pacientes totales (31,2%) se vio expresión de p53 aberrante, siendo de estos el 66,7% TN, el 20% HER2+ y el 13,4% luminales HER2-.

### 4.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

#### 4.2.1 Alteraciones moleculares en tumores primarios y metástasis cutáneas

##### 4.2.1.1 Distribución de mutaciones entre las distintas muestras y fenotipos

De las 86 muestras secuenciadas, se excluyeron del análisis molecular 2 de ellas por mala calidad de las secuencias. En la Tabla 14 se puede ver de qué tipo son las 84 muestras incluidas en el estudio molecular y la distribución de fenotipos.

**TABLA 14. DISTRIBUCIÓN DE MUESTRAS SEGÚN FENOTIPO MOLECULAR**

TIPO DE MUESTRA					
FENOTIPO	Tumor primario <i>n</i> = 38	Metástasis cutánea <i>n</i> = 44	Recidiva <i>n</i> = 1	Ganglio <i>n</i> = 1	Total de muestras <i>n</i> = 84
TN	15	19	0	0	34
Luminal A	9	8	1	0	18
Luminal B	9	11	0	0	20
Luminal HER2+	3	3	0	1	7
HER2 puro	2	3	0	0	5

Para el estudio de los CNVs en las muestras secuenciadas se usaron dos herramientas, Kit CNV (Talevich et al., 2016) y CONTRA (J. Li et al., 2012) (Tablas suplementarias 2 y 3). Se obtuvieron con ambas diferentes resultados, poco



concordantes. Esto se puede justificar por la antigüedad y la baja pureza de las muestras, ya que unas pueden contener un porcentaje de células tumorales mayor que otras y no se ha estudiado muestra de tejido sano como control.

Teniendo en cuenta las amplificaciones de HER2 observadas mediante FISH, se estima que la herramienta CONTRA da unos resultados de amplificaciones más fiables. Ya que de las muestras en las que se detecta amplificación por FISH, se detecta también mediante CONTRA en el 75% de los casos, en cambio mediante kit CNV baja a un 25% (Tabla 15).

**TABLA 15. CONCORDANCIA EN AMPLIFICACIÓN DE HER2 MEDIANTE FISH Y LAS HERRAMIENTAS CONTRA Y KIT CNV**

TUMOR	AMPLIFICACIONES HER2		
	FISH	CONTRA	KIT CNV
Pt14_Primary	SÍ	NO	NO
Pt16_Ganglio	SÍ	SÍ	NO
Pt16_Metástasis	SÍ	NO	NO
Pt16_Primary	SÍ	SÍ	NO
Pt20_Primary	SÍ	NO	NO
Pt20_Metástasis	SÍ	SÍ	NO
Pt21_Metástasis	SÍ	SÍ	NO
Pt21_Primary	SÍ	SÍ	NO
Pt32_Metástasis	SÍ (polisomía)	SÍ	SÍ
Pt37_Metástasis	SÍ	SÍ	NO
Pt47_Metástasis	SÍ	SÍ	SÍ
Pt47_Primary	SÍ	SÍ	SÍ

Además, mediante CONTRA se han observado amplificaciones de HER2 en muestras no vistas por FISH (Pt1\_Primary, Pt4\_Primary, Pt7\_Metástasis,

## RESULTADOS

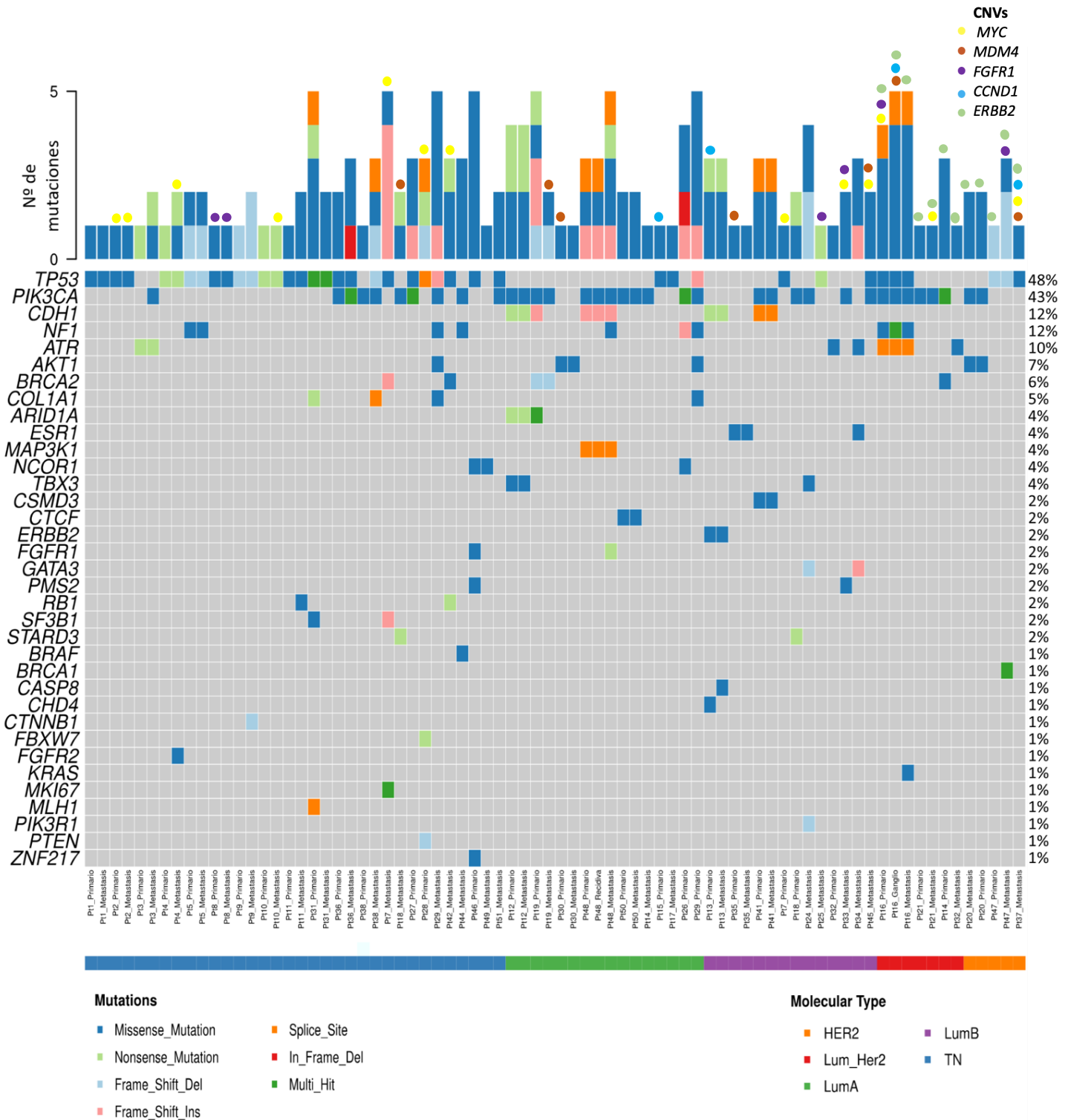
---

Pt32\_Primary, Pt40\_Primary). Ocurre igual en dos muestras (Pt7\_Metástasis, Pt32\_Primary) por kit CNV.

En conclusión, debido a los resultados dispares obtenidos mediante estas herramientas para detectar CNVs, no han sido incluidos los resultados obtenidos con ellas y se realizó FISH en las 74 muestras incluidas en el TMA para evaluar los CNVs que se observan con más frecuencia en los carcinomas de mama (*CCND1*, *MYC*, *FGFR1* y *MMD4*). De estas 74 muestras fueron valorables 70 de ellas (69 para *MYC*), 34 eran MC, 34 tumores primarios (33 para *MYC*), 1 ganglio y 1 recidiva. De los tumores primarios, 12 eran TN, 9 luminal B, 9 luminal A (8 para *MYC*) y 4 HER2+ y de las MC, 16 son TN, 7 luminal B, 6 luminal A y 5 HER2+. Entre estas se incluían 20 casos pareados, 14 con metástasis desarrolladas a distancia y 6 de manera local.

En la Fig. 16 se pueden observar las frecuencias de mutación de los 35 genes mutados del panel en las 84 muestras, además de los CNVs encontrados en algunas de ellas. Se vio mutación en 76 muestras y no se observó mutación en 8 muestras. En la Fig. 16 se representan las 76 con alguna alteración, pero para el cálculo de las frecuencias de mutación se incluyen las 84 muestras analizadas. Se observó un número máximo de 5 mutaciones por muestra en 9 casos. Además, se vio que el gen mutado con mayor frecuencia fue *TP53* (48%), seguido de *PIK3CA* (43%). En la Tabla suplementaria 7 se especifican las mutaciones y CNVs encontrados en algunos de los genes más relevantes.

FIGURA 16. DISTRIBUCIÓN DE ALTERACIONES ENTRE LAS MUESTRAS



En los anexos se encuentra un descriptivo detallado de las mutaciones encontradas en los tumores primarios y en las MC, en estos solo se incluyeron las muestras que presentaban algún tipo de mutación (Fig. suplementarias 2, 3 y 4).

#### 4.2.1.2 Alteraciones moleculares en los tumores primarios

De las 51 pacientes había material y secuencias de calidad tras la secuenciación de 38 tumores primarios, las mutaciones más frecuentes fueron en los genes *TP53* (47%), *PIK3CA* (39%), *CDH1* (13%), *NF1* (11%), *ATR* (8%) y *AKT1* (8%) (Fig. 17). Y las frecuencias de CNVs en tumores primarios fueron 15,2% en *MYC*, 11,8% en *MDM4*, 8,9% en *CCND1* y en 8,9% *FGFR1*. En la Tabla 16 se pueden ver las frecuencias de mutación o de CNVs en estos genes según fenotipo molecular.

**TABLA 16. ALTERACIONES MOLECULARES EN LOS GENES MÁS AFECTADOS EN LOS TUMORES PRIMARIOS SEGÚN FENOTIPO MOLECULAR**

FENOTIPO MOLECULAR	GENES	TUMORES PRIMARIOS <i>n</i> (%)	
TN <i>n</i> = 15	Mutaciones	<i>TP53</i>	13 (86,7)
		<i>PIK3CA</i>	3 (20)
		<i>NF1</i>	1 (6,7)
		<i>ATR</i>	1 (6,7)
TN <i>n</i> = 12	CNVs	<i>MYC</i>	3 (25)
		<i>FGFR1</i>	1 (8,3)
Luminal HER2- <i>n</i> = 18	Mutaciones	<i>TP53</i>	2 (11,1)
		<i>PIK3CA</i>	8 (44,4)
		<i>NF1</i>	2 (11,1)
		<i>AKT1</i>	2 (11,1)
		<i>CDH1</i>	4 (22,2)
	CNVs	<i>ATR</i>	1 (5,6)
		<i>MYC</i>	1 (5,6)
		<i>MDM4</i>	4 (22,2)
		<i>FGFR1</i>	1 (5,6)
		<i>CCND1</i>	3 (16,7)

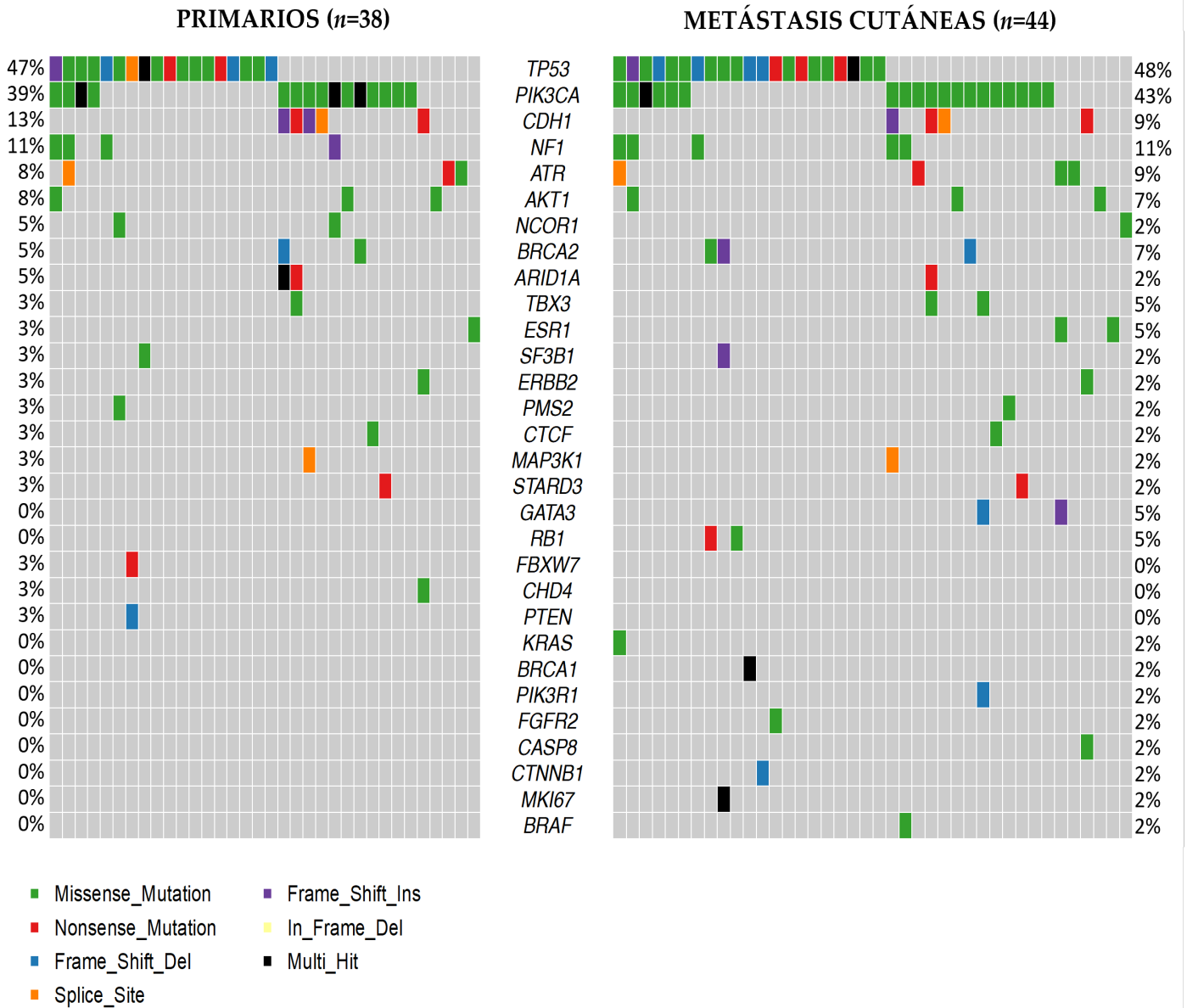
HER2+ n= 5	Mutaciones	<i>TP53</i>	2 (40)
		<i>PIK3CA</i>	4 (80)
		<i>NF1</i>	1 (20)
		<i>AKT1</i>	1 (20)
		<i>ATR</i>	1 (20)
HER2+ n= 4	CNVs	<i>MYC</i>	1 (25)
		<i>MDM4</i>	0
		<i>FGFR1</i>	1 (25)
		<i>CCND1</i>	0

De los 3 tumores primarios TN en que fueron RA positivos, en 1 (33%) se encontró mutación de *PIK3CA* y de los 9 casos RA negativos, se encontró mutación de *PIK3CA* en 3 (33%) casos, por lo que no se ve relacionada la positividad de RA con mutación en *PIK3CA*.

#### 4.2.1.3 Alteraciones moleculares en las metástasis cutáneas

De las 51 pacientes había material y secuencias de calidad tras la secuenciación de 44 muestras de MC. Las MC tuvieron un perfil molecular similar al de los tumores primarios, los genes con mayor frecuencia de mutación fueron también *TP53* (48%) y *PIK3CA* (43%) (Fig. 17). Y las frecuencias de CNVs fueron 11,8% para *CCND1*, 29,4% para *MYC*, 11,8 para *FGFR1* y 14,7% para *MDM4*. En la Tabla 17 se puede ver la distribución de las mutaciones en las MC agrupadas según fenotipo molecular de los tumores primarios correspondientes.

FIGURA 17. TIPO Y FRECUENCIA DE MUTACIÓN EN TUMORES PRIMARIOS VERSUS METÁSTASIS CUTÁNEAS



**TABLA 17. ALTERACIONES MOLECULARES EN LOS GENES MÁS AFECTADOS EN LAS METÁSTASIS CUTÁNEAS SEGÚN FENOTIPO MOLECULAR**

FENOTIPO MOLECULAR	GENES	METÁSTASIS CUTÁNEA	
		<i>n</i> (%)	
TN <i>n</i> =14	Mutaciones	<i>TP53</i>	12 (85,7)
		<i>PIK3CA</i>	4 (28,6)
		<i>NF1</i>	2 (14,3)
TN <i>n</i> =11	CNVs	<i>MYC</i>	4 (36,4)
		<i>MDM4</i>	1 (9)
		<i>FGFR1</i>	1 (9)
Luminal HER2- <i>n</i> =22	Mutaciones	<i>TP53</i>	4 (18,2)
		<i>PIK3CA</i>	9 (40,9)
		<i>NF1</i>	2 (9)
		<i>AKT1</i>	2 (9)
		<i>CDH1</i>	3 (13,6)
		<i>ATR</i>	1 (4,5)
Luminal HER2- <i>n</i> =15	CNVs	<i>MYC</i>	3 (20)
		<i>MDM4</i>	2 (13,3)
		<i>FGFR1</i>	1 (13,3)
		<i>CCND1</i>	1 (13,3)
HER2+ <i>n</i> =8	Mutaciones	<i>TP53</i>	4 (50)
		<i>PIK3CA</i>	6 (75)
		<i>NF1</i>	1 (12,5)
		<i>AKT1</i>	1 (12,5)
	CNVs	<i>ATR</i>	1 (12,5)
		<i>MYC</i>	3 (37,5)
		<i>MDM4</i>	2 (25)
		<i>FGFR1</i>	2 (25)
		<i>CCND1</i>	2 (25)

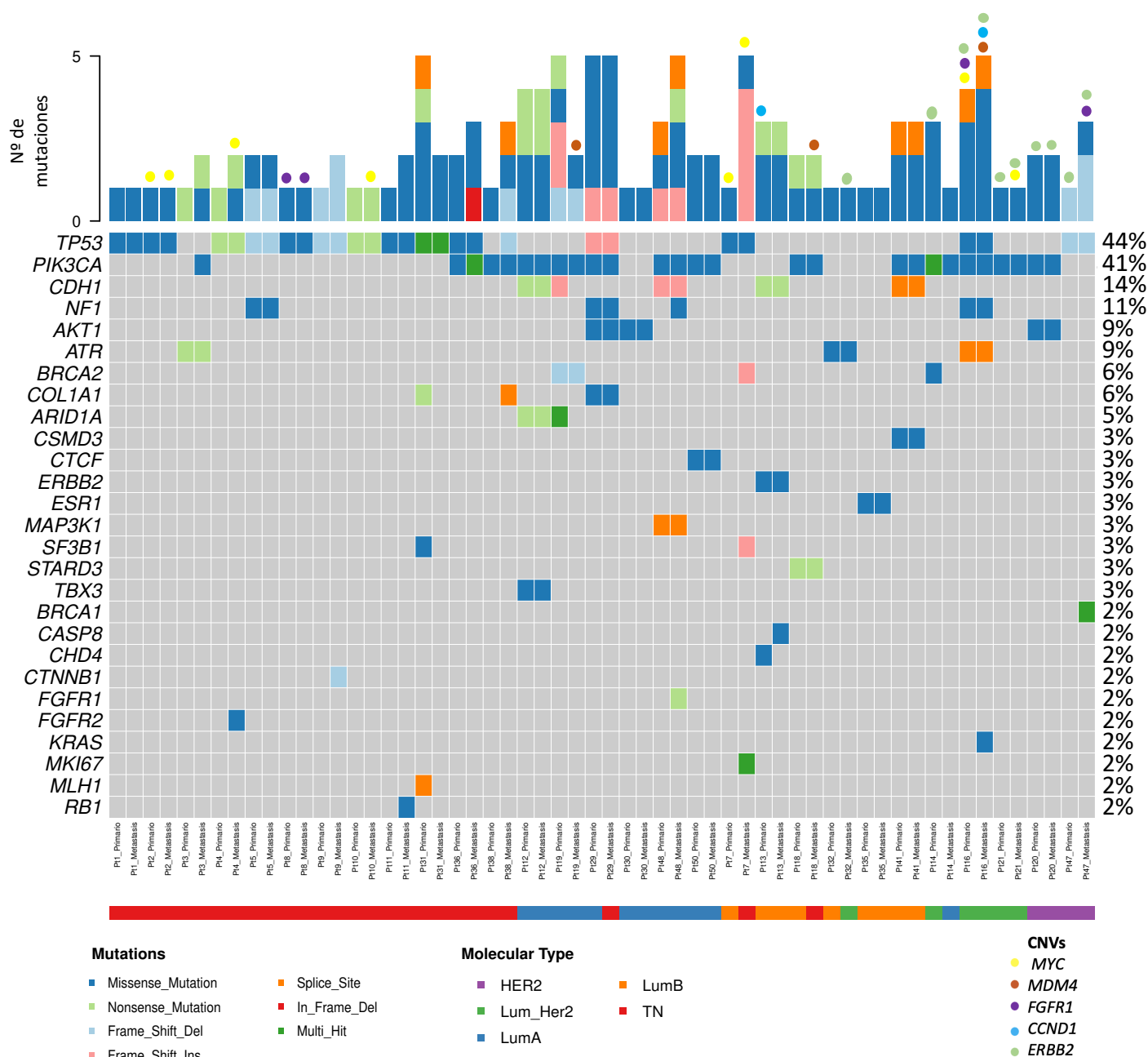
No obstante, aún siendo muy similares las frecuencias de mutación entre tumores primarios y MC, se observaron diferencias que se hicieron más evidentes cuando se estudiaron los casos pareados.

De las 51 pacientes teníamos para la secuenciación muestra tanto de tumor primario y de la MC de 33 de ellas, por lo que para el estudio de mutaciones somáticas teníamos 33 casos pareados. En cambio, para el estudio de CNVs mediante FISH solo fue posible incluir 20 de estos 33 casos pareados por falta de material.

Se encontraron alteraciones moleculares en 29 parejas representadas en la Fig. 18., pero las frecuencias de mutación se calcularon considerando los 33 casos pareados totales. Las muestras están ordenadas según el fenotipo de los tumores primarios. Las muestras con mayor número de mutaciones tenían 5 (Pt29 primario, Pt29 metástasis y Pt48 metástasis).



FIGURA 18. DISTRIBUCIÓN DE MUTACIONES Y CNVS EN LOS CASOS PAREADOS



Entre los 33 casos pareados para el análisis de secuenciación, *TP53* estaba mutado en 13 tumores primarios (39,4%) y en 14 MC (42,4%). *PIK3CA* estaba mutado en 13 tumores primarios (39,4%) y en 15 MC (45,4%). *NF1* estaba mutado en 3 de los tumores primarios (9%) y en 4 MC (12,1%). *AKT1* estaba mutado en 3 tumores primarios (9%) y 3 MC (9%). *ERBB2* estaba amplificado o había polisomía en 5 tumores

## RESULTADOS

primarios (15,15%) y 5 MC (15,15%). Entre los 20 casos pareados para CNVs por FISH, *MYC* estaba amplificado en 3 tumores primarios (15%) y 5 MC (25%). *MDM4* estaba amplificado sólo en 3 MC (15%). Los CNVs de *FGFR1* (amplificación o polisomía) se observaron en 2 tumores primarios (10%) y 2 MC (10%). Por último, *CCND1* estaba amplificado en 1 tumor primario (5%) y 1 MC (5%). La Tabla 18 muestra un resumen de estas alteraciones distribuidas por tipos moleculares.

**TABLA 18. ALTERACIONES MOLECULARES EN TUMORES PRIMARIOS Y SUS CORRESPONDIENTES METÁSTASIS CUTÁNEAS**

FENOTIPO MOLECULAR		GENES	TUMORES PRIMARIOS <i>n</i> (%)	METÁSTASIS CUTÁNEA <i>n</i> (%)
TN <i>n</i> = 12	Mutaciones	<i>TP53</i>	10 (83)	11 (92)
		<i>PIK3CA</i>	2 (17)	4 (33)
		<i>NF1</i>	1 (8,3)	1 (8,3)
TN <i>n</i> = 7	CNVs	<i>MYC</i>	1 (14,3)	3 (42,9)
		<i>MDM4</i>	0	1 (14,3)
		<i>FGFR1</i>	1 (14,3)	1 (14,3)
Luminal HER2- <i>n</i> = 16	Mutaciones	<i>TP53</i>	1 (6)	1 (6)
		<i>PIK3CA</i>	7 (39)	7 (39)
		<i>NF1</i>	1 (6,2)	2 (12,5)
		<i>AKT1</i>	2 (12,5)	2 (12,5)
Luminal HER2- <i>n</i> = 9	CNVs	<i>MYC</i>	1 (11,1)	1 (11,1)
		<i>MDM4</i>	0	1 (11,1)
		<i>CCND1</i>	1 (11,1)	0
HER2+ <i>n</i> = 5	Mutaciones	<i>TP53</i>	2 (40)	2 (40)
		<i>PIK3CA</i>	4 (80)	4 (80)
		<i>NF1</i>	1 (20)	1 (20)
		<i>AKT1</i>	1 (20)	1 (20)
HER2+ <i>n</i> = 4	CNVs	<i>MYC</i>	1 (25)	1 (25)
		<i>MDM4</i>	0	1 (25)
		<i>FGFR1</i>	1 (25)	1 (25)
		<i>CCND1</i>	0	1 (25)

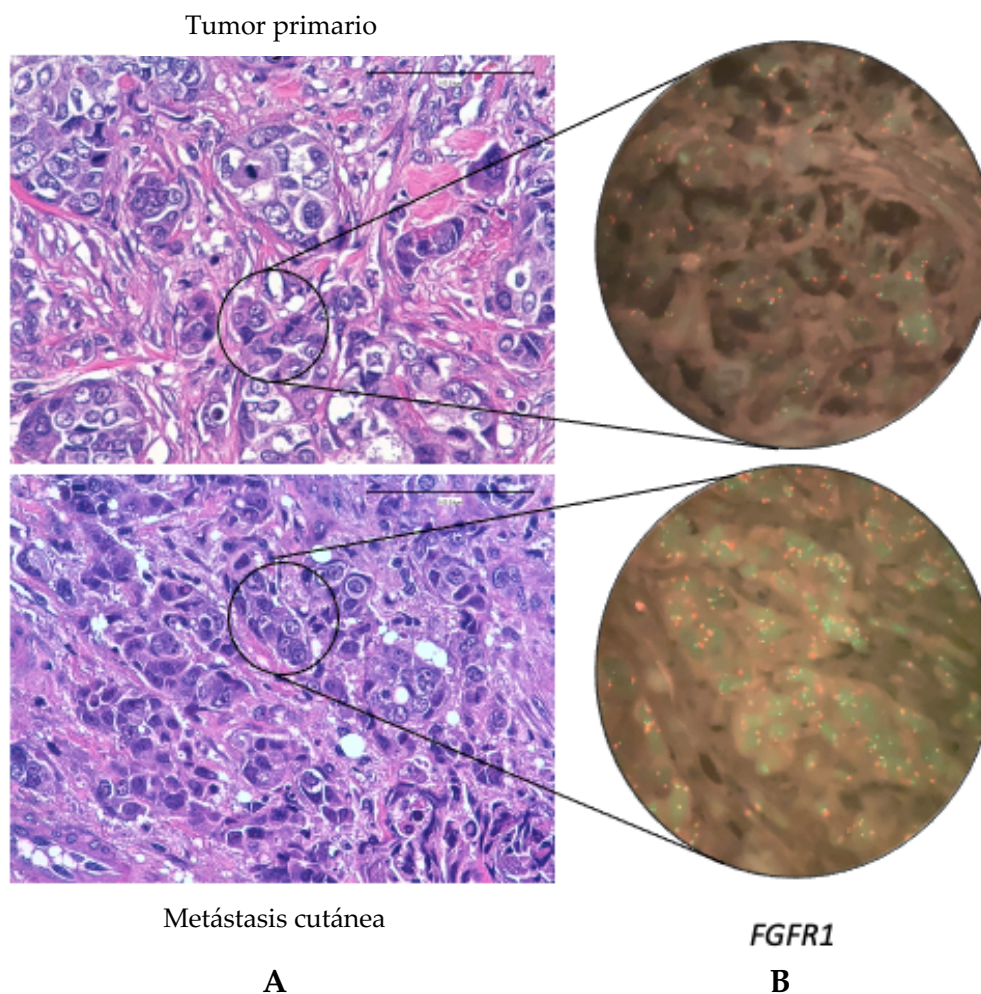
Se observaron alteraciones moleculares adicionales en las MC, ya sean mutaciones o CNVS, en 16 pacientes (48,5%) (Fig. 19). En 7 casos (21,2%) había más de una alteración adicional en el CM. La Tabla 19 muestra la distribución de estas alteraciones por fenotipos moleculares.

Hubo algunas diferencias en la frecuencia de las mutaciones adicionales dependiendo de la localización de la MC (local o a distancia). En los 17 casos pareados que desarrollaron MC a distancia, se encontraron alteraciones adicionales en el MC respecto a los tumores primarios en 11 casos (64,7%) (5 TN, 4 luminal HER2- y 2 HER2+). Por el contrario, entre los 15 casos pareados que desarrollaron MC local, sólo 5 casos (33,3%) (3 TN, 1 luminal HER2- y 1 HER2+) mostraron alteraciones moleculares adicionales. (Tabla 19).

**TABLA 19. MUTACIONES Y CNVS ADICIONALES EN LAS METÁSTASIS CUTÁNEAS DE LOS CASOS PAREADOS**

LOCALIZACIÓN	FENOTIPO	GEN	CASOS CON ALTERACIÓN MOLECULAR ADICIONAL EN LA METÁSTASIS CUTÁNEA	
			<i>n</i>	
Metástasis cutánea a distancia <i>n</i> = 17	TN	<i>PIK3CA</i>	1	
		<i>RB1</i>	1	
		<i>FGFR2</i> + <i>MYC</i> (amplificación)	1	
		<i>CTNNB1</i>	1	
		<i>MDM4</i> (amplificación)	1	
	Luminal HER2-  HER2+		<i>FGFR1</i> + <i>NF1</i>	1
			<i>BRCA2</i> + <i>MKI67</i> + <i>SF3B1</i>	1
			<i>CASP8</i> + <i>ERBB2</i>	1
			<i>MDM4</i> (amplificación)	1
			<i>KRAS</i> + <i>CCND1</i> (amplificación) + <i>MDM4</i> (amplificación)	1
Metástasis cutánea local <i>n</i> = 15	TN	<i>BRCA1</i> + <i>FGFR1</i> (polisomía)	1	
		<i>TP53</i> + <i>PIK3CA</i> + <i>COL1A1</i>	1	
		<i>PIK3CA</i>	1	
	Luminal HER2- HER2+		<i>MYC</i> (amplificación)	1
			<i>ERBB2</i> (polisomía)	1
			<i>MYC</i> (amplificación)	1

Cuando no se especifica como amplificación, la alteración encontrada fue una mutación.

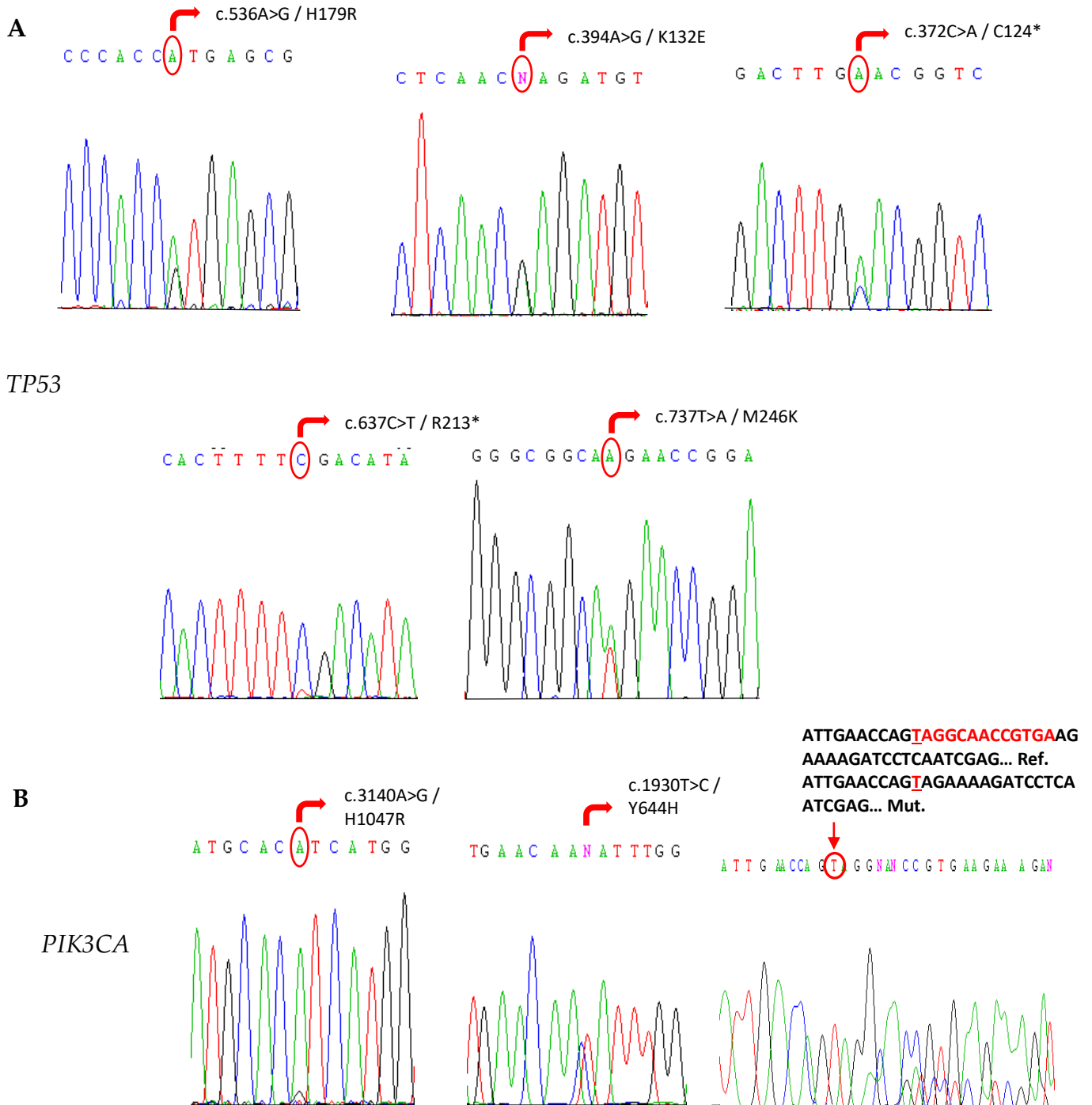
FIGURA 19. HEMATOXILINA Y FISH DE *FGFR1*

**A.** Hematoxilina-eosina de un tumor de mama primario y su correspondiente metástasis cutánea. **B.** Hibridación in situ fluorescente del gen *FGFR1* en el tumor primario de mama (sin alteraciones) y en la metástasis cutánea (con polisomía).

#### 4.2.1.4 Validación de resultados de NGS

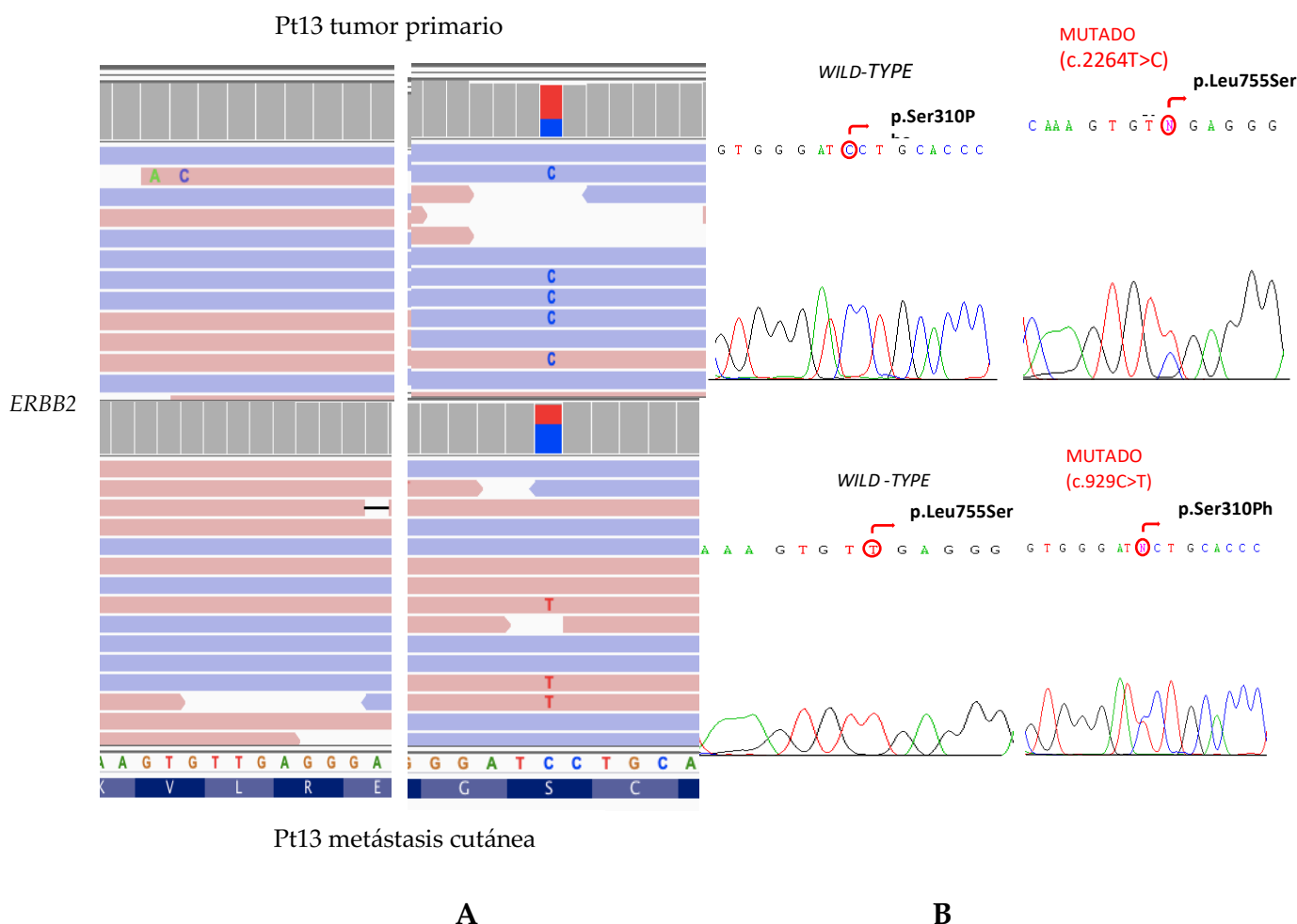
Además, para confirmar que los resultados de NGS eran fiables parte de estas mutaciones se verificaron mediante secuenciación Sanger en tejido tumoral (11 mutaciones en los genes *TP53*, *PIK3CA* y *ERBB2*) y algunas germinales encontradas en tejido normal (2 en *ERBB2*). (Fig. 20, 21 y 22).

FIGURA 20. MUTACIONES VERIFICADAS POR SANGER EN *TP53* y *PIK3CA*



**A.** Verificación de 5 mutaciones por Sanger del gen *TP53*. **B.** Verificación de 3 mutaciones por Sanger del gen *PIK3CA*.

**FIGURA 21. MUTACIONES SOMÁTICAS EN *ERBB2* EN IGV Y VERIFICADAS POR SANGER EN CASO PAREADO**



**A.** Visualización en el software IGV de las diferentes mutaciones de *ERBB2* encontradas en el tumor primario y en la metástasis cutánea del paciente Pt13. **B.** Validación mediante secuenciación Sanger.

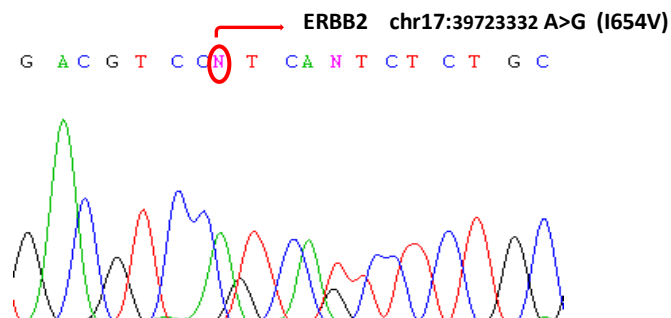
En 4 casos pareados (12,1%) se encontraron mutaciones en el gen *ERBB2* con una frecuencia alélica de entorno al 50% en ambas muestras de la pareja, por lo que se asumieron como mutaciones germinales. Estas mutaciones fueron I654V en dos de las muestras y I655V en las otras dos (Tabla 20).

**TABLA 20. MUTACIONES GERMINALES DE LOS CASOS PAREADOS**

TUMOR	ERBB2
Pt23_Primary	I654V
Pt23_Metástasis	I654V
Pt40_Primary	I655V
Pt40_Metástasis	I655V
Pt41_Primary	I654V
Pt41_Metástasis	I654V
Pt50_Primary	I655V
Pt50_Metástasis	I655V

A modo de control se validó la mutación I654V en las dos parejas mediante secuenciación Sanger en tejido sano de las pacientes (Fig. 22).

**FIGURA 22. VALIDACIÓN DE MUTACIÓN GERMINAL I654V EN EL GEN ERBB2**





#### 4.2.2 Análisis de supervivencia

El análisis de supervivencia se realizó sobre las 51 pacientes. La mediana desde el diagnóstico de la enfermedad inicial a la MC fue de 17,8 meses. La mediana de supervivencia desde el diagnóstico de la enfermedad inicial al éxitus fue de 52,5 meses y la mediana de supervivencia desde el diagnóstico de la MC al éxitus fue de 21 meses.

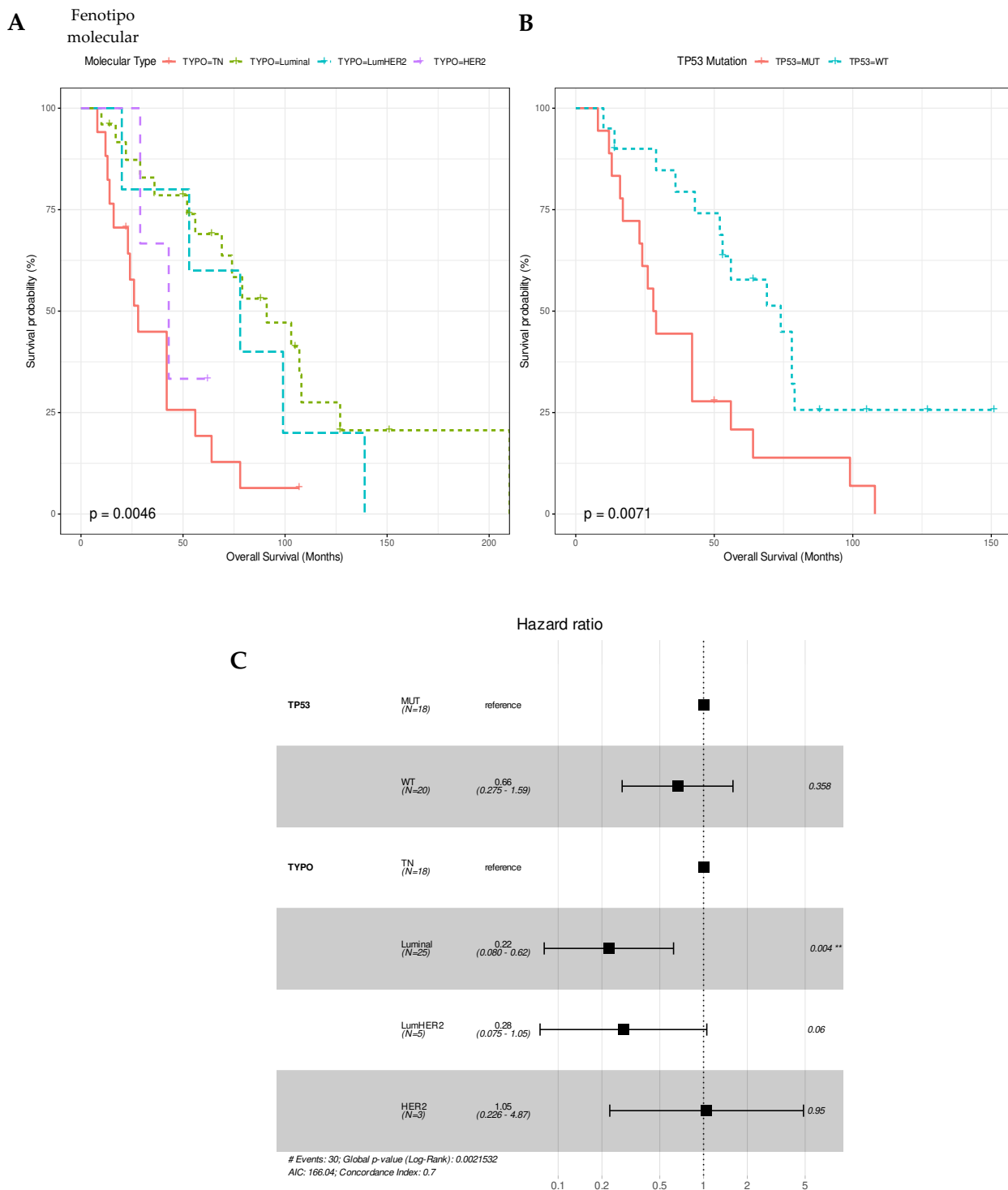
Se evaluó la asociación entre la supervivencia global desde el diagnóstico del tumor primario y la edad, la localización de la metástasis (local o distante), pT, pN, el estadio clínico, el tipo molecular subrogado, el tipo histológico, el grado histológico, la LIV y la terapia neoadyuvante. Además, se evaluó la asociación entre la supervivencia global y las mutaciones *TP53* y *PIK3CA* y los CNVs en *MYC*, *MDM4*, *FGFR1* y *CCND1*.

Se objetivó una mejor supervivencia estadísticamente significativa en el grupo de pacientes con tumores luminales HER2- (p-valor= 0,005). También se objetivó una peor supervivencia estadísticamente significativa en las pacientes con mutación en *TP53* (p-valor= 0,049) (Fig. 23 A y B). En cambio, el resto de las variables no se correlacionaron significativamente con la supervivencia global.

Mediante el análisis multivariante con las 2 variables significativas, la única variable independiente en el análisis de Cox fue el fenotipo molecular, donde los tumores luminales HER2- fueron los de mejor pronóstico (p= 0,004) (Fig. 23 C).

De los pacientes que desarrollaron MC a distancia, la supervivencia global al año desde su diagnóstico fue del 45%. En cambio, cuando la MC fue local, la supervivencia global al año fue del 72,2%. Aunque las pacientes que desarrollaron MC local tuvieron una supervivencia global mayor desde su diagnóstico, las diferencias entre la supervivencia según la localización no fueron estadísticamente significativas, probablemente debido al tamaño muestral, ya que sí se puede objetivar una tendencia estadística (p= 0,077).

**FIGURA 23. SUPERVIVENCIA GLOBAL SEGÚN DIFERENTES VARIABLES CON DIFERENCIA ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA**



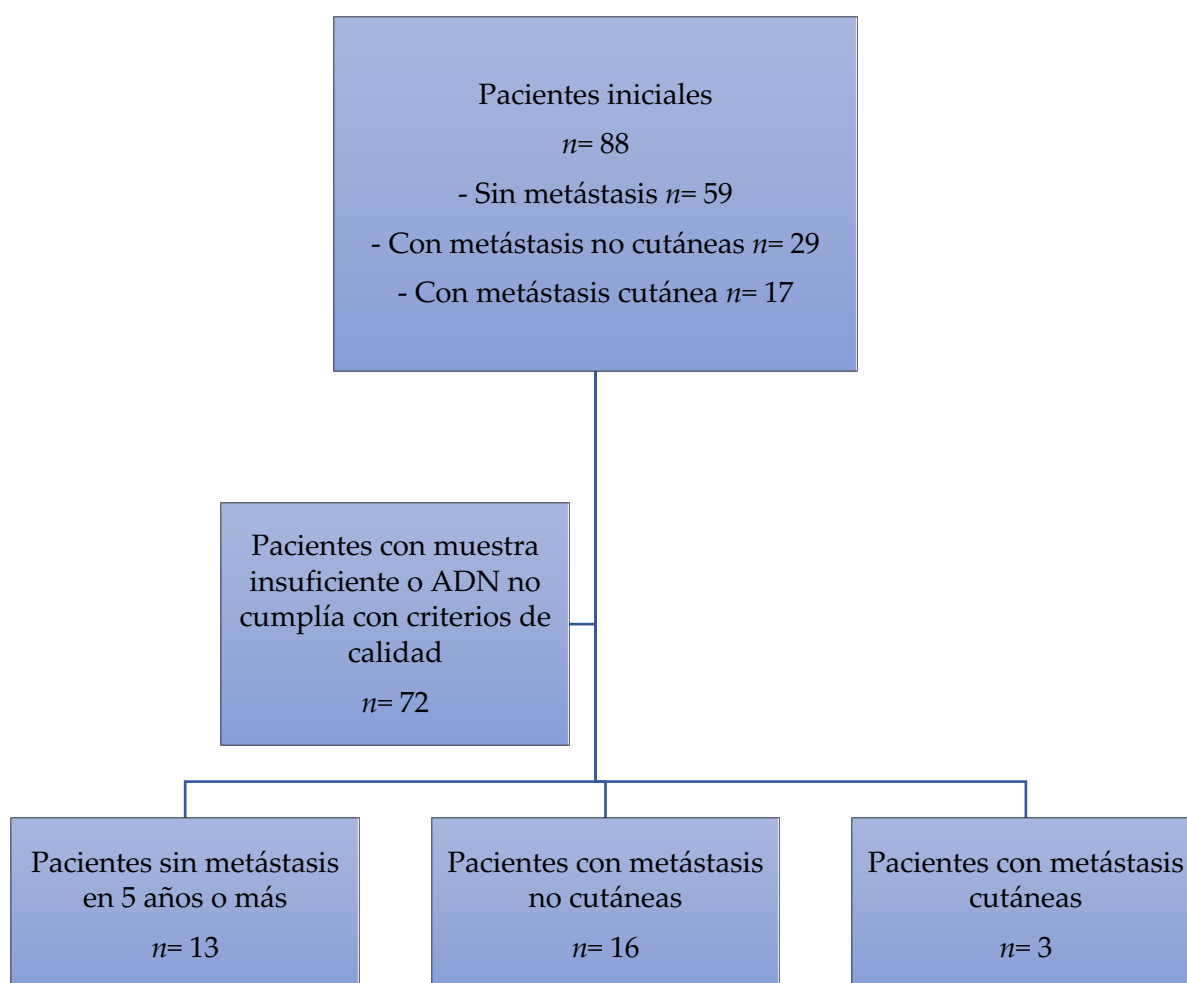
Gráficos de Kaplan-Meier que muestran la asociación entre la supervivencia global y el fenotipo molecular (A) y el estado de TP53 (B). (C) Análisis multivariante que muestra la importancia pronóstica independiente del fenotipo molecular.

## SERIE 2

## 4.3 CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS E INMUNOFENOTÍPICAS

En la segunda serie se incluyeron un total de 32 muestras de tumor primario de mama de 32 pacientes con CMTN diagnosticadas entre 2010 y 2018 del Servicio de Anatomía Patología del Hospital Universitario Ramón y Cajal. Fueron 16 casos de pacientes con metástasis no cutáneas, 3 casos de pacientes con metástasis cutáneas y 13 de pacientes sin metástasis que llevan 5 años o más sin progresión, de este último grupo tras la secuenciación se eliminó una muestra por problemas durante el análisis. (Fig. 24)

FIGURA 24. DIAGRAMA DE PACIENTES Y MUESTRAS DE LA SERIE 2 DEL ESTUDIO



### 4.3.1 Características clinicopatológicas

La distribución de las muestras por grupos y las características clinicopatológicas en detalle de la serie 2 se pueden observar en la Tabla 21.

La edad mediana de las pacientes fue de 51 años, la mediana de las pacientes que desarrollaron metástasis fue 59 años y la mediana de las que no desarrollaron ningún tipo fue 49 años ( $p= 0,06$ ). Del total de las pacientes, 21 (65,6%) eran menores o igual a 60 años y 11 pacientes (34,4%) mayores a 60 años.

Se conocía el pT de 22 de los CM, 8 (36,4%) eran pT1, 9 (40,9%) pT2, 3 (13,6%) pT3 y 2 (9%) pT4. Diferenciando entre las 10 pacientes que desarrollaron metástasis y las 12 pacientes que no lo hicieron de las que disponíamos de este dato, los porcentajes fueron pT1 en 20% vs. 50%, pT2 en 50% vs. 33,3%, pT3 en 20% vs. 8,3% y pT4 en 10% vs. 8,3%. No hay diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos.

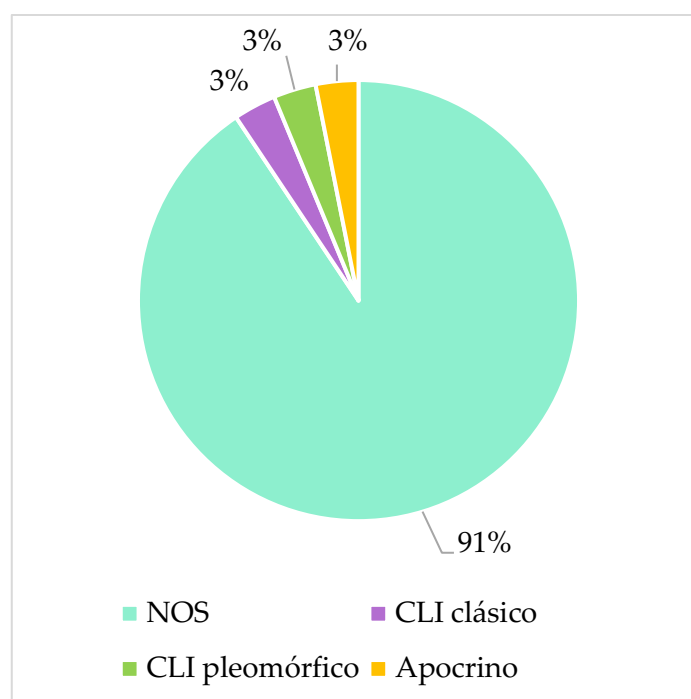
En cuanto a la presencia de metástasis en ganglios axilares disponíamos de este dato de 24 casos, 13 (54,2%) no mostraban afectación y 11 (45,8%) eran N+. La distribución fue N1, 8 (33,3%) casos y N3, 3 (12,5%) casos. Diferenciando entre las 12 pacientes que desarrollaron metástasis y las 12 pacientes que no desarrollaron metástasis de las que disponíamos de este dato, la distribución fue: N0, 5 (41,7%) vs. 8 (66,7%), N1, 5 (41,7%) vs. 3 (25%), y N3, 2 (16,7%) vs. 1 (8,3%). No hay diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos.

En esta serie, al momento de diagnóstico, la mayoría de los casos correspondían a un estadio IIB (23,3%) y a estadio IV (23,3%). De las 18 pacientes con metástasis de las que disponíamos del dato del estadio, el porcentaje de pacientes más alto se encontró en el estadio IV (38,9%). En cuanto a las 12 pacientes que no han desarrollado metástasis de las que disponíamos de este dato el porcentaje más alto lo observamos en estadio IIA (41,7%). Se observan diferencias significativas ( $p= 0,02$ ) en la comparativa de esta

variable con tipo de muestra, los estadios avanzados (III+IV) están más relacionados con las muestras metastásicas, y los tempranos con no metastásicas.

En la distribución de tipos histológicos, 29 (91%) correspondían a tumores NOS, 1 (3%) era CLI, 1 (3%) CLI pleomórfico y en 1 (3,4%) caso se observó diferenciación apocrina (Fig. 25).

**FIGURA 25. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA DISTRIBUCIÓN DE TIPOS HISTOLÓGICOS EN LA SERIE 2**



En referencia al grado histológico, 1 (3,1%) caso correspondía a grado 1, 4 (15,6%) casos a grado 2 y 26 (81,3%) casos a grado 3. De las 19 pacientes que desarrollaron metástasis 2 casos (10,5%) eran grado 2 y 17 (89,5%) casos grado 3. Y de las 13 pacientes que no han desarrollo metástasis, 1 (7,7%) caso era grado 1, 3 (23,1%) casos grado 2 y 9 (69,2%) casos grado 3. No hay diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos.

## RESULTADOS

LIV se observó en 8 casos (28,6%), mientras que 20 casos (71,4%) no la mostraban y de 4 casos no estaba este dato disponible. Se disponía de este dato de 16 pacientes que desarrollaron metástasis y de 10 pacientes que no lo hicieron. Del primer grupo, 6 (37,5%) casos mostraban LIV y 10 (62,5%) no y del tercer grupo, 1 (10%) caso sí y 9 (90%) casos no.

En esta serie todos los casos mostraban ausencia de RH y amplificación de *ERBB2*, ya que solo seleccionamos casos TN. Los CLI mostraron pérdida de expresión de cadherina E.

Con respecto al Ki67, 3 (9,4%) casos mostraban un Ki67  $\leq 15\%$ , 4 (12,5%) casos del 16-29%, y 25 (78,1%) casos  $\geq 30\%$ . De las pacientes que desarrollaron metástasis, 2 (10,5%) mostraron un Ki67  $\leq 15\%$  y las 17 (89,5%) restantes  $\geq 30\%$ . De las pacientes que no desarrollaron metástasis, 1 (7,7%) mostró un Ki67  $\leq 15\%$ , 4 (30,8%) del 16-29%, y 8 (61,5%)  $\geq 30\%$ .

**TABLA 21. CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS DE LA SERIE 2**

		SERIE 2		
		Casos total n (%)	Pacientes con metástasis n (%)	Pacientes sin metástasis n (%)
<b>Sexo</b>	Mujer	32 (100)	19 (100)	13 (100)
<b>Edad</b>	$\leq 60$	21 (65,6)	10 (52,6)	11 (84,6)
	$> 60$	11 (34,4)	9 (47,4)	2 (15,4)
<b>Localización</b>	MI	16 (50)	11 (57,9)	5 (38,5)
	MD	16 (50)	8 (42,1)	8 (61,5)
<b>Estado menopáusico al</b>	Sí	18 (64,3)	11 (68,7)	7 (58,3)
	No	10 (35,7)	5 (31,2)	5 (41,7)

<b>diagnóstico</b>	NC	4	3	1
	1	1 (3,1)		1 (7,7)
<b>Grado histológico</b>	2	5 (15,6)	2 (10,5)	3 (23,1)
	3	26 (81,3)	17 (89,5)	9 (69,2)
	≤ 15%	3 (9,4)	2 (10,5)	1 (7,7)
<b>Ki67</b>	16-29%	4 (12,5)		4 (30,8)
	≥ 30%	25 (78,1)	17 (89,5)	8 (61,5)
	1	8 (36,4)	2 (20)	6 (50)
<b>pT</b>	2	9 (40,9)	5 (50)	4 (33,3)
	3	3 (13,6)	2 (10)	1 (8,3)
	4	2 (9)	1 (10)	1 (8,3)
	NC	10	9	1
	0	13 (54,2)	5 (41,7)	8 (66,7)
<b>pN</b>	1	8 (33,3)	5 (41,7)	3 (25)
	2	0	0	0
	3	3 (12,5)	2 (16,7)	1 (8,3)
	NC	6	7	1
	IA	5 (16,7)	2 (11,1)	3 (25)
<b>AJCC estadio anatómico</b>	IIA	5 (16,7)		5 (41,7)
	IIB	7 (23,4)	5 (27,8)	2 (16,7)
	IIIB	2 (6,7)	1 (5,6)	1 (8,3)
	IIIC	4 (13,4)	3 (16,7)	1 (8,3)
	IV	7 (23,4)	7 (38,9)	
	NC	2	1	1
	Sí	8 (28,6)	6 (37,5)	1 (10)
<b>LIV</b>	No	20 (71,4)	10 (62,5)	9 (90)
	NC	4	3	3

### 4.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

#### 4.4.1 Mutaciones en tumores primarios triple negativo de pacientes metastásicas y no metastásicas

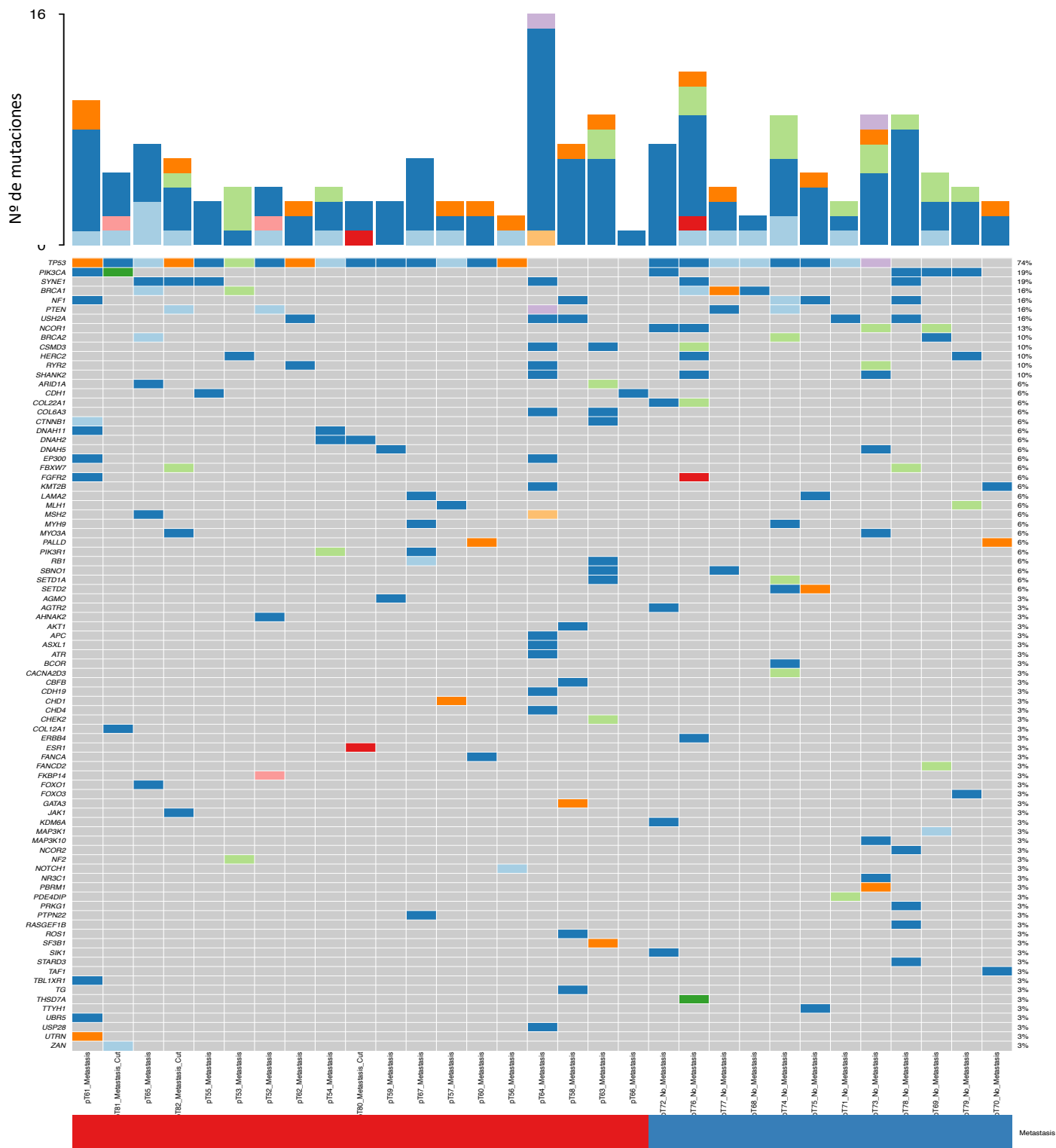
De las 32 muestras secuenciadas se obtuvieron resultados de 31, debido mala calidad de las secuencias de una de ellas. Aunque en esta serie se realizó un estudio de exoma completo, debido a que es un estudio preliminar y se está aún desarrollando, se analizaron las mutaciones observadas en los 206 genes involucrados en mayor frecuencia en CM según el estudio METABRIC de cBioportal (cBioPortal for Cancer Genomics, 2021). En todas las muestras se observaron mutaciones en un número variable genes, que se representan en la Fig. 26. En el grupo de tumores TN metastásicos se incluyeron 19 tumores primarios TN (3 de ellos desarrollaron MC). Y en el grupo de tumores TN no metastásicos se incluyeron 12 tumores primarios TN de pacientes que llevan 5 años o más sin progresión.

Teniendo en cuenta las 31 muestras, el gen mutado con mayor frecuencia fue *TP53* con un 74%, seguido *PIK3CA* y *SYNE1* con una frecuencia del 19%. La muestra más mutada presentó un total de 16 mutaciones. Además, se observó que 3 casos de la cohorte sin metástasis presentaban mutación de *PIK3CA*, pero no de *TP53* (Pt69, Pt78 y Pt79). Para investigar si estos casos pudieran corresponder al subtipo LAR, se realizó estudio de expresión de RA mediante IHC, observándose positividad en 2 de ellos (Pt69 y Pt78); además Pt78 presentó diferenciación morfológica apocrina (Fig. 26).

En los anexos se encuentra un descriptivo detallado de las mutaciones encontradas en los dos grupos de estudio (Fig. suplementarias 4, 5 y 6)



FIGURA 26. DISTRIBUCIÓN DE MUTACIONES ENTRE LOS GRUPOS DE PACIENTES CON METÁSTASIS Y SIN METÁSTASIS

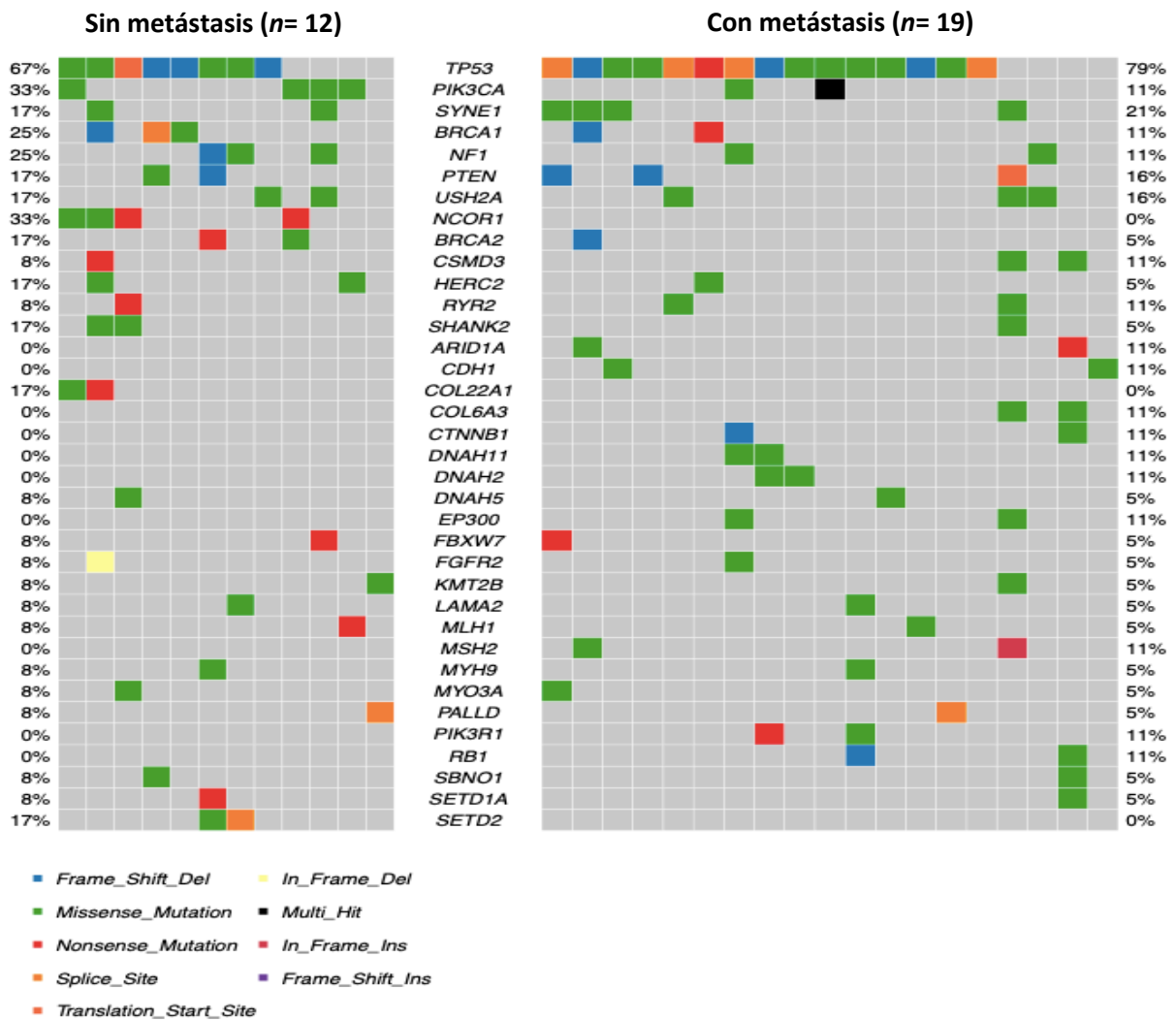


Distribución de mutaciones entre las 31 muestras, 19 carcinomas primarios triple negativo que desarrollaron metástasis y 12 carcinomas primarios triple negativo que llevan 5 años o más sin progresión.

4.4.1.1 Frecuencias de mutación en pacientes sin metástasis versus pacientes metastásicas

Teniendo en cuenta las 12 muestras de tumor primario TN de pacientes sin metástasis y las 19 muestras de tumor primario TN de las pacientes con metástasis, se observó que los genes con una mayor frecuencia de mutación fueron *TP53*, *PIK3CA*, seguidos de *SYNE1*, *BRCA1*, *NF1*, *PTEN*, *USH2A*, *NCOR1* y otros. (Fig. 27)

FIGURA 27. FRECUENCIAS DE MUTACIÓN DE LOS GENES ALTERADOS EN LAS PACIENTES NO METASTÁSICAS VERSUS LAS PACIENTES METASTÁSICAS



Distribución de mutaciones en el grupo de carcinomas primarios triple negativo que no desarrollaron metástasis en 5 años o más frente al grupo que desarrolló metástasis de algún tipo.

#### 4.4.2 Mutaciones en los tumores primarios triple negativo en 3 grupos de estudio

Como uno de los objetivos de este estudio fue encontrar si los tumores TN que desarrollaron MC tienen un patrón característico y el grupo de muestras de exomas es limitado, se hizo un análisis comparativo de las alteraciones de los 61 genes incluidos en el panel de NGS utilizado en el estudio de la serie 1. Para las comparaciones se incluyeron pacientes de ambas series y se dividieron las muestras en 3 grupos:

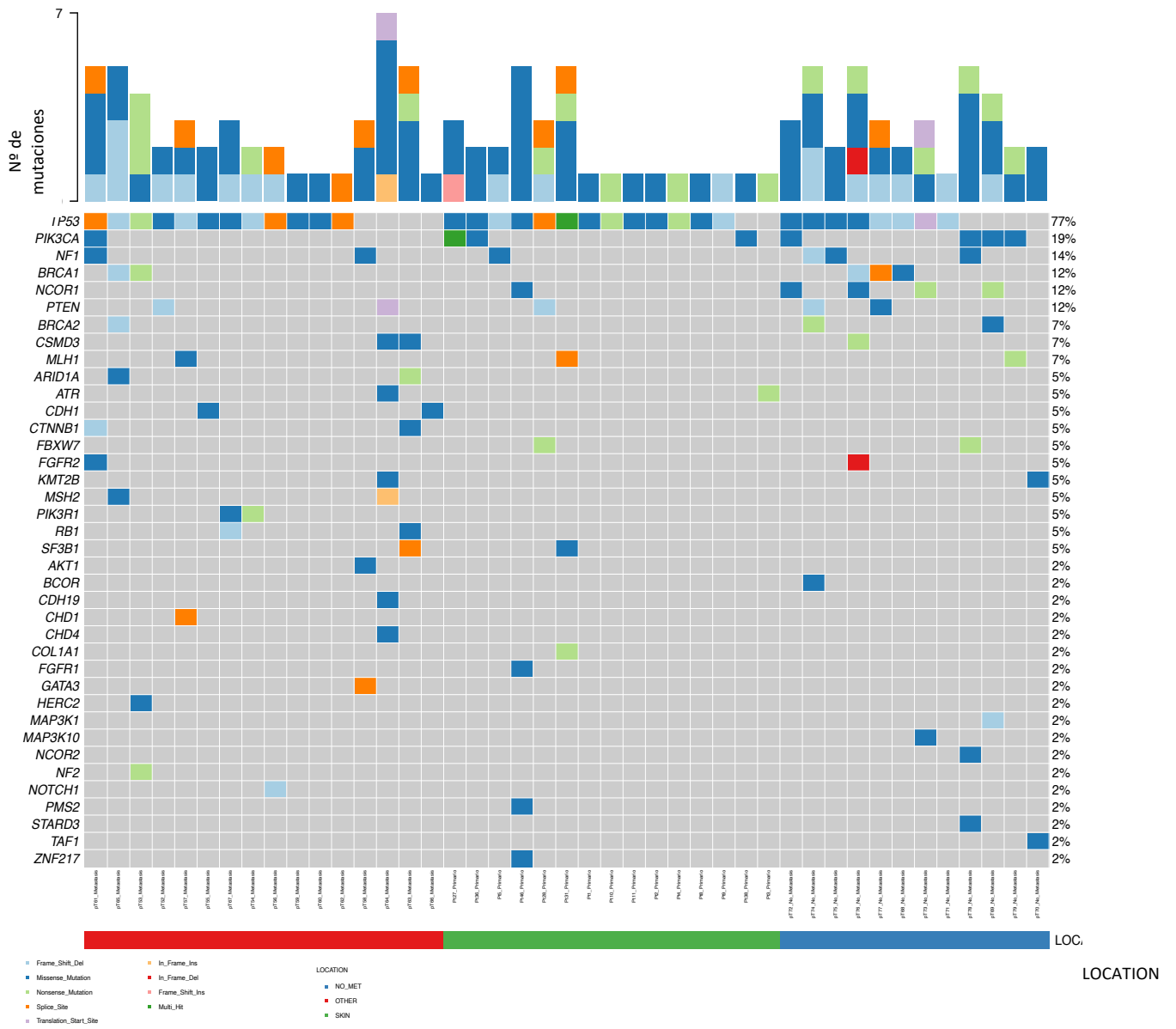
-Grupo 1: 15 tumores primarios TN de pacientes que han desarrollado MC (todos los CMTN de la serie 1, que incluyen los 3 CMTN con metástasis cutáneas de la serie 2).

-Grupo 2: 16 tumores primarios TN de pacientes que han desarrollado metástasis no cutáneas (serie 2).

-Grupo 3: 12 tumores primarios TN de pacientes que no han desarrollado metástasis de ningún tipo en al menos 5 años (serie 2).

El gen con mayor frecuencia de mutación fue *TP53*, mutado en 33 muestras (77%) seguido de *PIK3CA* mutado en el 19% de las muestras (Fig. 28).

FIGURA 28. DISTRIBUCIÓN DE MUTACIONES ENTRE LOS TUMORES PRIMARIOS TRIPLE NEGATIVO CON METÁSTASIS CUTÁNEAS, OTRAS METÁSTASIS Y SIN METÁSTASIS



#### 4.4.2.1 Tumores primarios triple negativo con metástasis cutáneas versus sin metástasis y versus otras metástasis

Se compararon las frecuencias de mutación de los carcinomas primarios TN que desarrollaron MC (los tumores primarios TN de la serie 1) frente a los que desarrollaron otras metástasis y a los que no desarrollaron metástasis de ningún tipo (Tabla 22). No se vieron diferencias estadísticamente significativas.

Si combinamos los grupos 1 y 2, obteniendo un total de 31 muestras y comparamos estas frecuencias de mutación con las del grupo 3. Vemos la mayor diferencia en la frecuencia de *NCOR1*, mutado en 4 muestras de pacientes no metastásicas (3%) y 1 de pacientes metastásicas (33%) ( $p=0,075$ ).

**TABLA 22. FRECUENCIAS DE MUTACIÓN EN TUMORES QUE DESARROLLARON METÁSTASIS CUTÁNEA, SIN METÁSTASIS Y OTRAS METÁSTASIS**

FRECUENCIAS DE MUTACIÓN			
Gen	Primarios metástasis cutáneas ( $n=15$ )	Primarios con otras metástasis ( $n=16$ )	Primarios sin metástasis ( $n=12$ )
<i>TP53</i>	87%	75%	67%
<i>PIK3CA</i>	20%	6%	33%
<i>NF1</i>	7%	12%	25%
<i>BRCA1</i>	0%	12%	25%
<i>NCOR1</i>	7%	0%	33%
<i>PTEN</i>	7%	12%	17%
<i>BRCA2</i>	0%	6%	17%
<i>CSMD3</i>	0%	12%	8%
<i>MLH1</i>	7%	6%	8%
<i>ATR</i>	7%	6%	0%

## RESULTADOS

---

<i>FBXW7</i>	7%	0%	8%
<i>FGFR2</i>	0%	6%	8%
<i>KMT2B</i>	0%	6%	8%
<i>SF3B1</i>	7%	6%	0%
<i>BCOR</i>	0%	0%	8%
<i>COL1A1</i>	7%	0%	0%
<i>FGFR1</i>	7%	0%	0%
<i>MAP3K1</i>	0%	0%	8%
<i>MAP3K10</i>	0%	0%	8%
<i>NCOR2</i>	0%	0%	8%
<i>PMS2</i>	7%	0%	0%
<i>STARD3</i>	0%	0%	8%
<i>TAF1</i>	0%	0%	8%
<i>MSH2</i>	0%	12%	0%
<i>HERC2</i>	0%	6%	0%
<i>NF2</i>	0%	6%	0%
<i>AKT1</i>	0%	6%	0%
<i>CHD4</i>	0%	6%	0%
<i>CDH19</i>	0%	6%	0%
<i>CHD1</i>	0%	6%	0%
<i>GATA3</i>	0%	6%	0%
<i>PIK3R1</i>	0%	12%	0%
<i>RB1</i>	0%	12%	0%
<i>CDH1</i>	0%	12%	0%
<i>ARID1A</i>	0%	12%	0%
<i>CTNNB1</i>	0%	12%	0%
<i>ZNF217</i>	7%	0%	0%

---

# DISCUSIÓN

---





---

## 5. DISCUSIÓN

Pasaremos a discutir de forma separada los distintos objetivos de este estudio, que fueron los siguientes:

- Analizar las características clinicopatológicas de los carcinomas primarios de mama que desarrollan metástasis cutánea.
- Comparar las diferencias moleculares entre carcinomas primarios y sus metástasis cutáneas.
- Determinar si el perfil molecular de los tumores primarios triple negativo difiere según su patrón metastásico o no.

### 5.1 ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS DE LOS CARCINOMAS DE MAMA QUE DESARROLLAN METÁSTASIS CUTÁNEA

Las 51 pacientes de la serie 1 tenían una mediana de **edad** de 61 años. La edad mediana de las mujeres con CM que desarrollan MC en un estudio de 18 pacientes fue de 74 años (Guanziroli et al., 2017) y en otro de 125 pacientes fue de 48 años (Kong et al., 2011), edades que no entran dentro del intervalo de confianza de nuestra serie ( $60,6 \pm 4,4$  error estándar). Si bien es cierto que la diferencia entre la mediana de edad de nuestra serie y estas puede deberse a la distinta procedencia de las pacientes, Italia, Corea del Sur y España, no se puede excluir que las diferencias se deban el tamaño muestral de los estudios y a la inclusión de distintos fenotipos tumorales.

En una reciente revisión sistemática clínica de MC (Johnson, 2021), aunque no especifican la mediana de edad, agrupan a las 41 pacientes con CM y MC en rangos de edad. Hemos comparado las pacientes de nuestra serie frente a las reportadas por Johnson et al. (Tabla 23). Tanto en nuestra serie como en la revisión, la mayor parte de las pacientes (66,6% vs. 65,8%) tenían menos de 70 años, el porcentaje de pacientes por encima de esta edad es similar en ambos estudios. En general en nuestra serie, a

excepción del grupo de pacientes < 40 años, las frecuencias se encuentran repartidas homogéneamente entre los distintos rangos de edad.

**TABLA 23. EDADES AGRUPADAS EN RANGOS DE NUESTRA SERIE FRENTE A LA DE LA REVISIÓN DE JOHNSON Y COL.**

RANGOS DE EDAD	PRESENTE SERIE	REVISIÓN JOHNSON Y COL.
	n= 51	n= 41
< 40 años	7,8%	4,9%
40-49	19,6%	19,5%
50-59 años	17,6%	24,4%
60-69 años	21,6%	17%
70-79 años	15,7%	27%
> 80 años	17,5%	7,3%

En cuanto a la **localización de la MC**, en nuestra serie, de las 50 pacientes de las que teníamos este dato, se desarrollaron en la piel de la mama en 28 casos (56%) y a distancia en 22 (44%), entre los que incluimos 3 casos de MC en tórax con una afectación muy significativa; si consideramos estos 3 casos como locales las frecuencias serían 60% locales y 38% a distancia. En la revisión de Johnson y col. (Johnson, 2021), observaron que de 61 casos, la localización más común de las lesiones cutáneas era en el tórax o la mama, representando el 57% de las MC. Vemos que el porcentaje de casos de MC locales y a distancia de nuestro estudio se asemeja a lo ya publicado sobre CM y MC, lo que refleja la consistencia de nuestra serie.

En nuestra serie, el **tipo histológico** de 39 casos (76,5%) correspondía a carcinoma infiltrante NOS, siendo el resto subtipos histológicos especiales. El siguiente grupo más numeroso, 8 casos (15,7%), correspondía a CLI clásico una frecuencia similar a la de CLI en la población general de CM (WHO Classification of Tumours Editorial Board et al., 2019), lo que podría hacer pensar que el CLI no tiene una propensión especial a metastatizar en piel; sin embargo, hay que considerar que la proporción de

CM RH+ en nuestra serie es relativamente baja, debido a la sobrerrepresentación de CMTN (ver discusión posterior). Así, si seleccionamos únicamente los 25 casos RH+ HER2- de nuestra serie, 8 son CLI (32%), lo que sugeriría una mayor tendencia del CLI a producir MC. Nuestros datos están en la línea de lo observado por Li et al. (Q. Li et al., 2021), quienes estudian CM metastásicos HR+HER2- y observan que el 26% de los que desarrollan MC son CLI.

No obstante, la frecuencia de CLI varía entre diferentes series. En la serie de Kong et al. (Kong et al., 2011), en el 95,2% de los casos de MC el primario fue un carcinoma infiltrante NOS, seguido de CLI (2,4%) y otros (2,4%). Sin embargo, en la serie de Guanzioli y col. (Guanzioli et al., 2017), de las 18 muestras de CM con MC el 50% fueron CLI.

Haciendo referencia a los **subtipos moleculares**, vimos que la frecuencia de los CM que desarrollan MC varía según el subtipo. En la Tabla 24 se comparan los datos de nuestra serie con los de otras publicadas (González-Martínez et al., 2021; Kong et al., 2011; Luna et al., 2020; Yates et al., 2017).

**TABLA 24. DISTRIBUCIÓN DE FENOTIPOS MOLECULARES EN LOS CASOS DE CÁNCER DE MAMA CON METÁSTASIS CUTÁNEA DE CADA SERIE**

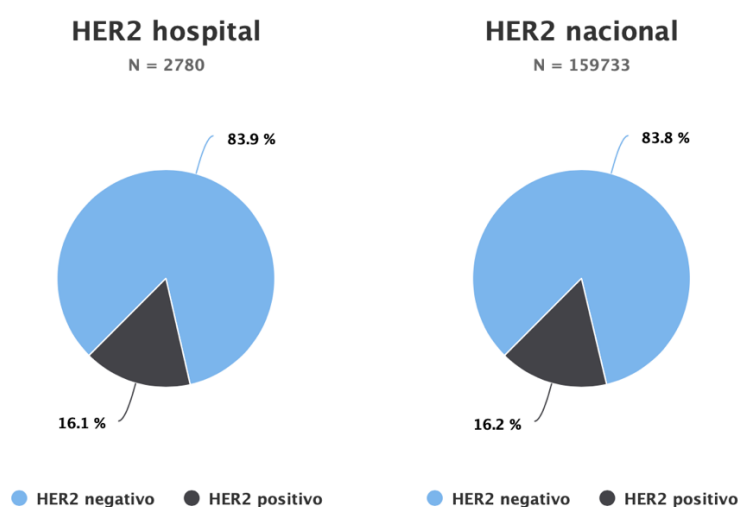
AUTORES	<i>n</i>	RH+/HER2- <i>n</i> (%)	HER2+ <i>n</i> (%)	TN <i>n</i> (%)	DESCONOCIDO <i>n</i> (%)
Kong y col.	125	53 (42,4)	43 (34,4)	29 (23,2)	
Luna y col.	26	7 (26,9)	7 (26,9)	10 (38,5)	2 (7,7)
González-Martínez y col.	58	29 (50)	8 (13,8)	15 (25,9)	6 (10,3)
Presente serie	51	25 (49)	8 (15,7)	18 (35,3)	

Se observa que, aunque haya diferencias entre series, un hallazgo común a todas ellas es la sobrerrepresentación relativa de CMTN, ya que su frecuencia en la población

general de CM se sitúa en torno al 15% (Morris et al., 2007), pero se sitúa entre el 23-39% en CM con MC, por lo que se podría sugerir la asociación de este fenotipo molecular con la mayor capacidad de metastatizar a piel. Por el contrario, la frecuencia del fenotipo RH+, se situaba entre 27-61%, menor que en la población general de CM, lo que sugiere menor propensión de los CM RH+ a metastatizar en piel.

Por otro lado, observando la frecuencia de tumores HER2+ de nuestra serie (16%), se ve que esta es muy similar a la frecuencia del total de los CM en España y en el Hospital Ramón y Cajal, según los datos de la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP, 2021) (Fig. 29), por lo que según nuestros resultados el estado de HER2 no se relaciona de manera preferente con la MC.

**FIGURA 29. CASOS DE CÁNCER DE MAMA HER2 EN EL HOSPITAL RAMÓN Y CAJAL Y A NIVEL NACIONAL EN ESPAÑA SEGÚN LA SEAP**



Las diferencias en las frecuencias de casos HER2+ entre las distintas series observadas en la Tabla 24 puede deberse a diversos factores. Uno de ellos es el área geográfica de las pacientes; por ejemplo, en la serie de Kong y col. (Kong et al., 2011), con un total de casos HER2+ del 34%, las pacientes se incluyeron de un hospital de Seúl (Corea del Sur) y en la de Luna y col. (Luna et al., 2020), con una frecuencia de casos HER2+ del 27%, las pacientes provenían de centros de Argentina. Se sabe mediante

---

estudios en mujeres latinas y latinoamericanas de Estados Unidos que existe una alta incidencia de tumores HER2+ en estas pacientes (Marker et al., 2020).

Otro factor podría ser el método de determinación de HER2; en la serie de Yates y col. (Yates et al., 2017) los datos de expresión de HER2 eran escasos y la amplificación de HER2 se determinó a partir de datos de secuenciación, siendo esta técnica menos precisa y sensible que IHC y FISH. Otro aspecto a tener en cuenta es la antigüedad de las muestras, ya que van perdiendo calidad con el paso del tiempo; de hecho, en el estudio de Luna y col. (Luna et al., 2020) las muestras se obtuvieron entre 1995 y 2005, y se recolectaron en 2014. Además, hay que resaltar que en el estudio de Lefebvre y col. (Lefebvre et al., 2016) el bajo número de casos HER2+ (7%), se podría explicar porque las muestras de MC eran de 3 ensayos clínicos, por lo que debían cumplir unos criterios de inclusión concretos según cada uno.

Es bien conocido que cada fenotipo molecular presenta distinto patrón metastásico. Los tumores RE+ suelen metastatizar en hueso (Coleman, 1997; Lipton, 2003; Richert & Welch, 2009). El fenotipo HER2+, cuando produce metástasis, suele afectar al sistema nervioso central (Bendell et al., 2003; Heitz et al., 2009; Lentzsch et al., 1999). Y los CMTN con frecuencia metastatizan a órganos viscerales, muestran un mayor tropismo para el pulmón con una alta tasa de metástasis al sistema nervioso central también (Gerratana et al., 2015). Con estos resultados podríamos incluir la piel como un órgano a destacar entre las localizaciones de metástasis de los CMTN.

En 5 casos pareados de los 33 de nuestra serie (15,1%), se produjo una **conversión de fenotipo molecular** entre el tumor primario y la metástasis: en 3 casos (9%) hay cambio de tumor luminal a TN, en un caso (3%) de tumor luminal HER2+ a luminal HER2- y en otro (3%) de luminal HER2- a luminal HER2+. Este dato de cambio de fenotipo entre tumores primarios y sus MC no se ha reportado previamente en la literatura, aunque existen estudios de este tipo en otras localizaciones metastásicas. En la Tabla 25 se puede ver la conversión de RHs y HER2 de nuestra serie frente a la serie

del estudio de GEICAM (de Dueñas et al., 2014), en el que incluyen diferentes tipos de metástasis, siendo las frecuencias de conversión similares.

**TABLA 25. CONVERSIÓN DE RECEPTORES DE HORMONAS Y HER2 ENTRE TUMORES PRIMARIOS Y METÁSTASIS DE NUESTRA SERIE Y DE GEICAM**

		PRESENTE SERIE	GEICAM
		<i>n</i> = 33	<i>n</i> = 167
RE	De + a -	9%	10%
	De - a +	0%	3%
RP	De + a -	15,2%	24%
	De - a +	9%	8%
HER2	De + a -	3%	0%
	De - a +	3%	3%

## 5.2 DIFERENCIAS MOLECULARES ENTRE TUMORES PRIMARIOS Y SUS METÁSTASIS CUTÁNEAS

El segundo objetivo fue comparar diferencias moleculares entre tumores primarios y MC para tratar de identificar alteraciones relacionadas con la progresión tumoral.

Debido a que de algunas de las 51 pacientes de la serie 1 no había disponible muestra de tumor primario y de MC y a que tuvimos que descartar algunas muestras por mala calidad de las secuencias, o a que por la mala hibridación en el FISH no fueron valorables, no todos los casos eran pareados. Dado que en la bibliografía predominan las series en las que incluyen muestras de primarios o MC sin parear, discutiremos los hallazgos de nuestro estudio en la serie completa de casos.

### 5.2.1 Tumores primarios

En primer lugar, analizamos las mutaciones de los tumores primarios y observamos que el perfil se adapta al fenotipo molecular. Así, *TP53* tenía una frecuencia de mutación del 86,7% en los CMTN y *PIK3CA* del 40% en los tumores RH+ HER2-.

Respecto a los CMTN, hay que considerar que constituyen un grupo heterogéneo en los que se distingue, entre otros, un fenotipo caracterizado por la expresión de RA y genes luminales (subtipo LAR). Se ha descrito que los CMTN LAR tienen más frecuentemente mutaciones en *PIK3CA* y muestran más mutaciones somáticas en *ERBB2* (The Cancer Genome Atlas Network, 2012). En nuestra serie, valoramos los RA en los 12 CMTN y 3 casos fueron positivos. En 1 de ellos (33%), se encontró mutación de *PIK3CA*. De los 9 casos con RA negativos, se encontró mutación de *PIK3CA* en 3 casos (33%), por lo que no observamos una relación entre la positividad de RA y la mutación en *PIK3CA*, si bien el tamaño de la muestra tan pequeño no puede hacernos sacar conclusiones definitivas y tan solo exploratorias.

Respecto a los CNVs en tumores primarios de la serie, hicimos una comparativa de las frecuencias de amplificación con los del estudio de Moelans y col. (Moelans et al., 2014) que eran también tumores que desarrollaron MC ( $n=22$ ) y por otro lado con las de los tumores primarios de METABRIC de Cbioportal (*cBioPortal for Cancer Genomics*, 2021); en esta última serie de pacientes con y sin afectación metastásica, se desconoce cuántos presentaron metástasis por lo que la diferencia en la frecuencia de alteraciones podría ser debido a distintos aspectos, entre los que cabe destacar la presencia o no de metástasis, además de a que los CNVs se analizaron por NGS en el estudio METABRIC (Tabla 26). En comparación con los resultados de Moelans y col. (Moelans et al., 2014) los resultados también difieren; esto puede deberse a que la distribución los fenotipos de nuestras muestras no se corresponden con las de ellos.

**TABLA 26. FRECUENCIAS DE AMPLIFICACIÓN DE *CCND1*, *MYC*, *FGFR1* Y *MDM4* EN MUESTRAS DE TUMORES PRIMARIOS DE NUESTRA SERIE Y DE OTRAS PUBLICADAS**

FRECUENCIAS DE AMPLIFICACIÓN EN TUMORES PRIMARIOS			
Genes	Con metástasis cutáneas		Metastásicos y no metastásicos
	Presente serie <i>n</i> = 34	Moelans y col. <i>n</i> = 22	METABRIC de Cbioportal <i>n</i> = 2.173
<i>CCND1</i>	8,8%	18%	16,3%
<i>MYC</i>	15,2%	9%	25,5%
<i>FGFR1</i>	8,8%	0%	13,1%
<i>MDM4</i>	11,8%	NC	25,1%

### 5.2.2 Metástasis cutáneas

El gen con mayor frecuencia de mutación en las MC de nuestra serie fue *TP53*, seguido de *PIK3CA* y otros como *MAP3K1*, *RB1*, *GATA3*, *CDH1*, *AKT1*, *NF1*, *ESR1*, etc. Los genes mutados en mayor frecuencia entre la presente serie y las publicadas son los mismos y las frecuencias de mutación son similares para *TP53* y *PIK3CA* (González-Martínez et al., 2021). En general las frecuencias son parecidas, y las pequeñas diferencias en algunos genes puede deberse posiblemente al tamaño muestral (Tabla 27).



**TABLA 27. FRECUENCIAS DE MUTACIÓN EN LAS METÁSTASIS CUTÁNEAS DE NUESTRA SERIE FRENTE A OTRAS PUBLICADAS**

GENES	PRESENTE SERIE	REVISIÓN GONZÁLEZ- MARTÍNEZ Y COL.
	<i>n</i> = 44	<i>n</i> = 58
<i>TP53</i>	47,3%	50%
<i>PIK3CA</i>	43,6%	41%
<i>NF1</i>	10,9%	5%
<i>CDH1</i>	9,1%	5%
<i>ATR</i>	9,1%	0%
<i>BRCA2</i>	6,4%	0%
<i>AKT1</i>	6,4%	5%
<i>GATA3</i>	4,5%	7%
<i>COL1A1</i>	4,5%	0%
<i>ESR1</i>	4,5%	2%
<i>RB1</i>	4,5%	9%
<i>MAP3K1</i>	1,8%	12%

Puesto que existen diferencias en la distribución de fenotipos moleculares y en el tipo de secuenciación realizada entre las distintas series, filtramos las series de la revisión según los genes de nuestro panel y analizamos las mutaciones encontradas según el fenotipo molecular. En la Tabla 28 se puede ver la distribución de las muestras de MC por fenotipos moleculares de nuestro estudio y de la revisión.

**TABLA 28. DISTRIBUCIÓN DE LOS CASOS DE METÁSTASIS CUTÁNEA DE NUESTRA SERIE Y DE OTRAS PUBLICADAS**

AUTORES	TOTAL MC <i>n</i>	RH+ HER2- <i>n</i> (%)	RH+ HER2+ <i>n</i> (%)	HER2+ <i>n</i> (%)	TN <i>n</i> (%)	DESCONOCIDO <i>n</i> (%)
Presente serie	44	19 (43,2)	3 (6,8)	3 (6,8)	19 (43,2)	0
Revisión					15	
González- Martínez y col.	58	29 (50)	2 (3,4)	6 (10,3)	(25,9)	6 (10,3)

Comparando en este caso las frecuencias de mutación de ambos estudios por fenotipos, solo se observaron diferencias estadísticamente significativas en el grupo de tumores RH+ HER2-, el gen *PIK3CA* estaba mutado en un 47,4% de los casos RH+ HER2- frente a 0 en las series de la revisión. Esto puede deberse a algún fallo en la secuenciación en las series incluidas en la revisión. De nuevo, hemos de tener en cuenta el tamaño muestral como una causa probable de estas diferencias.

Un estudio de MC publicado recientemente incluía sólo muestras del fenotipo RH+HER2- (Q. Li et al., 2021). En este estudio se secuenciaron mediante un panel de genes 72 muestras de MC. Comparando las 19 muestras de MC con fenotipo RH+HER2- de nuestra serie con las 72 muestras de este estudio, no se observan grandes diferencias (Tabla 29), siendo las frecuencias muy similares para genes como *TP53*, *PIK3CA*, *CDH1*, *GATA3*, *BRCA2*, *NF1* y *ARID1A*. En cambio, las frecuencias de amplificación de *CCND1*, *MYC* y *MDM4* son bastante dispares; en nuestra serie *MYC* se vio amplificado en 3 casos con un número de copias mayor a 6 en todos, mientras que en la serie de Li y col. (Q. Li et al., 2021) se objetivó en el 6,9% de las muestras. Esto puede deberse a que de todos los casos de MC fenotipo RH+HER2- de nuestra serie solo fue posible valorar las amplificaciones en 13 muestras por falta de material o mala hibridación.

**TABLA 29. FRECUENCIAS DE MUTACIÓN EN MUESTRAS CON FENOTIPO RH+HER2- DE LA SERIE 1 Y UNA SERIE DE CBIOPORTAL**

Gen	FRECUCIAS DE ALTERACIÓN EN FENOTIPO RH+HER2-		
	Muestras de metástasis cutánea	Muestras de hígado	
	Presente serie <i>n</i> = 19	Li y col. <i>n</i> = 72	
<i>TP53</i>	15,8%	18,1%	31,4%
<i>PIK3CA</i>	47,4%	45,8%	36,1%
<i>CDH1</i>	15,8%	26,4%	15,2%
<i>ESR1</i>	10,5%	19,4%	31,4%
<i>GATA3</i>	10,5%	12,5%	21,6%
<i>AKT1</i>	5,3%	12,5%	7,8%
<i>MAP3K1</i>	5,3%	9,7%	8,8%
<i>PTEN</i>	0,0%	9,7%	5,7%
<i>TBX3</i>	10,5%	4,2%	4,3%
<i>NCOR1</i>	0,0%	8,3%	3,6%
<i>BRCA2</i>	5,3%	6,9%	3,8%
<i>NF1</i>	5,3%	6,9%	6,7%
<i>ARID1A</i>	5,3%	5,6%	7,6%
<i>PIK3R1</i>	5,3%	4,2%	2,6%
<i>ATR</i>	5,3%	0,0%	3,6%
<i>CASP8</i>	5,3%	0,0%	0,2%
<i>CSMD3</i>	5,3%	0,0%	0,0%
<i>CTCF</i>	5,3%	1,4%	2,1%
<i>FGFR1</i>	5,3%	0,0%	1,2%
<i>BRCA1</i>	0,0%	4,2%	2,1%
<i>RB1</i>	0,0%	2,8%	4,2%
<u>Amplificaciones</u>	<i>n</i> = 13	<i>n</i> = 72	<i>n</i> = 421
<i>CCND1</i>	15,4%	29,2%	30,6%
<i>MYC</i>	23,0%	6,9%	13,1%

## DISCUSIÓN

---

<i>FGFR1</i>	15,4%	17,5%	22,8%
<i>MDM4</i>	15,4%	5,6%	8,3%

---

Respecto a las diferencias entre las MC y otras metástasis, en nuestra revisión (González-Martínez et al., 2021) estudiamos las diferencias moleculares entre metástasis hepáticas y MC de las series publicadas, y observamos diferencias estadísticamente significativas en seis genes: *RUNX1*, *ROBO1*, *MLL2*, *DYNC2H1* y *CHD1* ( $p= 0,025$ ), y *TP53* que se mutó en el 50% de las MC frente al 31% de las hepáticas ( $p= 0,036$ ). En nuestra serie no ha sido posible hacer una comparativa de este tipo, ya que no hemos secuenciado muestras de metástasis que no fueran de piel. Rinaldi y col. (Rinaldi et al., 2020), en su serie incluyeron unos 11.000 casos, entre ellos 5.034 muestras de distintos tipos de metástasis, de las cuales 118 casos fueron de MC y vieron un enriquecimiento de mutaciones en genes como *ESR1* y *CTCF* en algunas metástasis, pero solo los cambios en *NOTCH1* fueron específicos de MC. No obstante, en este estudio las MC también se vieron algo enriquecidas en mutaciones en *CDH1* (15,1%), *MAP3K1* (8,4%) y *ESR1* (8,2%), además de amplificaciones en *MYC* (27,5%), *NBN* (20,5%) y *RUNX1T1* (19,5%) con respecto al resto de localizaciones metastásicas.

En referencia a las frecuencias de CNVs de las MC, comparamos las de nuestra serie con las MC de otras publicadas (Tabla 30). Las frecuencias para *CCND1*, *MYC* y *FGFR1* son similares entre las de nuestra serie y la de Lefebvre y col. (Lefebvre et al., 2016); en cambio la frecuencia de *MDM4* es mayor en la nuestra. Rinaldi y col. (Rinaldi et al., 2020) solo analizaron *MYC* y se observa una frecuencia similar a la que objetivamos nosotros. En cambio, cuando comparamos estos resultados con los del estudio de Moelans y col. (Moelans et al., 2014) encontramos mayores diferencias, al igual que si comparamos con las frecuencias de amplificación del total de muestras de metástasis, tanto MC como otras del estudio de Lefebvre y col. (Lefebvre et al., 2016).

Rinaldi y col. (Rinaldi et al., 2020) vieron enriquecimiento de amplificaciones de *MYC* en las MC respecto a otras. Viendo las frecuencias en este gen en las MC de

nuestra serie, en la de Lefebvre y col. (Lefebvre et al., 2016) y en la de Rinaldi y col. (Rinaldi et al., 2020) frente a la de muestras de varios tipos de Lefebvre y col. (Lefebvre et al., 2016) observamos este enriquecimiento. Ocurre lo contrario para *CCND1*. (Tabla 30)

**TABLA 30. FRECUENCIAS DE AMPLIFICACIÓN DE *CCND1*, *MYC*, *FGFR1* Y *MDM4* EN MUESTRAS DE METÁSTASIS DE NUESTRA SERIE Y DE OTRAS PUBLICADAS**

Genes	FRECUENCIAS DE AMPLIFICACIÓN				
	Metástasis cutáneas			Varios tipos de metástasis	
	Presente serie <i>n</i> = 34	Lefebvre y col. <i>n</i> = 26	Rinaldi y col. <i>n</i> = 118	Moelans y col. <i>n</i> = 22	Lefebvre y col. <i>n</i> = 216
<i>CCND1</i>	11,8%	15,4%	NC	27%	24,1%
<i>MYC</i>	29,4%	26,9%	27,4%	5%	19%
<i>FGFR1</i>	11,8%	11,5%	NC	0%	13,4%
<i>MDM4</i>	14,7%	7,7%	NC	NC	6%

Una de las limitaciones que hay que tener en cuenta en el análisis de mutaciones es el tipo de plataformas usadas y la secuenciación realizada según el estudio. Yates y col. (Yates et al., 2017) secuenciaron genoma completo en las dos muestras de la cohorte 1 y un panel de genes específicos en la cohorte 2, Paul y col. (Paul et al., 2020) y Lefebvre y col. (Lefebvre et al., 2016) analizaron el exoma completo. Finalmente, en el estudio de Schrijver y col. (Schrijver et al., 2018), Muller y col. (Muller et al., 2016). Y Li y col. (Q. Li et al., 2021) secuenciaron un panel de genes, al igual que nosotros.

Las comparativas de CNVs que hemos hecho también tienen ciertas limitaciones ya que los resultados de CNVs pueden variar según la técnica usada. En el estudio METABRIC, en el de Rinaldi y col. (Rinaldi et al., 2020) y en de Lefebvre y col. (Lefebvre et al., 2016) los CNVs se analizaron por secuenciación masiva y en el de Moelans y col.

(Moelans et al., 2014) con un kit comercial "Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification" (MLPA). En nuestra serie los analizamos mediante FISH. Se ha visto que la detección de CNVs mediante NGS y FISH difiere, obteniéndose algunos falsos negativos mediante NGS (Kim et al., 2021).

Una vez analizados los tumores primarios y las muestras de MC totales independientemente, comparamos ambos grupos. En este análisis comparativo de todos los tumores primarios frente a todas las MC no encontramos diferencias estadísticamente significativas, probablemente por el bajo número de muestras y porque las variaciones en las MC fueron muy individuales sin seguir un patrón común.

### 5.2.3 Alteraciones moleculares adicionales en las metástasis cutáneas

Analizando estos casos, vimos que existían diferencias moleculares entre los tumores primarios y sus correspondientes MC (48,5% de casos). No encontramos un patrón fijo de alteraciones, sino que observamos que era un proceso muy individual, siendo las mutaciones adicionales en las MC muy variables. Cada una de las mutaciones (*TP53*, *PIK3CA*, *RB1*, *FGFR2*, *CTNNB1*, *COL1A1*, *CTCF*, *FGFR1*, *BRCA2+MKI67+SF3B1*, *CASP8*, *NF1*, *KRAS*, *BRCA1*) se vio adicional en la MC en un solo caso, a excepción de *PIK3CA* que se encontró en 3 (9%), y en cuanto a las amplificaciones, *MYC* se vio adicional en 3 casos (15%), *MDM4* en otros 3 (15%), *CCND1* en uno (5%) y *HER2* en otro (3%). Comparando nuestros resultados (González-Martínez et al., 2022) con los de otras series con casos pareados (Paul et al., 2020; Schrijver et al., 2018; Yates et al., 2017), observamos también mutaciones adicionales en *TP53*, *PIK3CA* y *NF1* y amplificaciones en genes como *MYC* y *FGFR1*. Se ven alterados diferentes genes según la serie (Tabla 31).

**TABLA 31. MUTACIONES ADICIONALES EN METÁSTASIS CUTÁNEAS DE CASOS PAREADOS NO ENCONTRADAS EN TUMORES PRIMARIOS**

AUTORES	CASOS PAREADOS DE METÁSTASIS CUTÁNEA <i>n</i>	ALTERACIONES MOLECULARES ADICIONALES EN METÁSTASIS EN PIEL	
Schrijver y col.	8	33 mutaciones ( <i>ATR, BRCA1, SMAD4, CDH1, ARID1A, ERBB2, IDH1, PIK3R1, RB1</i> , etc) y amplificación de <i>FGF3</i>	
Yates y col.	2	4 alteraciones moleculares (amplificación de <i>FGFR1</i> /variante estructural de <i>TP53</i> , indel de <i>RB1</i> /amplificación de <i>TERC</i> )	
	4	9 mutaciones ( <i>JAK2, NF1, TP53, AKT1</i> y <i>ARID1A</i> ) y 2 amplificaciones ( <i>MYC</i> y <i>FGFR1</i> )	
Paul y col.	1	54 mutaciones ( <i>PIK3CA, TP53</i> , etc)	
Presente serie	33	8 mutaciones ( <i>TP53+PIK3CA+COL1A1, PIK3CA, PIK3CA, RB1, FGFR2, CTNNB1</i> ) y 3 amplificaciones (2 en <i>MYC</i> y una en <i>MDM4</i> )	
		16 RH+HER2-	7 mutaciones ( <i>FGFR1+NF1, BRCA2+MKI67+SF3B1, CASP8+ERBB2</i> ), 1 polisomía ( <i>ERBB2</i> ) y una amplificación ( <i>MDM4</i> )
		5 HER2+	2 mutaciones ( <i>KRAS, BRCA1</i> ), 4 amplificaciones o polisomía ( <i>CCND1, MYC, FGFR1</i> y <i>MDM4</i> )

### 5.2.4 Implicaciones terapéuticas

Una cuestión importante en el estudio de la metástasis del cáncer es si las características moleculares de las muestras metastásicas modifican o no el tratamiento de cada paciente. En 5 pacientes de este estudio (15,1%), hubo una conversión de tipo molecular subrogado entre el tumor primario y su MC. En 3 casos (9%) hubo un cambio de luminal a TN, en un caso (3%) de luminal HER2+ a luminal HER2- y en otro (3%) de luminal HER2- a luminal HER2+. Todos estos cambios habrían repercutido en la decisión de tratamiento respecto al uso de la terapia hormonal o la terapia anti-HER2.

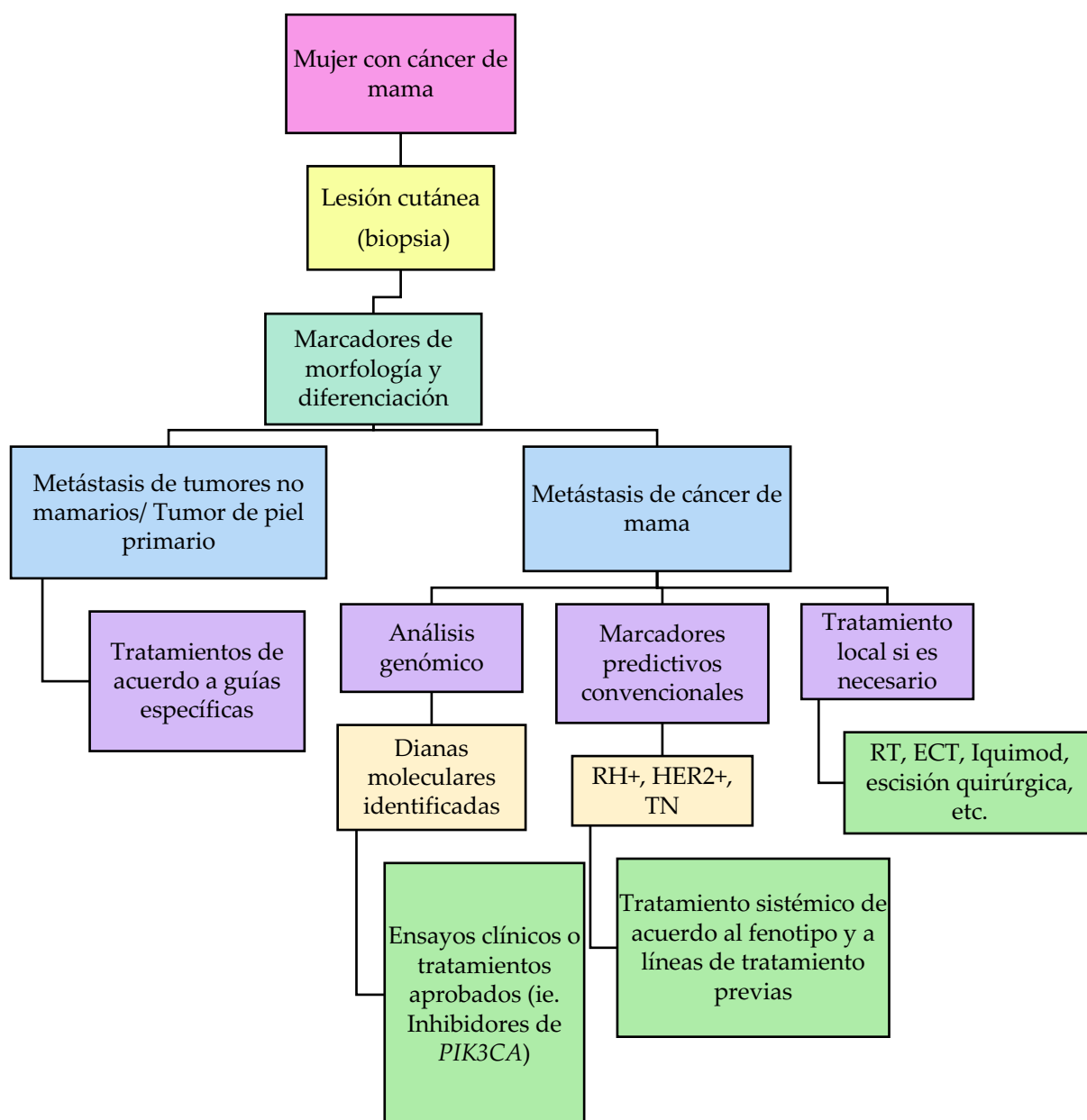
En cuanto a las mutaciones específicas, dos MC desarrollaron mutaciones adicionales en *PIK3CA*, que es un objetivo para el tratamiento con alpelisib en el CM metastásico RH+. Sin embargo, los dos primarios y las metástasis eran TN. Detectamos una mutación *ESR1* en un tumor primario RH+ y en su MC. Las mutaciones en *ESR1* son las mutaciones adicionales más frecuentes que se desarrollan en los CM HR+ metastásicos tras la terapia hormonal, especialmente tras el uso de inhibidores de la aromatasa, siendo infrecuentes en los tumores primarios. En este caso, las mutaciones del gen *ESR1* habrían influido en la respuesta a la terapia hormonal durante la evolución completa de la enfermedad.

Un caso interesante en esta serie fue el tumor y su MC desarrollado en la paciente Pt13. Se trataba de un CLI que portaba la mutación patogénica L755S en el tumor primario. Esta mutación estaba ausente en la MC, que portaba la mutación patogénica S310F. Las mutaciones en *ERBB2* son más frecuentes en los CLI (6%) que en los CDI (1,5%), especialmente en los CLI con características pleomórficas, y se asocian a un mal pronóstico (Kurozumi et al., 2020; Rosa-Rosa et al., 2019). Además, la respuesta a las diferentes terapias anti-HER2 difiere entre las mutaciones. Así, mientras que L755S parece ser resistente a trastuzumab y lapatinib pero sensible a neratinib y afatinib, S310F parece ser sensible a todos los fármacos.



En base a estos resultados se sugiere el algoritmo de diagnóstico y tratamiento de las MC indicado en la Fig. 30 (González-Martínez et al., 2021).

**FIGURA 30. ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LAS METÁSTASIS CUTÁNEAS**



### 5.2.5 Pronóstico

En relación con el **pronóstico y supervivencia**, las MC, independientemente del subtipo molecular del tumor primario, suelen aparecer al final de la enfermedad, en las

últimas etapas del curso del cáncer, por lo que son un signo de mal pronóstico. Lookingbill y col. (Lookingbill et al., 1990) observaron que únicamente el 6,3% de las pacientes con CM presentaban afectación cutánea al momento del diagnóstico del tumor primario. Más recientemente, en la revisión de Johnson y col. (Johnson, 2021) se comunica que aproximadamente el 13,7% de las pacientes presentaron una lesión cutánea antes o simultáneamente al diagnóstico de CM. En nuestra serie, teniendo en cuenta todas las localizaciones, el 18% de las que disponíamos de la fecha del diagnóstico del tumor primario y de la MC (50), debutaron con MC. Estas frecuencias se asemejan a las de la bibliografía y se confirma que la frecuencia de pacientes que presenta MC al diagnóstico de la enfermedad es baja.

Desde el diagnóstico de la MC, Lookingbill et al. (Lookingbill et al., 1993) observaron una supervivencia media de 31 meses. Kong et al. [15] observaron una mediana de supervivencia de 32 meses. En nuestra serie, la mediana de supervivencia fue de 21 meses, esta diferencia puede estar relacionada con las diferencias clínicas entre las series. Además, los pacientes que desarrollaron una MC a distancia tuvieron una supervivencia global más corta y murieron con más frecuencia durante el primer año tras el diagnóstico del CM; sin embargo, estas diferencias entre la supervivencia según la localización no fueron estadísticamente significativas. En el análisis de supervivencia univariante, las únicas variables que mostraron un impacto en el pronóstico fueron el tipo molecular subrogado y las mutaciones en *TP53*. Pero en el análisis multivariante sólo el tipo molecular subrogado siguió siendo estadísticamente significativo, siendo el tipo molecular subrogado luminal HER2- el de mejor pronóstico.

### **5.3 RELACIÓN ENTRE EL PERFIL MOLECULAR DE LOS TUMORES PRIMARIOS TRIPLE NEGATIVO Y SU PATRÓN METASTÁSICO**

Como tercer objetivo, nos planteamos valorar si existe una relación entre un perfil molecular concreto en los carcinomas primarios TN que se asocie con la

metástasis a piel. En la serie 1 encontramos que había un alto porcentaje de tumores TN, por ello en la serie 2 solo incluimos tumores de este grupo molecular.

Puesto que la serie 2 pertenece a un estudio preliminar y no se han analizado los CNVs, únicamente nos centramos en el análisis de mutaciones. Estamos recopilando más muestras y continuando con su caracterización.

Para el análisis de las muestras en las que se realizó secuenciación del exoma completo, se filtraron los 206 genes involucrados en mayor frecuencia en CM según el estudio METABRIC de cBioportal (*cBioPortal for Cancer Genomics*, 2021). Se hizo una comparativa entre las pacientes que desarrollaron metástasis de algún tipo (de estas 3 desarrollaron MC) y las pacientes que llevaban 5 años o más sin evidencia clínica de progresión.

Al hacer estudios estadísticos las diferencias no fueron significativas entre ambos grupos, pero sí que se observó una mayor frecuencia de mutación de *TP53* en las pacientes que desarrollaron metástasis, lo que sugiere su implicación en este proceso. En cambio, *PIK3CA* se observó mutado con mayor frecuencia en las pacientes sin metástasis; en este grupo se observó que 3 casos tenían mutación en *PIK3CA*, pero no en *TP53*. Además, 2 de estos 3 mostraron positividad para RA y uno de estos 2, presentó un patrón de diferenciación apocrina. Está descrito que una minoría de tumores TN expresan marcadores luminales, como los RA, y tienen una menor actividad proliferativa (Denkert et al., 2017). Además, el subtipo RA+ tiene un perfil de expresión génica significativamente diferente al de otros subtipos de CMTN. Aunque este no expresa el RE, tiene altamente activadas vías de señalización relacionadas con hormonas (incluida la síntesis de esteroides, el metabolismo de las porfirinas y el metabolismo de los andrógenos/estrógenos) (Yin et al., 2020).

Para poder ver las diferencias moleculares entre los tumores primarios TN que desarrollaron MC respecto al resto, agrupamos todos los tumores TN de ambas series y

realizamos un análisis conjunto. Para este análisis, de las muestras de las que se secuenció exoma completo, se extrajeron los datos de los genes del panel usado en la serie 1. Las muestras se dividieron en 3 grupos: i) pacientes con tumores primarios TN que desarrollaron MC (los de la serie 1), y como grupos controles, ii) un grupo que metastatizó en otras localizaciones y iii) un grupo de pacientes sin metástasis en al menos 5 años.

Cuando comparamos las mutaciones de los primarios TN que desarrollaron MC con los que no desarrollaron MC en al menos 5 años y con los que desarrollaron otros tipos de metástasis no cutáneas, la frecuencia de mutación más alta en todos los grupos fue la de *TP53*, aunque fue algo más alta en el grupo de MC, sugiriendo su implicación en el desarrollo de este tipo de metástasis en los tumores TN. En las pacientes con MC se observa una frecuencia de mutación menor en el gen *PIK3CA* en las pacientes sin metástasis, aunque más alta que en las pacientes que desarrollaron otro tipo de metástasis; esto puede deberse a que 3 casos que desarrollan MC fueron RA+, esto no se ha mirado en las pacientes que desarrollaron otras metástasis. Respecto al resto de genes no se observó una frecuencia mayor en ninguno en las pacientes con MC en relación con los otros dos grupos. No obstante, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas probablemente debido al bajo número de muestras.

Por último, comparamos las frecuencias de mutación de los tumores primarios TN que desarrollan MC, el total de tumores TNs de nuestras 2 series y los tumores primarios TN del estudio METABRIC de cBioportal (*cBioPortal for Cancer Genomics*, 2021) (Tabla 34). Vimos que la frecuencia de mutación de *TP53* fue algo mayor en el grupo de tumores TN que desarrollaron MC. Esto puede deberse a que en los otros dos grupos se incluyen tumores que no desarrollaron ningún tipo de metástasis y las mutaciones en el gen *TP53* están relacionadas con mayor agresividad tumoral (Olivier et al., 2010; Silwal-Pandit et al., 2014). En cambio, *PIK3CA* presentó una frecuencia similar en los tumores TN de los tres grupos. Respecto al resto de genes se observaron frecuencias más altas en los tumores primarios TN que desarrollaron MC en relación

con los otros 2 grupos en los genes *NF1*, *NCOR1*, *SF3B1*, *MLH1*, *COL1A1*, *FGFR1*, *PMS2* y *ZNF217*. Aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

**TABLA 32. FRECUENCIAS DE MUTACIÓN EN TUMORES PRIMARIOS TRIPLE NEGATIVO DE NUESTRA SERIE Y LOS TUMORES DE METABRIC**

FRECUENCIAS DE MUTACIÓN			
Gen	Primarios triple negativo con metástasis cutánea (n= 15)	Primarios triple negativo totales de nuestras series (n= 43)	Primarios triple negativo de METABRIC (n= 270)
<i>TP53</i>	87%	77%	80%
<i>PIK3CA</i>	20%	19%	17%
<i>NF1</i>	7%	14%	3%
<i>BRCA1</i>	0%	12%	5%
<i>NCOR1</i>	7%	12%	2%
<i>PTEN</i>	7%	12%	6%
<i>ATR</i>	7%	5%	5%
<i>CDH1</i>	0%	5%	2%
<i>FBXW7</i>	7%	5%	2%
<i>PIK3R1</i>	0%	5%	3%
<i>RB1</i>	0%	5%	6%
<i>SF3B1</i>	7%	5%	1%
<i>BRCA2</i>	0%	7%	3%
<i>MLH1</i>	7%	7%	0%
<i>AKT1</i>	0%	2%	3%
<i>COL1A1</i>	7%	2%	0%
<i>FGFR1</i>	7%	2%	0%
<i>PMS2</i>	7%	2%	0%
<i>ZNF217</i>	7%	2%	0%



# CONCLUSIONES

---





## 6. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en este trabajo son las siguientes:

1. En la presente serie, las MC se desarrollaron en pacientes con diagnóstico del CM a una edad mediana de 61 años y tras una evolución mediana de la enfermedad de 17,8 meses. La mitad aproximadamente se desarrolló a distancia, en una localización diferente a la piel de la mama.
2. Aunque el carcinoma de mama NOS con un fenotipo HR+HER2- fue el que más frecuentemente produjo MC, nuestros resultados sugieren que el CLI y el CMTN presentan un riesgo incrementado para producir MC.
3. Se encontró un cambio de fenotipo tumoral en las metástasis en el 15% de los pacientes, siendo lo más frecuente la conversión de luminal HER2- a TN.
4. En los tumores primarios, las alteraciones moleculares más frecuentes fueron en las mutaciones de *TP53* (47%) y *PIK3CA* (39%) y las amplificaciones de *MYC* (15%) y *MDM4* (11,8%). Estas alteraciones se relacionaron con el subtipo molecular.
5. El 48,5% de las MC presentó alteración molecular adicional respecto a los tumores primarios. Sin embargo, no se observó un patrón mutacional específico relacionado con la progresión del tumor.
6. Las alteraciones moleculares adicionales en metástasis incluyeron, entre otras, las amplificaciones de *MYC* y *MDM4* y mutaciones en genes como *TP53*, *PIK3CA* y *KRAS*.
7. La supervivencia se relacionó en el análisis univariante con el fenotipo tumoral y las mutaciones de *TP53*. Pero en el análisis multivariante sólo el fenotipo siguió siendo estadísticamente significativo, siendo el tipo molecular luminal HER2- el de mejor pronóstico.

8. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias de mutación en genes específicos entre los CMTN que desarrollaron MC y los que no lo hicieron.
9. Nuestros resultados sugieren que toda MC requeriría un detallado estudio IHQ y molecular, si tenemos en cuenta las implicaciones terapéuticas del cambio de fenotipo y de algunas de las alteraciones moleculares detectadas sólo en las MC.

# BIBLIOGRAFÍA

---



---

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis, G. R., Altshuler, D., Auton, A., Brooks, L. D., Durbin, R. M., Gibbs, R. A., Hurles, M. E., & McVean, G. A. (2010). A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*, 467(7319), 1061-1073. <https://doi.org/10.1038/nature09534>
2. Abdelwahab Yousef, A. J. (2017). Male Breast Cancer: Epidemiology and Risk Factors. *Seminars in Oncology*, 44(4), 267-272. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2017.11.002>
3. AECC. (2018). <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-mama/mas-informacion/evolucion-cancer-mama>
4. Alcaraz, I., Cerroni, L., Rütten, A., Kutzner, H., & Requena, L. (2012). Cutaneous Metastases From Internal Malignancies: A Clinicopathologic and Immunohistochemical Review. *The American Journal of Dermatopathology*, 34(4), 347-393. <https://doi.org/10.1097/DAD.0b013e31823069cf>
5. Allison, K. H., Hammond, M. E. H., Dowsett, M., McKernin, S. E., Carey, L. A., Fitzgibbons, P. L., Hayes, D. F., Lakhani, S. R., Chavez-MacGregor, M., Perlmutter, J., Perou, C. M., Regan, M. M., Rimm, D. L., Symmans, W. F., Torlakovic, E. E., Varella, L., Viale, G., Weisberg, T. F., McShane, L. M., & Wolff, A. C. (2020). Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: ASCO/CAP Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology*, 38(12), 1346-1366. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.02309>
6. Anders, C. K., Johnson, R., Litton, J., Phillips, M., & Bleyer, A. (2009). Breast Cancer Before Age 40 Years. *Seminars in Oncology*, 36(3), 237-249. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2009.03.001>
7. Antoniou, A. C., Casadei, S., Heikkinen, T., Barrowdale, D., Pylkäs, K., Roberts, J., Lee, A., Subramanian, D., De Leeneer, K., Fostira, F., Tomiak, E., Neuhausen, S. L., Teo, Z. L., Khan, S., Aittomäki, K., Moilanen, J. S., Turnbull, C., Seal, S., Mannermaa, A., ... Tischkowitz, M. (2014). Breast-Cancer Risk in Families with Mutations in PALB2. *New England Journal of Medicine*, 371(6), 497-506. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1400382>
8. Arozullah, A. M., Calhoun, E. A., Wolf, M., Finley, D. K., Fitzner, K. A., Heckinger, E. A., Gorby, N. S., Schumock, G. T., & Bennett, C. L. (2004). The financial burden of cancer: Estimates from a study of insured women with breast cancer. *The Journal of Supportive Oncology*, 2(3), 271-278.
9. Arrechea Irigoyen, M. A., Vicente García, F., Córdoba Iturriagoitia, A., Ibáñez Beroiz, B., Santamaría Martínez, M., & Guillén Grima, F. (2011). Subtipos moleculares del cáncer de mama: Implicaciones pronósticas y características clínicas e inmunohistoquímicas. *Anales Del Sistema Sanitario de Navarra*, 34(2), 219-233. <https://doi.org/10.4321/S1137-66272011000200008>
10. Baas, I. O., Mulder, J. R., Offerhaus, G. J. A., Vogelstein, B., & Hamilton, S. R. (1994). An evaluation of six antibodies for immunohistochemistry of mutant p53 gene product in archival colorectal neoplasms. *The Journal of Pathology*, 172(1), 5-12. <https://doi.org/10.1002/path.1711720104>
11. Badowska-Kozakiewicz, A. M., & Budzik, M. P. (2016). Immunohistochemical

- characteristics of basal-like breast cancer. *Contemporary Oncology (Poznan, Poland)*, 20(6), 436-443. <https://doi.org/10.5114/wo.2016.56938>
12. Bastien, R. R. L., Rodríguez-Lescure, Á., Ebbert, M. T. W., Prat, A., Munárriz, B., Rowe, L., Miller, P., Ruiz-Borrego, M., Anderson, D., Lyons, B., Álvarez, I., Dowell, T., Wall, D., Seguí, M. Á., Barley, L., Boucher, K. M., Alba, E., Pappas, L., Davis, C. A., ... Martín, M. (2012). PAM50 breast cancer subtyping by RT-qPCR and concordance with standard clinical molecular markers. *BMC Medical Genomics*, 5, 44. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-5-44>
  13. Bendell, J. C., Domchek, S. M., Burstein, H. J., Harris, L., Younger, J., Kuter, I., Bunnell, C., Rue, M., Gelman, R., & Winer, E. (2003). Central nervous system metastases in women who receive trastuzumab-based therapy for metastatic breast carcinoma. *Cancer*, 97(12), 2972-2977. <https://doi.org/10.1002/cncr.11436>
  14. Bourke, M. G., Salwa, S. P., Sadadcharam, M., Whelan, M. C., Forde, P. F., Larkin, J. O., Collins, C. G., O'Reilly, S., O'Sullivan, G. C., Clover, A. J., & Soden, D. M. (2017). Effective treatment of intractable cutaneous metastases of breast cancer with electrochemotherapy: Ten-year audit of single centre experience. *Breast Cancer Research and Treatment*, 161(2), 289-297. <https://doi.org/10.1007/s10549-016-4046-y>
  15. Brownstein, M. H., & Helwig, E. B. (1972). Metastatic tumors of the skin. *Cancer*, 29(5), 1298-1307. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197205\)29:5<1298::AID-CNCR2820290526>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197205)29:5<1298::AID-CNCR2820290526>3.0.CO;2-6)
  16. Burstein, M. D., Tsimelzon, A., Poage, G. M., Covington, K. R., Contreras, A., Fuqua, S. A. W., Savage, M. I., Osborne, C. K., Hilsenbeck, S. G., Chang, J. C., Mills, G. B., Lau, C. C., & Brown, P. H. (2015). Comprehensive Genomic Analysis Identifies Novel Subtypes and Targets of Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 21(7), 1688-1698. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0432>
  17. Cancer Genome Atlas Network. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490(7418), 61-70. <https://doi.org/10.1038/nature11412>
  18. Carlesimo, M., Rossi, A., De Marco, G., Narcisi, A., Cacchi, C., Mari, E., Persechino, F., & Camplone, G. (2009). Carcinoma en cuirasse of the breast. *European Journal of Dermatology: EJD*, 19(3), 289-290.
  19. Casimiro, L. M. (2009). *Metástasis cutáneas de neoplasias internas*. 37, 117-129.
  20. *CBioPortal for Cancer Genomics*. (2021). <http://www.cbioportal.org/>
  21. Chang, H. R. (2010). Trastuzumab-based neoadjuvant therapy in patients with HER2-positive breast cancer. *Cancer*, 116(12), 2856-2867. <https://doi.org/10.1002/cncr.25120>
  22. Cheang, M. C. U., Martin, M., Nielsen, T. O., Prat, A., Voduc, D., Rodriguez-Lescure, A., Ruiz, A., Chia, S., Shepherd, L., Ruiz-Borrego, M., Calvo, L., Alba, E., Carrasco, E., Caballero, R., Tu, D., Pritchard, K. I., Levine, M. N., Bramwell, V. H., Parker, J., ... Carey, L. A. (2015). Defining breast cancer intrinsic subtypes by quantitative receptor expression. *The Oncologist*, 20(5), 474-482. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2014-0372>
  23. Chiang, A. C., & Massagué, J. (2008). Molecular Basis of Metastasis. *New England Journal of Medicine*, 359(26), 2814-2823. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0805239>

24. Ciriello, G., Gatza, M. L., Beck, A. H., Wilkerson, M. D., Rhie, S. K., Pastore, A., Zhang, H., McLellan, M., Yau, C., Kandoth, C., Bowlby, R., Shen, H., Hayat, S., Fieldhouse, R., Lester, S. C., Tse, G. M. K., Factor, R. E., Collins, L. C., Allison, K. H., ... Zmuda, E. (2015). Comprehensive Molecular Portraits of Invasive Lobular Breast Cancer. *Cell*, 163(2), 506-519. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.033>
25. Coleman, R. E. (1997). Skeletal complications of malignancy. *Cancer*, 80(8 Suppl), 1588-1594. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0142\(19971015\)80:8+<1588::aid-cnrcr9>3.3.co;2-z](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0142(19971015)80:8+<1588::aid-cnrcr9>3.3.co;2-z)
26. Coonrod, E. M., Durtschi, J. D., Webb, C. V., Voelkerding, K. V., & Kumánovics, A. (2014). Next-generation sequencing of custom amplicons to improve coverage of HaloPlex multigene panels. *BioTechniques*, 57(4). <https://doi.org/10.2144/000114217>
27. Cox, S. E., & Cruz, P. D. (1994). A spectrum of inflammatory metastasis to skin via lymphatics: Three cases of carcinoma erysipeloides. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 30(2), 304-307. [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(94\)70028-1](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(94)70028-1)
28. Dabbs, D. J., Schnitt, S. J., Geyer, F. C., Weigelt, B., Baehner, F. L., Decker, T., Eusebi, V., Fox, S. B., Ichihara, S., Lakhani, S. R., Palacios, J., Rakha, E., Richardson, A. L., Schmitt, F. C., Tan, P.-H., Tse, G. M., Vincent-Salomon, A., Ellis, I. O., Badve, S., & Reis-Filho, J. S. (2013). Lobular Neoplasia of the Breast Revisited With Emphasis on the Role of E-Cadherin Immunohistochemistry. *American Journal of Surgical Pathology*, 37(7), e1-e11. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3182918a2b>
29. de Dueñas, E. M., Hernández, A. L., Zotano, Á. G., Carrión, R. M. P., López-Muñiz, J. I. C., Novoa, S. A., Rodríguez, Á. L., Fidalgo, J. A. P., Lozano, J. F., Gasión, O. B., Carrascal, E. C., Capilla, A. H., López-Barajas, I. B., Mateu, M. M., de Ceballos Reyna, M. H. L., Ferrando, A. O., Jañez, N. M., Ballerini, V. C., Torres, A. A., ... González-Angulo, A. M. (2014). Prospective evaluation of the conversion rate in the receptor status between primary breast cancer and metastasis: Results from the GEICAM 2009-03 ConvertHER study. *Breast Cancer Research and Treatment*, 143(3), 507-515. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2825-2>
30. De Giorgi, V., Grazzini, M., Alfaioli, B., Savarese, I., Corciova, S. A., Guerriero, G., & Lotti, T. (2010). Cutaneous manifestations of breast carcinoma: A clinical guide. *Dermatologic Therapy*, 23(6), 581-589. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2010.01365.x>
31. Denkert, C., Liedtke, C., Tutt, A., & von Minckwitz, G. (2017). Molecular alterations in triple-negative breast cancer—The road to new treatment strategies. *The Lancet*, 389(10087), 2430-2442. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32454-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32454-0)
32. Dunnwald, L. K., Rossing, M. A., & Li, C. I. (2007). Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: A prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Research: BCR*, 9(1), R6. <https://doi.org/10.1186/bcr1639>
33. Elston, C. W., & Ellis, I. O. (1991). 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*, 19(5), 403-410. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x>
34. Ferreira, V. A., Spelta, K., Diniz, L. M., & Lucas, E. A. (2018). Exuberant case of cutaneous metastasis of breast cancer. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 93(3), 429-431. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20187157>

35. Fukushige, S., Matsubara, K., Yoshida, M., Sasaki, M., Suzuki, T., Semba, K., Toyoshima, K., & Yamamoto, T. (1986). Localization of a novel v-erbB-related gene, c-erbB-2, on human chromosome 17 and its amplification in a gastric cancer cell line. *Molecular and Cellular Biology*, 6(3), 955-958. <https://doi.org/10.1128/mcb.6.3.955>
36. Gerratana, L., Basile, D., Buono, G., De Placido, S., Giuliano, M., Minichillo, S., Coinu, A., Martorana, F., De Santo, I., Del Mastro, L., De Laurentiis, M., Puglisi, F., & Arpino, G. (2018). Androgen receptor in triple negative breast cancer: A potential target for the targetless subtype. *Cancer Treatment Reviews*, 68, 102-110. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.06.005>
37. Gerratana, L., Fanotto, V., Bonotto, M., Bolzonello, S., Minisini, A. M., Fasola, G., & Puglisi, F. (2015). Pattern of metastasis and outcome in patients with breast cancer. *Clinical & Experimental Metastasis*, 32(2), 125-133. <https://doi.org/10.1007/s10585-015-9697-2>
38. González-Martínez, S., Pizarro, D., Pérez-Mies, B., Caniego-Casas, T., Curigliano, G., Cortés, J., & Palacios, J. (2021). Clinical, Pathological, and Molecular Features of Breast Carcinoma Cutaneous Metastasis. *Cancers*, 13(21), 5416. <https://doi.org/10.3390/cancers13215416>
39. González-Martínez, S., Pizarro, D., Pérez-Mies, B., Caniego-Casas, T., Rodríguez-Peralto, J. L., Curigliano, G., Cortés, A., Gión, M., Cortés, J., & Palacios, J. (2022). Differences in the Molecular Profile between Primary Breast Carcinomas and Their Cutaneous Metastases. *Cancers*, 14(5), 1151. <https://doi.org/10.3390/cancers14051151>
40. Goswami, R. S., Patel, K. P., Singh, R. R., Meric-Bernstam, F., Kopetz, E. S., Subbiah, V., Alvarez, R. H., Davies, M. A., Jabbar, K. J., Roy-Chowdhuri, S., Lazar, A. J., Medeiros, L. J., Broaddus, R. R., Luthra, R., & Routbort, M. J. (2015). Hotspot Mutation Panel Testing Reveals Clonal Evolution in a Study of 265 Paired Primary and Metastatic Tumors. *Clinical Cancer Research*, 21(11), 2644-2651. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2391>
41. Greninger, A. L., Naccache, S. N., Federman, S., Yu, G., Mbala, P., Bres, V., Stryke, D., Bouquet, J., Somasekar, S., Linnen, J. M., Dodd, R., Mulembakani, P., Schneider, B. S., Muyembe-Tamfum, J.-J., Stramer, S. L., & Chiu, C. Y. (2015). Rapid metagenomic identification of viral pathogens in clinical samples by real-time nanopore sequencing analysis. *Genome Medicine*, 7(1), 99. <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0220-9>
42. Guanziroli, E., Coggi, A., Venegoni, L., Fanoni, D., Ercoli, G., Boggio, F., Veraldi, S., Berti, E., Gianotti, R., Ferrero, S., & Del Gobbo, A. (2017). Cutaneous metastases of internal malignancies: An experience from a single institution. *European Journal of Dermatology*, 27(6), 609-614. <https://doi.org/10.1684/ejd.2017.3142>
43. Gutierrez, C., & Schiff, R. (2011). HER2: Biology, detection, and clinical implications. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 135(1), 55-62. <https://doi.org/10.1043/2010-0454-RAR.1>
44. Head, S. R., Komori, H. K., LaMere, S. A., Whisenant, T., Van Nieuwerburgh, F., Salomon, D. R., & Ordoukhanian, P. (2014). Library construction for next-generation sequencing: Overviews and challenges. *BioTechniques*, 56(2), 61-64, 66, 68, passim. <https://doi.org/10.2144/000114133>



- 
45. Heitz, F., Harter, P., Lueck, H.-J., Fissler-Eckhoff, A., Lorenz-Salehi, F., Scheil-Bertram, S., Traut, A., & du Bois, A. (2009). Triple-negative and HER2-overexpressing breast cancers exhibit an elevated risk and an earlier occurrence of cerebral metastases. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 45(16), 2792-2798. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2009.06.027>
  46. Hu, S.-S., Chen, G.-S., Lu, Y.-W., Wu, C.-S., & Lan, C.-C. (2008). Cutaneous metastases from different internal malignancies: A clinical and prognostic appraisal. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 22(6), 735-740. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2008.02590.x>
  47. Hu, Z., Fan, C., Oh, D. S., Marron, J. S., He, X., Qaqish, B. F., Livasy, C., Carey, L. A., Reynolds, E., Dressler, L., Nobel, A., Parker, J., Ewend, M. G., Sawyer, L. R., Wu, J., Liu, Y., Nanda, R., Tretiakova, M., Ruiz Orrico, A., ... Perou, C. M. (2006). The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics*, 7, 96. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-96>
  48. Johnson, C. (2021). Cutaneous Manifestation as Initial Presentation of Metastatic Breast Cancer: A Systematic Review. *Cutis, Volume 107 Issue 3*. <https://doi.org/10.12788/cutis.0223>
  49. Kamińska, M., Ciszewski, T., Łopacka-Szatan, K., Miotła, P., & Starosławska, E. (2015). Breast cancer risk factors. *Menopausal Review*, 3, 196-202. <https://doi.org/10.5114/pm.2015.54346>
  50. Kamps, R., Brandão, R. D., Bosch, B. J. van den, Paulussen, A. D. C., Xanthoulea, S., Blok, M. J., & Romano, A. (2017). Next-Generation Sequencing in Oncology: Genetic Diagnosis, Risk Prediction and Cancer Classification. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2). <https://doi.org/10.3390/ijms18020308>
  51. Kaye, P. V., Haider, S. A., James, P. D., Soomro, I., Catton, J., Parsons, S. L., Ragunath, K., & Ilyas, M. (2010). Novel staining pattern of p53 in Barrett's dysplasia - the absent pattern: Correspondence. *Histopathology*, 57(6), 933-935. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2010.03715.x>
  52. Kim, E., Lee, B., Lee, J. W., Sung, K. W., & Kim, J.-S. (2021). Comparison of Next-Generation Sequencing and Fluorescence In Situ Hybridization for Detection of Segmental Chromosomal Aberrations in Neuroblastoma. *Diagnostics*, 11(9), 1702. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11091702>
  53. Kjällquist, U., Erlandsson, R., Tobin, N. P., Alkodsji, A., Ullah, I., Stålhammar, G., Karlsson, E., Hatschek, T., Hartman, J., Linnarsson, S., & Bergh, J. (2018). Exome sequencing of primary breast cancers with paired metastatic lesions reveals metastasis-enriched mutations in the A-kinase anchoring protein family (AKAPs). *BMC Cancer*, 18(1), 174. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4021-6>
  54. Klauschen, F., Wienert, S., Schmitt, W. D., Loibl, S., Gerber, B., Blohmer, J.-U., Huober, J., Rüdiger, T., Erbstößer, E., Mehta, K., Lederer, B., Dietel, M., Denkert, C., & von Minckwitz, G. (2015). Standardized Ki67 Diagnostics Using Automated Scoring—Clinical Validation in the GeparTrio Breast Cancer Study. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 21(16), 3651-3657. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1283>
  55. Köbel, M., Reuss, A., Bois, A. du, Kommoss, S., Kommoss, F., Gao, D., Kalloger, S. E.,
-

- Huntsman, D. G., & Gilks, C. B. (2010). The biological and clinical value of p53 expression in pelvic high-grade serous carcinomas. *The Journal of Pathology*, 222(2), 191-198. <https://doi.org/10.1002/path.2744>
56. Kong, J. H., Park, Y. H., Kim, J. A., Kim, J. H., Yun, J., Sun, J. M., Won, Y. W., Lee, S., Kim, S. T., Cho, E. Y., Ahn, J. S., & Im, Y.-H. (2011). Patterns of Skin and Soft Tissue Metastases from Breast Cancer according to Subtypes: Relationship between EGFR Overexpression and Skin Manifestations. *Oncology*, 81(1), 55-62. <https://doi.org/10.1159/000331417>
57. Kurozumi, S., Alsaleem, M., Monteiro, C. J., Bhardwaj, K., Joosten, S. E. P., Fujii, T., Shirabe, K., Green, A. R., Ellis, I. O., Rakha, E. A., Mongan, N. P., Heery, D. M., Zwart, W., Oesterreich, S., & Johnston, S. J. (2020). Targetable ERBB2 mutation status is an independent marker of adverse prognosis in estrogen receptor positive, ERBB2 non-amplified primary lobular breast carcinoma: A retrospective in silico analysis of public datasets. *Breast Cancer Research*, 22(1), 85. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01324-4>
58. Lefebvre, C., Bachelot, T., Filleron, T., Pedrero, M., Campone, M., Soria, J.-C., Massard, C., Lévy, C., Arnedos, M., Lacroix-Triki, M., Garrabey, J., Boursin, Y., Deloger, M., Fu, Y., Commo, F., Scott, V., Lacroix, L., Dieci, M. V., Kamal, M., ... André, F. (2016). Mutational Profile of Metastatic Breast Cancers: A Retrospective Analysis. *PLOS Medicine*, 13(12), e1002201. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002201>
59. Lehmann, B. D., Jovanović, B., Chen, X., Estrada, M. V., Johnson, K. N., Shyr, Y., Moses, H. L., Sanders, M. E., & Pietenpol, J. A. (2016). Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLOS ONE*, 11(6), e0157368. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157368>
60. Lentzsch, S., Reichardt, P., Weber, F., Budach, V., & Dörken, B. (1999). Brain metastases in breast cancer: Prognostic factors and management. *European Journal of Cancer*, 35(4), 580-585. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(98\)00421-3](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(98)00421-3)
61. Lewis, G. H., Subhawong, A. P., Nassar, H., Vang, R., Illei, P. B., Park, B. H., & Argani, P. (2011). Relationship Between Molecular Subtype of Invasive Breast Carcinoma and Expression of Gross Cystic Disease Fluid Protein 15 and Mammaglobin. *American Journal of Clinical Pathology*, 135(4), 587-591. <https://doi.org/10.1309/AJCPMFR6OA8ICHNH>
62. Li, J., Lupat, R., Amarasinghe, K. C., Thompson, E. R., Doyle, M. A., Ryland, G. L., Tothill, R. W., Halgamuge, S. K., Campbell, I. G., & Goringe, K. L. (2012). CONTRA: Copy number analysis for targeted resequencing. *Bioinformatics*, 28(10), 1307-1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts146>
63. Li, Q., Jiang, B., Guo, J., Shao, H., Del Priore, I. S., Chang, Q., Kudo, R., Li, Z., Razavi, P., Liu, B., Boghossian, A. S., Rees, M. G., Ronan, M. M., Roth, J. A., Donovan, K. A., Palafox, M., Reis-Filho, J. S., de Stanchina, E., Fischer, E. S., ... Chandarlapaty, S. (2021). INK4 tumor suppressor proteins mediate resistance to CDK4/6 kinase inhibitors. *Cancer Discovery*, candisc.1726.2020. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1726>
64. Lin, J.-H., Lee, J. y.-Y., Chao, S.-C., & Tsao, C.-J. (2004). Telangiectatic metastatic breast carcinoma preceded by en cuirasse metastatic breast carcinoma. *British Journal of Dermatology*, 151(2), 523-524. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2004.06140.x>

- 
65. Liotta, L. A. (1990). Cancer invasion and metastases. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 263(8), 1123-1126. <https://doi.org/10.1001/jama.263.8.1123>
  66. Lipton, A. (2003). Bisphosphonates and metastatic breast carcinoma. *Cancer*, 97(S3), 848-853. <https://doi.org/10.1002/cncr.11123>
  67. Liu, Z., Wang, Y., Deng, T., & Chen, Q. (2016). Solid-State Nanopore-Based DNA Sequencing Technology. *Journal of Nanomaterials*, 2016, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2016/5284786>
  68. Lookingbill, D. P., Spangler, N., & Helm, K. F. (1993). Cutaneous metastases in patients with metastatic carcinoma: A retrospective study of 4020 patients. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 29(2), 228-236. [https://doi.org/10.1016/0190-9622\(93\)70173-Q](https://doi.org/10.1016/0190-9622(93)70173-Q)
  69. Lookingbill, D. P., Spangler, N., & Sexton, F. M. (1990). Skin involvement as the presenting sign of internal carcinoma. A retrospective study of 7316 cancer patients. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 22(1), 19-26. [https://doi.org/10.1016/0190-9622\(90\)70002-y](https://doi.org/10.1016/0190-9622(90)70002-y)
  70. Luna, A., Rabassa, M. E., Isla Larrain, M., Cabaleiro, P., Zwenger, A., Canzoneri, R., Segal-Eiras, A., Abba, M. C., & Croce, M. V. (2020). Breast cancer cutaneous metastases are associated to uMUC1 and sialyl Lewis x and to highly malignant primary tumors. *Pathology - Research and Practice*, 216(4), 152859. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2020.152859>
  71. Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H., & Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology & Therapy*, 10(10), 955-960. <https://doi.org/10.4161/cbt.10.10.13879>
  72. Mallon, E., & Dawber, R. P. R. (1994). Alopecia neoplastica without alopecia: A unique presentation of breast carcinoma scalp metastasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 31(2), 319-321. [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(94\)70163-6](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(94)70163-6)
  73. Manni, A., Arafah, B., & Pearson, O. H. (1980). Estrogen and progesterone receptors in the prediction of response of breast cancer to endocrine therapy. *Cancer*, 46(12 Suppl), 2838-2841. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19801215\)46:12+<2838::aid-cncr2820461421>3.0.co;2-a](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19801215)46:12+<2838::aid-cncr2820461421>3.0.co;2-a)
  74. Marcoval, J., Gallego, M. I., & Moreno, A. (2008). Inflammatory Cutaneous Metastasis as a First Sign of Recurrence of Squamous Cell Carcinoma of the Lung. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)*, 99(2), 157-159. [https://doi.org/10.1016/S1578-2190\(08\)70221-X](https://doi.org/10.1016/S1578-2190(08)70221-X)
  75. Marker, K. M., Zavala, V. A., Vidaurre, T., Lott, P. C., Vásquez, J. N., Casavilca-Zambrano, S., Calderón, M., Abugattas, J. E., Gómez, H. L., Fuentes, H. A., Picoaga, R. L., Cotrina, J. M., Neciosup, S. P., Castañeda, C. A., Morante, Z., Valencia, F., Torres, J., Echeverry, M., Bohórquez, M. E., ... Fejerman, L. (2020). Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer Is Associated with Indigenous American Ancestry in Latin American Women. *Cancer Research*, 80(9), 1893-1901. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-3659>
  76. Marneros, A. G., Blanco, F., Husain, S., Silvers, D. N., & Grossman, M. E. (2009). Classification of cutaneous intravascular breast cancer metastases based on immunolabeling for blood and lymph vessels. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 60(4), 633-638. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2008.11.008>

77. Masuda, H., Baggerly, K. A., Wang, Y., Zhang, Y., Gonzalez-Angulo, A. M., Meric-Bernstam, F., Valero, V., Lehmann, B. D., Pietenpol, J. A., Hortobagyi, G. N., Symmans, W. F., & Ueno, N. T. (2013). Differential Response to Neoadjuvant Chemotherapy Among 7 Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes. *Clinical Cancer Research*, *19*(19), 5533-5540. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0799>
78. Mavaddat, N., Antoniou, A. C., Easton, D. F., & Garcia-Closas, M. (2010). Genetic susceptibility to breast cancer. *Molecular Oncology*, *4*(3), 174-191. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.04.011>
79. Moelans, C. B., van der Groep, P., Hoefnagel, L. D. C., van de Vijver, M. J., Wesseling, P., Wesseling, J., van der Wall, E., & van Diest, P. J. (2014). Genomic evolution from primary breast carcinoma to distant metastasis: Few copy number changes of breast cancer related genes. *Cancer Letters*, *344*(1), 138-146. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.10.025>
80. Morris, G. J., Naidu, S., Topham, A. K., Guiles, F., Xu, Y., McCue, P., Schwartz, G. F., Park, P. K., Rosenberg, A. L., Brill, K., & Mitchell, E. P. (2007). Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients: A single-institution compilation compared with the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Cancer*, *110*(4), 876-884. <https://doi.org/10.1002/cncr.22836>
81. Muller, K. E., Marotti, J. D., de Abreu, F. B., Peterson, J. D., Miller, T. W., Chamberlin, M. D., Tsongalis, G. J., & Tafe, L. J. (2016). Targeted next-generation sequencing detects a high frequency of potentially actionable mutations in metastatic breast cancers. *Experimental and Molecular Pathology*, *100*(3), 421-425. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2016.04.002>
82. Mullinax, K., & Cohen, J. B. (2004). Carcinoma En Cuirasse Presenting as Keloids of the Chest. *Dermatologic Surgery*, *30*(2), 226-228. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2004.30071.x>
83. Nava, G., Greer, K., Patterson, J., & Y Lin, K. (2009). Metastatic Cutaneous Breast Carcinoma: A Case Report and Review of the Literature. *Canadian Journal of Plastic Surgery*, *17*(1), 25-28. <https://doi.org/10.1177/229255030901700105>
84. Nielsen, T. O., Hsu, F. D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., Hernandez-Boussard, T., Livasy, C., Cowan, D., Dressler, L., Akslén, L. A., Ragaz, J., Gown, A. M., Gilks, C. B., van de Rijn, M., & Perou, C. M. (2004). Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *10*(16), 5367-5374. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0220>
85. Nielsen, T. O., Leung, S. C. Y., Rimm, D. L., Dodson, A., Acs, B., Badve, S., Denkert, C., Ellis, M. J., Fineberg, S., Flowers, M., Kreipe, H. H., Laenkholm, A.-V., Pan, H., Penault-Llorca, F. M., Polley, M.-Y., Salgado, R., Smith, I. E., Sugie, T., Bartlett, J. M. S., ... Hayes, D. F. (2021). Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Updated Recommendations From the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *113*(7), 808-819. <https://doi.org/10.1093/jnci/djaa201>
86. Olivier, M., Hollstein, M., & Hainaut, P. (2010). TP53 mutations in human cancers: Origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(1), a001008. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001008>

- 
87. Pakula, A. S., & Robinson, J. K. (1992). Recognizing malignant skin changes following breast cancer. *American Family Physician*, 45(3), 1287-1292.
  88. Panal Cusati, M., Herrera de la Muela, M., Hardisson Hernaez, D., Choqueneira Dionisio, M., Román Guindo, A., & de Santiago Garcia, F. J. (2014). Correlación entre la expresión de Ki67 con factores clásicos pronósticos y predictivos en el cáncer de mama precoz. *Revista de Senología y Patología Mamaria*, 27(4), 163-169. <https://doi.org/10.1016/j.senol.2014.07.005>
  89. Parker, J. S., Mullins, M., Cheang, M. C. U., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., Davies, S., Fauron, C., He, X., Hu, Z., Quackenbush, J. F., Stijleman, I. J., Palazzo, J., Marron, J. S., Nobel, A. B., Mardis, E., Nielsen, T. O., Ellis, M. J., Perou, C. M., & Bernard, P. S. (2009). Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(8), 1160-1167. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.18.1370>
  90. Paul, M. R., Pant, D. K., Shih, N. N. C., Chen, Y., Harvey, K. L., Solomon, A., Lieberman, D., Morrisette, J. J. D., Soucier-Ernst, D., Goodman, N. G., Stavropoulos, S. W., Maxwell, K. N., Clark, C., Belka, G. K., Feldman, M., DeMichele, A., & Chodosh, L. A. (2020). Genomic landscape of metastatic breast cancer identifies preferentially dysregulated pathways and targets. *Journal of Clinical Investigation*, 10.1172/JCI129941. <https://doi.org/10.1172/JCI129941>
  91. Payne, S. J. L., Bowen, R. L., Jones, J. L., & Wells, C. A. (2008). Predictive markers in breast cancer—The present. *Histopathology*, 52(1), 82-90. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2007.02897.x>
  92. Perez, E. A., Ballman, K. V., Tenner, K. S., Thompson, E. A., Badve, S. S., Bailey, H., & Baehner, F. L. (2016). Association of Stromal Tumor-Infiltrating Lymphocytes With Recurrence-Free Survival in the N9831 Adjuvant Trial in Patients With Early-Stage HER2-Positive Breast Cancer. *JAMA Oncology*, 2(1), 56-64. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.3239>
  93. Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Aksten, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A. L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747-752. <https://doi.org/10.1038/35021093>
  94. Pipkin, C. A., & Lio, P. A. (2008). Cutaneous Manifestations of Internal Malignancies: An Overview. *Dermatologic Clinics*, 26(1), 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.det.2007.08.002>
  95. Pizarro, A., Benito, N., Navarro, P., Palacios, J., Cano, A., Quintanilla, M., Contreras, F., & Gamallo, C. (1994). E-cadherin expression in basal cell carcinoma. *British Journal of Cancer*, 69(1), 157-162. <https://doi.org/10.1038/bjc.1994.26>
  96. Poggio, F., Del Mastro, L., Bruzzone, M., Ceppi, M., Razeti, M. G., Fregatti, P., Ruelle, T., Pronzato, P., Massarotti, C., Franzoi, M. A., Lambertini, M., & Tagliamento, M. (2022). Safety of systemic hormone replacement therapy in breast cancer survivors: A systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 191(2), 269-275. <https://doi.org/10.1007/s10549-021-06436-9>
  97. Prat, A., Lluch, A., Albanell, J., Barry, W. T., Fan, C., Chacón, J. I., Parker, J. S., Calvo, L., Plazaola, A., Arcusa, A., Seguí-Palmer, M. A., Burgues, O., Ribelles, N., Rodríguez-Lescure,

- A., Guerrero, A., Ruiz-Borrego, M., Munarriz, B., López, J. A., Adamo, B., ... Alba, E. (2014). Predicting response and survival in chemotherapy-treated triple-negative breast cancer. *British Journal of Cancer*, 111(8), 1532-1541. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.444>
98. Purdie, C. A., Quinlan, P., Jordan, L. B., Ashfield, A., Ogston, S., Dewar, J. A., & Thompson, A. M. (2014). Progesterone receptor expression is an independent prognostic variable in early breast cancer: A population-based study. *British Journal of Cancer*, 110(3), 565-572. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.756>
99. Rakha, E. A., Reis-Filho, J. S., Baehner, F., Dabbs, D. J., Decker, T., Eusebi, V., Fox, S. B., Ichihara, S., Jacquemier, J., Lakhani, S. R., Palacios, J., Richardson, A. L., Schnitt, S. J., Schmitt, F. C., Tan, P.-H., Tse, G. M., Badve, S., & Ellis, I. O. (2010). Breast cancer prognostic classification in the molecular era: The role of histological grade. *Breast Cancer Research: BCR*, 12(4), 207. <https://doi.org/10.1186/bcr2607>
100. REDECAN. (2020). *Estimación de la incidencia de cáncer en España*. 21.
101. Richert, M. M., & Welch, D. R. (2009). Metastasis of Hormone Receptor Positive Breast Cancer. En S. A. W. Fuqua (Ed.), *Hormone Receptors in Breast Cancer* (Vol. 147, pp. 1-22). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-09463-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-0-387-09463-2_6)
102. Rinaldi, J., Sokol, E. S., Hartmaier, R. J., Trabucco, S. E., Frampton, G. M., Goldberg, M. E., Albacker, L. A., Daemen, A., & Manning, G. (2020). The genomic landscape of metastatic breast cancer: Insights from 11,000 tumors. *PLOS ONE*, 15(5), e0231999. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231999>
103. Ring, A. E., Smith, I. E., Ashley, S., Fulford, L. G., & Lakhani, S. R. (2004). Oestrogen receptor status, pathological complete response and prognosis in patients receiving neoadjuvant chemotherapy for early breast cancer. *British Journal of Cancer*, 91(12), 2012-2017. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602235>
104. Rosa-Rosa, J., Caniego-Casas, T., Leskela, S., Cristobal, E., González-Martínez, S., Moreno-Moreno, E., López-Miranda, E., Holgado, E., Pérez-Mies, B., Garrido, P., & Palacios, J. (2019). High Frequency of ERBB2 Activating Mutations in Invasive Lobular Breast Carcinoma with Pleomorphic Features. *Cancers*, 11(1), 74. <https://doi.org/10.3390/cancers11010074>
105. Rothberg, J. M., Hinz, W., Rearick, T. M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., Leamon, J. H., Johnson, K., Milgrew, M. J., Edwards, M., Hoon, J., Simons, J. F., Marran, D., Myers, J. W., Davidson, J. F., Branting, A., Nobile, J. R., Puc, B. P., Light, D., ... Bustillo, J. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*, 475(7356), 348-352. <https://doi.org/10.1038/nature10242>
106. Rouzier, R., Perou, C. M., Symmans, W. F., Ibrahim, N., Cristofanilli, M., Anderson, K., Hess, K. R., Stec, J., Ayers, M., Wagner, P., Morandi, P., Fan, C., Rabiul, I., Ross, J. S., Hortobagyi, G. N., & Pusztai, L. (2005). Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 11(16), 5678-5685. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2421>
107. Roy-Chowdhuri, S., de Melo Gagliato, D., Routbort, M. J., Patel, K. P., Singh, R. R.,

- Broaddus, R., Lazar, A. J., Sahin, A., Alvarez, R. H., Moulder, S., Wheler, J. J., Janku, F., Gonzalez-Angulo, A. M., Chavez-MacGregor, M., Valero, V., Ueno, N. T., Mills, G., Mendelsohn, J., Yao, H., ... Meric-Bernstam, F. (2015). Multigene Clinical Mutational Profiling of Breast Carcinoma Using Next-Generation Sequencing. *American Journal of Clinical Pathology*, 144(5), 713-721. <https://doi.org/10.1309/AJCPWDEQYCYC92JQ>
108. Santonja, A., Sánchez-Muñoz, A., Lluch, A., Chica-Parrado, M. R., Albanell, J., Chacón, J. I., Antolín, S., Jerez, J. M., de la Haba, J., de Luque, V., Fernández-De Sousa, C. E., Vicioso, L., Plata, Y., Ramírez-Tortosa, C. L., Álvarez, M., Llácer, C., Zarcos-Pedrinaci, I., Carrasco, E., Caballero, R., ... Alba, E. (2018). Triple negative breast cancer subtypes and pathologic complete response rate to neoadjuvant chemotherapy. *Oncotarget*, 9(41), 26406-26416. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25413>
109. Saphner, T., Tormey, D. C., & Gray, R. (1996). Annual hazard rates of recurrence for breast cancer after primary therapy. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 14(10), 2738-2746. <https://doi.org/10.1200/JCO.1996.14.10.2738>
110. Scheinfeld, N. (2006). Review of Scalp Alopecia due to a Clinically Unapparent or Minimally Apparent Neoplasm (SACUMAN). *Acta Dermato-Venereologica*, 86(5), 387-392. <https://doi.org/10.2340/00015555-0160>
111. Schrijver, W. A., Selenica, P., Lee, J. Y., Ng, C. K. Y., Burke, K., Piscuoglio, S., Berman, S. H., Reis-Filho, J. S., Weigelt, B., Van Diest, P. J., & Moelans, C. B. (2018). Mutation profiling of key cancer genes in primary breast cancers and their distant metastases. *Cancer Research*, canres.2310.2017. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2310>
112. SEAP. (2021). *Sociedad Española de Anatomía Patológica*. División española de la International Academy of Pathology. <https://www.seap.es/group/>
113. SESPM. (2021). *Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria*. *El cáncer de mama es la primera causa de muerte entre las mujeres de 25 a 55 años*. <https://www.sespm.es/el-cancer-de-mama-es-la-primera-causa-de-muerte-entre-las-mujeres-de-25-a-55-anos/>
114. Sheri, A., Smith, I. E., Johnston, S. R., A'Hern, R., Nerurkar, A., Jones, R. L., Hills, M., Detre, S., Pinder, S. E., Symmans, W. F., & Dowsett, M. (2015). Residual proliferative cancer burden to predict long-term outcome following neoadjuvant chemotherapy. *Annals of Oncology*, 26(1), 75-80. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu508>
115. Silwal-Pandit, L., Vollan, H. K. M., Chin, S.-F., Rueda, O. M., McKinney, S., Osako, T., Quigley, D. A., Kristensen, V. N., Aparicio, S., Børresen-Dale, A.-L., Caldas, C., & Langerød, A. (2014). TP53 mutation spectrum in breast cancer is subtype specific and has distinct prognostic relevance. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 20(13), 3569-3580. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2943>
116. Slamon, D., Clark, G., Wong, S., Levin, W., Ullrich, A., & McGuire, W. (1987). Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235(4785), 177-182. <https://doi.org/10.1126/science.3798106>
117. Slatko, B. E., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. (2018). Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Current Protocols in Molecular Biology*, 122(1), e59. <https://doi.org/10.1002/cpmb.59>

- 
118. Sørlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein, D., Lønning, P. E., & Børresen-Dale, A. L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), 10869-10874. <https://doi.org/10.1073/pnas.191367098>
119. Sotiriou, C., Neo, S.-Y., McShane, L. M., Korn, E. L., Long, P. M., Jazaeri, A., Martiat, P., Fox, S. B., Harris, A. L., & Liu, E. T. (2003). Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(18), 10393-10398. <https://doi.org/10.1073/pnas.1732912100>
120. Spencer, P. S., & Helm, T. N. (1987). Skin metastases in cancer patients. *Cutis*, 39(2), 119-121.
121. Talevich, E., Shain, A. H., Botton, T., & Bastian, B. C. (2016). CNVkit: Genome-Wide Copy Number Detection and Visualization from Targeted DNA Sequencing. *PLoS Computational Biology*, 12(4), e1004873. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004873>
122. Tan, A. R. (2016). Cutaneous manifestations of breast cancer. *Seminars in Oncology*, 43(3), 331-334. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2016.02.030>
123. The Cancer Genome Atlas Network. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490(7418), 61-70. <https://doi.org/10.1038/nature11412>
124. The Global Cancer Observatory. (2020). *Breast Source: Globocan 2020*. <https://gco.iarc.fr/today>
125. Tozbikian, G. H., & Zynger, D. L. (2019). A combination of GATA3 and SOX10 is useful for the diagnosis of metastatic triple-negative breast cancer. *Human Pathology*, 85, 221-227. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.11.005>
126. Turner, N. C., & Reis-Filho, J. S. (2013). Tackling the Diversity of Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 19(23), 6380-6388. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0915>
127. Utkan, G., BüyükçeliK, A., Okçu, A. H., Avci, U., Yalçın, B., & İÇli, F. (2009). *Widespread erythematous skin metastasis from breast cancer mimicking generalized drug eruption*. 39(2), 66-68.
128. van 't Veer, L. J., Dai, H., van de Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A. M., Mao, M., Peterse, H. L., van der Kooy, K., Marton, M. J., Witteveen, A. T., Schreiber, G. J., Kerkhoven, R. M., Roberts, C., Linsley, P. S., Bernards, R., & Friend, S. H. (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 415(6871), 530-536. <https://doi.org/10.1038/415530a>
129. Vranic, S., Stafford, P., Palazzo, J., Skenderi, F., Swensen, J., Xiu, J., Spetzler, D., & Gatalica, Z. (2020). Molecular Profiling of the Metaplastic Spindle Cell Carcinoma of the Breast Reveals Potentially Targetable Biomarkers. *Clinical Breast Cancer*, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2020.02.008>
130. Vu, T., & Claret, F. X. (2012). Trastuzumab: Updated mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Frontiers in Oncology*, 2, 62. <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00062>



- 
131. WHO Classification of Tumours Editorial Board, International Agency for Research on Cancer, & World Health Organization. (2019). *WHO classification of tumours. Breast Tumours*. International Agency for Research on Cancer.
132. Wolff, A. C., Hammond, M. E. H., Allison, K. H., Harvey, B. E., Mangu, P. B., Bartlett, J. M. S., Bilous, M., Ellis, I. O., Fitzgibbons, P., Hanna, W., Jenkins, R. B., Press, M. F., Spears, P. A., Vance, G. H., Viale, G., McShane, L. M., & Dowsett, M. (2018). Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *Journal of Clinical Oncology*, *36*(20), 2105-2122. <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.77.8738>
133. Wright, S. E. (2012). Immunotherapy of breast cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy*, *12*(4), 479-490. <https://doi.org/10.1517/14712598.2012.665445>
134. Yates, L. R., Knappskog, S., Wedge, D., Farmery, J. H. R., Gonzalez, S., Martincorena, I., Alexandrov, L. B., Van Loo, P., Haugland, H. K., Lilleng, P. K., Gundem, G., Gerstung, M., Pappaemmanuil, E., Gazinska, P., Bhosle, S. G., Jones, D., Raine, K., Mudie, L., Latimer, C., ... Campbell, P. J. (2017). Genomic Evolution of Breast Cancer Metastasis and Relapse. *Cancer Cell*, *32*(2), 169-184.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.07.005>
135. Yi, M., Huo, L., Koenig, K. B., Mittendorf, E. A., Meric-Bernstam, F., Kuerer, H. M., Bedrosian, I., Buzdar, A. U., Symmans, W. F., Crow, J. R., Bender, M., Shah, R. R., Hortobagyi, G. N., & Hunt, K. K. (2014). Which threshold for ER positivity? A retrospective study based on 9639 patients. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, *25*(5), 1004-1011. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu053>
136. Yin, L., Duan, J.-J., Bian, X.-W., & Yu, S.-C. (2020). Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Research: BCR*, *22*(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>
137. Yoo, T.-K., Han, K. D., Kim, D., Ahn, J., Park, W.-C., & Chae, B. J. (2020). Hormone Replacement Therapy, Breast Cancer Risk Factors, and Breast Cancer Risk: A Nationwide Population-Based Cohort. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, *29*(7), 1341-1347. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-20-0038>
138. Zhang, F., Gu, W., Hurles, M. E., & Lupski, J. R. (2009). Copy Number Variation in Human Health, Disease, and Evolution. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *10*(1), 451-481. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164217>



**ANEXOS**

---



## 8. ANEXOS

## ANEXO I: TABLAS SUPLEMENTARIAS

**TABLA SUPLEMENTARIA 1. LISTADO DE GENES MUTADOS CON MAYOR FRECUENCIA EN METABRIC**

GENES METABRIC Y PANEL							
<i>ACVRL1</i>	<i>CBFB</i>	<i>ERBB2</i>	<i>JAK1</i>	<i>MTAP</i>	<i>PNMT</i>	<i>SF3B1</i>	<i>UBR5</i>
<i>AFF2</i>	<i>CCND3</i>	<i>ERBB3</i>	<i>KDM3A</i>	<i>MUC16</i>	<i>POLE</i>	<i>SGCD</i>	<i>USH2A</i>
<i>AGMO</i>	<i>CCNE1</i>	<i>ERBB4</i>	<i>KDM6A</i>	<i>MYC</i>	<i>PPP2CB</i>	<i>SHANK2</i>	<i>USP28</i>
<i>AGTR2</i>	<i>CDH1</i>	<i>ESR1</i>	<i>KLRG1</i>	<i>MYH9</i>	<i>PPP2R1A</i>	<i>SIAH1</i>	<i>USP9X</i>
<i>AHNAK</i>	<i>CDH19</i>	<i>FAM20C</i>	<i>KMT2B</i>	<i>MYO1A</i>	<i>PPP2R2A</i>	<i>SIK1</i>	<i>UTRN</i>
<i>AHNAK2</i>	<i>CDKN1B</i>	<i>FANCA</i>	<i>KMT2C</i>	<i>MYO3A</i>	<i>PRKACG</i>	<i>SIK2</i>	<i>VGLL1</i>
<i>AKAP9</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>FANCD2</i>	<i>KRAS</i>	<i>NCOA3</i>	<i>PRKCE</i>	<i>SMAD2</i>	<i>ZFP36L1</i>
<i>AKT1</i>	<i>CHD1</i>	<i>FBXW7</i>	<i>L1CAM</i>	<i>NCOR1</i>	<i>PRKCQ</i>	<i>SMAD4</i>	<i>ZNF217</i>
<i>AKT2</i>	<i>CHD4</i>	<i>FGFR1</i>	<i>LAMA2</i>	<i>NCOR2</i>	<i>PRKCZ</i>	<i>SMARCB1</i>	<i>ZNF703</i>
<i>ALK</i>	<i>CHEK2</i>	<i>FGFR2</i>	<i>LAMB3</i>	<i>NDFIP1</i>	<i>PRKG1</i>	<i>SMARCC1</i>	
<i>APC</i>	<i>CLK3</i>	<i>FLT3</i>	<i>LARGE</i>	<i>NEK1</i>	<i>PRPF18</i>	<i>SMARCC2</i>	
<i>ARID1A</i>	<i>CLRN2</i>	<i>FOXA2</i>	<i>LDLRAP1</i>	<i>NF1</i>	<i>PRPS2</i>	<i>SMARCD1</i>	
<i>ARID1B</i>	<i>COL12A1</i>	<i>FOXO1</i>	<i>LIFR</i>	<i>NF2</i>	<i>PRR16</i>	<i>SPACA1</i>	
<i>ARID2</i>	<i>COL1A1</i>	<i>FOXO3</i>	<i>LIP1</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>PTEN</i>	<i>SPOP</i>	
<i>ARID5B</i>	<i>COL22A1</i>	<i>FOXP1</i>	<i>MAGEA8</i>	<i>NPNT</i>	<i>PTPN22</i>	<i>STAB2</i>	
<i>ASXL1</i>	<i>COL6A3</i>	<i>FRMD3</i>	<i>MAP2K4</i>	<i>NR2F1</i>	<i>PTPRD</i>	<i>STARD3</i>	
<i>ASXL2</i>	<i>CSMD3</i>	<i>GATA3</i>	<i>MAP3K1</i>	<i>NR3C1</i>	<i>PTPRM</i>	<i>STK11</i>	
<i>ATR</i>	<i>CTCF</i>	<i>GH1</i>	<i>MAP3K10</i>	<i>NRAS</i>	<i>RASGEF1B</i>	<i>STMN2</i>	
<i>BAP1</i>	<i>CTNNA1</i>	<i>GLDC</i>	<i>MAP3K13</i>	<i>NRG3</i>	<i>RB1</i>	<i>SYNE1</i>	
<i>BCAS3</i>	<i>CTNNA3</i>	<i>GPR124</i>	<i>MBL2</i>	<i>NT5E</i>	<i>ROS1</i>	<i>TAF1</i>	
<i>BCOR</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>GPR32</i>	<i>MEN1</i>	<i>OR6A2</i>	<i>RPGR</i>	<i>TAF4B</i>	
<i>BIRC6</i>	<i>DCAF4L2</i>	<i>GPS2</i>	<i>MKI67</i>	<i>PALLD</i>	<i>RPL22</i>	<i>TBL1XR1</i>	
<i>BRAF</i>	<i>DNAH11</i>	<i>GRB7</i>	<i>MLH1</i>	<i>PBRM1</i>	<i>RUNX1</i>	<i>TBX3</i>	
<i>BRCA1</i>	<i>DNAH2</i>	<i>GSDMB</i>	<i>MLL2</i>	<i>PDE4DIP</i>	<i>RYR2</i>	<i>TG</i>	
<i>BRCA2</i>	<i>DNAH5</i>	<i>HDAC9</i>	<i>MLL3</i>	<i>PGAP3</i>	<i>SBNO1</i>	<i>THADA</i>	
<i>BRIP1</i>	<i>DTWD2</i>	<i>HERC2</i>	<i>MLLT4</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>SETD1A</i>	<i>THSD7A</i>	
<i>CACNA2D3</i>	<i>EGFR</i>	<i>HIST1H2BC</i>	<i>MSH2</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>SETD2</i>	<i>TP53</i>	
<i>CASP8</i>	<i>EP300</i>	<i>HRAS</i>	<i>MSH6</i>	<i>PMS2</i>	<i>SETDB1</i>	<i>TTYH1</i>	

**TABLA SUPLEMENTARIA 2. LISTADO DE PRIMERS PARA VALIDACIÓN DE MUTACIONES POR SANGER**

Gen	MUTACIÓN		Posición	Forward Primer	Reverse Primer	Longitud (bp)
	Proteína	cDNA				
<i>PIK3CA</i>	VGNRE 105- 109V	c.317_328 del	chr3:17919913 9	CGACTTTGTGAC CTTCGGCT	TACGAAGGTATTGGTTT AGACAGAA	186
	Y644H	c.1930T>C	chr3:17921996 7	AGATCGGCCATG CAGAAACT	TGCCAAAAGAAAAAGT GCCCAA	149
	H1047R	c.3140A> G	chr3:17923429 7	ACTGAGCAAGAG GCTTTGGA	CGGTCTTTGCCTGCTGA GAG	193
<i>TP53</i>	M246K	c.737T>A	chr17:7674226	CCTCATCTTGGGC CTGTGTT	CGGGGATGTGATGAGA GGTG	268
	R213*	c.637C>T	chr17:7674894	CCAGGCCTCTGA TTCCTCAC	GCCACTGACAACCACCC TTA	202
	D184AX	c.550_551i nsC	chr17:7675061	AGTCACAGCACA TGACGGAG	GTGAGGAATCAGAGGC CTGG	134
	H179R	c.536A>G	chr17:7675076	CCCTGACTTTCA	CTCACCATCGCTATCTG AGCA	227
	K132E	c.394A>G	chr17:7675218	ACTCTGTCTC		
	C124*	c.372C>A	chr17:7675997	TGAAGCTCCCAG AATGCCAG	AAGTCTCATGGAAGCCA GCC	229
<i>ERBB2</i>	I654V	c.1960A> G	chr17:3972333 2	CACCCCAAATA GCCCTCAAT	GCAGTCTCCGCATCGTG TA	171

**TABLA SUPLEMENTARIA 3. MUESTRAS DE LA SERIE 1**

TUMOR	TIPO DE MUESTRA	KI67	FENOTIPO
Pt1_Primary	PRIMARIO	SÍ	TN
Pt1_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	TN
Pt2_Primary	PRIMARIO	SÍ	TN
Pt2_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	TN

Pt3_Primary	PRIMARIO	SÍ	TN
Pt3_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	TN
Pt4_Primary	PRIMARIO	SÍ	TN
Pt4_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	TN
Pt5_Primary	PRIMARIO	SÍ	TN
Pt5_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	TN
Pt6_Primary	PRIMARIO	SÍ	LumB
Pt6_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	LumB
Pt7_Primary	PRIMARIO	SÍ	LumB
Pt7_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	TN
Pt8_Primary	PRIMARIO	SÍ	TN
Pt8_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	TN
Pt9_Primary	PRIMARIO	SÍ	TN
Pt9_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	TN
Pt10_Primary	PRIMARIO	SÍ	TN
Pt10_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	TN
Pt11_Primary	PRIMARIO	SÍ	TN
Pt11_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	TN
Pt12_Primary	PRIMARIO	NO	LumA
Pt12_Metástasis	METÁSTASIS	NO	LumA
Pt13_Primary	PRIMARIO	SÍ	LumB
Pt13_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	LumB
Pt14_Primary	PRIMARIO	NO	Lum_Her2
Pt14_Metástasis	METÁSTASIS	NO	LumA
Pt15_Primary	PRIMARIO	NO	LumA
Pt16_Primary	PRIMARIO	SÍ	Lum_Her2
Pt16_Ganglio	GANGLIO	SÍ	Lum_Her2
Pt16_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	Lum_Her2
Pt17_Metástasis	METÁSTASIS	NO	LumA
Pt18_Primary	PRIMARIO	SÍ	LumB

Pt18_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	TN
Pt19_Primary	PRIMARIO	NO	LumA
Pt19_Metástasis	METÁSTASIS	NO	LumA
Pt20_Primary	PRIMARIO	SÍ	HER2
Pt20_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	HER2
Pt21_Primary	PRIMARIO	SÍ	Lum_Her2
Pt21_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	Lum_Her2
Pt22_Primary	PRIMARIO	SÍ	LumB
Pt22_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	LumB
Pt23_Primary	PRIMARIO	NO	LumA
Pt23_Metástasis	METÁSTASIS	NO	LumA
Pt24_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	LumB
Pt25_Metástasis	METÁSTASIS	SI	LumB
Pt26_Primary	PRIMARIO	NO	LumA
Pt27_Primary	PRIMARIO	NO	TN
Pt28_Primary	PRIMARIO	SÍ	TN
Pt29_Primary	PRIMARIO	SÍ	LumA
Pt29_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	TN
Pt30_Primary	PRIMARIO	NO	LumA
Pt30_Metástasis	METÁSTASIS	NO	LumA
Pt31_Primary	PRIMARIO	SÍ	TN
Pt31_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	TN
Pt32_Primary	PRIMARIO	SÍ	LumB
Pt32_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	Lum_Her2
Pt33_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	LumB
Pt34_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	LumB
Pt35_Primary	PRIMARIO	SÍ	LumB
Pt35_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	LumB
Pt36_Primary	PRIMARIO	SÍ	TN
Pt36_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	TN



Pt37_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	HER2
Pt38_Primary	PRIMARIO	SÍ	TN
Pt38_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	TN
Pt39_Primary	PRIMARIO	SÍ	TN
Pt40_Primary	PRIMARIO	SÍ	LumB
Pt40_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	LumB
Pt41_Primary	PRIMARIO	SÍ	LumB
Pt41_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	LumB
Pt42_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	TN
Pt43_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	LumB
Pt44_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	TN
Pt45_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	LumB
Pt46_Primary	PRIMARIO	SÍ	TN
Pt47_Primary	PRIMARIO	SÍ	HER2
Pt47_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	HER2
Pt48_Primary	PRIMARIO	NO	LumA
Pt48_Recidiva	RECIDIVA	NO	LumA
Pt48_Metástasis	METÁSTASIS	NO	LumA
Pt49_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	TN
Pt50_Primary	PRIMARIO	NO	LumA
Pt50_Metástasis	METÁSTASIS	NO	LumA
Pt51_Metástasis	METÁSTASIS	SÍ	TN

**TABLA SUPLEMENTARIA 4. INMUNOHISTOQUÍMICA DE P53 VS MUTACIÓN EN TP53 MEDIANTE NGS Y AMPLIFICACIONES POR FISH**

TUMOR	FENOTIPO	IHC	NGS	AMPLIFICACIONES			
		p53	TP53 NGS	CCND1	MYC	FGFR1	MDM4
Pt1_Primary	TN	Aberrante	Mutado	No	No	No	No
Pt1_Metástasis	TN	Aberrante	Mutado	No	No	No	No
Pt2_Primary	TN	Aberrante	Mutado	No	Sí	No	No
Pt2_Metástasis	TN	Aberrante	Mutado	No	Sí Low	No	No

## ANEXOS

Pt3_Primary	TN	Wild-Type	Wild-Type	No	No	No	No
Pt3_Metástasis	TN	Wild-Type	Wild-Type	No	No	No	No
Pt4_Primary	TN	Wild-Type	Mutado	No	No	No	No
Pt4_Metástasis	TN	Wild-Type	Mutado	No	Sí Low	No	No
Pt5_Primary	TN	Aberrante	Mutado	No	No	No	No
Pt5_Metástasis	TN	NC	Mutado	NC	NC	NC	NC
Pt6_Primary	Lum B	Wild-Type	Wild-Type	No	No	No	No
Pt6_Metástasis	Lum B	NC	Wild-Type	NC	NC	NC	NC
Pt7_Primary	Lum B	Aberrante	Mutado	No	Sí Low	No	No
Pt7_Metástasis	TN	Aberrante	Mutado	No	Sí Low	No	No
Pt8_Primary	TN	Aberrante	Mutado	No	No	Sí	No
Pt8_Metástasis	TN	Aberrante	Mutado	No	No	Sí	Sí Low
Pt9_Primary	TN	Wild-Type	Mutado	No	No	No	No
Pt9_Metástasis	TN	Wild-Type	Mutado	No	No	No	No
Pt10_Primary	TN	Wild-Type	Mutado	No	No	No	No
Pt10_Metástasis	TN	Wild-Type	Mutado	No	Sí Low	No	No
Pt11_Primary	TN	Aberrante	Mutado	NC	NC	NC	NC
Pt11_Metástasis	TN	Aberrante	Mutado	No	No	No	No
Pt12_Primary	Lum A	Wild-Type	Wild Type	No	No	No	No
Pt12_Metástasis	Lum A	Wild-Type	Wild Type	No	No	No	No
Pt13_Primary	Lum B	Wild-Type	Wild Type	Sí Low	No	No	No
Pt13_Metástasis	Lum B	Wild-Type	Wild Type	No	No	No	No
Pt14_Primary	Lum_Her2	Wild-Type	Wild Type	No	No	No	No
Pt14_Metástasis	Lum A	Wild-Type	Wild Type	No	No	No	No
Pt16_Primary	Lum_Her2	Aberrante	Mutado	No	Sí	Sí	No
Pt16_Ganglio	Lum_Her2	Wild-Type	Mutado	Sí	No	No	Sí Low
Pt16_Metástasis	Lum_Her2	Aberrante	Mutado	Sí	No	No	Sí Low
Pt18_Primary	Lum B	Wild-Type	Wild Type	No	No	No	No
Pt18_Metástasis	TN	Wild-Type	Wild Type	No	No	No	No
Pt19_Primary	Lum A	Wild-Type	Wild Type	No	No	No	No
Pt19_Metástasis	Lum A	Wild-Type	Wild Type	No	No	No	Sí Low
Pt21_Primary	Lum_Her2	Wild-Type	Wild Type	No	No	No	No
Pt21_Metástasis	Lum_Her2	Wild-Type	Wild Type	No	Sí Low	No	No
Pt22_Primary	Lum B	Wild-Type	Wild Type	Sí	No	No	Sí Low
Pt23_Primary	Lum A	NC	Wild Type	No	NC	Polisomía	No
Pt29_Primary	Lum A	Wild-Type	Wild Type	No	No	No	No
Pt29_Metástasis	TN	Wild-Type	Wild Type	No	No	No	No
Pt30_Primary	Lum A	Wild-Type	Wild Type	No	No	No	Sí Low
Pt31_Primary	TN	Aberrante	Mutado	No	No	No	No
Pt32_Primary	Lum B	Wild-Type	Wild Type	No	No	No	No
Pt32_Metástasis	Lum_Her2	Wild-Type	Wild Type	NC	NC	NC	NC
Pt35_Primary	Lum B	Wild-Type	Wild Type	No	No	No	Sí Low

Pt36_Primary	TN	Aberrante	Mutado	No	Sí Low	No	No
Pt38_Metástasis	TN	Wild-Type	Wild-Type	No	No	No	No
Pt40_Primary	Lum B	Wild-Type	Wild-Type	No	No	No	No
Pt40_Metástasis	Lum B	Wild-Type	Wild-Type	No	No	No	No
Pt41_Primary	Lum B	Wild-Type	Wild-Type	No	No	No	No
Pt47_Primary	HER2	Aberrante	Mutado	No	No	No	No
Pt47_Metástasis	HER2	Aberrante	Mutado	No	No	Polisomía	No
Pt48_Primary	Lum A	NC	Wild-Type	No	No	No	No
Pt48_Recidiva	Lum A	Wild-Type	Wild-Type	No	No	No	No
Pt48_Metástasis	Lum A	NC	Wild-Type	No	No	No	No
Pt50_Primary	Lum A	Wild-Type	Wild-Type	No	No	No	No
Pt50_Metástasis	Lum A	Wild-Type	Wild-Type	No	No	No	No
Pt15_Primary	Lum A	Wild-Type	Mutado	Sí Low	No	No	No
Pt17_Metástasis	Lum A	Aberrante	Mutado	No	No	No	No
Pt20_Metástasis	HER2	Wild-Type	Wild-Type	No	No	No	No
Pt24_Metástasis	Lum B	Wild-Type	Wild-Type	No	No	No	No
Pt25_Metástasis	Lum B	NC	Mutado	No	No	Sí	No
Pt26_Primary	Lum A	Wild-Type	Wild-Type	No	No	No	Sí Low
Pt28_Primary	TN	Wild-Type	Mutado	No	Sí Low	No	No
Pt33_Metástasis	Lum B	Wild-Type	Wild-Type	No	Sí	Polisomía	No
Pt37_Metástasis	HER2	Aberrante	Mutado	Sí	Sí	No	Sí
Pt42_Metástasis	TN	Aberrante	Mutado	No	Sí Low	No	No
Pt43_Metástasis	Lum B	Wild-Type	Wild-Type	Sí	Sí	No	No
Pt44_Metástasis	TN	Wild-Type	Wild-Type	No	No	No	No
Pt45_Metástasis	Lum B	Wild-Type	Mutado	No	Sí	No	Sí Low
Pt46_Primary	TN	Aberrante	Mutado	No	No	No	No
Pt49_Metástasis	TN	Wild-Type	Wild-Type	No	No	No	No
Pt51_Metástasis	TN	Aberrante	Mutado	No	No	No	No

**TABLA SUPLEMENTARIA 5. AMPLIFICACIONES Y DELECCIONES DE 8 REGIONES EN LA SERIE 1 ENCONTRADAS MEDIANTE KIT CNV**

GEN	PT	AMP/DEL
chr8:127339481-131439911 (MYC)	Pt1_Metástasis	Amp
chr11:68475551-70356153 (CCND1)	Pt1_Metástasis	Del
chr8:127339481-131439911 (MYC)	Pt2_Metástasis	Amp
chr8:35066171-40705120 (FGFR1)	Pt4_Primary	Del
chr8:127339481-131439911 (MYC)	Pt4_Primary	Amp

---

chr8:127339481-131439911 ( <i>MYC</i> )	Pt4_Metástasis	Amp
chr8:127339481-131439911 ( <i>MYC</i> )	Pt7_Prinario	Amp
chr8:127339481-131439911 ( <i>MYC</i> )	Pt7_Metástasis	Amp
chr17:31873304-38102169 ( <i>ERBB2</i> )	Pt7_Metástasis	Amp
chr19:28687501-32402303 ( <i>CCNE1</i> )	Pt7_Metástasis	Amp
chr8:127339481-131439911 ( <i>MYC</i> )	Pt10_Metástasis	Amp
chr11:68475551-70356153 ( <i>CCND1</i> )	Pt10_Metástasis	Del
chr12:5408501-10102027 ( <i>KRAS</i> )	Pt10_Metástasis	Del
chr19:28687501-32402303 ( <i>CCNE1</i> )	Pt10_Metástasis	Amp
chr8:35066171-40705120 ( <i>FGFR1</i> )	Pt11_Prinario	Del
chr8:127339481-131439911 ( <i>MYC</i> )	Pt11_Prinario	Amp
chr12:5408501-10102027 ( <i>KRAS</i> )	Pt11_Prinario	Del
chr8:127339481-131439911 ( <i>MYC</i> )	Pt11_Metástasis	Amp
chr19:28687501-32402303 ( <i>CCNE1</i> )	Pt11_Metástasis	Amp
chr19:28687501-32402303 ( <i>CCNE1</i> )	Pt14_Prinario	Del
chr8:35066171-40705120 ( <i>FGFR1</i> )	Pt16_Prinario	Del
chr8:127339481-131439911 ( <i>MYC</i> )	Pt16_Prinario	Amp
chr19:28687501-32402303 ( <i>CCNE1</i> )	Pt16_Prinario	Del
chr8:35066171-40705120 ( <i>FGFR1</i> )	Pt16_Metástasis	Del
chr8:127339481-131439911 ( <i>MYC</i> )	Pt18_Prinario	Amp
chr8:127339481-131439911 ( <i>MYC</i> )	Pt19_Prinario	Amp
chr8:127339481-131439911 ( <i>MYC</i> )	Pt19_Metástasis	Amp
chr20:49794259-54614800 ( <i>ZNF217</i> )	Pt21_Prinario	Amp
chr8:127339481-131439911 ( <i>MYC</i> )	Pt21_Prinario	Amp
chr11:68475551-70356153 ( <i>CCND1</i> )	Pt30_Metástasis	Del
chr8:127339481-131439911 ( <i>MYC</i> )	Pt31_Prinario	Amp
chr12:5408501-10102027 ( <i>KRAS</i> )	Pt31_Prinario	Amp
chr19:28687501-32402303 ( <i>CCNE1</i> )	Pt31_Prinario	Amp
chr17:31873304-38102169 ( <i>ERBB2</i> )	Pt32_Prinario	Amp
chr8:35066171-40705120 ( <i>FGFR1</i> )	Pt32_Prinario	Amp
chr17:31873304-38102169 ( <i>ERBB2</i> )	Pt32_Metástasis	Amp

---

chr8:127339481-131439911 ( <i>MYC</i> )	Pt35_Primary	Amp
chr8:127339481-131439911 ( <i>MYC</i> )	Pt35_Metástasis	Amp
chr8:127339481-131439911 ( <i>MYC</i> )	Pt36_Metástasis	Amp
chr20:49794259-54614800 ( <i>ZNF217</i> )	Pt38_Metástasis	Amp
chr12:5408501-10102027 ( <i>KRAS</i> )	Pt40_Primary	Del
chr8:127339481-131439911 ( <i>MYC</i> )	Pt40_Metástasis	Amp
chr8:35066171-40705120 ( <i>FGFR1</i> )	Pt47_Primary	Amp
chr8:127339481-131439911 ( <i>MYC</i> )	Pt47_Primary	Amp
chr17:31873304-38102169 ( <i>ERBB2</i> )	Pt47_Primary	Amp
chr17:31873304-38102169 ( <i>ERBB2</i> )	Pt47_Metástasis	Amp
chr8:127339481-131439911 ( <i>MYC</i> )	Pt33_Metástasis	Amp
chr8:35066171-40705120 ( <i>FGFR1</i> )	Pt33_Metástasis	Amp
chr20:49794259-54614800 ( <i>ZNF217</i> )	Pt33_Metástasis	Amp
chr8:127339481-131439911 ( <i>MYC</i> )	Pt43_Metástasis	Amp
chr19:28687501-32402303 ( <i>CCNE1</i> )	Pt44_Metástasis	Del
chr8:127339481-131439911 ( <i>MYC</i> )	Pt45_Metástasis	Amp
chr8:35066171-40705120 ( <i>FGFR1</i> )	Pt45_Metástasis	Amp
chr8:127339481-131439911 ( <i>MYC</i> )	Pt51_Metástasis	Amp
chr8:127339481-131439911 ( <i>MYC</i> )	Pt49_Metástasis	Amp
chr20:49794259-54614800 ( <i>ZNF217</i> )	Pt49_Metástasis	Amp
chr8:127339481-131439911 ( <i>MYC</i> )	Pt39_Primary	Amp

Amplificación (Amp). Deleción (Del)

**TABLA SUPLEMENTARIA 6. AMPLIFICACIONES Y DELECCIONES DE 8 REGIONES EN LA SERIE 1 ENCONTRADAS MEDIANTE CONTRA**

GEN	PT	AMP/DEL
chr8:35066171-40705120 ( <i>FGFR1</i> )	Pt1_Primary	Amp
chr17:31873304-38102169 ( <i>ERBB2</i> )	Pt1_Primary	Amp
chr19:28687501-32402303 ( <i>CCNE1</i> )	Pt1_Primary	Amp

---

chr11:68475551-70356153 ( <i>CCND1</i> )	Pt1_Metástasis	Del
chr20:49794259-54614800 ( <i>ZNF217</i> )	Pt1_Metástasis	Del
chr8:35066171-40705120 ( <i>FGFR1</i> )	Pt2_Metástasis	Amp
chr8:35066171-40705120 ( <i>FGFR1</i> )	Pt4_Primary	Del
chr12:5408501-10102027 ( <i>KRAS</i> )	Pt4_Primary	Amp
chr17:31873304-38102169 ( <i>ERBB2</i> )	Pt4_Primary	Amp
chr8:127339481-131439911 ( <i>MYC</i> )	Pt4_Metástasis	Amp
chr11:68475551-70356153 ( <i>CCND1</i> )	Pt4_Metástasis	Amp
chr3:176730001-180486834 ( <i>PIK3CA</i> )	Pt5_Primary	Del
chr19:28687501-32402303 ( <i>CCNE1</i> )	Pt5_Primary	Amp
chr3:176730001-180486834 ( <i>PIK3CA</i> )	Pt7_Metástasis	Del
chr8:35066171-40705120 ( <i>FGFR1</i> )	Pt7_Metástasis	Del
chr11:68475551-70356153 ( <i>CCND1</i> )	Pt7_Metástasis	Amp
chr17:31873304-38102169 ( <i>ERBB2</i> )	Pt7_Metástasis	Amp
chr19:28687501-32402303 ( <i>CCNE1</i> )	Pt7_Metástasis	Amp
chr8:35066171-40705120 ( <i>FGFR1</i> )	Pt8_Metástasis	Amp
chr19:28687501-32402303 ( <i>CCNE1</i> )	Pt8_Metástasis	Amp
chr8:127339481-131439911 ( <i>MYC</i> )	Pt10_Metástasis	Amp
chr11:68475551-70356153 ( <i>CCND1</i> )	Pt10_Metástasis	Del
chr19:28687501-32402303 ( <i>CCNE1</i> )	Pt10_Metástasis	Amp
chr19:28687501-32402303 ( <i>CCNE1</i> )	Pt11_Primary	Amp
chr19:28687501-32402303 ( <i>CCNE1</i> )	Pt11_Metástasis	Amp
chr19:28687501-32402303 ( <i>CCNE1</i> )	Pt14_Primary	Del
chr3:176730001-180486834 ( <i>PIK3CA</i> )	Pt16_Primary	Del
chr17:31873304-38102169 ( <i>ERBB2</i> )	Pt16_Primary	Amp
chr19:28687501-32402303 ( <i>CCNE1</i> )	Pt16_Primary	Del
chr3:176730001-180486834 ( <i>PIK3CA</i> )	Pt16_Ganglio	Del
chr17:31873304-38102169 ( <i>ERBB2</i> )	Pt16_Ganglio	Amp
chr3:176730001-180486834 ( <i>PIK3CA</i> )	Pt16_Metástasis	Del
chr11:68475551-70356153 ( <i>CCND1</i> )	Pt18_Primary	Del
chr17:31873304-38102169 ( <i>ERBB2</i> )	Pt21_Primary	Amp

---

---

chr17:31873304-38102169 ( <i>ERBB2</i> )	Pt21_Metástasis	Amp
chr3:176730001-180486834 ( <i>PIK3CA</i> )	Pt22_Metástasis	Del
chr11:68475551-70356153 ( <i>CCND1</i> )	Pt23_Primary	Amp
chr8:35066171-40705120 ( <i>FGFR1</i> )	Pt23_Primary	Amp
chr8:35066171-40705120 ( <i>FGFR1</i> )	Pt23_Metástasis	Amp
chr11:68475551-70356153 ( <i>CCND1</i> )	Pt30_Metástasis	Del
chr3:176730001-180486834 ( <i>PIK3CA</i> )	Pt30_Metástasis	Del
chr12:5408501-10102027 ( <i>KRAS</i> )	Pt31_Primary	Amp
chr19:28687501-32402303 ( <i>CCNE1</i> )	Pt31_Primary	Amp
chr3:176730001-180486834 ( <i>PIK3CA</i> )	Pt31_Primary	Del
chr17:31873304-38102169 ( <i>ERBB2</i> )	Pt32_Primary	Amp
chr17:31873304-38102169 ( <i>ERBB2</i> )	Pt32_Metástasis	Amp
chr3:176730001-180486834 ( <i>PIK3CA</i> )	Pt35_Primary	Del
chr8:127339481-131439911 ( <i>MYC</i> )	Pt35_Primary	Amp
chr11:68475551-70356153 ( <i>CCND1</i> )	Pt35_Primary	Amp
chr3:176730001-180486834 ( <i>PIK3CA</i> )	Pt35_Metástasis	Del
chr8:127339481-131439911 ( <i>MYC</i> )	Pt35_Metástasis	Amp
chr8:127339481-131439911 ( <i>MYC</i> )	Pt38_Primary	Amp
chr3:176730001-180486834 ( <i>PIK3CA</i> )	Pt38_Metástasis	Del
chr8:127339481-131439911 ( <i>MYC</i> )	Pt38_Metástasis	Amp
chr8:35066171-40705120 ( <i>FGFR1</i> )	Pt40_Primary	Amp
chr11:68475551-70356153 ( <i>CCND1</i> )	Pt40_Primary	Amp
chr12:5408501-10102027 ( <i>KRAS</i> )	Pt40_Primary	Amp
chr17:31873304-38102169 ( <i>ERBB2</i> )	Pt40_Primary	Amp
chr8:35066171-40705120 ( <i>FGFR1</i> )	Pt47_Primary	Amp
chr8:127339481-131439911 ( <i>MYC</i> )	Pt47_Primary	Amp
chr17:31873304-38102169 ( <i>ERBB2</i> )	Pt47_Primary	Amp
chr17:31873304-38102169 ( <i>ERBB2</i> )	Pt47_Metástasis	Amp
chr8:35066171-40705120 ( <i>FGFR1</i> )	Pt47_Metástasis	Amp
chr8:127339481-131439911 ( <i>MYC</i> )	Pt47_Metástasis	Amp
chr11:68475551-70356153 ( <i>CCND1</i> )	Pt48_Recidiva	Del

---

---

chr11:68475551-70356153 ( <i>CCND1</i> )	Pt48_Metástasis	Del
chr11:68475551-70356153 ( <i>CCND1</i> )	Pt50_Primary	Del
chr19:28687501-32402303 ( <i>CCNE1</i> )	Pt50_Primary	Del
chr17:31873304-38102169 ( <i>ERBB2</i> )	Pt17_Metástasis	Del
chr17:31873304-38102169 ( <i>ERBB2</i> )	Pt20_Metástasis	Amp
chr11:68475551-70356153 ( <i>CCND1</i> )	Pt24_Metástasis	Del
chr19:28687501-32402303 ( <i>CCNE1</i> )	Pt24_Metástasis	Del
chr8:127339481-131439911 ( <i>MYC</i> )	Pt33_Metástasis	Amp
chr8:35066171-40705120 ( <i>FGFR1</i> )	Pt33_Metástasis	Amp
chr20:49794259-54614800 ( <i>ZNF217</i> )	Pt33_Metástasis	Amp
chr3:176730001-180486834 ( <i>PIK3CA</i> )	Pt33_Metástasis	Del
chr8:35066171-40705120 ( <i>FGFR1</i> )	Pt34_Metástasis	Amp
chr17:31873304-38102169 ( <i>ERBB2</i> )	Pt37_Metástasis	Amp
chr8:35066171-40705120 ( <i>FGFR1</i> )	Pt42_Metástasis	Amp
chr11:68475551-70356153 ( <i>CCND1</i> )	Pt43_Metástasis	Amp
chr19:28687501-32402303 ( <i>CCNE1</i> )	Pt44_Metástasis	Del
chr8:127339481-131439911 ( <i>MYC</i> )	Pt45_Metástasis	Amp
chr8:35066171-40705120 ( <i>FGFR1</i> )	Pt45_Metástasis	Amp
chr12:5408501-10102027 ( <i>KRAS</i> )	Pt45_Metástasis	Del
chr8:35066171-40705120 ( <i>FGFR1</i> )	Pt49_Metástasis	Amp
chr20:49794259-54614800 ( <i>ZNF217</i> )	Pt49_Metástasis	Amp
chr12:5408501-10102027 ( <i>KRAS</i> )	Pt49_Metástasis	Del
chr8:127339481-131439911 ( <i>MYC</i> )	Pt39_Primary	Amp
chr20:49794259-54614800 ( <i>ZNF217</i> )	Pt46_Primary	Del
chr12:5408501-10102027 ( <i>KRAS</i> )	Pt46_Primary	Del

---



TABLA SUPLEMENTARIA 7. MUTACIONES Y CNVS EN ALGUNOS DE LOS GENES MÁS RELEVANTES

	Genes																								
	<i>TP53</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>ESR1</i>	<i>NF1</i>	<i>RB1</i>	<i>ARID1A</i>	<i>ARID1B</i>	<i>CDH1</i>	<i>AKT1</i>	<i>NCOR1</i>	<i>ATR</i>	<i>CHD4</i>	<i>CASP8</i>	<i>KRAS</i>	<i>PTEN</i>	<i>STARD3</i>	<i>GATA3</i>	<i>ATR</i>	<i>ERBB2</i>	<i>MYC</i>	<i>MDM4</i>	<i>CCND1</i>	<i>FGFR1</i>	
Pt1_Primary	M246K																	-421-422X							
Pt1_Metastasis	M246K																								
Pt2_Primary	H179R																								Amp
Pt2_Metastasis	H179R																								Amp
Pt3_Primary																									
Pt3_Metastasis		H1047R																							
Pt4_Primary	C124*																								
Pt4_Metastasis	C124*																								Amp
Pt5_Primary	A307X				N1984S																				
Pt5_Metastasis	A307X				N1984S																				
Pt6_Primary																									
Pt6_Metastasis																									
Pt7_Primary	F134C																								Amp
Pt7_Metastasis	F134C																								Amp
Pt8_Primary	R267P																								Amp
Pt8_Metastasis	R267P																								Amp
Pt9_Primary	AP76-77X																								
Pt9_Metastasis	AP76-77X																								
Pt10_Primary	R213*																								



Pt22_Primerio																								
Pt22_Metástasis																								
Pt23_Primerio																								
Pt23_Metástasis																								
Pt29_Primerio		Y644H			S2018I				E17K															
Pt29_Metástasis		Y644H			S2018I				E17K															
Pt30_Primerio									E17K															
Pt30_Metástasis									E17K															
Pt31_Primerio	E346G/R2 48W																							
Pt31_Metástasis	E346G/R2 48W																							
Pt32_Primerio										T1469 A														
Pt32_Metástasis										T1469 A													Poliso mía	
Pt35_Primerio				E380Q																				
Pt35_Metástasis				E380Q																				
Pt36_Primerio	P151R	Y644H																						
Pt36_Metástasis	P151R	Y644H/VGNRE105- 109V																						
Pt38_Primerio		L896M																						
Pt38_Metástasis	S90X	Q546K																						
Pt40_Primerio																								
Pt40_Metástasis																								
Pt41_Primerio		H1047R							P1419L															
Pt41_Metástasis		H1047R							P1419L															
Pt47_Primerio	FRE341-																						Amp	



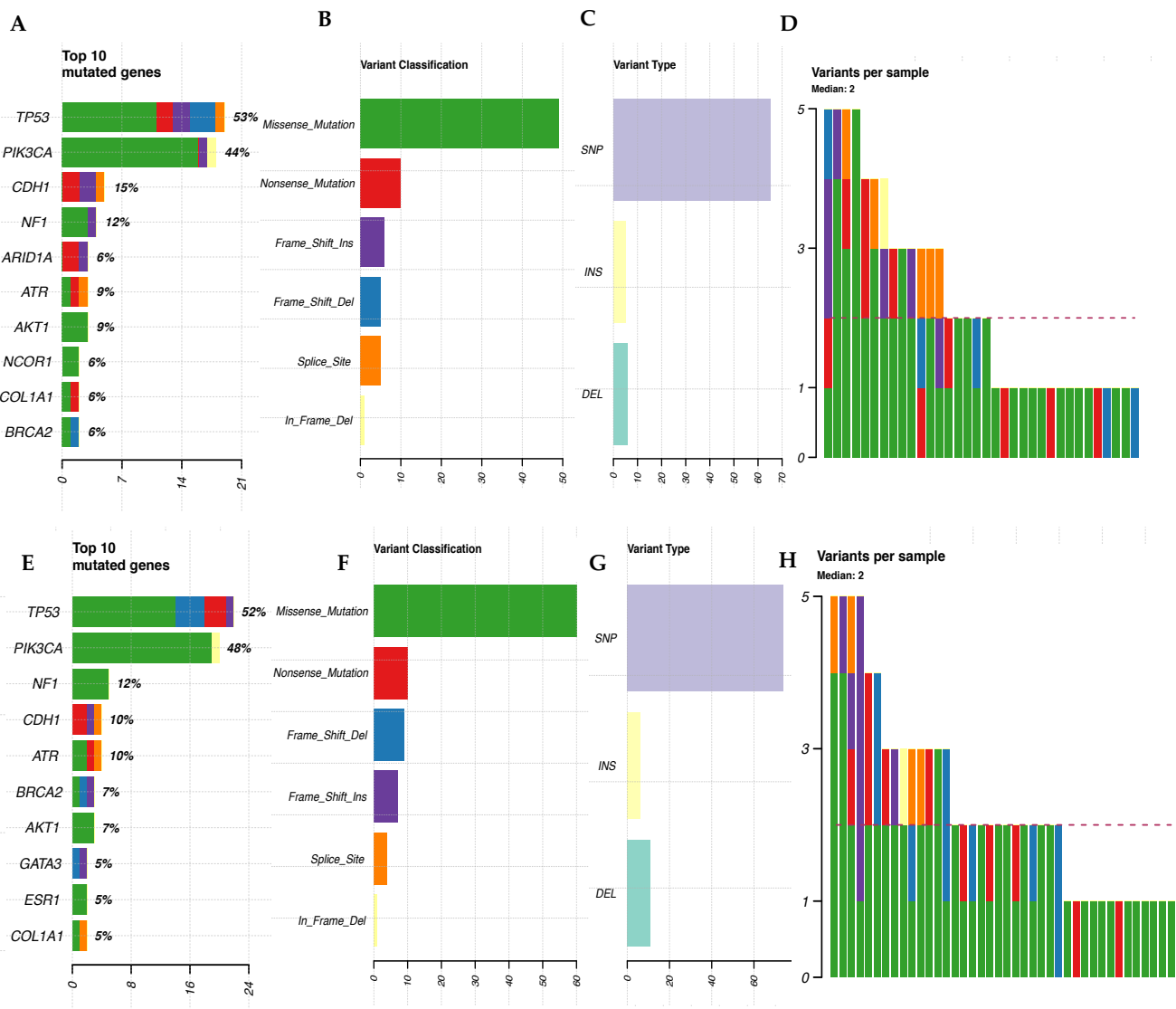
## ANEXO II: FIGURAS SUPLEMENTARIAS

### DESCRIPTIVO DE LAS MUESTRAS DE LA SERIE 1

En el grupo de tumores primarios, teniendo en cuenta sólo las muestras que presentan alguna mutación el gen con mayor frecuencia de mutación fue *TP53* (53%), seguido de otros en menor frecuencias *PIK3CA* (44%), *CDH1* (15%), *NF1* (11%), *ATR* (9%), *AKT1* (9%), *ARID1A* (6%), *NCOR1* (6%), *COL1A1* (6%) y *BRCA2* (6%). La mayor parte de las mutaciones fueron *missense* de tipo SNP, seguidas de *non sense* y *frame shift ins*, con una media de 2 mutaciones por muestra. (Fig. suplementaria 1)

Refiriéndonos al grupo de MC, también encontramos que el gen con mayor frecuencia de mutación fue *TP53* (52%), seguido de otros en menor frecuencias *PIK3CA* (48%), *NF1* (12%), *CDH1* (10%), *ATR* (10%), *BRCA2* (7%), *AKT1* (7%), *GATA3* (5%), *ESR1* (5%) y *COL1A1* (5%). La mayor parte de las mutaciones fueron *missense* de tipo SNP, seguidas de *non sense* y *frame shift del*, con una media de 2 mutaciones por muestra. (Fig. suplementaria 1)

## FIGURA SUPLEMENTARIA 1. RESUMEN DE TUMORES PRIMARIOS Y METÁSTASIS CUTÁNEAS

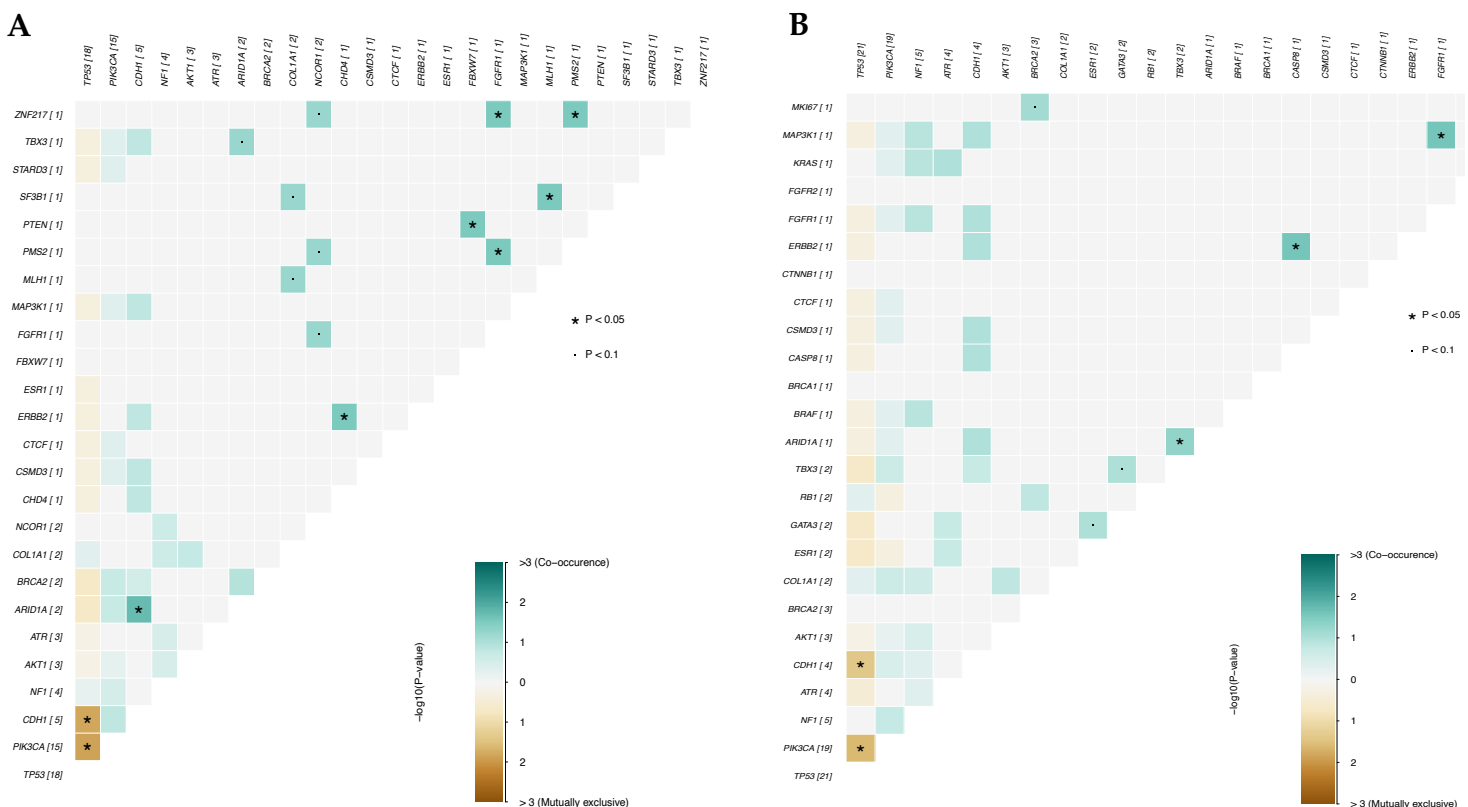


**A.** Genes con mayor frecuencia de mutación en los tumores primarios. **B.** Clasificación de las mutaciones en los tumores primarios. **C.** Tipo de variantes en los tumores primarios. **D.** Gráfico que representa el tipo de variante por muestra en los tumores. **E.** Genes con mayor frecuencia de mutación en las metástasis cutáneas. **F.** Clasificación de las mutaciones en las metástasis cutáneas. **G.** Tipo de variantes en las metástasis cutáneas. **H.** Gráfico que representa el tipo de variante por muestra en las metástasis cutáneas.

## Mutaciones coocurrentes o mutuamente excluyentes en los tumores primarios y las metástasis cutáneas

En los tumores primarios se observó, con un valor significativo  $p < 0,05$ , coocurrencia de mutaciones en las parejas de genes *PTEN-FBXW7*, *PMS2-FGFR1*, *SF3B1-MLH1*, *ERBB2-CHD4* y *ARID1A-CDH1*, y mutaciones mutuamente excluyentes en las parejas de genes *CDH1-TP53* y *PIK3CA-TP53*. En las MC se observó, con un valor significativo  $p < 0,05$ , coocurrencia de mutaciones en las parejas de genes *ARID1A-TBX3*, *MAP3K1-FGFR1* y *ERBB2-CASP8*, y mutaciones mutuamente excluyentes en las parejas de genes *CDH1-TP53* y *PIK3CA-TP53*. (Fig. suplementaria 2)

### FIGURA SUPLEMENTARIA 2. MUTACIONES COOCURRENTES O MUTUAMENTE EXCLUYENTES EN LOS TUMORES PRIMARIOS Y EN LAS METÁSTASIS CUTÁNEAS

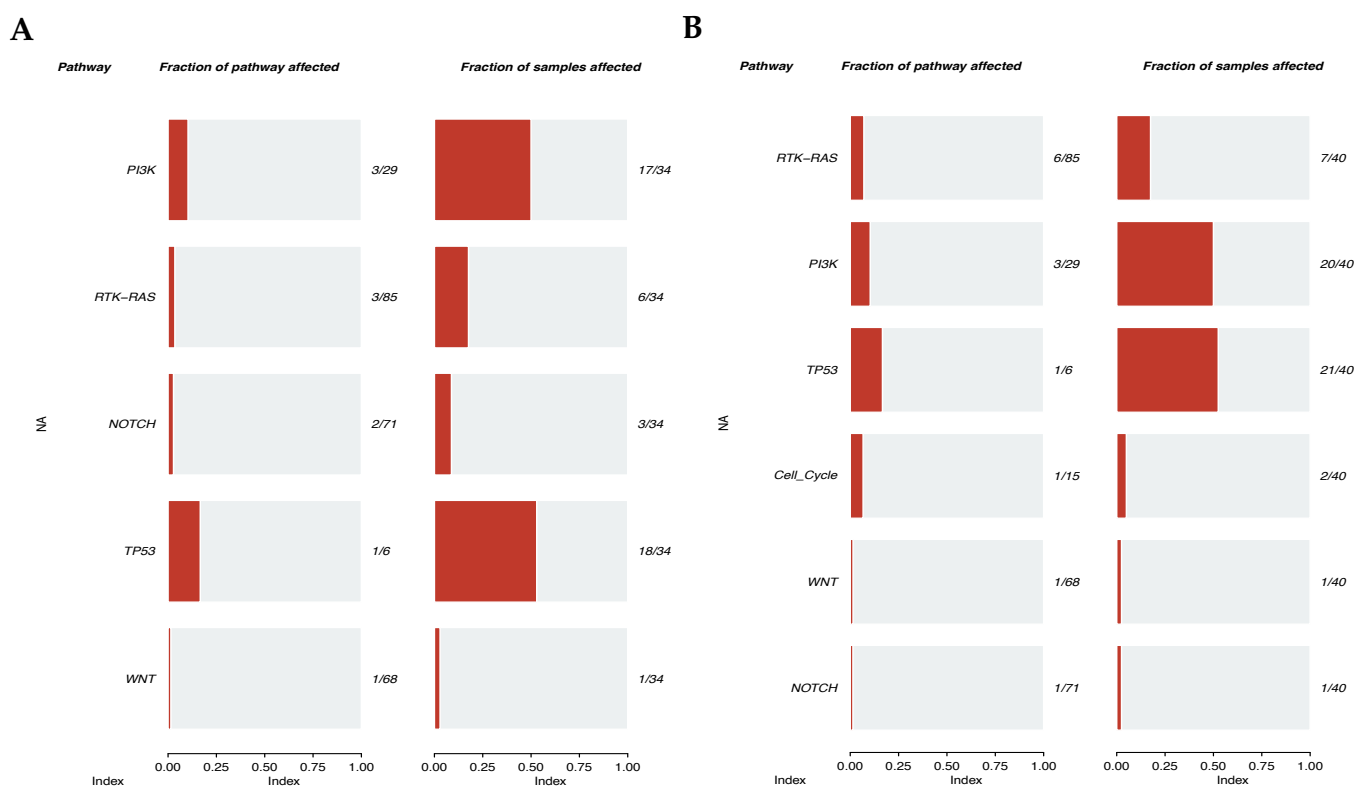


**A.** Representación de las mutaciones coocurrentes (azul) o mutuamente excluyentes (marrón) en los tumores primarios de la serie 1. **B.** Representación de las mutaciones coocurrentes (azul) o mutuamente excluyentes (marrón) en las metástasis cutáneas de la serie 1. (\*) valor significativo  $p < 0,05$ .

## Rutas de señalización alteradas en los tumores primarios y metástasis cutáneas

En la Fig. suplementaria 3, se observa que en ambos grupos la ruta molecular más alterada fue la de *TP53* con alteración en el 52,9% de las muestras de tumor primario y el 52,5% de las MC. La siguiente ruta más afectada en ambos grupos fue la de *PI3K*, con el 50% de alteración en ambos grupos. Y las vías alteradas en menor frecuencia en ambos fueron la de *NOTCH* y *RTK-RAS*. En el grupo de MC además se vio algo afectada la ruta de ciclo celular.

### FIGURA SUPLEMENTARIA 3. ALTERACIONES EN RUTAS DE SEÑALIZACIÓN EN LOS TUMORES PRIMARIOS Y METÁSTASIS CUTÁNEAS



**A.** Vías moleculares alteradas en los tumores primarios de la serie 1. **B.** Vías moleculares alteradas en las metástasis cutáneas de la serie 1.

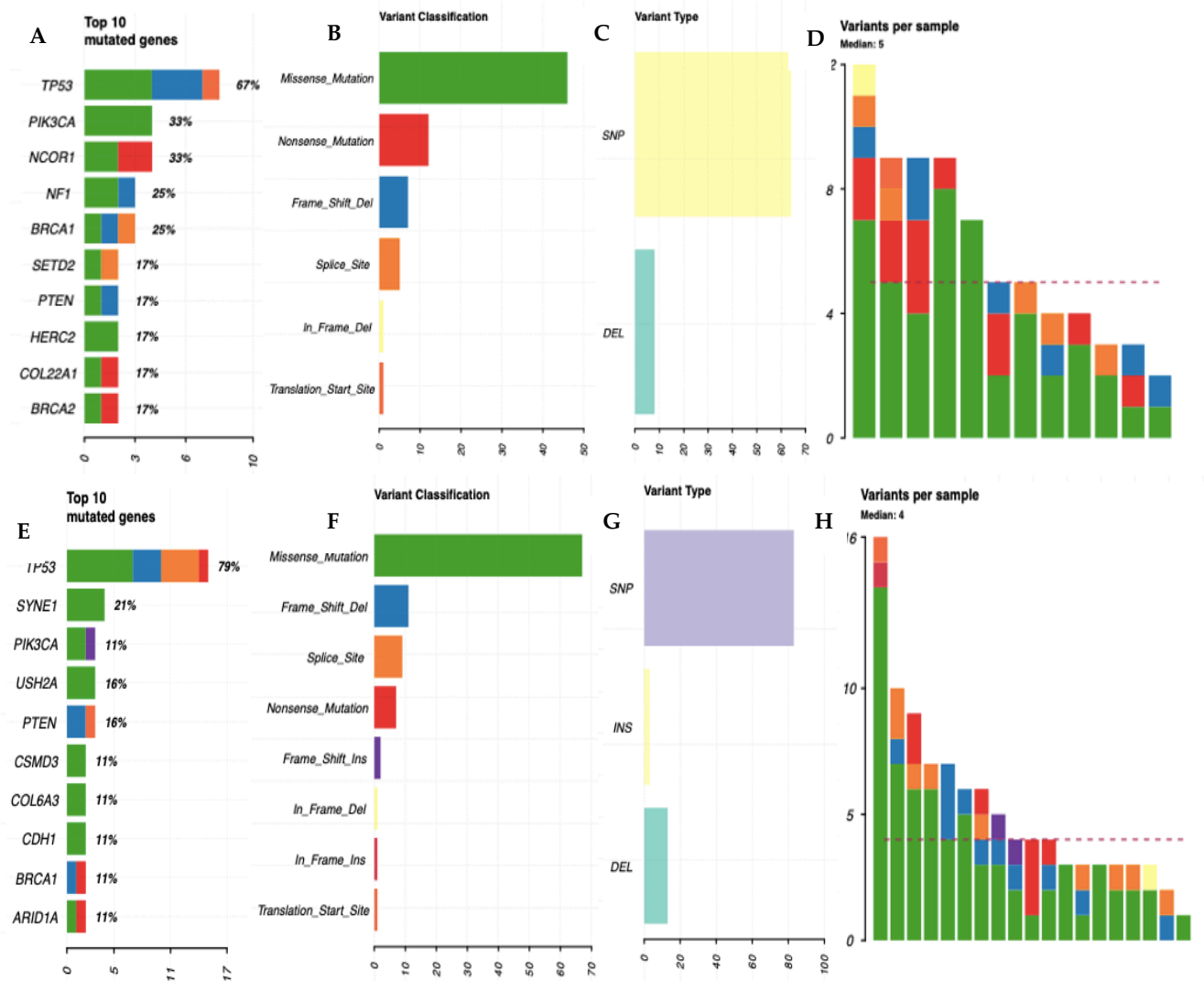


## Descriptivo de las muestras de la serie 2

Centrándonos en el grupo de tumores de las pacientes que no han desarrollado metástasis el gen con mayor frecuencia de mutación fue *TP53* (67%), seguido de otros en menor frecuencias *PIK3CA* (33%), *NCOR1* (33%), *NF1* (25%), etc. La mayor parte de las mutaciones fueron *missense* de tipo SNP, seguidas de *non sense* y *frameshift*, con una media de 5 mutaciones por muestra. (Fig. suplementaria 4)

Refiriéndonos al grupo de tumores de pacientes que desarrollaron metástasis, también encontramos que el gen con mayor frecuencia de mutación fue *TP53* (79%), *SYNE1* (21%), *PIK3CA* (11%), *USH2A* (16%), *PTEN* (16%), etc. La mayor parte de las mutaciones fueron *missense* de tipo SNP, seguidas de *non sense* y *splice site*, con una media de 5 mutaciones por muestra. (Fig. suplementaria 4)

## FIGURA SUPLEMENTARIA 4. TIPO Y FRECUENCIA DE MUTACIONES EN LOS TUMORES PRIMARIOS TRIPLE NEGATIVO

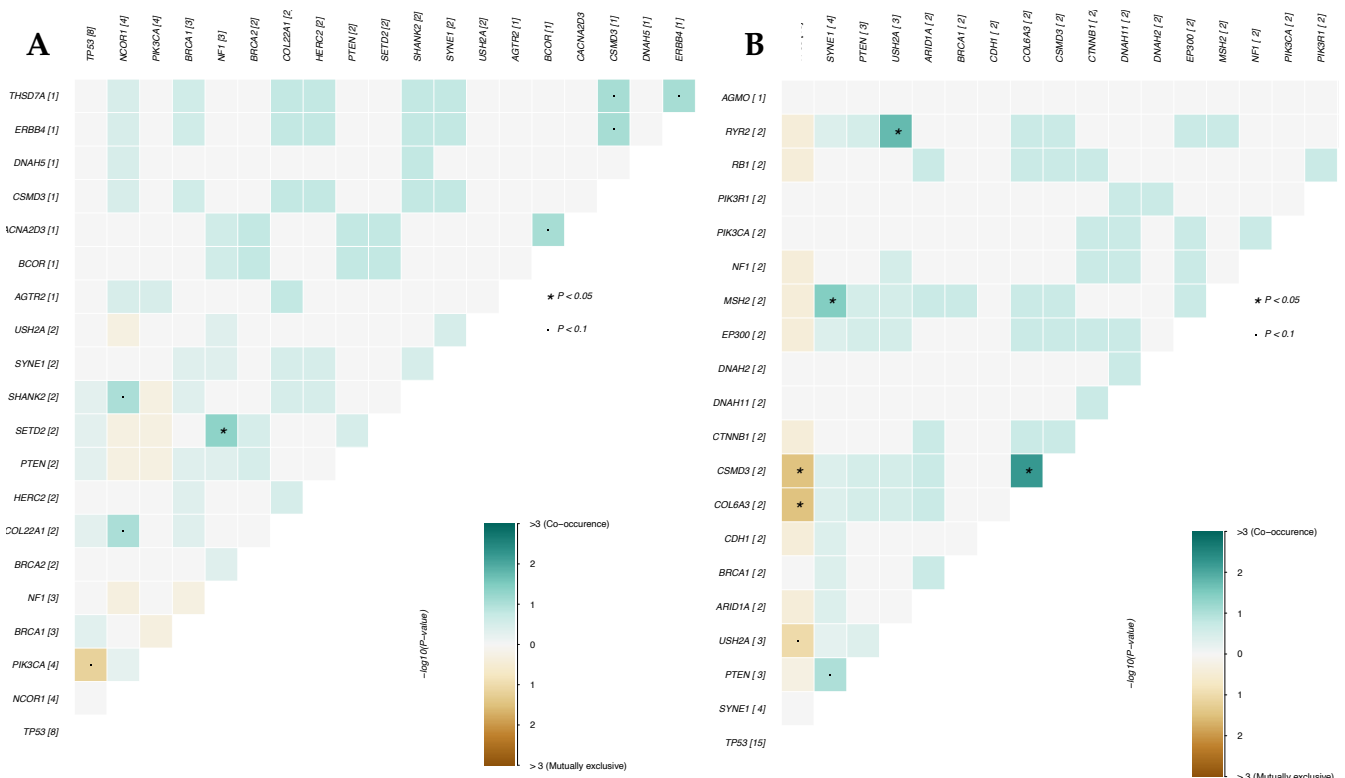


**A.** Genes con mayor frecuencia de mutación en los tumores primarios triple negativo de pacientes sin metástasis. **B.** Clasificación de las mutaciones en los tumores primarios triple negativo de pacientes sin metástasis. **C.** Tipo de variantes en los tumores primarios triple negativo de pacientes sin metástasis. **D.** Gráfico que representa el tipo de variante por muestra en los tumores primarios triple negativo de pacientes sin metástasis. **E.** Genes con mayor frecuencia de mutación en los tumores primarios triple negativo de pacientes con metástasis. **F.** Clasificación de las mutaciones en los tumores primarios triple negativo de pacientes con metástasis. **G.** Tipo de variantes en los tumores primarios triple negativo de pacientes con metástasis. **H.** Gráfico que representa el tipo de variante por muestra en los tumores primarios triple negativo de pacientes con metástasis.

## Mutaciones coocurrentes o mutuamente excluyentes en los tumores primarios triple negativo de pacientes no metastásicas y metastásicas

En los tumores primarios TN de pacientes no metastásicas observamos coocurrencia de mutaciones con un valor significativo  $p < 0,05$  en la pareja de genes *SETD2-NF1*. En los tumores primarios de pacientes metastásicas observamos con un valor significativo  $p < 0,05$  coocurrencia de mutaciones en las parejas de genes *MSH2-SYNE1*, *RYR2-USH2A* y *CSMD3-COL6A3* y mutaciones mutuamente excluyentes en las parejas de genes *TP53-COL6A3* y *TP53-CSMD3*. (Fig. suplementaria 5)

### FIGURA SUPLEMENTARIA 5. MUTACIONES COOCURRENTES O MUTUAMENTE EXCLUYENTES EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO NO METASTÁSICO Y METASTÁSICO

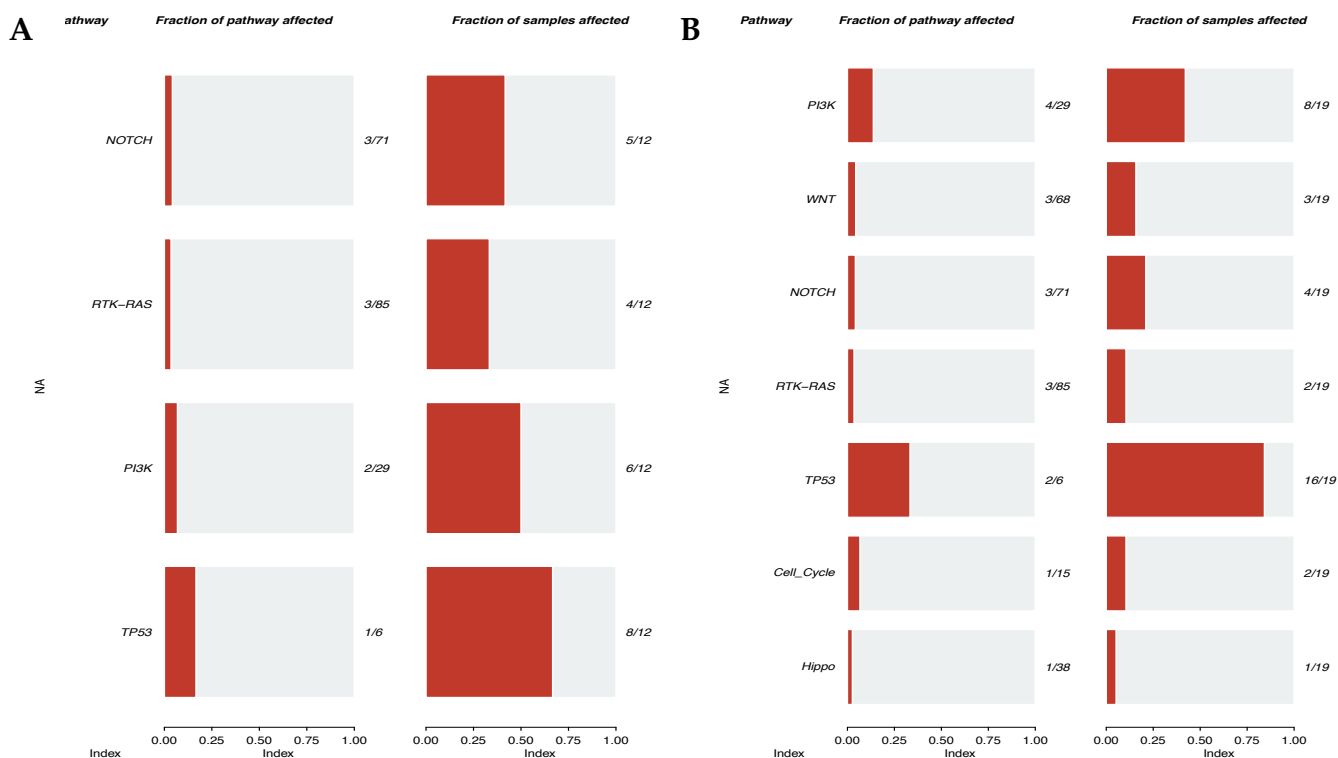


**A.** Representación de las mutaciones coocurrentes o mutuamente excluyentes en tumores primarios de cáncer de mama triple negativo de pacientes no metastásicas. **B.** Representación de las mutaciones coocurrentes o mutuamente excluyentes en tumores primarios de cáncer de mama triple negativos de pacientes metastásicas. (\*) valor significativo  $< 0,05$ .

## Rutas de señalización alteradas en los tumores primarios triple negativo de pacientes sin metástasis y metastásicas

En la Fig. suplementaria 6, se observa que en ambos grupos la ruta molecular más alterada fue la de *TP53* con mutación en el 67,7% de las muestras de las pacientes sin metástasis y el 84,2% de las muestras de las pacientes con metástasis. La siguiente ruta más afectada en ambos grupos fue la de *PI3K*, con el 50% de las muestras de las pacientes sin metástasis y el 42,1% de las muestras de pacientes con metástasis. Y las dos últimas vías alteradas en menor frecuencia en ambos grupos fueron la de *NOTCH* y *RTK-RAS*. En el grupo de pacientes metastásicas además se vieron algo afectadas las rutas *WNT*, ciclo celular y Hippo.

**FIGURA SUPLEMENTARIA 6. ALTERACIONES EN RUTAS DE SEÑALIZACIÓN EN LOS TUMORES PRIMARIOS TRIPLE NEGATIVO**



**A.** Vías moleculares alteradas en los tumores triple negativo de las pacientes no metastásicas. **B.** Vías moleculares alteradas en los tumores triple negativo de las pacientes metastásicas.

---

## ANEXO III: LISTADO DE PUBLICACIONES

### Listado de publicaciones relacionadas con este trabajo:

1. **González-Martínez, S.;** Pizarro, D.; Pérez-Mies, B.; Caniego-Casas, T.; Curigliano, G.; Cortés, J.; Palacios, J. Clinical, Pathological, and Molecular Features of Breast Carcinoma Cutaneous Metastasis. *Cancers* 2021, 13, 5416, doi:10.3390/cancers13215416.
2. **González-Martínez, S.;** Pizarro, D.; Pérez-Mies, B.; Caniego-Casas, T.; Rodríguez-Peralto, J.L.; Curigliano, G.; Cortés, A.; Gión, M.; Cortés, J.; Palacios, J. Differences in the Molecular Profile between Primary Breast Carcinomas and Their Cutaneous Metastases. *Cancers* 2022, 14, 1151, doi:10.3390/cancers14051151.

### Listado de publicaciones no directamente relacionadas con este trabajo:

3. García-Estevez, L.; **González-Martínez, S.;** Moreno-Bueno, G. The Leptin Axis and Its Association With the Adaptive Immune System in Breast Cancer. *Front. Immunol.* 2021, 12, 784823, doi:10.3389/fimmu.2021.784823.
4. **González-Martínez, S.;** Pérez-Mies, B.; Pizarro, D.; Caniego-Casas, T.; Cortés, J.; Palacios, J. Epithelial Mesenchymal Transition and Immune Response in Metaplastic Breast Carcinoma. *IJMS* 2021, 22, 7398, doi:10.3390/ijms22147398.
5. **González-Martínez, S.;** Pérez-Mies, B.; Carretero-Barrio, I.; Palacios-Berraquero, M.L.; Perez-García, J.; Cortés, J.; Palacios, J. Molecular Features of Metaplastic Breast Carcinoma: An Infrequent Subtype of Triple Negative Breast Carcinoma. *Cancers* 2020, 12, 1832, doi:10.3390/cancers12071832
6. Earl, J., Galindo-Pumariño, C., Encinas, J., Barreto, E., Castillo, M. E., Pachón, V., Ferreiro, R., Rodríguez-Garrote, M., **González-Martínez, S.**, Ramon y Cajal, T., Diaz, L. R., Chirivella-Gonzalez, I., Rodriguez, M., de Castro, E. M., García-

Seisdedos, D., Muñoz, G., Rosa, J. M. R., Marquez, M., Malats, N., & Carrato, A. (2020). A comprehensive analysis of candidate genes in familial pancreatic cancer families reveals a high frequency of potentially pathogenic germline variants. *EBioMedicine*, 53. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102675>

7. Rosa-Rosa, J.; Caniego-Casas, T.; Leskela, S.; Cristobal, E.; **González-Martínez, S.**; Moreno-Moreno, E.; López-Miranda, E.; Holgado, E.; Pérez-Mies, B.; Garrido, P.; et al. High Frequency of ERBB2 Activating Mutations in Invasive Lobular Breast Carcinoma with Pleomorphic Features. *Cancers* 2019, 11, 74, doi:10.3390/cancers11010074.







**Listado de capítulos de libro no directamente relacionados con este trabajo pendientes de publicación:**

8. **Silvia González Martínez**; Natalia Guerra Pérez. Capítulo “Aparato Cardiovascular”. *Histología y Organografía Microscópica para el Biólogo Sanitario*. 1ª Edición, 2022. Ilustre Colegio Oficial de Biólogos de Murcia. pp.XX-XX. ISBN XXX-XX-XXX-XXXX-X
9. Natalia Guerra Pérez; **Silvia González Martínez**. Capítulo “Respuesta Frente a Tumores. Bases Moleculares y Celulares de la Inmunología e Inmunidad”. 1ª Edición, 2022. Ilustre Colegio Oficial de Biólogos de Murcia. pp.XX-XX. ISBN XXX-XX-XXX-XXXX-X

**ANEXO IV: PUBLICACIONES RELACIONADOS CON ESTE TRABAJO**

## Article

# Differences in the Molecular Profile between Primary Breast Carcinomas and Their Cutaneous Metastases

Silvia González-Martínez <sup>1,2</sup> , David Pizarro <sup>3</sup> , Belén Pérez-Mies <sup>3,4,5,6</sup>, Tamara Caniego-Casas <sup>3</sup>, José Luis Rodríguez-Peralto <sup>5,7,8</sup> , Giuseppe Curigliano <sup>9,10</sup> , Alfonso Cortés <sup>11</sup>, María Gión <sup>11</sup>, Javier Cortés <sup>5,12,13,14,15,\*</sup>  and José Palacios <sup>3,4,5,6,\*</sup> 

<sup>1</sup> Clinical Research, Ramón y Cajal Hospital, 28034 Madrid, Spain; silviagonzalezmartinezbio@gmail.com

<sup>2</sup> “Contigo Contra el Cáncer de la Mujer” Foundation, 28010 Madrid, Spain

<sup>3</sup> Molecular Pathology of Cancer Group, Ramón y Cajal Health Research Institute (IRYCIS), 28034 Madrid, Spain; david.pizarro@salud.madrid.org (D.P.); bperez@salud.madrid.org (B.P.-M.); tamara880723@hotmail.com (T.C.-C.)

<sup>4</sup> Department of Pathology, Ramón y Cajal University Hospital, 28034 Madrid, Spain

<sup>5</sup> Centre for Biomedical Research in Cancer Networks (CIBERONC), Carlos III Health Institute, 28029 Madrid, Spain; jrperalto@salud.madrid.org

<sup>6</sup> Faculty of Medicine, University of Alcalá, 28801 Madrid, Spain

<sup>7</sup> I+D Institute, 12 de Octubre University Hospital, 28041 Madrid, Spain

<sup>8</sup> Department of Pathology, Medical School, Complutense University, 28040 Madrid, Spain

<sup>9</sup> European Institute of Oncology, Scientific Institute for Research, Hospitalization and Healthcare (IRCCS), 20141 Milan, Italy; giuseppe.curigliano@ieo.it

<sup>10</sup> Department of Oncology and Hematology, University of Milan, 20122 Milan, Italy

<sup>11</sup> Department of Medical Oncology, Ramón y Cajal University Hospital, 28034 Madrid, Spain; acsalgado86@gmail.com (A.C.); mariagion@gmail.com (M.G.)

<sup>12</sup> Department of Medicine, Faculty of Biomedical and Health Sciences, European University of Madrid, 28670 Madrid, Spain

<sup>13</sup> International Breast Cancer Center (IBCC), Quironsalud Group, 08017 Barcelona, Spain

<sup>14</sup> Medica Scientia Innovation Research, 08007 Barcelona, Spain

<sup>15</sup> Medica Scientia Innovation Research, Ridgewood, NJ 07450, USA

\* Correspondence: jacortes@vhio.net (J.C.); jose.palacios@salud.madrid.org (J.P.)



**Citation:** González-Martínez, S.; Pizarro, D.; Pérez-Mies, B.; Caniego-Casas, T.; Rodríguez-Peralto, J.L.; Curigliano, G.; Cortés, A.; Gión, M.; Cortés, J.; Palacios, J. Differences in the Molecular Profile between Primary Breast Carcinomas and Their Cutaneous Metastases. *Cancers* **2022**, *14*, 1151. <https://doi.org/10.3390/cancers14051151>

Academic Editors:  
Athina Giannoudis and  
Damir Vareslija

Received: 4 February 2022

Accepted: 22 February 2022

Published: 23 February 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Simple Summary:** The development of new strategies for the management of cutaneous metastases is a major clinical challenge because of the poor prognosis. To advance in this field, a better understanding of the molecular alterations involved in the metastatic process is needed. In the present study, the clinicopathological characteristics of breast cancer that develop cutaneous metastases were analyzed and the molecular differences between primary breast tumors and their corresponding cutaneous metastases were compared. We observed that the surrogate molecular type of breast cancer with an increased risk to metastasize to the skin was triple negative. In total, 48.5% of the cutaneous metastases presented some additional molecular alteration with respect to the primary tumor. However, no characteristic mutational pattern related to skin metastasis development was observed. Identifying the genes involved in the development of cutaneous metastases is important to gain insights into the biology of the disease and to identify possible diagnostic and therapeutic biomarkers.

**Abstract:** Background: The characterization of molecular alterations of primary breast carcinomas (BC) and their cutaneous metastases (CM) to identify genes involved in the metastatic process have not yet been completely accomplished. Methods: To investigate the molecular alterations of BC and their CM, a total of 66 samples (33 BC and 33 CM) from 33 patients were analyzed by immunohistochemical and massive parallel sequencing analyses. In addition, the clinicopathological characteristics of patients and tumors were analyzed. Results: Triple negative (TN) BCs were overrepresented (36.4%) among tumors that developed CM. A change of tumor surrogate molecular type in metastases was found in 15% of patients and 48.5% of the CM presented some additional molecular alteration with respect to the primary tumor, the most frequent were amplification of *MYC* and *MDM4*, and mutations in *TP53* and *PIK3CA*. Survival was related to histological grade, tumor surrogate molecular type and *TP53* mutations in the univariate analysis but only the tumor surrogate

molecular type remained as a prognostic factor in the multivariate analysis. Conclusions: The TN molecular type has a greater risk of developing skin metastases. There are phenotypic changes and additional molecular alterations in skin metastases compared to the corresponding primary breast tumors in nearly half of the patients. Although these changes do not follow a specific pattern and varied from patient to patient, they could impact on the treatment. More studies with larger patient and sample cohorts are needed.

**Keywords:** breast cancer; metastasis; skin; NGS; mutations; pathology; immunohistochemistry

## 1. Introduction

Breast cancer (BC) is the most prevalent malignancy in females and is the leading cause of cancer death in women [1]. We can distinguish between different groups of BC according to the molecular profile as those that express Estrogen Receptor (ER) and/or Progesterone Receptor (PR) (75%), those that express Epidermal Growth Factor Receptor 2 (Her2) (15%) [2], and tumors that do not express any of these three markers, the triple-negative (TN) tumors (10–20%) [3]. According to these characteristics, we can apply a surrogate molecular classification that distinguishes four surrogate molecular types of BC: luminal A-like, luminal B-like (HER2– and HER2+), HER2+ (non-luminal), and triple negative (TN) [4].

Metastasis accounts for the majority of deaths from BC [5]. It is a complex process in which the cells of a primary tumor are propagated to distal organs, showing uncontrolled growth in these tissues [6,7]. Normally, BC metastasize to the lung, bone, and brain [8]. Moreover, BC is the tumor most prone to develop skin metastases in females [9].

Skin metastases are the result of lymphatic embolization, hematogenous or contiguous spread [10] and are present in around 24% of patients with metastatic BC [9,11–16]. In addition, due to the high incidence of BC, these skin manifestations are the most common metastases among women seen by dermatologists, specifically, 69% of these metastases come from BC [13].

Cutaneous breast metastases tend to develop in the vicinity of the primary tumor in the skin of the breast and chest wall, although they can also develop in the abdomen, extremities, head, or neck [9,12,13]. In addition to being able to develop in different locations, breast cutaneous metastases (CM) can manifest in a wide variety of ways. Nodules are the most common presentation (80%), but there are other patterns [11,13] such as telangiectatic pattern with an incidence of 8–11%, erectile pattern with an incidence of 3–6.3%, carcinoma en cuirasse with an incidence of 3–4% and neoplastic alopecia with an incidence of 2–12% [11,13].

All BC metastases, regardless of subtype, usually occur late in the disease, in the later stages of the disease course. Brownstein et al. [17] observed that skin metastasis was the presenting sign of the disease in only 3% of cases of metastatic BC. Kong et al. [15] observed that 56.8% of the patients had more than one visceral metastasis at the time of diagnosis of CM. Therefore, when diagnosed, the primary tumor is widespread and may not be treatable (palliative care, surgical excision, or complete mastectomy is provided) [18]. All this confers a poor prognosis, with an average survival of 3 to 6 months, with few differences regarding whether the lesions are single or multiple, with mortality exceeding 70% in the first year after diagnosis [19].

Since there are few series evaluating the molecular alterations of CM and most do not include the analysis of both the primary tumor and CM, the objective of this study was to compare the molecular alterations of matched primary BC and their CM in a series of 33 patients to better understand the genes implicated in BC progression and to identify potential therapeutic targets.



## 2. Materials and Methods

**Compliance with Ethical Standards:** All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and national research committee and the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. The use of patient samples to meet the objectives of this study was approved on 14 May 2021 by the Ethics Committee of the Hospital Ramón y Cajal (ethical approval code: 30-21).

### 2.1. Histology

Histological sections of all primary tumors and their metastases were reviewed by two experienced pathologists (J.P and B.P.-M.). Histological typing and grading was performed according to WHO recommendations [4]. Lymphovascular invasion (LIV) was also evaluated in primary tumors. Cutaneous lesions were diagnosed as metastases from BC based on a biopsy, excluding cases with direct extension from a subjacent breast lesion.

### 2.2. Immunohistochemistry

All 33 primary tumors and 33 metastases underwent an immunohistochemical study for the expression of estrogen receptors (ER), progesterone receptors (PR), HER2 and Ki67. Immunostaining was performed using the EnVision detection system (K5007, Agilent Dako, Glostrup, Denmark) using the following antibodies: ER (clone EP1, Agilent Dako Omnis, Glostrup, Denmark), PR (clone PR 1294, Agilent Dako Omnis, Glostrup, Denmark), HER2 (SK001, clone poly, Agilent Dako autostainer, Glostrup, Denmark), and Ki-67 (clone MIB-1, Agilent Dako Omnis, Glostrup, Denmark). Evaluation of ER, PR, and HER2 expression was performed according to American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists (ASCO-CAP) guidelines [20]. HER2 equivocal cases (2+) underwent FISH analysis, using the PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (PathVysion II kit, Abbot Laboratories, Abbot Park, IL) on complete tumor sections. Results were interpreted according to 2018 ASCO-CAP guidelines [20].

In the 7 invasive lobular carcinomas, the expression of E-cadherin (clone NHC-38, Agilent Dako Omnis, Glostrup, Denmark) was studied to confirm the histological type. Androgen receptor (AR) (SP107 Cell Marque, Ventana Medical Systems, Rocklin, CA, USA) was also determined to evaluate the possible apocrine phenotype in 12 primary TN tumors and their metastases.

Tumors were classified into different surrogate molecular types as Luminal HER2-, Luminal HER2+, HER2 (non-luminal), and TN.

### 2.3. Massive Parallel Sequencing

Sufficient DNA for sequencing was obtained from the 33 primary breast carcinomas and their corresponding CMs. Areas with >30% of tumor cells were obtained by “punching” paraffin blocks in selected areas previously marked on hematoxylin/eosin (H&E) slides. The QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) was used to extract DNA from all samples. Quality of DNA samples was measured using TapeStation (Agilent 2200 TapeStation, Santa Clara, CA, USA), whereas quantification was performed by QUBIT 2.0 (Thermo Fisher Scientific Qubit 2.0 Fluorometer, Waltham, MA, USA).

A custom gene panel was designed using the SureDesign platform by Agilent Tech. (Santa Clara, CA, USA) to consistently target 61 genes (*AKT1*, *ARID1A*, *ARID1B*, *ARID5B*, *ATR*, *BCOR*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRAF*, *CASP8*, *CCNE1*, *CDH1*, *CDH4*, *CDH19*, *COL1A1*, *CSMD3*, *CTCF*, *CTNNB1*, *EGFR*, *ERBB2*, *ESR1*, *FBXW7*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FOXA2*, *GRB7*, *GSDMB*, *MAP2K4*, *KRAS*, *MAP3K1*, *MLL3*, *MLH1*, *MKI67*, *MSH2*, *MSH6*, *MYC*, *NCOR1*, *NF1*, *NRAS*, *PGAP3*, *PIK3CA3*, *PIK3R1*, *PMS2*, *PNMT*, *POLE*, *PPP2R1A*, *PRPF18*, *PTEN*, *KMT2B*, *RB1*, *RPL22*, *SF3B1*, *SPOP*, *STARD3*, *TAF1*, *TBX3*, *TCAP*, *TP53*, *VGLL1*, *ZNF217*, *ZNF703*). For library construction, a modified protocol for Agilent SureSelect<sup>XT</sup> FFPE was selected based on Covaris AFA fragmentation of DNA (Covaris, Woburn, MA, USA) and

subsequent probe-mediated hybridization capture. Sequencing of equimolar libraries was performed using the Ion S5™ Torrent (Thermo Fisher Scientific, MA, USA).

Bioinformatics analysis was carried out using a specific pipeline using Novoalign V3 (2021) (<http://www.novocraft.com/products/novoalign/> accessed on 4 February 2022) as aligner and VarScan [21] as variant-caller, with no filters. Variant annotation was performed using the VEP from Ensembl version 88 (<http://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html> accessed on 4 February 2022), which corresponds to the hg38 version of the human reference genome. Variants were latterly filtered using the functional information (taking only deleterious variants), the variant allele frequency (>0.05), and the strand-bias from both the variant and the reference allele. If normal tissue was available, those variants also present in the normal component were excluded. Finally, visual inspection was performed as the final selection criterion using the IGV browser [22].

In addition, 11 mutations were confirmed by Sanger sequencing, 3 in the *PIK3CA* gene (Pt3, Pt14 and pt36), 6 in the *TP53* gene (Pt1, Pt2, Pt4, Pt10 and Pt11), and 2 in the *ERBB2* gene in the samples (pt13). (Supplementary Table S1).

#### 2.4. Fluorescent In-Situ Hybridization on Tissue Microarrays

Since our panel was not designed to detect CNVs, a tissue microarray (TMA) was constructed to evaluate gene copy number variations in *CCND1*, *MYC*, *FGFR1* and *MDM4*, the genes most frequently amplified in BC, by Fluorescent In-Situ Hybridization (FISH). Only 20 matched primary tumors and metastases (40 samples) were included in the TMA due to sample limitation after the initial immunohistochemical/molecular study. Chromosomal alterations were evaluated by FISH on TMA sections using the following probes: SPEC *CCND1/CEN11*, *MYC/CEN8*, *FGFR1/CEN8*, and *MDM4/1p12* dual color Probe Kit (Zytovision GmbH, Bremen, DE). FISH slides were observed with a fluorescence microscope at 100X with immersion oil. A detailed scoring of at least 20 neoplastic cells per sample was performed. Amplification was considered when the tumor cell population had at least twice as many gene signals than centromere signals of the respective chromosome (ratio  $\geq 2$ ), and polysomy when the average of centromere signals on tumor cells were  $>3$ .

#### 2.5. Statistical Methods

The Kaplan–Meier method was used to calculate overall survival according to clinicopathological characteristics (age, pT, pN, histological type, surrogated molecular type, LIV, histological grade, clinical stage, metastasis location, and neoadjuvant therapy) and mutations in *TP53* and *PIK3CA* genes. Cox proportional hazards models were used to investigate the association between mortality and clinicopathological and molecular features.

### 3. Results

#### 3.1. Case Selection

A total of 33 patients diagnosed with BC and CM between 2005 and 2020 from the Pathology Department in Ramón y Cajal University Hospital (Madrid, Spain) and in 12 de Octubre University Hospital (Madrid, Spain) were selected, all had available paired samples (primary tumor and CM).

#### 3.2. Clinicopathological Features

Clinicopathological features of all 33 primary samples are presented in supplementary Table S2 and summarized in Table 1. The median age of the patients at diagnosis was 63.5 years old (range 29 to 84), 57.6% of patients were older than 60 years.

**Table 1.** Clinicopathological features of the 33 patients.

Clinicopathological Features	Categories	n (%)	
Sex	Female	33 (100)	
Age	<60	14 (42.4)	
	>60	19 (57.6)	
Cutaneous metastases location	Local *	15 (46.9)	
	Distance	17 (53.1)	
	NA	1	
Menopausal status at diagnosis	Yes	27 (90)	
	No	3 (10)	
	NA	3	
pT	1	5 (18.5)	
	2	14 (51.9)	
	3	5 (18.5)	
	4	3 (11.1)	
	NA	6 **	
pN	0	8 (30.8)	
	1	10 (38.5)	
	2	2 (7.7)	
	3	6 (23)	
	NA	7 **	
Clinical stage	I	4 (12.5)	
	II	5 (15.6)	
	III	14 (43.7)	
	IV	9 (28.1)	
	NA	1	
Histological Grade	1	1 (3)	
	2	13 (39.4)	
	3	19 (57.6)	
LIV	Yes	11 (33.3)	
	No	22 (66.7)	
Immunohistochemical markers	ER+	19 (57.6)	
	PR+	11 (33.3)	
	HER2+	5 (15.2)	
	Ki67	≤15%	9 (27.3)
		16–29%	5 (15.2)
		≥30%	19 (57.6)
Surrogated molecular type	TN	12 (36.4)	
	Luminal HER2-	16 (48.5)	
	Luminal HER2+	3 (9)	
	HER2+ (non-luminal)	2 (6)	

\* Local lesions refer to lesions that presented on the skin of the breast/thorax. \*\* Patients diagnosed at stage IV did not undergo surgery and did not have pT and pN data.

According to the immunohistochemical profile, 16 cases (48.5%) were Luminal HER2-surrogate molecular type, 3 cases (9%) were Luminal HER2+, 2 cases (6%) were HER2+ (non-Luminal), and 12 cases (36.4%) were TN.

Examining the distribution of histological types, 24 cases (72.7%) corresponded to invasive breast carcinomas of non-special type (BCNST), the rest were special histological types. The largest group of 7 cases (21.2%) corresponded to invasive lobular carcinoma (ILC), one case (3%) was a matrix-producing (chondroid) metaplastic carcinoma, and one case was an apocrine carcinoma (3%).

### 3.3. Immunohistochemistry and HER2 FISH

#### 3.3.1. Surrogate Molecular Types

The surrogate molecular type of the tumors and metastases was confirmed by IHC and FISH. The most frequent type of primary tumor was Luminal HER2- followed by TN. The molecular type changed between the primary tumor and its CM in 5 patients (15%), the most common being from luminal to TN (Table 2).

**Table 2.** Surrogate molecular type change between primary tumors and their cutaneous metastasis.

Tumor	Surrogated Molecular Type
Pt7_Primary	Luminal HER2-
Pt7_Metastasis	TN
Pt18_Primary	Luminal HER2-
Pt18_Metastasis	TN
Pt29_Primary	Luminal HER2-
Pt29_Metastasis	TN
Pt14_Primary	Luminal HER2+
Pt14_Metastasis	Luminal HER2-
Pt32_Primary	Luminal HER2-
Pt32_Metastasis	Luminal HER2+

In case Pt14, HER2 amplification was lost in the metastasis; on the other hand, in case Pt32, HER2 was overexpressed in the metastasis due to polysomy of chromosome 17.

#### 3.3.2. Androgen Receptor in Triple-Negative Cases

AR expression was studied in 12 TN primary tumors and their metastases by IHC, since AR expression in TNBC is related with the apocrine molecular type [23]. In this series, 3 out of 12 TNBC expressed AR and expression was concordant in primary tumors and the associated metastases.

### 3.4. Molecular Characterization

#### 3.4.1. Most Frequently Altered Genes in Primary Tumors and Cutaneous Metastases

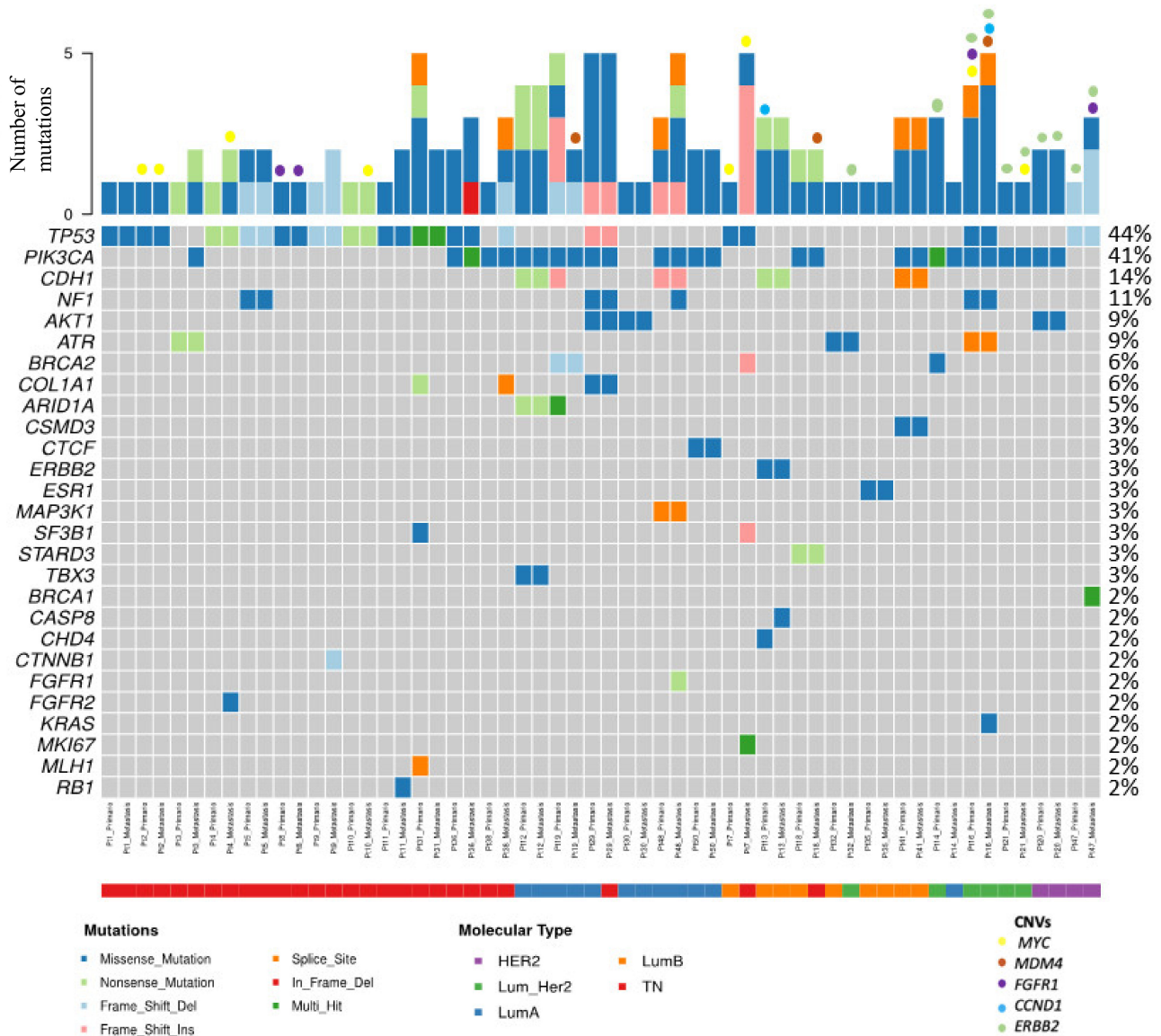
The following molecular analysis is based on 66 samples (33 primary tumor and 33 CM) for mutation analysis and 40 samples (20 primary tumor and 20 CM) for CNV analysis. Figure 1 shows the mutations and CNVs found in 29 pairs. In 4 cases, no mutations or CNVs were found, and all were Luminal HER2- cases. Molecular alterations were detected in 12 TN, 12 Luminal HER2-, 3 Luminal HER2+ and 2 HER2+ (non-Luminal) primary tumors. The number of mutations ranged between 1–5. A summary table with the type of mutation and CNVs found in each of the samples is presented in supplementary Table S3.

Among the 33 matched cases, *TP53* was mutated in 13 primary tumors (39.4%) and in 14 CMs (42.4%). *PIK3CA* was mutated in 13 primary tumors (39.4%) and 15 CMs (45.4%). *NF1* was mutated in 3 of the primary tumors (9%) and 4 CMs (12.1%). *AKT1* was mutated in 3 primary tumors (9%) and 3 CMs (9%). *ERBB2* was amplified or there was polysomy in 5 primary tumors (15.15%) and 5 CM (15.15%). Among 20 matched cases, *MYC* was amplified in 3 primary tumors (15%) and 5 CM (25%). *MDM4* was amplified in only 3 CM (15%). *FGFR1* CNVs (amplification or polysomy) were observed in 2 primary tumors (10%) and 2 CMs (10%). Finally, *CCND1* was amplified in 1 primary tumor (5%) and 1 CM (5%). Table 3 shows a summary of these alterations distributed by surrogate molecular types.

Analyzing *TP53* and *PIK3CA* mutation frequencies in the CMs of BC cases diagnosed at early stages (I-II) versus those diagnosed at advanced stages (III-IV), we observed that they were very similar. The mutation frequency for both genes of cases diagnosed at early stages was 44.4%. In cases diagnosed at advanced stages the frequencies were 47.8% for *TP53* and 52.2% for *PIK3CA*. Thus, there were no statistically significant differences between the two groups.

### Enriched Molecular Alterations in Cutaneous Metastases

Additional molecular alterations were observed in the CM, either mutations or CNVs, in 16 patients (48.5%) (Figure 2). In 7 cases (21.2%) there was more than one additional alteration in the CM. Table 4 shows the distribution of these alterations by surrogate molecular types.



**Figure 1.** Distribution of mutations and CNVs in this series. The figure shows paired samples corresponding to 29 paired patients, but the mutation frequencies were calculated considering the 33 paired cases with 66 samples.

There were some differences in the frequency of additional mutations depending on the local or distant nature of the CM. In the 17 paired cases that developed distant CM, additional alterations in the CM with respect to the primary tumors were found in 11 cases (64.7%) (5 TN, 4 Luminal HER2-, and 2 HER2+). In contrast, among the 15 paired cases that developed local CM, only 5 cases (33.3%) (3 TN, 1 Luminal HER-, and 1 HER2+) showed additional molecular alterations. (Table 4).

In addition, 11 mutations were confirmed in the *TP53*, *PIK3CA*, and *ERBB2* genes. Figure 3 shows the different mutations found in the *ERBB2* gene (L755S and S310F) between the primary tumor and the MC of Pt13, as well as the verification by Sanger.

**Table 3.** Pathogenic alterations in primary tumors and their cutaneous metastasis.

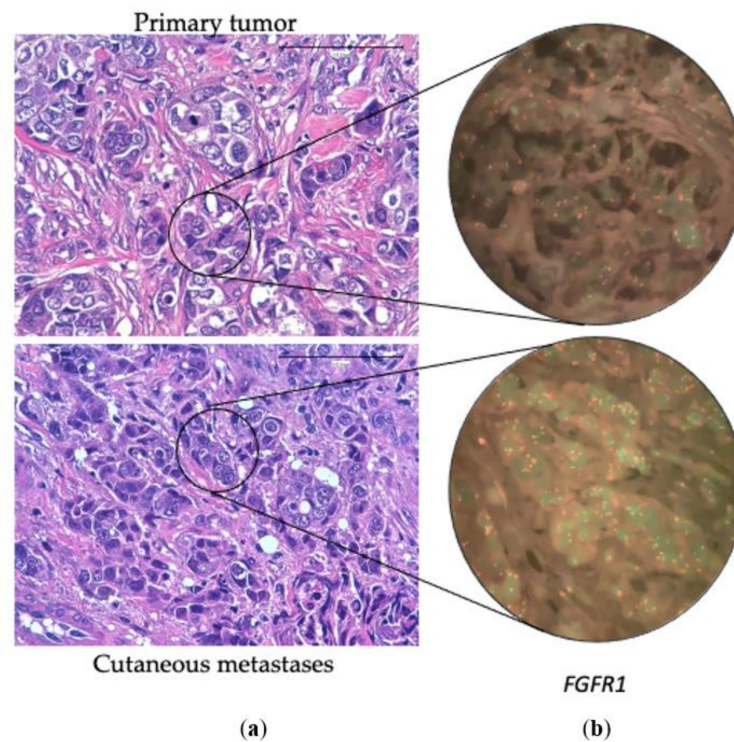
Surrogate Molecular Types		Gene	Primary Tumors <i>n</i> (%)	Cutaneous Metastases <i>n</i> (%)
TN <i>n</i> = 12	Mutations	<i>TP53</i>	10 (83)	11 (92)
		<i>PIK3CA</i>	2 (17)	4 (33)
		<i>NF1</i>	1 (8.3)	1 (8.3)
TN <i>n</i> = 7	CNVs	<i>MYC</i>	1 (14.3)	3 (42.9)
		<i>MDM4</i>	0	1 (14.3)
		<i>FGFR1</i>	1 (14.3)	1 (14.3)
Luminal HER2- <i>n</i> = 16	Mutations	<i>TP53</i>	1 (6)	1 (6)
		<i>PIK3CA</i>	7 (39)	7 (39)
		<i>NF1</i>	1 (6.2)	2 (12.5)
		<i>AKT1</i>	2 (12.5)	2 (12.5)
Luminal HER2- <i>n</i> = 9	CNVs	<i>MYC</i>	1 (11.1)	1 (11.1)
		<i>MDM4</i>	0	1 (11.1)
		<i>CCND1</i>	1 (11.1)	0
HER2+ <i>n</i> = 5	Mutations	<i>TP53</i>	2 (40)	2 (40)
		<i>PIK3CA</i>	4 (80)	4 (80)
		<i>NF1</i>	1 (20)	1 (20)
		<i>AKT1</i>	1 (20)	1 (20)
HER2+ <i>n</i> = 4	CNVs	<i>MYC</i>	1 (25)	1 (25)
		<i>MDM4</i>	0	1 (25)
		<i>FGFR1</i>	1 (25)	1 (25)
		<i>CCND1</i>	0	1 (25)

### 3.5. Survival Analysis

In our series, 7 patients were alive and 26 had died when the data were censored. The median survival since the diagnosis of the disease was 53 months and the median survival since the diagnosis of the CM was 19.6 months. Of the patients who developed distant CM, the median survival was 14.5 months, with an overall survival in the first year of 46.7% of patients. In contrast, when MC was local, the median survival was 34.6 months, with an overall survival in the first year of 40% of patients.

The association between overall survival since the diagnosis of the primary tumor and age, location (local or distant), pT, pN, clinical stage, surrogate molecular type and histological type, histological grade, LIV, and neoadjuvant therapy were assessed. In addition, the association between overall survival and *TP53* and *PIK3CA* mutations was assessed. Histological grade, surrogate molecular type, and *TP53* mutations significantly affect overall survival ( $p = 0.015$ ,  $p = 0.0011$  and  $p = 0.019$ , respectively) (Figure 4a–c). The shortest overall survival was observed in the TN surrogate molecular type (Figure 4a). By multivariate analysis with the 3 significant variables, the only independent variable in the CoxPh analysis was surrogate molecular type, where HER2- Luminal was the best prognostic type. (Figure 4d).

In contrast, the variables pT, pN, stage, permeation, age, histological type location (local or distant), neoadjuvant therapy, or *PIK3CA* mutations did not significantly affect overall survival.



**Figure 2.** (a) Hematoxylin-eosin of a primary breast tumor and its corresponding cutaneous metastasis. (b) Fluorescent In-Situ Hybridization of the *FGFR1* gene in the primary breast tumor (without CNV) and in the cutaneous metastasis (with polysomy). 100 $\times$ .

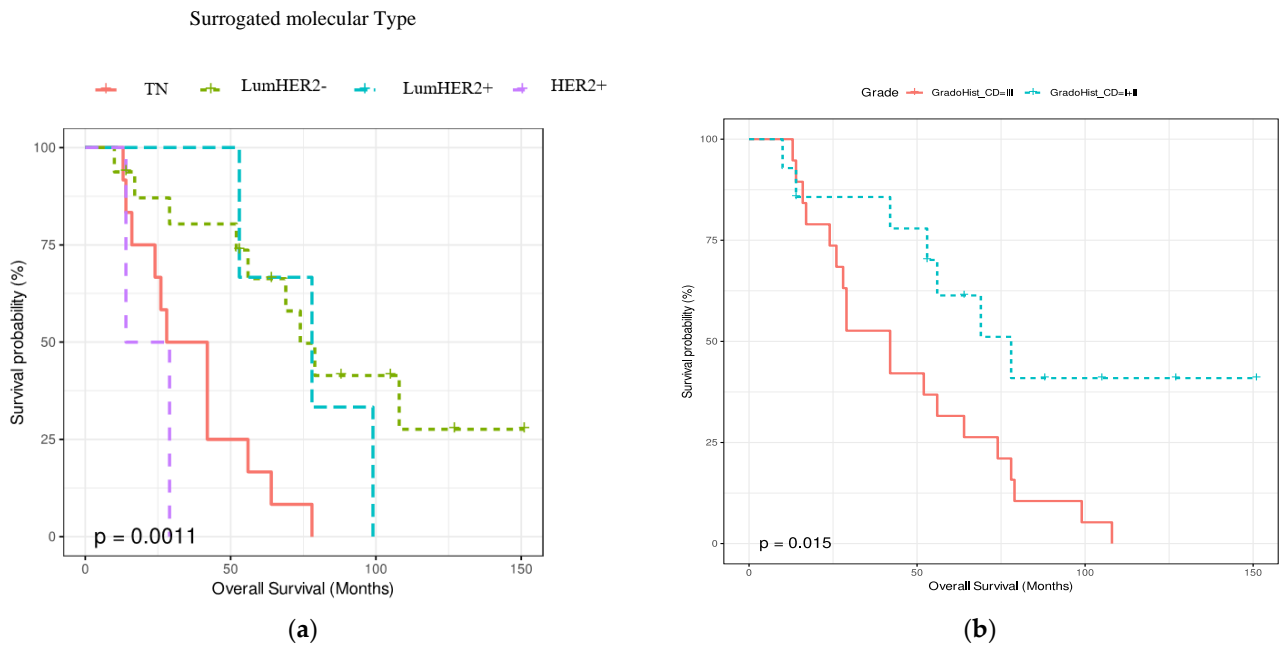
**Table 4.** Additional molecular alteration in cutaneous metastases not found in primary tumors of paired cases.

Location	Surrogated Molecular Type	Gene	Cases with Additional Mutation in Cutaneous Metastasis <i>n</i>
Distant cutaneous metastasis <i>n</i> = 17	TN	<i>PIK3CA</i>	1
		<i>RB1</i>	1
		<i>FGFR2</i> + <i>MYC</i> (amplification)	1
		<i>CTNNB1</i>	1
		<i>MDM4</i> (amplification)	1
	Luminal HER2-	<i>FGFR1</i> + <i>NF1</i>	1
		<i>BRCA2</i> + <i>MKI67</i> + <i>SF3B1</i>	1
		<i>CASP8</i> + <i>ERBB2</i>	1
		<i>MDM4</i> (amplification)	1
	HER2+	<i>KRAS</i> + <i>CCND1</i> (amplification) + <i>MDM4</i> (amplification)	1
<i>BRCA1</i> + <i>FGFR1</i> (polysomy)		1	
Local cutaneous metastasis <i>n</i> = 15	TN	<i>TP53</i> + <i>PIK3CA</i> + <i>COL1A1</i>	1
		<i>PIK3CA</i>	1
		<i>MYC</i> (amplification)	1
	Luminal HER2-	<i>ERBB2</i> (polysomy)	1
	HER2+	<i>MYC</i> (amplification)	1

When not specified as an amplification, the alteration detected was a mutation.

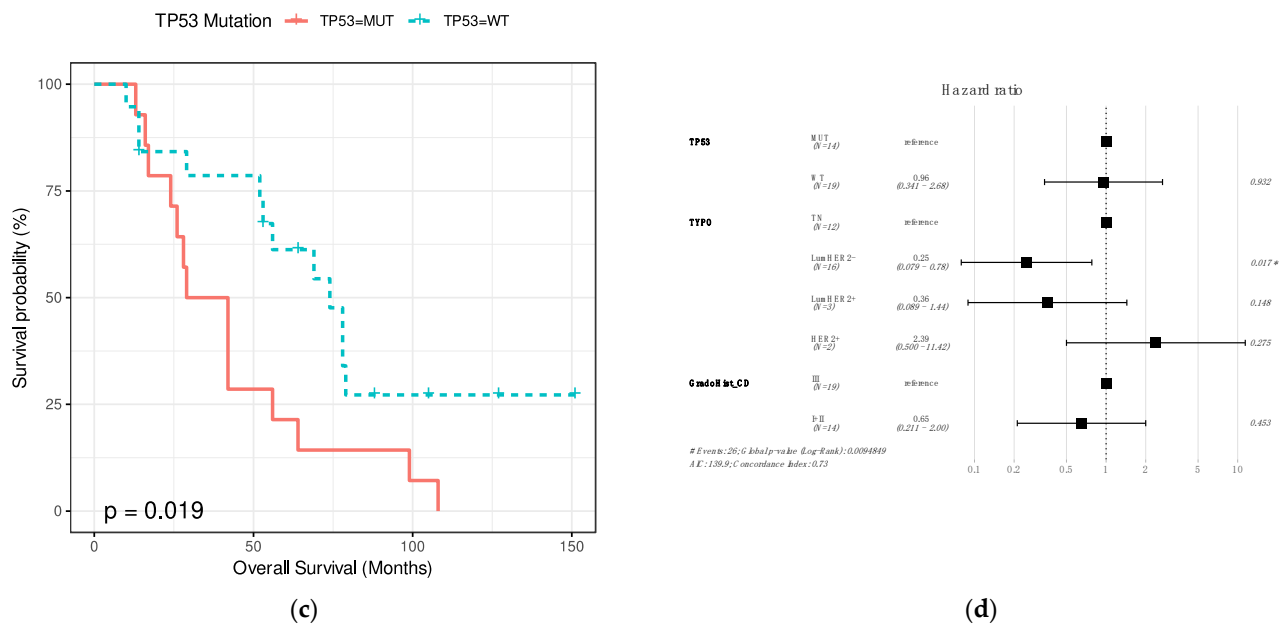


**Figure 3.** (a) Visualization in the IGV software of different *ERBB2* mutations found in the primary tumor and the cutaneous metastasis in patient Pt13. (b) Orthogonal validation by the Sanger sequencing.



**Figure 4.** Cont.





**Figure 4.** Kaplan–Meiers graphs showing the association between overall survival and the surrogate molecular type (a), histological grade (b), and *TP53* status (c). (d) Multivariate analysis showing the independent prognostic significance of the surrogate molecular type.

#### 4. Discussion

##### 4.1. Clinicopathologic Features of Breast Carcinomas That Develop Cutaneous Relapses

In this study, the clinicopathological features were analyzed of 33 females with BC that developed cutaneous metastases, distantly in 53.1% and locally in 46.9% of the patients. Our observation that 46.9% of CM developed locally on the skin of the breast/thorax is in accordance with the review by Johnson et al. [24], who found in a study of 61 patients with CM, 57% showed metastases in the breast/thorax skin.

In the present series, CM developed at a median of 22.8 months after the initial diagnosis of the primary BC. CM usually appear at the end of the disease, late during cancer evolution. Thus, Lookingbill et al. [25] found that only 6.3% of patients with BC had cutaneous involvement at the time of diagnosis of the primary tumor. More recently, Johnson et al. [24] reported that approximately 13.7% of the patients in the 9 retrospective series reviewed [26–34] had a skin lesion before or simultaneously with the diagnosis of BC. Supporting these observations, we found that 18.2% of patient in the present series debuted with skin involvement.

The median age of women with BC who developed CM varies among series. Whereas the age in our series (63.5 years) was similar to the Johnson et al. [24] review of 41 patients, other studies have reported a mean of 74 years ( $n = 18$ ) [9] and 48 years ( $n = 125$ ) [15]. These differences may be related with the different number of patients included in each series or due to ethnic/geographic differences, since these series originated from Italy, South Korea, and Spain.

In the present series, the histology of 24 cases (72.7%) corresponded to BCNST, and the rest to special histologic subtypes. Among them, the largest group corresponded to ILC (21.2%). However, considering only the 16 Luminal HER2- cases in our series, 43.7% were ILC. Since the frequency of ILC in Luminal HER2- BC is between 15% and 20% [35], our results suggested that ILC is a major risk factor for developing skin metastases. In accordance with our results, the study of Li et al. [36] that included only metastases from Luminal HER2- BC, reported that the proportion of ILC was 26% in the group of patients that developed CM.

We observed that the frequency of BC developing CM varied according to the subtype. Table 5 compares the data from our series with those from other published series [15,37–39],

including our recently published CM review that includes samples ( $n = 58$ ) of molecularly characterized CM [39–43].

**Table 5.** Distribution of surrogated molecular types in breast cancer with cutaneous metastasis in different series.

Authors	<i>n</i>	Luminal HER2– <i>n</i> (%)	HER2+ <i>n</i> (%)	TN <i>n</i> (%)	Unknown <i>n</i> (%)
Yates y col. [39]	19	9 (47)	2 (10)	5 (26)	3 (16)
Kong y col. [15]	125	53 (42.4)	43 (34)	29 (23)	
Luna y col. [38]	26	7 (27)	7 (27)	10 (39)	2 (7)
González-Martínez y col. [37]	58	29 (50)	8 (14)	15 (26)	6 (10)
Present series	33	16 (48.5)	5 (15.2)	12 (36.4)	

Although there were differences between series, a finding common to all of them is the relative overrepresentation of TNBC, since its frequency in the general population of BC is around 15% [44], but it was between 23–39% in BC with CM, suggesting that this surrogate molecular type could be associated with a greater potential to metastasize to the skin.

In our series, 15.2% of BC that developed CM were HER2+, a frequency similar to the general population of BC, at least in Spain, suggesting that this surrogate molecular type does not have a special propensity to develop CM. However, Table 5 shows important differences in the frequency of HER2+ BC that develop CM among different series. These differences are probably due to differences in sample size, patient selection, methods of HER2 detection and the period of study.

#### 4.2. Molecular Alterations Involved in the Development of Cutaneous Metastasis in Breast Cancer

In this series, we studied the mutational landscape of 33 matched primary tumors with their corresponding CM by NGS. In addition, changes in copy number of *CCND1*, *FGFR1*, *MDM4* and *MYC* were analyzed by FISH in 20 paired samples. The molecular landscape of primary tumors in this series was concordant with many previous reports demonstrating different mutational patterns among different surrogate molecular types. Thus, whereas mutations in *PIK3CA* predominated among Luminal BC, *TP53* mutation was the main molecular alteration in TNBC.

When primary tumors were compared with their respective metastasis, we found that 48.5% of CM exhibited additional pathogenic mutations and/or gene amplification in important oncogenes and/or tumor suppressor genes. Genes involved in the progression of more than one case in the present series included *MYC*, *MDM4*, *PIK3CA* and *ERBB2*. In spite of this high frequency of additional changes, we did not observe a specific mutational pattern related to tumor progression, indicating that CM is a very individual process in each tumor. These results add to the observations of three previous series analyzing paired primary BCs and their CMs including a total of only 15 patients [39] (Table 6).

There are several studies analyzing molecular alterations in metastatic BC including samples from CM, but without comparison with their primary tumors (see González-Martínez et al. [37]). In general, these studies also confirmed that there is no specific pattern of mutations that predispose to CM. Only Rinaldi et al. [39] observed that alterations in *NOTCH1* were overrepresented in CM when compared to other metastatic locations.

We observed that the number of CM with additional molecular alterations was higher in distant than local metastases. Thus, additional mutations and CNVs were observed in 11 out of 17 (64.7%) distant CM but in only 5 out 15 (33.3%) local CM. These differences seemed to indicate a more advanced molecular stage of distant CM, although they did not have prognostic implications.

**Table 6.** Additional mutations in cutaneous metastases reported in different series.

Authors	Paired Cases of Cutaneous Metastases <i>n</i>	Cases with Additional Mutation	Additional Molecular Alterations in Cutaneous Metastases
Schrijver and col. [41]	8 *	6	33 mutations ( <i>ATR, BRCA1, SMAD4, CDH1, ARID1A, ERBB2, IDH1, PIK3R1, RB1</i> , etc.) and <i>FGF3</i> amplification
Yates and col. [39]	Cohort 1: 2	2	4 molecular alterations ( <i>FGFR1</i> amplification/ <i>TP53</i> structural variant, <i>RB1</i> indel/ <i>TERC</i> amplification)
	Cohort 2: 4	4	8 mutations ( <i>JAK2, NF1, TP53, AKT1, ARID1A, ARID1A, RB1</i> ) and 2 amplifications ( <i>MYC</i> and <i>FGFR1</i> )
Paul and col. [42]	1	1	54 mutations ( <i>PIK3CA, TP53</i> , etc.)
Present series	33	17	12 TN 6 mutations ( <i>TP53 + PIK3CA + COL1A1, PIK3CA, RB1, FGFR2, CTNNB1</i> ) and 3 amplifications (2 in <i>MYC</i> and one in <i>MDM4</i> )
			16 RH + HER2- 7 mutations ( <i>FGFR1 + NF1, BRCA2 + MKI67 + SF3B1, CASP8 + ERBB2</i> ) and 2 amplifications or polysomy ( <i>ERBB2</i> and <i>MDM4</i> )
		5 HER2+ 2 mutations ( <i>KRAS, BRCA1</i> ), 4 amplifications or polysomy ( <i>CCND1, MYC, FGFR1</i> and <i>MDM4</i> )	

\* Of these 8 cases, 2 had no additional molecular alterations in cutaneous metastasis.

It is also worth noting that there was hardly any difference between the mutation frequency of *TP53* and *PIK3CA* in CM samples of patients diagnosed at early and advanced stages, so we assume that treatment has no effect on the mutation pattern.

#### 4.3. Therapeutic Implications

An important question in the study of cancer metastasis is whether or not the molecular characteristics of metastatic samples modify patient treatment. In 5 patients in this study (15.1%), there was a conversion of the surrogate molecular type between the primary tumor and its CM. In 3 cases (9%), there was a change from luminal to TN, from Luminal HER2+ to Luminal HER2- in one case (3%), and from Luminal HER2- to Luminal HER2+ in another case (3%). All these changes would have impacted on the treatment decision regarding the use of hormone therapy or anti-HER2 therapy.

Regarding specific mutations, three CM developed additional *PIK3CA* mutations, which is a target for treatment with alpelisib in RH+ metastatic BC. However, the three primary and metastases were TN. We detected an *ESR1* mutation in a primary HR+ tumor and the corresponding CM. *ESR1* mutations are the most frequent additional mutations that develop in metastatic HR+ BC after hormone therapy, especially after the use of aromatase inhibitors, being infrequent in primary tumors. In this case, *ESR1* mutations would have influenced the response to hormone therapy during the complete evolution of the disease.

An interesting case in this series was the tumor and the CM developed in patient Pt13, which was an ILC that carried the pathogenic L755S mutation in the primary tumor. This mutation was absent in the CM, which carried the pathogenic mutation S310F. *ERBB2* mutations are more frequent in ILC (6%) than in IDC (1.5%), especially in ILC with pleomorphic features, and are associated with a poor prognosis in ILC [45,46]. In addition, response to different anti-HER2 therapies differed among mutations. Thus, whereas L755S seems to be resistant to trastuzumab and lapatinib but sensitive to neratinib and afatinib, S310F seems to be sensitive to all drugs.

#### 4.4. Prognosis

Patients with CM have a very poor prognosis. Lookingbill et al. [47] observed an average survival of 31 months after the diagnosis of the CM. Kong et al. [15] observed a median survival of 32 months. In our series, the median survival was 19.6 months, and this difference may be related to the clinical differences between the series. Additionally, patients who developed distant CM had a shorter overall survival and died more frequently during the first year after the diagnosis of CM. However, these differences between survival according to location were not statistically significant. In the univariate survival analysis, the only three variables that showed an impact on prognosis were the histological grade, the surrogate molecular type, and *TP53* mutations. However, in the multivariate analysis, only the surrogate molecular type remained statistically significant, and the Luminal HER2-surrogate molecular type had a better prognosis.

#### 4.5. Study Limitations

One limitation of this study is the relatively low number of cases studied. However, in spite of this and to the best of our knowledge, this is the largest series analyzing matched primary tumors and CMs reported so far. In addition, a comprehensive NGS panel of 61 genes was used in this study, including the most frequently mutated genes in BC. However, there may be additional genes with a role in progression in individual tumors that were not included in the panel. Moreover, the panel was not designed to detect CNVs or gene rearrangements, although this limitation was resolved in part by analyzing the genes most frequently amplified in BC by FISH.

Further research in this field would require studies with a larger number of patients and samples and perhaps focused on patients with BC of the TN surrogated molecular type, as this seems to be not only the most likely to metastasize to the skin but also has the poorest prognosis.

### 5. Conclusions

The development of new strategies for the management of CMs is a major clinical challenge because of the poor prognosis. To advance in this field, a better understanding of the molecular alterations involved in the metastatic process is needed. In the present study, the clinicopathological characteristics of BCs developing CM was analyzed and compared to the molecular differences between primary breast tumors and their corresponding CMs. We observed that the surrogate molecular type of BC with a greater risk to metastasize to skin was TN. A change of tumor surrogate molecular type in metastases with an impact on treatment was found in 15% of patients. In addition, half of the CM presented some additional molecular alterations with respect to the primary tumors, but a characteristic molecular pattern related to tumor progression and CM development was not observed. In this series, survival was related to the tumor surrogate molecular type. The immunohistochemical and molecular analysis of BC CM is essential for a proper treatment of the patients.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers14051151/s1>, Table S1: Mutations and primers used for Sanger verifications. Table S2: Clinicopathological features of the 33 patients; Table S3: List of somatic mutations found in the breast cancer and cutaneous metastases subjected to NGS analysis.

**Author Contributions:** Conceptualization, S.G.-M., J.C. and J.P.; methodology, S.G.-M., D.P., T.C.-C. and B.P.-M.; validation, S.G.-M., B.P.-M. and J.P.; formal analysis, S.G.-M. and D.P.; investigation, S.G.-M., resources, J.C., J.L.R.-P. and J.P.; data curation, S.G.-M.; writing—original draft preparation, S.G.-M.; writing—review and editing, J.C., J.P., S.G.-M., D.P., B.P.-M., T.C.-C., J.L.R.-P., G.C., M.G. and A.C.; visualization, S.G.-M., J.C. and J.P.; supervision, J.C. and J.P.; funding acquisition, J.C. and J.P.; project administration, J.C. and J.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was funded by grants from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (PI19/01331) and CIBERONC (CB16/12/00316 and CB16/12/00449), co-financed by the European Development Regional Fund ‘A way to achieve Europe’ (FEDER), and by the Spanish Association Against Cancer Scientific Foundation (Grupos Coordinados Traslacionales aecc 2018).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Hospital Ramón y Cajal (Madrid, Spain) (protocol code 30-21 19/05/2021).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** “Contigo contra el Cáncer de la Mujer” Foundation.

**Conflicts of Interest:** J.C.: Consulting/Advisor: Roche, Celgene, Cellectia, AstraZeneca, Biothera Pharmaceutical, Merus, Seattle Genetics, Daiichi Sankyo, Erytech, Athenex, Polyphor, Lilly, Servier, Merck Sharp&Dohme, GSK, Leuko, Bioasis, Clovis Oncology, Boehringer Ingelheim, Kyowa Kirin. Honoraria: Roche, Novartis, Celgene, Eisai, Pfizer, Samsung Bioepis, Lilly, Merck Sharp&Dohme, Daiichi Sankyo. Research funding to the Institution: Roche, Ariad pharmaceuticals, AstraZeneca, Baxalta GMBH/Servier Affaires, Bayer healthcare, Eisai, F.Hoffman-La Roche, Guardanth health, Merck Sharp&Dohme, Pfizer, Piquor Therapeutics, Puma C, Queen Mary University of London. Stock, patents, and intellectual property: MedSIR. Travel, accommodation, expenses: Roche, Novartis, Eisai, Pfizer, Daiichi Sankyo. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References






1. Torre, L.A.; Islami, F.; Siegel, R.L.; Ward, E.M.; Jemal, A. Global Cancer in Women: Burden and Trends. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2017**, *26*, 444–457. [[CrossRef](#)]
2. Tsang, J.Y.S.; Tse, G.M. Molecular Classification of Breast Cancer. *Adv. Anat. Pathol.* **2020**, *27*, 27–35. [[CrossRef](#)]
3. Yam, C.; Mani, S.A.; Moulder, S.L. Targeting the Molecular Subtypes of Triple Negative Breast Cancer: Understanding the Diversity to Progress the Field. *Oncologist* **2017**, *22*, 1086–1093. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. World Health Organization Classification of Tumours Editorial Board; International Agency for Research on Cancer; World Health Organization. *WHO Classification of Tumours. Breast Tumours*; International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 2019; ISBN 978-92-832-4500-1.
5. Scully, O.J.; Bay, B.-H.; Yip, G.; Yu, Y. Breast cancer metastasis. *Cancer Genom. Proteom.* **2012**, *9*, 311–320.
6. Chiang, A.C.; Massagué, J. Molecular Basis of Metastasis. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *359*, 2814–2823. [[CrossRef](#)]
7. Liotta, L.A. Cancer invasion and metastases. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **1990**, *263*, 1123–1126. [[CrossRef](#)]
8. Arozullah, A.M.; Calhoun, E.A.; Wolf, M.; Finley, D.K.; Fitzner, K.A.; Heckinger, E.A.; Gorby, N.S.; Schumock, G.T.; Bennett, C.L. The financial burden of cancer: Estimates from a study of insured women with breast cancer. *J. Support. Oncol.* **2004**, *2*, 271–278. [[PubMed](#)]
9. Guanziroli, E.; Coggi, A.; Venegoni, L.; Fanoni, D.; Ercoli, G.; Boggio, F.; Veraldi, S.; Berti, E.; Gianotti, R.; Ferrero, S.; et al. Cutaneous metastases of internal malignancies: An experience from a single institution. *Eur. J. Dermatol.* **2017**, *27*, 609–614. [[CrossRef](#)]
10. de Bittencourt, M.J.S.; Carvalho, A.H.; do Nascimento, B.A.M.; Freitas, L.K.M.; de Parijós, A.M. Cutaneous metastasis of a breast cancer diagnosed 13 years before. *An. Bras. Dermatol.* **2015**, *90*, 134–137. [[CrossRef](#)]
11. De Giorgi, V.; Grazzini, M.; Alfaioli, B.; Savarese, I.; Corciova, S.A.; Guerriero, G.; Lotti, T. Cutaneous manifestations of breast carcinoma: A clinical guide. *Dermatol. Ther.* **2010**, *23*, 581–589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

12. Alcaraz, I.; Cerroni, L.; Rütten, A.; Kutzner, H.; Requena, L. Cutaneous Metastases From Internal Malignancies: A Clinicopathologic and Immunohistochemical Review. *Am. J. Dermatopathol.* **2012**, *34*, 347–393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Tan, A.R. Cutaneous manifestations of breast cancer. *Semin. Oncol.* **2016**, *43*, 331–334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Hu, S.C.-S.; Chen, G.-S.; Wu, C.-S.; Chai, C.-Y.; Chen, W.-T.; Lan, C.-C.E. Rates of cutaneous metastases from different internal malignancies: Experience from a Taiwanese medical center. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2009**, *60*, 379–387. [[CrossRef](#)]
15. Kong, J.H.; Park, Y.H.; Kim, J.A.; Kim, J.H.; Yun, J.; Sun, J.M.; Won, Y.W.; Lee, S.; Kim, S.T.; Cho, E.Y.; et al. Patterns of Skin and Soft Tissue Metastases from Breast Cancer according to Subtypes: Relationship between EGFR Overexpression and Skin Manifestations. *Oncology* **2011**, *81*, 55–62. [[CrossRef](#)]
16. Krathen, R.A.; Orenco, I.F.; Rosen, T. Cutaneous Metastasis: A Meta-Analysis of Data. *South Med. J.* **2003**, *96*, 164–167. [[CrossRef](#)]
17. Brownstein, M.H.; Helwig, E.B. Metastatic tumors of the skin. *Cancer* **1972**, *29*, 1298–1307. [[CrossRef](#)]
18. Moore, S. Cutaneous Metastatic Breast Cancer. *Clin. J. Oncol. Nurs.* **2002**, *6*, 255–260. [[CrossRef](#)]
19. Marcoval, J.; Gallego, M.I.; Moreno, A. Inflammatory Cutaneous Metastasis as a First Sign of Recurrence of Squamous Cell Carcinoma of the Lung. *Actas Dermo-Sifiliográficas Engl. Ed.* **2008**, *99*, 157–159. [[CrossRef](#)]
20. Lin, L.; Sirohi, D.; Coleman, J.F.; Gulbahce, H.E. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists 2018 Focused Update of Breast Cancer HER2 FISH Testing Guidelines Results From a National Reference Laboratory. *Am. J. Clin. Pathol.* **2019**, *152*, 479–485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Koboldt, D.C.; Zhang, Q.; Larson, D.E.; Shen, D.; McLellan, M.D.; Lin, L.; Miller, C.A.; Mardis, E.R.; Ding, L.; Wilson, R.K. VarScan 2: Somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res.* **2012**, *22*, 568–576. [[CrossRef](#)]
22. Robinson, J.T.; Thorvaldsdóttir, H.; Winckler, W.; Guttman, M.; Lander, E.S.; Getz, G.; Mesirov, J.P. Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 24–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Turner, N.C.; Reis-Filho, J.S. Tackling the Diversity of Triple-Negative Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 6380–6388. [[CrossRef](#)]
24. Johnson, C. Cutaneous Manifestation as Initial Presentation of Metastatic Breast Cancer: A Systematic Review. *Cutis* **2021**, *107*, E29–E36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Lookingbill, D.P.; Spangler, N.; Sexton, F.M. Skin involvement as the presenting sign of internal carcinoma. A retrospective study of 7316 cancer patients. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1990**, *22*, 19–26. [[CrossRef](#)]
26. Atış, G.; Tükenmez Demirci, G.; Kıvanç Atunay, İ.; Sakız, D. Derinin metastatik tümörlerinin primer deri tümörleri arasındaki sıklığı ve klinik özellikleri. *Turkderm* **2013**, *47*, 166–169. [[CrossRef](#)]
27. Bansal, R.; Patel, T.; Sarin, J.; Parikh, B.; Ohri, A.; Trivedi, P. Cutaneous and subcutaneous metastases from internal malignancies: An analysis of cases diagnosed by fine needle aspiration. *Diagn. Cytopathol.* **2011**, *39*, 882–887. [[CrossRef](#)]
28. Benmously, R.; Souissi, A.; Badri, T.; Ben Jannet, S.; Marrak, H.; Mokhtar, I.; Fenniche, S. Cutaneous metastases from internal cancers. *Acta Dermatovenerol. Alp. Pannonica Adriat.* **2008**, *17*, 167–170. [[PubMed](#)]
29. Chopra, R.; Chhabra, S.; Samra, S.G.; Thami, G.P.; Punia, R.P.S.; Mohan, H. Cutaneous metastases of internal malignancies: A clinicopathologic study. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* **2010**, *76*, 125–131. [[CrossRef](#)]
30. El Khoury, J.; Khalifeh, I.; Kibbi, A.-G.; Abbas, O. Cutaneous metastasis: Clinicopathological study of 72 patients from a tertiary care center in Lebanon. *Int. J. Dermatol.* **2014**, *53*, 147–158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Fernandez-Flores, A. Cutaneous metastases: A study of 78 biopsies from 69 patients. *Am. J. Dermatopathol.* **2010**, *32*, 222–239. [[CrossRef](#)]
32. Gómez Sánchez, M.E.; Martínez Martínez, M.L.; Martín De Hijas, M.C.; López Villaescusa, M.T.; Faura Berruga, C.; Rodríguez Vázquez, M.; Pérez García, L.J. Metástasis cutáneas de tumores sólidos. Estudio descriptivo retrospectivo. *Piel* **2014**, *29*, 207–212. [[CrossRef](#)]
33. Handa, U.; Kundu, R.; Dimri, K. Cutaneous Metastasis: A Study of 138 Cases Diagnosed by Fine-Needle Aspiration Cytology. *Acta Cytol.* **2017**, *61*, 47–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Itin, P.; Tomaschett, S. Hautmetastasen bei viszeralem Malignomen: Eine epidemiologische Studie. *Internist* **2009**, *50*, 179–186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Razavi, P.; Chang, M.T.; Xu, G.; Bandlamudi, C.; Ross, D.S.; Vasan, N.; Cai, Y.; Bielski, C.M.; Donoghue, M.T.A.; Jonsson, P.; et al. The Genomic Landscape of Endocrine-Resistant Advanced Breast Cancers. *Cancer Cell* **2018**, *34*, 427–438.e6. [[CrossRef](#)]
36. Li, Q.; Jiang, B.; Guo, J.; Shao, H.; Del Priore, I.S.; Chang, Q.; Kudo, R.; Li, Z.; Razavi, P.; Liu, B.; et al. INK4 tumor suppressor proteins mediate resistance to CDK4/6 kinase inhibitors. *Cancer Discov.* **2021**, *12*, 356–371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. González-Martínez, S.; Pizarro, D.; Pérez-Mies, B.; Caniego-Casas, T.; Curigliano, G.; Cortés, J.; Palacios, J. Clinical, Pathological, and Molecular Features of Breast Carcinoma Cutaneous Metastasis. *Cancers* **2021**, *13*, 5416. [[CrossRef](#)]
38. Luna, A.; Rabassa, M.E.; Isla Larrain, M.; Cabaleiro, P.; Zwenger, A.; Canzoneri, R.; Segal-Eiras, A.; Abba, M.C.; Croce, M.V. Breast cancer cutaneous metastases are associated to uMUC1 and sialyl Lewis x and to highly malignant primary tumors. *Pathol.-Res. Pract.* **2020**, *216*, 152859. [[CrossRef](#)]
39. Yates, L.R.; Knappskog, S.; Wedge, D.; Farmery, J.H.R.; Gonzalez, S.; Martincorena, I.; Alexandrov, L.B.; Van Loo, P.; Haugland, H.K.; Lilleng, P.K.; et al. Genomic Evolution of Breast Cancer Metastasis and Relapse. *Cancer Cell* **2017**, *32*, 169–184.e7. [[CrossRef](#)]
40. Lefebvre, C.; Bachelot, T.; Filleron, T.; Pedrero, M.; Campone, M.; Soria, J.-C.; Massard, C.; Lévy, C.; Arnedos, M.; Lacroix-Triki, M.; et al. Mutational Profile of Metastatic Breast Cancers: A Retrospective Analysis. *PLoS Med.* **2016**, *13*, e1002201. [[CrossRef](#)]

41. Schrijver, W.A.; Selenica, P.; Lee, J.Y.; Ng, C.K.Y.; Burke, K.; Piscuoglio, S.; Berman, S.H.; Reis-Filho, J.S.; Weigelt, B.; Van Diest, P.J.; et al. Mutation profiling of key cancer genes in primary breast cancers and their distant metastases. *Cancer Res.* **2018**, *78*, 3112–3121. [[CrossRef](#)]
42. Paul, M.R.; Pant, D.K.; Shih, N.N.C.; Chen, Y.; Harvey, K.L.; Solomon, A.; Lieberman, D.; Morrissette, J.J.D.; Soucier-Ernst, D.; Goodman, N.G.; et al. Genomic landscape of metastatic breast cancer identifies preferentially dysregulated pathways and targets. *J. Clin. Investig.* **2020**, *130*, 4252–4265. [[CrossRef](#)]
43. Muller, K.E.; Marotti, J.D.; de Abreu, F.B.; Peterson, J.D.; Miller, T.W.; Chamberlin, M.D.; Tsongalis, G.J.; Tafe, L.J. Targeted next-generation sequencing detects a high frequency of potentially actionable mutations in metastatic breast cancers. *Exp. Mol. Pathol.* **2016**, *100*, 421–425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Morris, G.J.; Naidu, S.; Topham, A.K.; Guiles, F.; Xu, Y.; McCue, P.; Schwartz, G.F.; Park, P.K.; Rosenberg, A.L.; Brill, K.; et al. Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients: A single-institution compilation compared with the National Cancer Institute’s Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Cancer* **2007**, *110*, 876–884. [[CrossRef](#)]
45. Kurozumi, S.; Alsaleem, M.; Monteiro, C.J.; Bhardwaj, K.; Joosten, S.E.P.; Fujii, T.; Shirabe, K.; Green, A.R.; Ellis, I.O.; Rakha, E.A.; et al. Targetable ERBB2 mutation status is an independent marker of adverse prognosis in estrogen receptor positive, ERBB2 non-amplified primary lobular breast carcinoma: A retrospective in silico analysis of public datasets. *Breast Cancer Res.* **2020**, *22*, 85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Rosa-Rosa, J.; Caniego-Casas, T.; Leskela, S.; Cristobal, E.; González-Martínez, S.; Moreno-Moreno, E.; López-Miranda, E.; Holgado, E.; Pérez-Mies, B.; Garrido, P.; et al. High Frequency of ERBB2 Activating Mutations in Invasive Lobular Breast Carcinoma with Pleomorphic Features. *Cancers* **2019**, *11*, 74. [[CrossRef](#)]
47. Lookingbill, D.P.; Spangler, N.; Helm, K.F. Cutaneous metastases in patients with metastatic carcinoma: A retrospective study of 4020 patients. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1993**, *29*, 228–236. [[CrossRef](#)]

Review

# Clinical, Pathological, and Molecular Features of Breast Carcinoma Cutaneous Metastasis

Silvia González-Martínez <sup>1,2,†</sup> , David Pizarro <sup>3,†</sup> , Belén Pérez-Mies <sup>3,4,5,6</sup>, Tamara Caniego-Casas <sup>3</sup>, Giuseppe Curigliano <sup>7,8</sup> , Javier Cortés <sup>5,9,10,11,12,13,\*</sup>  and José Palacios <sup>3,4,5,6,\*</sup> 

- <sup>1</sup> Clinical Researcher, Hospital Ramón y Cajal, 28034 Madrid, Spain; silviagonzalezmartinezbio@gmail.com
  - <sup>2</sup> Fundación Contigo contra el Cáncer de la Mujer, 28010 Madrid, Spain
  - <sup>3</sup> Department of Pathology, Hospital Ramón y Cajal, 28034 Madrid, Spain; david.pizarro@salud.madrid.org (D.P.); bperez@salud.madrid.org (B.P.-M.); tamara880723@hotmail.com (T.C.-C.)
  - <sup>4</sup> Institute Ramón y Cajal for Health Research (IRYCIS), 28034 Madrid, Spain
  - <sup>5</sup> CIBER-ONC, Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain
  - <sup>6</sup> Faculty of Medicine, University of Alcalá de Henares, Alcalá de Henares, 28801 Madrid, Spain
  - <sup>7</sup> European Institute of Oncology, IRCCS, 20141 Milan, Italy; giuseppe.curigliano@ieo.it
  - <sup>8</sup> Department of Oncology and Hematology, University of Milan, 20122 Milan, Italy
  - <sup>9</sup> Department of Medicine, Faculty of Biomedical and Health Sciences, Universidad Europea de Madrid, 28670 Madrid, Spain
  - <sup>10</sup> International Breast Cancer Center (IBCC), Quironsalud Group, 08017 Barcelona, Spain
  - <sup>11</sup> Medica Scientia Innovation Research, 08007 Barcelona, Spain
  - <sup>12</sup> Medica Scientia Innovation Research, Ridgewood, NJ 07450, USA
  - <sup>13</sup> Vall d'Hebron Institute of Oncology, 08035 Barcelona, Spain
- \* Correspondence: jacortes@vhio.net (J.C.); jose.palacios@salud.madrid.org (J.P.)  
† Contributed equally to this work.



**Citation:** González-Martínez, S.; Pizarro, D.; Pérez-Mies, B.; Caniego-Casas, T.; Curigliano, G.; Cortés, J.; Palacios, J. Clinical, Pathological, and Molecular Features of Breast Carcinoma Cutaneous Metastasis. *Cancers* **2021**, *13*, 5416. <https://doi.org/10.3390/cancers13215416>

Academic Editor: David Wong

Received: 27 September 2021

Accepted: 26 October 2021

Published: 28 October 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Simple Summary:** Metastasis is the last stage in the development of cancer and usually results in mortality. Cutaneous metastases (CMs) account for 2% of all skin malignancies. Nearly 70% of CMs in women originate from breast cancer (BC). Since CM is usually associated with poor prognosis, the development of management strategies for these patients remains an important clinical challenge. Identifying molecular markers in primary BC that predict CMs and determining the molecular differences between primary tumors and their metastases is of great interest for designing new therapeutic approaches.

**Abstract:** Cutaneous metastases (CMs) account for 2% of all skin malignancies, and nearly 70% of CMs in women originate from breast cancer (BC). CMs are usually associated with poor prognosis, are difficult to treat, and can pose diagnostic problems, such as in histopathological diagnosis when occurring long after development of the primary tumor. In addition, the molecular differences between the primary tumors and their CMs, and between CMs and metastases in other organs, are not well defined. Here, we review the main clinical, pathological, and molecular characteristics of breast cancer CMs. Identifying molecular markers in primary BC that predict CM and can be used to determine the molecular differences between primary tumors and their metastases is of great interest for the design of new therapeutic approaches.

**Keywords:** breast cancer; metastasis; skin; pathology; immunohistochemistry; mutation; CNV

## 1. Introduction

Breast cancer (BC) is the most prevalent neoplastic disease among women worldwide. In women, it represents around 30% of all new cancer cases and is the leading cause of cancer death [1,2].

Metastatic disease is the last stage in the development of cancer, and the outcome is usually fatal. It is a complex process in which the cells of a primary tumor propagate



to distal organs by invading local tissues and blood and/or lymphatic vessels, followed by uncontrolled growth in these distal tissues [3,4]. BC cells predominantly metastasize to the lungs, bones, and brain [5], although the metastatic pattern varies among different subtypes. ER-positive tumors usually have less invasive and metastatic potential and tend to metastasize to the bone [6–8]. The incidence of brain metastases in HER2-positive BCs is high [9,10], and nearly 50% of patients with advanced disease die from central nervous system progression [11]. TNBCs frequently metastasize to visceral organs; they show a high tropism for the lungs but also a high rate of metastasis to the central nervous system [12].

Cutaneous metastases (CMs) account for only 2% of all skin cancers [13,14]. In women, BC is the tumor most likely to metastasize to the skin [13,15–17]. Notably, 69% of the CMs in women observed by dermatologists originate from BC [17]. These CMs result from lymphatic embolization and hematogenous or contiguous dissemination [18] and are present in around 24% of patients with metastatic BC [13–17]. They can appear locally (86%) or distantly (14%). Since CM is usually associated with poor prognosis [19], the development of management strategies for these patients remains an important clinical challenge. Identifying molecular markers in primary BC that predict CM and could be used to identify CMs would be of great clinical interest. In this narrative review, we discuss the main clinical, pathological, and molecular features of CM from the breast.

## 2. Clinical and Pathological Features of Breast Cancer Cutaneous Metastasis

### 2.1. Epidemiology, Incidence, and Prognosis of Breast Cancer Cutaneous Metastasis

The frequency of CM varies according to the molecular subtype of BC. In their study, Lefebvre et al. [20] included 28 cases of CM in which the BC had the following phenotypes: 61% HR-positive/HER2-negative, 25% TN, 7% HER2-positive, and 7% unknown. Yates et al. [21] included 19 cases of CM from BC, which were 47% ER-positive/HER2-negative, 26% TN, 10% ER-positive/HER2-positive, and 16% unknown. The distributions of cases among the different molecular phenotypes in the studies of Kong et al. [22] and Luna et al. [23] differ from those in the remainder of the series in the number of cases HER2-positive and also the series of Luna et al. [23] in the number of cases TN; Kong et al. [22] included 125 women with skin and/or soft tissue metastasis, in which 42.4% were HR-positive, 34.4% were HER2-positive, and 23.2% were TN; and Luna et al. [23] included 26 cases, 27% of which were HR-positive/HER2-negative, 27% HER2-positive, 39% TN, and 7% unknown (Table 1).

**Table 1.** Distribution of molecular phenotypes in the cases of BC with MC of each series.

References	N	HR-Positive/HER2-Negative N (%)	HER2-Positive N (%)	TN N (%)	Unknown N (%)
Lefebvre et al. [20]	28	17 (61)	2 (7)	7 (25)	2 (7)
Yates et al. [21]	19	9 (47)	2 (10)	5 (26)	3 (16)
Kong et al. [22]	125	53 (42.4)	43 (34.4)	29 (23.2)	
Luna et al. [23]	26	7 (27)	7 (27)	10 (39)	2 (7)

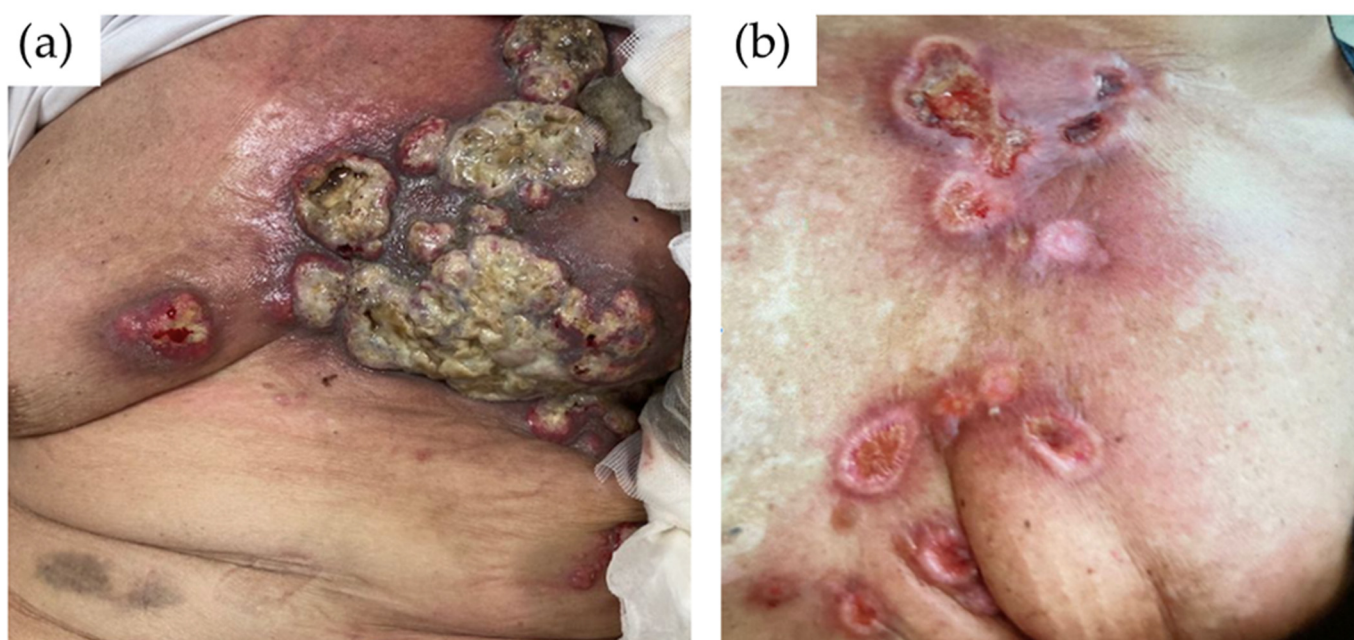
Although there are differences among series, a finding common to all of them is the relative overrepresentation of TNBC, since its frequency in the general population of BCs is around 15%, but it is between 23% and 39% in BCs with CM.

The median age of women who have BC with CM is 74 years [13,15–17,24,25]. As previously mentioned, CM usually occurs late in the disease, in the later stages of the cancer course. Brownstein et al. [26] analyzed 724 cases of metastatic cancers with skin metastases and observed that signs of skin metastasis were only present in 3% of metastatic BC cases. Kong et al. [22] observed that more than half of the patients (56.8%) had more than one visceral metastasis at the time of CM diagnosis: bone in 41.6%, lung in 36%, liver in 13.6%, and brain in 1.6% of patients. At the time of diagnosis, the primary tumor was already widespread, and curative treatment was not available.

## 2.2. Clinical Presentation of Breast Cancer Cutaneous Metastasis

The location of CMs in BC patients is not completely random but occurs more frequently in the vicinity of the primary tumor, perhaps by direct extension of the underlying tumor or by lymphatic spread [16]. CMs from BC tend to develop in the chest wall, although they can also develop in the abdomen, extremities, head, or neck [13,16,17,27]. In addition to being able to develop in different locations, cutaneous breast metastasis can manifest with different patterns.

The most common clinical presentation of skin metastases is in the form of nodules, with an incidence of 80% [17]. They range in size from 1 to 3 cm and may present as firm, solitary, or multiple papules that are located in the dermis or subcutaneous tissue. They are often flesh colored but could be colored brown, bluish black, pink, or red–brown [28–30]. The nodules are usually asymptomatic, although they can also become ulcerated and infected [31] (Figure 1a).



**Figure 1.** (a) Cutaneous metastases in form of ulcerated and infected nodules. (b) Cutaneous metastasis in the form of sharply demarcated erythematous patches and plaques affecting the breast and surrounding skin.

The telangiectatic pattern may appear as an erythematous patch with prominent telangiectasias or as a lymphangioma circumscriptum-like pseudovesicular lesion [32]. It is characterized by papules, plaques, or purpuric nodules, and it is often accompanied by pruritus [33–35]. Telangiectatic presentation occurs with an incidence of 8–11% among patients [15,17].

The erysipeloides or erysipelatoides pattern is also known as inflammatory metastatic carcinoma [30,36]. This pattern shows erysipelas-like lesions, with sharply demarcated erythematous patches and plaques affecting the breast and surrounding skin. Erysipeloides occurs with an incidence of 3–6.3% among patients [15,17] (Figure 1b).

Carcinoma en cuirasse, also named scirrhus carcinoma, appears as scattered and firm erythematous and indurated plaques on the chest wall [30,37,38]. Carcinoma en cuirasse occurs with an incidence of 3–4% among patients [15,17].

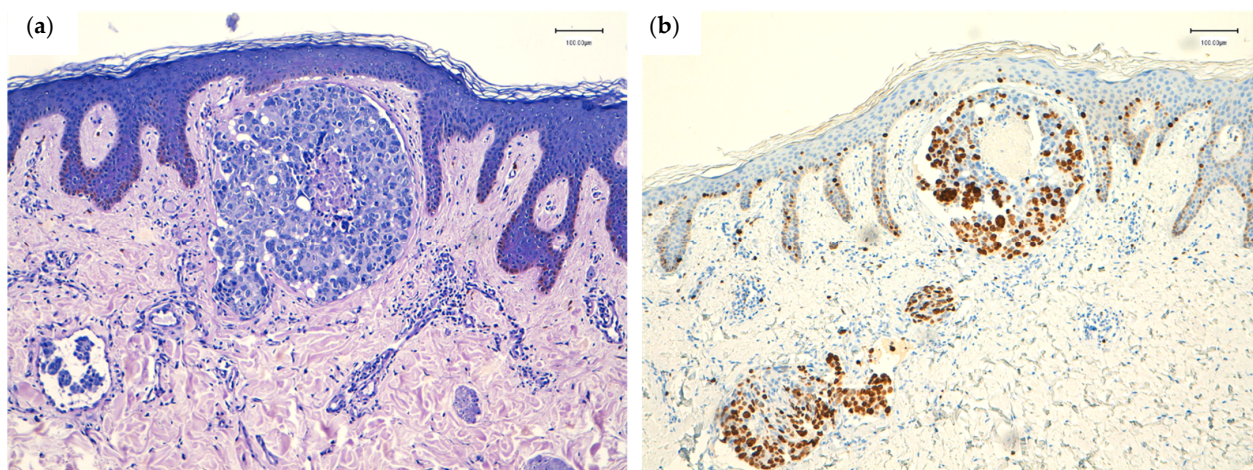
Neoplastic alopecia presents as circular indurated areas of alopecia on the scalp due to the hematogenous spread of BC [39]. The areas of alopecia are typically painless, nonpruritic, and well demarcated, and they appear as oval plaques, often displaying a red–pink tone and a smooth surface [26]. The infiltrative nature of such alopecia may be

unapparent or only minimally apparent [40]. This type occurs with an incidence of 2–12% among patients [15].

### 2.3. Histopathology of Breast Cancer Cutaneous Metastasis

The main BC histological type that produces CMs are an invasive carcinoma of no special type (NST). In the series reported by Mayer et al. [41], 95.2% of CM cases resulted from BCNST, followed by invasive lobular carcinoma (ILC) (2.4%) and others (2.4%).

The pattern of infiltration of dermal tissue influences the clinical pattern of presentation. Histologically, nodules are composed of atypical neoplastic cells arranged in small nests and cords surrounded by fibrosis, usually in a single-file line within the collagen bundles of the dermis [28,31]. In the telangiectatic pattern, aggregates of atypical neoplastic cells and erythrocytes are present within dilated vessels of the papillary and/or reticular dermis (Figure 2) [31]. In the erysipeloid pattern, the metastatic tumor cells are tightly crowded within dilated superficial and deep lymphatic vessels, and a slight perivascular infiltrate of lymphocytes and plasma cells is usually present [15,31,32]. Carcinoma en cuirasse forms through dense fibrosis with few neoplastic cells, sometimes exhibiting a characteristic single-file pattern between the collagen bundles of the dermis [15,31]. Finally, neoplastic alopecia is characterized by the presence of small tumor cells arranged in cords, with single cells destroying hair follicles and inducing fibroplasia [42–45].



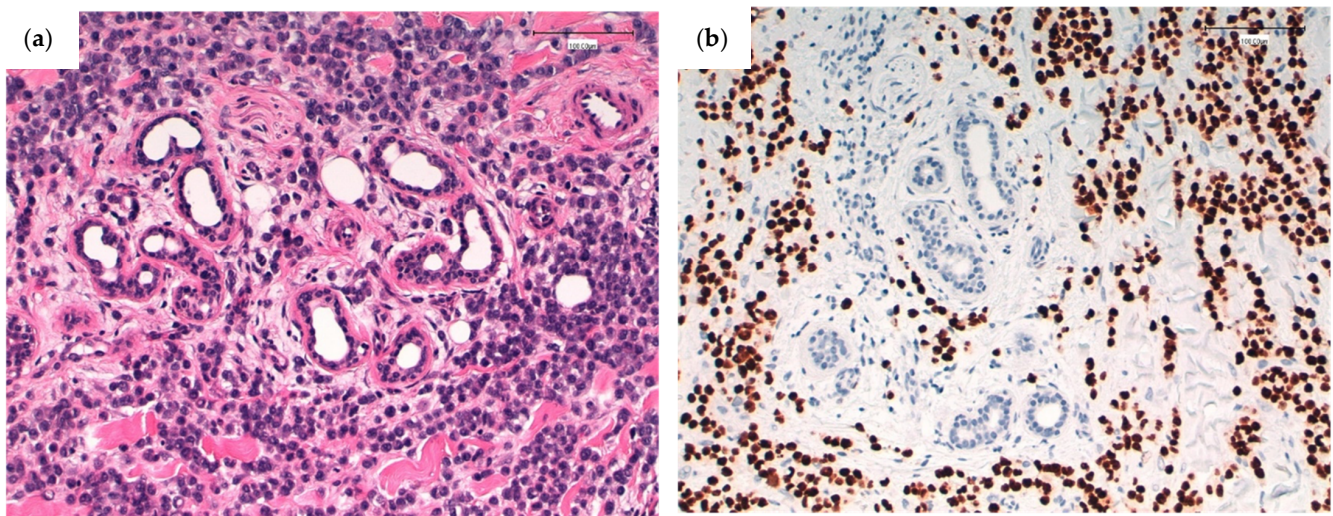
**Figure 2.** (a) Lymphovascular permeation in dermal lymphatics. H&E; original magnification, 100 $\times$ . (b) High proliferation index in tumor emboli (Ki-67; Clon Mib-1, Agilent). Original magnification, 100 $\times$ .

For CMs, it is recommended that immunohistochemical analysis detection of ER, PR, and HER2 (Figure 3) be repeated to evaluate whether the immune profile of the primary tumor has changed, since a change can influence the efficacy of future treatment.

#### Differential Diagnosis of CM of Mammary Origin

Histologically, the primary characteristics of the neoplasia can be observed in CM, but CMs are often very poorly differentiated variants of the original tumor, and a microscopic study may be insufficient to arrive at the etiological diagnosis [46]. Certain immunohistochemistry markers (IHC) are used in the investigation of CM origin in cases where a primary tumor has not yet been diagnosed at the time of cutaneous biopsy. Against CM of unknown origin, it is often useful to perform IHC for cytokeratin 7 (CK7), cytokeratin 20 (CK20), antithyroid transcription factor 1 (TTF-1), S100 protein (S100), and HRs. The distinction of the skin lesion as resulting from BC metastasis has great clinical importance since it can completely modify the application of treatment guidelines. To date, there is no totally specific marker for confirming breast origin. Despite not being specific markers to define the mammary origin, a CK7 +, CK20 –, ER + and PR + algorithm is sometimes used [25,47].

Additionally, there are multiple antibodies that can help to distinguish it from primary skin tumors or metastases of other origins.



**Figure 3.** (a) Cutaneous metastasis from a lobular carcinoma. Discohesive, monomorphic cells surrounding a cutaneous appendage. H&E; original magnification, 200 $\times$ . (b) High expression of estrogen receptor (Clon EP1, Agilent). Original magnification, 200 $\times$ .

The difficulty in recognizing the tumor as being of mammary origin mainly depends on the profile of primitive BC. In luminal tumors, which present intense expression of HRs, and in HER2 tumors, the diagnosis can be made more easily, since these tumors present the characteristic immunophenotype of mammary origin with positivity for GCDFP (gross cystic disease factor protein), mammaglobin, GATA3, HRs, or HER2, if applicable.

TN cases are the most difficult group to diagnose. This subgroup of tumors presents much lower positivity for typical breast markers, such as mammaglobin (17–24% positivity), GCDFP-15 (0–5%), and GATA3, which show a lower expression than that identified in luminal carcinomas or HER2 [48].

GCDFP and mammaglobin are frequently used as immunohistochemical markers of mammary origin. Mammaglobin is more sensitive and GCDFP more specific, but both markers are expressed in most luminal and HER2 tumors. Staining is cytoplasmic and heterogeneous, so the entire stained slide should be carefully examined. However, these two markers are much less sensitive for TN tumors (< 35% and 16%, respectively) and therefore have less diagnostic utility for them. Cutaneous adnexal tumors can also express these two markers, which must be taken into account for differential diagnosis [49].

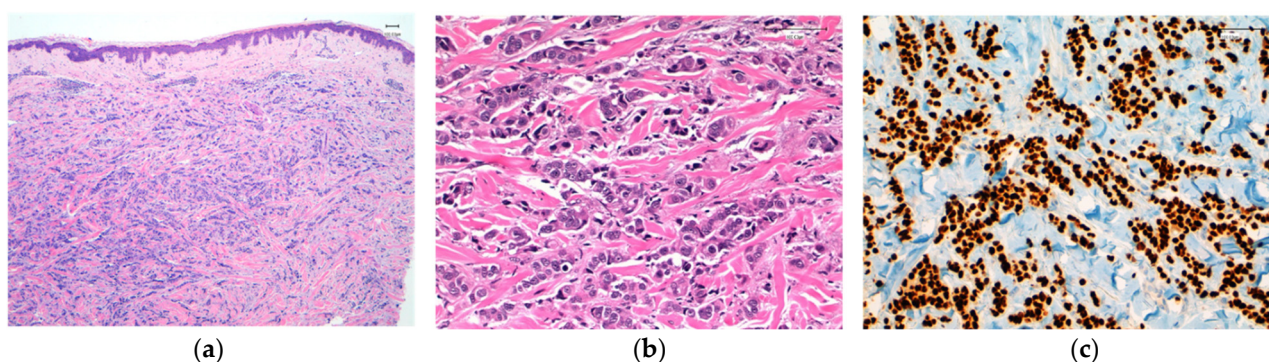
GATA3 is a transcription factor that plays a role in the differentiation of many tissues, including the mammary luminal epithelium. In surgical pathology, GATA3 is a sensitive marker of BCs since GATA3 is involved in ER signaling, but it is also expressed in urothelial, trophoblastic, salivary, and pancreatic tumors, among others [49]. GATA3 is more sensitive than other markers, such as mammaglobin and GCDFP15, since its positivity in luminal tumors is around 90%, but in TN tumors, the percentage of positive tumors is lower. Its sensitivity is much higher for luminal tumors than for TN tumors [49].

SOX10 is a transcription factor that plays a role in the differentiation and survival of neural crest cells. Under normal conditions, SOX10 is expressed in normal salivary gland tissue, in bronchial cells, and in myoepithelial cells of the breast. In surgical pathology, SOX10 has mainly been used as a marker for melanoma and nerve sheath tumors. In breast, the tumor expression of SOX10 has been related to the activation of progenitor cells and the epithelial–mesenchymal transition. SOX10 positivity has been described in 66–74% of TN and metaplastic BCs but only 5% of non-TN carcinomas. This marker can be useful even in the absence of GATA3 expression [49].

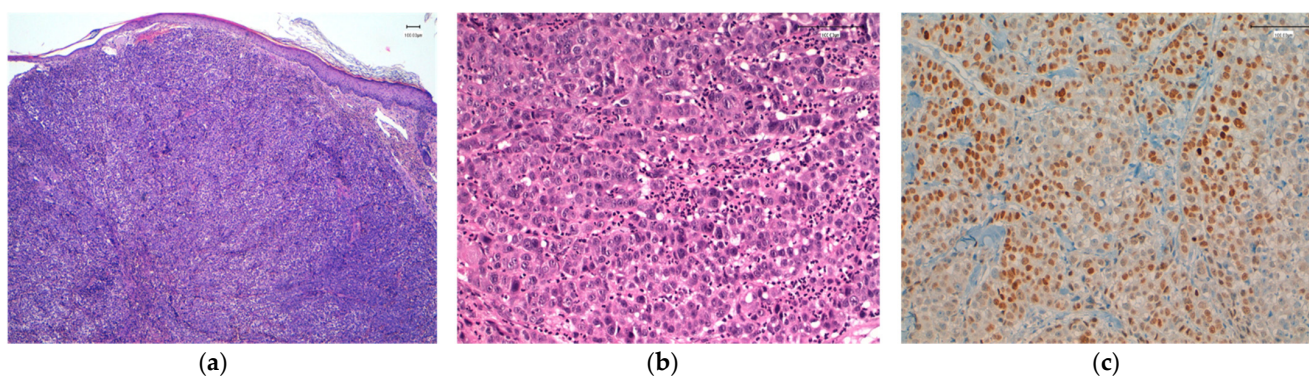
It is important to note that both ER-positive and ER-negative tumors can show intense S100 expression, which implies a differential diagnosis of melanoma.

Lastly, the androgen receptor plays a role in the normal development and proliferation of breast cells. It is expressed more frequently than ER and PR, but like GATA3, its expression is closely linked to ER expression, with a positivity between 25% and 35% in TN carcinomas [49].

SOX10, androgen receptor, and GATA3 expression studies have recently been carried out in TNBC, both in primary tumors and in metastatic carcinomas [45] (Figures 4 and 5). In the review of Tozbikian et al. [49], the most sensitive of the three markers is GATA3 (82% positivity), and the least sensitive is the androgen receptor. SOX10, in turn, remains the most stable when comparing the expression between primary and metastatic carcinoma, and in addition, it is capable of allowing the detection of cases in which there is no expression of GATA3.



**Figure 4.** (a) Infiltrating trabecular pattern in a cutaneous nodular metastasis from a triple-negative breast carcinoma of no special type. Original magnification, 40  $\times$ . (b) Tumor cells dissecting dermal collagen fibers. Original magnification, 200 $\times$ . (c) Intense expression of GATA3 (Clon L50-823, Roche). Original magnification, 200 $\times$ .



**Figure 5.** (a) Solid pattern of infiltration in a cutaneous nodular metastasis from a triple-negative breast carcinoma of no special type. Original magnification, 40  $\times$ . (b) Tumor cells forming solid nests in the dermis. Original magnification, 200 $\times$ . (c) Intense expression of SOX10 (Clon SP267, Roche). Original magnification, 200 $\times$ .

Another important differential diagnosis of CM is primary epithelial cutaneous tumors, mainly when metastasis develops a long time after the primary tumor. The distinction between primary adnexal carcinoma (PAC) and metastatic BC to the skin can be quite challenging, despite adequate clinical history [50,51]. The differential diagnosis with primary cutaneous apocrine carcinoma, a rare tumor that shares morphologic characteristics with BC is especially defiant. For this subtype, GATA 3 has been proven useful in confirming breast origin, but this antibody can be also expressed in other primary skin tumors [50]. CD117 (is expressed by sweat gland secretory cells as well as a wide variety of adnexal tumors, so it can be useful in differentiating tumors with apocrine/eccrine differentiation from metastatic carcinomas to the skin with a high specificity, albeit low sensitivity. D2-40

(podoplanin) has been reported to highlight not only a variety of vascular tumors but is a useful tool in distinguishing PAC and other cutaneous tumors from metastatic adenocarcinoma to the skin. P63 expression has also been found to be helpful in distinguishing primary adnexal tumors from metastatic adenocarcinoma to the skin, as it is highly expressed in the basal/myoepithelial cells of epithelial tissues, such as in the eccrine/apocrine sweat glands. Therefore, the use of these three markers in a panel may serve as a valuable tool in daily clinical practice when faced with this dilemma [51]. However, it should be taken into account that some TNBC can express one or more of these proteins.

#### 2.4. Prognosis and Treatment of Breast Cancer Cutaneous Metastasis

The poor prognosis conferred by the presence of CMs in women with BC is highlighted by the short median survival of these patients. There are few differences in prognosis regarding whether the lesions are single or multiple, with a mortality exceeding 70% in the first year after the diagnosis [13,52].

When BC spreads to the skin, it cannot be cured. The purpose of treatment is to relieve symptoms, improve quality of life, and slow the growth of the cancer. The CMs are systemically treated based on the molecular type (HR-positive, HER2-positive, or TN). A HR-positive tumor can be treated with a variety of endocrine-based strategies. Chemotherapy is the preferred option for CMs that are HR-negative and/or rapidly progressing. HER2-directed therapy should be applied to HER2-positive tumors, depending on the extent of disease. For the local control of skin metastases, external beam radiation therapy is an option for palliation but would not usually be used in previously irradiated areas due to the issue of cumulative dose [17].

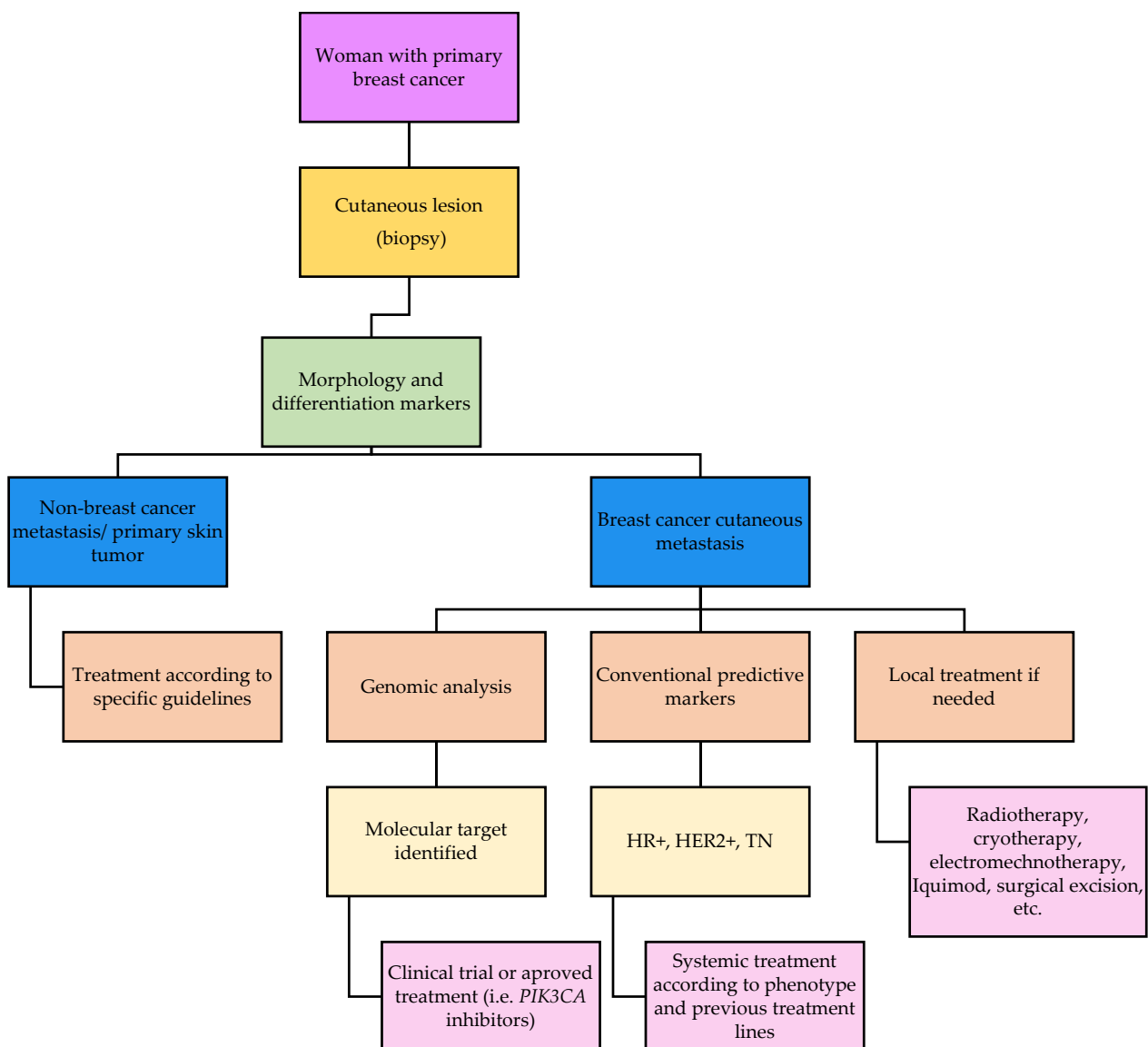
Debridement may be advised when lesions are bleeding. Other options are possible and can be helpful, such as imiquimod, showing good results in localized lesions; trastuzumab, in tumors that are HER2-positive; systemic chemotherapy; radiation therapy; and immunotherapy [53,54]. Surgical excision may improve the quality of life of patients [54,55].

In a number of cases, it has been highlighted that cryotherapy and topical immunomodulators may be useful for the management of CM of BC, possibly by eliciting improved responses to traditional systemic chemotherapy, as may emerging therapies including targeted agents and immune-checkpoint blockers. Trials evaluating combination therapy in metastatic melanoma (NCT03276832) are ongoing. Clinical and correlative studies to develop a therapeutic protocol for CM of BC based on these observations are underway [56].

Another option for the treatment of CM in BC is electrochemotherapy (ECT). This is an effective treatment for cutaneous BC lesions that have proven refractory to standard therapies. As smaller lesions were found to be more responsive, Bourke et al. [36] suggested that ECT should be considered as an early treatment modality, within multimodal treatment strategies.

Elucidating the molecular landscape of CMs could help in selecting new targeted therapies for this ominous manifestation of BC.

A potential diagnostic and treatment algorithm for CM is presented in the Figure 6.



**Figure 6.** Diagnostic and treatment algorithm for cutaneous metastasis.

### 3. Molecular Landscape of BC Metastasis

#### 3.1. Overview of Molecular Alterations in Metastases of Mammary Origin

Metastases are associated with the acquisition of additional driver mutations compared with the primary tumor [21]. Different studies show that the number of somatic mutations in BC metastasis was significantly higher than that in primary cancers [21,57–60]. The type of mutation acquired during the metastatic process will probably depend on both the intrinsic molecular subtype of BC and the metastatic site.

Rinaldi et al. [61], who explored a set of 11,616 breast tumors, including 5034 non-paired metastases, showed a significant enrichment for *ESR1* mutations in metastasis (18.3% in metastases vs. 2.2% in local disease). Additionally, they observed a metastatic enrichment of previously unreported, lower-prevalence *ESR1* mutations in the ligand-binding domain, implying that these mutations may also be functional. The type of *ESR1* mutation differed according to the histological type (ductal vs. lobular) and the metastatic site. Other alterations enriched across all the metastases include the loss of function of *CDKN1B* and mutations in the transcription factor *CTCF*, *NF1*, and *KRAS*. Mutations enriched at specific metastatic sites affected genes that are important in the development of primary tumors in that site, suggesting the local adaptation of BC metastasis. They

included 118 cases of CM and demonstrated that only changes in *NOTCH1* were specific for skin metastases. Other examples included *PTEN* and *ASXL1* in brain metastases and *KRAS*, *KEAP1*, *STK11*, and *EGFR* mutations in lung metastases.

Lefebvre et al. [20], in their study of 216 metastatic breast tumors, also observed more *ESR1* mutations in metastases than in primary tumors, as well as more mutations in *RB1*. In this study, other genes that were more frequently observed to be mutated in metastasis from BC as compared with early BC were *FSIP2*, *FRAS1*, *OSBPL3*, *EDC4*, *PALB2*, *IGFN1*, and *AGRN*.

Focusing on studies that analyzed specific metastases, Tian et al. [62], using the MSKCC Dataset and POTUAM dataset, studied cases of hepatic metastases and unpaired primary breast tumors. They found that the driver genes for liver metastasis (LM) were *ESR1*, *AKT1*, *ERBB2*, and *FGFR4* and that LM matched three prominent mutation signatures: APOBEC cytidine deaminase, ultraviolet exposure, and defective DNA mismatch repair. Huang et al. [63] studied cases of brain metastases and unpaired primary breast tumors and observed that the metastases were enriched for genomic alterations in *TP53*, *ERBB2*, *RAD21*, *NF1*, *BRCA1*, and *ESR1*. They also demonstrated significantly increased levels of immune-checkpoint-inhibitor biomarkers, microsatellite instability, and *CD274* amplification in the metastasis cohort.

#### Differences in Mutational Profile between Primary Tumors and Their Paired Metastases

Some studies have compared mutations between paired cases of primary breast tumors and their metastasis. Schijver et al. [57] included 17 paired ER-negative/HER2-positive and TN cases and found that a large subset of non-synonymous somatic mutations (45%) were shared between primary tumors and paired metastases. However, mutations restricted to a given primary tumor or its metastasis, the acquisition of a loss of wild-type allele heterozygosity, and clonal gene changes affected by somatic mutations, such as in *TP53* and *RB1*, were observed in the progression of primary tumors to metastasis. Roy-Chowdhuri et al. [59] analyzed 61 matched cases and observed 77% concordant mutations between primaries and metastases and 23% mutations only in metastases, including *TP53*, *PIK3CA*, *KRAS*, *PTEN*, *BRAF*, and *AKT1*. However, their group of patients focused primarily on the ER-positive subtype and included only 2% that were ER-negative/HER2-positive breast tumors and 25% that were TN breast tumors. Other studies have also shown that *TP53* and *PIK3CA* are the genes most frequently mutated in metastases [21,64]. Paul et al. [58] studied 28 matched cases and observed seven genes that were preferentially mutated in metastases—*MYLK*, *PEAK1*, *SLC2A4RG*, *EVC2*, *XIRP2*, *PALB2*, and *ESR1*—five of which are not significantly mutated in any type of human primary cancer. Kjällquist et al. [60], who included 30 matched cases, showed the enrichment of mutations in *AKAP* genes in metastatic BCs, suggesting the involvement of *AKAPs* in the metastatic process. Furthermore, Van Geelen et al. [65] studied 76 paired cases and found alterations in *AKT1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *ESR1*, *FGFR1*, *KMT2C*, *NCOR1*, *PIK3CA*, and *TSC2* that were significantly enriched in metastases when compared with paired primary tumors. On the other hand, they observed agreement in both types of samples in cases of *TP53* and *ERBB2* amplification. Paul et al. [58] included 28 paired cases in their study and found preferential mutations or copy number variations (CNVs) to be altered in metastases compared with paired primary tumors. The genes preferentially mutated in metastases were *MYLK*, *PEAK1*, *SLC2A4RG*, *EVC2*, *XIRP2*, *PALB2*, and *ESR1* (five of which are not significantly mutated in any type of human primary cancer). The most relevant CNVs were a loss of *STK11* and *CDKN2A/B* and gain of *PTK6* and the membrane-bound PR *PAQR8*. *PAQR8* gain and *ESR1* mutations were mutually exclusive, suggesting a role in treatment resistance.

A recent specific retrospective study of 94 paired cases of lobular carcinoma demonstrated mutations in *AKT1*, *ARID1A*, *ESR1*, *ERBB2*, or *NF1* only in 22% of patients with metastasis; *PTEN* and *NF1* deletion and *CYP19A1* amplification were seen in 19% of patients [66].



### 3.2. Molecular Landscape of Breast Cancer Cutaneous Metastases

Some of the studies that have analyzed mutations in metastatic lesions and mutations in their respective primary tumors specify additional mutations observed in skin metastases not seen in the primary tumors [21,58,60]. Data for these are presented in Table 2.

**Table 2.** Additional mutations in skin metastases vs. primary breast tumors in paired cases along with data source.

References	Total Paired Cases N	Paired Cases of Skin Metastases N	Additional Molecular Alterations in Skin Metastases Not Found in Primary Breast Tumors
Schrijver et al. [57]	17	8	33 mutations ( <i>ATR</i> , <i>BRCA1</i> , <i>SMAD4</i> , <i>CDH1</i> , <i>ARID1A</i> , <i>ERBB2</i> , <i>IDH1</i> , <i>PIK3R1</i> , <i>RBI</i> , and others)
Yates et al. [21]	Cohort 1: 7	2	4 molecular alterations (amplification of <i>FGFR1</i> /structural variant of <i>TP53</i> , indel of <i>RBI</i> /amplification of <i>TERC</i> )
Paul et al. [58]	Cohort 2: 51 28	4 1	9 mutations ( <i>JAK2</i> , <i>NF1</i> , <i>TP53</i> , <i>AKT1</i> , and <i>ARID1A</i> ) 54 mutations ( <i>PIK3CA</i> , <i>TP53</i> , and others)

Referring to copy number alterations, Moelans et al. [67], who included 22 cases of primary and skin metastases from a total of 55 primary BC samples and their corresponding distant metastases, showed a high frequency of CNVs in BC metastases compared with primary tumors for a few genes (*ADAM9*, *IKBKB*, *PRDM14*, *CCND1*, *MED1*, *ERBB2*, *CDC6*, *C11ORF30*, *CDH1*, *TRAF4*, *CPD*, *CDC6*, *MAPT*, and *CCNE1*). These genes had been implicated in different pathways, including the development of therapy resistance. Focusing only on paired skin cases, they observed more gains of the *ESR1*, *MTDH*, *MED1*, and *ERBB2* genes in metastasis samples than in the primary tumors and more *CDH1* losses in the metastasis compared with the primary tumor. Curigliano et al. [68] identified a molecular signature on skin metastasis. This molecular signature was similar but not identical to that described for the basal-like subtype, including high expression levels of several cytokeratins, Aurora kinase A, Cyclin E, and others.

### 3.3. Comparison of Mutational Profile between Cutaneous and Hepatic Metastases

In order to further explore the possible specific molecular alterations of CMs in comparison with other visceral metastases, we analyzed the mutational differences between CMs and LMs of BC. We chose LMs because they are the metastases most frequently found in the analyzed series, probably because they are easier to biopsy. We included 58 sequenced cases of skin metastasis from five series [20,21,57,58,69] and 87 cases of LM from two series [20,21]. We could not access the data of the largest series of metastases reported by Rinaldi et al. [61].

First, we analyzed whether there were differences in the immunophenotypes of BC according to the metastatic site. The percentages of each phenotype of BC with skin metastasis with respect to those with LMs is presented in Table 3.

**Table 3.** Number of cases of metastasis in skin and liver grouped by phenotype.

Location	Luminal N (%)	Luminal HER2-Positive N (%)	HER2-Positive N (%)	TN N (%)	ND N (%)
SKIN	29 (50)	2 (3.4)	6 (10.3)	15 (25.9)	6 (10.3)
LIVER	59 (68.6)	4 (4.6)	9 (10.5)	11 (12.8)	3 (3.5)

Although the differences in the immunophenotype were not statistically significant, which could be due to the relative low number of cases, we observed a higher proportion of the TN phenotype in tumors with CMs than in those with LMs.

The mutations more frequently found in CMs and LMs are shown in Figure 7.

For this dataset, we evaluated statistically significant differences, considering only those genes that appeared mutated in at least four samples. We observed differences in six genes: *RUNX1*, *ROBO1*, *MLL2*, *DYNC2H1*, and *CHD1* were mutated in 7% of CMs but no LMs ( $p$ -value = 0.025), and *TP53* was mutated in 50% of skin metastases and 31% of LMs ( $p$ -

value = 0.036) (Figure 8). This analysis has certain limitations, since the data included come from different sequencing platforms and different numbers of genes have been sequenced according to the study. Lefebvre et al. [20] and Paul et al. [58] analyzed the whole exome. On the other hand, Yates et al. [21], Schrijver et al. [57], and Muller et al. [69] sequenced a specific panel of genes. Additionally, further studies with larger series are required to check whether the discrepant results were related to differences in the molecular landscapes of the primary tumors or represented specific events in CMs [70].

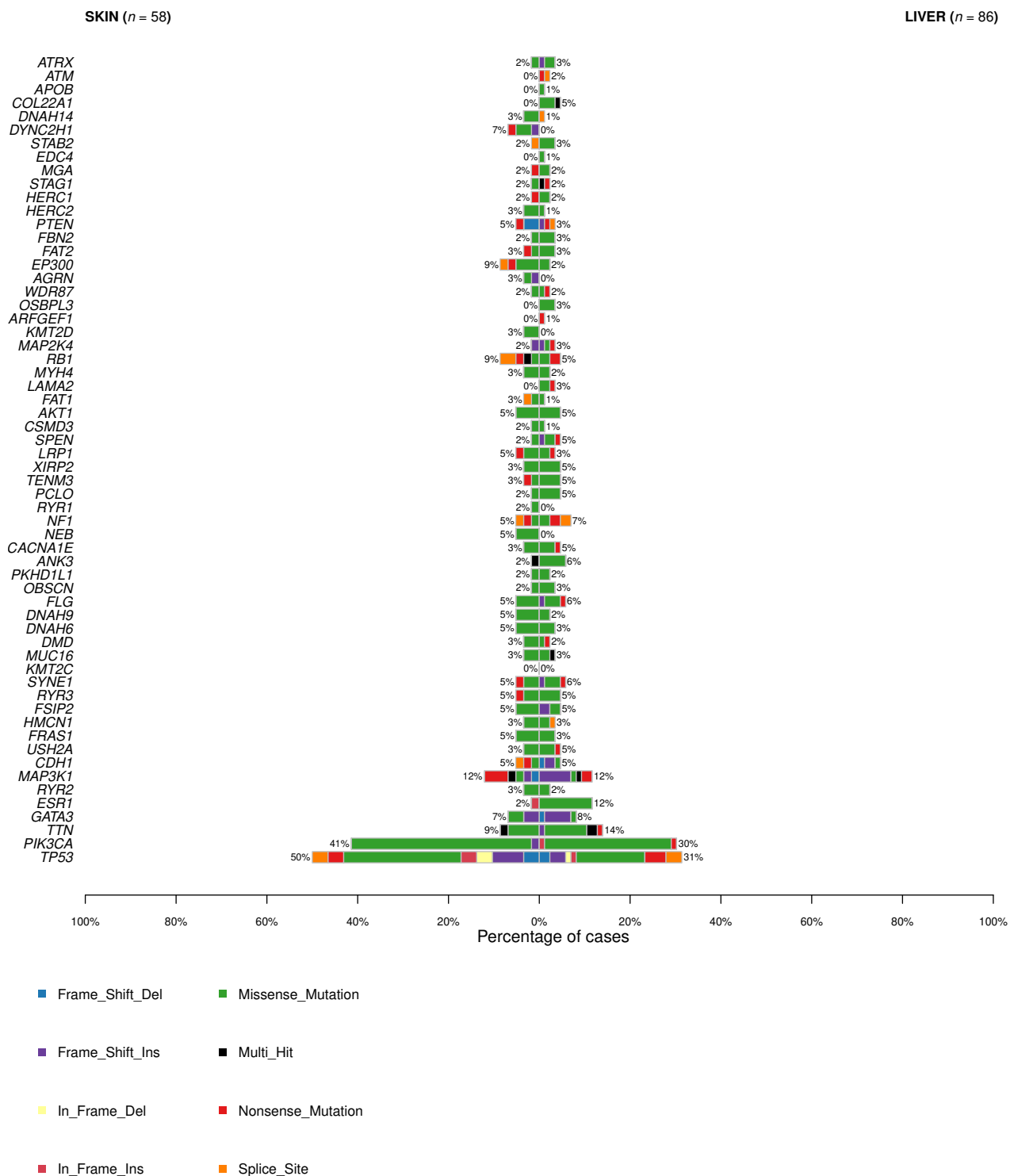
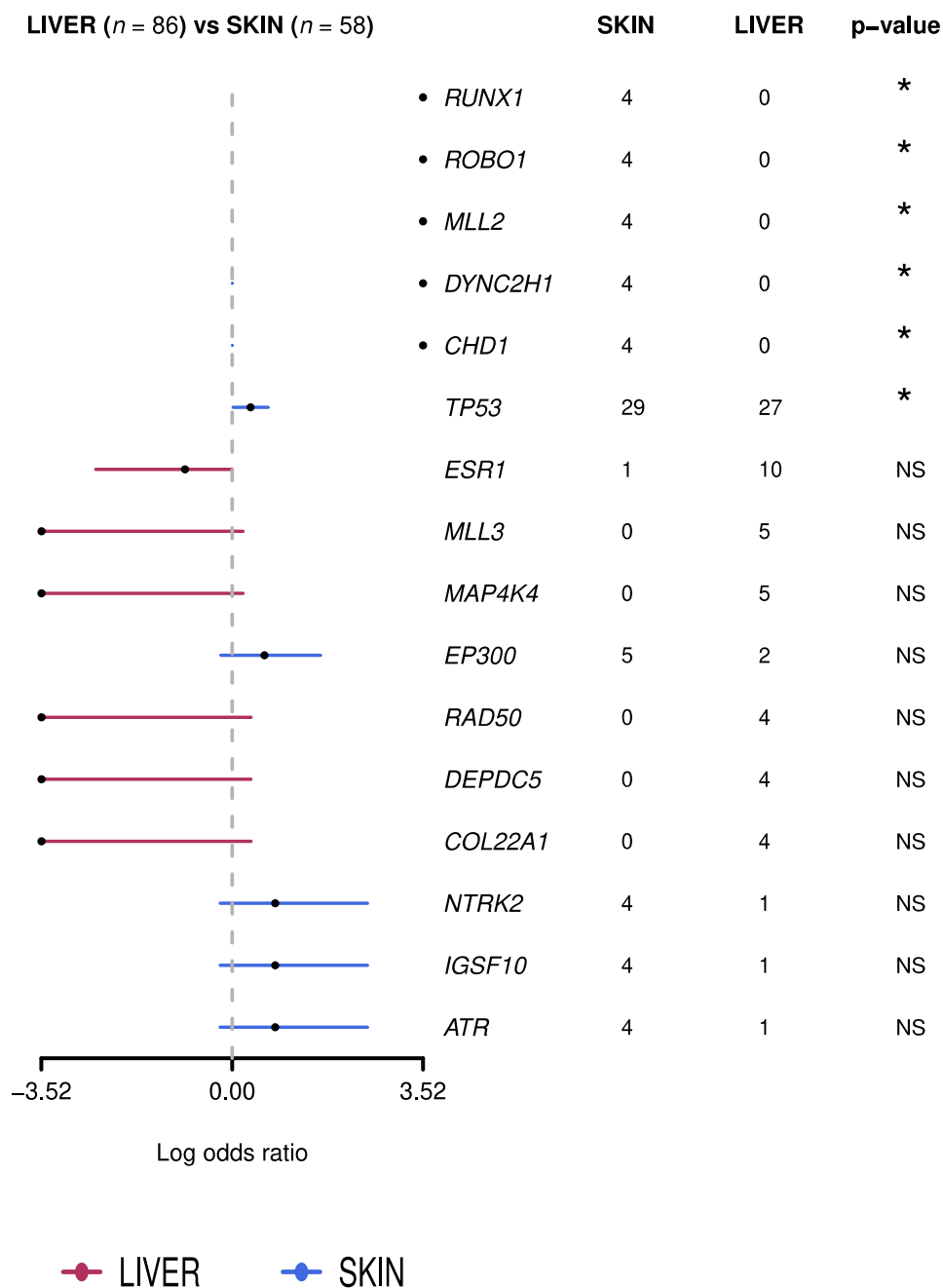
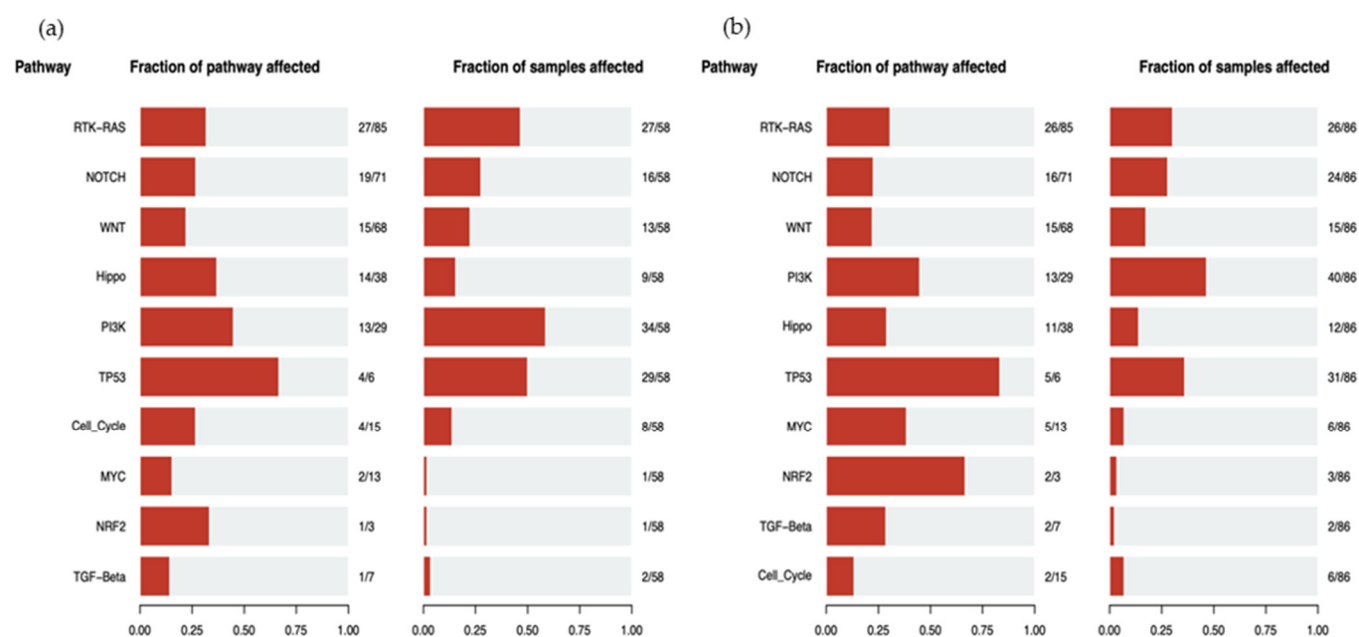


Figure 7. Type and frequency of mutations in cutaneous and liver metastases according to gene.



**Figure 8.** Genes differentially mutated in liver and skin metastases (\* statistically significant differences). The red lines reflect a higher frequency of mutation in genes in the liver metastases with respect to the skin metastases, with no statistically significant differences, and the blue lines reflect a higher frequency of mutation of genes in the skin metastases with respect to the liver metastases, with no statistically significant differences.

According to the alterations observed in CM and LM, the biological mechanisms underlying their development can be hypothesized. Figure 9a shows the number of altered genes of each molecular pathway and the number of samples in which genes of the pathway are mutated in CM. Figure 9b presents the same information referring to LM. In both CM and LM, the pathway most affected according to the mutations found is PI3K, followed by TP53 and RTK-KRAS, with the frequencies 58.6% vs. 46.5%, 50% vs. 36% and 46.5% vs. 30.2%, respectively.



**Figure 9.** (a) Altered pathways according to the number of mutated genes and according to the number of samples affected in cutaneous metastasis. (b) Altered pathways according to the number of mutated genes and according to the number of samples affected in liver metastasis.

#### 4. Possible Future Directions

To improve the knowledge of the biology of BCM, it would be necessary to carry out more sequencing studies with a greater number of cases from patients with CM of mammary origin. More paired cases of primaries with their corresponding CM should be studied with a broad panel of genes, including all those most frequently involved in BC, to find the additional mutations in CM that lead to their development, to identify not only metastasis mechanisms but also potential therapeutic targets. Another possible future projection in this area would be using whole exome sequencing to study the primary BC tumors of patients who have developed CM, attempting to find a specific mutational profile in such patients in comparison with tumors that developed metastases in other sites. Studies of this type could have clinical impact since knowing the pathways that lead to the development of skin metastases or knowing a specific genetic profile in the primary tumor of the patients who develop this type of metastasis would help to act against specific targets or help to predict and prevent tumor development to the skin.

#### 5. Conclusions

CM is a factor for poor prognosis of BC, and new therapeutic approaches are needed to improve patient survival. A better understanding of the pathological and molecular characteristics of the primary tumor and their CMs will help in achieving this objective.

**Author Contributions:** Conceptualization, S.G.-M., J.C. and J.P.; data curation, S.G.-M., D.P. and J.P.; writing—original draft preparation, S.G.-M. and J.P.; writing—review and editing, S.G.-M., D.P., B.P.-M., T.C.-C., G.C., J.C. and J.P.; funding acquisition, J.C. and J.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This review was funded by grants from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (PI19/01331) and CIBERONC (CB16/12/00316 and CB16/12/00449), co-financed by the European Development Regional Fund, ‘A way to achieve Europe’ (FEDER), and by the Spanish Association Against Cancer Scientific Foundation (Grupos Coordinados Traslacionales aecc 2018).

**Acknowledgments:** “Contigo contra el Cáncer de la Mujer” Foundation.

**Conflicts of Interest:** J.C.: consulting/advisor: Roche, Celgene, Cellectia, AstraZeneca, Biothera Pharmaceutical, Merus, Seattle Genetics, Daiichi Sankyo, Erytech, Athenex, Polyphor, Lilly, Servier, Merck Sharp & Dohme, GSK, Leuko, Bioasis, Clovis Oncology, Boehringer Ingelheim, Kyowa Kirin. Honoraria: Roche, Novartis, Celgene, Eisai, Pfizer, Samsung Bioepis, Lilly, Merck Sharp & Dohme, Daiichi Sankyo. Research funding to the Institution: Roche, Ariad Pharmaceuticals, AstraZeneca, Baxalta GMBH/Servier Affaires, Bayer Healthcare, Eisai, F.Hoffman-La Roche, Guardanth Health, Merck Sharp & Dohme, Pfizer, Piquar Therapeutics, Puma C, Queen Mary University of London. Stock, patents, and intellectual property: MedSIR. Travel, accommodation, expenses: Roche, Novartis, Eisai, Pfizer, Daiichi Sankyo. G.C. reports consulting/advisor for Roche, Astra Zeneca, Daichii Sankyo, Pfizer, Lilly, BMS, Novartis, Seagen, Merck, Ellipsis; grants from Merck; expert talk for Pfizer, Lilly, Daichii Sankyo, Seagen, and Medscape, outside the submitted work. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

## References

1. Torre, L.A.; Islami, F.; Siegel, R.L.; Ward, E.M.; Jemal, A. Global Cancer in Women: Burden and Trends. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2017**, *26*, 444–457. [[CrossRef](#)]
2. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2019. *CA A Cancer J. Clin.* **2019**, *69*, 7–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Chiang, A.C.; Massagué, J. Molecular Basis of Metastasis. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *359*, 2814–2823. [[CrossRef](#)]
4. Liotta, L.A. Cancer Invasion and Metastases. *JAMA* **1990**, *263*, 1123–1126. [[CrossRef](#)]
5. Arozullah, A.M.; Calhoun, E.A.; Wolf, M.; Finley, D.K.; Fitzner, K.A.; Heckinger, E.A.; Gorby, N.S.; Schumock, G.T.; Bennett, C.L. The Financial Burden of Cancer: Estimates from a Study of Insured Women with Breast Cancer. *J. Support Oncol.* **2004**, *2*, 271–278.
6. Coleman, R.E. Skeletal Complications of Malignancy. *Cancer* **1997**, *80*, 1588–1594. [[CrossRef](#)]
7. Lipton, A. Bisphosphonates and Metastatic Breast Carcinoma. *Cancer* **2003**, *97*, 848–853. [[CrossRef](#)]
8. Richert, M.M.; Welch, D.R. Metastasis of Hormone Receptor Positive Breast Cancer. In *Hormone Receptors in Breast Cancer*; Fuqua, S.A.W., Ed.; Cancer Treatment and Research; Springer US: Boston, MA, USA, 2009; Volume 147, pp. 1–22. ISBN 978-0-387-09462-5.
9. Heitz, F.; Harter, P.; Lueck, H.-J.; Fissler-Eckhoff, A.; Lorenz-Salehi, F.; Scheil-Bertram, S.; Traut, A.; du Bois, A. Triple-Negative and HER2-Overexpressing Breast Cancers Exhibit an Elevated Risk and an Earlier Occurrence of Cerebral Metastases. *Eur. J. Cancer* **2009**, *45*, 2792–2798. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Lentzsch, S.; Reichardt, P.; Weber, F.; Budach, V.; Dörken, B. Brain Metastases in Breast Cancer: Prognostic Factors and Management. *Eur. J. Cancer* **1999**, *35*, 580–585. [[CrossRef](#)]
11. Bendell, J.C.; Domchek, S.M.; Burstein, H.J.; Harris, L.; Younger, J.; Kuter, I.; Bunnell, C.; Rue, M.; Gelman, R.; Winer, E. Central Nervous System Metastases in Women Who Receive Trastuzumab-Based Therapy for Metastatic Breast Carcinoma. *Cancer* **2003**, *97*, 2972–2977. [[CrossRef](#)]
12. Gerratana, L.; Fanotto, V.; Bonotto, M.; Bolzonello, S.; Minisini, A.M.; Fasola, G.; Puglisi, F. Pattern of Metastasis and Outcome in Patients with Breast Cancer. *Clin. Exp. Metastasis* **2015**, *32*, 125–133. [[CrossRef](#)]
13. Alcaraz, I.; Cerroni, L.; Rütten, A.; Kutzner, H.; Requena, L. Cutaneous Metastases From Internal Malignancies: A Clinicopathologic and Immunohistochemical Review. *Am. J. Dermatopathol.* **2012**, *34*, 347–393. [[CrossRef](#)]
14. Casimiro, L.M. Metástasis cutáneas de neoplasias internas. *Med. Cutan. Iber. Lat. Am.* **2009**, *37*, 117–129.
15. De Giorgi, V.; Grazzini, M.; Alfaioli, B.; Savarese, I.; Corciova, S.A.; Guerriero, G.; Lotti, T. Cutaneous Manifestations of Breast Carcinoma: A Clinical Guide. *Dermatol. Ther.* **2010**, *23*, 581–589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Guanziroli, E.; Coggi, A.; Venegoni, L.; Fanoni, D.; Ercoli, G.; Boggio, F.; Veraldi, S.; Berti, E.; Gianotti, R.; Ferrero, S.; et al. Cutaneous Metastases of Internal Malignancies: An Experience from a Single Institution. *Eur. J. Dermatol.* **2017**, *27*, 609–614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Tan, A.R. Cutaneous Manifestations of Breast Cancer. *Semin. Oncol.* **2016**, *43*, 331–334. [[CrossRef](#)]
18. Bittencourt, M.D.J.S.; Carvalho, A.H.; Nascimento, B.A.M.; Freitas, L.K.M.; Parijós, A.M.D. Cutaneous Metastasis of a Breast Cancer Diagnosed 13 Years Before. *An. Bras. Dermatol.* **2015**, *90*, 134–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Hu, S.-S.; Chen, G.-S.; Lu, Y.-W.; Wu, C.-S.; Lan, C.-C. Cutaneous Metastases from Different Internal Malignancies: A Clinical and Prognostic Appraisal. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.* **2008**, *22*, 735–740. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Lefebvre, C.; Bachelot, T.; Filleron, T.; Pedrero, M.; Campone, M.; Soria, J.-C.; Massard, C.; Lévy, C.; Arnedos, M.; Lacroix-Triki, M.; et al. Mutational Profile of Metastatic Breast Cancers: A Retrospective Analysis. *PLoS Med.* **2016**, *13*, e1002201. [[CrossRef](#)]
21. Yates, L.R.; Knappskog, S.; Wedge, D.; Farmery, J.H.R.; Gonzalez, S.; Martincorena, I.; Alexandrov, L.B.; Van Loo, P.; Haugland, H.K.; Lilleng, P.K.; et al. Genomic Evolution of Breast Cancer Metastasis and Relapse. *Cancer Cell* **2017**, *32*, 169–184.e7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Kong, J.H.; Park, Y.H.; Kim, J.A.; Kim, J.H.; Yun, J.; Sun, J.M.; Won, Y.W.; Lee, S.; Kim, S.T.; Cho, E.Y.; et al. Patterns of Skin and Soft Tissue Metastases from Breast Cancer According to Subtypes: Relationship between EGFR Overexpression and Skin Manifestations. *Oncology* **2011**, *81*, 55–62. [[CrossRef](#)]

23. Luna, A.; Rabassa, M.E.; Isla Larrain, M.; Cabaleiro, P.; Zwenger, A.; Canzoneri, R.; Segal-Eiras, A.; Abba, M.C.; Croce, M.V. Breast Cancer Cutaneous Metastases Are Associated to UMUC1 and Sialyl Lewis x and to Highly Malignant Primary Tumors. *Pathol. Res. Pract.* **2020**, *216*, 152859. [[CrossRef](#)]
24. Kelati, A.; Gallouj, S. Dermoscopy of Skin Metastases from Breast Cancer: Two Case Reports. *J. Med. Case Rep.* **2018**, *12*, 273. [[CrossRef](#)]
25. Saeed, S.; Keehn, C.A.; Morgan, M.B. Cutaneous Metastasis: A Clinical, Pathological, and Immunohistochemical Appraisal: Cutaneous Metastasis. *J. Cutan. Pathol.* **2004**, *31*, 419–430. [[CrossRef](#)]
26. Brownstein, M.H.; Helwig, E.B. Metastatic Tumors of the Skin. *Cancer* **1972**, *29*, 1298–1307. [[CrossRef](#)]
27. Spencer, P.S.; Helm, T.N. Skin Metastases in Cancer Patients. *Cutis* **1987**, *39*, 119–121.
28. Nava, G.; Greer, K.; Patterson, J.; Lin, K.Y. Metastatic Cutaneous Breast Carcinoma: A Case Report and Review of the Literature. *Can. J. Plast. Surg.* **2009**, *17*, 25–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Pipkin, C.A.; Lio, P.A. Cutaneous Manifestations of Internal Malignancies: An Overview. *Dermatol. Clin.* **2008**, *26*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Wong, C.B.; Kalb, R.; Zeitouni, N.; Helm, M.; Helm, T. The Presentation, Pathology, and Current Management Strategies of Cutaneous Metastasis. *N. Am. J. Med. Sci.* **2013**, *5*, 499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Lookingbill, D.P.; Spangler, N.; Helm, K.F. Cutaneous Metastases in Patients with Metastatic Carcinoma: A Retrospective Study of 4020 Patients. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1993**, *29*, 228–236. [[CrossRef](#)]
32. Marneros, A.G.; Blanco, F.; Husain, S.; Silvers, D.N.; Grossman, M.E. Classification of Cutaneous Intravascular Breast Cancer Metastases Based on Immunolabeling for Blood and Lymph Vessels. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2009**, *60*, 633–638. [[CrossRef](#)]
33. Lin, J.-H.; Lee, J.-Y.; Chao, S.-C.; Tsao, C.-J. Telangiectatic Metastatic Breast Carcinoma Preceded by En Cuirasse Metastatic Breast Carcinoma. *Br. J. Dermatol.* **2004**, *151*, 523–524. [[CrossRef](#)]
34. Pakula, A.S.; Robinson, J.K. Recognizing Malignant Skin Changes Following Breast Cancer. *Am. Fam. Physician* **1992**, *45*, 1287–1292. [[PubMed](#)]
35. Maghfour, S. Telangiectatic Cutaneous Metastasis from Breast Carcinoma. *Our Dermatol. Online* **2021**, *12*, 47–49. [[CrossRef](#)]
36. Bourke, M.G.; Salwa, S.P.; Sadadcharam, M.; Whelan, M.C.; Forde, P.F.; Larkin, J.O.; Collins, C.G.; O'Reilly, S.; O'Sullivan, G.C.; Clover, A.J.; et al. Effective Treatment of Intractable Cutaneous Metastases of Breast Cancer with Electrochemotherapy: Ten-Year Audit of Single Centre Experience. *Breast Cancer Res. Treat.* **2017**, *161*, 289–297. [[CrossRef](#)]
37. Mullinax, K.; Cohen, J.B. Carcinoma En Cuirasse Presenting as Keloids of the Chest. *Dermatol. Surg.* **2004**, *30*, 226–228. [[CrossRef](#)]
38. Carlesimo, M.; Rossi, A.; De Marco, G.; Narcisi, A.; Cacchi, C.; Mari, E.; Persechino, F.; Camplone, G. Carcinoma En Cuirasse of the Breast. *Eur. J. Dermatol.* **2009**, *19*, 289–290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Mallon, E.; Dawber, R.P.R. Alopecia Neoplastica without Alopecia: A Unique Presentation of Breast Carcinoma Scalp Metastasis. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1994**, *31*, 319–321. [[CrossRef](#)]
40. Scheinfeld, N. Review of Scalp Alopecia Due to a Clinically Unapparent or Minimally Apparent Neoplasm (SACUMAN). *Acta Derm. Venereol.* **2006**, *86*, 387–392. [[CrossRef](#)]
41. Mayer, J.E.; Maurer, M.A.; Nguyen, H.T. Diffuse Cutaneous Breast Cancer Metastases Resembling Subcutaneous Nodules with No Surface Changes. *Cutis* **2018**, *101*, 219–223. [[PubMed](#)]
42. Conner, K.B.; Cohen, P.R. Cutaneous Metastasis of Breast Carcinoma Presenting as Alopecia Neoplastica. *South. Med. J.* **2009**, *102*, 385–389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Skafida, E.; Triantafyllopoulou, I.; Flessas, I.; Liontos, M.; Koutsoukos, K.; Zagouri, F.; Dimopoulos, A.-M. Secondary Alopecia Neoplastica Mimicking Alopecia Areata Following Breast Cancer. *Case Rep. Oncol.* **2020**, *13*, 627–632. [[CrossRef](#)]
44. Lee, H.; Lim, H.S.; Ki, S.Y.; Lee, J.E.; Lee, J.S.; Park, M.H. Cutaneous Scalp Metastases of Malignant Phyllodes Tumor of the Breast. *J. Breast Cancer* **2020**, *23*, 320. [[CrossRef](#)]
45. Schorr, W.F. Alopecia Neoplastica: Hair Loss Resembling Alopecia Areata Caused by Metastatic Breast Cancer. *JAMA* **1970**, *213*, 1335. [[CrossRef](#)]
46. Schwartz, R.A. Histopathologic Aspects of Cutaneous Metastatic Disease. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1995**, *33*, 649–657. [[CrossRef](#)]
47. Azoulay, S.; Adem, C.; Pelletier, F.L.E.; Barete, S.; Frances, C.; Capron, F. Skin Metastases from Unknown Origin: Role of Immunohistochemistry in the Evaluation of Cutaneous Metastases of Carcinoma of Unknown Origin. *J. Cutan. Pathol.* **2005**, *32*, 561–566. [[CrossRef](#)]
48. Lewis, G.H.; Subhawong, A.P.; Nassar, H.; Vang, R.; Illei, P.B.; Park, B.H.; Argani, P. Relationship Between Molecular Subtype of Invasive Breast Carcinoma and Expression of Gross Cystic Disease Fluid Protein 15 and Mammaglobin. *Am. J. Clin. Pathol.* **2011**, *135*, 587–591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Tozbikian, G.H.; Zynger, D.L. A Combination of GATA3 and SOX10 Is Useful for the Diagnosis of Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Hum. Pathol.* **2019**, *85*, 221–227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Llamas-Velasco, M.; Pérez-González, Y.C.; Daudén, E.; Rütten, A. GATA3 Staining in Primary Cutaneous Apocrine Cribiform Carcinoma: Usefulness to Differentiate It from Breast Cancer Metastasis. *J. Cutan. Pathol.* **2018**, *45*, 348–351. [[CrossRef](#)]
51. Valencia-Guerrero, A.; Dresser, K.; Cornejo, K.M. Utility of Immunohistochemistry in Distinguishing Primary Adnexal Carcinoma From Metastatic Breast Carcinoma to Skin and Squamous Cell Carcinoma. *Am. J. Dermatopathol.* **2018**, *40*, 389–396. [[CrossRef](#)]
52. Gan, E.Y.; Chio, M.T.-W.; Tan, W.P. A Retrospective Review of Cutaneous Metastases at the National Skin Centre Singapore: Cutaneous Metastases in Asians. *Australas. J. Dermatol.* **2015**, *56*, 1–6. [[CrossRef](#)]

53. Kapoor, A.; Singhal, M.; Singh, P.; Kumar, V.; Kumar, H.; Singh, D. Cutaneous Metastasis Involving Face in Breast Cancer: A Series of Three Patients. *Clin. Cancer Investig. J.* **2014**, *3*, 545. [[CrossRef](#)]
54. Ferreira, V.A.; Spelta, K.; Diniz, L.M.; Lucas, E.A. Exuberant Case of Cutaneous Metastasis of Breast Cancer. *An. Bras. Dermatol.* **2018**, *93*, 429–431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Utkan, G.; BüyükçeliK, A.; Okçu, A.H.; Avci, U.; Yalçin, B.; İÇli, F. Widespread Erythematous Skin Metastasis from Breast Cancer Mimicking Generalized Drug Eruption. *Turk. J. Cancer* **2009**, *39*, 66–68.
56. Krishnasamy, S.R.; Almazan, T.H.; Suero-Abreu, G.A.; Jung, J.Y. Successful Treatment of Cutaneous Metastatic Breast Cancer with Topical Treatments That Potentially Synergize with Systemic Therapy: A Case Series. *JAAD Case Rep.* **2018**, *4*, 711–715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Schrijver, W.A.; Selenica, P.; Lee, J.Y.; Ng, C.K.Y.; Burke, K.; Piscuoglio, S.; Berman, S.H.; Reis-Filho, J.S.; Weigelt, B.; Van Diest, P.J.; et al. Mutation Profiling of Key Cancer Genes in Primary Breast Cancers and Their Distant Metastases. *Cancer Res.* **2018**, *78*, 3112–3121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Paul, M.R.; Pant, D.K.; Shih, N.N.C.; Chen, Y.; Harvey, K.L.; Solomon, A.; Lieberman, D.; Morrisette, J.J.D.; Soucier-Ernst, D.; Goodman, N.G.; et al. Genomic Landscape of Metastatic Breast Cancer Identifies Preferentially Dysregulated Pathways and Targets. *J. Clin. Investig.* **2020**, *130*, 4252–4265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Roy-Chowdhuri, S.; de Melo Gagliato, D.; Routbort, M.J.; Patel, K.P.; Singh, R.R.; Broaddus, R.; Lazar, A.J.; Sahin, A.; Alvarez, R.H.; Moulder, S.; et al. Multigene Clinical Mutational Profiling of Breast Carcinoma Using Next-Generation Sequencing. *Am. J. Clin. Pathol.* **2015**, *144*, 713–721. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Kjällquist, U.; Erlandsson, R.; Tobin, N.P.; Alkodsı, A.; Ullah, I.; Stållhammar, G.; Karlsson, E.; Hatschek, T.; Hartman, J.; Linnarsson, S.; et al. Exome Sequencing of Primary Breast Cancers with Paired Metastatic Lesions Reveals Metastasis-Enriched Mutations in the A-Kinase Anchoring Protein Family (AKAPs). *BMC Cancer* **2018**, *18*, 174. [[CrossRef](#)]
61. Rinaldi, J.; Sokol, E.S.; Hartmaier, R.J.; Trabucco, S.E.; Frampton, G.M.; Goldberg, M.E.; Albacker, L.A.; Daemen, A.; Manning, G. The Genomic Landscape of Metastatic Breast Cancer: Insights from 11,000 Tumors. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0231999. [[CrossRef](#)]
62. Tian, C.; Liu, S.; Wang, Y.; Song, X. Prognosis and Genomic Landscape of Liver Metastasis in Patients With Breast Cancer. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 588136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Huang, R.S.P.; Haberberger, J.; McGregor, K.; Mata, D.A.; Decker, B.; Hiemenz, M.C.; Lechpammer, M.; Danziger, N.; Schiavone, K.; Creeden, J.; et al. Clinicopathologic and Genomic Landscape of Breast Carcinoma Brain Metastases. *Oncology* **2021**, *26*, 835–844. [[CrossRef](#)]
64. Goswami, R.S.; Patel, K.P.; Singh, R.R.; Meric-Bernstam, F.; Kopetz, E.S.; Subbiah, V.; Alvarez, R.H.; Davies, M.A.; Jabbar, K.J.; Roy-Chowdhuri, S.; et al. Hotspot Mutation Panel Testing Reveals Clonal Evolution in a Study of 265 Paired Primary and Metastatic Tumors. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 2644–2651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. van Geelen, C.T.; Savas, P.; Teo, Z.L.; Luen, S.J.; Weng, C.-F.; Ko, Y.-A.; Kuykhoven, K.S.; Caramia, F.; Salgado, R.; Francis, P.A.; et al. Clinical Implications of Prospective Genomic Profiling of Metastatic Breast Cancer Patients. *Breast Cancer Res.* **2020**, *22*, 91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Richard, F.; Majjaj, S.; Venet, D.; Rothé, F.; Pingitore, J.; Boeckx, B.; Marchio, C.; Clatot, F.; Bertucci, F.; Mariani, O.; et al. Characterization of Stromal Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Genomic Alterations in Metastatic Lobular Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2020**, *26*, 6254–6265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Moelans, C.B.; van der Groep, P.; Hoefnagel, L.D.C.; van de Vijver, M.J.; Wesseling, P.; Wesseling, J.; van der Wall, E.; van Diest, P.J. Genomic Evolution from Primary Breast Carcinoma to Distant Metastasis: Few Copy Number Changes of Breast Cancer Related Genes. *Cancer Lett.* **2014**, *344*, 138–146. [[CrossRef](#)]
68. Curigliano, G.; Bagnardi, V.; Bertolini, F.; Alcalay, M.; Locatelli, M.A.; Fumagalli, L.; Rabascio, C.; Calleri, A.; Adamoli, L.; Criscitiello, C.; et al. Antiangiogenic Therapy in Recurrent Breast Cancer with Lymphangitic Spread to the Chest Wall: A Randomized Phase II Trial of Bevacizumab with Sequential or Concurrent Oral Vinorelbine and Capecitabine. *Breast* **2015**, *24*, 263–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Muller, K.E.; Marotti, J.D.; de Abreu, F.B.; Peterson, J.D.; Miller, T.W.; Chamberlin, M.D.; Tsongalis, G.J.; Tafe, L.J. Targeted Next-Generation Sequencing Detects a High Frequency of Potentially Actionable Mutations in Metastatic Breast Cancers. *Exp. Mol. Pathol.* **2016**, *100*, 421–425. [[CrossRef](#)]
70. Lehmann, B.D.; Pietsenpol, J.A. Clinical Implications of Molecular Heterogeneity in Triple Negative Breast Cancer. *Breast* **2015**, *24*, S36–S40. [[CrossRef](#)]